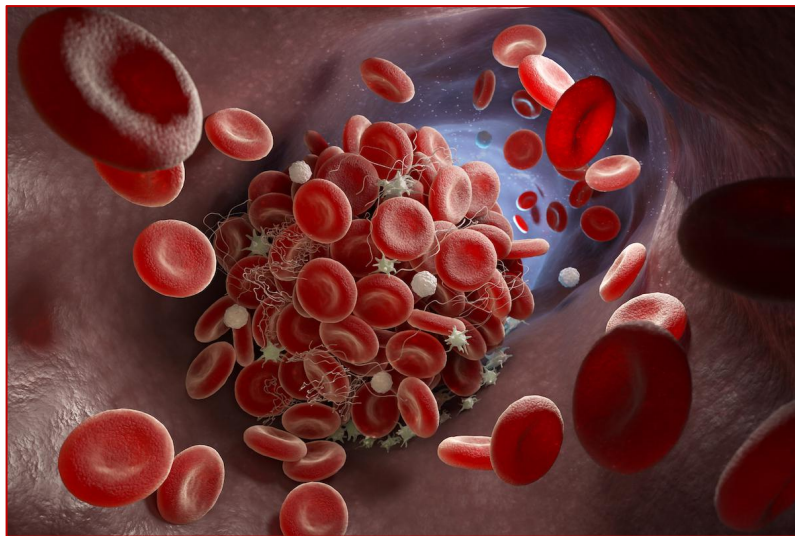




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΙΑΤΡΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ

Διπλωματική ερευνητική εργασία με τίτλο:
**“Η οξείδωση ως δείκτης ποιότητας των
αποθηκευμένων αιμοπεταλίων”**



Όνοματεπώνυμο φοιτήτριας: Ηλιάδη Νεκταρία

Αριθμός Μητρώου: 19678077

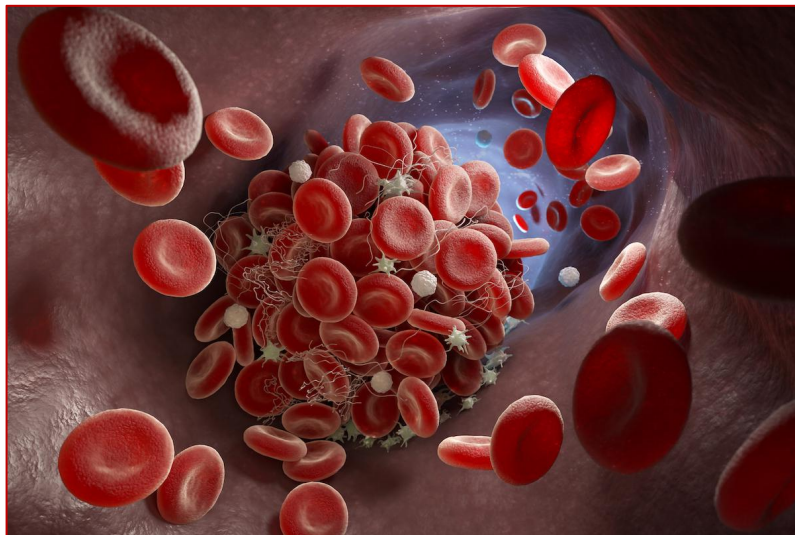
Επιβλέπων καθηγητής: Φόρτης Σωτήριος

Αθήνα, 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

Diploma thesis:
**“Oxidization as quality marker of
stored platelets”**



Student name: Iliadi Nektaria

Registration number: 19678077

Supervisor: Fortis Sotirios

Athens, 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΙΑΤΡΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ

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

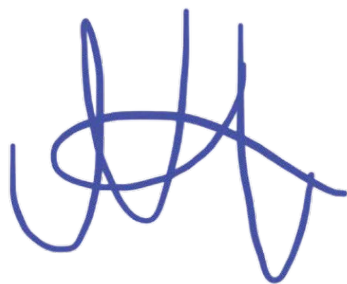
Η διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι εξεταστική επιτροπή:

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΑΔΑ / ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
ΠΑΥΛΟΥ ΕΥΘΥΜΙΑ	ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ	
ΜΠΙΡΤΣΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ	ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟΣ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ	
ΦΟΡΤΗΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ	ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟΣ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Ηλιάδη Νεκταρία, με αριθμό μητρώου 19678077 φοιτήτρια 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”.

Η Δηλούσα



Εισηγητής: Φόρτης Σωτήριος

Ακαδημαϊκός Υπότροφος

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πίνακας εικόνων και διαγραμμάτων.....	7
Πίνακας συντομογραφιών.....	8
Περίληψη.....	8
Abstract.....	12
Κεφάλαιο 1. Το αιμοπετάλιο.....	13
1.1. Γενικά.....	13
1.2. Ρόλος.....	13
1.3. Αυξητικοί παράγοντες.....	14
1.4. Κατασταλτικοί παράγοντες ενεργοποίησης αιμοπεταλίων.....	14
1.5. Στάδια αιμόστασης:.....	15
1.6. Επεξήγηση των σταδίων αιμόστασης.....	16
Στάδιο Έναρξης.....	16
Στάδιο Επέκτασης.....	17
Στάδιο Σταθεροποίησης.....	18
Κεφάλαιο 2. Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια.....	19
2.1. Εισαγωγή.....	19
2.2. Τι είναι το PRP;.....	19
2.3. Ταξινόμηση του PRP.....	20
2.4. Τρόπος λήψης πακεταρισμένων αιμοπεταλίων.....	21
2.5. Βήματα προετοιμασίας του PRP.....	22
2.6. Εφαρμογές του PRP.....	24
Κεφάλαιο 3. Ανοσοφθορισμός και φθορίζουσες ουσίες.....	26
3.1. Ιστορική αναδρομή.....	26
3.2. Άμεσος και Έμμεσος Ανοσοφθορισμός.....	26
3.3. Πλεονεκτήματα έμμεσου ανοσοφθορισμού.....	27
Κεφάλαιο 4. Κυτταρομετρία ροής.....	28
4.1. Λειτουργία Κυτταρομετρητή Ροής.....	28

4.2.	Αναλυτική περιγραφή της λειτουργίας του κυτταρόμετρου φθορισμού.....	28
	Σύστημα νηματικής ροής.....	28
	Οπτικό σύστημα.....	29
	Ηλεκτρονικό σύστημα.....	30
4.3.	Εφαρμογές κυτταρομετρητή ροής.....	30
4.4.	Κυτταρομετρία ροής και διαταραχές αιμοπεταλίων.....	31
	4.4.1. Κληρονομικές αιμορραγικές διαταραχές.....	32
	4.4.2. Επίκτητες αιμορραγικές διαταραχές.....	32
Κεφάλαιο 5. Η σημασία των μεταγγίσεων αιμοπεταλίων.....		33
5.1.	Εισαγωγή.....	33
5.2.	Η οξειδωση των αιμοπεταλίων.....	33
	5.2.1. Τι είναι οι δραστικές ρίζες οξυγόνου;.....	34
	5.2.2. Τρόπος ανίχνευσης των ROS.....	35
Κεφάλαιο 6. Υλικά και μέθοδοι.....		36
6.1.	Αντιδραστήρια, συσκευές και όργανα.....	36
	6.1.1. Διαλύματα - Αντιδραστήρια.....	36
	6.1.2. Αναλώσιμα.....	36
	6.1.3. Όργανα και συσκευές.....	36
6.2.	Μέθοδοι.....	37
	6.2.1. Προετοιμασία ασκών.....	37
	6.2.2. Προετοιμασία δείγματος.....	37
	6.2.3. Μέτρηση στο κυτταρόμετρο ροής.....	39
	6.2.4. Στατιστική ανάλυση.....	39
Κεφάλαιο 7. Αποτελέσματα.....		40
Κεφάλαιο 8. Συζήτηση.....		43
Βιβλιογραφία.....		45

Πίνακας εικόνων και διαγραμμάτων

Εικόνα 1: Το σχεδιάγραμμα απεικονίζει την αποδομή του ινώδους σε D-διμερές.....	16
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής της μήτρας και των κυττάρων των τεσσάρων κατηγοριών των συμπυκνωμάτων των αιμοπεταλίων. Δύο σημαντικοί παράμετροι είναι: η περιεκτικότητα σε λευκοκύτταρα (μπλε σφαιρίδια) και η πυκνότητα του ινώδους (κιτρινόχρωες ίνες).....	21
Εικόνα 3: Πρωτόκολλο συλλογής πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) μέσω διαδικασίας φυγοκέντρησης δύο σταδίων.....	23
Εικόνα 4: Διάγραμμα ροής παρασκευασμάτων παραγώγων αιμοπεταλίων.....	24
Πίνακας 1 Στον πίνακα απεικονίζονται οι διαταραχές των αιμοπεταλίων οι οποίες διακρίνονται σε κληρονομικές και επίκτητες και μπορούν να ανιχνευτούν με κυτταρομετρία φθορισμού.....	32
Διάγραμμα 1: Ιστόγραμμα έκφρασης του ποσοστού των ROS των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και μελετήθηκαν την 1 ^η , 5 ^η , 10 ^η και 15 ^η ημέρα αποθήκευσης. Απεικονίζεται η μέση τιμή του ποσοστού των ROS για κάθε ημέρα και η τυπική απόκλιση.....	40
Διάγραμμα 2: Ιστόγραμμα έκφρασης του ποσοστού των ROS των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν στους 4°C και μελετήθηκαν την 1 ^η , 5 ^η , 10 ^η και 15 ^η ημέρα αποθήκευσης. Απεικονίζεται η μέση τιμή του ποσοστού των ROS για κάθε ημέρα και η τυπική απόκλιση.....	41
Διάγραμμα 3: Ιστόγραμμα που συνδυάζει το ποσοστό έκφρασης των ROS των αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και στους 4°C της 1 ^{ης} , 5 ^{ης} , 10 ^{ης} και 15 ^{ης} ημέρας μελέτης τους.....	42

Πίνακας συντομογραφιών

ROS	δραστικές ρίζες οξυγόνου
IL-6	ιντερλευκίνη 6
EGF	επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
PF	αιμοπεταλιακός παράγοντας
VEGF	αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
TGF-β1	μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας-β1
ECM	εξωκυτταρική μήτρα
PGI2	προσταγλανδίνη I2
vWF	παράγοντας von Willebrand
GPIb	γλυκοπρωτεΐνη Ib
TxA2	θρομβοξάνη A2
PRP	πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
L-PRP	πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα
P-PRP	καθαρό πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
PRP-F	καθαρό ιώδες πλούσιο σε αιμοπετάλια
L-PRF	ιώδες πλούσιο σε λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια
PC	συμπυκνωμένα αιμοπετάλια / φυκοκυανίνη
PPP	πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια
RBCs	ερυθροκύτταρα
ΔΕΠ	διάχυτη ενδαγγειακή πήξη
FITC	ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη
TRITC	ισοθειοκυανική τετραμεθυλοδαμίνη
PE	φυκοερυθρίνη
FS	πρόσθιος σκεδασμός

SS	κάθετος σκεδασμός
FL	παραγόμενος φθορισμός

Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε την περίοδο Φεβρουάριος 2023 - Ιανουάριος 2024 στα πλαίσια των προπτυχιακών μου σπουδών στο Ερευνητικό Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία, του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Για αρχή, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Φόρτη Σωτήριο, Ακαδημαϊκό Υπότροφο του τμήματος, για την πολύτιμη βοήθειά του τόσο κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών όσο 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 τον κύριο Αναστάσιο Κριεμπάρδη, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου, που μου έδωσε την ευκαιρία να είμαι στο εργαστήριό του και την τιμή να συνεργαστούμε στο συγκεκριμένο ερευνητικό πρόγραμμα. Το πάθος και η αγάπη για το αντικείμενο, οι γνώσεις, οι συμβουλές και η εργαστηριακή του ηθική συνετέλεσαν αδιαμφισβήτητα στην εκπαίδευση και την επιστημονική μου ταυτότητα.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Παύλου Ευθυμία, Ακαδημαϊκή Υπότροφο, που από μικρότερα κιόλας εξάμηνα μου μετέδωσε την αγάπη της για το αντικείμενο, και τον κύριο Μπίρτσα Βασίλειο, Ακαδημαϊκό Υπότροφο, για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου για την εξαιρετικά αμοιβαία συνεργασία μας κατά τη διεξαγωγή των διαφόρων πειραμάτων, καθώς και την οικογένειά μου για τη συνεχή ενθάρρυνση καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Η θρομβοπενία αποτελεί μία από τις σοβαρότερες αιμοπεταλιακές διαταραχές, γεγονός το οποίο αυξάνει την ανάγκη μετάγγισης των αιμοπεταλίων. Οι συνθήκες και η διάρκεια αποθήκευσης των αιμοπεταλίων, όμως, επηρεάζουν σημαντικά τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους. Τα αιμοπετάλια παράγουν φυσιολογικά στα μιτοχόνδριά τους δραστικές ρίζες οξυγόνου, υψηλά αντιδραστικά μόρια με ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια παραγόμενα από τη μείωση του οξυγόνου, τα οποία διεγείρονται ενδογενώς από τις κυτοκίνες και την είσοδο μικροοργανισμών βακτηριακής φύσης. Η παραγωγή των ριζών αυτών αυξάνεται σε συνθήκες αποθήκευσης των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα να αλλοιώνεται η ποιότητά τους για μετάγγιση. Συνεπώς η επιμήκυνση της ζωής και της ποιότητας των αιμοπεταλίων παίζει σημαντικό ρόλο για μια επιτυχή μετάγγιση. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η ανίχνευση των δραστικών ριζών οξυγόνου σε τέσσερα δείγματα πακεταρισμένων αιμοπεταλίων και πως τα επίπεδα τους μεταβάλλονται σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης. Συγκεκριμένα, η αποθήκευση πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές συνθήκες: σε θερμοκρασία δωματίου και στους 4°C. Η μέτρηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου των αιμοπεταλίων πραγματοποιήθηκε σε τέσσερα χρονικά σημεία, δηλαδή την 1^η, 5^η, 10^η και 15^η μέρα αποθήκευσης των αιμοπεταλίων. Ως πρώτη ημέρα, ορίστηκε η ημέρα λήψης τους. Έγινε σύγκριση των επιπέδων των ROS, στις δύο διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης στα τέσσερα χρονικά σημεία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι χρειάζονται περαιτέρω μελέτες με περισσότερα δείγματα προκειμένου να βγει ένα αξιόπιστο συμπέρασμα. Έτσι, μπορούμε να αναδείξουμε τα πιθανά πλεονεκτήματα των παγωμένων αιμοπεταλίων ως προς τη βιωσιμότητα τους κατά την αποθήκευση, χρησιμοποιώντας μια σειρά από δείκτες του μεταβολισμού τους, καθώς και την αποτελεσματικότητά τους στη διατήρηση της αιμόστασης, με βάση τις υπάρχουσες κλινικές μελέτες.

Λέξεις κλειδιά: κυτταρομετρία ροής, μετάγγιση αιμοπεταλίων, οξειδωση αιμοπεταλίων, αποθήκευση αιμοπεταλίων, παγωμένα αιμοπετάλια

Abstract

Thrombocytopenia is one of the most severe platelet disorders which leads to the increasing need for platelet transfusion. However, the conditions and the storage duration of platelets affect their quality significantly. Platelets produce reactive oxygen radicals in their mitochondria in a natural way, molecules which are highly reactive and contain one or more single electrons produced by the reduction of oxygen via endogenous stimulation by cytokines and the entry of bacteria. During storage conditions there is an increase of these radicals in platelets which leads to the deterioration of the platelets' quality for transfusion. Therefore prolonging the lifespan and quality of platelets plays an important role for a successful transfusion. The purpose of this study is the detection of reactive oxygen species in four samples of packed platelets and how their levels alter in different storage conditions. The storage was specifically carried out in two different conditions: at room temperature and at 4°C. The measurement of the platelets' free oxygen radicals was performed at four time points, i.e. on the 1st, 5th, 10th and 15th day of platelet storage. The day of their collection was defined as the 1st day. A comparison was made of the levels of reactive oxygen species between the two storage conditions at the four time points. The results showed that further research needs to be conducted using a larger quantity of samples in order to come to a reliable conclusion. In this way, we are able to highlight the potential advantages of frozen platelets in terms of their viability during storage, using a number of markers of their metabolism, as well as their effectiveness in maintaining hemostasis based on existing clinical studies.

Key words: flow cytometry, platelet transfusion, platelet lesion, platelet storage, frozen platelets

Κεφάλαιο 1. Το αιμοπετάλιο

1.1. Γενικά

Τα αιμοπετάλια είναι απύρρηνα κύτταρα του αίματος διαμέτρου 2 με 4 μm με πολλαπλές λειτουργίες. Έχουν σύντομη διάρκεια ζωής στην κυκλοφορία του αίματος που κυμαίνεται από 7 έως 10 μέρες στον άνθρωπο. Η διαδικασία παραγωγής των αιμοπεταλίων ξεκινάει στο μυελό των οστών με πρώτο στάδιο τη διαφοροποίηση των πολυδύναμων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε μεγακαρυοκύτταρα (διαμέτρου 50-100 μm). Τα μεγακαρυοκύτταρα με τη σειρά τους αποβάλλουν πολυάριθμες μακροκλαδισμένες προεξοχές, δηλαδή τα αιμοπετάλια. [1] Περιέχουν περισσότερες από 30 βιοδραστικές πρωτεΐνες, πολλές από τις οποίες έχουν θεμελιώδη ρόλο στην αιμόσταση ή την επούλωση ιστών. [2] Η θρομβοποίηση ρυθμίζεται από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, με τον αρνητικό μηχανισμό ανατροφοδότησης της θρομβοποιητίνης να ολοκληρώνει τη θρομβοκυτταρογένεση. Η θρομβοποιητίνη, η οποία παράγεται από το ήπαρ, διεγείρει τους αντίστοιχους υποδοχείς στα μεγακαρυοκύτταρα για να προκαλέσει το σχηματισμό των αιμοπεταλίων μέσω ενός μηχανισμού που ενεργοποιείται σε συνθήκες χαμηλού αριθμού αιμοπεταλίων στο αίμα. [3] Σε συνθήκες φλεγμονής, η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) ενισχύει την διαδικασία σχηματισμού των αιμοπεταλίων με την αύξηση της θρομβοποιητίνης. [4]

1.2. Ρόλος

Τα αιμοπετάλια, ή αλλιώς θρομβοκύτταρα κατέχουν έναν κρίσιμο ρόλο στην αιμόσταση, ο οποίος περιλαμβάνει την απόφραξη των φυσιολογικών σχισμών και κενών που δημιουργούνται μεταξύ των κυττάρων των τριχοειδικών αγγείων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν ελεύθερα μέσα στα αγγεία χωρίς να προσκολλώνται στο τοίχωμά τους χάρη στη θρομβοπροστατευτική ιδιότητα του ενδοθηλίου και των αιμοπεταλίων αντίστοιχα. [5]

1.3. Αυξητικοί παράγοντες

Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό των αιμοπεταλίων είναι η ρύθμιση φλεγμονής και επούλωση πληγών. Τα αιμοπετάλια περιέχουν α-κόκκους που διαθέτουν διάφορες πρωτεΐνες, κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Κάποια παραδείγματα αποτελούν ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF), παράγοντας αγγειογένεσης, αυξητικός παράγοντας όμοιος της ινσουλίνης, αιμοπεταλιακός παράγοντας (Platelet Factor, PF), μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας-β1 (Transforming growth factor-β1, TGF-β1), και αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth factor, VEGF). Μόλις ενεργοποιηθούν στο σημείο τραυματισμού, τα αιμοπετάλια αποκοκκιώνονται, απελευθερώνοντας αυτές τις βιοδραστικές ουσίες που διευκολύνουν τη χημειοταξία, την κυτταροπροστασία, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων, την αγγειογένεση και την αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας (Extracellular Matrix, ECM). [6]

1.4. Κατασταλτικοί παράγοντες ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

Το αγγειακό ενδοθήλιο διαρκώς αποτρέπει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω πολλαπλών μηχανισμών, εκ των οποίων οι πιο μελετημένοι είναι:

- Οι εκτονουκλεοτιδάσες (αποικοδομούν τα μόρια ATP και ADP)
- Η θρομβομοντουλίνη (αδρανοποιεί τη θρομβίνη)
- Η απελευθέρωση προσταγλανδίνης I₂ (ή PGI₂ ή προστακυκλίνη)
- Το μονοξείδιο του αζώτου

Το μονοξείδιο του αζώτου και η PGI₂ καταστέλλουν τις περισσότερες διαδικασίες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, όπως καταγράφονται και παρακάτω:

- Προσκόλληση
- Σχηματισμός ψευδόποδων
- Έκκριση

- Συσσωμάτωση
- Προπηκτική δράση

Η επικράτουσα έννοια είναι ότι η καταστολή αυτή είναι εξασθενημένη στο σημείο του αγγειακού τραυματισμού, από διάβρωση ή ρήξη μιας αθηρωματικής πλάκας ή από αγγειακή φλεγμονή (κυτοκίνη και απελευθέρωση παράγοντα von Willebrand (vWF)). [3]

Κατά τη διάρκεια μιας αγγειακής βλάβης, η εξάπλωση και προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο σημείο του τραυματισμού θεωρείται το πρώτο και πιο κρίσιμο στάδιο σχηματισμού θρόμβου στην αιμόσταση για τον έλεγχο της αιμορραγίας. [5]

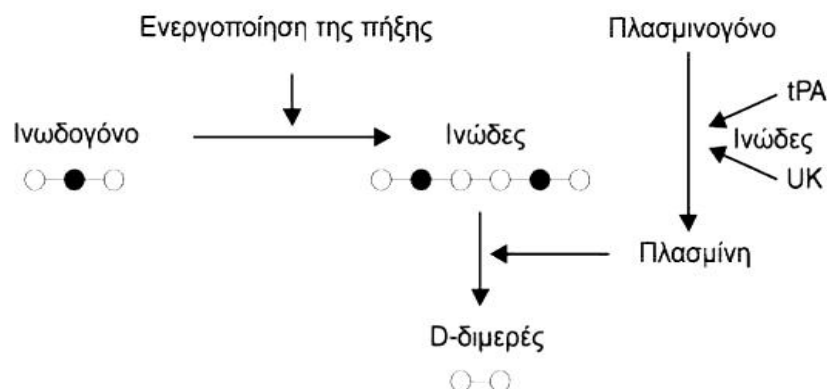
1.5. Στάδια αιμόστασης

Παρακάτω παρατίθενται περιληπτικά τα στάδια της αιμόστασης. Η σειρά με την οποία περιγράφονται στη συνέχεια, δεν αντιπροσωπεύει την πραγματικότητα, καθώς όλα τα στάδια συμβαίνουν την ίδια χρονική στιγμή.

- I. Σύσπαση αγγείου στο σημείο του τραυματισμού
- II. Αρχική αιμόσταση
- III. Πήξη αίματος
- IV. Ινωδόλυση

Η καταστροφή των αιμοπεταλίων και η έξοδος του αίματος από τα αγγεία πυροδοτούν την απελευθέρωση της θρομβοπλαστίνης, η οποία σε συνδυασμό με ιόντα ασβεστίου μετατρέπει την ανενεργή προθρομβίνη (ένζυμο πήξης) που υπάρχει ελεύθερη στο αίμα, σε δραστικό ένζυμο, τη θρομβίνη. Ιδιότητα της θρομβίνης είναι η μετατροπή του ινωδογόνου (λεύκωμα πλάσματος) σε ινώδες. Το ινωδογόνο, πρωτεΐνη οξείας φάσης και πρώτη ύλη για τη δημιουργία θρόμβου, επίσης παράγεται στο ήπαρ. Είναι το υπόστρωμα της θρομβίνης, η οποία αποσπά τα ινωδοπεπτίδια Α και Β από το ινωδογόνο, ώστε το υπόλοιπο μόριο να πολυμεριστεί σε ινική. Το ινώδες σε συνεργασία με τα ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια καθώς και με τα αιμοπετάλια,

σχηματίζει τον πλακούντα, δηλαδή το αίμα που έχει πήξει, περικλείοντας το υγρό μέρος του αίματος. [7]



Εικόνα 1: Το σχεδιάγραμμα απεικονίζει την αποδομή του ινώδους σε D-διμερές. Με την ενεργοποίηση της πήξης, ξεκινάει η παραγωγή του ινωδογόνου που μετατρέπεται σε ινώδες και εν τέλει σε D-διμερές μέσω της πλασμίνης. Το πλασμινογόνο που υπάρχει ήδη στο αίμα επίσης ενεργοποιείται και ενισχύει τον σχηματισμό του D-διμερούς αφού πρώτα μετατραπεί σε πλασμίνη με την βοήθεια παραγόντων. [7]

1.6. Επεξήγηση των σταδίων αιμόστασης

Στάδιο Έναρξης

Η αιμόσταση πυροδοτείται από την έκθεση του αίματος λόγω ρήξης του τοιχώματος του αγγείου. Κατά τη διάρκεια της φάσης έναρξης, τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια συγκεντρώνονται στο σημείο τραυματισμού μέσω συγκολλητικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του παράγοντα von Willebrand (vWf) συνδεδεμένο με ίνες κολλαγόνου στο τοίχωμα του αγγείου και του συμπλέγματος υποδοχέα αιμοπεταλίων γλυκοπρωτεΐνης Ib (GPIb)-IX-V. [8]

Ο παράγοντας vWf φυσιολογικά:

- ❖ Βρίσκεται να κυκλοφορεί στο πλάσμα σε ανενεργή μορφή
- ❖ Εκκρίνεται από ενδοθηλιακά κύτταρα ως μέρος της εξωκυτταρικής μήτρας

- ❖ Εκκρίνεται από τα σωματίδια Weibel-Palade των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων [8]

Μετά τον τραυματισμό του τοιχώματος του αγγείου, ο ελεύθερος παράγοντας vWf που κυκλοφορεί, εναποτίθεται στις ίνες κολλαγόνου του τοιχώματος. [9] Οι δυνάμεις διάτμησης οδηγούν στο ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα την έκθεση πολλών θέσεων δέσμευσης για την γλυκοπρωτεΐνη στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Εξαιτίας της ασθενούς αλληλεπίδρασης μεταξύ του παράγοντα vWf και GPIIb, απαιτούνται περαιτέρω συγκολλητικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες προκαλούνται από μόρια προσκόλλησης της οικογένειας των ιντεγκρινών που βρίσκονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. [8]

Τα μόρια αυτά ενισχύουν την πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο σημείο τραυματισμού και περιλαμβάνουν:

- A. Την ιντεγκρίνη $\alpha 2\beta 1$ που συνδέεται με το κολλαγόνο και
- B. Την ιντεγκρίνη $\alpha 1\text{Ib}\beta 3$ που συνδέεται με τον παράγοντα vWf και άλλους συνδέτες

Για τη σύνδεση των ιντεγκρινών των αιμοπεταλίων καθίσταται απαραίτητη η μετάβασή τους από κατάσταση ηρεμίας σε κατάσταση ενεργοποίησης. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων κατά τη φάση έναρξης πιθανώς μεσολαβείται μέσω πολλαπλών οδών σηματοδότησής τους, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης του υποδοχέα GPVI του κολλαγόνου, των υποδοχέων ATP και ADP (με την απελευθέρωση των μορίων αυτών από κατεστραμμένα κύτταρα) και μεταγενέστερης σηματοδότησης του συμπλέγματος GPIIb-IX-V. [8]

Στάδιο Επέκτασης

Μετά την αρχική προσκόλληση και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, επιπρόσθετα αιμοπετάλια λαμβάνονται από την κυκλοφορία για το σχηματισμό ενός συσσωματώματος αιμοπεταλίων. Το συσσωμάτωμα αυτό ενισχύεται κυρίως από τη δέσμευση του ινωδογόνου του πλάσματος στην ιντεγκρίνη $\alpha 1\text{Ib}\beta 3$. Κάθε μόριο ινωδογόνου διαθέτει δύο θέσεις δέσμευσης της ιντεγκρίνης $\alpha 1\text{Ib}\beta 3$ και έτσι μεσολαβείται η δέσμευση των υποδοχέων μεταξύ γειτονικών αιμοπεταλίων. Αυτό επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από μόρια ADP, τα οποία

απελευθερώνονται από τους πυκνούς κόκκους των αιμοπεταλίων, και τη θρομβοξάνη A₂ (TxA₂), η οποία παράγεται από τα αιμοπετάλια που έχουν ήδη προσκολληθεί στο σημείο τραυματισμού. [8]

Στάδιο Σταθεροποίησης

Μόλις σχηματιστεί το συσσωμάτωμα ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στο σημείο τραυματισμού, είναι αναγκαία η σταθεροποίησή του στο σημείο προκειμένου να μην παρασυρθεί από τη δύναμη της ροής του αίματος και οδηγήσει σε επαναιμορραγία. Εκτός από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η θρομβίνη μετατρέπει το ινωδογόνο σε ιώδες, σχηματίζοντας ένα δίκτυο ιών ιώδους που συνεισφέρει στην σταθεροποίηση του συσσωματώματος των αιμοπεταλίων. Η σταθεροποίηση επιπλέον επιτυγχάνεται με τη συστολή των αιμοπεταλίων με τη μεσολάβηση της ακτίνης-μυοσίνης. [8]

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ενισχύεται με τη θετική ανατροφοδότηση (positive feedback) από διαλυτούς αγωνιστές (δηλαδή τη θρομβίνη, ADP, θρομβοξάνη A₂), καθώς και από μονοπάτια σηματοδότησης που ξεκινούν με τη στενή επαφή των αιμοπεταλίων μεταξύ τους, με αποτέλεσμα ο υποδοχέας του ενός να συνδεθεί με τη θέση σύνδεσης του άλλου. [8]

Και πάλι, η ιντεγκρίνη α11bβ3 έχει ένα σημαντικό ρόλο στο στάδιο αυτό, ενεργώντας ως ένα σηματοδοτικό μόριο που ρυθμίζει τις διαδικασίες συστολής των αιμοπεταλίων. [8]

Τα μονοπάτια σηματοδότησης ολοκληρώνονται όταν πραγματοποιείται: [8]

- Ενεργοποίηση ιντεγκρίνης α11bβ3
- Σύσσωμάτωση αιμοπεταλίων
- Έκκριση κόκκων αιμοπεταλίων
- Παραγωγή θρομβοξάνης
- Σύστολή αιμοπεταλίων

Κεφάλαιο 2. Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια

2.1. Εισαγωγή

Η αρχική ιδέα του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια (Platelet Rich Plasma, PRP) περιγράφηκε και χρησιμοποιήθηκε από τους αιματολόγους τη δεκαετία του '70 όταν το χρησιμοποιούσαν ως προϊόν μετάγγισης για τη θεραπεία ασθενών με θρομβοπενία. Η Ferrari το χρησιμοποίησε ως συστατικό αυτόλογης μετάγγισης μετά από εγχείρηση ανοιχτής καρδιάς για την αποφυγή μετάγγισης προϊόντων του αίματος και αργότερα βρέθηκε ότι το PRP αυξάνει το ρυθμό με τον οποίο ωριμάζει το οστικό μόσχευμα των οδοντικών εμφυτευμάτων, καθώς και τη δοκιδωτή οστική πυκνότητα. Το 2006 θεωρήθηκε δυνητικά χρήσιμο συμπλήρωμα για τη θεραπεία της ανδρογενετικής αλωπεκίας. Τις τελευταίες πέντε δεκαετίες από την ανακάλυψή του, το PRP έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες ειδικότητες και σε πολλές διαφορετικές μορφές.[10] Για την έρευνά μας χρησιμοποιήθηκε PRP ώστε να εξετάσουμε την πλειονότητα των αιμοπεταλίων και πόση οξείδωση μπορεί να προκληθεί από την αποθήκευση του πλάσματος ανάλογα με τις συνθήκες διατήρησης.

2.2. Τι είναι το PRP;

Το PRP είναι η συγκέντρωση των αυτόλογων ανθρώπινων αιμοπεταλίων σε ένα μικρό όγκο πλάσματος που παράγεται με φυγοκέντρηση του αίματος του ίδιου του ασθενούς. Τα αιμοπετάλια περιέχουν ένα περιβάλλον αυξητικών παραγόντων και μεσολαβητών στους άλφα κόκκους τους τα οποία συμπυκνώνονται μέσω της διαδικασίας της φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια παραδίδονται σε κάποιο σημείο τραυματισμού για την αύξηση του ρυθμού της φυσικής διαδικασίας επούλωσης του σώματος. Ο φυσιολογικός αριθμός των αιμοπεταλίων στο σώμα κυμαίνεται από 150.000 έως 350.000 αιμοπετάλια / ml. [11]

2.3. Ταξινόμηση του PRP

Η βιβλιογραφία που αναφέρεται στο PRP είναι αξιοσημείωτη αλλά τα δημοσιεύματα είναι συχνά αντιφατικά μεταξύ τους. Η ταξινόμηση και ερμηνεία των δεδομένων καθίσταται δύσκολη λόγω των πολλών τεχνικών προετοιμασίας, ορολογιών και μορφών των υλικών που χρησιμοποιούνται για τη συλλογή του PRP, καθώς και ο ατελείωτος κατάλογος των πιθανών εφαρμογών.[2]

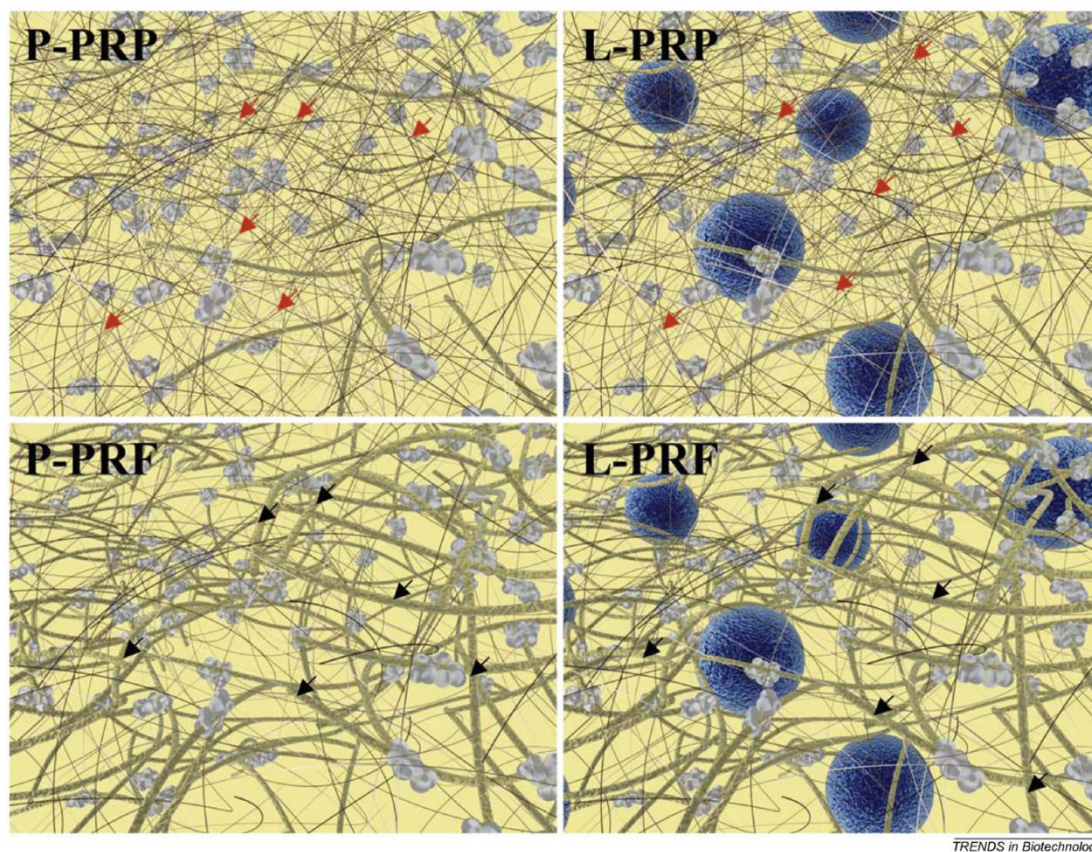
Με κριτήριο την περιεκτικότητα σε κύτταρα και την αρχιτεκτονική των ινών, ορίζονται τέσσερις κύριες οικογένειες παρασκευασμάτων [12]:

1. Καθαρό πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (P-PRP) ή προϊόντα του φτωχού σε λευκοκύτταρα PRP είναι παρασκευάσματα χωρίς λευκοκύτταρα και με δίκτυο ινώδους χαμηλής πυκνότητας μετά την ενεργοποίηση.

2. Τα προϊόντα λευκοκυττάρων και PRP (L-PRP) είναι παρασκευάσματα με λευκοκύτταρα και με χαμηλής πυκνότητας δίκτυο ινώδους μετά την ενεργοποίηση. Η οικογένεια αυτή είναι που χρησιμοποιείται περισσότερο για τα υπάρχοντα εμπορικά και πειραματικά συστήματα. Συγκεκριμένα, πολλά αυτοματοποιημένα πρωτόκολλα έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια, απαιτώντας τη χρήση ορισμένων κιτ που επιτρέπουν τον ελάχιστο χειρισμό των δειγμάτων αίματος και τη μέγιστη τυποποίηση των παρασκευασμάτων.

3. Καθαρό ινώδες πλούσιο σε αιμοπετάλια (P-PRF) ή και φτωχό σε λευκοκύτταρα είναι παρασκευάσματα χωρίς λευκοκύτταρα και με δίκτυο ινώδους υψηλής πυκνότητας. Τα προϊόντα αυτά υπάρχουν μόνο σε μορφή ισχυρά ενεργοποιημένης γέλης και δεν μπορούν να ενεθούν ή να χρησιμοποιηθούν όπως οι κλασικές κόλλες ινώδους.

4. Ινώδες πλούσιο σε λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια (L-PRF) ή τα προϊόντα PRP δεύτερης γενιάς είναι παρασκευάσματα με λευκοκύτταρα και με δίκτυο ινώδους υψηλής πυκνότητας.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής της μήτρας και των κυττάρων των τεσσάρων κατηγοριών των συμπυκνωμάτων των αιμοπεταλίων. Δύο σημαντικοί παράμετροι είναι: η περιεκτικότητα σε λευκοκύτταρα (μπλε σφαιρίδια) και η πυκνότητα του ινώδους (κιτρινόχρωμες ίνες). Τα συσσωματώματα των αιμοπεταλίων (γκρι σχήματα) συγκεντρώνονται πάντα στις ίνες ινώδους. Σε τυπικά παρασκευάσματα P-PRP και L-PRP το δίκτυο ινώδους είναι ανώριμο και αποτελείται κυρίως από ινίδια μικρής διαμέτρου (κόκκινα βέλη) λόγω απλού πολυμερισμού των ινών. Αυτό το δίκτυο ινώδους υποστηρίζει την εφαρμογή των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια μιας επέμβασης αλλά διαλύεται γρήγορα σαν κόλλα ινώδους. Στα παρασκευάσματα P-PRF και L-PRF, οι ίνες του ινώδους είναι παχιές (μαύρα βέλη) λόγω της συγκέντρωσης πολλαπλών ινών και αποτελούν μια ανθεκτική μήτρα που μπορεί να θεωρηθεί ως βιοϋλικό ινώδους. [12]

2.4. Τρόπος λήψης πακεταρισμένων αιμοπεταλίων

Πριν από τη μετάγγιση, τα αιμοπετάλια πρέπει να εξαχθούν από το αίμα και να αποθηκευτούν. Συλλέγονται με μεθόδους αφαίρεσης, όπου επιλέγονται μόνο τα στοχευμένα κύτταρα, αιμοπετάλια στην προκειμένη περίπτωση, παράγοντας έναν ασκό που περιέχει από έναν έως τρεις υποασκούς έτοιμη για περαιτέρω επεξεργασία. Από το ολικό αίμα δύο διαδικασίες είναι εφικτές: η μέθοδος PRP και η μέθοδος του

buffy-coat. Μια ήπια φυγοκέντρηση του ολικού αίματος χρησιμοποιείται για την παραγωγή PRP. Μια επιπλέον φυγοκέντρηση απαιτείται για τη συγκέντρωση των αιμοπεταλίων και έτσι παραλαμβάνονται συμπυκνωμένα αιμοπετάλια (Platelet Concentrate, PC) από τη δεξαμενοποίηση από μονάδες διάφορων δωρεών. Στην περίπτωση της μεθόδου buffy-coat χρησιμοποιείται μια ισχυρή φυγοκέντρηση και τα αιμοπετάλια συγκεντρώνονται μέσα στο στρώμα του buffy-coat. [13]

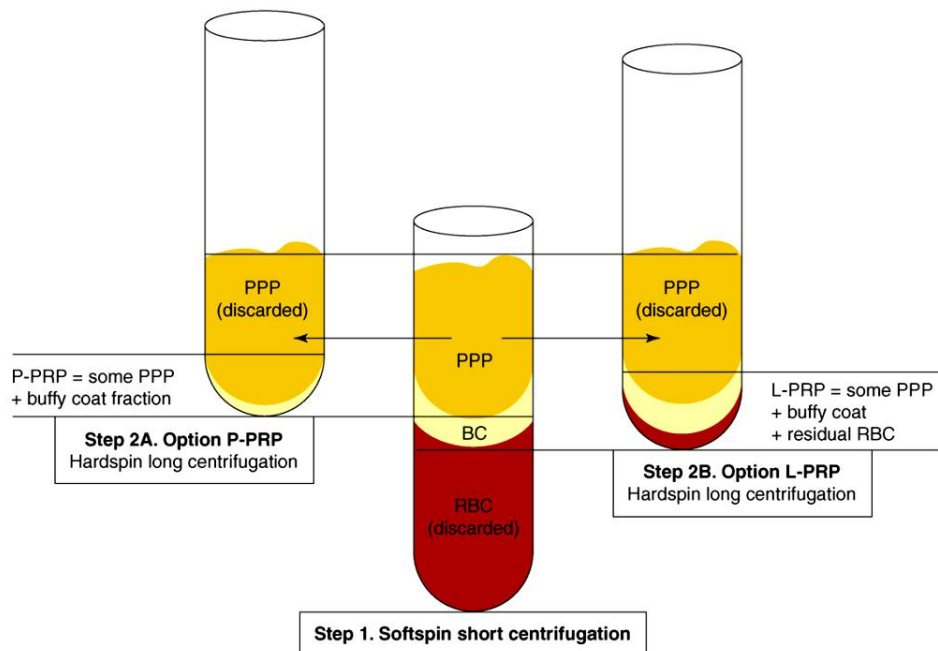
2.5. Βήματα προετοιμασίας του PRP

Το PRP μπορεί να ποικίλλει ανάλογα τη σύνθεσή του και το πρωτόκολλο που ακολουθεί. Κάθε πρωτόκολλο παρ'όλα αυτά ακολουθεί τα εξής βασικά βήματα προετοιμασίας:

1. Συλλογή αίματος
2. Φυγοκέντρηση
3. Αναρρόφηση πλάσματος
4. Δεύτερη φυγοκέντρηση (όχι πάντα)
5. Απομάκρυνση επιλεγμένου υπερκείμενου
6. Ανάμιξη / Επαναιώρηση αιμοπεταλίων
7. Ενεργοποίηση
8. Εφαρμογή

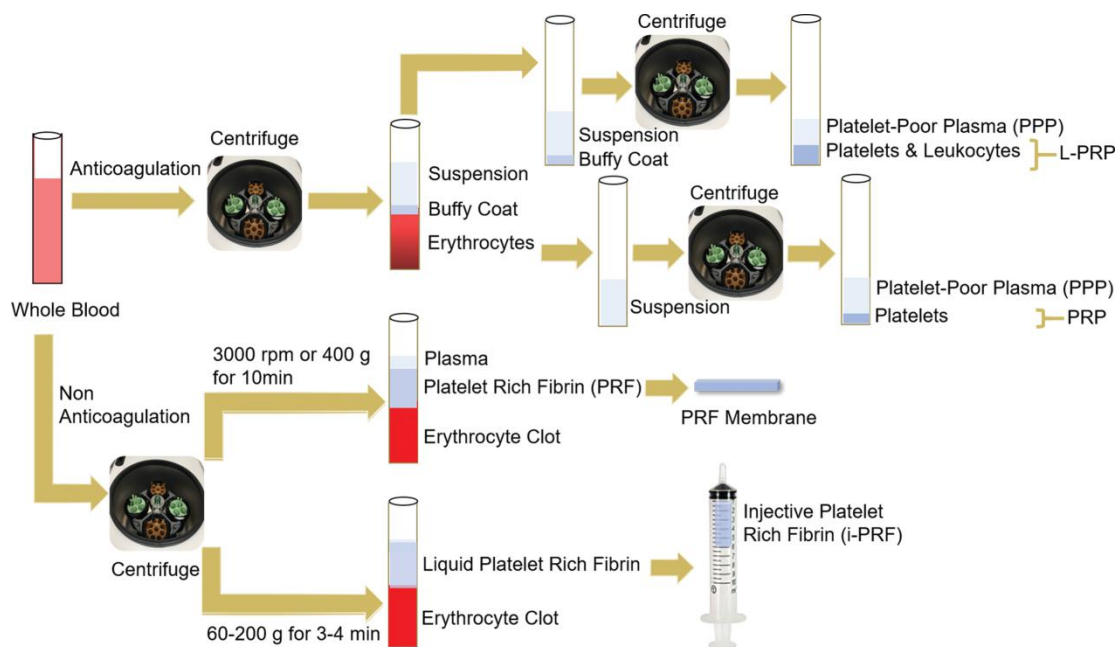
Όλα τα πρωτόκολλα περιλαμβάνουν το βήμα της συλλογής του αίματος αμέσως πριν από τη χρήση, όπως και το βήμα της μίας ή περισσοτέρων διαφορετικών φυγοκεντρήσεων. Στόχος της διαφορικής φυγοκέντρωσης είναι ο διαχωρισμός του ολικού αίματος του ασθενούς με βάση την πυκνότητα σε τρία στρώματα: πλάσμα, ερυθρά αιμοσφαίρια και μια στιβάδα πλούσια σε αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα (buffy coat). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι διάφοροι παράγοντες κατά τη διαδικασία προετοιμασίας μπορούν να επηρεάσουν το τελικό προϊόν PRP, όπως θερμοκρασία, στροφές και χρόνος φυγοκέντρωσης, αριθμό φυγοκεντρήσεων, χρήση αντιπηκτικών και μηχανισμός ενεργοποίησης.[10] Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται πως το τελικό προϊόν εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό όχι μόνο από την ισχύ της φυγοκέντρωσης αλλά και τα μέσα συλλογής. Όπως για παράδειγμα, στο

βήμα μεταφοράς που αναφέρεται παρακάτω, εκτελείται συχνά με μια σύριγγα ή μια πιπέττα και μετράται οπτικώς. [12]



Εικόνα 3: Πρωτόκολλο συλλογής πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) μέσω διαδικασίας φυγοκέντρησης δύο σταδίων. Βήμα 1: Το ολικό αίμα συλλέγεται με αντιπηκτικά και φυγοκεντρείται για λίγο σε χαμηλές στροφές (softspin). Λαμβάνονται τρία στρώματα: ερυθρά αιμοσφαίρια (Red Blood Cells, RBCs), στρώμα “buffy coat” (BC) που περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων, και πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (Platelet Poor Plasma, PPP). Βήμα 2A: Για την παραγωγή καθαρού PRP (Pure PRP, P-PRP) το PPP και το επιφανειακό BC μεταφέρονται σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα. Ύστερα από ισχυρή φυγοκέντρηση υψηλών στροφών, το μεγαλύτερο μέρος του P-PRP απορρίπτεται. Το τελικό P-PRP συμπύκνωμα αποτελείται από BC (που περιέχει μεγάλο αριθμό αιμοπεταλίων) αιωρούμενο σε πλάσμα πλούσιο σε ιώδες. Τα περισσότερα λευκοκύτταρα δε συλλέγονται. Βήμα 2B: Για την παραγωγή PRP πλούσιο σε λευκοκύτταρα (L-PRP), το PPP, ολόκληρο το στρώμα BC και μερικά υπολειμματικά RBCs μεταφέρονται σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα. Ύστερα από ισχυρή φυγοκέντρηση υψηλών στροφών, το PPP απορρίπτεται. Το τελικό L-PRP αποτελείται από ολόκληρο το BC, το οποίο περιέχει τα περισσότερα από τα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα, και υπολειμματικά RBCs αιωρούμενα σε πλάσμα πλούσιο σε ιώδες. [12]

Στην εικόνα 4 παρουσιάζεται η διαδικασία συλλογής των διαφόρων παρασκευασμάτων PRP.



Εικόνα 4: Διάγραμμα ροής παρασκευασμάτων παραγώγων αιμοπεταλίων. Το ολικό αίμα συλλέγεται με ένα αντιπηκτικό (πάνω αριστερά). Δύο διαδοχικά στάδια φυγοκέντρησης συμβαίνουν υπό διαφορετικές συνθήκες δύναμης, ταχύτητας και διάρκειας. Το πρώτο βήμα διαχωρίζει τα ερυθρά αιμοσφαίρια από το buffy coat και το υπερκείμενο εναιώρημα, που περιέχει πλάσμα και αιμοπετάλια. Μετά από ένα δεύτερο γύρισμα, το buffy coat και το υπερκείμενο διαχωρίζονται σε PPP και L-PRP. Μια δεύτερη φυγοκέντρηση του εναιωρήματος οδηγεί στην παραγωγή PPP και PRP. Για τη δημιουργία PRF το ολικό αίμα υποβάλλεται σε επεξεργασία με μία μόνο φυγοκέντρηση χωρίς αντιπηκτικό. Χρησιμοποιώντας διαφορετικές συνθήκες ισχύος, ταχύτητας και διάρκειας, δημιουργούνται χωριστά μια μεμβράνη PRF και ένα ινώδες πλούσιο σε αιμοπετάλια (i-PRF). [14]

2.6. Εφαρμογές του PRP

Το PRP είναι ένα παράγωγο αίματος, το οποίο περιέχει συμπυκνωμένα αιμοπετάλια και άλλα συστατικά του αίματος. Παρόμοια με τα αιμοπετάλια, το PRP μπορεί να απελευθερώσει υψηλές συγκεντρώσεις διαφόρων βιοενεργών μορίων αποθηκευμένα σε α-κόκκους, συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών παραγόντων, των χημειοκινών και των κυτοκινών. [14] Η θεραπεία με PRP βασίζεται στο γεγονός

ότι οι αυξητικοί παράγοντες των αιμοπεταλίων υποστηρίζουν τις τρεις φάσεις επούλωσης των πληγών (φλεγμονή, πολλαπλασιασμός, αναδιαμόρφωση) και τον “καταρράκτη” αντιδράσεων. [6] Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα για την αξιοποίηση των προστατευτικών ιδιοτήτων του PRP. Αρχικά, μπορεί να παρασκευαστεί εύκολα από δείγμα περιφερειακού αίματος, μια σχετικά μη επεμβατική τεχνική. [14] Σε συνδυασμό με την αυτόλογη φύση και τη διαθεσιμότητα, τέτοιες ιδιότητες κάνουν το PRP εξεζητημένη μέθοδο θεραπείας σε πολλές πλαστικές και αναδομητικές χειρουργικές εφαρμογές [10], καθώς ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος ανοσολογικών αντιδράσεων και η μετάδοση παθογόνων σε σύγκριση με μη αυτόλογο υλικό. [14]

Η διαδικασία μετάγγισης των αιμοπεταλίων πραγματοποιείται με βάση τον αριθμό των αιμοπεταλίων του ασθενούς, την κλινική κατάστασή του και την υποκείμενη νόσο του. Ακολουθεί αναφορά των κύριων ενδείξεων:

1. Θρομβοπενία λόγω πρωτοπαθούς ή δευτεροπαθούς μυελικής ανεπάρκειας
2. Θρομβοπενία μετά χειρουργείου
3. Λειτουργικές διαταραχές των αιμοπεταλίων
4. Καρδιοπνευμονική παράκαμψη και διάχυτη ενδαγγειακή πήξη (ΔΕΠ)
5. Ιδιοπαθής αυτοάνοση θρομβοπενία

Κεφάλαιο 3. Ανοσοφθορισμός και φθορίζουσες ουσίες

3.1. Ιστορική αναδρομή

Το 1944, ο Albert Coons έδειξε ότι τα αντισώματα μπορούν να σημανθούν με μόρια που έχουν την ικανότητα να φθορίζουν. Τα φθορίζοντα μόρια απορροφούν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος (διέγερση) και εκπέμπουν φως σε διαφορετικό μήκος κύματος (εκπομπή). Εάν μόρια αντισωμάτων σημανθούν με φθορίζουσες χρωστικές, ή φθοριοχρώματα (fluorochromes), ανοσοσυμπλέγματα τα οποία περιέχουν αυτά τα σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές αντισώματα μπορούν να ανιχνευθούν από την εκπομπή έγχρωμου φωτός όταν διεγερθούν με φως κατάλληλου μήκους κύματος. Μόρια αντισωμάτων συνδεδεμένα με αντιγόνα σε κύτταρα ή τομές ιστών μπορούν να ανιχνευθούν με αντίστοιχο τρόπο. Το εκπεμπόμενο φως μπορεί να γίνει ορατό με μικροσκόπιο φθορισμού, το οποίο είναι εξοπλισμένο με μια πηγή φωτός UV. Σε αυτή την τεχνική, γνωστή και ως ανοσοφθορισμός (immunofluorescence), χρησιμοποιούνται συχνά φθορίζουσες ουσίες όπως η φλουορεσκεΐνη. Αυτά τα μόρια συνδέονται με το Fc τμήμα ενός μορίου αντισωμάτων χωρίς να επηρεάζουν την ειδικότητα του μορίου. Τα φθοριοχρώματα απορροφούν το φως σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και εκπέμπει σε μεγαλύτερο μήκος κύματος. [15] Παράδειγμα αποτελεί η παρακάτω φθορίζουσα ουσία:

Φλουορεσκεΐνη (fluorescein), μια οργανική χρωστική η οποία χρησιμοποιείται ευρύτατα για διαδικασίες ανοσοφθορισμού, απορροφά μπλε φως (490nm) και εκπέμπει έντονο κίτρινο-πράσινο φθορισμό (517nm). [15]

3.2. Άμεσος και Έμμεσος Ανοσοφθορισμός

Η σήμανση των μορίων κυτταρικών μεμβρανών ή ιστολογικών τομών με φθορίζοντα αντισώματα μπορεί να είναι είτε άμεση είτε έμμεση. Στην άμεση σήμανση (direct staining), το συγκεκριμένο αντίσωμα (το πρωτογενές αντίσωμα) συνδέεται άμεσα με τη φλουορεσκεΐνη. Στην έμμεση σήμανση (indirect staining), το πρωτογενές αντίσωμα είναι μη σημασμένο και ανιχνεύεται με ένα πρόσθετο σημασμένο με φθοριόχρωμα αντιδραστήριο. Ένας αριθμός αντιδραστηρίων έχει αναπτυχθεί για την έμμεση σήμανση. Το πιο συνηθισμένο είναι ένα σημασμένο με

φθοριόχρωμα δευτερογενές αντίσωμα το οποίο έχει παραχθεί σε ένα είδος ζώου έναντι αντισωμάτων διαφορετικού είδους ζώου, όπως είναι η σημασμένη με φθορίζουσα χρωστική ανοσοσφαιρίνη γίδας με ειδικότητα έναντι αντισωμάτων ποντικού. [15]

3.3. Πλεονεκτήματα έμμεσου ανοσοφθορισμού

Ο ανοσοφθορισμός με έμμεση σήμανση έχει δύο πλεονεκτήματα έναντι της άμεσης σήμανσης. Πρώτον, το πρωτογενές αντίσωμα δεν χρειάζεται να σημασθεί με φθοριόχρωμα. Επειδή η διαθεσιμότητα του πρωτογενούς αντισώματος είναι συνήθως περιοριστικός παράγοντας, οι έμμεσες μέθοδοι αποτρέπουν την απώλεια αντισωμάτων που συνήθως συμβαίνει κατά την αντίδραση σύζευξης. Δεύτερον, οι έμμεσες μέθοδοι αυξάνουν την ευαισθησία της σήμανσης, καθώς πολλαπλά μόρια του φθορίζοντα παράγοντα δεσμεύονται σε κάθε μόριο πρωτογενούς αντισώματος, αυξάνοντας την ποσότητα του φωτός που εκπέμπεται στην περιοχή κάθε μορίου πρωτογενούς αντισώματος. [15]

Κεφάλαιο 4. Κυτταρομετρία ροής

4.1. Λειτουργία Κυτταρομετρητή Ροής

Οι τεχνικές φθορισμού των αντισωμάτων δεν παρέχουν ποσοτικά δεδομένα, πράγμα που οδήγησε στην ανάπτυξη της κυτταρομετρίας ροής, η οποία σχεδιάστηκε για την αυτοματοποίηση της ανάλυσης και του διαχωρισμού κυττάρων σημασμένων με φθορίζοντα αντισώματα. [15]

Ο κυτταρομετρητής ροής χρησιμοποιεί μια δέσμη laser και έναν ανιχνευτή φωτός σε μονήρη κύτταρα σε εναιώρημα. Κάθε φορά που ένα κύτταρο διέρχεται από τη δέσμη laser, το φως ανακλάται από τον ανιχνευτή και αυτή η διακοπή στη δέσμη του laser καταγράφεται. Τα κύτταρα που έχουν δεσμευμένα αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες στα αντιγόνα της κυτταρικής τους επιφάνειας, διεγείρονται από το laser και εκπέμπουν φως το οποίο καταγράφεται από ένα δεύτερο σύστημα ανίχνευσης το οποίο βρίσκεται σε δεξιά γωνία σε σχέση με τη δέσμη του laser. Ένα συνδεδεμένο σύστημα υπολογιστή παράγει τη γραφική παράσταση του αριθμού των κυττάρων στον άξονα Y και της έντασης του φθορισμού στον άξονα X.

Η χρήση του οργάνου για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των κυττάρων ενός πληθυσμού που δεσμεύουν αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές ονομάζεται ανάλυση.

Η χρήση του οργάνου για τη διοχέτευση κυττάρων με διαφορετικά πρότυπα σε διαφορετικά σωληνάρια ονομάζεται κυτταρικός διαχωρισμός. [15]

4.2. Αναλυτική περιγραφή της λειτουργίας του κυτταρόμετρου φθορισμού

Ένα μηχάνημα κυτταρομετρίας ροής με φθορισμό αποτελείται από τρία επί μέρους συστήματα, το σύστημα νηματικής ροής, το οπτικό σύστημα και το ηλεκτρονικό σύστημα.

Σύστημα νηματικής ροής

Το υπό εξέταση υλικό συνήθως είναι εναιώρημα. Με ειδικές υδροδυναμικές ρυθμίσεις επιτυγχάνεται η κίνηση των κυττάρων το ένα πίσω από το άλλο (νηματική

ροή) στο κέντρο της οπής μέτρησης, όπως περίπου συμβαίνει και στον αιματολογικό αναλυτή. Εκεί, κάθε κύτταρο ξεχωριστά έρχεται σε επαφή με την ακτίνα laser. Το όλο σύστημα αποτελεί το σύστημα νηματικής ροής του κυτταρομετρητή. [16]

Οπτικό σύστημα

Πριν την ανάλυση, τα προς μελέτη κύτταρα που φέρουν τα ερευνώμενα αντιγόνα επεξεργάζονται με μονοκλωνικά αντισώματα ενωμένα με φθορίζουσες χρωστικές οι οποίες διεγείρονται σε συγκεκριμένο μήκος κύματος της δέσμης που εκπέμπει το laser. Σήμερα υπάρχει η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης τριών ή και περισσότερων φθορισμών από το ίδιο κύτταρο, δηλαδή η εντόπιση τριών ή και περισσότερων αντιγόνων. Τα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται συχνότερα παρατίθενται παρακάτω: [16]

- Η ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη (FITC) που εκπέμπει πράσινο φθορισμό.
- Η ισοθειοκυανική τετραμεθυλοδοαμίνη (TRITC) που εκπέμπει κόκκινο φθορισμό.
- Η φυκοερυθρίνη (PE) που εκπέμπει πορτοκαλί φθορισμό.
- Η φυκοκυανίνη (PC) που εκπέμπει γαλαζοπράσινο φθορισμό.
- Τα φθοριοχρώματα Hoechst 33258, DAPI, CA3 που χρησιμοποιούνται συνήθως στη χρώση χρωμοσωμάτων.
- Η θειαζόλη, η οραμίνη και η οξαζίνη για τη βαφή των ΔΕΚ.

Όταν η ακτίνα laser προσπέσει στο κύτταρο, η προσπίπτουσα ακτινοβολία διαχέεται προς όλες τις κατευθύνσεις, φαινόμενο που είναι γνωστό ως σκέδαση του φωτός. Για την ανίχνευση του σκεδαζόμενου φωτός χρησιμοποιούνται ειδικοί ανιχνευτές που είναι βολταϊκές φωτοδιόδοι. Ανάλογα με τη διάταξή τους, όταν η φωτοδίοδος βρίσκεται σε ευθεία γραμμή ή υπό μικρή γωνία μπροστά από το κύτταρο ανιχνεύεται το πρόσθιο ή απευθείας σκεδαζόμενο φως (FS- forward light scatter), ενώ όταν η φωτοδίοδος είναι κάθετη ή υπό μεγάλη γωνία προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία ανιχνεύεται το κάθετα ή πλάγια σκεδαζόμενο φως (SS- side scatter). Το απευθείας σκεδαζόμενο φως δίνει πληροφορίες για τον όγκο του κυττάρου, ενώ το

κάθετα ή υπό ορθή γωνία δίνει πληροφορίες κυρίως για τον πυρήνα, την πυκνότητα και την κοκκίωση του πρωτοπλάσματος του κυττάρου. [16]

Όμως, οι ακτίνες laser διεγείρουν και τα φθοριοχρώματα που είναι συνδεδεμένα με τα μονοκλωνικά αντισώματα και έτσι ανιχνεύεται και ο παραγόμενος φθορισμός (FL-fluorescence). Με τον τρόπο αυτό λαμβάνονται συνολικά τρία κυρίως οπτικά σήματα: [16]

1. Ο πρόσθιος σκεδασμός (FS)
2. Ο κάθετος σκεδασμός (SS)
3. Ο παραγόμενος φθορισμός (FL)

Τα οπτικά αυτά σήματα συλλέγονται από τους ανιχνευτές (βολταϊκές φωτοδίοδοι) και μετατρέπονται μέσω μαθηματικών ολοκληρωμάτων σε ένα ρεύμα παλμού, το οποίο τελικά από αναλογικό μετατρέπεται σε ψηφιακό με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος. Το όλο σύστημα που περιγράφηκε αποτελεί το οπτικό σύστημα του κυτταρομετρητή. [16]

Ηλεκτρονικό σύστημα

Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει τη συλλογή και ανάλυση των σημάτων η οποία γίνεται με τη βοήθεια προγράμματος στον υπολογιστή που τα μετατρέπει σε κυτταρογράμματα (νεφελογράμματα). [16]

4.3. Εφαρμογές κυτταρομετρητή ροής

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο διερεύνησης ως προς: [15]

- a) Τον αριθμό των κυττάρων που εκφράζουν το προς διερεύνηση αντιγόνο σε απόλυτο αριθμό και ως ποσοστό των συνολικών κυττάρων που έχουν περάσει από τη δέσμη laser.

- b) Την κατανομή των κυττάρων σε ένα δείγμα όπως αναλύεται σύμφωνα με την πυκνότητα έκφρασης του αντιγόνου και προσδιορίζεται από την ένταση του φθορισμού.
- c) Το μέγεθος των κυττάρων, πληροφορία η οποία προκύπτει από την ανάλυση των χαρακτηριστικών της διάθλασης του φωτός από μέλη υπό εξέταση κυτταρικού πληθυσμού.

4.4. Κυτταρομετρία ροής και διαταραχές αιμοπεταλίων

Η λειτουργία των αιμοπεταλίων αποτελεί σημαντική για τις κληρονομικές και επίκτητες αιμορραγικές δυσλειτουργίες και η κυτταρομετρία ροής φθορισμού είναι η κατάλληλη μέθοδος για την μελέτη αυτών. Οι μέθοδοι και τα μόρια που χρησιμοποιούνται για τις διάφορες αιμορραγικές δυσλειτουργίες στην κυτταρομετρία ροής φθορισμού παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. [17]

Πίνακας 1 Στον πίνακα απεικονίζονται οι διαταραχές των αιμοπεταλίων οι οποίες διακρίνονται σε κληρονομικές και επίκτητες και μπορούν να ανιχνευτούν με κυτταρομετρία φθορισμού. Στη δεύτερη στήλη καταγράφονται οι βλάβες που μπορεί να προκαλέσουν την κάθε διαταραχή και στην τρίτη στήλη αναφέρονται τα προς ανίχνευση μόρια της κάθε αιμοπεταλιακής διαταραχής.

4.4.1. Κληρονομικές αιμορραγικές διαταραχές

Οι κληρονομικές διαταραχές των αιμοπεταλίων αποτελούν σημαντική αιτιολογία μη φυσιολογικής αιμορραγίας και η κυτταρομετρία ροής για τη μελέτη της λειτουργίας των αιμοπεταλίων συνιστάται κυρίως για αυτές τις διαταραχές. Αναφορικά κάποιες ασθένειες που περιλαμβάνονται στη μελέτη αυτή είναι η θρομβασθένεια του Glanzmann με τη μείωση GpIIb/IIIa, το σύνδρομο Bernard-Soulier με την ανεπάρκεια του συμπλόκου GPIb-IX-V, η νόσος von Willebrand και ανεπάρκεια έκφρασης υποδοχέων του κολλαγόνου. [17][18][19]

4.4.2 Επίκτητες αιμορραγικές διαταραχές

Οι επίκτητες αιμορραγικές διαταραχές των αιμοπεταλίων αποτελούν μια ετερογενή ομάδα. Στις διαταραχές αυτές περιλαμβάνονται η οξεία μυελογενή λευχαιμία, το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, η θρομβοκυτταροπενία, η οποία συναντάται συχνότερα σε συστηματικές ή χρόνιες ασθένειες και μπορεί να οφείλεται και σε ανοσολογικά αίτια και συχνά εντοπίζεται σε λοίμωξη και σήψη. [17]

Κεφάλαιο 5. Η σημασία των μεταγγίσεων αιμοπεταλίων

5.1. Εισαγωγή

Ένα αιμορραγικό σοκ μπορεί να αποτελέσει αιτία θανάτου ύστερα από σοβαρό τραύμα και οι μεταγγίσεις αιμοπεταλίων είναι συχνά απαραίτητες για την επίτευξη της αιμόστασης. Τα αιμοπετάλια, παρόλα αυτά, απαιτούν ειδικές συνθήκες αποθήκευσης και ο χρόνος αποθήκευσης έχει συσχετιστεί με την απώλεια ποιότητας των αιμοπεταλίων. Οι μεταγγίσεις αιμοπεταλίων σχεδόν παγκοσμίως συμβαίνουν μεταξύ της 3^{ης} και 5^{ης} ημέρας αποθήκευσης. Για τον έλεγχο της αιμορραγίας απαιτείται η μετάγγιση προϊόντων αίματος προκειμένου να επιτευχθεί η αιμόσταση και σταθεροποίηση. [20]

Παρά το γεγονός ότι πολλοί τραυματίες μπορούν να επωφεληθούν σημαντικά από την έγκαιρη μετάγγιση αιμοπεταλίων [21], η προμήθεια δεν αντιστοιχεί στην αυξανόμενη ζήτηση. [22] Η εθνική προμήθεια αίματος μειώνεται ως αποτέλεσμα της αυξανόμενης ιατρικής και χειρουργικής ζήτησης. Με αυτό ως αφορμή, χρειάζονται μέθοδοι που να βελτιώνουν και να επεκτείνουν την ζωή των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων προκειμένου να αυξηθεί η διαθεσιμότητά τους. [20]

5.2. Η οξείδωση των αιμοπεταλίων

Η ποιότητα των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όμως η οξείδωση είναι από τα κυριότερα που απασχολεί την επιστημονική κοινότητα, καθώς αποτελεί μια διαδικασία εν τέλει αναπόφευκτη. Χρονικές περιόδους χωρίς ανακίνηση συσχετίζονται με υποξία στα αποθηκευμένα αιμοπετάλια και η μείωση του οξυγόνου έχει αποδειχθεί να πυροδοτεί την παραγωγή των μιτοχονδριακών δραστικών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species ή ROS). [20]

5.2.1. Τι είναι οι δραστικές ρίζες οξυγόνου;

Ως φυσικά υποπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού, τα ROS αποτελούνται από ριζικά και μη ριζικά είδη οξυγόνου που σχηματίζονται από τη μερική αναγωγή του οξυγόνου, συμπεριλαμβανομένου του ανιόντος του υπεροξειδίου (O_2^-), του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και της ρίζας του υδροξυλίου (OH) [23]. Τα ROS παράγονται ενδογενώς από τη διέγερση των κυτοκίνων, ξενοβιοτικών και βακτηριακής εισβολής, καθώς και κατά τη διάρκεια του μιτοχονδριακού οξειδωτικού μηχανισμού. [24] [25]

Τα ROS σχηματίζονται από τα αιμοπετάλια με την ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης και της οξειδάσης της ξανθίνης. Κάποια άλλα μονοπάτια ενζύμων που συνεισφέρουν στην παραγωγή των ROS από τα αιμοπετάλια είναι της P13 κινάσης και της πρωτεΐνης κινάσης C [5]. Τα αιμοπετάλια, σε αναλογία με τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος, μπορούν να παράγουν ROS, τα οποία με τη σειρά τους επάγουν αλλαγές στο ενδοαιμοπεταλιακό Ca^{2+} και μπορούν να συμπεριφερθούν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι των αιμοπεταλίων που ενεργοποιήθηκαν από τη θρομβίνη ή το κολλαγόνο. Η ύπαρξη των ROS έχει θεωρηθεί ως κρίσιμο σήμα που ρυθμίζει τη δραστηριότητα των αιμοπεταλίων. [26]

Η μη φυσιολογική αύξηση των ROS σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες, το οποίο εμπλέκεται σε ασθένειες όπως την αθηροσκλήρωση, το διαβήτη, το νευροεκφυλισμό καθώς και τη γήρανση, με αποτέλεσμα την πιθανή βλάβη των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των νουκλεϊκών οξέων. Αυξημένα επίπεδα σε ROS επίσης σχετίζονται με θρομβωτικές ασθένειες, υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία και μεταβολικό σύνδρομο [27]. Στις θρομβωτικές ασθένειες μπορεί να εμπλέκονται στην αποβολή των υποδοχέων προσκόλλησης των αιμοπεταλίων, πράγμα που μπορεί να μειώσει την έκφρασή τους, επηρεάζοντας την λειτουργία πρόσδεσης των αιμοπεταλίων. [5] Η αύξηση αυτή επάγει περαιτέρω παραγωγή των ROS, καθώς προκαλείται άνοιγμα των μιτοχονδριακών ευαίσθητων στο ATP καναλιών καλίου, προκαλώντας μεγαλύτερη παραγωγή των ROS, οδηγώντας σε έναν φαύλο κύκλο. [20]

5.2.2. Τρόπος ανίχνευσης των ROS

Η παραγωγή των ενδοκυττάρων ROS των αιμοπεταλίων που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες, μετριέται από H₂DCF-DA, μια χημικά μειωμένη μορφή της φλουορεσκεΐνης, η οποία χρησιμοποιείται ως δείκτης των ενδοκυττάρων ROS. Ο ανιχνευτής αυτός που διαπερνά τα κύτταρα, με την εισχώρηση των οξικών ομάδων από ενδοαιμοπεταλιακές εστεράσες και περαιτέρω οξείδωση από τα ROS, μετατρέπεται σε υψηλά φθορίζουσα DCF από μη-φθορίζον H₂DCF-DA, και έτσι υπολογίζεται το επίπεδο των ROS στα αιμοπετάλια. [28]

Κεφάλαιο 6. Υλικά και μέθοδοι

6.1. Αντιδραστήρια, συσκευές και όργανα

Στα πλαίσια της ερευνητικής εργασίας που διεξήχθη στο εργαστήριο Αιματολογίας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά και όργανα:

6.1.1. Διαλύματα - Αντιδραστήρια

- i. Tyrode's Buffer σύστασης NaHCO_3 890 mM, MgCl_2 100 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ 100 Mm, Hepes/NaOH 100 mM, Glucose 500 mM, NaCl 1,5M, KCl 100 mM, CaCl_2 100 mM
- ii. Αντιδραστήριο DCFDA
- iii. Bovine Serum Albumin (BSA) σε μορφή σκόνης

6.1.2. Αναλώσιμα

- i. Σωληνάκια κυτταρομετρίας ροής
- ii. Σωληνάκια Eppendorf με κούμπωμα
- iii. Μπλε tips 100 μl - 1000 μl
- iv. Κίτρινα tips 10 μl - 100 μl
- v. Λευκά tips 0,2 μl - 10 μl
- vi. Χαρτί αλουμινίου
- vii. Γάντια λάτεξ μιας χρήσεως με πούδρα
- viii. Σωληνάριο Falcon των 50 ml

6.1.3. Όργανα και συσκευές

- i. Κυτταρόμετρο ροής, BD FACS Canto I
- ii. Στατώ σωληναρίων
- iii. Αποστειρωμένος ογκομετρικός κύλινδρος των 50 ml
- iv. Vortex δυο ταχυτήτων
- v. Υαλογράφος
- vi. Κίτρινος κάδος για εργαστηριακά απόβλητα
- ix. Πιπέττα των 100 μl - 1000 μl τύπου BIO RAD

- x. Πιπέττα των 10 μ l - 100 μ l τύπου BIO RAD
- xi. Μικροπιπέττα των 0,2 μ l - 10 μ l τύπου BIO RAD
- vii. Ψυγείο ρυθμισμένο στους 4°C
- viii. Εργαστηριακός ζυγός
- ix. Κλίβανος
- x. Χρονόμετρο 1 ώρας
- xi. Καταψύκτης

6.2. Μέθοδοι

6.2.1. Προετοιμασία ασκών

Για την εμβάθυνση των γνώσεών μας πάνω στο αντικείμενο της οξείδωσης των αιμοπεταλίων που προορίζονται για μετάγγιση, εφαρμόστηκε το πείραμα που θα εξηγηθεί παρακάτω σε εννέα ασκούς αιμοδοσίας με δεξαμενοποιημένα αιμοπετάλια που απομονώθηκαν από ολικό αίμα. Με τη μέθοδο της άσηπτης συγκόλλησης τα αιμοπετάλια κατανεμήθηκαν σε δεύτερο χρόνο σε δύο συνοδούς ασκούς. Για το χρονικό διάστημα των 15 ημερών, οι μισοί ασκοί αποθηκεύτηκαν σε συνθήκη θερμοκρασίας +22°C και οι υπόλοιποι σε θερμοκρασία +4°C υπό ανακίνηση για την αποφυγή σχηματισμού συσσωματώματος (aggregation) των αιμοπεταλίων.

6.2.2. Προετοιμασία δείγματος

Το πείραμα διεξήχθη σε διάστημα αποθήκευσης 15 ημερών για τον κάθε ασκό αιμοδοσίας. Η ημέρα 1^η, 5^η, 10^η και 15^η αποτελούσαν μέρες διεξαγωγής, όπου με δειγματοληψία σε άσηπτες συνθήκες μετρήθηκε η οξείδωση των αιμοπεταλίων σε δύο διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, θερμοκρασία δωματίου και θερμοκρασία συντήρησης στους 4°C με κυτταρομετρία ροής.

Την πρώτη μέρα, η οποία αποτελεί και μέρα διαχωρισμού και δεξαμενοποίησης των αιμοπεταλίων στον ασκό αιμοδοσίας, έχουμε μόνο την αποθήκευσή τους σε συνθήκη θερμοκρασίας δωματίου. Τα παρακάτω στάδια επαναλαμβάνονται κάθε πέντε μέρες, και στις δύο συνθήκες αποθήκευσης.

Αρχικά, γίνεται προετοιμασία 10 ml του stock σε Tyrode's buffer μέσα σε σωληνάριο Falcon των 15 ml. Ζυγίζουμε 0,2 gr σκόνης BSA, καθώς χρειαζόμαστε διάλυμα Tyrode's Buffer 0,2% και ύστερα ανακινούμε πολύ καλά το διάλυμα με vortex έως ότου ομογενοποίησης του μίγματος. Τοποθετείται στη συντήρηση για διατήρηση και τη στιγμή που θα χρειαστεί στο πείραμα, το βγάζουμε και περιμένουμε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου πρώτου χρησιμοποιηθεί.

Στάδια πειράματος

Σε στατώ ετοιμάζουμε δύο μικρά erpendorf των 1,5 ml και με έναν υαλογράφο γράφουμε πάνω στο πόμα τον αριθμού του ασκού και RT (Room temperature) για τη συνθήκη αποθήκευσης. Επίσης σημειώνουμε ποιο erpendorf θα λειτουργήσει ως negative control, δηλαδή δε θα περιέχει το αντιδραστήριο DCFDA, και ποιο θα το περιέχει.

Με μια πιπέττα των 1000 μl παίρνουμε από το Tyrode's Buffer 0,2% BSA 250 μl και βάζουμε σε κάθε erpendorf την ίδια ποσότητα. Με μια πιπέττα των 100 μl αναρροφούμε 10 μl του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) και τοποθετούμε την ίδια ποσότητα και στα δυο erpendorf. Ανακινούμε με αναρρόφηση με την πιπέττα για να γίνει ομογενοποίηση. Πωματίζουμε εκείνο που αποτελεί το αρνητικό control.

Παίρνουμε το αντιδραστήριο DCFDA που φυλάσσεται στη βαθιά ψύξη και το καλύπτουμε με το χέρι μας καθώς είναι φωτοευαίσθητο και χάνεται η δραστηκότητά του. Το ανακινούμε έντονα με το vortex για τη ρευστοποίηση του DCFDA και με μια μικροπιπέττα τοποθετούμε γρήγορα στο Erpendorf συγκεκριμένη ποσότητα. Γίνεται ελαφριά ανακίνηση με αναρρόφηση της πιπέττας. Το στατώ με τα δυο erpendorf τοποθετείται στον κλίβανο για επώαση για 30 λεπτά στους 37°C και το αντιδραστήριο τοποθετείται ξανά στη βαθιά ψύξη.

Κατά τη διάρκεια της επώασης προετοιμάζονται δύο σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής, ένα για κάθε erpendorf και με τον υαλογράφο σημειώνουμε τα ίδια στοιχεία, ξεχωρίζοντας το αρνητικό control από το θετικό που περιέχει το αντιδραστήριο. Σε κάθε σωληνάριο τοποθετείται με τη χρήση πιπέττας των 1000 μl από 475 μl Tyrode's Buffer 0,2% BSA.

Με το πέρας της επώασης, παίρνουμε γρήγορα από το erpendorf με το αντιδραστήριο 25 μl και τα βάζουμε στο αντίστοιχο σωληνάριο. Είναι σημαντικό αυτό το σημείο καθώς η αντίδραση μεταξύ των αιμοπεταλίων και του αντιδραστηρίου συνεχίζει να τρέχει και με την υπεραραιώση στο buffer θα σταματήσει έτσι ώστε να καταφέρουμε να πραγματοποιήσουμε τη μέτρηση και να έχουμε όσο πιο ακριβή αποτελέσματα γίνεται. Το ίδιο κάνουμε και με το αρνητικό control και τέλος καλύπτουμε τα σωληνάρια με αλουμινόχαρτο, προκειμένου να προστατευτεί και το αντιδραστήριο από το φως. Επόμενο και τελευταίο στάδιο είναι η μέτρηση στο κυτταρόμετρο.

6.2.3. Μέτρηση στο κυτταρόμετρο ροής

Η μέτρηση της οξειδωσης, συγκεκριμένα των δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) στα αιμοπετάλια, πραγματοποιήθηκε με το κυτταρόμετρο BD (με το λογισμικό DiVa) FACS (Fluorescence-activated cell sorting) Canto I. Το κυτταρόμετρο έχει την ικανότητα μέτρησης χρησιμοποιώντας 8 παραμέτρους, 6 χρώματα και δύο σκεδάσεις, την πρόσθια και πλάγια. Για την έρευνά μας χρησιμοποιήθηκαν 4 παράμετροι, 2 χρώματα και οι 2 σκεδάσεις.

Πρώτα μετρήθηκε το αρνητικό control, σταματώντας τη μέτρηση στα 20000 events, ώστε να έχουμε εικόνα του αριθμού των αιμοπεταλίων χωρίς να έχουν εμβαπτιστεί με το αντιδραστήριο DCFDA. Ύστερα μετρήθηκε το διάλυμα που περιείχε το αντιδραστήριο και έτσι υπολογιζόταν η ποσότητα των ROS στα αιμοπετάλια. Το αντιδραστήριο DCFDA είναι ένας ανηγμένος εστέρας που έχει την δυνατότητα να αποσυντίθεται και να εισχωρεί στον ενδοκυττάριο χώρο των αιμοπεταλίων, όπου και υδρολύεται σε διυδροξυ-DCFH (Free Radical Biology and Medicine, 2022). Η αντίδραση αυτή είναι φθοριογενής, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η μέτρησή της με το κυτταρόμετρο.

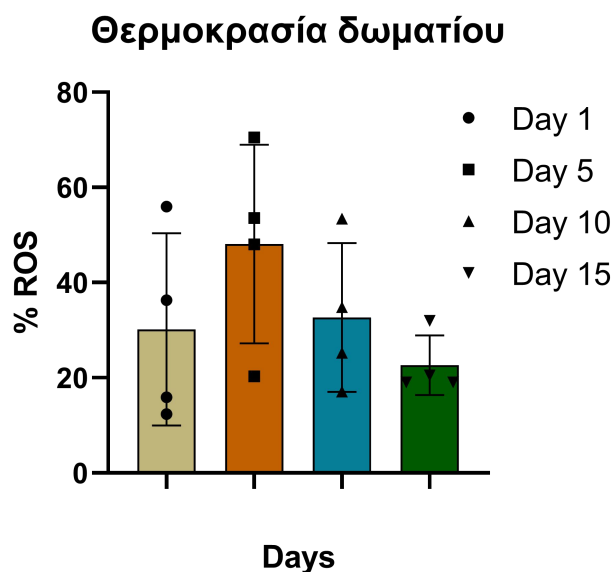
6.2.4. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στατιστικά με το SPSS v.27.

Κεφάλαιο 7. Αποτελέσματα

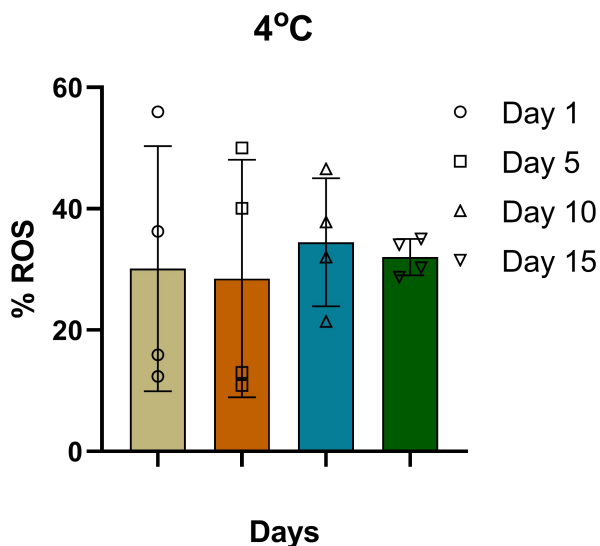
Αρχικά πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των επιπέδων των ROS στα αιμοπετάλια την 1^η, 5^η, 10^η και 15^η ημέρα αποθήκευσης και σε θερμοκρασία δωματίου και στους 4°C. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τους τέσσερις ασκούς δεξαμενοποιημένων αιμοπεταλίων σε μορφή ιστογράμματος που δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα GraphPad.

Στο Διάγραμμα 1 απεικονίζονται τα ποσοστά έκφρασης των ROS στα τέσσερα δείγματα αιμοπεταλίων στα τέσσερα διαφορετικά χρονικά σημεία που μελετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Παρατηρείται η μέση τιμή έκφρασης των ROS των ασκών την κάθε ημέρα μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις τους (standard deviation, SD). Παρατηρείται την 5^η ημέρα μια αύξηση των ROS κατά μέσο όρο και για τους τέσσερις ασκούς και στις υπόλοιπες μέρες μειώνονται. (Διάγραμμα 1)



Διάγραμμα 1: Ιστόγραμμα έκφρασης του ποσοστού των ROS των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και μελετήθηκαν την 1^η, 5^η, 10^η και 15^η ημέρα αποθήκευσης. Απεικονίζεται η μέση τιμή του ποσοστού των ROS για κάθε ημέρα και η τυπική απόκλιση.

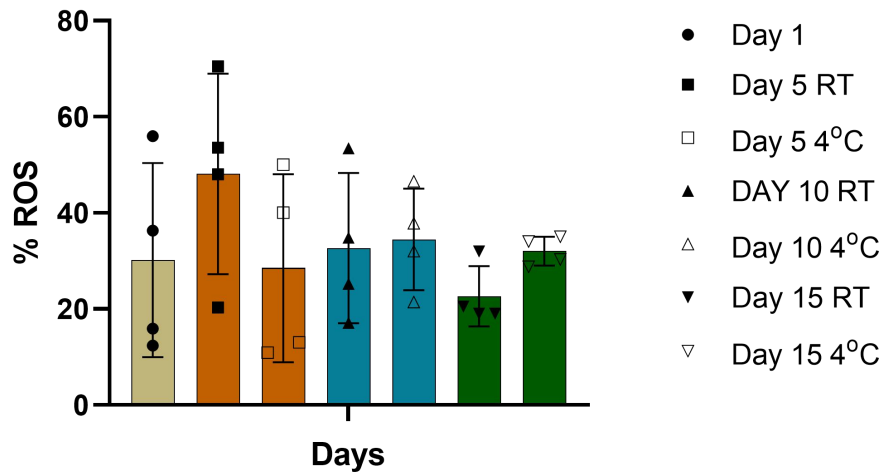
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα ποσοστά των ROS των αιμοπεταλίων σε συνθήκες ψύξης. Δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή στο ποσοστό τους μεταξύ των τεσσάρων ημερών μέτρησής τους. (Διάγραμμα 2)



Διάγραμμα 2: Ιστόγραμμα έκφρασης του ποσοστού των ROS των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν στους 4°C και μελετήθηκαν την 1^η, 5^η, 10^η και 15^η ημέρα αποθήκευσης. Απεικονίζεται η μέση τιμή του ποσοστού των ROS για κάθε ημέρα και η τυπική απόκλιση.

Το Διάγραμμα 3 απεικονίζει τα ποσοστά των ROS στα τέσσερα διαφορετικά χρονικά σημεία της μελέτης και στις δύο συνθήκες αποθήκευσης. Συγκρίνοντας τις δύο συνθήκες αποθήκευσης δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποσοστά των ROS. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρούνται κατά την 5^η ημέρα αποθήκευσης αυξημένα επίπεδα ROS στα αιμοπετάλια που ήταν αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική αυτή η αύξηση πιθανά λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία και της διακύμανσης των επιπέδων ROS που παρατηρούνται.

Δυο συνθήκες αποθήκευσης



Διάγραμμα 3: Ιστόγραμμα που συνδυάζει το ποσοστό έκφρασης των ROS των αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και στους 4°C της 1^{ης}, 5^{ης}, 10^{ης} και 15^{ης} ημέρας μελέτης τους. Κάθε σύμβολο που είναι γεμισμένο αντιστοιχεί στη συνθήκη θερμοκρασίας δωματίου, ενώ τα κενά σύμβολα αντιστοιχούν στους 4°C, καθιστώντας πιο εύκολη την απεικόνιση των τιμών του ποσοστού των ROS σε θερμοκρασία δωματίου με εκείνων σε θερμοκρασία ψύχους σε κάθε μια από τις τέσσερις ημέρες μελέτης τους. Επιπλέον παρουσιάζονται η μέση τιμή των ROS των δειγμάτων για κάθε ημέρα και η τυπική απόκλιση.

Κεφάλαιο 8. Συζήτηση

Η μετάγγιση των αιμοπεταλίων αποτελεί μια διαδικασία υψίστης σημασίας, καθώς μπορούν να σωθούν πολλοί άνθρωποι που πλήττονται από αιμορραγικές διαταραχές που σχετίζονται με τα αιμοπετάλια. Η βελτίωση της ποιότητας και η επέκταση της ζωής τους αποτελούν προτεραιότητα και για να επιτευχθεί αυτό, καθίσταται αναγκαίο η “καθυστέρηση” της παραγωγής των ROS στα αιμοπετάλια, αφού αποτελεί διαδικασία που θα ενεργοποιηθεί ανεξαρτήτως συνθηκών.

Ο αριθμός των ROS, όμως, είναι εκείνος που απαιτείται να μειωθεί προκειμένου να μην υπάρξουν επιπλοκές κατά την μετάγγιση των αιμοπεταλίων που προορίζονται για αυτό, όπως είναι η ενεργοποίηση, η πρωτεόλυση, οι αλλαγές στη μορφολογία, στις μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και την έκφραση του υποδοχέα επιφανείας. [29] Διεξάγονται για το σκοπό αυτό μελέτες όπου τα αιμοπετάλια φυλάσσονται στη συντήρηση στους 4°C και με τη χρήση της ένωσης H₂DCF-DA και με κυτταρομετρία φθορισμού μετρώνται τα επίπεδα ROS ανά συγκεκριμένο αριθμό ημερών. Τα αποτελέσματα αυτά με τη σειρά τους συγκρίνονται με τα αντίστοιχα των αιμοπεταλίων που φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου στους 25°C και γίνεται προσπάθεια διαπίστωσης για το αν είναι εφικτό να επιμηκυνθεί η αποθήκευση των αιμοπεταλίων χωρίς να αλλοιώνεται η ποιότητά τους από ανεπιθύμητη οξειδωση. Μια άλλη μέθοδος που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της οξειδωσης, σύμφωνα με έρευνες, είναι με το σύστημα Mirasol όπου με τη χρήση ριβοφλαβίνης (βιταμίνη B2) και ακτινοβολία ευρέος φάσματος UV επιτυγχάνεται η μείωση των παθογόνων. [30] Η εκτίμηση των μεταβολικών δεικτών των αιμοπεταλίων θα ήταν μια άλλη χρήσιμη παράμετρος για την επιτήρησή τους μέσω LTA (Light Transmission Aggregometry) καθώς και η εκτίμηση των ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων μέσω Θρομβοελαστογραφίας (TEG) και Περιστροφικής Θρομβοελαστογραφίας (ROTEM). [30]

Με τη παρούσα έρευνα αποσκοπούμε στην επιβεβαίωση της συσχέτισης των ROS με τη συνθήκη αποθήκευσης των αιμοπεταλίων που προορίζονται για μετάγγιση. Παρ'όλα αυτά, η μεγάλη διακύμανση λόγω της τυπικής απόκλισης (Standard Deviation, SD) από τη μέση τιμή των ασκών και στις δύο συνθήκες αποθήκευσης δεν μπορεί να οδηγήσει σε ένα σαφές συμπέρασμα. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πολλά αίτια, όπως μηχανικά σφάλματα κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, καθώς και μικρό

αριθμό ασκών που πάθησαν από τους αιμοδότες. Επομένως, καθίσταται αναγκαία η πραγματοποίηση περισσότερων μελετών, ερευνώντας μεγαλύτερο αριθμό ROS από περισσότερους ασκούς δεξαμενοποιημένων αιμοπεταλίων έτσι ώστε να προκύψει ένα αξιόπιστο συμπέρασμα.

Βιβλιογραφία

- 1.Grozovsky, R., Giannini, S., Falet, H. & Hoffmeister, K. M. , Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. 2015.
- 2.Dhurat, R. and M. Sukesh, Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 2014. 7(4): p. 189.
- 3.Van Der Meijden, P.E.J. and J.W.M. Heemskerk, Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nature Reviews Cardiology*, 2019. 16(3): p. 166-179.
- 4.Grozovsky, R., et al., Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. *Blood*, 2015. 126(16): p. 1877-1884.
- 5.Hosseini, E., et al., Collagen-dependent platelet dysfunction and its relevance to either mitochondrial ROS or cytosolic superoxide generation: a question about the quality and functional competence of long-stored platelets. *Thrombosis Journal*, 2020. 18(1): p. 18.
- 6.Everts, P., et al., Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. 21(20): p. 7794.
- 7.Παύλου Ευθυμία, Δ.Π.Μ., Μπίρτσας Βασίλειος M.Sc. , Σημειώσεις ασκήσεων πήξης. 2022.
- 8.Tomaiuolo, M., L.F. Brass, and T.J. Stalker, Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. *Interventional Cardiology Clinics*, 2017. 6(1): p. 1-12.
- 9.Rand, J.H., et al., The significance of subendothelial von Willebrand factor. *Thrombosis and Haemostasis*, 1997. 78(1): p. 445-450.
- 10.Abu-Ghname, A., et al., Platelet-Rich Plasma: Principles and Applications in Plastic Surgery. *Seminars in Plastic Surgery*, 2019. 33(03): p. 155-161.
- 11.Le, A.D.K., et al., Platelet-Rich Plasma. *Clinics in Sports Medicine*, 2019. 38(1): p. 17-44.
- 12.Dohan Ehrenfest, D.M., L. Rasmusson, and T. Albrektsson, Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*, 2009. 27(3): p. 158-167.

13. Prudent, M., What about Platelet Function in Platelet Concentrates? *Hämostaseologie*, 2020. 40(04): p. 500-508.
14. Zhang, W., et al., Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Tissue Infection: Preparation and Clinical Evaluation. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2019. 25(3): p. 225-236.
15. Goldsby, R., et al., *Ανοσολογία*. 2007, Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
16. Γεωργούλης, Δ.Ι.Ε., *Εργαστηριακή Αιματολογία*. Vol. 1. 2012: POTONTA. 480.
17. Shen, C.-L. and Y.-F. Wu, Flow cytometry for evaluating platelet immunophenotyping and function in patients with thrombocytopenia. *Tzu Chi Medical Journal*, 2022. 34(4): p. 381.
18. Handin, R.I., Inherited Platelet Disorders. *Hematology*, 2005. 2005(1): p. 396-402.
19. Botero, J.P., et al., Glanzmann thrombasthenia: genetic basis and clinical correlates. *Haematologica*, 2020. 105(4): p. 888-894.
20. Perales Villarroel, J.P., et al., Increased platelet storage time is associated with mitochondrial dysfunction and impaired platelet function. *Journal of Surgical Research*, 2013. 184(1): p. 422-429.
21. Pidcoke, H.F., et al., Ten-year analysis of transfusion in Operation Iraqi Freedom and Operation Enduring Freedom: Increased plasma and platelet use correlates with improved survival. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 2012. 73(6): p. S445-S452.
22. Singh, H., R. Chaudhary, and V. Ray, Platelet indices as quality markers of platelet concentrates during storage: *Platelet indices in stored platelet concentrate*. *Clinical & Laboratory Haematology*, 2003. 25(5): p. 307-310.
23. Ray, P.D., B.-W. Huang, and Y. Tsuji, Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 2012. 24(5): p. 981-990.
24. Andreyev, A.Y., Y.E. Kushnareva, and A.A. Starkov, Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, 2005. 70(2): p. 200-214.
25. Qiao, J., et al., Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. *Redox Biology*, 2018. 14: p. 126-130.

26. Wachowicz, B., et al., Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets*, 2002. 13(3): p. 175-182.
27. Bonomini, F., L.F. Rodella, and R. Rezzani, Metabolic Syndrome, Aging and Involvement of Oxidative Stress. *Aging and disease*, 2015. 6(2): p. 109.
28. Yadav, P., et al., Platelet-derived microvesicles activate human platelets via intracellular calcium mediated reactive oxygen species release. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2023. 98: p. 102701.
29. Petrou, E., et al., Haemostatic profile of riboflavin-treated apheresis platelet concentrates. *Blood Transfusion*, 2021(Blood Transfusion - 3 2022 (May-June)): p. 223-234.
30. Tsalas, S., et al., The effects of pathogen reduction technology on apheresis platelet concentrates stored in PAS : In vitro function of PRT-treated platelets in PAS. *Blood Transfusion*, 2024(Ahead-of-Print).