



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



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη αυξητικών παραγόντων των αιμοπεταλίων σε πλάσμα πλούσιο  
σε αιμοπετάλια αποθηκευμένο σε ψύχος**

POST GRADUATE THESIS

**Study of platelet-derived growth factors in platelet-rich plasma stored in cold  
conditions**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

**Μπακογεώργου Σαμπρίνα**

Bakogeorgou Sabrina

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

**Κριεμπάρδης Αναστάσιος**

Kriebardis Anastasios

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022



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



POST GRADUATE THESIS

## **Study of platelet's growth factors in platelet-rich plasma stored in cold conditions**

Bakogeorgou Sabrina  
19005  
sbakogeorgou@gmailcom

FIRST SUPERVISOR  
Kriebardis Anastasios

SECOND SUPERVISOR  
Georgatzakou Chara

THIRD SUPERVISOR  
Papageorgiou Eustathia

AIGALEO 2022

## **Επιτροπή εξέτασης**

Ημερομηνία εξέτασης:

Ονόματα εξεταστών

1<sup>ος</sup> Εξεταστής: Κριεμπάρδης Αναστάσιος

2<sup>ος</sup> Εξεταστής: Γεωργατζάκου Χαρά

## **Υπογραφή**

## Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Μπακογεώργου Σαμπρίνα του Σόλων, με αριθμό μητρώου 19005 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

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

Η Δηλούσα

Μπακογεώργου Σαμπρίνα

## **Ευχαριστίες**

Η διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος με τίτλο: Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση.

Ευχαριστώ τους:

Κ. Κριεμπάρδη Αναστάσιο, εισηγητή καθηγητής της διπλωματικής εργασίας, για την καθοδήγηση, υπομονή και την εμπιστοσύνη του.

Κ. Γεωργατζάκου Χαρά, εισηγήτρια Β΄ της διπλωματικής εργασίας

Κ. Παπαγεωργίου Ευσταθία, , εισηγήτρια Γ΄ της διπλωματικής εργασίας

## Αφιερώσεις

Στην μητέρα μου Παρασκευή Ζάχου  
και στα αδέρφια μου, Άννα και Δημήτρης, για την στήριξη τους

## Συντομογραφίες

### Αγγλική ορολογία

PRP	platelet rich plasma
PC	platelet concentrate
L-PRP	leucocyte platelet rich plasma
PRF	plasma rich fibrin
L-PRF	leucocyte plasma rich fibrin
UCB-PRP	umbilical cord blood PRP
ROS	reactive oxygen species
MMP	matrix metalloproteinases
GPVI	glycoprotein VI
MSC	mesenchymal stem cell
BMSC	bone marrow stem cell
ADSC	adipose stem cell
PDLSC	periodontal ligament stem cell
GM	gelatin microspheres
SEM	scanning electron microscopy
ECM	extracellular matrix
GF	growth factor
PDGF	platelet derived growth factor
TGF- β	transforming growth factor beta
EGF	epidermal growth factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
IGF-1	insulin-like growth factor-1
bFGF	basic fibroblast growth factor

### Ελληνική ορολογία

πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
συμπύκνωμα αιμοπεταλίων
πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια με λευκοκύτταρα
πλάσμα ινώδους πλούσιο σε αιμοπετάλια
πλάσμα ινώδους πλούσιο σε αιμοπετάλια με λευκοκύτταρα
πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια από αίμα ομφάλιου λώρου
αντιδραστικά είδη οξυγόνου
μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας
γλυκοπρωτεΐνη VI
μεσεγχυματικό βλαστοκύτταρο
βλαστοκύτταρο από μυελό των οστών
βλαστοκύτταρο από λιπώδη ιστό
βλαστοκύτταρα περιοδοντικού συνδέσμου
μικροσφαιρίδια ζελατίνης
ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
εξωκυτταρική μήτρα
αυξητικός παράγοντας
αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας
τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας
επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης-1
ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας

PCR polymerase chain reaction

q-PCR quantitative PCR

RT-PCR real time PCR

αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-

ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση

πολυμεράσης

αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

πραγματικού χρόνου



## Περίληψη

Τα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια επιστρέφουν. Εγκαταλείφθηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1960 προς όφελος των αποθηκευμένων σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπεταλίων λόγω της ανάγκης για μεγαλύτερη διάρκεια ανάκτησης και επιβίωσης των αιμοπεταλίων μετά τη μετάγγιση σε ασθενείς με χρόνια θρομβοπενία. Ωστόσο, οι τρέχουσες ανάγκες για μεταγγίσεις αιμοπεταλίων αλλάζουν συνεχώς, καθώς σήμερα, όλο και περισσότερα αιμοπετάλια χορηγούνται σε ασθενείς με ενεργή αιμορραγία, όπως συμβαίνει σε καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις. Έχει διαπιστωθεί ότι τα ψυχρά αιμοπετάλια είναι πιο αποτελεσματικά αιμοστατικά, έχουν μειωμένη ανάπτυξη βακτηρίων και έχουν μεγαλύτερη πιθανή διάρκεια ζωής. Αυτά τα επιτακτικά χαρακτηριστικά οδήγησαν στο πρόσφατο ενδιαφέρον για την επαναφορά των ψυχρών αιμοπεταλίων στα συστήματα αίματος. Ωστόσο, πριν επαναποθετηθούν τα αιμοπετάλια σε ψυχρή αποθήκευση στις κλινικές, απαιτείται ενδελεχής διερεύνηση των *in vitro* χαρακτηριστικών αποθήκευσης και των επιπτώσεων της μετάγγισης *in vivo*. Αυτή η ανασκόπηση έχει ως στόχο να προσφέρει μια ενημέρωση όσον αφορά τις διάφορες ερευνητικές προσπάθειες που έχουν γίνει για την βελτίωση των συνθηκών αποθήκευσης και διατήρησης των λειτουργιών των αιμοπεταλίων που φυλάσσονται σε ψυχρές θερμοκρασίες. Θα συζητήσουμε επίσης τις προσπάθειες που έγιναν για τη βελτίωση των ψυχρών αποθηκευμένων αιμοπεταλίων ώστε να είναι ένα ασφαλέστερο προϊόν κατά τη χρήση του σε διάφορες εφαρμογές. Τέλος, θα ασχοληθούμε με τη συσχέτιση των *in vitro* δεδομένων με τα αποτελέσματα της μετάγγισης αιμοπεταλίων *in vivo* και θα παρέχουμε πληροφορίες και οδηγίες για μελλοντικές έρευνες αιμοπεταλίων αποθηκευμένων σε θερμοκρασίες ψύχους.

**Λέξεις-κλειδιά:** ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, διάλυμα αποθήκευσης, μετάγγιση αιμοπεταλίων, αυξητικοί παράγοντες

## **Abstract**

Cold-stored platelets return. They were abandoned in the late 1960s in favor of room-temperature stored platelets because of the need for longer platelet recovery and survival after transfusion in patients with chronic thrombocytopenia. However, current needs for platelet transfusions are changing rapidly. Today, more platelets are given to patients who are actively bleeding, such as those undergoing heart surgery. Cold platelets have been found to be more effective hemostatically, have reduced bacterial growth, and have a longer potential lifespan. These compelling features have led to recent interest in reintroducing cold platelets into blood systems. However, before platelets are reintroduced into cold storage in clinics, a thorough investigation of the in vitro storage characteristics and the effects of transfusion in vivo is required. This review aims to provide an update on recent research efforts on the storage characteristics and functions of cryopreserved platelets using modern research tools. We will also discuss the efforts made to improve cold-stored platelets to be a better and safer product. Finally, we will conclude by discussing the relevance of in vitro data to in vivo transfusion outcomes and provide insights and directions for future investigations of cryopreserved platelets.

**Keywords:** cold-stored platelets, platelet rich plasma, storage solution, platelet transfusion, growth factors

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	1
Εισαγωγή .....	12
<b>Κεφάλαιο 1: Ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια In vitro Χαρακτηρισμός: Μια ενημέρωση και μια συζήτηση.....</b>	<b>16</b>
1.1 Βιοενεργοί παράγοντες σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) .....	18
1.2 Παραγωγή πλάσματος PRP .....	21
1.3 Λευκοκύτταρα στο PRP πλάσμα.....	24
<b>Κεφάλαιο 2: "Omics" και ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια.....</b>	<b>26</b>
<b>Κεφάλαιο 3: Μείωση της ψυχρής βλάβης αποθήκευσης αιμοπεταλίων, ένα έργο σε εξέλιξη.....</b>	<b>28</b>
3.1 Ιστορικό θερμοκρασίας αποθήκευσης αιμοπεταλίων .....	31
3.2 Βλάβη αποθήκευσης αιμοπεταλίων.....	31
<b>Κεφάλαιο 4: Μικροβιακή μόλυνση.....</b>	<b>33</b>
4.1 Βιολογία πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια.....	36
<b>Κεφάλαιο 5: Επίδραση των συνθηκών αποθήκευσης στην απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων σε παράγωγα αίματος πλούσια σε αιμοπετάλια .....</b>	<b>39</b>
5.1 Επεξεργασία PRP πλάσματος και συμπυκνώματος αιμοπεταλίων .....	39
5.2 Πειραματική ρύθμιση .....	40
5.3 Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια.....	41
5.4 Συμπύκνωμα αιμοπεταλίων.....	42
<b>Κεφάλαιο 6: Αυξητικοί παράγοντες .....</b>	<b>43</b>
6.1 Βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (bFGF) .....	44
6.2 Ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1) .....	45
6.3 TGF-β .....	46
6.4 Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) .....	47
6.5 Αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF).....	47
6.6 Αυξητικοί παράγοντες και βλαστοκύτταρα προερχόμενα από λιπώδη ιστό (ADSCs) στη μυοσκελετική αναγέννηση .....	48
6.7 Αυξητικοί παράγοντες και βλαστοκύτταρα που προέρχονται από μυελό των οστών (BMSCs) στη μυοσκελετική αναγέννηση .....	48
6.8 Αυξητικοί παράγοντες και βλαστοκύτταρα περιοδοντικού συνδέσμου (PDLSCs) στη μυοσκελετική αναγέννηση .....	50
<b>Συζήτηση .....</b>	<b>51</b>
7.1 Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια.....	52
7.2 Συμπύκνωμα αιμοπεταλίων.....	53
<b>Συμπεράσματα .....</b>	<b>54</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>55</b>

## Εισαγωγή

Η χρήση των ψυχρών αποθηκευμένων αιμοπεταλίων δεν αποτελεί κάτι καινοτόμο της νέας γενιάς, καθώς πριν από τα τέλη της δεκαετίας του 1970, όλες οι μονάδες αιμοπεταλίων που χρησιμοποιούνταν για μεταγγίσεις αποθηκεύονταν στους 4°C. Ωστόσο, αναγνωρίστηκε το 1969 ότι τα ψυχρά αιμοπετάλια απομακρύνθηκαν γρήγορα από τις κυκλοφορίες, ενώ τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια είχαν σημαντικά μεγαλύτερο χρόνο κυκλοφορίας (Murphy, 1969).

Η ταχεία κάθαρση των ψυχρών αιμοπεταλίων αποδίδεται σε μία από τις σημαντικές φυσιολογικές αλλαγές όταν τα αιμοπετάλια εκτίθενται στην ψυχρή θερμοκρασία. Ανακαλύφθηκε ότι η ψυχρή αποθήκευση προκαλεί τη συγκέντρωση της γλυκοπρωτεΐνης GPIIb στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, η οποία έχει αποδειχθεί ότι μεσολαβεί στη φαγοκυττάρωση από μακροφάγα σε βραχυπρόθεσμα (<48 ώρες) ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια (Josefsson E.C., 2005). Τα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται πάνω από 48 ώρες απομακρύνονται από τα ηπατοκύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα Ashwell-Morell με τα εκτεθειμένα τμήματα β-GlcNA αυτών (Badlou B.A., 2006). Έγιναν αρκετές προσπάθειες για την αντιμετώπιση της ταχείας κάθαρσης των ψυχρών αιμοπεταλίων με γαλακτοζυλίωση των τμημάτων β-GlcNAc, όμως δεν στέφθηκαν με επιτυχία (Wandall H.H., 2011). Δεδομένου ότι η πλειονότητα των μεταγγίσεων αιμοπεταλίων έγινε σε ασθενείς με αιματολογικές διαταραχές στα τέλη της δεκαετίας του 1970, υπήρξε μια πλήρης αλλαγή στη μεθοδολογία αποθήκευσης αιμοπεταλίων από ψυχρά αιμοπετάλια σε αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε ψυχρές συνθήκες παρουσιάζουν σημαντικές μορφολογικές αλλαγές σε σύγκριση με τα φρέσκα αιμοπετάλια καθώς και στους επιφανειακούς υποδοχείς τους. Στην κυκλοφορία, τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια έχουν λεπτό δισκοειδές σχήμα, με την άμεση έκθεσή τους στους 0°C για 10 λεπτά *ex vivo*, η πλειονότητα των αιμοπεταλίων χάνουν το σχήμα τους και γίνονται σφαιρικά. Κατά τη παρατήρησή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, τα αιμοπετάλια που εκτίθενται στο κρύο είναι σφαιρικά με πολλά «χτυπήματα» και συχνά διαθέτουν λεπτά ψευδοπόδια που εκτείνονται προς τα έξω (Zucker M.B., 1954), χάνοντας επίσης τους περιφερειακούς μικροσωληνίσκους δακτυλίους τους (White J.G., 1967).

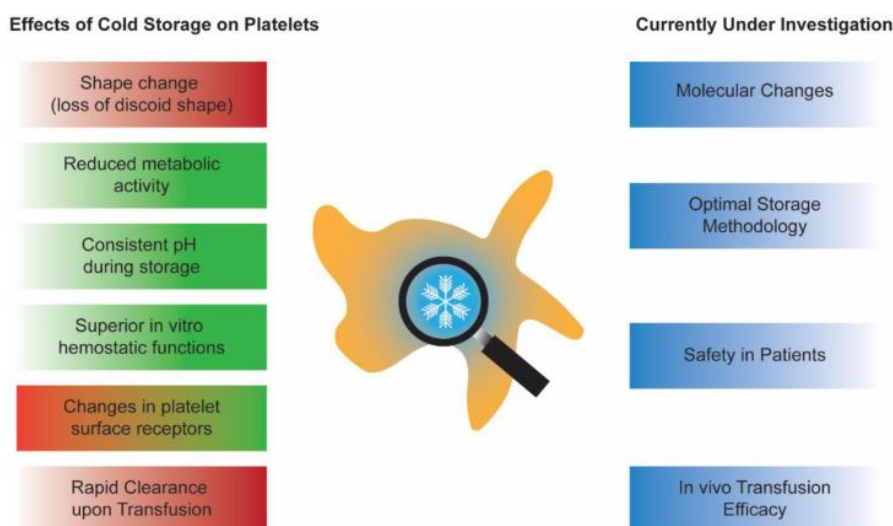
Η ψυχρή θερμοκρασία επάγει επίσης την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με τη μορφή απελευθέρωσης των συστατικών των αιμοπεταλιακών κόκκων και την έκθεση σε φωσφατιδυλοσερίνη (Reddoch K.M., 2014). Ένας πιθανός μηχανισμός ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων που προκαλείται από τις χαμηλές θερμοκρασίες είναι η σημαντική συσσώρευση ενδοκυτταρικού ασβεστίου κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ψύξη (Oliver A.E., 1999). Επιπλέον, η χαμηλή θερμοκρασία έχει σημαντικές επιπτώσεις στο μεταβολισμό των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων, με τη μείωση στην κατανάλωση της γλυκόζης και την παραγωγή γαλακτικού οξέος (Getz T.M., 2016). Η αποθήκευση στο κρύο έχει επίσης συσχετιστεί με τη διατήρηση των μιτοχονδριακών λειτουργιών των αιμοπεταλίων.

Παρά την ταχεία *in vivo* κάθαρση, έχει ανανεωθεί το ενδιαφέρον για την επιστροφή των αιμοπεταλίων που έχουν αποθηκευτεί σε ψυχρή κατάσταση ως προϊόν. Αυτή η πρόσφατη αναζωπύρωση μπορεί να αποδοθεί σε τρεις κύριους λόγους. Με πρωταρχικό κύριο λόγο, η αποθήκευση των μονάδων αιμοπεταλίων σε θερμοκρασίες ψύχους μειώνει σημαντικά την ανάπτυξη μικροοργανισμών, όπως διάφορων βακτηρίων (Ketter P.M., 2019). Αυτό επιτρέπει στις μονάδες αιμοπεταλίων να έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, μειώνοντας έτσι τη σπατάλη λόγω της παλαιότητας. Δεύτερον, τα ψυχρά αιμοπετάλια φαίνεται να είναι αιμοστατικά ανώτερα από τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια (Becker G.A., 1973). Τέλος, ενώ τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια απαιτούν συνεχή μηχανική ανάδευση κατά την αποθήκευση, τα ψυχρά αιμοπετάλια δεν φαίνεται να απαιτούν ανάδευση (Zhao H.W., 2021).

Με αυτό το τρόπο μειώνουμε το κόστος των μηχανικών ανακινήτων και βελτιώνουμε τον χειρισμό υλικοτεχνικής υποστήριξης κατά τη μεταφορά αιμοπεταλίων. Επιπλέον, πρόσφατες έρευνες που στοχεύουν το τρόπο χρήσης και εφαρμογής των αιμοπεταλίων που προορίζονται για μετάγγιση, έχουν αναδείξει την σημαντική αύξηση της θεραπευτικής χρήσης των αιμοπεταλίων μετάγγισης έναντι της προφυλακτικής μετάγγισης (Pandey S.). Με ανώτερες αιμοστατικές λειτουργίες και μεγαλύτερη πιθανή διάρκεια ζωής, τα ψυχρά αιμοπετάλια θα μπορούσαν να είναι ένα πολλά υποσχόμενο προϊόν για ασθενείς με ενεργή αιμορραγία.

Προηγούμενες ανασκοπήσεις έχουν συζητήσει διεξοδικά τα *in vitro* χαρακτηριστικά, τη φυσιολογία και την αιμοστατική αποτελεσματικότητα των ψυχρών αποθηκευμένων αιμοπεταλίων (Getz, 2019). Μια σύντομη επισκόπηση των

γνωστών χαρακτηριστικών των ψυχροαποθηκευμένων αιμοπεταλίων και του χάσματος στη γνώση συνοψίζεται στην Εικόνα 1. Αυτή η ανασκόπηση στοχεύει να παρέχει πρώτα μια ενημέρωση σχετικά με τα νέα ευρήματα των ψυχροαποθηκευμένων αιμοπεταλίων που παράγονται από καινοτόμα *in vitro* μοντέλα και προηγμένες αναλυτικές τεχνικές. Στη συνέχεια, θα συνοψίσουμε τις πρόσφατες προσπάθειες για τη βελτίωση της ποιότητας των ψυχρών αιμοπεταλίων μέσω συμπληρωμάτων με αντιοξειδωτικά καθώς και για να γίνουν ασφαλέστερα τα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια με την εφαρμογή της τεχνολογίας απενεργοποίησης παθογόνων σε συνδυασμό με διαλύματα πρόσθετων αιμοπεταλίων. Στη συνέχεια, θα συζητήσουμε τις αλλαγές που έγιναν στη μεθοδολογία αποθήκευσης ψυχρών αιμοπεταλίων με σκοπό τη καλύτερη ποιότητα του προϊόντος και τέλος, η ανασκόπηση θα ολοκληρωθεί με μια συζήτηση σχετικά με τη συνάφεια των *in vitro* και *in vivo* δεδομένων των εν ψυχρώ αποθηκευμένων αιμοπεταλίων.



Εικόνα 1. Σύνοψη των γνωστών επιπτώσεων της αποθήκευσης σε ψύξη στα αιμοπετάλια και πτυχές των αιμοπεταλίων που είναι αποθηκευμένα σε ψυχρή κατάσταση που βρίσκονται υπό διερεύνηση. Οι επιβλαβείς επιδράσεις της ψυχρής αποθήκευσης σκιάζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ οι ευεργετικές επιδράσεις σκιάζονται με πράσινο. Το κουτί που σκιάζεται με κόκκινα και πράσινα χρώματα αντιπροσωπεύει αντικρουόμενες επιπτώσεις της αποθήκευσης σε ψύξη στους υποδοχείς της επιφάνειας των αιμοπεταλίων. (Zhao, 2022)

Η αναγέννηση και η αναδιαμόρφωση των οστών συντονίζονται από την αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών κυττάρων, αδιάλυτων και διαλυτών ρυθμιστών και των ανταγωνιστών τους (Gerstenfeld, 2003) για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Σε ιστική βλάβη, όπως κατάγματα, νέκρωση ή λοιμώξεις, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και έχουμε την απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων από τα α-κοκκία τους.

Στα κοκκία των αιμοπεταλίων αποθηκεύονται διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας PDGF, ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας-β TGF-β, ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης IGF-1, και πολλοί άλλοι. Συγκεκριμένα, οι αυξητικοί παράγοντες PDGF και TGF-β παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αναγέννηση των οστών και στην επούλωση (Frechette, 2005). Υπάρχουν 3 ισομορφές του PDGF, (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB), έχοντας και δύο διακριτούς υποδοχείς, τον α και β, μέσω των οποίων καταλύονται οι επιδράσεις των παραγόντων PDGF στα κύτταρα στόχους. Το PDGF-BB είναι η μόνη ισομορφή, η οποία επάγει όλους τους συνδυασμούς διμερών άλφα και βήτα υποδοχέα (Fang, 2004), (Colciago, 2009). Σε μία μελέτη όπου αξιολογήθηκε ο ρόλος του PDGF στη χημειοπροσέλκυση οστεοβλαστών που προέρχονται από ανθρώπινα οστά σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης, απέδειξε ότι ο υποδοχέας του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (rhPDGF-BB) παρήγαγε ένα ισχυρό χημειοτακτικό ερέθισμα (Fiedler, 2004). Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF, έχει υποστηρικτικό ρόλο κυρίως στην επούλωση των οστών, προάγοντας τις αγγειακές δομές και δρώντας στους οστεοβλάστες (Street, 2002), (Herford, 2017). Ο TGF-β είναι μια ρυθμιστική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση των οστών και στην επούλωση καταγμάτων (Joyce, 1990) και τα αυξημένα επίπεδα του TGF-β1, που ανήκει στην οικογένεια TGF-β, στα αιματώματα και στον ορό μετά από κατάγματα οστών δείχνουν τη σημασία του στην επούλωση των καταγμάτων και κακώσεων (Sarahrudi, 2011)..

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τα προϊόντα αιμοπεταλίων, όπως είναι το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP), το πλούσιο σε αιμοπετάλια ινώδες (PRF) παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων αυξητικών παραγόντων που εμπεριέχουν. (Anitua, 2012), (De Pascale, 2015), (Maoudi, 2016). Υπάρχουν πολλές διαφορετικές μέθοδοι παραγωγής τέτοιων προϊόντων αιμοπεταλίων, οι οποίες διαφέρουν ως προς την ταχύτητα, τον χρόνο και τον αριθμό των φυγοκεντρήσεων, τον όγκο αίματος που χρησιμοποιείται, τα αντιπηκτικά συμπληρώματα και τις μεθόδους ενεργοποίησης/επώασης (Zimmerman, 2003), (Mazzucco, 2009).

Τα συμπυκνώματα αιμοπεταλίων που παρασκευάζονται από πλήρες αίμα χωρίς προσθήκη αντιπηκτικών, που ονομάζονται PRF, οδηγούν στην πρόκληση

θρόμβου ινώδους. Το τυπικό PRF φυγοκεντρείται στις 3000 RPM για 10 λεπτά, ενώ η διαδικασία για το A-PRF περιλαμβάνει φυγοκέντρηση στις 1500 RPM για 14 λεπτά (Dohan, 2006), (Ghanaati S., 2014). Η ενεργοποίηση της απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων από συμπυκνώματα αιμοπεταλίων πριν από την κλινική εφαρμογή έχει περιγραφεί συχνά, ειδικά για την παραγωγή του PRP πλάσματος. Οι μέθοδοι απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων από παράγωγα αιμοπεταλίων μπορούν να χωριστούν σε διαφορετικές κατηγορίες: α) επαναλαμβανόμενοι κύκλοι κατάψυξης-απόψυξης (πάγωμα-απόψυξη-κατάψυξη, FTF), β) επώαση στους 37°C για 1 ώρα ακολουθούμενη από ανάκληση στους 4°C για 16 ώρες, και γ) άμεση ενεργοποίηση με προσθήκη διαλύματος CaCl<sub>2</sub> ή ανθρώπινης/ανασυνδυασμένης θρομβίνης (Burnouf, 2016). Παρόλου που στο εμπόριο υπάρχουν αρκετές συσκευές για τη παραγωγή του PRP που προορίζεται για κλινική χρήση, δεν υπάρχει ένα επίσημο πρωτόκολλο παραγωγής του. Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί για την ανάδειξη του κατάλληλου τρόπου ενεργοποίησης του PRP, όπως η χρήση ασβεστίου, θρομβίνης, επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης-απόψυξης ή επώασης στους 37°, για τη βέλτιστη και υψηλότερη απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων. Ωστόσο, πολλά ερωτήματα πάνω στην εφαρμογή αυτών των διαδικασιών παραμένουν αναπάντητα.

## **Κεφάλαιο 1: Ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια in vitro**

### **Χαρακτηρισμός: Μια ενημέρωση και μια συζήτηση**

Οι περισσότερες μελέτες in vitro στο παρελθόν είχαν ως κοινό χαρακτηριστικό ότι τα ψυχρά αιμοπετάλια έδειχναν να έχουν υψηλότερο αιμοστατικό δυναμικό σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία δωματίου. Στα τέλη της δεκαετίας του 1960, όταν η πρακτική αποθήκευσης αιμοπεταλίων άλλαξε από ψυχρά αιμοπετάλια σε αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου, ήταν γνωστό ότι τα ψυχρά αιμοπετάλια ήταν καλύτερα για ασθενείς με αιμορραγία, καθώς έδειχναν ανώτερη διόρθωση στον χρόνο αιμορραγίας (Becker G.A., 1973). Τα τελευταία μοντέλα in vitro αποκάλυψαν νέες πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά αποθήκευσης των ψυχρών αποθηκευμένων αιμοπεταλίων. Χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης για την εξέταση των χαρακτηριστικών των θρόμβων που σχηματίζονται από ψυχρά αιμοπετάλια έναντι αιμοπεταλίων που είναι αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου (Nair, 2017). Οι εικόνες μικροσκοπίας έδειξαν ότι τα ψυχρά αιμοπετάλια είχαν σημαντικά μεγαλύτερη



διασύνδεση με πυκνότερες ίνες σε σύγκριση με θρόμβους που σχηματίστηκαν από αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου. Η εργαστηριακή ανάλυση που έγινε στα αποθηκευμένα σε ψύχος αιμοπετάλια, για 5 ημέρες, έδειξε επίσης παρόμοια ακαμψία θρόμβων με αυτή των φρέσκων αιμοπεταλίων. Η ανώτερη διασύνδεση ινών σε ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια θα μπορούσε να προκληθεί από τον παράγοντα XIII μέσω της δέσμευσης στην ενεργοποιημένη γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa στις ψυχρές επιφάνειες των αιμοπεταλίων (Nair, 2017). Επιπλέον, η ιστολογική ανάλυση του θρόμβου έδειξε ότι τα ψυχρά αιμοπετάλια είχαν υψηλότερο πορώδες και πιο καλά καθορισμένη δομή στους θρόμβους τους, που έμοιαζε με αυτή των φρέσκων αιμοπεταλίων. Από την άλλη πλευρά, τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια σχημάτισαν θρόμβους με αλλοιωμένη δομή και μειωμένο πορώδες (Nair P. M., 2021).

Τα μιτοχόνδρια στα αιμοπετάλια είναι απαραίτητα για τον μεταβολισμό και την παραγωγή ενέργειας των αιμοπεταλίων. Τα μιτοχόνδρια παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη μεσολάβηση της αντίδρασης των αιμοπεταλίων στο στρες και την ενεργοποίηση (Melchinger, 2019). Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS), τα οποία παράγονται κατά τη μιτοχονδριακή αναπνοή, βρέθηκαν να είναι χαμηλότερα στα ψυχρά αιμοπετάλια σε σύγκριση με τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια (Bynum, 2016). Επιπλέον, τα ψυχρά αιμοπετάλια διατήρησαν τις δυνατότητες μιτοχονδριακής αναπνοής ενώ τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου είχαν μειωμένη μιτοχονδριακή αναπνοή μετά από 7 ημέρες αποθήκευσης (Bynum, 2016). Τέλος, η αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες έχει επίσης ανακαλυφθεί ότι προκαλεί σημαντικές αλλαγές στους υποδοχείς ADP των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα, οι υποδοχείς P2Y1 και P2X1 μειώθηκαν στα ψυχρά αιμοπετάλια σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Οι αλλαγές στους υποδοχείς ADP των ψυχρών αιμοπεταλίων θα μπορούσαν να παρέχουν μια εξήγηση για το γιατί τα ψυχρά αιμοπετάλια ανταποκρίνονται λιγότερο σε ανασταλτικά σήματα, όπως το μονοξειδίο του αζώτου και η προσταγλανδίνη E1, σε σύγκριση με τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια (Koessler, 2020).

Μία *in vitro* έρευνα αποκάλυψε αντιφατικά δεδομένα όσον αφορά την υπεροχή των αιμοστατικών λειτουργιών των ψυχρών αποθηκευμένων αιμοπεταλίων. Για παράδειγμα, αποδείχθηκε ότι η συγκέντρωση της γλυκοπρωτεΐνης VI, του υποδοχέα στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων για την ενεργοποίηση του κολλαγόνου,

ήταν χαμηλότερη στα ψυχρά αιμοπετάλια σε σχέση με τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου (Miles, 2021). Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ένα προσαρμοσμένο μοντέλο μικρορευστοποίησης που σχεδιάστηκε για τη μέτρηση της συσταλτικής δύναμης των αιμοπεταλίων υπό διατμητική τάση, τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν ψυχρά βρέθηκε ότι είχαν ασθενέστερη απόκριση συσσωμάτωσης στο κολλαγόνο από τα αιμοπετάλια που είναι αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου. Πειράματα μετάγγισης *in vivo* σε ανθρώπους εθελοντές υπό διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία έδειξαν επίσης ότι τα ψυχρά αιμοπετάλια μετά τη μετάγγιση ανταποκρίθηκαν λιγότερο στο κολλαγόνο σε σύγκριση με τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια, υποδηλώνοντας περαιτέρω απώλεια γλυκοπρωτεΐνης VI κατά την αποθήκευση *in vitro* (Miles, 2021). Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αυτά τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με περιορισμένο αριθμό βιολογικών αντιγράφων (N=8), και χρησιμοποιήθηκαν πλυμένα αιμοπετάλια, τα οποία μπορεί να επηρεάσουν το ποσοστό της γλυκοπρωτεΐνης VI.

Επιπλέον, υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με το εάν οι *in vitro* δοκιμές είναι αξιόπιστες στη μελέτη ψυχρών αποθηκευμένων αιμοπεταλίων. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η χρήση ιξωδοελαστικών δοκιμών. Οι ιξωδοελαστικές δοκιμές, όπως η περιστροφική θρομβοελαστομετρία ή η θρομβοελαστογραφία, έχουν χρησιμοποιηθεί συχνά για να δείξουν την ανώτερη αιμοστατική αποτελεσματικότητα των ψυχρών αιμοπεταλίων έναντι των αποθηκευμένων σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπεταλίων. Ωστόσο, λόγω των σημαντικών αλλαγών στους επιφανειακούς υποδοχείς των αιμοπεταλίων, όπως η γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa σε ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια, τα αποτελέσματα των ιξωδοελαστικών δοκιμών μπορεί να είναι παραπλανητικά. Κατά τη χρήση θρομβοελαστογραφίας (MaFibrin), η οποία αντικατοπτρίζει τη συμβολή του ινώδους στη δημιουργία θρόμβων, όταν αναλύθηκαν ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια η ενεργοποιημένη γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa τους συνέβαλε σε αύξηση του μέγιστου πλάτους (Scorer, 2020). Ο αποκλεισμός της γλυκοπρωτεΐνης IIb/IIIa με χρήση αναστολέων εξάλειψε αυτό το αποτέλεσμα. Αυτά τα δεδομένα έδειξαν ότι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων *in vitro* των αιμοπεταλίων που φυλάσσονται εν ψυχρώ θα πρέπει να είναι προσεκτική και ότι άλλες αναλύσεις θα πρέπει να χρησιμοποιούνται παράλληλα.

### **1.1 Βιοενεργοί παράγοντες στο PRP**

Το PRP έχει οριστεί ως μια αυτόλογη συγκέντρωση ανθρώπινων αιμοπεταλίων που

είναι περίπου 3-5 φορές μεγαλύτερη από τη φυσιολογική συγκέντρωση θρομβοκυττάρων που υπάρχει στο πλήρες αίμα (Knezevic, 2016). Ο φυσιολογικός αριθμός αιμοπεταλίων σε υγιή άτομα κυμαίνεται μεταξύ 150000 και 350000 κυττάρων/ $\mu$ L αίματος. Τα αιμοπετάλια είναι μικρά, δισκοειδή κύτταρα χωρίς πυρήνα, μη έχοντας τη δυνατότητα να αναπαραχθούν και σχηματίζονται στο μυελό των οστών από τα μεγακαρυοκύτταρα. Τα αιμοπετάλια χαρακτηρίζονται από την κύριο ρόλο τους στην αιμόσταση και την πήξη και έχουν μέσο χρόνο ζωής 7 έως 10 ημέρες. Μετά από τραυματισμό με προκύπτουσα αιμορραγία, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και αρχίζουν να απελευθερώνουν το περιεχόμενο των  $\alpha$ -κοκκίων τους, μία πληθώρα αυξητικών παραγόντων που τελικά διεγείρουν τον καταρράκτη φλεγμονής και τη διαδικασία επούλωσης.

Διάφορες πρωτεΐνες και άλλες ουσίες που είναι απαραίτητες για την διαδικασία επούλωσης των ιστών εκκρίνονται από τους τρεις τύπους κοκκίων των αιμοπεταλίων ( $\alpha$ φ,  $\delta$ λ, και  $\lambda$ μ). Τα  $\alpha$ -κοκκία βρίσκονται στο μεγαλύτερο ποσοστό και αποτελούν το 10% του όγκου των αιμοπεταλίων και σε αριθμό περίπου 50-80  $\alpha$ -κόκκοι ανά κύτταρο. Τα  $\alpha$ -κοκκία περιέχουν πρωτεΐνες που συνδέονται με τη μεμβράνη καθώς και διαλυτές πρωτεΐνες που απελευθερώνονται στον εξωκυτταρικό χώρο. Οι δεσμευμένες στη μεμβράνη πρωτεΐνες περιλαμβάνουν διάφορες ιντεγκρίνες ( $\alpha$ IIb,  $\alpha$ 6,  $\beta$ 3), μόριο προσκόλλησης ενδοθηλιακών κυττάρων αιμοπεταλίων (PECAM), υποδοχείς οικογένειας ανοσοσφαιρίνης (γλυκοπρωτεΐνη VI) και άλλους υποδοχείς (Maynard, 2007).

Από την άλλη πλευρά, διάφορες μελέτες πρότειναν ότι περισσότερες από 300 διαλυτές πρωτεΐνες απελευθερώνονται από τα  $\alpha$ -κοκκία (Coppinger, 2004). Αυτά τα βιοενεργά μόρια είναι πολύ ετερογενή όσον αφορά τη λειτουργία και περιλαμβάνουν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην πήξη, τη φλεγμονή, την ανάπτυξη των κυττάρων, την προσκόλληση των κυττάρων και την άμυνα του ξενιστή. Τα  $\delta$ -κοκκία αναφερόμενα και ως πυκνά σωματίδια, περιέχουν κυρίως μόρια που διεγείρουν τη διαδικασία πήξης, συμπεριλαμβανομένου του ασβεστίου, του μαγνησίου, της αδενοσίνης και βιοδραστικών αμινών, όπως η σεροτίνη και η ισταμίνη (Gedlitschky, 2004). Τα  $\lambda$ -κοκκία είναι ένας άλλος τύπος κοκκίων των θρομβοκυττάρων και ανήκουν στα οργανίδια λυσοσωμικού τύπου. Όπως τα λυσοσώματα σε άλλους τύπους κυττάρων, το  $\lambda$ -κοκκία περιέχουν ένζυμα απαραίτητα για τη διαδικασία αποικοδόμησης πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων. Επίσης, συμμετέχουν στην αφαίρεση των υπολειμμάτων από τον κατεστραμμένο ιστό και στην αφαίρεση των

μολυσματικών παραγόντων (Boswell, 2012)

Γενικά, οι λειτουργικές ιδιότητες του PRP βασίζονται κυρίως στη σύνθεση και έκκριση πολλαπλών αυξητικών παραγόντων που εκκρίνονται μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Αυτοί οι παράγοντες παίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής διαδικασίας, χημειοταξίας, μιτογένεσης και διαφοροποίησης και είναι αποθηκευμένα κυρίως στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται έχουν ως αποτέλεσμα την διέγερση των τοπικών επιθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων και τα ωθούν να μεταναστεύσουν, να διαιρεθούν και να αυξήσουν τη σύνθεση κολλαγόνου και μήτρας με αποτέλεσμα το σχηματισμό συνδετικού ιστού ινώδους και σχηματισμό ουλής (Sanchez, 2003). Επιπλέον, πολλοί από τους αυξητικούς παράγοντες που απελευθερώνονται στον κατεστραμμένο ιστό εκφράζουν συνδυασμένη δράση και μπορεί επίσης να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, παρέχοντας την ενεργοποίηση διαφορετικών ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης με ενισχυμένη επισκευή ιστού (Nikolidakis, 2008)

Οι εξέχοντες αυξητικοί παράγοντες του PRP περιλαμβάνουν τον αιμοπεταλιακό αυξητικό παράγοντα (PDGF), τον τροποποιητικό αυξητικό παράγοντα β (TGF-β), αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF), τον αυξητικό παράγοντα ινσουλίνης (IGF), και αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF) (Yu, 2011). Ο PDGF πήρε το όνομά του αφού ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στα αιμοπετάλια, όμως πέραν των αιμοπεταλίων βρίσκεται επίσης και σε άλλους τύπους κυττάρων, όπως είναι τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα (Nikolidakis, 2008). Ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας αποτελείται από υπομονάδες Α και/ή Β και υπάρχουν τρεις ισομορφές AA, BB και AB. Ο PDGF που απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια διεγείρει τη χημειοταξία και τη μίτωση των ινοβλαστών, τη σύνθεση κολλαγόνου και την αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας, καθώς και τη χημειοταξία των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων και ενισχύει την έκκριση του TGFβ παράγοντα από τα μακροφάγα (Barrientos, 2008).

Ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας β, TGF-β, ανήκει σε μία υπεροικογένεια που αποτελείται από τρεις ισομορφές, οι παράγοντες TGF-β, TGF-β1, TGF-β2 και TGF-β3 (Davis, 2014). Σε περίπτωση τραυματισμού, η μορφή του TGF-β που απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια είναι η TGF-β1. Αυτός ο αυξητικός παράγοντας διεγείρει την παραγωγή κολλαγόνου και αποτρέπει τη διάσπαση του

κολλαγόνου. Ο TGF-β1 προάγει την αγγειογένεση, την αναγέννηση του συνδετικού ιστού και τη χημειοταξία των κυττάρων του ανοσοποιητικού (Gurtner, 2008). Περαιτέρω, στη θέση του οστικού τραυματισμού, ο TGF-β1 διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και αναστέλλει τον σχηματισμό οστεοκλαστών, ευνοώντας τον σχηματισμό οστού έναντι της απορρόφησης (Nikolidakis, 2008).

Σε περίπτωση τραύματος, στο σημείο του κατεστραμμένου ιστού ο αυξητικός παράγοντας VEGF απελευθερώνεται από τα θρομβοκύτταρα και τα μακροφάγα. Ο VEGF είναι σημαντικός για την τόνωση του σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων και, ως εκ τούτου, για τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών και αυξημένης ροής αίματος στο σημείο του τραυματισμού (Dhillon, 2012). Για τη διέγερση της αγγειογένεσης, εκτός από τον VEGF, είναι επίσης απαραίτητη η παρουσία του FGF. Έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία PDGF, TGF-β και EGF μπορεί να ενισχύσει σε μεγάλο βαθμό την έκκριση VEGF (Barrientos, 2008).

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGF, παίζει ρόλο στη χημειοταξία και την αγγειογένεση των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη μίτωση των μεσεγχυματικών κυττάρων. Σε μελέτη έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί τη έναρξη της επιθηλιοποίησης και μειώνει το χρόνο της διαδικασίας επούλωσης τραύματος (Barrientos, 2008). Με την απελευθέρωση του, πυροδοτεί επίσης και την έκκριση κυτοκίνης από μεσεγχυματικά και επιθηλιακά κύτταρα (Knezevic, 2016).

Ο IGF-1 είναι πολυπεπτιδική ορμόνη 70 αμινοξέων που είναι φυσιολογικό συστατικό του πλάσματος αλλά μπορεί επίσης να μεταφερθεί στα αιμοπετάλια μέσω πρωτεϊνών που δεσμεύουν τον IGF. Απελευθερώνεται από τα διεγερμένα αιμοπετάλια διεγείροντας τη διαφοροποίηση και μιτογένεση των μεσεγχυματικών κυττάρων. Περαιτέρω, επειδή προκαλεί τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών παίζει ρόλο και στη διαδικασία σχηματισμού οστών (Dhillon, 2012).

Ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών FGF αποτελεί ένα ισχυρό μιτογόνο που δρα σε πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων, όπως τα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα χονδροκύτταρα και τους οστεοβλάστες (Oliveira Filho, 2010). Παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων και οστεοβλαστών και συνεργάζεται με τον αυξητικό παράγοντα VEGF στην αγγειογένεση. (Barrientos, 2008).

## **1.2 Παραγωγή PRP**

Μέχρι σήμερα υπάρχουν 40 διαφορετικά εμπορικά συστήματα ικανά να

δημιουργήσουν PRP πλάσμα από αυτόλογο πλήρες αίμα, τα οποία αρχειοθετούνται μέσω φυγοκέντρησης (Hsu, 2013). Υπάρχουν πολλά διαθέσιμα συστήματα στο εμπόριο για τη παραγωγή του PRP, με προκαθορισμένες συνθήκες φυγοκέντρησης, χρόνου και ταχύτητας, συνήθως όμως αποτελείται από δύο στάδια φυγοκέντρησης. Κατά κύριο λόγο, η παραγωγή του PRP βασίζεται στις διαφορετικές διαβαθμίσεις πυκνότητας των κυτταρικών συστατικών του αίματος. Κατά τη πρώτη φυγοκέντρηση, τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχοντας μεγαλύτερη πυκνότητα και ποσότητα, καθιζάνουν στον πυθμένα του δοχείου. Τα λευκά αιμοσφαίρια, διακρίνονται ως μία λεπτή στοιβάδα πάνω από τη συγκέντρωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα αιμοπετάλια βρίσκονται στη μεγαλύτερη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα και συλλέγονται σε δεύτερο δοχείο μαζί με την λεπτή στοιβάδα των λευκοκυττάρων, και φυγοκεντρείται το προϊόν για δεύτερη φορά με σκοπό την αύξηση συγκέντρωσης των αιμοπεταλίων. Η τελική συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στο PRP μπορεί να ποικίλλει, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο η επιλογή του εμπορικού συστήματος παραγωγής του, καθώς και τα χαρακτηριστικά του ασθενή όπως είναι η ηλικία, νοσήματα που μπορεί να έχει καθώς και το κυκλοφορικό του (Mazzucco, 2009).

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η κλινική χρήση του PRP, σε διάφορες θεραπευτικές εφαρμογές, παρόλα αυτά δεν έχει καθοριστεί ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο παραγωγής του, όπως και δεν υπάρχει μία καθολική άποψη για την ποσότητα αιμοπεταλίων που απαιτείται να υπάρχει στο PRP για να είναι θεραπευτικά αποτελεσματικό. Υπάρχουν αμφιλεγόμενες απόψεις για την απαιτούμενη συγκέντρωση αιμοπεταλίων για τη παραγωγή του PRP, καθώς σε μία μελέτη έχει αναφερθεί ότι απαιτείται μία συγκέντρωση αιμοπεταλίων της τάξεως από  $800$  έως  $1200 \times 10^9$  αιμοπετάλια/L για να είναι αποτελεσματικό το PRP σε θεραπευτικές εφαρμογές (Weibrich, 2004). Άλλοι ερευνητές πρότειναν ότι  $1000 \times 10^9$  αιμοπετάλια/L, μετρημένα σε όγκο  $5$  ml πλάσματος, μπορεί να αντιπροσωπεύουν θεραπευτική δόση PRP (Marx, 2004), ενώ σε μία άλλη μελέτη αναφέρει ότι η ελάχιστη ποσότητα αιμοπεταλίων για τη παραγωγή του PRP είναι τα  $200 \times 10^3$  αιμοπετάλια/ $\mu$ L, και άλλη μελέτη έδειξε ότι το PRP πρέπει να περιέχει περισσότερα από  $300 \times 10^3/\mu$ l (Anitua E. A., 2004).

Έχοντας τα παραπάνω στοιχεία υπόψιν, αντιλαμβανόμαστε ότι υπάρχουν διάφορα πρωτόκολλα παραγωγής του PRP, με την συγκέντρωση των αιμοπεταλίων να μην είναι σταθερή, και στο τελικό προϊόν να υπάρχουν και άλλα συστατικά ολικού αίματος σε διάφορες ποσότητες. Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει καθολική

ταξινόμηση για το PRP, έχουν προταθεί τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες PRP. Με βάση τη συνολική περιεκτικότητα σε λευκοκύτταρα και ινώδους εντός του PRP υπάρχουν: πλούσιο σε λευκοκύτταρα PRP (L-PRP), φτωχό σε λευκοκύτταρα PRP (P-PRP, μειωμένα λευκοκύτταρα ή καθαρό PRP), πλάσμα ινώδους πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRF) και πλάσμα ινώδους πλούσιο σε αιμοπετάλια με λευκοκύτταρα (L-PRF) (Bielecki, 2012). Ανάλογα με το πρωτόκολλο που θα επιλέξουμε για τη παραγωγή του PRP το τελικό προϊόν θα περιέχει και την αντίστοιχη ποσότητα λευκών αιμοσφαιρίων.

Δεν υπάρχει καθολική άποψη σχετικά με τον θετικό ή αρνητικό ρόλο των λευκοκυττάρων στο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια στην επούλωση των ιστών. Ορισμένες μελέτες όμως, έχουν αναφέρει την προσφορά των λευκοκυττάρων στην διαδικασία επούλωσης των ιστών με την ταυτόχρονη καταστολή και απομάκρυνση βακτηρίων και μικροοργανισμών. (Alsousou, 2009). Από την άλλη πλευρά όμως, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η ύπαρξη λευκών αιμοσφαιρίων στο PRP σχετίζεται με αυξημένη έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών, αναστέλλοντας έτσι τη διαδικασία της επούλωσης. (Dragoo, 2012).

Υπάρχει μία συνεχής συζήτηση σχετικά με την πιθανή εξωγενή ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων πριν από την εφαρμογή του PRP στον κατεστραμμένο ιστό. Πριν την θεραπευτική εφαρμογή του PRP, τα αιμοπετάλια στον ασκό είναι αδρανοποιημένα, με την τοπική εφαρμογή επέρχεται η επαφή των αιμοπεταλίων με το ινιδικό κολλαγόνο, την θρομβίνη, ή τη βασική μεμβράνη των κυττάρων έχοντας έτσι μέγιστη απελευθέρωση βιοδραστικών μορίων, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες, από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Με αυτό το τρόπο έχουμε άμεσα διαθέσιμο αυτό το μεγάλο ποσό αυξητικών παραγόντων έτοιμο να δράσει πάνω στον κατεστραμμένο ιστό. Σε άλλα πρωτόκολλα απαιτείται η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων πριν την τοπική εφαρμογή του PRP. Γενικά, η συνολική ποσότητα αυξητικών παραγόντων απελευθερώνεται περίπου μία ώρα μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, ενώ το 70% του αυξητικού παράγοντα απελευθερώνεται 10 λεπτά μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Συμπερασματικά η εξωγενής ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων θα μπορούσε να οδηγήσει σε ταχεία έκκριση των αυξητικών παραγόντων αλλά σε μειωμένο χρόνο έκθεσης των κατεστραμμένων ιστών στους αυξητικούς παράγοντες. Είναι απαραίτητο να εκτελεστούν πολλές και διαφορετικές κλινικές μελέτες για να διαπιστωθεί εάν είναι απαραίτητη η εξωγενής ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων πριν την εφαρμογή του PRP.

### 1.3 Λευκά αιμοσφαίρια στο PRP

Δεδομένου ότι το PRP αποτελεί ένα παράγωγο ολικού αίματος, ανάλογα με το πρωτόκολλο παραγωγής του, είναι δυνατόν να υπάρχουν και λευκοκύτταρα σε διάφορες ποσότητες. Τα ουδετερόφιλα, ως η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού, μεταναστεύουν στον κατεστραμμένο ιστό με σκοπό τη φαγοκυττάρωση νεκρωτικού ιστού και μικροβίων. Τα μονοκύτταρα καταφθάνουν στο σημείο του κατεστραμμένου ιστού μετά από τα ουδετερόφιλα, προκαλώντας διάσπαση της εξωκυτταρικής μήτρας με την απελευθέρωση μεταλλοπρωτεϊνών όπως MMP-2, MMP-9 και MMP-13 (Boswell, 2012). Με τη καταστροφή της εξωκυτταρικής μήτρας, διευκολύνεται η κυτταρική μετανάστευση μέσω του ιστού, καθιστώντας την επούλωση αποτελεσματική. Τα μονοκύτταρα μετά την άφιξή τους στο σημείο του τραύματος, μετατρέπονται σε μακροφάγα συνεχίζοντας την φαγοκυττάρωση κυτταρικών υπολειμμάτων και ουδετερόφιλων. Τα μακροφάγα επίσης, απελευθερώνουν διάφορους αυξητικούς παράγοντες που συνδράμουν στην διαδικασία της επούλωσης όπως οι TGF-β1, PDGF, VEGF, IGF-1, EGF και έτσι με την έκκριση των βιοδραστικών μορίων, τα μακροφάγα είναι απαραίτητα για τη νεοαγγειογένεση. Με το σχηματισμό των νέων αιμοφόρων αγγείων, αυξάνεται η παροχή των θρεπτικών συστατικών, του οξυγόνου και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων, μαζί με το σχηματισμό του κοκκιώδους ιστού και την αφαίρεση του νεκρωτικού ιστού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδοχή ότι μία κακή αγγειογένεση καθυστερεί την επούλωση των πληγών και το σχηματισμό έλκους.

Τα λευκοκύτταρα εκκρίνουν πολλές πρωτεΐνες, μεταξύ άλλων και των μεταλλοπρωτεϊνών και της σερίνης που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της επούλωσης. Ακόμη και οι πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να επάγουν την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και των αιμοπεταλίων, την ενεργοποίηση των κυτοκινών και το σχηματισμό βύσματος ινώδους-αιμοπεταλίου, επίσης είναι σε θέση να ελέγχουν την ένταση της φλεγμονώδους διαδικασίας απενεργοποιώντας τα φλεγμονώδη κύτταρα. Επίσης, οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα λευκοκύτταρα είναι σε θέση να ελέγχουν τη δραστηριότητα των εκκρινόμενων αυξητικών παραγόντων. Ο TGF-β1 μετά την απελευθέρωσή του ενεργοποιείται από τις πρωτεΐνες και αποθηκεύεται δεσμευμένος στην εξωκυτταρική μήτρα. Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα λευκοκύτταρα είναι ικανή να αποικοδομήσει τη μήτρα και να απελευθερώσει τον αυξητικό παράγοντα που μπορεί να λάβει χώρα στη διαδικασία επούλωσης πληγών.



Σε μελέτη έχει τεκμηριωθεί ότι η διαδικασία επούλωσης πληγών μπορεί να ενισχυθεί με την εφαρμογή PRP με λευκοκύτταρα σε κατεστραμμένους στοματικούς βλεννογόνους, βασιζόμενα σε αυτά τα αποτελέσματα μια άλλη μελέτη έδειξε ότι τα μειωμένα επίπεδα μακροφάγων στο σημείο του κατάγματος είχαν ως αποτέλεσμα μειωμένη πυκνότητα αιμοφόρων αγγείων και καθυστερημένο σχηματισμό οστού. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι οι αυξητικοί παράγοντες PDGF και TGF-β1 που απελευθερώνονται από τα λευκοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποκατάσταση ενός κατάγματος.

<b>Βασικοί αυξητικοί παράγοντες των α-κοκκίων και οι λειτουργίες τους</b>	
PDGF	Διεγείρει το πολλαπλασιασμό των κυττάρων, χημειοταξία, διαφοροποίηση και αγγειογένεση
TGF-b	Διεγείρει τη παραγωγή κολλαγόνου τύπου I και τύπου III, αγγειογένεση, επανεπιθηλιοποίηση, και τη σύνθεση αναστολέων πρωτεάσης για την αναστολή της διάσπασης του κολλαγόνου
VEGF	Διεγείρει την αγγειογένεση ρυθμίζοντας το πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων
EGF	Επηρεάζει το πολλαπλασιασμό και τη κυτταροπροστασία, επιταχύνει την επανεπιθηλιοποίηση, διευκολύνει την οργάνωση του κοκκιδώδους ιστού
bFGF	Διεγείρει την αγγειογένεση, προωθεί τη διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων, προωθεί τη παραγωγή κολλαγόνου και επιδιόρθωση ιστών
IGF-1	Ρυθμίζει το πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων, συμβάλλει στη έκκριση μήτρας από οστεοβλάστες, και παραγωγή κολλαγόνου

Πίνακας 1. PDGF: αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας, TGF-b: τροποποιητικός παράγοντας-β, VEGF: ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, EGF: επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, bFGF: βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας, IGF-1: αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης-1

Από την άλλη πλευρά, ορισμένες μελέτες έχουν προτείνει ότι το PRP πλούσιο σε λευκοκύτταρα μπορεί να αναστείλει τη διαδικασία επούλωσης πληγών κυρίως με μαζική απελευθέρωση αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) από ουδετερόφιλα σε κατεστραμμένο ιστό. Τα ουδετερόφιλα αποτελούν τη πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού και φθάνουν άμεσα στο σημείο τραυματισμού απελευθερώνοντας ROS και μονοξειδίο του αζώτου για να απομακρύνουν πιθανά μικρόβια και υπολείμματα στον τραυματισμένο ιστό. Συμπερασματικά μια υψηλότερη συγκέντρωση λευκοκυττάρων στο PRP μπορεί να επιφέρει καθυστερημένη επούλωση του τραύματος και, ως εκ τούτου, η εισροή ουδετερόφιλων θα ήταν φρόνιμο να ελεγχθεί (Boswell, 2012). Ακόμη, τα μακροφάγα είναι πιθανό να προκαλέσουν απόπτωση ουδετερόφιλων με αποτέλεσμα να αποφευχθεί η πιθανή αρνητική επίδραση των τεράστιων ποσοτήτων ουδετερόφιλων σε κατεστραμμένο ιστό. Καθώς υπάρχει έλλειψη επαρκών μελετών για την μελέτη της όποιας πιθανής θετικής ή αρνητικής επίδρασης των λευκοκυττάρων στη διαδικασία επούλωσης τραυμάτων, το οριστικό συμπέρασμα μένει αδιευκρίνιστο. Ωστόσο, οι θετικές ή αρνητικές επιδράσεις των λευκοκυττάρων στο PRP μπορεί να μην γενικεύονται σε όλους τους ιστούς, καθώς το PRP πλούσιο σε λευκά αιμοσφαίρια έχει θετικά αποτελέσματα σε ορισμένες καταστάσεις (Knezevic, 2016).

## **Κεφάλαιο 2: "Omics" και ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια**

Έχει παρατηρηθεί τελευταία ότι η ομική τεχνολογία «omics», όπως αποτελούν η πρωτεομική και η μεταβολομική, έχει γίνει πιο προσιτή, καθώς το μειωμένο κόστος εκτέλεσης των συγκεκριμένων αναλύσεων και η δυνατότητα δημιουργίας ενός μεγάλου ρεπερτορίου πληροφοριών όσον αφορά την βιολογία αποθήκευσης αιμοπεταλίων, έχουν συμβάλει σε αυτό (Gutmann, 2020). Μια μη στοχευμένη μεταβολομική προσέγγιση πραγματοποιήθηκε για να εξετάσει την όποια επίδραση έχει η ψυχρή θερμοκρασία στους μεταβολίτες κατά την αποθήκευση των αιμοπεταλίων. Σε σύγκριση με τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια, τα ψυχρά αιμοπετάλια είχαν σημαντικά μειωμένο οξειδωτικό στρες. Τα ψυχρά αιμοπετάλια είχαν επίσης μειωμένη κατανάλωση γλουταθειόνης κατά την αποθήκευση (D'Alessandro, 2020). Κατά την εξέταση των τάσεων στις μεταβολές των μεταβολιτών με τη χρήση της ανάλυσης των κύριων συστατικών, το

μεταβολομικό προφίλ των ψυχρών αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν για 21 ημέρες συγκεντρώθηκε κοντά στα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου ημέρα 5 αιμοπετάλια (D'Alessandro, 2020). Θα έλεγε κανείς ότι λογικά η αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε χαμηλή θερμοκρασία θα πρέπει να επιβραδύνει τον μεταβολισμό τους, γεγονός που θα οδηγούσε σε λιγότερο ενεργοποιημένα μεταβολομικά μονοπάτια. Ωστόσο, τα μεταβολικά δεδομένα υποδηλώνουν διαφορετικά. Ορισμένες γλυκολυτικές οδοί στα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια, όπως η οδός της φωσφορικής πεντόζης και η οδός μεταβολισμού πουρίνης, είχαν αύξηση της δραστηριότητας μετά από παρατεταμένη αποθήκευση στο κρύο (D'Alessandro, 2020). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα από μία μη στοχευμένη μεταβολομική για να συμπληρώσουν τον *in vitro* χαρακτηρισμό των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα, οι μεταβολομικές οδοί που ανταποκρίνονται στο οξειδωτικό στρες, όπως η οδός της φωσφορικής πεντόζης, φάνηκε να συσχετίζονται θετικά με τη λειτουργία των αιμοπεταλίων που μετρήθηκε με περιστροφική θρομβοελαστομετρία και συσσωματομετρία μετάδοσης φωτός (Zhao H.W., 2021). Σημαντικό να αναφερθεί ότι η μηχανική ανάδευση των αιμοπεταλίων δεν οδήγησε σε σημαντική διαφορά στα *in vitro* χαρακτηριστικά αποθήκευσης ή στα μεταβολομικά προφίλ των ψυχροαποθηκευμένων αιμοπεταλίων (Zhao H.W., 2021) υποδηλώνοντας ότι μπορεί να μην απαιτείται ανάδευση σε ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια.

Εξετάστηκαν επίσης αλλαγές στα πρωτεώματα των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ψύξη. Οι διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης των αιμοπεταλίων οδήγησαν σε διαφορετικές εκφραζόμενες πρωτεΐνες σημαντικές για την αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων, τη μεταφορά κυστιδίων πήξης του αίματος, τον καταρράκτη ενεργοποίησης πρωτεΐνης και την απόκριση στο στρες (Wang, 2018). Είναι ενδιαφέρον ότι πολλές από τις διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες εντοπίστηκαν στα δεσμευμένα στη μεμβράνη κυστίδια των αιμοπεταλίων. Μερικά παραδείγματα αυτών των διαφορετικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών ήταν οι GP5, TBXAS1 και FERMT3, οι οποίες έχει παρατηρηθεί ότι παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων κατά την αποθήκευση (Nagy, 2017).

Έχει παρατηρηθεί ότι η θερμοκρασία αποθήκευσης έχει σημαντικό αντίκτυπο στο προφίλ έκφρασης του *microRNA* (miRNA) των αιμοπεταλίων, συμπληρωματικά σε μια μελέτη, διαπιστώθηκε ότι υπήρχαν πάνω από 100 διαφορετικά εκφραζόμενα miRNA μεταξύ φρέσκων αιμοπεταλίων, ψυχρών αιμοπεταλίων και αιμοπεταλίων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία δωματίου. Η

επιβεβαίωση ήρθε με τη χρήση ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR) με τα αποτελέσματα να δείχνουν ότι αρκετά miRNAs, όπως το miR-20a-5p, είχαν σημαντικά αυξημένη έκφραση στα ψυχρά αιμοπετάλια σε σύγκριση με τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου (Mukai, 2019). Η σημασία αυτών των συσχετίσεων miRNA με την ποιότητα των αιμοπεταλίων φυσικά εξακολουθεί να διερευνάται.

### **Κεφάλαιο 3: Μείωση της ψυχρής βλάβης αποθήκευσης αιμοπεταλίων, ένα έργο σε εξέλιξη**

Τα αποτελέσματα από την πρόσφατη μελέτη των μεθόδων «omics», έδειξαν ότι το οξειδωτικό στρες έπαιξε σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων, τόσο σε αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου όσο και σε ψυχρά αιμοπετάλια. Ως εκ τούτου, για να βελτιωθεί η ποιότητα αποθήκευσης των αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται σε ψυχρή κατάσταση, έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο συνθετικά όσο και φυσικά αντιοξειδωτικά ως συμπληρώματα.

Ως συμπλήρωμα για την ελαχιστοποίηση της μιτοχονδριακής αποσύνδεσης και των διαρροών πρωτονίων που προκαλούνται από την ψυχρή αποθήκευση έχει χρησιμοποιηθεί η N-ακετυλοκυστεΐνη (Hedge, 2020). Το συμπλήρωμα N-ακετυλοκυστεΐνης έδειξε επίσης ως αποτέλεσμα, μία ελαφρά μείωση των ενεργών ειδών οξυγόνου σε ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια. Τόσο τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια όσο και τα ψυχρά αιμοπετάλια με συμπλήρωμα N-ακετυλοκυστεΐνης είχαν καλύτερη δράση σε ένα αιμορραγικό πείραμα με θρομβοπενικά ποντίκια που τους έκαναν έγχυση ασπιρίνης, σε σχέση με τα ψυχρά αιμοπετάλια χωρίς προσθήκη N-ακετυλοκυστεΐνης (Hedge, 2020). Επιπλέον, η χρήση κάποιου άλλου πρόσθετου διαλύματος αιμοπεταλίων θα μπορούσε επίσης να επηρεάσει τα αποτελέσματα.

Σε μια άλλη μελέτη, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια ολικού αίματος συμπληρωμένο με N-ακετυλοκυστεΐνη και αποθηκευμένο στο κρύο φάνηκε να είχε μειωμένη ενεργοποίηση αιμοπεταλίων που μετρήθηκε με έκφραση P-σελεκτίνης σε σύγκριση με τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια (Handigund, 2016). Το συμπλήρωμα N-ακετυλοκυστεΐνης δεν οδήγησε σε διαφορές στην έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης των ψυχρών αιμοπεταλίων ή των αποθηκευμένων σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπεταλίων. Ωστόσο, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα αποθηκεύτηκαν σε σωληνάκια πολυπροπυλενίου, σφραγισμένα

με μεμβράνη παραφίνης, αφήνοντας χώρο για ανταλλαγή αερίων, που δεν είναι σύμφωνο με τους επίσημους κανόνες αποθήκευσης της τράπεζας αίματος. (Handigund, 2016).

Σε μια μελέτη παρακολούθησης, η επίδραση της N-ακετυλοκυστεΐνης στην ανάκτηση των αιμοπεταλίων μετά τη μετάγγιση σε ψυχρή αποθήκευση έχει δοκιμαστεί χρησιμοποιώντας το μοντέλο Prkdc<sup>scid</sup> ποντικού. (Handigund M. K., 2021). Παρατηρήθηκε μια μικρή βελτίωση στην ανάκτηση των αιμοπεταλίων 2 ώρες μετά τη μετάγγιση στα ψυχρά αιμοπετάλια με την ομάδα της N-ακετυλοκυστεΐνης. Ωστόσο, αυτό το βελτιωμένο αποτέλεσμα ανάκτησης μειώθηκε μετά από 24 ώρες μετά τη μετάγγιση. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σε αυτή τη μελέτη σε ποντίκια, τα αιμοπετάλια που φυλάσσονταν εν ψυχρώ χωρίς συμπλήρωμα N-ακετυλοκυστεΐνης δεν δοκιμάστηκαν λόγω του σχηματισμού συσσωματωμάτων στη σακούλα αποθήκευσης. Το γεγονός ότι δεν υπήρξε κάποιος έλεγχος σε αυτό η ερμηνεία των αποτελεσμάτων καθίσταται πιο δύσκολη, καθώς το αποτέλεσμα θα μπορούσε να οφείλεται είτε στις θερμοκρασίες αποθήκευσης είτε στην προσθήκη N-ακετυλοκυστεΐνης.

Επίσης, για τη μείωση του οξειδωτικού στρες στα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια έχουν χρησιμοποιηθεί ένα άλλο αντιοξειδωτικό, η ρεσβερατρόλη και μια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη στόχευσης, το κυτόχρωμα C (Ekaney, 2017). Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα από αυτά τα συμπληρώματα έδειξαν μειωμένα είδη αντιδραστικού οξυγόνου σε ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με ρεσβερατρόλη. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της συμπληρωματικής ψυχρής λειτουργίας των αιμοπεταλίων και της αποτελεσματικότητας της μετάγγισης.

Για τη μείωση της βλάβης στα ψυχρά αιμοπετάλια έχουν χρησιμοποιηθεί, εκτός των αντιοξειδωτικών, συνθετικά μόρια, οι λεγόμενοι Εξειδικευμένοι Μεσολαβητές Επίλυσης (SPMs), οι οποίοι αποτελούν βιοσυνθετικά μόρια που προέρχονται από απαραίτητα λιπαρά οξέα. Έχει βρεθεί ότι οι Εξειδικευμένοι Μεσολαβητές Επίλυσης (SPMs), που είναι ενδογενείς ρυθμιστές μόλυνσης και φλεγμονής, μειώνουν την οξεία φλεγμονή κατά την απόκριση του ξενιστή σε εισβάλλοντα παθογόνα (Basil, 2015). Ειδικοί Εξειδικευμένοι Μεσολαβητές Επίλυσης, όπως ο RvE1, έχει συμβάλει στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, μέσω του ρόλου του στην ρύθμιση της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP), (Fredman, 2010). Στα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια, η προσθήκη Εξειδικευμένων Μεσολαβητών

Επίλυσης μείωσε σημαντικά την έκφραση της γλυκοπρωτεΐνης 1b, σε σύγκριση με τα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια χωρίς Εξειδικευμένους Μεσολαβητές Επίλυσης (Reddoch-Gardenas, 2020). Ωστόσο, σε αυτή τη μελέτη, δεν υπήρχαν αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου με Εξειδικευμένους Μεσολαβητές ως μάρτυρα. Δεν έχει διευκρινιστεί απολύτως ποιες άλλες επιδράσεις μπορεί να έχουν οι Εξειδικευμένοι Μεσολαβητές στα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια κατά την αποθήκευσή τους.

Ομοίως, το οκτανοϊκό νάτριο χρησιμοποιήθηκε ως συμπλήρωμα σε ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια για τη βελτίωση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας και τη μείωση της απόπτωσης των αιμοπεταλίων κατά την αποθήκευσή τους σε συνθήκες ψύχους (Baghadadi, 2020). Αν και τα ψυχρά αιμοπετάλια με οκτανοϊκό νάτριο φαίνεται να τείνουν να έχουν καλύτερη μιτοχονδριακή δραστηριότητα σε σύγκριση με τα ψυχρά αιμοπετάλια χωρίς οκτανοϊκό νάτριο, τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά. Επιπλέον, αν και παρατηρήθηκε χαμηλότερη έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης στα ψυχρά αιμοπετάλια με οκτανοϊκό νάτριο την 5η ημέρα αποθήκευσης, περαιτέρω ανάλυση του επιπέδου κασπάσης-3 μεταξύ των ομάδων θεραπείας δεν ήταν σημαντική. Η ενδοκυττάρωση των αιμοπεταλίων με μοντέλα κυττάρων HepG2 δεν έδειξε επίσης διαφορά στα αιμοπετάλια που υποβλήθηκαν σε αγωγή με οκτανοϊκό νάτριο έναντι των μη επεξεργασμένων ψυχρών αιμοπεταλίων (Baghadadi, 2020). Τέλος, ο αναστολέας ιντεγκρίνης RGDS και ένας χηλικός παράγοντας ιόντων ασβεστίου EGTA προστέθηκαν για να βελτιωθεί η κάθαρση των αιμοπεταλίων πριν την αποθήκευσή τους σε ψύχος (Xiang, 2021). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αυτό το πείραμα διεξήχθη με αιμοπετάλια ποντικού και η περίοδος ψυχρής αποθήκευσης των αιμοπεταλίων ποντικού ήταν το μέγιστο για 24 ώρες. Ενώ ο χηλικός παράγοντας ασβεστίου EGTA έδειξε κάποια βελτίωση στην εν ψυχρώ αποθηκευμένη κάθαρση των αιμοπεταλίων ποντικού, το αποτέλεσμα εξαφανίστηκε όταν το EGTA χρησιμοποιήθηκε σε ανθρώπινα αιμοπετάλια. Επιπλέον, η συμπλήρωση EGTA σε ανθρώπινο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια απέτρεψε τη μείωση του αριθμού αιμοπεταλίων που παρατηρείται συνήθως στα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια κατά την αποθήκευση καθώς και το σχηματισμό συσσωματωμάτων. Ωστόσο, τα ψυχρά αιμοπετάλια που αποθηκεύονται με διάλυμα πρόσθετου των αιμοπεταλίων θα μπορούσαν επίσης να επιτύχουν παρόμοια αποτελέσματα, επομένως η ακριβής λειτουργία του EGTA στα ψυχρά αιμοπετάλια δεν είναι τόσο απλή όσο φαίνεται.

### **3.1 Ιστορικό θερμοκρασίας αποθήκευσης αιμοπεταλίων**

Σε πρώιμη μετάγγιση αιμοπεταλίων στις ΗΠΑ, χρησιμοποιούσαν φρέσκα απομονωμένα αιμοπετάλια, λιγότερο από 24ώρες. Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες για να καθοριστεί εάν τα αιμοπετάλια μπορούσαν να αποθηκευτούν για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους και εάν η αποθήκευση σε ψυχρή αποθήκευση ή η αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου διατηρούσαν καλύτερα τη λειτουργικότητα και δράση των αιμοπεταλίων. Μελέτες στα τέλη της δεκαετίας του 1960 και στις αρχές της δεκαετίας του 1970, ανέφεραν ότι η παρατεταμένη αποθήκευση των αιμοπεταλίων στο ψύχος είχε ως αποτέλεσμα παραγωγή προϊόντων αιμοπεταλίων με μειωμένο χρόνους κυκλοφορίας και μειωμένη βιωσιμότητα, σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια που ήταν αποθηκευμένα σε θερμοκρασία, *in vivo*. (Shea, 2019). Μία από αυτές τις μελέτες ήταν μια τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή, που έδειξε ότι τα ψυχρά αιμοπετάλια είχαν ως αποτέλεσμα, βελτιωμένη απόκριση συσσώρευσης και μειωμένους χρόνους αιμορραγίας τόσο σε ασθενείς με θρομβοπενία όσο και σε αυτούς που λάμβαναν ασπιρίνη.

Εκείνη την εποχή, η διατήρηση αρχείων για τη χρήση των ψυχρών ή σε θερμοκρασία δωματίων αιμοπεταλίων σε ασθενείς με αιμορραγία δεν έγινε εφικτή υλικοτεχνικά. Ως εκ τούτου, τα τελευταία 40-50 χρόνια, η αποθήκευση αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία δωματίου επιλέχθηκε ως η κυρίαρχη χρήση αιμοπεταλίων για ασθενείς με θρομβοπενία, λόγω του πλεονεκτήματος σε μεγαλύτερο χρόνο κυκλοφορίας στον οργανισμό, μειώνοντας την αυξημένη έκθεση του ασθενή σε παραπανίσιες μεταγγίσεις αιμοπεταλίων. Λιγότερες μεταγγίσεις μειώνουν τον κίνδυνο μόλυνσης, αντιδράσεων μετάγγισης και αλλοανοσοποίησης.

### **3.2 Βλάβες αποθήκευσης αιμοπεταλίων**

Κατά την αποθήκευση, τα αιμοπετάλια υφίστανται μια σειρά βιοχημικών και μορφολογικών και λειτουργικών αλλαγών που οδηγούν σε βλάβες αποθήκευσης των αιμοπεταλίων, το οποίο μειώνει την αιμοστατική λειτουργία και την *in vivo* επιβίωση αυτών. Εν συντομία, τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα είναι μεταβολικές αλλαγές που έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία, απελευθέρωση διαλυτών μεσολαβητών (όπως το sCD40L), απελευθέρωση μικροσωματιδίων και αυξημένη έκφραση των υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια (όπως P-selectin/CD62P).

Πρόσφατες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει τεχνολογίες «omics» για να περιγράψουν τις ενδογενείς μεταβολικές και πρωτεομικές αλλαγές των αιμοπεταλίων

που συμβαίνουν κατά την αποθήκευση, υποδεικνύοντας την ενδοκυττάρωση, την κυτταροσκελετική αναδιάταξη και τη μεσολαβούμενη φαγοκυττάρωση από τον υποδοχέα Fc των λευκοκυττάρων, ως σημαντικά αλλοιωμένα μονοπάτια κατά την αποθήκευση (Wang, 2018). Αυτές οι ειδικές διεργασίες είναι σημαντικές για τις αλληλεπιδράσεις των αιμοπεταλίων με άλλα κύτταρα στον αγγειακό χώρο, καθώς και για την κινητικότητα των αιμοπεταλίων, υπογραμμίζοντας έτσι πιθανούς μηχανισμούς μέσω των οποίων τα αποθηκευμένα αιμοπετάλια μπορεί να είναι ευαίσθητα και να αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον τους. (Shea, 2019).

Τις τελευταίες δεκαετίες δεν έχουν πραγματοποιηθεί ιδιαίτερες αλλαγές στους ασκούς συλλογής και αποθήκευσης των αιμοπεταλίων ώστε να μετριαστούν οι βλάβες αποθήκευσης. Τα αιμοπετάλια έχουν υψηλή μεταβολική δραστηριότητα όταν αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου, και ως εκ τούτου παράγουν μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος και διοξειδίου του άνθρακα κατά την κατανάλωση οξυγόνου, γεγονός που οδηγεί σε πτώση του pH στον σάκο αποθήκευσης, και αυξάνοντας τις βλάβες κατά την αποθήκευση. (Prowse, 2014). Οι σάκοι αιμοπεταλίων κατασκευάζονται πλέον, με διαφορετικούς πλαστικοποιητές από άλλα προϊόντα αίματος (π.χ. RBC) για να διευκολυνθεί η ανταλλαγή αερίων και να διατηρηθεί ένα πιο επιθυμητό pH. Εκτός από αυτό, το ίδιο το δοχείο αποθήκευσης δεν έχει βελτιωθεί.

Ανέκαθεν η αποθήκευση των αιμοπεταλίων γίνεται στο πλάσμα, και προκαλεί όμως το σχηματισμό μικροσυσσωμαμάτων λόγω της ενεργοποίησης της γλυκοπρωτεΐνης (GP) IIb/IIIa και της επακόλουθης δέσμευσης με το ινωδογόνο. Για να ελαχιστοποιήσουμε αυτό το φαινόμενο και για την παράταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων αιμοπεταλίων, έχει διερευνηθεί η αποθήκευση αυτών σε ασκούς με πρόσθετα διαλύματα. Τα εμπλουτισμένα με διάλυμα προϊόντα αιμοπεταλίων, επιτρέπουν επίσης τη συλλογή περισσότερου πλάσματος από το δότη και μειώνει τις ανοσολογικές αντιδράσεις που βασίζονται σε αντισώματα λόγω είτε ασυμβίβαστου τύπου πλάσματος, είτε λόγω οξείας πνευμονικής βλάβης που σχετίζεται με τη μετάγγιση, αντίδραση του δέκτη στα κύτταρα HLA του δότη. (Getz T.M., 2016).

Το πειραματικό στάδιο μέχρι σήμερα έχει δείξει ότι η αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε πρόσθετα διαλύματα, πράγματι μειώνει την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των τους και διατηρεί βελτιωμένες αποκρίσεις συσσωμάτωσης σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες σε ζώα. Επιπλέον, *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι τα αποθηκευμένα σε πρόσθετα διαλύματα αιμοπετάλια, πληρούν τα πρότυπα του



Οργανισμού Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) για ανάκτηση και επιβίωση έως και επτά ημέρες αποθήκευσης και έχουν εγκριθεί από καιρό και χρησιμοποιούνται για μετάγγιση στην Ευρώπη. (Reddoch-Cardenas, 2018). (Getz T.M., 2016).

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το κιτρικό, το οποίο προστίθεται συχνά στα προϊόντα, προάγει τον σχηματισμό βλαβών αποθήκευσης, μέσω αυξημένης έκφρασης P-σελεκτίνης, έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης καθώς και αυξημένης παραγωγής αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), ενώ η απομάκρυνση του κιτρικού από τα προϊόντα μείωσε αυτές τις επιδράσεις. (Getz M. T., 2019). Όπως και με άλλες μεθόδους παραγωγής αιμοπεταλίων, οι διαφορές στις βιολογικές επιδράσεις που προκαλούνται από τα διαλύματα αποθήκευσης αιμοπεταλίων θα μπορούσαν ενδεχομένως να αξιοποιηθούν για να επιτραπεί η ανάπτυξη εξατομικευμένων πρωτοκόλλων μετάγγισης αιμοπεταλίων στο μέλλον.

Ένας επιπλέον μηχανισμός που οδηγεί σε ρύθμιση των βλαβών αποθήκευσης των αιμοπεταλίων είναι η αποθήκευση τους στο κρύο, επιβραδύνοντας έτσι τη μεταβολική δραστηριότητα. Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε συνθήκες ψύχους, έχει αποδειχθεί ότι διατηρεί τη βιοενεργητική τους δραστηριότητα, ελαχιστοποιώντας την απελευθέρωση διαλυτών μεσολαβητών και αυξάνοντας την έκφραση των δεικτών ενεργοποίησης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, όπως η P-selectin. (Connor, 1996).

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει αυξημένη αιμοστατική λειτουργία των ψυχρών αιμοπεταλίων, αποδεικνύοντας ότι η θερμοκρασία αποθήκευσης των αιμοπεταλίων μεταβάλλει την αιμοστατική αποτελεσματικότητα. Επιπλέον, η αποθήκευση προϊόντων αιμοπεταλίων, που είναι μειωμένα από παθογόνους παράγοντες στους 4°C, βελτίωσε τις ιξωδοελαστικές μετρήσεις της λειτουργίας των αιμοπεταλίων σε σύγκριση με την αποθήκευση στους 22°C (Becker G.A., 1973).

Αν και υποστηρίζουν την αποθήκευση αιμοπεταλίων σε ψυχρή κατάσταση, τα δεδομένα είναι περιορισμένα σχετικά με την αιμοστατική αποτελεσματικότητα των ψυχρών αιμοπεταλίων υπό φυσιολογικά σχετικές συνθήκες ροής, και επίσης λίγα δεδομένα είναι διαθέσιμα που να δείχνουν βελτιωμένη αιμοστατική λειτουργία *in vivo* σε ασθενείς με αιμοπετάλια αποθηκευμένα για περισσότερες από 48-72 ώρες (Aster, 1976).

#### **Κεφάλαιο 4: Μικροβιακή μόλυνση**

Για να επιτευχθεί η μείωση του κινδύνου μικροβιακής μόλυνσης των προϊόντων

αιμοπεταλίων έχουν ληφθεί απαραίτητα προληπτικά διαγνωστικά μέτρα καθώς και αύξηση της ευαισθησίας των εργαστηριακών δοκιμών που χρησιμοποιούνται. Παρόλα αυτά, οι συνθήκες αποθήκευσης των παραγών αιμοπεταλίων που έχουν υιοθετηθεί (διαπερατοί από οξυγόνο σάκοι, αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου και συνεχής ανάδευση), ασκούν θετική επίδραση στην ανάπτυξη βακτηρίων. Επίσης η μετάγγιση αιμοπεταλίων χορηγείται κυρίως σε αιματολογικούς ασθενείς, οπότε ο κίνδυνος βακτηριακής μόλυνσης απαιτεί ακόμη πιο ακριβή διαγνωστικά μέτρα για να εξαλειφθεί.

Σε μία μελέτη που διεξήχθη (Schrezenmeier, 2007), πραγματοποιήθηκε ένας έλεγχος ρουτίνας βακτηριακής καλλιέργειας και έδειξε ότι η συνολική συχνότητα βακτηριακής ανάπτυξης σε συμπυκνώματα αιμοπεταλίων ήταν μεταξύ 0,06 και 0,09%, επίσης ο κίνδυνος μετάδοσης ιού είναι σημαντικά χαμηλότερος (Hourfar, 2008). Σε έναν ασθενή όσο περισσότερα συμπυκνώματα αιμοπεταλίων λάβει τόσο περισσότερο αυξάνεται και ο κίνδυνος μόλυνσης, ο οποίος επηρεάζεται και από την εκάστοτε νοσηρότητα του ασθενή. Στην καθημερινή κλινική πρακτική, υπάρχουν αρκετά μέτρα που μπορούν να μειώσουν τον αριθμό αλλά και την σοβαρότητα των βακτηριακών μολύνσεων και κατά συνέπεια των ανεπιθύμητων ενεργειών όπως και της σήψης.

Το πρώτο μέτρο αποτελεί η σωστή επιλογή δότη, καθώς τους δίνονται συγκεκριμένα ερωτηματολόγια πριν από κάθε εθελοντική ή μη αιμοδοσία για τη γενική κατάσταση της υγείας τους και εάν είχαν εκδηλώσει συμπτώματα που θα μπορούσαν να υποδηλώνουν παρουσία βακτηριακής λοίμωξης την περίοδο πριν από τη δωρεά. Ωστόσο, τα ερωτηματολόγια δεν θα έπρεπε να αποτελούν μοναδικό κριτήριο καθώς βασίζονται στην ικανότητα των δωρητών να αναγνωρίζουν συμπτώματα που πιθανώς να σχετίζονται με μια λοίμωξη και, σίγουρα δεν είναι σε θέση να αναγνωρίσουν την όποια ασυμπτωματική βακτηριαιμία. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί εργαστηριακή ανάλυση του αίματος του δότη (π.χ. δείκτες φλεγμονής, αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων), καθώς και εργαστηριακές εξετάσεις που στοχεύουν στον εντοπισμό ενδεχόμενης βακτηριακής μόλυνσης. Συνήθως, οι τυπικές μέθοδοι βακτηριακού ελέγχου περιλαμβάνουν καλλιέργεια και μέθοδοι ταχείας ανίχνευσης. Η τυπική μέθοδος καλλιέργειας αποτελεί τον εμβολιασμό των μέσων καλλιέργειας με 4–10 mL συμπυκνώματος αιμοπεταλίων εντός 24 ωρών από την απόσυρση. Ακολουθεί επώαση των υλικών και μια φάση ανάπτυξης και σε περίπτωση αρνητικών αποτελεσμάτων, το προϊόν αιμοπεταλίων

μπορεί να εγκριθεί για μετάγγιση και τελικά να ανακληθεί εάν εντοπιστεί ανάπτυξη βακτηρίων αργότερα μετά από αυτήν την περίοδο. Το BacT/ALERT από τη BioMérieux είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα διαλογής που χρησιμοποιείται για συμπυκνώματα αιμοπεταλίων (Hattori, 2020). Να αναφερθεί όμως, ότι αυτές οι μέθοδοι επικεντρώνονται σε αερόβια βακτηριακά είδη και τα αναερόβια και προαιρετικά στελέχη ενδέχεται να παραμείνουν μη ανιχνεύσιμα.

Επίσης, τα αργά αναπτυσσόμενα είδη, σε συνδυασμό με τη χαμηλή ευαισθησία της βακτηριακής καλλιέργειας, θέτουν σε κίνδυνο την αξιοπιστία ως προς την αναγνώριση βακτηριακών μολύνσεων. Οι μέθοδοι ταχείας ανίχνευσης έχουν ως αρχή μεθόδου την ανίχνευση βακτηριακού γονιδιώματος στο αίμα του δότη. Με την εμφάνιση της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR), είναι δυνατό να εντοπιστεί γρήγορα και αξιόπιστα η παρουσία βακτηριακού DNA σε λίγες ώρες. Παρόλο που η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική, υπάρχει κίνδυνος να έχουμε ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω της χρήσης πολυμερασών που εξάγονται από βακτήρια, ελεύθερου βακτηριακού DNA/RNA ή πιθανής μόλυνσης του γονιδιωματικού DNA από τον δότη. Επομένως, είναι υποχρεωτική η συνεχής επαλήθευση οποιασδήποτε μόλυνσης των μεμονωμένων συστατικών της αντίδρασης (εκκινητές, πολυμεράση, νερό και ρυθμιστικό διάλυμα). Σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου αποτελεί η δυνατότητα ενίσχυσης του γενετικού υλικού πολλών βακτηριακών στελεχών ταυτόχρονα.

Τα βακτηριακά γονίδια που θέλουμε να ανιχνεύσουμε με PCR θα πρέπει ενδεχομένως να έχουν όσο το δυνατόν χαμηλό ποσοστό μετάλλαξης, για να καταφέρουμε να εξαλείψουμε με την πάροδο του χρόνου τον κίνδυνο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Οι γονιδιωματικές περιοχές που υπάρχουν στις βακτηριακές ριβοσωμικές υπομονάδες 16S και 23S είναι μια τυπική επιλογή που πληρούν αυτήν την απαίτηση. Η β-υπομονάδα πολυμεράσης RNA είναι επίσης κατάλληλος στόχος για το σκοπό αυτό. Το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης βακτηριακής μόλυνσης βρίσκεται στο τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος. Στην πρόληψη και μείωση του κινδύνου δυσάρεστου έως θανατηφόρου αντίδρασης από μετάγγιση μολυσμένων προϊόντων, το 2008 η Μόνιμη Ομάδα Εργασίας για το αίμα του Ομοσπονδιακού Υπουργείου Υγείας (Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit) αποφάσισε να περιορίσει την περίοδο αποθήκευσης των συμπυκνωμάτων αιμοπεταλίων σε τέσσερις ημέρες, υπολογίζοντας από τα μεσάνυχτα της ημέρας συλλογής. Να σημειωθεί ότι, εάν εφαρμοστεί μια επικυρωμένη και

διαπιστευμένη διαδικασία με σκοπό την ανίχνευση μικροβιακής μόλυνσης, η μέγιστη διάρκεια αποθήκευσης μπορεί να παραταθεί σε  $5 \times 24$  ώρες (Vit, 2020).

#### **4.1 Βιολογία του PRP πλάσματος**

Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP) είναι ένα αυτόλογο συμπυκνωμένο παράγωγο ολικού αίματος με αυξημένη συγκέντρωση αυξητικών παραγόντων και φλεγμονωδών μεσολαβητών και έχει θεωρηθεί ότι είναι δυνητικά αποτελεσματικό για την επιδιόρθωση πολλών τραυματισμών και όχι μόνο καθώς οι θεραπευτικές του εφαρμογές όλο και αυξάνονται. Ας αξιολογήσουμε την θεραπευτική χρήση του PRP στην επιδιόρθωση του χόνδρου, στο PRP πλάσμα το ινωδογόνο μπορεί να ενεργοποιηθεί με σκοπό να σχηματίσει μια μήτρα ινώδους για να γεμίσει τις βλάβες του χόνδρου, ικανοποιώντας τις αρχικές απαιτήσεις μιας φυσιολογικής διαδικασίας επούλωσης πληγών. Σε αυτή την ανασκόπηση θα δούμε για τα αναβολικά, αντιφλεγμονώδη και δημιουργίας ικριώματος αποτελέσματα χρήσης του PRP που βασίζονται σε διάφορες εργαστηριακές έρευνες, μελέτες σε ζώα και κλινικές δοκιμές. In vitro, το PRP βρέθηκε ότι διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την παραγωγή χόνδρινου πλέγματος από χονδροκύτταρα και ώριμα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs), ενισχύει την έκκριση μήτρας από αρθρικά κύτταρα, μετριάξει τη φλεγμονή που προκαλείται από την IL-1 $\beta$  και παρέχει ένα ευνοϊκό υπόστρωμα για τα MSCs κύτταρα. Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες προκλινικές μελέτες για τη χρήση του PRP, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί είτε ως γέλη για την διόρθωση ελαττωμάτων του χόνδρου με ποικίλα αποτελέσματα, είτε για την επιβράδυνση της εξέλιξης της αρθρίτιδας σε ζωικά μοντέλα με θετικά αποτελέσματα. (Xie, 2014). Συμπερασματικά, βάσει των ευρημάτων των κλινικών δοκιμών, το PRP φαίνεται να έχει τη δυνατότητα να καλύψει ελαττώματα χόνδρου και να συμβάλλει στην ενίσχυση της αποκατάστασης του χόνδρου, να μετριάσει τα συμπτώματα της οστεοαρθρίτιδας και να βελτιώσει τη λειτουργία των αρθρώσεων, και όλα αυτά μέσα σε ένα αποδεκτό προφίλ ασφάλειας. Στη θεραπεία οστεοαρθρίτιδας, τα στοιχεία θεραπευτικής χρήσης του PRP φαίνεται να είναι πιο ευνοϊκά και αποτελεσματικά έναντι του υαλουρονικού οξέος, παρόλα αυτά η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με PRP παραμένει απρόβλεπτη λόγω της εξαιρετικά ετερογενούς φύσης των αναφερόμενων μελετών και της ποικιλίας σύνθεσης των σκευασμάτων PRP. Είναι σημαντικό να διεκπαιρωθούν μελλοντικές μελέτες με στόχο την αποσαφήνιση της λειτουργικής δραστηριότητας μεμονωμένων

συστατικών PRP στη ρύθμιση συγκεκριμένων παθογόνων μηχανισμών.

Τα αιμοπετάλια παράγονται από τα μεγακαρυοκύτταρα ως αποπυρηνωμένα κύτταρα (Italiano, 2003) στα οποία είναι αποθηκευμένα μια ποικιλία αυξητικών παραγόντων, παράγοντες πήξης, μόρια προσκόλλησης, κυτοκίνες, χημειοκίνες και ιντεγκρίνες (Macaulay, 2005). Μετά την ενεργοποίηση, τα αιμοπετάλια στο PRP μπορούν να απελευθερώσουν ένα πλήθος αυξητικών παραγόντων σε συγκεντρώσεις σημαντικά υψηλότερες από τα αρχικά επίπεδα στο αίμα, συμπεριλαμβανομένων του τροποποιητικού αυξητικού παράγοντα β (TGF-β), του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGF), του αυξητικού παράγοντα ινσουλίνης (IGF), του βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (b-FGF), αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και πολλοί άλλοι (Nurden, 2008). Πολλές από αυτές τις αναβολικές κυτοκίνες, όπως ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας β, ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης, ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας και ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας, είναι χονδροπροαγωγικές και χονδροπροστατευτικές. Συγκεκριμένα, μπορούν να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων και των πολυδύναμων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (MSC), να προάγουν τη σύνθεση χονδροκυττάρων της αγγρεκάνης και κολλαγόνου τύπου II (Col II), να προάγουν τη χονδρογονική διαφοροποίηση των MSC, να αποτρέψουν την απόπτωση των χονδροκυττάρων και των MSC και να μειώσουν τις φλεγμονώδεις επιδράσεις των καταβολικών κυτοκινών, όπως η IL-1β, και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (MMPs) (Cosenza S., 2017).

Τα αιμοπετάλια στο PRP είναι επίσης πηγή φλεγμονωδών μεσολαβητών και ρυθμιστών. Μετά την επώαση με σφαιρίδια πολυακρυλαμιδίου, τα αιμοπετάλια μπορεί να απελευθερώσουν πολυάριθμες αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένων ανταγωνιστών υποδοχέα IL-1 (IL-1ra), υποδοχέα διαλυτού παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF) (sTNF-R) I και II, IL-4, IL-10, IL-13, και ιντερφερόνη γ (Woodell-May, 2011). Συγκεκριμένα, η IL-1ra αναστέλλει τη βιοδραστικότητα της IL-1 αναστέλλοντας τους υποδοχείς της. Οι υποδοχείς του TNF sTNF-RI και sTNF-RII μπορούν να συνδεθούν με ελεύθερο TNFα, μπλοκάροντας με αυτό το τρόπο τη μεταγωγή σήματος. Επίσης, οι ιντερλευκίνες IL-4, IL-10 και IL-13 μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή του IL-1ra και να μειώσουν τη παραγωγή προσταγλανδίνης E2 από τον TNFα. Η ιντερφερόνη γ προκαλεί την παραγωγή πρωτεΐνης δέσμευσης του IL-18, ενός φυσικού αναστολέα της IL-18 (Moller, 2003). Το PRP απελευθερώνει επίσης, προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως IL-1α, IL-1β,

TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-17 και IL-18, οι συγκεντρώσεις τους όμως είναι πολύ χαμηλότερες από εκείνες των αντιφλεγμονωδών αντίστοιχα. Παραδείγματος χάριν, σε ένα τυπικό σκεύασμα PRP η συγκέντρωση της IL-1 $\alpha$  είναι πάνω από 23.000 φορές υψηλότερη από αυτή της IL-1 $\alpha$  και πάνω από 8.000 φορές από αυτή της IL-1 $\beta$ . Η σημαντική αυτή διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων των αντιφλεγμονωδών κυτοκινών και εκείνων των προφλεγμονωδών παραγόντων στο PRP υποδηλώνει ότι το PRP μπορεί να καταστέλλει τη φλεγμονή στην οστεοαρθρίτιδα, προστατεύοντας έτσι τον χόνδρο και μειώνοντας τον πόνο.

Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια είναι γνωστό ότι είναι εμπλουτισμένο με μια ποικιλία από πρωτεΐνες πλάσματος, οι οποίες αποτελούν σημαντικά στοιχεία στον μηχανισμό επούλωσης των συνδετικών ιστών. Το πλάσμα είναι πλούσιο σε ινωδογόνο και άλλους παράγοντες πήξης, οι οποίοι μπορούν να ενεργοποιηθούν για να σχηματίσουν ένα προσωρινό ικρίωμα ινώδους που δρα συνεργικά για να προσκολληθούν, να μεταναστεύσουν και να πολλαπλασιαστούν τα κύτταρα (Xie X. W., 2012). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της πήξης, τα αιμοπετάλια συσσωματώνονται κατά μήκος των ινών φιβρίνης, και έτσι το προκύπτον τρισδιάστατο ικρίωμα μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως δεξαμενή αυξητικών παραγόντων που ασκούν ευνοϊκές επιδράσεις στα κύτταρα. Τα κλινικά οφέλη της μήτρας ινώδους PRP είναι γνωστά και χρησιμοποιούνται ευρέως στην γναθοπροσωπική χειρουργική καθώς και στην αποκατάσταση χρόνιων τραυμάτων. Με τη χρήση του PRP και την δημιουργία μήτρας ινώδους, ο αρθρικός χόνδρος που δεν περιέχει αιμοφόρα αγγεία από μόνος του, είναι σε θέση να ξεκινήσει την διαδικασία επούλωσης με άλλους ιστούς με καλό αναγεννητικό δυναμικό, καθώς η εισαγωγή του ικρίωματος PRP μπορεί και μιμείται το αρχικό στάδιο της επούλωσης του τραύματος και της επιδιόρθωσης των ιστών.

Έχει αναφερθεί ότι το PRP ή άλλα παράγωγά του, σύμφωνα με όλα τα πιθανά οφέλη των βιολογικών παραγόντων του, μπορεί να έχουν θετικά αποτελέσματα στην αποκατάσταση του χόνδρου και τραυματισμών. Υπάρχουν εκτενείς ανασκοπήσεις για τους αυξητικούς παράγοντες του PRP και τις επιδράσεις τους στη βιβλιογραφία, οπότε αυτή η ανασκόπηση θα επικεντρωθεί κυρίως στις συλλογικές επιδράσεις του PRP στα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των χονδροκυττάρων, των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων που προέρχονται από διάφορους ιστούς, και των αρθρικών κυττάρων, καθώς και στον τραυματισμό του χόνδρου σε εργαστηριακά ζωικά μοντέλα, και ασθένειες του ανθρώπινου χόνδρου.

Προκειμένου να παρέχεται μια ακριβής επισκόπηση, το σύστημα ταξινόμησης υιοθετείται εδώ, κατηγοριοποιεί το γενικό PRP σε καθαρό πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (P-PRP), πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια με λευκοκύτταρα (L-PRP), πλάσμα ινώδους πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRF) και πλάσμα ινώδους πλούσιο σε αιμοπετάλια με λευκοκύτταρα (L-PRF).

## **Κεφάλαιο 5: Επίδραση των συνθηκών αποθήκευσης στην απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων σε παράγωγα αίματος πλούσια σε αιμοπετάλια**

Η εφαρμογή της χρήσης των αιμοπεταλίων ως αυτόλογο μόσχευμα, βασίζεται στη δημιουργία παραγώγων αίματος με αυξημένη συγκέντρωση θρομβοκυττάρων που προορίζονται για θεραπευτικές εφαρμογές όπως π.χ. για τη θεραπεία τραύματος που επιτυγχάνεται μέσω της απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων, όπως ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF). Η απελευθέρωση του PDGF από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων επηρεάζεται άμεσα από τις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης των πλούσιων σε αιμοπετάλια παραγώγων αίματος. Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) και το συμπύκνωμα αιμοπεταλίων (PC), βάσει βιβλιογραφίας παρήχθησαν με ένα πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα φυγοκέντρωσης, έπειτα τα προϊόντα PRP και PC αποθηκεύτηκαν για 1 ώρα έως 4 μήνες σε θερμοκρασίες μεταξύ  $-20^{\circ}\text{C}$  και  $+37^{\circ}\text{C}$  με στόχο την αξιολόγηση της επίδρασης στην ποσότητα του απελευθερωμένου PDGF παράγοντα. Παρατηρήθηκε ότι στην ψυχρή αποθήκευση στους  $-20^{\circ}\text{C}$  υπήρξε η υψηλότερη απελευθέρωση του PDGF στο PRP και προσδιορίστηκε η χρονική εξάρτηση: η παρατεταμένη αποθήκευση έως 1 μήνα σε PRP και 10 ημέρες σε PC αύξησε την απελευθέρωση PDGF, να συμπληρωθεί ότι ανεξάρτητα από τις συνθήκες αποθήκευσης, η απελευθέρωση PDGF ανά αιμοπετάλιο ήταν υψηλότερη στο PC από ότι στο PRP.

### **5.1 Επεξεργασία πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) και συμπυκνώματος αιμοπεταλίων (PC)**

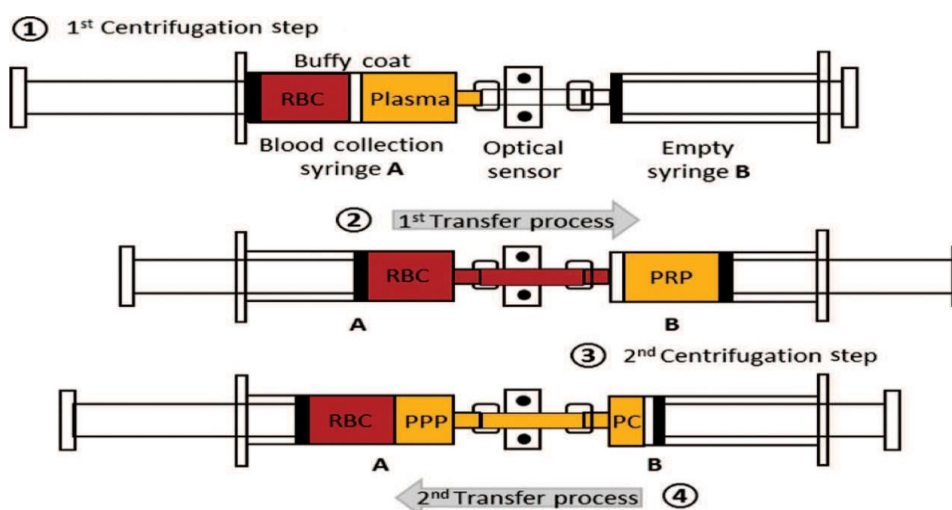
Σύμφωνα με την έρευνα των Duregger, Peng και Eblenkamp (Duregger, 2016), ελήφθη φλεβικό αίμα από υγιείς δότες με σύριγγες των 12 ml προγεμισμένες με 1 ml κιτρικού (4% κιτρικό νάτριο, Duomedica GmbH). Οι γεμισμένες σύριγγες (11 ml αίματος, 1 ml κιτρικό) που λήφθηκαν από τους δότες, συνδέθηκαν με άδειες σύριγγες ίσου μεγέθους με έναν εύκαμπτο σωλήνα. Στη συνέχεια, το συνδεδεμένο ζεύγος

σύριγγας υποβλήθηκε σε μια εργαστηριακή φυγόκεντρη (Rotanta 460, Hettich) πλήρως αυτοματοποιημένη για την παρασκευή παραγώγων αίματος. Το σύστημα μπορεί και διαχωρίζει τα κλάσματα ολικού αίματος, με τον κινητήρα και τον αισθητήρα που διαθέτει, κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης.

Αφού ολοκληρωθεί πρώτο βήμα φυγοκέντρωσης, στα 930 g για 5 λεπτά, το πλάσμα και η λεπτή στρώση των λευκοκυττάρων μεταφέρονται στη συνδεδεμένη σύριγγα B, και μόλις ο αισθητήρας ανιχνεύσει τα ερυθρά αιμοσφαίρια σταματάει αυτόματα τη διαδικασία μεταφοράς. Αυτό οδηγεί σε εξαρτώμενο από τον δότη όγκο, συνήθως 5–6 ml PRP στη σύριγγα B.

Στη συνέχεια εκτελείται ένα δεύτερο βήμα φυγοκέντρωσης, στα 475 g για 27 λεπτά, και αποχωρίζεται το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP) και το συμπύκνωμα αιμοπεταλίων (PC) μέσα στη σύριγγα B. Το κλάσμα του φτωχού σε αιμοπετάλια πλάσματος PPP της σύριγγας B, μεταφέρεται πίσω στη σύριγγα A, αφήνοντας 1 ml συμπύκνωμα αιμοπεταλίων PC στη σύριγγα B. Σε όλες τις διαδικασίες μεταφοράς διατηρείται μια δύναμη φυγοκέντρωσης 20 g.

Η τελική συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στα παράγωγα προσδιορίστηκε με σύγκριση του αριθμού των αιμοπεταλίων στο ολικό πλήρες αίμα που λήφθηκε από το δότη πριν από την παρασκευή και στα παράγωγα αίματος μετά την επεξεργασία, χρησιμοποιώντας έναν αιματολογικό αναλυτή (KX 21N, Sysmex Europe GmbH).



Εικόνα 2: Δημιουργία του PRP και PC. Εικόνα 2: Δημιουργία του PRP και PC: (1) διαχωρισμός των κλασμάτων αίματος στη σύριγγα A μετά την 1<sup>η</sup> φυγοκέντρωση, που ακολουθείται από μία ελεγχόμενη από αισθητήρα διαδικασία μεταφοράς που οδηγεί σε PRP σε σύριγγα B (2). Το PC συλλέγεται στη σύριγγα B με ένα δεύτερο στάδιο φυγοκέντρωσης (3) και διαδικασία μεταφοράς. (Duregger, 2016)



## 5.2 Πειραματική ρύθμιση

Στην έρευνα των Düregger, Peng και Eblenkamp (2016) οι χρόνοι αποθήκευσης και οι θερμοκρασίες επιλέχθηκαν με βάση τις συστάσεις του Γερμανικού Ιατρικού Συλλόγου (2002). Οι χρόνοι αποθήκευσης των παραγώγων PRP ήταν μεταξύ 1 ώρας και 4 μηνών και για τα συμπυκνώματα αιμοπεταλίων PC μεταξύ 1 ώρας και 10 ημερών. Οι θερμοκρασίες αποθήκευσης στις οποίες έγιναν οι αξιολογήσεις ήταν +4°C, +22°C και +37°C για τα συμπυκνώματα αιμοπεταλίων PC και επιπλέον -20°C για τα PRP δείγματα.

Αφού ολοκληρώθηκαν όλες οι αποθηκεύσεις, με το πέρας της μελέτης, όλα τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και η ποσότητα του απελευθερωμένου PDGF προσδιορίστηκε με ELISA (Human PDGF DuoSet ELISA Kit – R&D Systems, Minneapolis, USA).

Τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν ως η απόλυτη ποσότητα απελευθερωμένου PDGF αυξητικού παράγοντα και η ποσότητα που απελευθερώνεται ανά 106 αιμοπετάλια λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των αιμοπεταλίων.

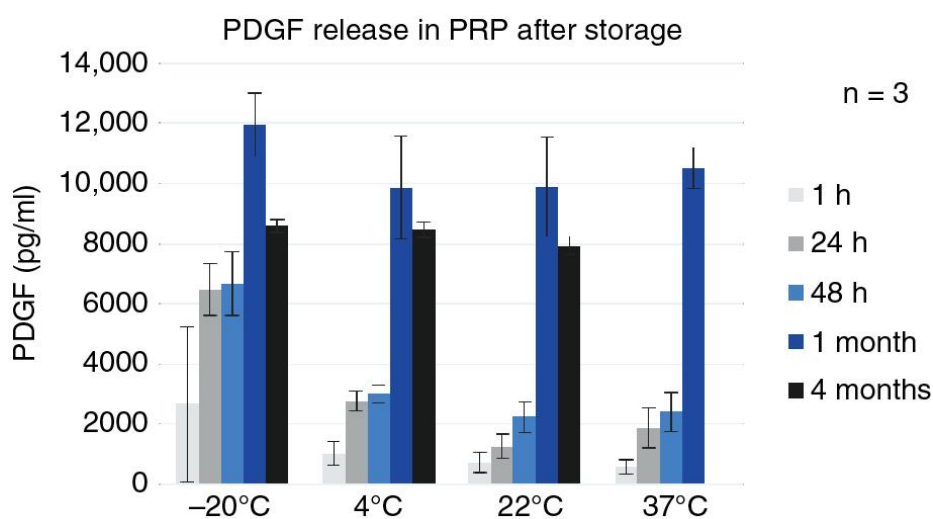
## 5.3 Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP)

Η μέση απόδοση αιμοπεταλίων σε PRP που ελήφθη από πρόσφατα ληφθέντα δείγματα φλεβικού αίματος ήταν  $97,2 \pm 7,8\%$ , με συγκέντρωση αιμοπεταλίων  $402 \pm 24 \times 10^3 \text{ plt}/\mu\text{l}$  ( $1,75 \pm 0,13$  φορές σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα δείγματα πλήρους αίματος:  $n = 15$ ).

Υπολογίστηκε η συγκέντρωση του αυξητικού παράγοντα PDGF σε PRP πλάσμα κατά μέσο όρο σε 3 δότες. Παρατηρήθηκε ότι η περιεκτικότητα σε PDGF αυξήθηκε με τους χρόνους αποθήκευσης μέσα στον 1ο μήνα και στη συνέχεια είχε πτωτική στους επόμενους 3 μήνες, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία αποθήκευσης. Για όλους τους χρόνους αποθήκευσης, οι υψηλότερες τιμές που επιτεύχθηκαν στη συγκέντρωσή του PDGF ήταν σε θερμοκρασία αποθήκευσης -20°C.

Επιπλέον, η απελευθέρωση του PDGF ανά 106 αιμοπετάλια υπολογίστηκε με βάση τον αριθμό των αιμοπεταλίων που μετρήθηκαν στα δείγματα πριν από την αποθήκευση. Και εδώ επίσης, παρατηρήθηκε μια αύξηση της απελευθέρωσης PDGF μέσα στον 1ο μήνα αποθήκευσης και μείωση μέσα στους επόμενους 3 μήνες, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία αποθήκευσης. Το υψηλότερο συνολικό ποσοστό επιτεύχθηκε μετά την αποθήκευση του PRP για 1 μήνα στους -20°C με 33 pg ανά 106

αιμοπετάλια.



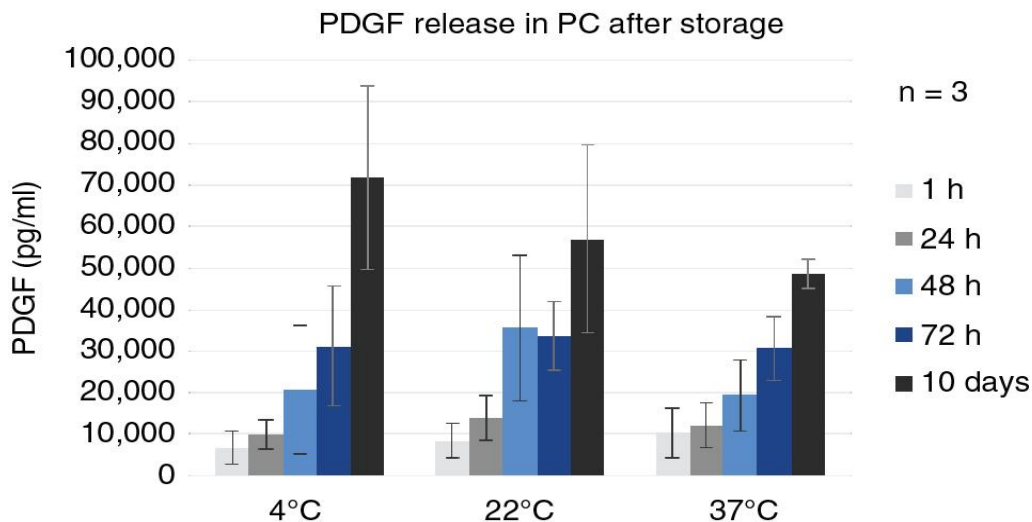
Εικόνα 3: Η απελευθέρωση του PDGF στο PRP μετά από αποθήκευση μεταξύ 1 ώρας και 4 μηνών στους -20°C, +4°C, +22°C και +37°C. Η συγκέντρωση του PDGF αυξάνεται με το χρόνο αποθήκευσης για όλες τις θερμοκρασίες και η υψηλότερη τιμή επιτυγχάνεται στους -20°C για όλους τους χρόνους αποθήκευσης. (Duregger, 2016)

#### 5.4 Συμπύκνωμα αιμοπεταλίων (PC)

Η μέση απόδοση αιμοπεταλίων σε PC που ελήφθη από πρόσφατα ληφθέντα δείγματα ολικού αίματος ήταν  $69,4 \pm 21,3\%$  με συγκέντρωση αιμοπεταλίων  $1528 \pm 477 \times 10^3$  plt/ml ( $6,64 \pm 2,13$  φορές σε σύγκριση με το δείγμα πλήρους αίματος;  $n = 18$ ).

Στη συνέχεια υπολογίστηκε η συγκέντρωση του παράγοντα PDGF σε συμπύκνωμα αιμοπεταλίων (PC) κατά μέσο όρο σε 3 δότες. Παρατηρήθηκε η συγκέντρωση σε PDGF να έχει αυξητική πορεία με το χρόνο αποθήκευσης εντός 10 ημερών από την αποθήκευση, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία αποθήκευσης. Η απελευθέρωση PDGF μέσα στις πρώτες 72 ώρες ήταν συγκρίσιμη για όλη την αποθήκευση. Επίσης, η υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε κατά την αποθήκευση σε απλή ψύξη στους +4°C μέσα στις επόμενες 7 ημέρες.

Η απελευθέρωση PDGF ανά 106 αιμοπετάλια υπολογίστηκε με βάση τον αριθμό των αιμοπεταλίων που μετρήθηκαν πριν από την αποθήκευση. Η υψηλότερη ποσότητα PDGF ανά 106 αιμοπετάλια επιτεύχθηκε στους +22°C ανεξάρτητα τον χρόνο αποθήκευσης, εντός των πρώτων 72 ωρών και στους +4°C τις επόμενες 7 ημέρες. Παρατηρήθηκε αύξηση της απελευθέρωσης του παράγοντα με παρατεταμένο χρόνο αποθήκευσης για κάθε θερμοκρασία. Το υψηλότερο ποσοστό παρατηρήθηκε σε δείγμα PC από έναν δότη που αποθηκεύτηκε για 10 ημέρες στους 4°C με υπολογισμένη τιμή 67,0 pg ανά 106 αιμοπετάλια.



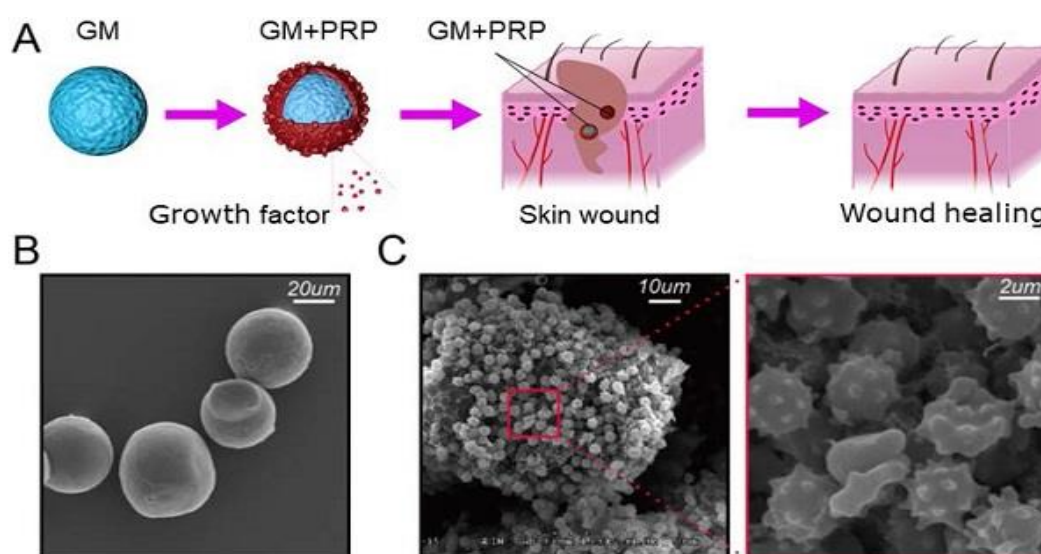
Εικόνα 4: Η απελευθέρωση του PDGF σε PC μετά από αποθήκευση 1 ώρας με 10 ημερών σε στους +4°C, +22°C και +37°C. Το PDGF αυξάνεται με το χρόνο αποθήκευσης για όλες τις θερμοκρασίες και η υψηλότερη τιμή επιτυγχάνεται στους +4°C μετά από 10 ημέρες. (Duregger, 2016).

## Κεφάλαιο 6: Αυξητικοί παράγοντες

Οι διάφοροι αυξητικοί παράγοντες που εμπεριέχονται σε ένα PRP πλάσμα, συμβάλουν στην αναγέννηση των ιστών, βοηθώντας τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τη σύνθεση εξωκυτταρικής μήτρας των κυττάρων. Ωστόσο, οι ποικίλες συγκεντρώσεις των αυξητικών παραγόντων έχουν διαφορετικές βιολογικές επιδράσεις, οπότε πριν την όποια θεραπευτική του χρήση θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν για να υπάρχει μία σχετικά αξιόπιστη ερμηνεία των βιολογικών λειτουργιών της τοπικής εφαρμογής του PRP πλάσματος.

Πολυάριθμοι αυξητικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (bFGF), του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGF) και του τροποποιητικού αυξητικού παράγοντα β (TGF-β), που απελευθερώνονται από το PRP, μπορούν να ανιχνευθούν κατά την πρώιμη φάση της επούλωσης του τραύματος (Gulotta, 2011). Δεν εκφράζονται όλοι οι αυξητικοί παράγοντες την ίδια χρονική στιγμή και ο καθένας παίζει το δικό του ρόλο στη μυοσκελετική αναγέννηση. Γενικά, οι αυξητικοί παράγοντες χορηγούνται τοπικά στην περιοχή που χρίζει αναγέννησης των οστών και των μαλακών μορίων με ικρίωματα κατασκευασμένα από ιστούς, καλυμμένα ράμματα ή διαλύονται σε μια ενθυλάκωση που μοιάζει με ινώδες. (Losi, 2013). Μία επιτυχημένη μέθοδος που θα αποσκοπεί σε μία βιολογική αύξηση της επιδιόρθωσης ιστού, θα αποτελεί έναν κατάλληλο συνδυασμό αυξητικών παραγόντων, ώστε να έχουμε τη βέλτιστη

ανταπόκριση από τα κύτταρα ξενιστές στη σηματοδότηση του αυξητικού παράγοντα καθώς και μια βέλτιστη μέθοδο χορήγησης του PRP (Gulotta, 2011).



Εικόνα 3 Σχηματική απεικόνιση. (Α) Σφαιρίδια ζελατίνης (GM) φορτωμένα με PRP. (Β) Απεικόνιση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (SEM) σε GM με λεία σφαιρική επιφάνεια. (Γ) Ακίνητοποιημένο PRP πάνω σε GMs. (Zhou, 2021).

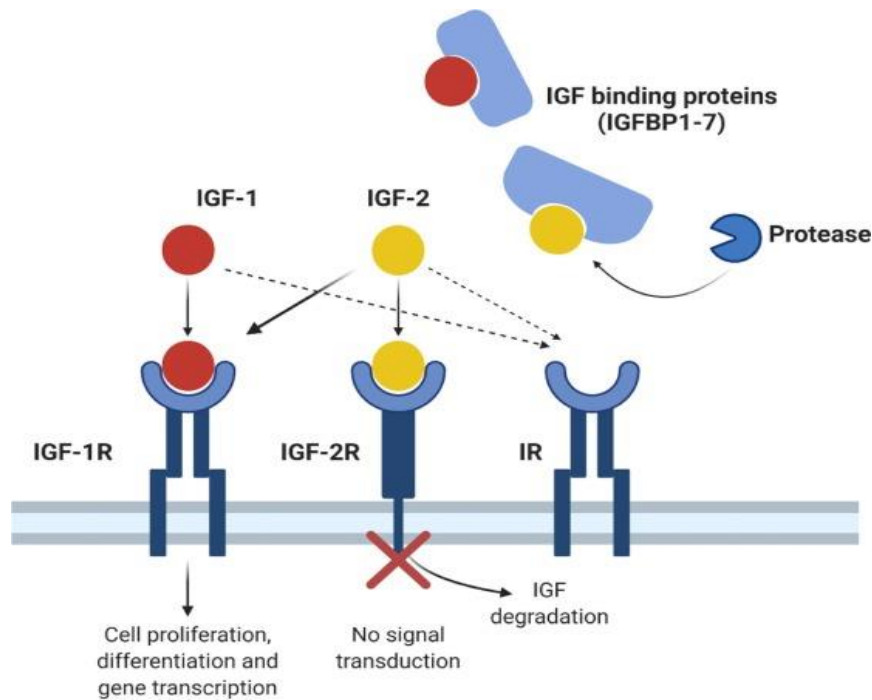
### 6.1 Βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF)

Ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από το PRP πλάσμα (bFGF) εμπλέκεται ενεργά στην οστεογένεση και την αγγειογένεση. Ο ανασυνδυασμένος bFGF έχει χρησιμοποιηθεί για την υποστήριξη της επέκτασης των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων μυελού των οστών (BMSC) και είναι σε θέση να προκαλέσει άφθονη εναπόθεση ασβεστίου (Cheng, 2014). Αρκετές προκλινικές μελέτες υποστηρίζουν ότι ο παράγοντας bFGF μπορεί να φανεί χρήσιμος για την προώθηση της επούλωσης των οστών (Kawagushi, 2010), (Hata, 2013). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η χρήση ανασυνδυασμένου bFGF σε συνέχεια της επιδιόρθωσης των καταγμάτων της κνήμης βελτιώνει σημαντικά την επούλωση αυτών. Επιπλέον, τα πολυμορφοπύρηννα ουδετερόφιλα από υγιή άτομα εκφράζουν διαφορετικά επίπεδα υποδοχών bFGF στο κυτοσόλιο τους (FGFR-1 και FGFR-4) και στην κυτταροπλασματική τους μεμβράνη (FGFR-2). Αυτοί οι υποδοχείς μπορούν να συλλάβουν τον bFGF, εξηγώντας επομένως την αντίστροφη σχέση μεταξύ του bFGF και του αριθμού πολυμορφοπύρηννων κυττάρων σε δείγματα πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια με λευκοκύτταρα (L-PRP) σε όλες τις χρονικές στιγμές (Chamberlain, 2011). Επιπλέον η επίδραση των λευκοκυττάρων στο PRP εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενη και μπορεί να είναι είτε θετική είτε αρνητική, ανάλογα με τον ιστό και

την υποκείμενη νόσο, καθώς τα συμπυκνώματα PRP που εμπεριέχουν λεμφοκύτταρα συμβάλλουν στη συντήρηση της παραγωγής νέου bFGF μετά την αρχική απελευθέρωση του. Μερικά στοιχεία έχουν δείξει ότι η παρουσία πολυμορφοπύρηνων κυττάρων μπορεί να οδηγήσει σε προφλεγμονώδη κυτταρική σηματοδότηση και τοπικό καταβολισμό ιστών, ενώ άλλα έχουν δείξει ότι τα μακροφάγα είναι απαραίτητα για τον καθαρισμό του κατεστραμμένου συνδέσμου ιστού και για την απελευθέρωση κυτοκίνης που μεσολαβεί στη διαδικασία αποκατάστασης (Dines, 2007).

## **6.2 Αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης 1 (IGF-1)**

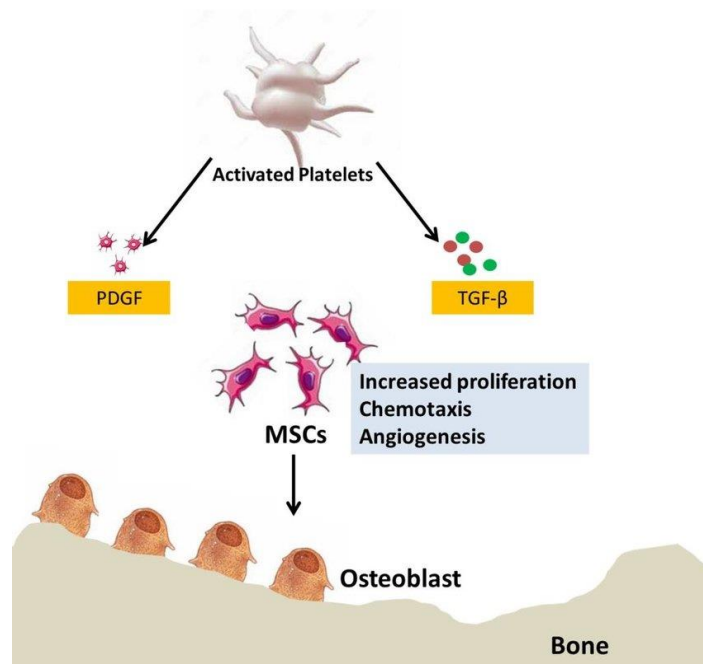
Ο IGF-1 είναι σε θέση να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ινοβλαστών και άλλων τοπικών κυττάρων και χρησιμεύει ως διασταυρούμενη σύνδεση μεταξύ μυών και οστών με ορισμένα φυσικά και βιοχημικά στοιχεία. Ο Kabiri και συνεργάτες του, ανέφεραν ότι το PRP έχει πλούσια συγκέντρωση αυξητικών παραγόντων όπως το IGF-1 TGF-β και bFGF, συζήτησαν επίσης τον πιθανό ρόλο τους στη χονδρογονική αναγέννηση, ειδικά στην προώθηση του πολλαπλασιασμού και της προσκόλλησης χονδροκυττάρων καθώς και στη διαφοροποίηση των βλαστικών μεσεγχυματικών κυττάρων. Ωστόσο, ο άμεσος ρόλος του IGF-1 που προέρχεται από το PRP πλάσμα στην αναγέννηση των οστών και των μυών δεν έχει διευκρινιστεί απόλυτα (Kabiri, 2014). Σε άλλη μελέτη έχει αναφερθεί ότι ο μηχανικός αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από το PRP (MGF), μια ισομορφή του IGF-1, θα μπορούσε να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των μυοβλαστών και μπορεί να έχει έναν πιθανό ρόλο στη βελτίωση της μυοσκελετικής αποκατάστασης (Creaney, 2008). Ωστόσο, ο σύντομος χρόνος ημιζωής περιορίσε τις συστηματικές εφαρμογές του. Επιπλέον, η συγκέντρωση των ισομορφών IGF-1 στο PRP δεν μπορεί να παράγει επαρκώς ένα προαγωγικό αποτέλεσμα στην αναγέννηση των μυών, κάτι που απαιτεί μεγάλη ποσοτικοποίηση της πρώτης ύλης στην επισκευή των οστών και των μυών.



Εικόνα 4: Συνστατικά και κύριες λειτουργίες του IGF-1. Οι ελεύθεροι IGF-1 και IGF-2 μπορούν να συνδεθούν με τους υποδοχείς τους (IGF-1R, IGF-2R). Οι πρωτεΐνες δέσμησης IGF, (IGFBP1-7) ρυθμίζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των IGF. Ο IGF-1R είναι μια κινάση τυροσίνης που μεσολαβεί στις δράσεις των IGFs. Ο IGF-2R είναι ένας ανασταλτικός υποδοχέας, καθώς κατευθύνει τον IGF-2 στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Οι IGF μπορούν επίσης να δεσμεύσουν τον υποδοχέα ινσουλίνης (IR). (Talia, 2020)

### 6.3 Τροποιητικός αυξητικός παράγοντας β (TGF-β)

Ο TGF-β, ένας από τους πιο άφθονους αυξητικούς παράγοντες που απελευθερώνονται από το PRP, έχει αποδειχθεί ότι προάγει την επούλωση των τενόντων. Ως εκ τούτου, θεωρείται καλός υποψήφιος για την δημιουργία μιας θέσης εισαγωγής τένοντα-οστού. Οι μελέτες σχετικά με την ανταπόκριση του TGF-β στη θέση οστικής βλάβης είναι αμφιλεγόμενες. Αναφέρθηκε ότι η υψηλή έκφραση του TGF-β θα μπορούσε να οδηγήσει σε παθολογικό σχηματισμό οστού και έκκριση κολλαγόνου. Ως εκ τούτου, οδήγησε σε ανώμαλη σύνθεση ινώδους και αποτυχία της ιδανικής αποκατάστασης των οστών (Shehata, 2004). Σε μια μελέτη έχει διαπιστωθεί ότι η δράση του PRP πλάσματος θα μπορούσε να ρυθμιστεί από συνθετικά υλικά και να εκκρίνει διάφορους αυξητικούς παράγοντες για τη διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων που προέρχονται από λιπώδη ιστό. Μεταξύ αυτών, ο TGF-β ήταν προφανώς αυξημένος και θα μπορούσε να διεγείρει την εναπόθεση των οστών για επιτυχή επούλωση κατάγματος (Busilacchi, 2013).



Εικόνα 5: Ο ρόλος του PRP στα βλαστοκύτταρα στο σχηματισμό οστών και χόνδρων. PRP: Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, PDGF: Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας, TGF-β: Τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας β, MSCs: Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (Wijekoon. S., 2021).

#### 6.4 Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)

Οι αγγειακοί ενδοθηλιακοί αυξητικοί παράγοντες είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών σηματοδότησης που λειτουργούν για να διεγείρουν τόσο την αγγειογένεση όσο και την αγγειογένεση μέσω ενός καταρράκτη σηματοδότησης που διαμεσολαβείται από υποδοχείς τυροσίνης. Αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει την αύξηση του VEGF παράγοντα στην επιδιόρθωση των οστών, σε διαφορετικά στάδια οστικής επούλωσης, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, της ενδοχονδρικής οστεοποίησης, της ενδομεμβρανώδους οστεοποίησης (Hu, 2016). Σε μελέτη παρατήρησης του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα, σχεδίασαν ένα ικρίωμα με βάση το PRP πλάσμα σε συνδυασμό με μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα και βρήκαν ότι η έκκριση του VEGF από το PRP συνέβαλε στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, οδηγώντας έτσι σε αγγειογένεση και οστεογένεση (El Backly, 2013).

#### 6.5 Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF)

Ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει την επούλωση σε μοντέλα αποκατάστασης οστών. Ο ανασυνδυασμένος PDGF μπορεί να μειώσει την οστεογονική διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων *in vitro*. Σε μελέτη εμφύτευσαν ένα ανασυνδυασμένο ανθρώπινο PDGF-BB (rhPDGF-BB) μαζί με μια μήτρα βόειου κολλαγόνου τύπου I, προκειμένου να βελτιώσει τη βιομηχανική

λειτουργία και τη μορφολογική εμφάνιση της επισκευής του περιστροφικού πετάλου σε ένα μοντέλο προβάτου. Τα αποτελέσματα, 2 εβδομάδων, έδειξαν αύξηση της βιομηχανικής αντοχής και της ανατομικής εμφάνισης (Hee, 2011). Οι αιμοπεταλιακοί αυξητικοί παράγοντες (PDGF), θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μετά από ρήξη του περιστροφικού πετάλου, για να προκαλέσουν πολλαπλασιασμό και σύνθεση κυττάρων των τενόντων, με τη βοήθεια του συμπλέγματος πρωτεϊνών της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM) (Scheibel, 2011). Ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας φάνηκε να ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των τενόντων και να προάγει τη σύνθεση της εξωκυτταρικής μήτρας. Σε τραυματισμό τενόντων, τα τενοντοκύτταρα του υπερακανθίου δεν είναι σε θέση να συνθέσουν φυσιολογική ινοχόνδρινη εξωκυτταρική μήτρα (ECM) ή κολλαγόνο τύπου II, αλλά μόνο τους τύπους I και III (Venneri, 2007).

#### **6.6 Αυξητικοί παράγοντες και βλαστοκύτταρα προερχόμενα από λιπώδη ιστό (ADSCs) στη μυοσκελετική αναγέννηση**

Η χρήση βλαστοκυττάρων που προέρχονται από λιπώδη ιστό (ADSC) στην οστική αναγέννηση απαιτεί πολύ καλή γνώση της διαδικασίας απομόνωσης και χειρισμού των κυττάρων καθώς και των συνθηκών καλλιέργειας, επειδή αυτές μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα, τη δυνατότητα διαφοροποίησης και την έκφραση γονιδίων (Gaiba, 2012). Υπάρχουν μερικές *in vitro* μελέτες σχετικά με τις πιθανές επιδράσεις των αυξητικών παραγόντων που απελευθερώνονται από το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, στα βλαστοκύτταρα και στην ικανότητα τους στην αναγέννηση των ιστών. Έχει διαπιστωθεί ότι το PRP πλάσμα θα μπορούσε να βελτιώσει αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων που προέρχονται από λιπώδη ιστό με την έκκριση των TGF-1 και PDGF-AB αυξητικών παραγόντων (Wang M. L., 2012). Η συνδυασμένη επίδραση των αυξητικών παραγόντων που προέρχονται από το PRP και των ADSC κυττάρων συζητήθηκε επίσης για *in vivo* έρευνα, στην οποία παρατηρήθηκε ότι η ενεργοποίηση του PRP θα μπορούσε να συμβάλει σημαντικά σε μια ορισμένη διαφοροποίηση των ADSC κυττάρων και να βελτιώσει την αναγέννηση του αρθρικού χόνδρου *in vivo* (Van Pham, 2013).

#### **6.7 Αυξητικοί παράγοντες και βλαστοκύτταρα που προέρχονται από μυελό των οστών (BMSCs) στη μυοσκελετική αναγέννηση**

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSC) προερχόμενα από διάφορες πηγές, έχουν



τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σε θεραπείες βασιζόμενες στη χρήση κυττάρων. Ωστόσο, λόγω του χαμηλού ποσοστού των πρωτογενών μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων (MSCs) που υπάρχουν κατά τη προσκόλληση του μυελού των οστών με χρήση πλαστικού υλικού και στην *in vitro* επέκταση του, είναι απαραίτητο να προηγηθεί της κλινικής εφαρμογής ο πολλαπλασιασμός των βλαστοκυττάρων του μυελού των οστών (BMSCs) (Phinney, 1999).

Υπάρχουν μερικές σημαντικές *in vitro* μελέτες που υποστηρίζουν την αξία του χονδροεπαγωγικού TGF-β3 αυξητικού παράγοντα, το PRP με το αλγινικό οξύ συνέβαλαν εξίσου στη χονδρογονική ανάπτυξη. Ο TGF-β3 δεν ήταν απαραίτητος παράγοντας για τη χονδροεπαγωγή των βλαστοκυττάρων του μυελού των οστών, αλλά αυτή η διαδικασία θα μπορούσε να επιταχυνθεί εξαιρετικά με την παρουσία του TGF-β3 (Zurita, 2010). Το σύστημα καλλιέργειας σφαιριδίων αλγινικού οξέος ενδείκνυται ότι βελτιώνει σημαντικά την επιτυχή χονδροεπαγωγή των BMSC κυττάρων *in vitro* και επομένως χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθεί με το PRP. Τα κύτταρα που δεν αλληλεπιδρούν με μόρια αλγινικού οξέος παραμένουν σε σχήμα σφαιρικό μέχρι να δημιουργηθεί μια περικυτταρική μήτρα που να ευνοεί τις συνδέσεις αυτών (Elder, 2014). Επιπλέον, η εξαρτώμενη από την ιντεγκρίνη αντίδραση των κυττάρων με την εξωκυττάρια μήτρα που διεγείρεται από PRP πλάσμα μπορεί να βελτιώσει σημαντικά τη χονδρογονική διαφοροποίηση που διεγείρεται από τον TGF-β3. Επιπλέον, η έκφραση των Col-2, Sox-9 και AGC θα μπορούσε να ρυθμιστεί θετικά με την παρουσία PRP και τη χαμηλή έκφραση του TGF-β3 ώστε να διεγερθεί η χονδρογονική διαφοροποίηση των BMSC κυττάρων, η οποία πιθανώς επηρεάστηκε από κοινές προσπάθειες διάφορων αυξητικών παραγόντων από PRP στην αναγέννηση του χόνδρου.

Επιπλέον, το συνδυασμένο αποτέλεσμα του PRP με αλγινικού οξέος, αξιολογήθηκε επίσης σε ορισμένες *in vivo* μελέτες. Το PRP συγκέντρωσης 2-5% θα μπορούσε να αυξήσει καλύτερα την οστεογονική διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων μυελού των οστών. Σε αυτή τη διαδικασία, υπήρξε η παρατήρηση της αυξημένης έκφρασης του PDGF και του TGF-β που απελευθερώνεται από το PRP πλάσμα, γεγονός που συνέβαλε σε μια αποτελεσματική και επιτυχημένη αποκατάσταση των οστών (Yamanda, 2004). Ακόμη σε μία μελέτη παρατηρήθηκε ότι η κοινή εφαρμογή των αυξητικών παραγόντων VEGF και bFGF σε BMSC κύτταρα, έχει θετικό αποτέλεσμα στη διέγερση της οστεογένεσης και της αύξησης της αναγέννησης των οστών σε ένα μοντέλο αρουραίου. Η προσθήκη αυξητικών

παραγόντων θα μπορούσε περαιτέρω να συμβάλει στη διαφοροποίηση στην αρχή του πολλαπλασιασμού (Bai, 2014).

### **6.8 Αυξητικοί παράγοντες και βλαστοκύτταρα περιοδοντικού συνδέσμου (PDLSCs) στη μυοσκελετική αναγέννηση**

Η έρευνα στα βλαστοκύτταρα ανθρώπινου περιοδοντικού συνδέσμου έχει επίσης προσελκύσει την προσοχή πολλών επιστημόνων, και αποτελεί μία σχετικά εύκολη μέθοδο απομόνωσης των PDLSC κυττάρων λόγω της πλούσιας περιεκτικότητά τους στα δόντια. Επιπλέον, οι διαδικασίες εκχύλισης και καθαρισμού που έχουν υιοθετηθεί, δεν οδηγούν σε σημαντική βλάβη στους ασθενείς (Xiong, 2016).

Προηγούμενες έρευνες έχουν αναφέρει πιθανές επιπτώσεις των PDLSC κυττάρων σε συνδυασμό με PRP στην οστική αναγέννηση *in vitro*, με αυξημένη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης και οστεογονική διαφοροποίηση. Μερικοί επιστήμονες διαπίστωσαν ότι η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης από PDLSC κύτταρα αυξήθηκε μετά από θεραπεία με πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια από αίμα ομφάλιου λώρου (UCB-PRP) με δοσοεξαρτώμενο τρόπο έως και σε συγκέντρωση 2%. Η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης είχε πτωτική πορεία σε υψηλότερη συγκέντρωση UCB-PRP. Παρατηρήθηκαν επίσης, και οι επιδράσεις του UCB-PRP στην εναπόθεση ασβεστίου καθώς ήταν παρόμοιες με εκείνες του κυτταρικού πολλαπλασιασμό και της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης (Lee, 2011), όπως και η θεραπεία με 2% UCB-PRP είχε ως αποτέλεσμα τις υψηλότερες εναποθέσεις ασβεστίου στα ανθρώπινα PDLSC κύτταρα. Διερευνήθηκαν οι συγκεντρώσεις του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα-AB (PDGF-AB) και του τροποποιητικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β) στο UCB-PRP διερευνήθηκαν και φάνηκαν να είναι συγκρίσιμες με τις ποσότητες στο περιφερικό αίμα. Τέλος, και κάποιες ισόμορφες αιμοπεταλιακών αυξητικών παραγόντων (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB), πρωτεΐνες σύνδεσης αυξητικού παράγοντα ινσουλίνης 2 και 6 (IGFBP-2, IGFBP-6) φαίνεται να συμμετείχαν στενά στη διαδικασία.

Συνολικά, το UCB-PRP είχε ευεργετικές επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό και την οστεογονική διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων ανθρώπινων περιοδοντικών συνδέσμων. Σε μία μελέτη ανακάλυψαν επίσης μια σημαντική ενίσχυση της διαφοροποίησης των κυττάρων σε μια συνδυασμένη χρήση PDLSC κυττάρων και PRP. Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες που απελευθερώθηκαν από το PRP συνέβαλαν στη βελτιωμένη αναδόμηση του κυτταρικού φύλλου, στην αυξημένη

οστεογονική έκφραση γονιδίων. (Xu, 2017). Όλα αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ισχυρότερη ικανότητα αναγέννησης του περιοδοντικού ιστού.

## Συζήτηση

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί την επίδραση διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας στην απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων, όπως PDGF, VEGF και TGF- $\beta$  από διαφορετικούς τύπους συμπυκνώματος αιμοπεταλίων. Η μελέτη διερεύνησε μη-ενεργοποιημένο με  $\text{Ca}^{2+}$  PRP, με  $\text{Ca}^{2+}$  ενεργοποιημένο PRP, και PRF. Κατά τη διάρκεια της παρασκευής, ελήφθησαν τα προϊόντα λύσης από αυτά τα προϊόντα χρησιμοποιώντας τρεις μεθόδους επώασης: κατάψυξη-απόψυξη-κατάψυξη, επώαση στους 37°C για 1 ώρα ακολουθούμενη από ανάκληση στους 4°C για 16 ώρες και αποθήκευση 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (22°C). Έχουν περιγραφεί διάφορες μέθοδοι ενεργοποίησης και επώασης με στόχο την απελευθέρωση των PDGF, TGF- $\beta$  και VEGF παραγόντων από PRP πλάσμα (Weibrich G. K., 2003), (Burnouf, 2016). Σε αυτή τη μελέτη οι μέθοδοι επώασης που διερευνήθηκαν δεν απαιτούν προσθήκες υποστρώματος, με εξαίρεση το ασβέστιο, η οποία μέθοδος χρησιμοποιείται συχνά πριν από την τοπική εφαρμογή του PRP προκειμένου να σχηματιστεί θρόμβος (Landesberg, 2000). Μια σύγκριση σχετικών μελετών έδειξε έλλειψη πληροφοριών σχετικά με την απελευθέρωση των PDGF, TGF- $\beta$ 1 και VEGF από τις διαφορετικές μεθόδους επώασης, και έτσι η μέθοδος παρασκευής του δείγματος θα μπορούσε να έχει σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση των PDGF, VEGF και TGF- $\beta$ 1 σε παράγωγα αιμοπεταλίων (Zimmerman R. A., 2003).

Τα διάφορα παράγωγα αιμοπεταλίων που είναι πλούσια σε αιμοπετάλια περιέχουν πολλαπλούς αυξητικούς παράγοντες με θετικά αποτελέσματα στη θεραπεία των τραυματισμένων περιοχών και κακώσεων (De Pascale, 2015). Καθώς ο PDGF είναι ένας από τους πιο σημαντικούς και καλά χαρακτηρισμένους αυξητικούς παράγοντες, επιλέχθηκε ως εκπρόσωπος και δείκτης σε αυτή τη μελέτη. Ο στόχος μας ήταν να αξιολογήσουμε την απελευθέρωση του PDGF από τα  $\alpha$ -κοκκία των αιμοπεταλίων στο πλάσμα, που προκαλείται από τις διάφορες συνθήκες αποθήκευσης, ανεξάρτητα από την επιδιωκόμενη θεραπευτική προσέγγιση. Ωστόσο, τα ευρήματα παρέχουν πληροφορίες για το στόχο της χαμηλής ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων καθώς και της μεγιστοποίησης της απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων στα παράγωγα του αίματος.

Η πρώτη επίδραση στην απελευθέρωση PDGF σε παράγωγα αίματος είναι η διαδικασία παραγωγής. Χρησιμοποιήσαμε ένα πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα για τη δημιουργία PRP και PC που οδηγεί σε μια διαδικασία εξαιρετικά αναπαραγώγιμη σε σύγκριση με τις τυπικές διαδικασίες προετοιμασίας που περιλαμβάνουν χειροκίνητα βήματα. Έτσι, οι λόγοι για τις διακυμάνσεις της απόδοσης των αιμοπεταλίων μπορούν να περιοριστούν σε διαφορές που εξαρτώνται από τον δότη.

Και στα δύο παράγωγα αιμοπεταλίων, PRP και PC, η αυξημένη απελευθέρωση του PDGF σε σχέση με το χρόνο αποθήκευσης μπορεί να εξηγηθεί από την ενεργοποίηση που προκαλείται από μηχανική και θερμική καταπόνηση (Perrota, 2007) που ακολουθείται από την αποκοκκίωση και αποσύνθεση των αιμοπεταλίων. Επίσης, η αποσύνθεση των αιμοσφαιρίων οδηγεί σε ψευδείς μετρήσεις αιμοπεταλίων σε αιματολογικούς αναλυτές (Briggs, 2007), οπότε οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται στον αριθμό των αιμοπεταλίων μετά την αποθήκευση μπορεί να θεωρηθούν ως δείκτης αποικοδόμησης και αποσύνθεσης αυτών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της φυσιολογικής δραστηριότητας και της ακεραιότητας των αιμοπεταλίων όπως είναι επιθυμητό σε ορισμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Στο PRP μόνο μικρές αλλαγές ανιχνεύθηκαν στον αριθμό των αιμοπεταλίων που μετρήθηκαν εντός των πρώτων 48 ωρών αποθήκευσης πάνω από τους +4°C, υποδεικνύοντας ότι κυρίως η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και όχι η αποσάθρωση προκάλεσε την απελευθέρωση του PDGF. Για παρατεταμένη και κατεψυγμένη αποθήκευση προσδιορίστηκαν υψηλές διακυμάνσεις του αριθμού των αιμοπεταλίων στο PRP και η διάσπαση των αιμοπεταλίων. Στο συμπύκνωμα αιμοπεταλίων αυτό παρατηρήθηκε ήδη στις πρώτες 72 ώρες αποθήκευσης.

### **7.1 Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια**

Στο PRP δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καμία διαφορά στην περιεκτικότητα σε PDGF μεταξύ των δοκιμασμένων θερμοκρασιών αποθήκευσης μετά από 1 μήνα αποθήκευσης. Παρατηρήθηκε ότι στην αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία πάνω από τους +4°C υπήρξε συνεχής απελευθέρωση του PDGF, η οποία ήταν σχεδόν ίδια με την ποσότητα που απελευθερώθηκε στους -20°C μετά από 1 μήνα. Η πτωτική πορεία της περιεκτικότητας σε PDGF σε όλες τις θερμοκρασίες μπορεί να οφείλεται σε μετουσίωση των απελευθερωμένων αυξητικών παραγόντων. Το θεωρητικά δυνατό μέγιστο επίπεδο των 60 pg ανά 10<sup>6</sup> αιμοπετάλια που

δεσμεύονται στα α-κοκκία (Kudlow, 2013) δεν επιτεύχθηκε στα παράγωγα του αίματος.

Μια περαιτέρω παρατήρηση στα κατεψυγμένα δείγματα PRP που θα μπορούσε να εξηγήσει τις υψηλότερες τιμές του PDGF ήταν μια πολύ ομοιογενής σύνθεση χωρίς εμφανή διαχωρισμό φάσεων. Λόγω της στατικής αποθήκευσης χωρίς ανάδευση, τα παράγωγα αίματος που αποθηκεύτηκαν στους +4°C, +22°C και +37°C είχαν ορατό διαχωρισμό φάσεων. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε διακυμάνσεις της τιμής του pH και επομένως σε μετουσίωση των πρωτεϊνών που εξηγεί τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε PDGF. Με την ταχεία κατάψυξη των παραγώγων αίματος που αποθηκεύτηκαν στους -20°C, δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός φάσεων παρά τις εξίσου στατικές συνθήκες αποθήκευσης.

## **7.2 Συμπύκνωμα αιμοπεταλίων (PC)**

Στο συμπύκνωμα αιμοπεταλίων (PC) τα αιμοπετάλια καθώς βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι και πιο πυκνά συσκευασμένα από ό,τι στο PRP, οπότε πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ενεργοποίηση της επαφής των πυκνά συσκευασμένων αιμοπεταλίων. Επίσης σημαντικό ρόλο παίζει η φυσική διεργασία της φυγοκέντρωσης, δύο σταδίων, στην απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων.

Η συγκέντρωση PDGF σε όλα τα δείγματα PC ήταν υψηλότερη από ό,τι στο PRP, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγηθεί από την υψηλότερη περιεκτικότητα σε αιμοπετάλια. Ωστόσο, υψηλότερες τιμές ανιχνεύθηκαν επίσης όταν συγκρίθηκαν οι τυποποιημένες ποσότητες PDGF με τον αριθμό των αιμοπεταλίων. Εντός των πρώτων 10 ημερών αποθήκευσης, η ποσότητα του PDGF που απελευθερώθηκε ανά 106 αιμοπετάλια στο συμπύκνωμα αιμοπεταλίων ήταν υψηλότερη από το συνολικό μέγιστο στο PRP, ανεξάρτητα από τις συνθήκες αποθήκευσης. Επιπλέον, η απελευθέρωση εντός 72 ωρών στο συμπύκνωμα αιμοπεταλίων ήταν ήδη ίση με την ποσότητα που απελευθερώθηκε σε PRP μέσα σε 1 μήνα αποθήκευσης.

Αυτό υποδεικνύει ότι η απελευθέρωση PDGF επιταχύνεται σαφώς σε σύγκριση με το PRP και μπορεί να οφείλεται στην ισχυρότερη ενεργοποίηση κατά την παραγωγή και την ενεργοποίηση επαφής. Οι τιμές του PDGF ανά 106 αιμοπετάλια είναι επίσης πιο κοντά στο μέγιστο δυνατό φυσιολογικό επίπεδο των 60 pg ανά 106 αιμοπετάλια. Επιπλέον, η αποθήκευση στους -20°C θα μπορούσε να είναι μια πολλά υποσχόμενη για να επιτευχθεί ακόμη υψηλότερη απόδοση και πλήρη απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων στο PC.

## **Συμπεράσματα**

Το PRP αντιπροσωπεύει σημαντική θεραπεία στην αναγεννητική ιατρική. Με τη χρήση διαφορετικών μεθόδων είναι δυνατό να ληφθούν διάφοροι τύποι PRP, όσον αφορά την περιεκτικότητα σε βιοενεργά μόρια. Εκτός των αιμοπεταλίων, ως κύριο συστατικό του PRP πλάσματος, και άλλοι βιοενεργοί παράγοντες μπορεί να εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης. Το PRP πλούσιο σε λευκοκύτταρα μπορεί να ενισχύσει τη διαδικασία επούλωσης, επιτυγχάνοντας και μείωση του μικροβιακού φορτίου στο σημείο τραυματισμού και διεγείροντας την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων. Ωστόσο, η μεγάλη συγκέντρωση λευκών αιμοσφαιρίων στο PRP μπορεί να έχει ανασταλτική δράση. Η βέλτιστη συγκέντρωση αιμοπεταλίων, λευκοκυττάρων και άλλων συστατικών του πλάσματος πρέπει να διευκρινιστεί και ο ερευνητής θα πρέπει να γνωρίζει ότι το αποτέλεσμα PRP δεν βασίζεται μόνο στη συγκέντρωση των αιμοπεταλίων.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα, η αποθήκευση των διάφορων παραγώγων αίματος πλούσιων σε αιμοπετάλια οδήγησε σε αυξημένη απελευθέρωση του αυξητικού παράγοντα PDGF από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων στο πλάσμα με χρόνο αποθήκευσης έως 1 μήνα σε PRP και 10 ημέρες σε PC, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία αποθήκευσης. Η απελευθέρωση PDGF ανά αιμοπετάλιο σε PC επιταχύνθηκε σαφώς σε σύγκριση με το PRP και έφτασε σχεδόν στο φυσιολογικά δυνατό επίπεδο των 60 pg ανά 10<sup>6</sup> αιμοπετάλια. Τα υψηλότερα επίπεδα PDGF επιτεύχθηκαν σε αποθήκευση με απλή ψύξη ή κατεψυγμένη αποθήκευση με επιταχυνόμενη απελευθέρωση PDGF σε PRP στους -20°C. Τα ευρήματα παρέχουν πληροφορίες για το στόχο της χαμηλής ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων καθώς και της μεγιστοποίησης της απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων σε παράγωγα αίματος λόγω των συνθηκών αποθήκευσης.

Συμπερασματικά, μια απλή ψύξη-απόψυξη θα οδηγήσει σε άμεση αύξηση της ποσότητας της καταβολικής μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP-9 σε PRP που περιέχει λευκοκύτταρα χωρίς κλινικά σχετική αλλαγή στις συγκεντρώσεις των PDGF, TGF-β1 ή IGF-1. Επιπλέον, το PRP αποθηκεύεται καλύτερα στους -80°C για 1 μήνα ή σε υγρό άζωτο για έως και 6 μήνες για τη διατήρηση των συγκεντρώσεων PDGF και TGF-β1 (McClain, 2019). Ωστόσο, εάν ο IGF-1 θεωρείται απαραίτητος αυξητικός παράγοντας για την επιδιωκόμενη θεραπευτική εφαρμογή του PRP, τότε θα πρέπει να χρησιμοποιείται φρέσκο PRP σε αυτές τις περιπτώσεις. Τέλος, για ερευνητικές

εφαρμογές, ο IGF-1 θα πρέπει να μετράται αμέσως, ενώ ο PDGF και ο TGF-β1 μπορούν να ποσοτικοποιηθούν μετά από αποθήκευση έως και 6 μηνών σε υγρό άζωτο. Η ίδια η πράξη της κατάψυξης αυξάνει τη συγκέντρωση της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP-9 και αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν κατεψυγμένα δείγματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων MMP-9, οι οποίες δεν θα αντικατοπτρίζουν με ακρίβεια τις συγκεντρώσεις της MMP-9 που εφαρμόζονται σε ιστούς ή κύτταρα εάν το φρέσκο PRP πλάσμα χρησιμοποιείται για καλλιέργεια ή in vivo μελέτες.

## Βιβλιογραφία

- Alsousou, J. T. (2009). The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *The Journal of Bone and Joint Surgery* . doi:10.1302/0301-620X.91B8.22546
- Andia I, S. M. (2012). Joint pathology and platelet-rich.
- Anitua, E. A. (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis* . doi:10.1160/TH03-07-0440
- Anitua, E. T. (2012). Platelet-rich plasma to improve the bio-functionality of biomaterials. *BioDrugs*. doi:10.1007/s40259-012-0004-3
- Aster, H. R. (1976). Studies to improve methods of short-term platelet preservation. *Transfusion*.
- Badlou B.A., S. G.-W. (2006). Role of glycoprotein Iba in phagocytosis of platelets by macrophages. Στο *CELL PHYSIOLOGY*. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.01034.x.
- Baghadadi, V. Y. (2020). Platelets Apoptosis and Clearance in The Presence of Sodium Octanoate during Storage of Platelet Concentrate at 4°C. *Cell Journal*.
- Bai, Y. L. (2014). Effects of combinations of BMP-2 with FGF-2 and/or VEGF on HUVECs angiogenesis in vitro and CAM angiogenesis in vivo. doi:10.1007/s00441-013-1781-9
- Barrientos, S. S.-C. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x
- Basil, M. C. (2015). Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. doi:10.1038/nri.2015.4
- Becker G.A., T. M. (1973). Studies of Platelet Concentrates Stored at 22 C and 4 C. *Transfusion*. doi:10.1111/j.1537-2995.1973.tb05442.x
- Bielecki, T. M. (2012). The role of leukocytes from L-PRP/L-PRF in wound healing and immune defense: new perspectives. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. doi:10.2174/138920112800624373
- Boswell, S. G. (2012). Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy*. doi:10.1016/j.arthro.2011.10.018
- Briggs, C. H. (2007). Continuing developments with the automated platelet count.
- Burnouf, T. S. (2016). Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.065

- Busilacchi, A. G.-B. (2013). Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration.  
doi:10.1016/j.carbpol.2013.06.044
- Bynum, J. A. (2016). Bioenergetic profiling of platelet mitochondria during storage: 4°C storage extends platelet mitochondrial function and viability. *Transfusion*.  
doi:https://doi.org/10.1111/trf.13337
- Chamberlain, S. C. (2011). The influence of macrophage depletion on ligament healing.
- Cheng, T. M. (2014). Optimization of culture conditions for stem cells derived from human anterior cruciate ligament and bone marrow. *Cell Transplant*.
- Colciago, A. C. (2009). In Vitro Effects of PDGF Isoforms (AA, BB, AB and CC) on Migration and Proliferation of SaOS-2 Osteoblasts and on Migration of Human Osteoblasts. *International Journal of Biomedical Science*.
- Connor, J. C. (1996). Recovery of in vitro functional activity of platelet concentrates stored at 4 degrees C and treated with second-messenger effectors. *Transfusion*.
- Coppinger, J. A. (2004). Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood Journal* . doi:10.1182/blood-2003-08-2804
- Cosenza S., R. M. (2017). Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis.
- Creaney, L. H. (2008). Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play.
- D'Alessandro, A. T. (2020). Metabolic phenotypes of standard and cold-stored platelets. *Transfusion*. doi:10.1111/trf.15651
- Davis, V. A.-E. (2014). Platelet-rich preparations to improve healing. Part I: workable options for every size practice. *Journal of Oral Implantology* .  
doi:10.1563/AAID-JOI-D-12-00104
- De Pascale, M. R. (2015). Platelet Derivatives in Regenerative Medicine: An Update. *Στο Transfusion Medicine Reviews*.  
doi:https://doi.org/10.1016/j.tmr.2014.11.001
- Dhillon, R. S. (2012). Platelet-rich plasma therapy - future or trend? *Arthritis Research & Therapy*. doi:10.1186/ar3914
- Dines, S. J. (2007). Tissue engineering and rotator cuff tendon healing.
- Dohan, D. M. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution.  
doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.008
- Dragoo, J. L. (2012). Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *The American Journal of Sports Medicine* . doi: 10.1177/0363546512442334
- Duregger, K. P. (2016). Influence of storage conditions on the release of growth factors in platelet-rich blood derivatives. *Current Directions in Biomedical Engineering*. doi:10.1515/cdbme-2016-0069
- Dyer, H. A. (2016). The role of Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) in brain development, maturation and neuroplasticity.
- Ekaney, M. L. (2017). Cytochrome c and resveratrol preserve platelet function during cold storage. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*.  
doi:10.1097/TA.0000000000001547
- El Backly, R. M. (2013). A platelet-rich plasma-based membrane as a periosteal substitute with enhanced osteogenic and angiogenic properties: a new concept



- for bone repair.
- Elder, S. T. (2014). Effect of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation in three-dimensional culture.
- Fang, L. (2004). PDGF C Is A Selective  $\alpha$  Platelet-Derived Growth Factor Receptor Agonist That Is Highly Expressed in Platelet  $\alpha$  Granules and Vascular Smooth Muscle. *Thrombosis*. doi:https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000120785.82268.8b
- Fiedler, J. E. (2004). To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF. *Journal of Cellular Biochemistry*. doi:10.1002/jcb.20219
- Frechette, J. M. (2005). Platelet-rich Plasmas: Growth Factor Content and Roles in Wound Healing. *Journal of Dental Research*. doi:https://doi.org/10.1177/154405910508400507
- Fredman, G. V. (2010). Resolvin E1 regulates adenosine diphosphate activation of human platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. doi:10.1161/ATVBAHA.110.209908
- Gaiba, S. P. (2012). Characterization of human adipose-derived stem cells.
- Gedlitschky, G. T. (2004). The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. *Blood Journal* . doi:10.1182/blood-2003-12-4330
- Gerstenfeld, L. C. (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*. doi:https://doi.org/10.1002/jcb.10435
- Getz T.M., M. R. (2016). Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses. *Στο BLOOD COMPONENTS*. doi:10.1111/trf.13511
- Getz, M. T. (2019). Sodium citrate contributes to the platelet storage lesion. *Transfusion*. doi:10.1111/trf.15213
- Getz, T. M. (2019). Physiology of cold-stored platelets. *Transfusion and Apheresis Science*. doi:https://doi.org/10.1016/j.transci.2018.12.011
- Ghanaati S., B. P. (2014). Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. doi:10.1563/aaid-joi-D-14-00138
- Gulotta, V. L. (2011). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuff healing in a rat model.
- Gurtner, G. C. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*. doi:10.1038/nature07039
- Gutmann, C. J. (2020). Platelet "-omics" in health and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.05.022
- Handigund, M. B. (2016). Evaluation of in vitro storage characteristics of cold stored platelet concentrates with N acetylcysteine. doi:10.1016/j.transci.2016.01.006
- Handigund, M. K. (2021). N-acetylcysteine reduce the stress induced by cold storage of platelets: A potential way to extend shelf life of platelets. *Transfusion and Apheresis Science*. doi:10.1016/j.transci.2020.103039
- Hata, Y. I. (2013). Quantitative evaluation of myofibroblast apoptosis during wound healing in rat palate after post-operative administration of basic fibroblast growth factor (bFGF).
- Hattori, T. N. (2020). Clinical evaluation of FAPlus/FNPlus bottles compared with the combination of SA/SN and FA/FN bottles in the BacT/Alert blood culture system.

- Hedge, S. W. (2020). Antioxidant prevents clearance of hemostatically competent platelets after long-term cold storage. *Transfusion* . doi: 10.1111/trf.16200
- Hedge, S. W. (2020). Antioxidant prevents clearance of hemostatically competent platelets after long-term cold storage. *Transfusion*. doi:10.1111/trf.16200
- Hee, K. C. (2011). Augmentation of a rotator cuff suture repair using rhPDGF-BB and a type I bovine collagen matrix in an ovine model.
- Herford, A. S. (2017). Maxillofacial Defects and the Use of Growth Factors. doi:https://doi.org/10.1016/j.coms.2016.08.006
- Hourfar, M. K.-S. (2008). Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus. *Transfusion*. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01718.x
- Hsu, W. K. (2013). Platelet-rich plasma in orthopaedic applications: evidence-based recommendations for treatment. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. doi:10.5435/JAAOS-21-12-739
- Hu, K. O. (2016). The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration.
- Italiano, J. E. (2003). Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.
- Josefsson E.C., G. H. (2005). The Macrophage  $\alpha$ M $\beta$ 2 Integrin  $\alpha$ M Lectin Domain Mediates the Phagocytosis of Chilled Platelets. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*.
- Joyce, M. J. (1990). Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair.
- Kabiri, A. E. (2014). Platelet-rich plasma application in chondrogenesis. doi:10.4103/2277-9175.135156
- Kawagushi, H. O. (2010). A local application of recombinant human fibroblast growth factor 2 for tibial shaft fractures: A randomized, placebo-controlled trial.
- Ketter P.M., K. R. (2019). Platelet enhancement of bacterial growth during room temperature storage: mitigation through refrigeration. doi:10.1111/trf.15255
- Knezevic, N. N. (2016). Is Platelet-Rich Plasma a Future Therapy in Pain Management? doi:10.1016/j.mcna.2015.08.014
- Koessler, J. K. (2020). The Impact of Cold Storage on Adenosine Diphosphate-Mediated Platelet Responsiveness. doi:10.1055/s-0040-1714254
- Kudlow, L. E. (2013). *Biology of growth factors: molecular biology, oncogenes, signal transduction, and clinical implications*.
- Landesberg, R. R. (2000). Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation.
- Lee, Y. J. (2011). The effects of platelet-rich plasma derived from human umbilical cord blood on the osteogenic differentiation of human dental stem cells.
- Losi, P. B. (2013). Fibrin-based scaffold incorporating VEGF- and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice.
- Macaulay, I. C. (2005). Platelet genomics and proteomics in human health and disease. *Journal of Clinical Investigation* . doi:10.1172/JCI26885
- Maoudi, E. A. (2016). Platelet-Rich Blood Derivatives for Stem Cell-Based Tissue Engineering and Regeneration. doi:10.1007/s40778-016-0034-8
- Marx, R. E. (2004). Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral Maxillofac Surgery*. doi:10.1016/j.joms.2003.12.003
- Maynard, D. M. (2007). Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. doi:10.1111/j.1538-

7836.2007.02690.x

- Mazzucco, L. B. (2009). Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateltex and one manual procedure. doi:10.1111/j.1423-0410.2009.01188.x
- McClain, K. A. (2019). The effect of four different freezing conditions and time in frozen storage on the concentration of commonly measured growth factors and enzymes in equine platelet-rich plasma over six months.
- Melchinger, H. J. (2019). Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone. doi:10.3389/fcvm.2019.00153
- Miles, J. B. (2021). Storage temperature determines platelet GPVI levels and function in mice and humans. doi:10.1182/bloodadvances.2021004692
- Moller, B. P. (2003). Interferon-gamma induces expression of interleukin-18 binding protein in fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology*. doi:10.1093/rheumatology/keg146
- Mukai, N. N. (2019). Cold storage conditions modify microRNA expressions for platelet transfusion. *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0218797
- Murphy, S. &. (1969). Effect of Storage Temperature on Maintenance of Platelet Viability-Deleterious Effect of Refrigerated Storage. *New England Journal of Medicine*.
- Nagy, M. M. (2017). Variable impairment of platelet functions in patients with severe, genetically linked immune deficiencies. *Haematologica*. doi:10.3324/haematol.2017.176974
- Nair, P. M. (2017). Platelets stored at 4°C contribute to superior clot properties compared to current standard-of-care through fibrin-crosslinking. doi:10.1111/bjh.14751
- Nair, P. M. (2021). Cold-stored platelets have better preserved contractile function in comparison with room temperature-stored platelets over 21 days. *Transfusion*. doi:10.1111/trf.16530
- Nikolidakis, D. J. (2008). The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. doi: 10.1089/ten.teb.2008.0062
- Nurden, T. A. (2008). Platelets and wound healing. doi:10.2741/2947
- Oliveira Filho, M. A. (2010). Effects of a highly concentrated platelet-rich plasma on the bone repair using non-critical defects in the calvaria of rabbits. *Acta Cirurgica Brasileira*. doi:10.1590/s0102-86502010000100008
- Oliver A.E., T. F. (1999). The internal calcium concentration of human platelets increases during chilling. Στο *Biochimica et Biophysica Acta*. doi:10.1016/s0005-2736(98)00239-9
- Pandey S., B. G. (χ.χ.). A survey of US hospitals on platelet inventory management, transfusion practice, and platelet availability. *Transfusion*. doi: https://doi.org/10.1111/trf.16561
- Perrota, L. P. (2007). Apoptotic activity in stored human platelets. *Transfusion*.
- Phinney, G. D. (1999). Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation.
- Prowse, V. C. (2014). Commercially available blood storage containers.
- Reddoch K.M., P. H. (2014). Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4°C and 22°C. doi:10.1097/SHK.0000000000000082.
- Reddoch-Cardenas, M. K. (2018). Cold storage of platelets in platelet additive solution: an in vitro comparison of two Food and Drug Administration-

- approved collection and storage systems. *Transfusion*.
- Reddoch-Gardenas, K. M. (2020). Use of Specialized Pro-Resolving Mediators to Alleviate Cold Platelet Storage Lesion. *Transfusion*. doi:10.1111/trf.15750
- Sanchez, R. S. (2003). Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *THE JOURNAL OF PROSTHETIC DENTISTRY*.
- Sarahrudi, K. T. (2011). Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) levels in human fracture healing. Στο *Injury*. doi:10.1016/j.injury.2011.03.055
- Scheibel, M. S. (2011). Arthroscopic soft tissue tenodesis versus bony fixation anchor tenodesis of the long head of the biceps tendon.
- Schrezenmeier, H. W.-W. (2007). Bacterial contamination of platelet concentrates: results of a prospective multicenter study comparing pooled whole blood-derived platelets and apheresis platelets. *Transfusion*. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01166.x
- Scorer, T. G. (2020). TEG PlateletMapping assay results may be misleading in the presence of cold stored platelets. *Transfusion*. doi:10.1111/trf.15753
- Shea, M. S. (2019). The effect of platelet storage temperature on haemostatic, immune, and endothelial function: potential for personalised medicine. *Blood Transfusion*.
- Shehata, M. S. (2004). TGF-beta1 induces bone marrow reticulin fibrosis in hairy cell leukemia.
- Street, J. B. (2002). Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. doi:https://doi.org/10.1073/pnas.152324099
- Sun, X. C. (2014). bFGF-grafted electrospun fibrous scaffolds via poly(dopamine) for skin wound healing.
- T.M., G. (2019). Physiology of cold-stored platelets. *Transfusion and Apheresis Science*. doi:https://doi.org/10.1016/j.transci.2018.12.011
- Van Pham, P. B.-T. (2013). Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage.
- Venneri, A. M. (2007). Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood*.
- Vit, G. K. (2020). Platelet storage and functional integrity.
- Wandall H.H., H. K. (2011). The role of lectins and glycans in platelet clearance. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04276.x
- Wang, M. L. (2012). The comparison of platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in releasing of growth factors and their effects on the proliferation and differentiation of adipose tissue-derived stem cells in vitro.
- Wang, S. J. (2018). A proteomic approach reveals the variation in human platelet protein composition after storage at different temperatures. *Platelets*. doi:10.1080/09537104.2018.1453060
- Weibrich, G. H. (2004). Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. doi:10.1016/j.bone.2003.12.010
- Weibrich, G. K. (2003). Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank.
- White J.G., K. W. (1967). An ultrastructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling. doi:10.1182/BLOOD.V30.5.625.625
- Wijekoon. S., d. S. (2021). Current Evidence on Using Platelet Rich Plasma as a Therapeutic Modality for Veterinary Orthopedic Conditions.

- Woodell-May, J. M. (2011). Autologous protein solution inhibits MMP-13 production by IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ -stimulated human articular chondrocytes.
- Xiang, B. Z. (2021). Calcium Ion Chelation Preserves Platelet Function During Cold Storage. *Arteriosclerosis and Thrombosis Vascular Biology*.
- Xie, X. W. (2012). Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. *Biomaterials*. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.058
- Xie, X. Z. (2014). Biology of platelet-rich plasma and its clinical. *Arthritis Research and Therapy*. doi:10.1186/ar4493
- Xiong, J. M. (2016). Investigation of the Cell Surface Proteome of Human Periodontal Ligament Stem Cells.
- Xu, Q. L. (2017). Combination of platelet-rich plasma within periodontal ligament stem cell sheets enhances cell differentiation and matrix production.
- Yamanda, Y. U.-H. (2004). Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration.
- Yu, W. W. (2011). Platelet-rich plasma: a promising product for treatment of peripheral nerve regeneration after nerve injury. doi:10.3109/00207454.2010.544432
- Zhao H.W., S. K. (2021). In Vitro Characterization and Metabolomic Analysis of Cold-Stored Platelets. *Journal of Proteome*. doi:10.1021/acs.jproteome.0c00792
- Zhou, S. L. (2021). Injectable gelatin microspheres loaded with platelet rich plasma improve wound healing by regulating early inflammation.
- Zimmerman, R. A. (2003). Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sanguinis*. doi:https://doi.org/10.1111/j.0042-9007.2003.00361.x
- Zucker M.B., B. J. (1954). Reversible alterations in platelet morphology produced by anticoagulants and by cold. doi:10.1182/BLOOD.V9.6.602.602
- Zurita, M. O. (2010). Cell therapy for spinal cord repair: optimization of biologic scaffolds for survival and neural differentiation of human bone marrow stromal cells. *Cytotherapy*.