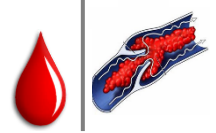




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΤΤΙΣΕΩΝ

## Διπλωματική Εργασία

«Δείκτες γήρανσης και απόπτωσης ασκών αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται σε ψυχρές θερμοκρασίες»

ΟΝΟΜΑ : ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΣΠΥΡΑΤΟΣ

Αριθμός Μητρώου: 20171033

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ : ΣΕΡΕΝΑ ΒΑΛΣΑΜΗ

## **Ευχαριστίες:**

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «**Θρόμβωση – Αιμορραγία – Ιατρική των Μεταγγίσεων**».

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθιές μου ευχαριστίες στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κυρία Μαριάννα Πολίτου, γιατί αρχικά ως Διευθύντρια με επέλεξε στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών δίνοντάς μου την δυνατότητα να εργαστώ στο συγκεκριμένο θέμα.

Στη συνέχεια, ευχαριστίες οφείλω στην επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας, Επίκουρη Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κυρία Σερένα Βαλσάμη, για την εμπιστοσύνη της, την επιστημονική της καθοδήγηση, την εποικοδομητική κριτική στην διόρθωση της εργασίας και την ηθική συμπαράσταση σε όλη την διάρκεια της εκπόνησής της.

Ειλικρινείς ευχαριστίες οφείλω στον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, κύριο Αναστάσιο Κριεμπάρδη, ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ στο Ερευνητικό Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία-HemQcR, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής καθώς και για τις εύστοχες παρατηρήσεις του και την πρόθυμη ανταπόκρισή του, όποτε ζητήθηκε. Η συμμετοχή του ήταν πολύ σημαντική, τόσο στην πορεία όσο και στην ολοκλήρωση της μελέτης αυτής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την διοίκηση και τους συναδέλφους μου στα εργαστήρια όπου εργάζομαι, Labogen Ανοσολογική ΑΕ, που με στήριξαν ηθικά και έμπρακτα καθ' όλη την διάρκεια φοίτησής μου στο συγκεκριμένο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών.

Με εκτίμηση

Γεράσιμος Σπυράτος

## Περίληψη

Η μετάγγιση αιμοπεταλίων αποτελεί μια σωτήρια θεραπευτική παρέμβαση που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της θρομβοπενίας ή της αιμορραγίας ενώ παράλληλα έχει καταστεί απαραίτητο θεραπευτικό μέσο στην σύγχρονη ιατρική. Η τρέχουσα συνήθης μέθοδος αποθήκευσης των αιμοπεταλίων είναι σε θερμοκρασία δωματίου (RT 20- 24° C) υπό συνεχή ανακίνηση. Αν και το κλινικό όφελος της μετάγγισης αιμοπεταλίων είναι αποδεδειγμένο, δεν παύει να εγκυμονεί ο κίνδυνος μετάδοσης βακτηριακής λοίμωξης καθώς η αποθήκευση στην θερμοκρασία δωματίου ευνοεί την βακτηριακή επιμόλυνση. Επιπροσθέτως το μικρό χρονικό όριο αποθήκευσης στην θερμοκρασία δωματίου (5 ημέρες) οδηγεί σε σπατάλη δια της απόρριψης των προϊόντων λόγω λήξης τους και κατά συνέπεια σε ενδεχόμενη έλλειψη διαθεσιμότητάς τους η οποία μάλιστα είναι χαρακτηριστική στην περίοδο που διανύουμε λόγω της πανδημίας COVID 19.

Λύση για τα παραπάνω ζητήματα θα μπορούσαν να δώσουν νέοι εναλλακτικοί τρόποι αποθήκευσης αιμοπεταλίων γεγονός που έχει οδηγήσει στην διεξαγωγή εκτεταμένων ερευνών. Μάλιστα διάφορες μελέτες έδειξαν ότι τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε ψυχρές θερμοκρασίες (1 -6° C) εμφανίζουν καλύτερη αιμοστατική ικανότητα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου ενώ παράλληλα υπάρχει η δυνατότητα επιμήκυνσης του χρόνου αποθήκευσης. Ωστόσο παρά τις πολλά υποσχόμενες δοκιμές σε ανθρώπους στη δεκαετία του 1970, η ψυχρή αποθήκευση αιμοπεταλίων εγκαταλείφθηκε λόγω του μικρότερου χρόνου επιβίωσης στην κυκλοφορία μετά τη μετάγγιση.

Η ψυχρή αποθήκευση των αιμοπεταλίων προκαλεί δομικές, μοριακές και μεταβολικές αλλαγές. Αυτές οι αλλαγές, που χαρακτηρίζονται και ως αποθηκευτικές βλάβες ψυχρών αιμοπεταλίων, επιδεικνύουν κάποια μορφή ενεργοποίησης αλλά μπορούν να σημάνουν και απόπτωση. Αν και τα ψυχρά αιμοπετάλια εμφανίζουν αυξημένους αποπτωτικούς δείκτες σε αρκετές έρευνες, ο ακριβής μηχανισμός απόπτωσης παραμένει ασαφής.

Η διερεύνηση διάφορων δεικτών απόπτωσης κατά την ψυχρή αποθήκευση έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών που είχαν ως στόχο τόσο την αξιολόγηση της ποιότητας και του μέγιστου χρόνου αποθήκευσης, όσο και την ανάδειξη των αντικτύπων που έχουν οι διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης μεταξύ τους. Οι δείκτες

γήρανσης και απόπτωσης των αποθηκευμένων ψυχρών αιμοπεταλίων σχετίζονται με την ταχεία κάθαρση τους από την κυκλοφορία και κατά συνέπεια η διερεύνηση τους θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων μέσων και μεθόδων αποθήκευσης αλλά και αναστολής της αποπτωτικής δραστηριότητας.

## **Abstract**

Platelet transfusion is a life-saving therapeutic intervention used to treat thrombocytopenia or hemorrhage, while it has become an essential therapeutic mean in modern medicine. The current standard platelet storage method is at room temperature (RT 20-24 ° C) under constant agitation. Although the clinical benefit of platelet transfusion has been demonstrated, the risk of transmitting bacterial infection is still high as storage at room temperature promotes bacterial contamination. In addition, the short storage time at room temperature (5 days) leads to waste by discarding the preparations due to their expiration and consequently to a possible lack of availability which is typical today due to the COVID-19 pandemic.

New alternative ways of storing platelets could provide a solution to the above issues, a fact that has led to the conduct of extensive research. In fact, various studies have shown that platelets stored at cold temperatures (1-6° C) show better hemostatic capacity compared to those stored at room temperature while at the same time there is the possibility of extending storage time. However, despite promising human trials in the 1970s, cold platelet storage was abandoned due to the shorter survival time in the circulation after transfusion.

Cold storage of platelets causes structural, molecular and metabolic changes. These changes, also known as cold platelet storage damage, show some form of activation but can also mean apoptosis. Although cold platelets show elevated apoptotic markers in several studies, the exact mechanism of apoptosis remains unclear. The investigation of various indicators of apoptosis during cold storage has been the subject of many studies that aimed to evaluate the quality and maximum storage time, as well as to reveal the effects of different storage temperatures. The indicators of aging and apoptosis of stored cold platelets are related to their rapid clearance from the circulation and therefore their investigation could lead to the development of new means and methods of storage and inhibition of apoptotic activity.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....1**

1.1 Το ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ .....1

1.2 ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....6

1.3 ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΑΙΜΑΤΟΣ.....9

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....19**

2.1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ –ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ .....19

2.2 ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΗΜΕΡΑ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ .....30

2.3 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ .....34

2.4 ΕΝΝΑΛΑΚΤΙΚΟΙ ΤΡΟΠΟΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ .....38

2.4.1 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΕ ΨΥΞΗ (COLD-PLTs). .....38

2.4.2 ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ (FROZEN PLTs).....40

2.4.3 ΚΥΚΛΙΚΗ ΘΕΡΜΑΝΣΗ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (TC).....49

2.4.4 ΑΝΑΣΥΣΤΑΜΕΝΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ.....49

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....50**

3.1 ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....50

3.1.1 ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ, ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ, ΟΔΟΣ. ....51

3.1.2 ΕΞΩΓΕΝΗΣ ΟΔΟΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ .....51

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 .....53**

4.1 ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ .....53

4.2 ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ .....55

4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ .....61

4.4 ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΒΛΑΒΕΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ .....70

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 .....75**

#### **ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΑΣΚΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΘΗΚΕΥΟΝΤΑΙ ΣΕ ΨΥΧΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ .....75**

5.1 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΨΥΧΡΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ .....77

5.2 ΚΑΘΑΡΣΗ ΨΥΧΡΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑ .....80

5.3 ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΜΕΤΡΗΘΕΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΤΟΥΣ 4° C .....81

5.4 ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΜΕΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΕ ΑΛΛΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ .....86

5.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ CSPs ΚΑΙ RTPs. ....	91
<b>ΣΥΝΟΨΗ.....</b>	<b>98</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>102</b>

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### 1.1 Το αίμα και τα κύτταρά του

Το αίμα είναι ένας ρευστός ιστός του ανθρώπινου σώματος, αποτελούμενο από έμμορφα συστατικά ενναιωρημένα σε πλάσμα. Κυκλοφορεί εν μέσω ενός σύνθετου και πολύπλοκου συστήματος που αποτελείται από αρτηρίες, φλέβες και τριχοειδή αγγεία. Το περιφερικό αίμα στο σύνολό του αποτελεί περίπου το 7% του συνολικού βάρους ενός μέσου ενήλικα ανθρώπου ή αλλιώς 5 -6 λίτρα. Κυκλοφορεί καλύπτοντας το σύνολο του δικτύου των αιμοφόρων αγγείων, η επιφάνεια των οποίων εκτιμάται σε εμβαδόν 8.000 τετραγωνικών μέτρων. Μέσω της κυκλοφορίας του έχει τον ρόλο μεταφοράς στα κύτταρα, οξυγόνου και άλλων θρεπτικών συστατικών, καθώς και απομάκρυνσης διοξειδίου του άνθρακα και άχρηστων στοιχείων που προκύπτουν από την μεταβολική λειτουργία των τελευταίων. Επίσης διανέμει ορμόνες και άλλες ρυθμιστικές ουσίες στα κύτταρα. Ως ρυθμιστής φροντίζει για την διατήρηση της ομοιόστασης των υγρών του σώματος, την ρύθμιση της θερμοκρασίας αλλά και του pH. Χημικοί παράγοντες και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος για την προστασία από παθογόνους παράγοντες, ξένες πρωτεΐνες και μετασχηματισμένα κύτταρα. Μέσω του μηχανισμού της πήξης παρέχεται προστασία του οργανισμού από πιθανή αιμορραγία. [1,2,3,4].

Το αίμα ως μίγμα αποτελείται από κυτταρικά στοιχεία που αποκαλούνται έμμορφα συστατικά σε ποσοστό επί του όγκου ολικού αίματος 45% και από πλάσμα σε ποσοστό 55% αντίστοιχα. [5,6]

#### *Πλάσμα:*

Είναι ένα υγρό συστατικό του αίματος μέσα στο οποίο βρίσκονται ενναιωρημένα τα έμμορφα συστατικά. Αποτελεί περίπου το 55% επί του συνολικού όγκου του αίματος. Είναι διάφανου ωχροκίτρινου χρώματος και αποτελείται στο μεγαλύτερο ποσοστό του από νερό (90 -92%) και από διάφορα οργανικά και ανόργανα συστατικά. Αυτά είναι διαλυμένες πρωτεΐνες (αλβουμίνη, σφαιρίνες, ινωδογόνο), παράγοντες πήξης, γλυκόζη, ηλεκτρολύτες ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ), διοξείδιο του άνθρακα, ορμόνες και οξυγόνο. Ο ρόλος του πλάσματος είναι μέσω της διατήρησης της ωσμωτικής πίεσης του συστήματος, η διασφάλιση της ισορροπίας των συγκεντρώσεων ηλεκτρολυτών και μεταφοράς τους στους ιστούς, καθώς και η άμυνα του οργανισμού μέσω των ανοσοσφαιρινών.[5,6]



Στα έμμορφα συστατικά του αίματος ανήκουν τα λευκά αιμοσφαίρια (WBC), τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC) και τα αιμοπετάλια.

*Λευκά αιμοσφαίρια (White blood cells – WBC):*

Τα λευκά αιμοσφαίρια, κοκκιοκύτταρα ή λευκοκύτταρα είναι εμπύρηνια κύτταρα μεγέθους μεγαλύτερου των ερυθρών. Κατασκευάζονται και ωριμάζουν στον μυελό τον οστών. Τα λευκοκύτταρα, ή λευκά αιμοσφαίρια, έχουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς παρέχουν άμυνα από μολυσματικές ασθένειες και ξένες για τον οργανισμό ουσίες. Συγκεκριμένα εμπλέκονται στην άμυνα του οργανισμού έναντι βακτηρίων, ιών, αλλεργικών αντιδράσεων και καρκινικών κυττάρων. Στο κανονικό περιφερικό αίμα υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα λευκοκύτταρα ταξινομούνται σε δύο κύριες ομάδες: α) μονοπύρηνια (λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα) και β) πολυμορφοπύρηνια κύτταρα (πολυμορφοπύρηνια-ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα κοκκιοκύτταρα). [7, 8, 9]

*Πολυμορφοπύρηνια (ουδετερόφιλα):* Αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα ενός υγιούς ενήλικα (40 – 75%). Τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνια υπό φυσιολογικές συνθήκες, φέρουν ένα πυρήνα, ο οποίος διαχωρίζεται σε 3-5 λοβούς. Φυσιολογικά τα ουδετερόφιλα κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα. Βακτηριακές μολύνσεις, περιβαλλοντικοί παράγοντες και είδη καρκίνου αποτελούν αιτία φλεγμονής, στην πρώτη φάση (οξεία) της οποίας, τα ουδετερόφιλα είναι η πρώτη απάντηση του οργανισμού και κινούνται προς το φλεγμένον σημείο. Με μια διαδικασία που ονομάζεται αιμόταξη, τα ουδετερόφιλα μεταναστεύουν μέσω των αιμοφόρων αγγείων και εν συνεχεία μέσω των διάμεσων ιστών, ακολουθώντας χημικά σήματα όπως είναι η ιντερλευκίνη-8 (IL-8), το C5a, fMLP, και η λευκοτριώνη B4. [10 -14] Αποτελούν τα κύρια κύτταρα στο πύον και είναι υπεύθυνα για την λευκόχροη/κιτρινόχροη του όψη. Τα ουδετερόφιλα φθάνουν στην περιοχή του τραυματισμού μέσα σε λίγα λεπτά και είναι τα χαρακτηριστικά κύτταρα της οξείας φλεγμονής. Η διάρκεια ζωής των μη ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων στην κυκλοφορία είναι 4-5 ημέρες.[15] Ύστερα από την ενεργοποίηση και μετανάστευσή τους στους ιστούς επιβιώνουν 1-2 ημέρες.[16]

*Ηωσινόφιλα:* Βρίσκονται σε ποσοστό 1 -6% επί του συνολικού αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων. Μετά την ωρίμανσή τους, τα ηωσινόφιλα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και αποκρινόμενα σε χημειοκίνες όπως η CCL11 (ηωταξίνη-1), η CCL24 (ηωταξίνη-2), η CCL5 (RANTES) αλλά και σε συγκεκριμένα λευκοτριένια όπως τα B4 (LTB4) και MCP1/4, μεταναστεύουν σε φλεγμονώδεις περιοχές στους ιστούς ή σε περιοχές που έχουν υποστεί παρασιτικές (ελμινθικές) λοιμώξεις.[17, 18]

Στις μολυσμένες αυτές περιοχές, τα ηωσινόφιλα ενεργοποιούνται από κυτταροκίνες Τύπου 2 και απελευθερώνονται από ένα συγκεκριμένο υποσύνολο των Τ-Βοηθητικών κυττάρων (Th2), τις IL-5, GM-CSF και IL-3, οι οποίες εκτός της αναγκαιότητας τους για την ενεργοποίηση των ηωσινόφιλων είναι απαραίτητες και για την ωρίμανσή τους. Ο ρόλος τους στην καταπολέμηση ιογενών λοιμώξεων είναι σημαντικός ενώ παράλληλα τα ηωσινόφιλα δρουν αποτελεσματικά έναντι των παρασίτων ενώ παράλληλα αποτελούν σημαντικούς μεσολαβητές των αλλεργικών αντιδράσεων.[19, 20] Ο χρόνος ζωής των ηωσινόφιλων είναι 8 -12 ώρες στην κυκλοφορία του αίματος και μετά την μετανάστευσή τους στους ιστούς μπορούν να επιβιώσουν για 8 – 12 ημέρες. [21, 22]

*Βασεόφιλα:* Είναι ένα είδος κοκκιοκυττάρων και βρίσκονται σε ποσοστό 0.5 – 1% επί του συνόλου των λευκών αιμοσφαιρίων. Τα βασεόφιλα απαντούν σε συγκεκριμένα είδη φλεγμονής, ειδικότερα δε σε αλλεργικές ή προερχόμενες από παράσιτα, αντιδράσεις. Περιέχουν ηπαρίνη και την αγγειοδιασταλτική ισταμίνη, ουσίες που εμποδίζουν τη γρήγορη πήξη του αίματος και προάγουν την ροή του στους ιστούς αντίστοιχα.[23] Μαζί με τα ηωσινόφιλα τα βασεόφιλα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις αλλεργικές και παρασιτικές αντιδράσεις.[24] Εκκρίνουν λιπιδικούς μεσολαβητές όπως λευκοτριένια (LTD-4) και αρκετές κυτοκίνες. Στα κοκκία των βασεόφιλων βρίσκονται αποθηκευμένες η ισταμίνη και οι πρωτεογλυκάνες. Αποτελούν σημαντική πηγή της ιντερλευκίνης-4 (IL-4,) μίας κυτοκίνης με σημαντικό ρόλο στις αλλεργικές αντιδράσεις και στην παραγωγή IgE αντισώματος (anti -IgE) από το ανοσοποιητικό σύστημα.[25]

*Λεμφοκύτταρα:* Είναι μονοπύρρηνα κύτταρα που ανήκουν στα λευκά αιμοσφαίρια και μετέχουν στο ανοσοποιητικό σύστημα. Βρίσκονται σε ποσοστό 18 – 42% επί του συνόλου των λευκοκυττάρων. Χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες : α) τα Τ –λεμφοκύτταρα (T-cells), β) τα Β-λεμφοκύτταρα (B-cells) και γ) τα κύτταρα φυσικούς φονείς (Natural Killer cells – NK cells). Τα Τ –λεμφοκύτταρα εμπλέκονται στην κυτταρική ανοσία ενώ τα Β- λεμφοκύτταρα έχουν ως κύριο ρόλο την χημική ανοσία σχετιζόμενη με τα αντισώματα. Τα Τ και Β-cells αναγνωρίζουν τα μη ειδικά αντιγόνα κατά την διάρκεια της ανοσολογικής διαδικασίας της αντιγονοπαρουσίασης. Έπειτα της αναγνώρισης του αντιγόνου τα Β-λεμφοκύτταρα παράγουν ποσότητες αντισωμάτων έναντι του ξενιστή. Τα Τ-λεμφοκύτταρα (Τ-βοηθητικά κύτταρα) παράγουν κυτοκίνες που καθοδηγούν την ανοσολογική απόκριση ενώ παράλληλα ένας άλλος τύπος Τ-cells (κυτταροτοξικά Τ- λεμφοκύτταρα) παράγουν τοξικά κοκκία στα οποία περιλαμβάνεται υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών που επάγουν την καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK-cells) έχουν την ικανότητα να μετέχουν στην άμυνα του οργανισμού

δρώντας έναντι μολυσμένων ή καρκινικών κυττάρων. Ενεργοποιούνται ως απάντηση στις ιντερφερόνες. Ο τρόπος λειτουργίας τους χαρακτηρίζεται από την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν και να θανατώνουν κύτταρα που δεν συμβαδίζουν με το MCH (Major histocompatibility complex - Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας).[26 – 28]

*Μονοπύρρηνα:* Βρίσκονται σε ποσοστό 2 – 10% έναντι του συνολικού αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων. Συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού και μεταναστεύουν ως απάντηση σε χημειοτακτικά ερεθίσματα. Μετά την μετανάστευσή τους στους ιστούς χαρακτηρίζονται ως μακροφάγα και ανήκουν στα φαγοκύτταρα. Διαφοροποιούνται σε δύο βασικές κατηγορίες α) τα μονοπύρρηνα – μακροφάγα, β) τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs, antigen presenting cells).[29, 30]

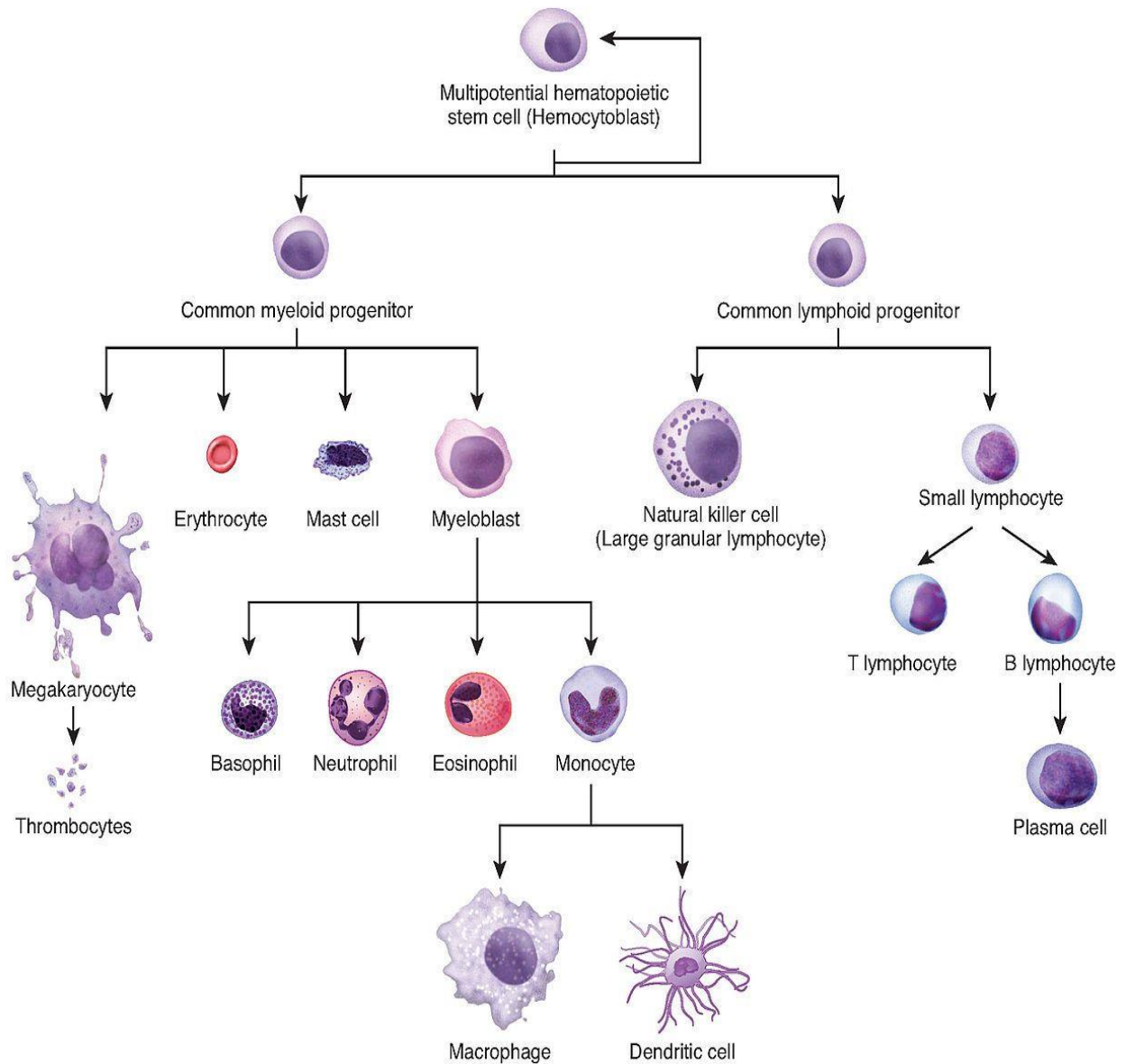
#### *Ερυθρά αιμοσφαίρια (ερυθροκύτταρα - RBC)*

Τα κύτταρα αυτά είναι τα πολυπληθέστερα κύτταρα του αίματος και δεν διαθέτουν πυρήνα. Παράγονται μέσω της διαδικασίας της ερυθροποίησης. Προέρχονται από τους ερυθροβλάστες του μυελού και αποτελούν το τελικό παράγωγό τους. Το ερυθροκύτταρο έχει σχήμα αμφίκοιλου δίσκου και μέσο μέγεθος περίπου 6-8  $\mu\text{m}$ . Ωστόσο το σχήμα αυτό συχνά παραμορφώνεται καθώς το ερυθροκύτταρο πρέπει να διασχίσει τριχοειδή αγγεία με μικρότερη από αυτό διάμετρο ενώ μετά με τη διακοπή των συμπιεστικών δυνάμεων μπορεί να επανέλθει στην αρχική του μορφή. Τα ερυθροκύτταρα φέρουν την αιμοσφαιρίνη (Hb) μέσω της οποίας γίνεται η μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς. Ο φυσιολογικός αριθμός ερυθρών στις γυναίκες είναι 4 – 5 εκατομμύρια ερυθροκύτταρα ανά  $\mu\text{l}$  αίματος και στους άνδρες 5 -6 εκατομμύρια RBC/ $\mu\text{l}$  αίματος. Η επιβίωση των ερυθροκυττάρων στο αίμα διαρκεί περίπου 120 ημέρες υπό φυσιολογικές συνθήκες. [ 9, 31, 32]

#### *Αιμοπετάλια (Θρομβοκύτταρα)*

Είναι μικρά, δισκοειδή και διάφανα απύρρηνα κύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα. Αποτελούν θραύσματα των μεγακαρυοκυττάρων και έχουν διάμετρο 2-3  $\mu\text{m}$ . [33 -35] Πιο συγκεκριμένα προκύπτουν από απόσπασση τμημάτων του κυτταροπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων. [36] Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο αριθμός τους στο αίμα είναι 150 – 400 χιλιάδες / $\text{mm}^3$ . Η μέση διάρκεια ζωής των αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία είναι σχετικά μικρή και διαμορφώνεται στις 5–9 ημέρες. Η διάρκεια ζωής ρυθμίζεται από έναν εσωτερικό μηχανισμό απόπτωσης. Τα γηρασμένα αιμοπετάλια καταστρέφονται με φαγοκυττάρωση στο ήπαρ και στον σπλήνα. Η παραγωγή των αιμοπεταλίων ρυθμίζεται από την θρομβοποιητίνη (THPO). Τα αιμοπετάλια είναι επιφορτισμένα με σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της πρωτογενούς αιμόστασης. Αν και διεθνώς είναι αποδεκτό ότι τα αιμοπετάλια προέρχονται από

μεγακαρυοκύτταρα, οι μηχανισμοί με τους οποίους σχηματίζονται και απελευθερώνονται από αυτά τα πρόδρομα κύτταρα παραμένουν αμφιλεγόμενοι.[37]



Εικόνα 1: Τύποι κυττάρων του αίματος, Πηγή: <https://gotalktogetherdotcom.wordpress.com/>

## 1.2 Μετάγγιση αίματος – Ιστορική αναδρομή

Η μετάγγιση αίματος ορίζεται ως η δυνατότητα παροχής ολικού αίματος και παραγών του με συγκεκριμένες διαδικασίες που διέπονται από κανόνες ασφαλείας. Αποτελεί μία ουσιαστική και σοβαρή θεραπευτική διαδικασία με σκοπό την θεραπεία και την βελτίωση της υγείας ασθενών υπό διαφόρων ενδείξεων. Είναι μία πρακτική που τοποθετείται αναφορικά από την αρχαιότητα ενώ υπάρχουν έγγραφες αναφορές από τον 13<sup>ο</sup> αιώνα[38].

Αρχαία τελετουργικά είχαν ως επίκεντρο το αίμα. Ρωμαίοι και Αιγύπτιοι ελάμβαναν λουτρά αίματος για φυσική και πνευματική αναζωογόνηση. Νικητές Ρωμαίοι μονομάχοι στην αρένα, έπιναν το αίμα του πεσόντα – ηττημένου αντιπάλου τους με σκοπό να λάβουν την ζωτικότητα του τελευταίου και να επουλωθούν. Στην βίβλο αναφέρεται χαρακτηριστικά, <<η ζωή της σάρκας βρίσκεται στο αίμα>> (LeviticusXVII1:1) απαγορεύοντας στους πιστούς γι' αυτό τον λόγο να το καταναλώνουν. Στον Μεσαίωνα το αίμα εμφανίζεται ως τονωτικό σε ασθενείς που το καταναλώνουν με σκοπό την βελτίωση της υγείας τους[39].

Ιστορικά αναφέρεται πως το 1492 ο Πάπας (Pope Innocent VIII), λόγω της προχωρημένης ηλικίας και της κακής κατάστασης της υγείας του συμμετείχε σε ένα πείραμα το οποίο αποσκοπούσε σε βελτίωση της επιβαρυνμένης κατάστασής του. Για τον λόγο αυτό σύμφωνα με τις αναφορές έλαβε αίμα προερχόμενο από τρία νεαρά και υγιή άτομα. Το πείραμα απέτυχε καθώς η κατάσταση της υγείας του Πάπα δεν βελτιώθηκε, τα τρία νεαρά άτομα απεβίωσαν ενώ η κατάληξη του θεραπευτή του δεν έγινε γνωστή[39].

Ο William Harvey το 1628 (*Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis*) είναι ο πρώτος που περιγράφει την συστηματική κυκλοφορία του αίματος και τις ιδιότητές του, αν και είχαν προηγηθεί αναφορές και από άλλους συγγραφείς (Realdo Colombo, Michael Servetus, και Jacques Dubois)[40,41].

Η σημαντική ανακάλυψη του Harvey προετοιμάζει το κατάλληλο περιβάλλον για την θεωρία μετάγγισης αίματος από άνθρωπο σε άνθρωπο ενώ μέσα στον ίδιο αιώνα λαμβάνουν χώρα σημαντικές, πρωτότυπες και ενδιαφέρουσες ανακαλύψεις σχετιζόμενες με την μετάγγιση.

Πρώτη γραπτή αναφορά για την διεξαγωγή πειράματος μετάγγισης αίματος μεταξύ ζώων (σκύλων) γίνεται το 1666 στην Οξφόρδη από τον Richard Lower. Ακολουθεί το 1667 ο Jean Denis (Paris) που δοκίμασε την μετάγγιση αίματος από ζώα σε άνθρωπο (Keynes, 1967) [42,43]. Ενώ η μετάγγιση αίματος με αυτόν τον τρόπο εγκαταλείφθηκε άλλες σπουδαίες

ανακαλύψεις βοήθησαν στην σταδιακή και βαθμιαία κατανόηση και εξέλιξη της τεχνικής μετάγγισης αίματος.

Η πραγματοποίηση της πρώτης μετάγγισης από άνθρωπο σε άνθρωπο έγινε από τον James Blundell στο Λονδίνο το 1818. Η σημαντική ανακάλυψη του συστήματος ABO από τον Karl Landsteiner το 1901 αποτέλεσε την αρχή μόνο των ερευνών που θα ακολουθούσαν στο ίδιο πεδίο όπως από τους Alfred Decastello και Adriano Struli (1902), Richard Weil (1907), Jan Jansky (1907), Ludvig Hektoen , Reuben Ottenberg (1913) [38,39,42,43].

Η ανακάλυψη του συστήματος Rh από τους Landsteiner και Wiener (1940), καθώς και άλλες σημαντικές ανακαλύψεις που αναφέρονται περιγραμματακά [εικόνα 2], υπήρξαν σταθμός στην ιστορία των μεταγγίσεων και με την σειρά τους αποτέλεσαν αρχή για νέες διερευνήσεις.

1666	Richard Lower (Oxford) conducts experiments involving transfusion of blood from one animal to another
1667	Jean Denis (Paris) transfuses blood from animals to humans
1818	James Blundell (London) is credited with being the first person to transfuse blood from one human to another
1901	Karl Landsteiner (Vienna) discovers ABO blood groups. Awarded Nobel Prize for Medicine in 1930
1908	Alexis Carrel (New York) develops a surgical technique for transfusion, involving anastomosis of vein in the recipient with artery in the donor. Awarded Nobel Prize for Medicine in 1912
1915	Richard Lewinsohn (New York) develops 0.2% sodium citrate as anticoagulant
1921	The first blood donor service in the world was established in London by Percy Oliver
1937	Blood bank established in a Chicago hospital by Bernard Fantus
1940	Landsteiner and Wiener (New York) identify Rhesus antigens in man
1940	Edwin Cohn (Boston) develops a method for fractionation of plasma proteins. The following year, albumin produced by this method was used for the first time to treat victims of the Japanese attack on Pearl Harbour
1945	Antiglobulin test devised by Coombs (Cambridge), which also facilitated identification of several other antigenic systems such as Kell (Coombs et al, 1946), Duffy (Cutbush et al, 1950) and Kidd (Cutbush et al, 1950)
1948	National Blood Transfusion Service (NBTS) established in the UK
1951	Edwin Cohn (Boston) and colleagues develop the first blood cell separator
1964	Judith Pool (Palo Alto, California) develops cryoprecipitate for the treatment of haemophilia
1966	Cyril Clarke (Liverpool) reports the use of anti-Rh antibody to prevent haemolytic disease of the newborn

*Εικόνα 2: Ανακαλύψεις σταθμός στην ιστορία των μεταγγίσεων, Πηγή: Paul L. F. Giangrande, The history of blood transfusion, 10.1046/j.1365-2141.2000.02139.x*

Ωστόσο ένα σημαντικό βήμα που ουσιαστικά έθεσε τις βάσεις για την βέλτιστη χρήση του αίματος , όπως αυτή γίνεται σήμερα, ήταν η ανακάλυψη διάταξης διαχωριστή κυττάρων. Το 1951 ο Edwin Cohn ανέπτυξε μία τέτοιου είδους διάταξη η οποία είχε την ικανότητα να διαχωρίζει το ολικό αίμα σε συστατικά δηλαδή σε λευκά αιμοσφαίρια (WBC), ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC) και αιμοπετάλια (PLTs). Η χρήση και αποτελεσματικότητα στην πράξη αυτού του διαχωριστή κυττάρων, βελτιστοποιήθηκε ύστερα με την ανάπτυξη ειδικών ασκών, όπου θα αποθηκεύονταν τα επιμέρους προϊόντα [38].

Οι έρευνες πλέον και τα αποτελέσματα αυτών έρχονταν με καταϊγιστικό ρυθμό και δημιούργησαν σταδιακά και με το πέρασμα των χρόνων τις αρχές επί της μετάγγισης αίματος και παραγώγων του, όπως σήμερα πραγματοποιούνται. Σήμερα οι τράπεζες αίματος διαθέτουν τον εξοπλισμό και την τεχνογνωσία ώστε να είναι σε θέση να διαχωρίσουν τα επιμέρους συστατικά από μονάδες ολικού αίματος ( ερυθρά αιμοσφαίρια, πλάσμα και αιμοπετάλια ) και να τα χορηγήσουν ανάλογα με τις ανάγκες των ασθενών. Έτσι επιτυγχάνεται η βέλτιστη δυνατή χρήση του αίματος.

Η συλλογή του αίματος από δότες μπορεί να πραγματοποιηθεί στα κέντρα μετάγγισης αίματος ή στις τράπεζες αίματος στα νοσοκομεία. Συλλέγεται επίσης συχνά από δότες, κατά τη διάρκεια κινητών συνεδριών συλλογής αίματος. Το αίμα στη συνέχεια μεταφέρεται σε εργαστήρια για έλεγχο και επεξεργασία. Ακολουθεί αποθήκευση και διανομή ανάλογα με τις ανάγκες. Το αίμα συλλέγεται σε θερμοκρασία σώματος, δηλ. στους  $+37^{\circ}\text{C}$ . Προκειμένου να διατηρηθούν οι ζωτικές του ιδιότητες, πρέπει να ψυχθεί κάτω από  $+10^{\circ}\text{C}$  για μεταφορά και να αποθηκευτεί σε θερμοκρασίες ψύξης περίπου  $+4^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη χρήση. Εάν το αίμα αποθηκεύεται ή μεταφέρεται εκτός αυτών των θερμοκρασιών για μεγάλο χρονικό διάστημα, χάνει την ικανότητά του να μεταφέρει οξυγόνο ή διοξείδιο του άνθρακα προς και από τους ιστούς αντίστοιχα. Άλλοι παράγοντες που προκαλούν σοβαρή ανησυχία είναι ο κίνδυνος βακτηριακής μόλυνσης εάν το αίμα εκτίθεται σε θερμές θερμοκρασίες. Αντίθετα, το αίμα που εκτίθεται σε θερμοκρασίες κάτω από  $4^{\circ}\text{C}$  μπορεί να υποστεί βλάβη και η μετάγγισή του μπορεί να αποβεί θανατηφόρα [44,45].

Το ολικό αίμα και τα ερυθρά κύτταρα πρέπει πάντα να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία μεταξύ  $+2^{\circ}\text{C}$  και  $+6^{\circ}\text{C}$ . Οι κύριοι λόγοι για τη μετάγγιση αίματος είναι η αποκατάσταση ή η διατήρηση της ικανότητας μεταφοράς οξυγόνου του σώματος στον οργανισμό. Εάν το αίμα δεν αποθηκεύεται μεταξύ  $+2^{\circ}\text{C}$  και  $+6^{\circ}\text{C}$ , η ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου μειώνεται σημαντικά. Εάν το αίμα αποθηκεύεται πάνω από τους  $+6^{\circ}\text{C}$ , βακτήρια που ενδέχεται να έχουν εισέλθει κατά λάθος στη μονάδα κατά τη συλλογή

μπορεί να αναπτυχθούν σε τέτοιο βαθμό που η μετάγγιση του μολυσμένου αίματος θα μπορούσε να είναι θανατηφόρα. Το χαμηλότερο όριο των +2 ° C είναι επίσης πολύ σημαντικό. Αυτό συμβαίνει επειδή τα ερυθρά κύτταρα είναι πολύ ευαίσθητα στην κατάψυξη. Εάν αφεθούν να παγώσουν, οι μεμβράνες των ερυθρών αιμοσφαιρίων σπάζουν και η αιμοσφαιρίνη απελευθερώνεται ενώ τα κύτταρα αιμολύονται. Η μετάγγιση αιμολυμένου αίματος μπορεί να είναι θανατηφόρα [46].

Η κλινική διαδικασία της μετάγγισης πρέπει να εναρμονίζεται πλήρως με τον κανόνα, <<μετάγγιση του σωστού συστατικού αίματος στον σωστό ασθενή, τη σωστή στιγμή, στη σωστή κατάσταση και σύμφωνα πάντα με τις κατάλληλες οδηγίες>>[47-EDQM 19th Edition 2017 p.231]. Πρόκειται για αλληλοσυνδεόμενα γεγονότα που ξεκινούν με την σωστή απόφαση για μετάγγιση, γίνεται η επιλογή του ορθού συστατικού βάσει αναγκών και εν κατακλείδι αξιολογείται το κλινικό αποτέλεσμα.

### 1.3 Παράγωγα αίματος

Πλέον το ολικό αίμα χρησιμοποιείται σπάνια ως προϊόν μετάγγισης. Η χρήση συγκεκριμένων συστατικών του αίματος είναι συνηθέστερη και κλινικά λογική. Αυτό συμβαίνει καθώς περισσότεροι ασθενείς χρειάζονται ένα συγκεκριμένο συστατικό αίματος όπως τα ερυθρά αιμοσφαίρια ή τα αιμοπετάλια ενώ παράλληλα οι δόσεις των τελευταίων μπορούν να βελτιστοποιηθούν ανάλογα με τις ανάγκες του ασθενούς. Κάθε συστατικό μπορεί να αποθηκεύεται ξεχωριστά στις βέλτιστες συνθήκες συντήρησής του ενώ με αυτόν τον τρόπο μία μονάδα ολικού αίματος αξιοποιείται στο μέγιστο βαθμό. [48, 49]

Μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες που πραγματοποιούνται έπειτα από την συλλογή του ολικού αίματος από τους δότες είναι ο διαχωρισμός στα συστατικά του. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη καθώς:

α) η μέγιστη λειτουργικότητα κάθε συστατικού του αίματος εξασφαλίζεται και είναι εξαρτώμενη από το πρωτόκολλο επεξεργασίας και από τις κατάλληλες για αυτό συνθήκες συντήρησης. (π.χ. έστω ό,τι μία μονάδα ολικού αίματος συλλέγεται και αποθηκεύεται στους 2-6 ° C. Έπειτα από 24 ώρες παραμένουν κάποια λειτουργικά αιμοπετάλια και οι παράγοντες πήξης που υπάρχουν είναι πλέον ασταθείς. Αντίθετα με την μέθοδο διαχωρισμού θα μπορούσε να σχηματιστεί παράγωγο αιμοπεταλίων το οποίο θα μπορούσε να αποθηκευτεί στους 20-24 ° C για έως πέντε ημέρες και παράλληλα παράγωγο FFP στους -20 ° C με δυνατότητα αποθήκευσης έως ένα έτος.)



β) στα πλαίσια μίας εξατομικευμένης θεραπείας, συγκεκριμένα συστατικά του αίματος μπορούν να χορηγηθούν στον ασθενή, εφόσον πραγματοποιείται ο διαχωρισμός του ολικού αίματος σε επιμέρους παράγωγα.

γ) δυνατότητα αποφυγής ανεπιθύμητων ενεργειών λόγω υπερμετάγγισης με μονάδα ολικού αίματος σε συγκεκριμένη ομάδα ασθενών σε αντίθεση με την χρήση κάποιου παραγώγου. Ο ασθενής δεν επιβαρύνεται από την χρήση πλεοναζόντων συστατικών ή περιττού όγκου αίματος.

δ) διάφορα παράγωγα που προκύπτουν από τον διαχωρισμό μπορούν να χορηγηθούν συμπληρωματικά στο αίμα ασθενούς.

στ) από μία μονάδα ολικού αίματος που προκύπτει από έναν μοναδικό δότη μπορούν να παρασκευαστούν επιπλέον παράγωγα.

Ως προϊόν αίματος (*blood product*) χαρακτηρίζεται οποιοδήποτε παράγωγο αίματος παρασκευάζεται σε τράπεζες αίματος από έναν δότη (ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, FFP, κρυοίζημα), ή οποιοδήποτε παράγωγο πλάσματος παράγεται από δεξαμενές πλάσματος (*pooled plasma donations*) σε ειδικά κέντρα κλασμάτωσης πλάσματος (αλβουμίνη, παράγοντες πήξης, και ανοσοσφαιρίνες) [48,50].

Το αίμα και τα παράγωγά του χωρίζονται σε δύο κατηγορίες [51]:

*Ασταθή Προϊόντα (Labile) Αίματος* (γνωστά και ως προϊόντα κυτταρικής προέλευσης):

1. Ολικό αίμα – Whole Blood (WB).
2. Συμπυκνωμένα Ερυθρά Αιμοσφαίρια (ΣΕ) – packed Red Blood Cells (pRBCs).
3. Συμπυκνωμένα αιμοπετάλια.
4. Πρόσφατα κατεψυγμένο πλάσμα – Fresh Frozen Plasma (FFP).
5. Κατεψυγμένο Πλάσμα - Frozen Plasma (FP).
6. Νωπό πλάσμα.
7. Προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα.

*Σταθερά (medicinal) προϊόντα – παράγωγα αίματος, αποτέλεσμα βιομηχανικής επεξεργασίας*

1. Αλβουμίνη.
2. Συμπυκνωμένοι παράγοντες πήξεως και αντιπρωτεάσες.

3. Ενδοφλέβιες Ανοσοσφαιρίνες.
4. Προθρομβινικό σύμπλεγμα.
5. Συμπύκνωμα αντιθρομβίνης III.
6. Συμπύκνωμα ινωδογόνου.

### 1.3.1 Ολικό αίμα

Το ολικό αίμα, από την ιστορία των μεταγγίσεων χρησιμοποιήθηκε ως παράγοντας διάσωσης ειδικά κατά τη διάρκεια πολέμων, μαζικών ατυχημάτων και ατυχημάτων με σοβαρά τραύματα. Ωστόσο, λόγω της βελτίωσης των τραπεζών αίματος, της θεραπείας με συστατικά - παράγωγα και των νέων στρατηγικών για μετάγγιση, η χρήση του ολικού αίματος στην μετάγγιση έχει μειωθεί. Το ολικό αίμα συλλέγεται απευθείας από τους υγιείς δότες σε ασκό με αντιπηκτικό διάλυμα CPDA-1 (κιτρική φωσφορική δεξτρόζη της αδενίνης). Διατηρείται στους +2-6 °C για διάστημα 35 έως 42 ημέρες ανάλογα με το αντιπηκτικό που περιέχεται στον ασκό συλλογής [Citrate-Phosphate- Dextrose-Adenine (CPDA-1) 35 ημέρες, και Additive-Solution (AS) 42 ημέρες]. Εναλλακτικά το ολικό αίμα μπορεί να συντηρηθεί για διάστημα έως και 24 ωρών σε χώρο με θερμοκρασία +20 °C έως +24 °C, συνθήκη απαραίτητη για παρασκευή αιμοπεταλίων.

Λόγω των συνθηκών θερμοκρασίας στους +2-6 °C και του χρόνου συντήρησης το ολικό αίμα δεν έχει μεγάλο αριθμό λειτουργικών αιμοπεταλίων και δεν παρέχονται οι ασταθείς παράγοντες πήξης V και VIII μετά την αποθήκευσή του. Ο κύριος σκοπός συλλογής ολικού αίματος είναι προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως αρχικό υλικό για την παρασκευή άλλων παραγώγων. Ο όγκος ενός ασκού ολικού αίματος προβλέπεται να είναι 420-500ml δίχως το αντιπηκτικό διάλυμα, με τιμή Hct 36 – 40%, η ελάχιστη συγκέντρωση της Hb να είναι περίπου 45gr/μονάδα, ενώ στο τέλος της αποθήκευσης της μονάδας η αιμόλυση να μην ξεπερνάει το 0,8% του συνολικού αριθμού ερυθροκυττάρων.[47,52] Αν και στις μέρες μας λόγω της θεραπείας με παράγωγα, η χρήση ολικού αίματος έχει μειωθεί, παραμένει μία εναλλακτική λύση για ασθενείς με τραύματα και αθρόα αιμορραγία που απαιτούν μαζική ανάνηψη [53,54]. Ορισμένες μελέτες ενθαρρύνουν τη χρήση φρέσκου ολικού αίματος σε περίπτωση πολέμων και μαζικών ατυχημάτων, αναλύοντας την αναλογία κινδύνου προς όφελος για μετάγγιση ολικού αίματος [55]. Σήμερα οι ενδείξεις του περιορίζονται μόνο σε αφαιμαξομεταγγίσεις νεογνών και στην παιδιατρική καρδιοχειρουργική.[52]

### 1.3.2 Συμπυκνωμένα Ερυθρά Αιμοσφαίρια (ΣΕ):

Τα συμπυκνωμένα ερυθρά (ΣΕ) προέρχονται από το ολικό αίμα ύστερα από φυγοκέντρηση και διαχωρισμό. Παράγονται επίσης με τη διαδικασία της αφαίρεσης ερυθροκυττάρων. Αποτελούν το βασικό παράγωγο του αίματος που μεταγγίζεται στις περιπτώσεις περιστατικών αναιμίας με στόχο την αποφυγή της ιστικής υποξίας δηλαδή την αποκατάσταση σωστής μεταφοράς οξυγόνου στους ιστούς. Διακρίνονται σε πλυμένα, λευκαφαιρεμένα και ακτινοβολημένα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Μια μονάδα ΣΕ περιέχει τα ερυθροκύτταρα της αρχικής μονάδας ολικού αίματος από την οποία έγινε ο διαχωρισμός, αιματοκρίτη 65 έως 75% και όγκο 250 έως 330 ml, ανάλογα με το προσθετικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε. Διατηρούνται στους 2-6 °C για διάστημα 35 έως 42 ημέρες ανάλογα με το αντιπηκτικό που περιέχεται στον ασκό συλλογής (CPDA1 ή AS αντίστοιχα). Ειδικότερα βάσει του συντηρητικού:

CPD (citrate, phosphate, dextrose) - 21 ημέρες

CPDA1 (προσθήκη αδενίνης) – 35 ημέρες

SAGM (προσθήκη μανιτόλης) – 42 ημέρες

Υπό αυτές τις συνθήκες συντήρησης, τα ερυθροκύτταρα παραμένουν τόσο σταθερά ώστε να παρατηρείται αιμόλυση μικρότερη του 0.8% των συνολικών ερυθροκυττάρων, ποσοστό το οποίο θεωρείται αποδεκτό. Μία μονάδα ΣΕ θα αυξήσει την τιμή της Hb ενός μέσου ενήλικα κατά 1g/Dl και την τιμή του Hct κατά 3% αντίστοιχα.[44, 47, 49, 52, 56]

#### Συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα σε διάλυμα με πρόσθετες ουσίες (Additive Solution – AS)

Τα ΣΕ με πρόσθετο διάλυμα (Additive Solution - AS) είναι ένα παράγωγο ερυθροκυττάρων που παρασκευάζεται με την απομάκρυνση του πλάσματος από το ολικό αίμα και με την προσθήκη ύστερα, του κατάλληλου πρόσθετου θρεπτικού διαλύματος. Τα συμβατικά πρόσθετα θρεπτικά διαλύματα περιέχουν χλωριούχο νάτριο, αδενίνη, γλυκόζη και μανιτόλη διαλυμένα σε νερό (SAGM). Άλλα ποιο σύγχρονα διαλύματα περιέχουν κιτρικά ιόντα, φωσφορικά ιόντα, μανιτόλη και γουανοσίνη.[57,58] Τα ΣΕ (AS) έχουν ελάχιστη περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης 45 g. Ο αιματοκρίτης είναι 50-70%. Επίσης, περιέχουν το μεγαλύτερο μέρος των λευκοκυττάρων (περίπου 2,5 έως 3,0 X 10<sup>9</sup> κύτταρα) της αρχικής μονάδας και αριθμό αιμοπεταλίων που κυμαίνεται , ανάλογα με τη μέθοδο φυγοκέντρησης. Η παρασκευή τους πραγματοποιείται από αρχική μονάδα ολικού αίματος που έχει συλλεχθεί

σε ασκό με CPD αντιπηκτικό διάλυμα. Μετά από τη φυγοκέντρωση του ολικού αίματος, το πλάσμα απομακρύνεται και το πρόσθετο διάλυμα προστίθεται αμέσως στα ερυθρά κύτταρα με προσεκτική ανάμιξη. Τα ΣΕ (AS) πρέπει να συντηρούνται σε ελεγχόμενη θερμοκρασία μεταξύ + 2 και + 6 ° C κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Ανάλογα με το αντιπηκτικό/πρόσθετο διάλυμα που χρησιμοποιείται, ο χρόνος αποθήκευσης μπορεί να παραταθεί.[47]

### Πλυμένα ερυθροκύτταρα

Είναι παράγωγο των συμπυκνωμένων ερυθρών μετά από πλύσιμο τους με ισότονο διάλυμα NaCl και είναι σχεδόν απαλλαγμένο από πλάσμα (98% απομάκρυνση πλάσματος), λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται οι πρωτεΐνες και κυττοκίνες του πλάσματος και τα αντισώματα (anti – IgA και έναντι απτοσφαιρίνης) που μπορούν να πυροδοτήσουν αντιδράσεις μετά την μετάγγιση. Η διαδικασία γίνεται χειροκίνητα είτε αυτοματοποιημένα σε ελεγχόμενη θερμοκρασία. Μία μονάδα πλυμένων ερυθρών έχει όγκο που ποικίλλει ανάλογα με το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε και Hct 50 -70%. Τα πλυμένα ερυθρά συντηρούνται μετά την πλύση για 24 ώρες σε θερμοκρασία 1-6 °C. Ένδειξη χορήγησης του συγκεκριμένου παρασκευάσματος είναι η αποφυγή αλλεργικών αντιδράσεων μετά την μετάγγιση οι οποίες δεν ανταποκρίνονται σε θεραπεία.[47, 49, 59, 60]

### Λευκαφαιρεμένα συμπυκνωμένα ερυθρά:

Παράγονται από συμπυκνωμένα ερυθρά αφαιρώντας την πλειονότητα των λευκών αιμοσφαιρίων. Ως λευκαφαιρεμένα ορίζονται τα παρασκευάσματα ερυθρών που έχουν αριθμό λευκοκυττάρων  $<1 \times 10^6$  κύτταρα. Η ελάχιστη ποσότητα της Hb σε μία πρότυπη μονάδα λευκαφαιρεμένων ερυθρών πρέπει να είναι 40g ενώ η τιμή του Hct 65 – 75%. Τα εναπομείναντα λευκά αιμοσφαίρια στις μονάδες των ΣΕ, ενοχοποιούνται για διάφορες άμεσες αλλά και απώτερες αντιδράσεις. Τέτοιες είναι η μεταφορά διάφορων ενδοκυττάρων παραγόντων – ιών (όπως CMV –κυτταρομεγαλιός, EBV – Epstein Barr virus, HTLV I/II - , νόσος Creutzfeld-Jacob), οι πυρετικές μη αιμολυτικές αντιδράσεις, καθώς και η αλλοανοσοποίηση στα HLA αντιγόνα. Για τη μείωση των λευκοκυττάρων σε μονάδα συμπυκνωμένων ερυθρών χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές επεξεργασίας και διαχωρισμού:

α)αφαίρεση της στιβάδας λευκών (Buffy Coat Removed)

β)διήθηση ερυθρών με φίλτρο

γ)πλύσιμο ερυθρών (washed red cells)

δ) κατάψυξη και απογλυκερινοποίηση ερυθρών.

Τα παράγωγα λευκαφαιρεμένων συμπυκνωμένων ερυθρών συντηρούνται σε ελεγχόμενη θερμοκρασία 2-6 °C. Ο χρόνος συντήρησής τους μπορεί να παραταθεί ανάλογα με το συντηρητικό διάλυμα που χρησιμοποιείται. Είναι κατάλληλα για πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς. [47]

#### **Λευκαφαιρεμένα συμπυκνωμένα ερυθρά με προσθετικό διάλυμα (ΣΕ LD AS)**

Είναι παράγωγο το οποίο μπορεί να παρασκευαστεί από,

1) μονάδα ολικού αίματος, με τεχνική διήθησης λευκοκυττάρων, επακόλουθη φυγοκέντρηση, απομάκρυνση του πλάσματος και άμεση προσθήκη του πρόσθετου διαλύματος με προσεκτική ανάμιξη.

2) μονάδα ΣΕ (AS) ή ΣΕ (BCR – AS), με διήθηση των λευκοκυττάρων.

Η διαδικασία της λευκαφαίρεσης πρέπει να γίνει έως και 48 ώρες μετά την λήψη αίματος. Στο τέλος της επεξεργασίας κάθε παράγωγο ΣΕ (LD-AS) πρέπει να έχει τουλάχιστον 40g Hb, αριθμό λευκοκυττάρων  $<1 \times 10^6$  κύτταρα και Hct 50 – 70%. Οι συνθήκες συντήρησης είναι οι ίδιες με λευκαφαιρεμένα συμπυκνωμένα ερυθρά. [47]

#### **Ερυθροκύτταρα μετά από αφαίρεση στιβάδας λευκοκυττάρων (BCR - Buffy coat removed)**

Πρόκειται για παράγωγο ερυθρών κυττάρων, όπου έχει αφαιρεθεί η στιβάδα λευκοκυττάρων ύστερα από φυγοκέντρηση ολικού αίματος. Δημιουργείται με την απομάκρυνση ενός μεγάλου μέρους του πλάσματος και της στιβάδας των λευκοκυττάρων (20 – 60ml) από τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Κατά την διαδικασία αφαίρεσης του buffy coat υπάρχει μία απώλεια ερυθροκυττάρων όγκου 10 -30 ml. Στην συνέχεια προστίθεται ο ανάλογος όγκος πλάσματος ώστε ο Hct να διαμορφωθεί σε 65 – 75%. Τα ΣΕ (BCR) περιέχουν 43g αιμοσφαιρίνης κατ' ελάχιστον, συνήθως λιγότερα από  $1,2 \times 10^9$  λευκοκύτταρα και αριθμό αιμοπεταλίων που ποικίλει ανάλογα με τη μέθοδο της φυγοκέντρησης. Τα ΣΕ (BCR) συντηρούνται σε ελεγχόμενη θερμοκρασία μεταξύ +2 °C και +6 °C. Ο χρόνος αποθήκευσης εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο αντιπηκτικό – συντηρητικό (πχ 35 ημέρες σε CPDA-1). [47]

#### **Συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα, χωρίς την στιβάδα λευκών (Buffy coat), σε προσθετικό διάλυμα. ΣΕ (BCR AS)**

Το συγκεκριμένο παράγωγο παρασκευάζεται επίσης με την αφαίρεση ενός μεγάλου μέρους του πλάσματος και της στιβάδας λευκών από μονάδα

ολικού αίματος, με επακόλουθη προσθήκη κατάλληλου θρεπτικού διαλύματος. Τα ΣΕ (BCR-AS) πρέπει να έχουν τουλάχιστον 43g αιμοσφαιρίνης. Ο αιματοκρίτης να είναι 50 έως 70% και να περιέχουν λιγότερα από  $1,2 \times 10^9$  λευκοκύτταρα ενώ και εδώ ο αριθμός των αιμοπεταλίων ποικίλλει, ανάλογα με τη μέθοδο φυγοκέντρωσης. Για το συγκεκριμένο παρασκεύασμα, το μεγαλύτερο μέρος του πλάσματος και 20 έως 60 mL της στιβάδας λευκών αφαιρείται, με αποτέλεσμα την απώλεια 10 έως 30 mL των ερυθρών κυττάρων από το ολικό αίμα. Το προσθετικό διάλυμα (AS) προστίθεται αμέσως στα ερυθρά κύτταρα και ακολουθεί προσεκτική ανάμιξη. Η θερμοκρασία συντήρησης είναι ίδια με τα ΣΕ (BCR) ενώ ο χρόνος αποθήκευσης διαμορφώνεται και εδώ από το αντιπηκτικό – πρόσθετο διάλυμα.[47]

### **Ερυθροκύτταρα αφαίρεσης**

Τα ερυθροκύτταρα αφαίρεσης (Red Cells, Apheresis- Aph) είναι ένα παράγωγο ερυθρών αιμοσφαιρίων που προκύπτει από έναν δότη. Λαμβάνεται από τον τελευταίο χρησιμοποιώντας αυτοματοποιημένο εξοπλισμό διαχωρισμού κυττάρων. Τα ερυθροκύτταρα (Aph) περιέχουν περιεκτικότητα σε αιμοσφαιρίνη 40 g κατ' ελάχιστο. Ο αιματοκρίτης είναι 65 έως 75% και διαφοροποιείται σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί κάποιο προσθετικό διάλυμα ( Hct 50 – 70%). Ο αριθμός των λευκοκυττάρων μπορεί να ποικίλει και εξαρτάται και από την πιθανή επόμενη επεξεργασία των ερυθροκυττάρων (λευκαφαίρεση). Τα ερυθροκύτταρα από αφαίρεση μπορούν να χορηγηθούν είτε αυτούσια είτε ύστερα από επεξεργασία όπως τα ΣΕ (λευκαφαίρεση ή προσθήκη πρόσθετου θρεπτικού διαλύματος). Πρέπει να συντηρούνται σε ελεγχόμενη θερμοκρασία μεταξύ + 2 και + 6 ° C. Ανάλογα με το αντιπηκτικό / πρόσθετο, ο χρόνος αποθήκευσης δύναται να παραταθεί. Τα ερυθρά κύτταρα αφαίρεσης που πρόκειται να αποθηκευτούν θα πρέπει να έχουν διαχωριστεί σε αυτοματοποιημένο κλειστό σύστημα. Διαφορετικά σε περίπτωση που η αφαίρεση γίνει σε ανοιχτό σύστημα , ο μέγιστος χρόνος αποθήκευσης περιορίζεται σε 24 ώρες στην ίδια θερμοκρασία.[47]

### **Ακτινοβολημένα ερυθρά**

Η ακτινοβολήση (25-50 Gy) αδρανοποιεί τα λεμφοκύτταρα του δότη, τα οποία ενδέχεται να προκαλέσουν αντίδραση μοσχεύματος εναντίον ξενιστή μετά μετάγγιση (TA-GvHD) σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Το παράγωγο των ερυθρών πρέπει να ακτινοβοληθεί με Gamma ή X-ακτινοβολία το ανώτερο έως 14 μέρες από την λήψη. Μετά την ακτινοβολήση μπορούν να συντηρηθούν για άλλες 14 ημέρες. [48, 52]

### **Κατεψυγμένα – Κρυσυντηρημένα ερυθροκύτταρα (Cryopreserved red cells –Cryo)**

Το προϊόν αυτό παρασκευάζεται από δευτερογενή επεξεργασία μονάδας ΣΕ ή ολικού αίματος. Τα ΣΕ καταψύχονται εντός 7 ημερών (κατά προτίμηση) από τη συλλογή του αίματος και με την προσθήκη κάποιου κρυοπροστατευτικού διαλύματος αποθηκεύονται σε θερμοκρασία από - 60 ° C έως - 80 ° C ή χαμηλότερα, ανάλογα με τη μέθοδο κρυοσυντήρησης που χρησιμοποιείται. Η παρασκευή των κρυοσυντηρημένων ερυθροκυττάρων πραγματοποιείται γενικά με δύο μεθόδους: στην μία χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας γλυκερόλη υψηλής συγκέντρωσης (40%), ενώ στην άλλη χρησιμοποιείται γλυκερόλη χαμηλής συγκέντρωσης (20%). Έτσι αναλόγως της μεθόδου που έχει χρησιμοποιηθεί, η θερμοκρασία συντήρησης και το μέσο αποθήκευσης διαφοροποιούνται ως εξής:

α) Από -60°C έως -80°C σε ηλεκτρικό καταψύκτη όταν έχει χρησιμοποιηθεί γλυκερόλη 40%.

β) Από -120 °C έως -150°C σε υγρό άζωτο όταν έχει χρησιμοποιηθεί γλυκερόλη χαμηλής συγκέντρωσης 20%.

Η διάρκεια συντήρησης των κατεψυγμένων ερυθρών είναι έως και 30 έτη, εφόσον έχει διασφαλιστεί η διατήρηση των προβλεπόμενων θερμοκρασιών συντήρησης.

Για την χορήγηση των κατεψυγμένων ερυθροκυττάρων απαιτούνται διαδικασίες απόψυξης, πλύσης και ανασύστασης. Τα κύτταρα μετά την απόψυξή τους, πλένονται για την απομάκρυνση της γλυκερόλης και προστίθενται κατά την διαδικασία της ανασύστασης σε χλωρονατριούχο ορό ή σε θρεπτικό διάλυμα για ερυθροκύτταρα. Τα αποψυγμένα ανασυσταθέντα ερυθροκύτταρα ύστερα από την απογλυκεροποίηση τους θα πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία +2-6°C σε όσο το δυνατόν βραχύτερο χρόνο και όχι περισσότερο από 24 ώρες.

Οι μονάδες κρυοσυντηρημένων ερυθροκυττάρων μετά την επεξεργασία ανασύστασης έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια. Κάθε ανασυσταθείσα μονάδα πρέπει να περιέχει 36gr αιμοσφαιρίνης κατ ελάχιστο και Hct 0,65-0,75, ενώ ο όγκος της να είναι μεγαλύτερος από 185ml. Τέλος, τα εναπομείναντα λευκοκύτταρα θα πρέπει να είναι  $<0,1 \times 10^9$  ανά μονάδα. Η σκοπιμότητα της κατάψυξης των ερυθροκυττάρων είναι κατά κύριο λόγο η διατήρηση σπάνιων ομάδων αίματος.[47,52,56]

### 1.3.3 Παράγωγα πλάσματος

Η χρήση παραγώγων πλάσματος έχει ως στόχο την υποκατάσταση πολλών παραγόντων πήξης που βρίσκονται σε ανεπάρκεια, για θεραπεία

ελλείψεων ενός παράγοντα πήξης εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμος συμπυκνωμένος παράγοντας για χορήγηση, και ως υγρό αντικατάστασης έναντι του πλάσματος που χρησιμοποιείται στη θεραπευτική πλασμαφαίρεση στην θρομβωτική θρομβοκυτταροπενική πορφύρα (ΘΘΠ). Το πλάσμα λαμβάνεται είτε από μονάδα ολικού αίματος μετά από ανάλογη φυγοκέντρηση και διαχωρισμό από τα ερυθροκύτταρα και τα αιμοπετάλια είτε με την διαδικασία της πλασμαφαίρεσης.[61, 62]

### **Πλάσμα, φρέσκο κατεψυγμένο (Plasma, Fresh Frozen –FFP)**

Είναι ένα συστατικό αίματος που προορίζεται για μετάγγιση ή για κλασματοποίηση. Το πλάσμα λαμβάνεται είτε από μονάδα ολικού αίματος μετά από ανάλογη φυγοκέντρηση και διαχωρισμό από τα ερυθροκύτταρα και τα αιμοπετάλια είτε με την διαδικασία της πλασμαφαίρεσης. Καταψύχεται εντός συγκεκριμένης χρονικής περιόδου και σε θερμοκρασία που επιτυγχάνεται η διατήρηση της λειτουργικότητας των ασταθών παραγόντων πήξης.

Για να χαρακτηριστεί ως φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα (FFP) θα πρέπει να έχει καταψυχθεί με διαδικασία ταχείας κατάψυξης (εντός μίας ώρας) σε θερμοκρασία  $-25^{\circ}\text{C}$  ή χαμηλότερη εντός 6 – 8 ωρών από την λήψη. Το FFP περιέχει κανονικά επίπεδα σταθερών παραγόντων σταθερής πήξης, αλβουμίνη και ανοσοσφαιρίνες. Πρέπει να περιλαμβάνει περισσότερο από 70% επί της αρχικής συγκέντρωσης του φρέσκου πλάσματος, του παράγοντα VIII και παρόμοιες συγκεντρώσεις των υπόλοιπων ασταθών παραγόντων πήξης καθώς και των φυσικών ανασταλτών τους.[63-67]

Το FFP πριν την μετάγγιση πρέπει να αποψυχθεί σε θερμοκρασία μεταξύ  $30^{\circ}\text{C}$  και  $37^{\circ}\text{C}$  σε υδατόλουτρο υπό συνεχή ανάδευση ή έστω χρησιμοποιώντας άλλο σύστημα ικανό να διασφαλίσει μια ελεγχόμενη θερμοκρασία απόψυξης. Το πλάσμα πρέπει να μεταγγίζεται το συντομότερο δυνατό μετά την απόψυξη, αλλά σε κάθε περίπτωση εντός 24 ωρών, εάν φυλάσσεται στους  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Το FFP ύστερα από την απόψυξή του δεν πρέπει να καταψυχθεί ξανά.[68,69] Ο χρόνος αποθήκευσης ποικίλλει ανάλογα με την θερμοκρασία κατάψυξης και διαμορφώνεται ως εξής: έως 3 μήνες σε θερμοκρασία  $-18^{\circ}\text{C}$  έως  $-25^{\circ}\text{C}$  και έως 36 μήνες σε θερμοκρασία χαμηλότερη των  $-25^{\circ}\text{C}$  .[47]

### **Κρυοκαθίζημα (Cryoprecipitate)**

Είναι προϊόν που προκύπτει από την ελεγχόμενη απόψυξη του FFP και περιέχει το κλάσμα των κρυοσφαιρινών του πλάσματος το οποίο μετά από επεξεργασία συμπυκνώνεται. Περιέχει ένα μεγάλο μέρος ινωδογόνου, φιβρονεκτίνης και των παραγόντων VIII, XIII και von Willebrand. Παρασκευάζεται από μία μονάδα FFP η οποία αποψύχεται σε θερμοκρασία  $+2^{\circ}\text{C}$  με  $+6^{\circ}\text{C}$ . Κατά την διάρκεια της απόψυξης, το



κρυοκαθίζημα σχηματίζεται ως λευκό ίζημα στο πλάσμα. Ύστερα από την απόψυξη ακολουθεί φυγοκέντρηση υψηλών στροφών (hard spin). Το υπερκείμενο αποβάλλεται ενώ το κρυοκαθίζημα που απομένει καταψύχεται ταχέως. Ο αναμενόμενος μέγιστος όγκος του παρασκευάσματος όταν αυτό προκύπτει από πλάσμα προερχόμενο από φυγοκέντρηση ολικού αίματος είναι περίπου 40ml. Το κρυοκαθίζημα αποθηκεύεται για έως 3 μήνες σε θερμοκρασία -18°C έως -25°C ή για 36 μήνες σε θερμοκρασία -25°C (ή χαμηλότερη) αντίστοιχα. Πριν την χορήγηση θα πρέπει να αποψύχεται άμεσα σε θερμοκρασία +37°C. [47, 70]

#### **1.3.4 Πρωτεΐνες πλάσματος:**

Οι πρωτεΐνες πλάσματος απομονώνονται με την διαδικασία της κλασματοποίησης από πλάσμα που προέρχεται είτε από μονήρεις μονάδες αίματος από τις οποίες αφαιρέθηκαν τα κυτταρικά στοιχεία, είτε από μονάδες προερχόμενες από πλασμαφαίρεση αιμοδοτών. Το πλάσμα που κλασματοποιείται συλλέγεται σε δεξαμενές. Η υψηλή καθαρότητα των παρασκευασμένων προϊόντων διασφαλίζεται με την συνδυαστική εφαρμογή τεχνικών αδρανοποίησης.[9]

Τα κυριότερα προϊόντα κλασματοποίησης είναι:

(α)Οι συμπυκνωμένοι παράγοντες πήξης: FVIII, FIX, vWF, FVII, προθρομβινικό σύμπλεγμα (II, VII, IX, X), και FXIII,

(β) Οι φυσικοί ανασταλτές πήξης: AT, PrC,

(γ) Η λευκωματίνη και

(δ) Οι ανοσοσφαιρίνες

#### **1.3.5 Παράγωγα αιμοπεταλίων**

Τα συμπυκνωμένα αιμοπετάλια ανάλογα με τον τρόπο παρασκευής τους διακρίνονται σε:

α)Αιμοπετάλια ανάκτησης τα οποία παρασκευάζονται από φυγοκέντρηση πρόσφατου ολικού αίματος, και

β) αιμοπετάλια αφαίρεσης τα οποία παρασκευάζονται με την διαδικασία της αιμοπεταλιοαφαίρεσης από δότη χρησιμοποιώντας αυτόματη διάταξη διαχωριστή κυττάρων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

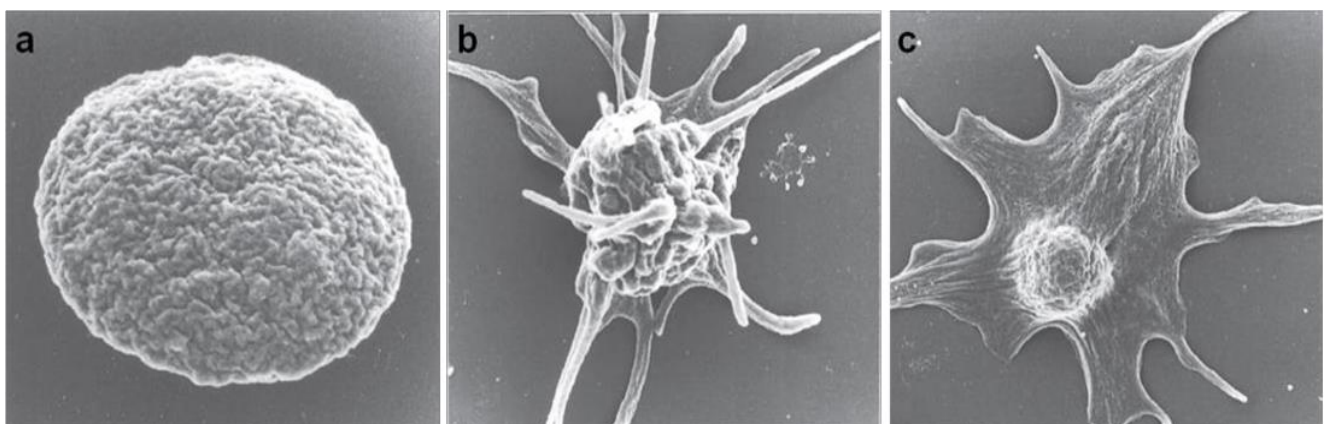
### 2.1 Φυσιολογία –Μορφολογία αιμοπεταλίων

Η ανίχνευση ζωντανών ΑΜΠ και η παρατήρησή τους σε νωπά παρασκευάσματα είναι εφικτή με την χρήση του μικροσκοπίου αντίθεσης φάσεων. Με αυτόν τον τρόπο παρατήρησης διαπιστώνεται ότι τα ΑΜΠ, κατά την πορεία της ενεργοποίησής τους, λαμβάνουν τρεις διαφορετικούς μορφολογικούς τύπους :

α) τον «ήρεμο» - σφαιρικό τύπο (circulating form), είναι η μορφή που έχουν τα μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στην κυκλοφορία

β) το δενδριτικό τύπο (dendritic form), στην αρχική φάση της ενεργοποίησής τους όπου τα ΑΜΠ αλλάζουν μορφολογικά από δισκοειδή , γίνονται σφαιρικά και το σχήμα τους τελικά διαφοροποιείται με την εμφάνιση ψευδοποδίων στην επιφάνειά τους

γ) τον απλωμένο τύπο (spread form), μορφή την οποία παίρνουν όταν οι προεκβολές τους έρχονται σε επαφή με τη γυάλινη επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας. Τα αιμοπετάλια μορφολογικά διαφοροποιούνται καθώς χάνουν τις προεκβολές τους και μετατρέπονται σε μία μορφή λεπτής μεμβράνης, που απλώνεται και προσκολλάται στην επιφάνεια. Εξαιτίας αυτής τη μορφολογικής μεταβολής, τα σωματίδια των αιμοπεταλίων συγκεντρώνονται στο κέντρο όπου και κατά συνέπεια παρατηρείται αύξηση της πυκνότητάς τους.[71, 72]



Εικόνα 3. Ήρεμο αιμοπετάλιο (a), δενδριτικός τύπος αιμοπεταλίου (b) και απλωμένος τύπος αιμοπεταλίου (c) .Πηγή: Michelson, Platelets (Second Edition) 2006; p 46

Παρ' όλο που φαίνονται σαν κυστίδια στο περιφερικό αίμα, τα αιμοπετάλια είναι υποκυτταρικά σωματίδια με κυτταροπλασματικό περιεχόμενο που περιέχει κοκκία, με πολύπλοκη αλλά ταυτόχρονα οργανωμένη δομή. Η δομή των αιμοπεταλίων μπορεί εννοιολογικά να διαχωριστεί σε τέσσερις ζώνες με βάση την οργάνωση και τη λειτουργία τους: την περιφερική ζώνη, τη δομική ζώνη (sol-gel), τη ζώνη των οργανιδίων και τη μεμβρανική ζώνη.[73]

### **Περιφερική ζώνη**

Η περιφερική ζώνη των αιμοπεταλίων αποτελείται από μια μεμβράνη και ένα καναλοειδές σύστημα (open canalicular system –OCS) το οποίο μέσω των εγκολπώσεων της κυτταρικής μεμβράνης επικοινωνεί με το εξωκυττάριο περιβάλλον. Μπορεί να χωριστεί περαιτέρω σε άλλους ξεχωριστούς τομείς: την εξωκυτταρική και ενδοκυτταρική μεμβράνη και τον γλυκοκάλυκα που τις περιβάλλει.[74]

Το καναλοειδές σύστημα της μεμβράνης δια μέσω των εγκολπώσεων που λειτουργούν ως είσοδοι στην επιφάνειά της είναι υπεύθυνο για την ανταλλαγή μορίων με το περιβάλλον εκτός του κυττάρου. Συγκεκριμένα ευθύνεται για τη σημαντική απελευθέρωση μορίων από τα αιμοπετάλια μετά την ενεργοποίησή τους και κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης. Η μεμβράνη του πλάσματος των αιμοπεταλίων είναι σχετικά ομαλή και έχει παχύτερο γλυκοκάλυκα (κάλυψη GP-πολυσακχαρίτη) από άλλα κύτταρα του αίματος.[73, 75]

Ο γλυκοκάλυκας, ως το εξωτερικό στρώμα αιμοπεταλίων αποτελεί μια δυναμική δομή και τον τόπο πρώτης επαφής με τον περιβάλλοντα εξωκυττάριο χώρο. Έχει πάχος 10-50 nm ενώ αποτελείται από βλεννοπολυσακχαρίτες και από αυξημένη ποσότητα σιαλικού οξέος. Περιέχει διάφορες γλυκοπρωτεΐνες που έχουν τον ρόλο υποδοχέων. Η κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων έχει πάχος 7-9 nm, είναι λεία δίχως προεξοχές και είναι διάτρητη από ένα σύστημα μικροσωληνίσκων(OCS), το οποίο αυξάνει την έκταση αλλά διαμορφώνει ποικιλοτρόπως τη λειτουργικότητά της. Προέρχεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο των μεγακαρυοκυττάρων και αποτελεί φυσικό και χημικό φραγμό του εσωτερικού του κυττάρου από το εξωτερικό του περιβάλλον ενώ μέσω του συστήματος των μικροσωληνίσκων επιτρέπει την επιλεκτική αλληλεπίδραση με αυτό. Η ύπαρξη αντλιών όπως η αντλία Na/K επιτρέπει την ενεργό διάδοση ιόντων και μεταβολιτών και την διαχείριση μεταφοράς αυτών διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης αποδίδοντας της έτσι μία από τις κυριότερες αλληλεπιδράσεις με το εξωκυττάριο περιβάλλον. Τα κύρια συστατικά της είναι τα λιπίδια (35%),

οι πρωτεΐνες (57%) και οι υδατάνθρακες (8%). Στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης εκφράζεται πλήθος γλυκοπρωτεϊνών όπως υποδοχείς GPIb /IX /X, GPVI, GPIIb/IIIa που απαιτούνται για την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με υποενδοθηλιακές δομές του τραυματισμένου αγγειακού τοιχώματος καθώς και για την προσκόλληση, ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων.[71]

Κάτω από τον γλυκοκάλυκα τοποθετείται μία λιπιδική διπλοστιβάδα με σημαντικό ρόλο στην λειτουργία της αιμόστασης καθώς περιέχει ιστικό παράγοντα (TF), ο οποίος εκλύεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων σε ανενεργή μορφή μαζί με αρνητικά φορτισμένη φωσφατιδυλοσερίνη (PS) κατά την φάση ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Στη συνέχεια, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν μικροκυστίδια (MP) που φέρουν TF ικανό να δεσμεύει παράγοντες πήξης Va, VIa, και Xa στην επιφανειακή τους φωσφατιδυλοσερίνη. Μέσα από αλληλεπίδραση αυτών των παραγόντων πήξης με τον TF, η παραγωγή θρομβίνης ενισχύεται στην επιφάνεια ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων καθώς και σε MPs που προέρχονται από αιμοπετάλια.[71]

Κάτω από τη λιπιδική διπλοστιβάδα βρίσκεται η υπομεμβρανική περιοχή των αιμοπεταλίων με καθοριστική σημασία για τη λειτουργία τους. Περιέχει ένα σύστημα μικροϊνιδίων ακτίνης που σχηματίζουν τον κυτταροσκελετό ο οποίος απαιτείται για την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων και τη μετατόπιση των υποδοχέων και σωματιδίων στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Στο κυτταρικό διαμέρισμα υπό της μεμβράνης, οι κυτταροπλασματικοί επίτοποι όλων των διαμεμβρανικών υποδοχέων αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες, πολλές εκ των οποίων σχετίζονται με καλμοδουλίνη, μυοσίνη και μικροϊνίδια ακτίνης που συνιστούν τον προαναφερθέν κυτταροσκελετό. Με αυτόν τον τρόπο, ρυθμίζουν τις απαιτούμενες διαδικασίες σηματοδότησης για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.[71,76,77]

### **Δομική ζώνη**

Το διαφανές αλλά ιξώδες δίκτυο μέσα στα αιμοπετάλια αναφέρεται ως δομική ζώνη sol-gel. Βρίσκεται κάτω από την περιφερική ζώνη και αποτελείται από τον κυτταροσκελετό. Μοιάζει με υγρή γέλη και περιέχει οργανωμένους μικροσωληνίσκους και μικροϊνίδια, τυχαία κατανομημένα γλυκογόνο, μερικά κυστίδια επικαλυμμένα με κλαθρίνη, καθώς και εκκριτικά οργανίδια. Οι μικροσωληνίσκοι είναι διατεταγμένοι σε περιφερειακή δέσμη κοντά στο κυτταρικό τοίχωμα, σχηματίζοντας έτσι ένα σύστημα που υποστηρίζει τον συσταλτικό κυτταροσκελετό της μεμβράνης. Διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις υποστηρίζουν ότι η

ύπαρξη των μικροσωληνίσκων είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του δισκοειδούς σχήματος των ανθρώπινων αιμοπεταλίων.[71] Τα μικροϊνίδια ακτίνης εντός της δομικής ζώνης (Sol – gel) σχηματίζουν το δίκτυο του κυτταροσκελετού όπου βρίσκονται συγκεντρωμένα όλα τα οργανίδια ενώ παράλληλα εξασφαλίζει την απόσταση των τελευταίων τόσο μεταξύ τους όσο και από το κυτταρικό τοίχωμα ενός αιμοπεταλίου σε κατάσταση ηρεμίας.[71,78,79]. Μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, το κυτταροπλασματικό σύστημα ακτίνης συστέλλει το δίκτυο μικροσωληνίσκων με αποτέλεσμα την μετακίνηση των α-κοκκίων και των πυκνών σωματίων στο κέντρο των κυττάρων, γεγονός το οποίο πυροδοτεί την έκκριση του περιεχομένου τους μέσω του OCS.[71]

### ***Ζώνη οργανιδίων:***

Η ζώνη των οργανιδίων εντοπίζεται στο κέντρο των αιμοπεταλίων. Περιέχει πλήθος σωματιδίων, τα οποία αποτελούν κυρίως τόπους αποθήκευσης πρωτεϊνών αλλά και άλλων ουσιών, οι οποίες είναι καθοριστικής σημασίας για τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Στα αιμοπετάλια υπάρχουν κυρίως τρεις τύποι εκκριτικών οργανιδίων. Αυτά είναι τα α-κοκκία (α-granules), τα πυκνά ή δ-κοκκία (dense bodies) και τα λυσοσώματα ή λ-κοκκία (lysosomes). [71]

α-κοκκία (α-granules) : Είναι στρογγύλα σωματίδια με δική τους τρίστιβη μεμβράνη και διάμετρο περίπου 200 – 500nm. Ο αριθμός τους ανέρχεται σε 50-80 σε ένα μέσο αιμοπετάλιο ενήλικα ανθρώπου, γεγονός που τα καθιστά τα πιο συνήθη οργανίδια των αιμοπεταλίων. Σε ένα αιμοπετάλιο σε κατάσταση ηρεμίας τα α-κοκκία διαχωρίζονται μεταξύ τους μέσω των ινών ακτίνης του κυτταροσκελετού όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Με βάση την τελευταία συνθήκη έχει φανεί πως η σύντηξη α-κοκκίων κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας αποθήκευσης αιμοπεταλίων είναι ένα πρώτο σημάδι κυτταρικής βλάβης.[71,80] Περιέχουν τους περισσότερους αιμοπεταλιακούς παράγοντες, όπως τον αιμοπεταλιακό παράγοντα 4 (Platelet Factor 4, PF4), τον αιμοπεταλιακό παράγοντα 3, (Platelet Factor 3, PF3), τη θρομβοσπονδίνη (TSP), τη β-θρομβοσφαιρίνη (β-thromboglobulin, β-TG) και τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (Platelet Derived Growth Factor, PDGF) καθώς και πολλούς παράγοντες πήξης (ινωδογόνο, παράγοντα von Willebrand, παράγοντες V και XI, πρωτεΐνη S κ.λπ.). Η κεντρική ζώνη των α-κοκκίων εμφανίζεται πυκνότερη από την περιφερειακή ζώνη τους, που ενδεχομένως υποδηλώνει την παρουσία πρωτεϊνών με θέσεις σύνδεσης για βαρέα μέταλλα.[71,73] Μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες των α-κοκκίων εκφράζονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, ενώ οι διαλυτές πρωτεΐνες τους απελευθερώνονται στο

εξωκυτταρικό διαμέρισμα. Οι περισσότερες από τις δεσμευμένες στη μεμβράνη πρωτεΐνες υπάρχουν ήδη στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων σε κατάσταση ηρεμίας. Τέτοιες είναι ιντεγκρίνες όπως αIIbβ3, υποδοχείς της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών όπως GPVI, υποδοχείς Fc (FcR), PECAM-1, το σύμπλεγμα GPIb-IX-V, τετρασπανίνες, CD36 και Glut 3 (Glucose transporter 3).[81,82] Ωστόσο άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες όπως ινωδοκυστίνη L, CD109 και P σελεκτίνη εκφράζονται αποκλειστικά στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων.[81]

Τα πυκνά ή δ-κοκκία (dense bodies): είναι μικρότερα από τα α-κοκκία και εμφανίζουν μεγάλη μορφολογική μεταβλητότητα ενώ στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν χαρακτηριστική πυκνή εμφάνιση.[71,83] Αριθμούν από 3 έως 8 σωματίδια ανά μέσο αιμοπετάλιο ενήλικα ανθρώπου. Αποτελούν την αποθήκη των μη μεταβολικών ουσιών των ΑΜΠ, όπως της σεροτονίνης (5-HT), της ισταμίνης, των  $Ca^{2+}$  και μαγνησίου καθώς και των νουκλεοτιδίων της αδερίνης όπως τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) αλλά και νουκλεοτιδίων ουρακίλης και γουανίνης .[71]

Τα λυσοσώματα ή λ-κοκκία (lysosomes): Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια περιέχουν 0 έως 2 σφαιρικά λυσοσώματα, που είναι ελαφρώς μικρότερα από τα α-κοκκία. Δεν εμφανίζουν ιδιαίτερα μορφολογικά γνωρίσματα δυσχεραίνοντας έτσι η διάκριση τους από τα δ-κοκκία. Είναι γεμάτα υδρολυτικά ένζυμα καθώς το περιεχόμενό τους περιλαμβάνει τουλάχιστον 13 όξινη υδρολάσες, καθεψίνη D και E, πρωτεΐνη LAMP-2 (Lysosomal-associated membrane protein 2) και CD63, τα οποία εκκρίνονται ως απόκριση κατά την διάρκεια ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Ποιο συγκεκριμένα φέρουν ένζυμα αποικοδόμησης πρωτεϊνών όπως καθεψίνες, ελαστάση και κολλαγενάση, ένζυμα αποικοδόμησης υδατανθράκων όπως γλυκοσιδάση και γαλακτοσιδάση καθώς και όξινη φωσφατάση ως ένζυμο υδρόλυσης φωσφορικού εστέρα. Οι υποδοχείς LAMP-1, LAMP-2 και CD63 ανιχνεύονται στην μεμβράνη των λυσοσωμάτων σε εξαιρετικά γλυκοσυλιωμένη κατάσταση υποστηρίζοντας έτσι την προστατευτική της λειτουργία. [71, 84]

Άλλα σωματίδια που παρατηρούνται στην ζώνη οργανιδίων είναι τα μιτοχόνδρια (mitochondria), τα υπεροξυσώματα (peroxisomes), τα ριβοσώματα και αγγελιοφόρο RNA (ribosomes) καθώς και τα κοκκία γλυκογόνου.[71]

Μιτοχόνδρια: Ο αριθμός τους κυμαίνεται από 10-60 σε κάθε αιμοπετάλιο. Παρά τον χαμηλό αριθμό και την απλή δομή τους, ικανοποιούν τις ενεργειακές απαιτήσεις των αιμοπεταλίων και διασφαλίζουν ότι ο αποκλεισμός της αναερόβιας γλυκόλυσης δεν επηρεάζει τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Αποτελούν χώρους αποθήκευσης  $Ca^{2+}$  και τόπους όπου

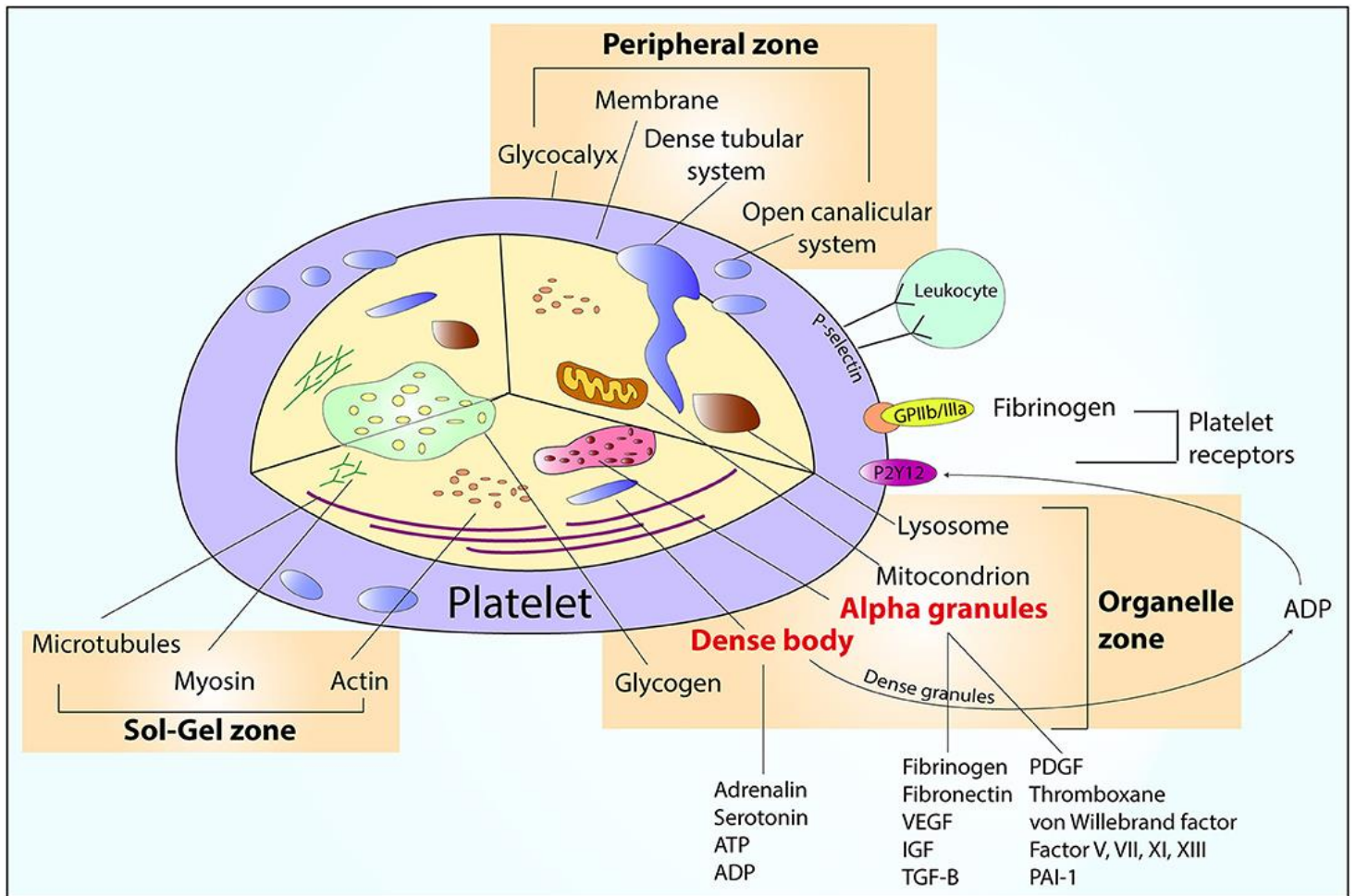
πραγματοποιούνται διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις, όπως οι φωσφορυλιώσεις και οι ενδοαιμοπεταλιακές αναπνευστικές αντιδράσεις.

Κοκκία γλυκογόνου: Τα γλυκοσώματα αιμοπεταλίων που φέρουν γλυκογόνο είναι ένα άλλο συστατικό της οργανικής ζώνης των αιμοπεταλίων. Έχουν στρογγυλό ή οβάλ σχήμα και μέγεθος παρόμοιο με αυτό των με α-κοκκίων. Αποτελούν την απαραίτητη ενεργειακή πηγή για τη διέγερση των αιμοπεταλίων.

Τα υπεροξυσώματα (peroxisomes) είναι πολύ μικρά οργανίδια, τα οποία περιέχουν ένζυμα που καταλύουν τις αρχικές χημικές αντιδράσεις της σύνθεσης των φωσφολιπιδίων.

### **Μεμβρανική ζώνη**

Εκτός από την εξωτερική στιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, η μεμβρανική ζώνη στα ανθρώπινα αιμοπετάλια περιλαμβάνει το σύμπλεγμα Golgi, το συνδεδεμένο με την επιφάνεια σύστημα των ανοικτών σωληναρίων (Surface Connected open canalicular System, SCS) , το σύστημα των πυκνών σωληναρίων (Dense Tubular System, DTS) και το τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο. Κύριο δομικό συστατικό του SCS είναι η σπεκτρίνη.



Εικόνα 4, Επισκόπηση της δομής αιμοπεταλίων. Πηγή: Ostrowska M, Kubica J, Adamski P, Kubica A, Eyiletten C, Postula M, Toma A, Hengstenberg C, Siller-Matula JM. Stratified Approaches to Antiplatelet Therapies Based on Platelet Reactivity Testing. Front Cardiovasc Med. 2019 Dec 3;6:176. doi: 10.3389/fcvm.2019.00176. PMID: 31850373; PMCID: PMC6901499.

### Υποδοχείς μεμβράνης των αιμοπεταλίων

Η ύπαρξη υποδοχέων σύνδεσης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων αποτελεί αναγκαία συνθήκη για την προσκόλληση, ενεργοποίηση και συσσώρευση των τελευταίων. Οι υποδοχείς αυτοί είναι εξειδικευμένοι για συγκεκριμένες ουσίες (ligands), ενώ μπορούν να εντοπιστούν στη μεμβράνη των ΑΜΠ αλλά και στο απογυμνωμένο ενδοθήλιο των αγγείων. Επιπλέον, οι υποδοχείς αυτοί, δεχόμενοι χημικά ερεθίσματα ρυθμίζουν την επικοινωνία του εσωτερικού του κυττάρου με το εξωτερικό τους περιβάλλον. Μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τη μοριακή τους δομή σε 4 κυρίως κατηγορίες. Στις ιντεγκρίνες, στους πλούσιους σε λευκίνη υποδοχείς, στις σελεκτίνες και στους υποδοχείς ανοσοσφαιρινικής δομής.[71, 85]



**Ιντεγκρίνες:** Είναι μόρια προσκόλλησης και σηματοδότησης που υπάρχουν σε πολλούς τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των αιμοπεταλίων. Το μόριο τους αποτελείται από μία α και μία β πολυπεπτιδική αλυσίδα, σχηματίζοντας έτσι ετεροδιμερή συμπλέγματα. Πολλοί από τους πρωτεϊνικούς υποδοχείς των αιμοπεταλίων ανήκουν στην κατηγορία των ιντεγκρινών οι οποίες σε αυτά τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε τρεις τύπους β1, β2 και β3. Ποιο συγκεκριμένα και ανάλογα με τον τύπο:

**α2β1 υποδοχέας ή GPIa-IIa :** Είναι σημαντικός αιμοπεταλιακός υποδοχέας ο οποίος προσδένεται με το κολλαγόνο. Οι υποδοχείς α2β1 φροντίζουν για την ανάπτυξη σταθερού θρόμβου και προάγουν την προπηκτική δραστηριότητα. Επίσης μετά τη σύνδεση τους με το κολλαγόνο αποτελούν το έναυσμα για την έναρξη της αιμοπεταλιακής πρωτεϊνοσύνθεσης.[85]

**α5β1 υποδοχείς:** Επιτελούν συμπληρωματικό ρόλο στις λειτουργίες αιμοπεταλίων καθώς διευκολύνουν την προσκόλληση τους στην φιβρονεκτίνη.[85, 86]

**α6β1 ιντεγκρίνη:** Προκαλεί προσκόλληση των αιμοπεταλίων στην λαμινίνη. Η α6β1 σηματοδοτεί μέσω της 3-κινάσης φωσφατιδυλνινοσιτόλης (PI3K) τις μορφολογικές αλλαγές στα αιμοπετάλια.[85-87]

**αLβ2 (CD102) επίσης γνωστό και ως ICAM-2:** Θεωρείται σημαντική για την προσκόλληση αιμοπεταλίων στα ουδετερόφιλα και επίσης για την αλληλεπίδραση μεταξύ λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων .[85, 88]

**αIIbβ3 (CD41 / CD61) επίσης γνωστό ως σύμπλεγμα GPIIb –IIIa:** Υποδοχέας γλυκοπρωτεϊνών ο οποίος ανευρίσκεται αποκλειστικά και μόνο στα αιμοπετάλια και είναι ο πιο άφθονος υποδοχέας προσκόλλησης αυτών. Τα αιμοπετάλια σε κατάσταση ηρεμίας εκφράζουν 80.000-100.000 μόρια αIIbβ3 στην επιφάνειά τους ενώ παράλληλα 20.000-40.000 επιπλέον μόρια αIIbβ3 βρίσκονται στα α και δ κοκκία καθώς και στις μεμβράνες του ανοιχτού καναλοειδούς συστήματος. Αυτοί οι υποδοχείς μετατοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των αιμοπεταλίων μετά την ενεργοποίησή τους και την αντίδραση απελευθέρωσης. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, ο αIIbβ3 μετασχηματίζεται από κατάσταση χαμηλής συγγένειας σε υψηλής για προσκόλληση με τους εξειδικευμένους συνδετές του. Αυτό διευκολύνει τη δέσμευση του αIIbβ3 με ινωδογόνο, ινώδες, παράγοντα von Willebrand (vWF) φιβρονεκτίνη, βιτρονεκτίνη και θρομβοσπονδίνη προάγοντας έτσι τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Ο σημαντικός ρόλος του ενεργοποιημένου αIIbβ3 στη συσσώρευση αιμοπεταλίων καθιστά την αναστολή του πρωταρχικό στόχο

για την ανάπτυξη αντιθρομβωτικής θεραπείας σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις.[71, 85, 89-91]

*αVβ3*: Παρουσία μαγνησίου ή μαγγανίου, οι υποδοχείς αVβ3 προκαλούν προσκόλληση αιμοπεταλίων σε βιτρονεκτίνη, ινωδογόνο, vWF, προθρομβίνη και θρομβοσπονδίνη.[85]

*Υποδοχείς πλούσιοι σε λευκίνη (Leucine-Rich Repeat Glycoprotein Receptors-LRR)*: Αποτελούν ένα μοτίβο πρωτεϊνών που σχηματίζεται από υδρόφοβα αμινοξέα - λευκίνη. Περιλαμβάνουν το σύμπλοκο GPIb-IX-V, τους toll-like υποδοχείς (TLR) και τις μεταλλοπρωτεϊνάσες εξωκυττάρου δικτύου (MMP). [85]

Το σύμπλεγμα GPIb-IX-V είναι ο δεύτερος πιο κοινός υποδοχέας αιμοπεταλίων μετά την ιντεγκρίνη αIIbβ3, με περίπου 50.000 αντίγραφα ανά αιμοπετάλιο. Δρα ως υποδοχέας επιφανείας αιμοπεταλίων και εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό στην φυσιολογική αιμόσταση καθώς και στην αρτηριακή θρόμβωση. Το σύμπλεγμα GPIb-IX-V επάγει την προσκόλληση ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων σε ενδοθηλιακά κύτταρα και υποενδοθηλιακές δομές του τραυματισμένου αγγειακού τοιχώματος, κυρίως δεσμεύοντας τον πιο σημαντικό συνδετή του, τον VWF, ο οποίος είναι ικανός να δεσμεύσει κολλαγόνο. Ένας άλλος συνδετής για το σύμπλεγμα GPIb- Το IX-V είναι η θρομβοσπονδίνη, η οποία φαίνεται να προκαλεί προσκόλληση αιμοπεταλίων ,απουσία VWF. Έχει αποδειχθεί ότι η γλυκοπρωτεΐνη GPIba μπορεί επίσης να δεσμεύσει την P-σελεκτίνη, προσφέροντας έτσι έναν άλλο μηχανισμό αλληλεπιδράσεων αιμοπεταλίων – ενδοθηλίου και αιμοπεταλίων μεταξύ τους. Εκτός από τον ρόλο του στην προσκόλληση αιμοπεταλίων, το σύμπλεγμα GPIb-IX-V οργανώνει την προπηκτική δραστηριότητα σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παρέχοντας θέσεις δέσμευσης για την θρομβίνη, παράγοντα XI και το κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους. Αντίθετα, η δέσμευση του παράγοντα XII από την γλυκοπρωτεΐνη GPIba ανταγωνίζεται τη δέσμευση κινινογόνου και αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που εξαρτώνται από τη σύνδεση της θρομβίνης στην GPIba.[85,91,92]

*Σελεκτίνες*: Οι σελεκτίνες είναι μια ομάδα υποδοχέων που έχουν κεντρικό ρόλο στην προσκόλληση. Αυτοί οι υποδοχείς δεν εντοπίζονται μόνο στα αιμοπετάλια, αλλά βρίσκονται επίσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα και λεμφοκύτταρα. Στα αιμοπετάλια εντοπίζονται η P-σελεκτίνη και ο υποδοχέας CLEC-2 (C-type lectin-like receptor 2). [85]

Η P-σελεκτίνη, γνωστή και ως CD62P εντοπίζεται στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων σε κατάσταση ηρεμίας ενώ μετά την ενεργοποίηση των τελευταίων μετατοπίζεται και εκφράζεται στην επιφάνειά τους. Η

ενεργοποίηση αιμοπεταλίων έχει ως αποτέλεσμα την επιφανειακή έκφραση περίπου 13.000 μορίων P-σελεκτίνης, η έκφραση της οποίας σε κυκλοφορούντα αιμοπετάλια αποτελεί δείκτη για την *in vivo* ενεργοποίησή τους. Η P-σελεκτίνη συνδέει ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα στα αιμοπετάλια και στα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και μικροκυστίδια τα οποία φέρουν τον ανάλογο υποδοχέα PSGL-1.[94]

**Υποδοχείς ανοσοσφαιρικής δομής:** Τα μόρια της υπεροικογένειας ανοσοσφαιρίνης (IgSF) είναι μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών επιφανείας που εμπλέκονται στην αναγνώριση, σύνδεση και προσκόλληση των κυττάρων. Περιλαμβάνουν υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας, συν-υποδοχείς και συν-διεγερτικά μόρια.[85]

Ο GPVI αποτελεί έναν σημαντικό υποδοχέα κολλαγόνου. Εμφανίζεται ως σύμπλοκο με την FcR  $\gamma$ -αλυσίδα, και εκφράζεται στα αιμοπετάλια με μονομερή ή διμερή μορφή. Οι μονομερείς μορφές υπάρχουν ιδιαίτερα σε ήρεμα αιμοπετάλια και εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια σύνδεσης με το κολλαγόνο ανεπαρκή ώστε να επιτρέψει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις κολλαγόνου. Αντιθέτως, η διμερής μορφή έχει αυξημένη συγγένεια σύνδεσης με το κολλαγόνο και η σύνδεση αυτή στο διμερές σύμπλοκο μπορεί να οδηγήσει σε ενδοκυτταρικά σήματα που οδηγούν στη δημιουργία περαιτέρω διμερών. Χωρίς την FcR  $\gamma$ -αλυσίδα, ο GPVI δεν εξωτερικεύεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και έτσι δεν προκαλείται ενεργοποίηση αιμοπεταλίων επαγόμενη από το κολλαγόνο.[71,85,95,96]

Τα αιμοπετάλια φέρουν επίσης και διάφορους υποδοχείς για προσταγλανδίνες όπως υποδοχείς θρομβοξάνης (TxA<sub>2</sub>), υποδοχείς προστακυκλίνης (PGI<sub>2</sub>), PGD<sub>2</sub> και PGE<sub>2</sub>.

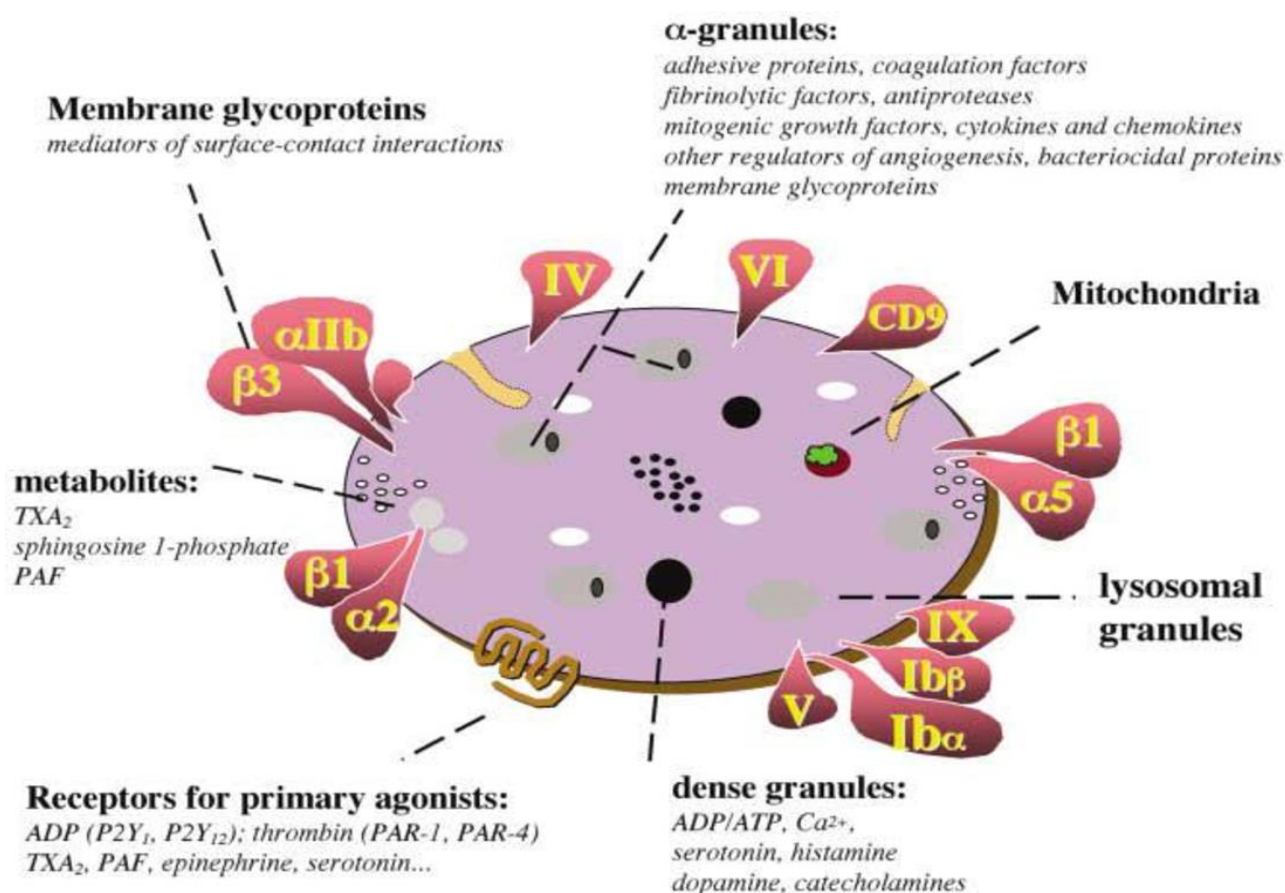
**Υποδοχείς θρομβοξάνης:** Τα αιμοπετάλια έχουν υποδοχείς θρομβοξάνης A<sub>2</sub> / προσταγλανδίνης H<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub> / PGH<sub>2</sub>) οι οποίοι ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση A<sub>2</sub> και τη φωσφολιπάση C μέσω μεταγωγής σημάτων από G πρωτεΐνες. Μετά την διέγερση από αγωνιστές, οι υποδοχείς TxA<sub>2</sub> / PGH<sub>2</sub> ενισχύουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με αυτοκρινή μηχανισμό. [85]

**Οι υποδοχείς προστακυκλίνης (PGI<sub>2</sub>)** είναι οι κύριοι ανασταλτικοί υποδοχείς προσταγλανδίνης στα αιμοπετάλια. Αυτοί οι υποδοχείς, μέσω αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες G, ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση και κατά συνέπεια δεσμεύσουν την προστακυκλίνη ώστε να διατηρήσουν τα αιμοπετάλια σε κατάσταση ηρεμίας.[85]

**Οι υποδοχείς PGE<sub>2</sub>** ξεκινούν ενεργοποίηση αιμοπεταλίων σε χαμηλές συγκεντρώσεις ADP και κολλαγόνου, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτών των αγωνιστών αναστέλλουν την σχετιζόμενη με PGE<sub>2</sub>

ενεργοποίηση αιμοπεταλίων. Η συσσώρευση αιμοπεταλίων αναστέλλεται από τη σύνδεση του υποδοχέα EP3 στην PGE2 λόγω της μειωμένης παραγωγής κυκλικού AMP.[85]

Πολυάριθμοι υποδοχείς επιπλέον αυτών που αναπτύχθηκαν παραπάνω εντοπίζονται στα αιμοπετάλια επιτελώντας σημαντικό ρόλο στην δομή και λειτουργία των αιμοπεταλίων. Υποδοχείς τετρασπανινών όπως CD 63 (LAMP -3), διαμεμβρανικοί υποδοχείς αγωνιστών όπως αυτός του ADP, υποδοχείς σχηματιζόμενοι από φωσφολιπίδια σαν τον υποδοχέα του PAF (Platelet activating factor) και άλλοι υποδοχείς όπως θρομβοποιητίνης, λεπτίνης, σεροτονίνης, υποδοχέας PDGF και άλλοι συμβάλλουν με τον ρόλο τους στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. [71, 85]



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της δομής των αιμοπεταλίων και των μεσολαβητών τους. Πηγή: Anitua et al., *Thromb Haemost* 2004;91:415.

## 2.2 Παράγωγα αιμοπεταλίων που χρησιμοποιούνται σήμερα και τρόποι παρασκευής:

Τα αιμοπετάλια είναι απαραίτητα στον μηχανισμό πήξης του αίματος συμμετέχοντας στην πρωτογενή αιμόσταση γι' αυτό και χορηγούνται σε αιμορραγίες, σε ασθενείς με θρομβοπενία και λειτουργικές διαταραχές των αιμοπεταλίων.[44]

Οι μεταγγίσεις αιμοπεταλίων από το 1950 έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τη θνησιμότητα από αιμορραγία σε ασθενείς και η χρήση τους ως θεραπευτικό μέσο αυξάνεται σταθερά από τότε. Η μετάγγιση αιμοπεταλίων ως θεραπευτικό μέσο λαμβάνει ουσιαστικό ρόλο στην αντιμετώπιση και προσπάθεια θεραπείας του καρκίνου, των αιματολογικών κακοηθειών, στην ανεπάρκεια μυελού και στην μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Παρά την θεραπευτική της σημασία, η μετάγγιση αιμοπεταλίων μπορεί να προκαλέσει σοβαρές παρενέργειες ή μπορεί να καταστεί αναποτελεσματική με την αλλοανοσοποίηση. Ως εκ τούτου η προσπάθεια τροποποίησης των παραγώγων αιμοπεταλίων με σκοπό την μείωση των ανεπιθύμητων αντιδράσεων είναι ζωτικής σημασίας.[97-99]

Τα παράγωγα των αιμοπεταλίων διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο παρασκευής τους:

1) Τα ανακτηθέντα συμπυκνωμένα αιμοπετάλια από μονάδες πρόσφατου ολικού αίματος τυχαίων δοτών. Τα συγκεκριμένα αιμοπετάλια παρασκευάζονται είτε με την μέθοδο του πλούσιου σε αιμοπετάλια πλάσματος (Platelet rich plasma – PRP), είτε από την στιβάδα των λευκοκυττάρων (Buffy coat - BC). Ο ασκός τοποθετείται σε ειδικό αναδευτήρα και διατηρείται για 5 ημέρες σε θερμοκρασία 24°C υπό συνεχή ανακίνηση.

2) Τα αιμοπετάλια αφαίρεσης, προϊόν το οποίο παρασκευάζεται με αφαίρεση αιμοπεταλίων από έναν δότη με τη χρήση αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διαχωρισμού κυττάρων.

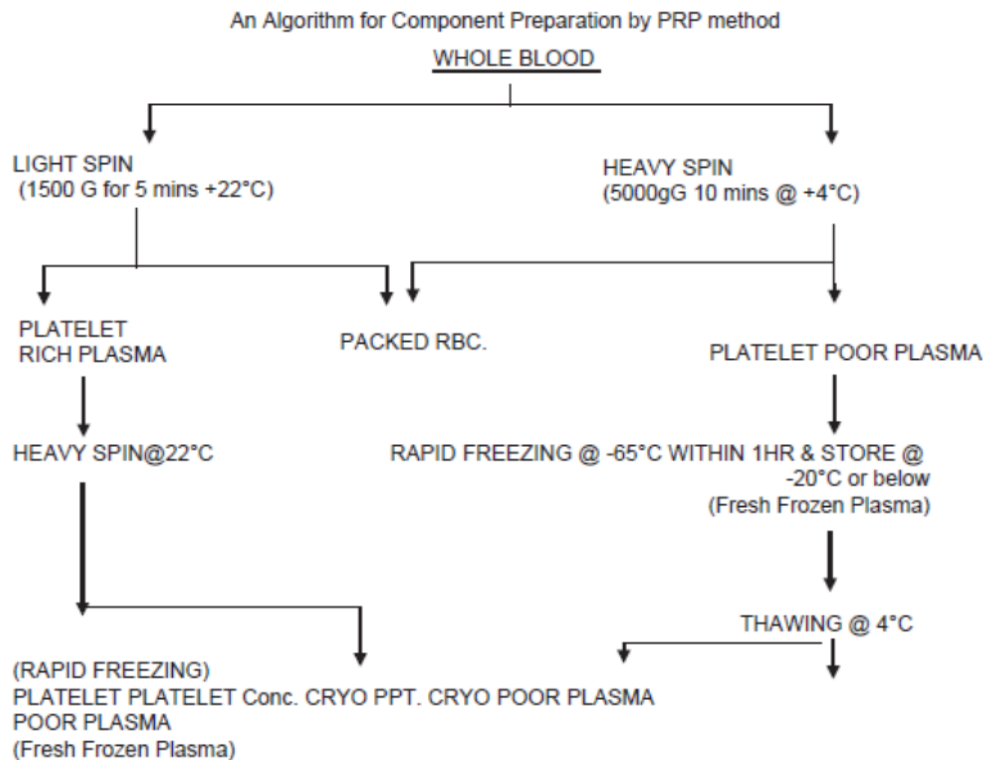
Ο αριθμός των περιεχόμενων αιμοπεταλίων στον ασκό ποικίλλει ανάλογα με την μέθοδο – τρόπο συλλογής τους:

- από μια μονάδα ολικού αίματος τυχαίου δότη (από PRP ή BC):  $0.45-0.85 \times 10^{11}$  αιμοπετάλια ανά ασκό
- από δεξαμενή BC (4-8 μονάδες τυχαίων δοτών): ελάχιστη περιεκτικότητα  $2.3 \times 10^{11}$  αιμοπετάλια ανά ασκό
- από αφαίρεση: ελάχιστη περιεκτικότητα  $2 \times 10^{11}$  αιμοπετάλια ανά ασκό

Ως προϊόν τα αιμοπετάλια αφαίρεσης πλεονεκτούν καθώς η συλλογή είναι επαρκής από έναν μόνο δότη και συνεπώς μειώνεται ο κίνδυνος μετάδοσης λοιμώξεων και αλλοευαισθητοποίησης μετά την μετάγγιση, ενώ για τη συλλογή ισοδύναμου αριθμού αιμοπεταλίων από ολικό αίμα τυχαίων δοτών απαιτούνται 4-8 μονάδες. Ενδεικτικό και άξιο αναφοράς είναι ότι μετά την μετάγγιση ενός ασκού αιμοπεταλίων από μία μονάδα ολικού αίματος τυχαίου δότη αναμένεται αύξηση του αριθμού PLT 7-10.000/ $\mu\text{L}$  ενώ ύστερα από την μετάγγιση ενός ασκού αιμοπεταλίων αφαίρεσης αναμένεται αύξηση 30-40.000/ $\mu\text{L}$ . [102 -103]

Τα ανακτηθέντα αιμοπετάλια παρασκευάζονται από πρόσφατο ολικό αίμα. Ειδικότερα από μονάδα ολικού αίματος, αποθηκευμένη για έως και 24 ώρες σε συνθήκες θερμοκρασίας μεταξύ  $+ 20^\circ \text{C}$  και  $+ 24^\circ \text{C}$ . Περιέχουν το μεγαλύτερο αριθμό αιμοπεταλίων της αρχικής μονάδας σε θεραπευτικά δραστική μορφή. [44,47,52]

Ανάκτηση από πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (Platelet rich plasma – PRP): η μονάδα ολικού αίματος φυγοκεντρείται σε χαμηλές στροφές έτσι ώστε να διατηρηθεί ο βέλτιστος αριθμός αιμοπεταλίων στο πλάσμα ενώ τα λευκοκύτταρα και ερυθροκύτταρα καθιζάνουν σε ένα καθορισμένο επίπεδο. Το πλάσμα που προκύπτει από αυτήν την φυγοκέντρωση ως υπερκείμενο είναι το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP). Ακολουθεί φυγοκέντρωση υψηλών στροφών κατά την οποία κατακρημνίζονται τα αιμοπετάλια του PRP. Έπειτα απομακρύνεται το υπερκείμενο πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια και τα αιμοπετάλια που έχουν καθιζάνει επανεναιωρούνται σε 50-70 mL πλάσματος. Παρά την απλότητα της μεθόδου ένας σημαντικός περιορισμός είναι η ανάγκη δεξαμενοποίησης πολλών συμπυκνωμάτων αιμοπεταλίων προκειμένου να επιτευχθεί μία θεραπευτικά δραστική δόση ενήλικα. [47,56,99]



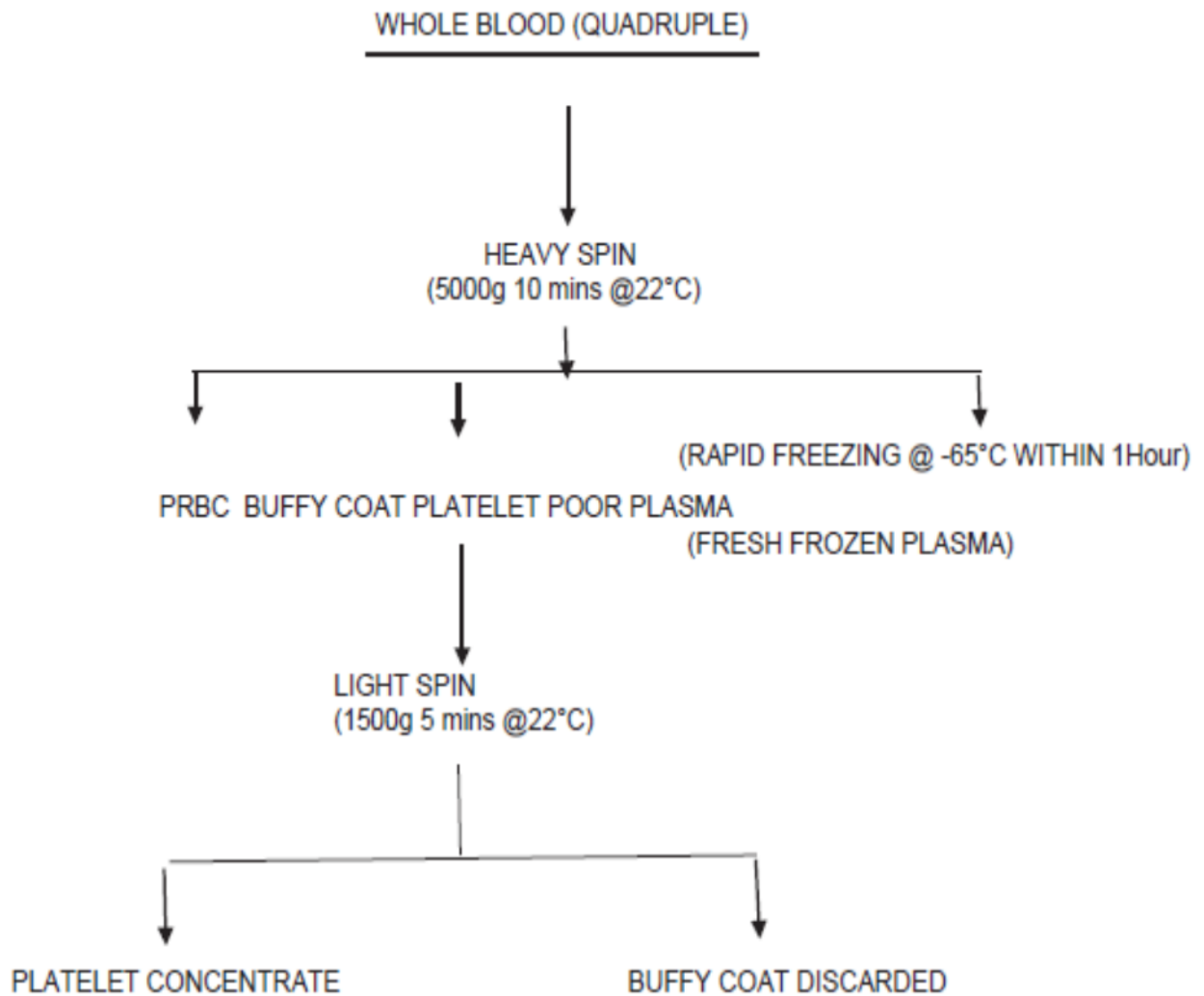
Εικόνα 6: Αλγόριθμος παρασκευής συμπυκνωμάτων με PRP, Πηγή: Basu D, Kulkarni R. Overview of blood components and their preparation. *Indian J Anaesth* 2014;58:529-37.

Ανάκτηση από στιβάδα λευκοκυττάρων (Buffy coat): Μονάδα πρόσφατου ολικού αίματος φυγοκεντρείται σε υψηλές στροφές (hard spin) έτσι ώστε να καθιζάνουν όλα τα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια και τα λευκοκύτταρα ως ίζημα τοποθετούνται πάνω από την επιφάνεια του ιζήματος των ερυθροκυττάρων σχηματίζοντας την στιβάδα λευκοκυττάρων (Buffy Coat). Έπειτα συλλέγονται 4 – 8 ABO/Rh συμβατά buffy coats, δεξαμενοποιούνται (pool) και αραιώνονται σε αυτόλογο πλάσμα ή κρυσταλλοειδές διάλυμα. Αυτά υποβάλλονται σε εκ νέου φυγοκέντρηση χαμηλών στροφών (soft spin) όπου το πλούσιο σε αιμοπετάλια υπερκείμενο διατηρείται ως συμπύκνωμα αιμοπεταλίων ενώ το ίζημα λευκών και ερυθρών αιμοσφαιρίων αποβάλλεται. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της μεθόδου buffy coat είναι η δυνατότητα επιλογής του κατάλληλου προσθετικού διαλύματος ως διαλύτη για την βελτίωση του μεταβολισμού των αιμοπεταλίων κατά την αποθήκευση καθώς και για την μείωση της εμφάνισης αντιδράσεων από την χορήγηση μεγάλων όγκων πλάσματος.

Ως πλεονεκτήματα της μεθόδου της στιβάδας λευκοκυττάρων BC θεωρούνται πως είναι η μέγιστη ανάκτηση πλάσματος, καθώς και η μειωμένη ποσότητα πλάσματος στα ερυθρά. Ωστόσο αναφορικά για τα

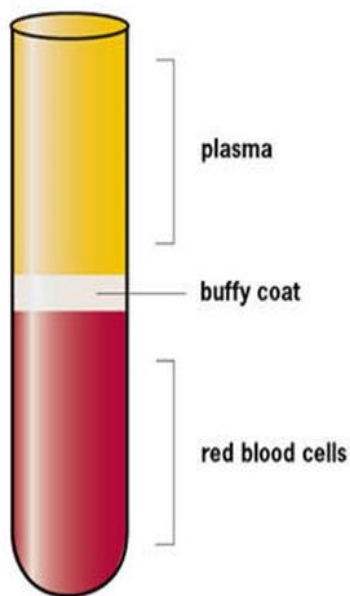
αιμοπετάλια, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο τεχνικών ανάκτησης, αν και τα PRP θεωρούνται από αρκετούς κατώτερης ποιότητας.[99-102]

### Buffy coat method

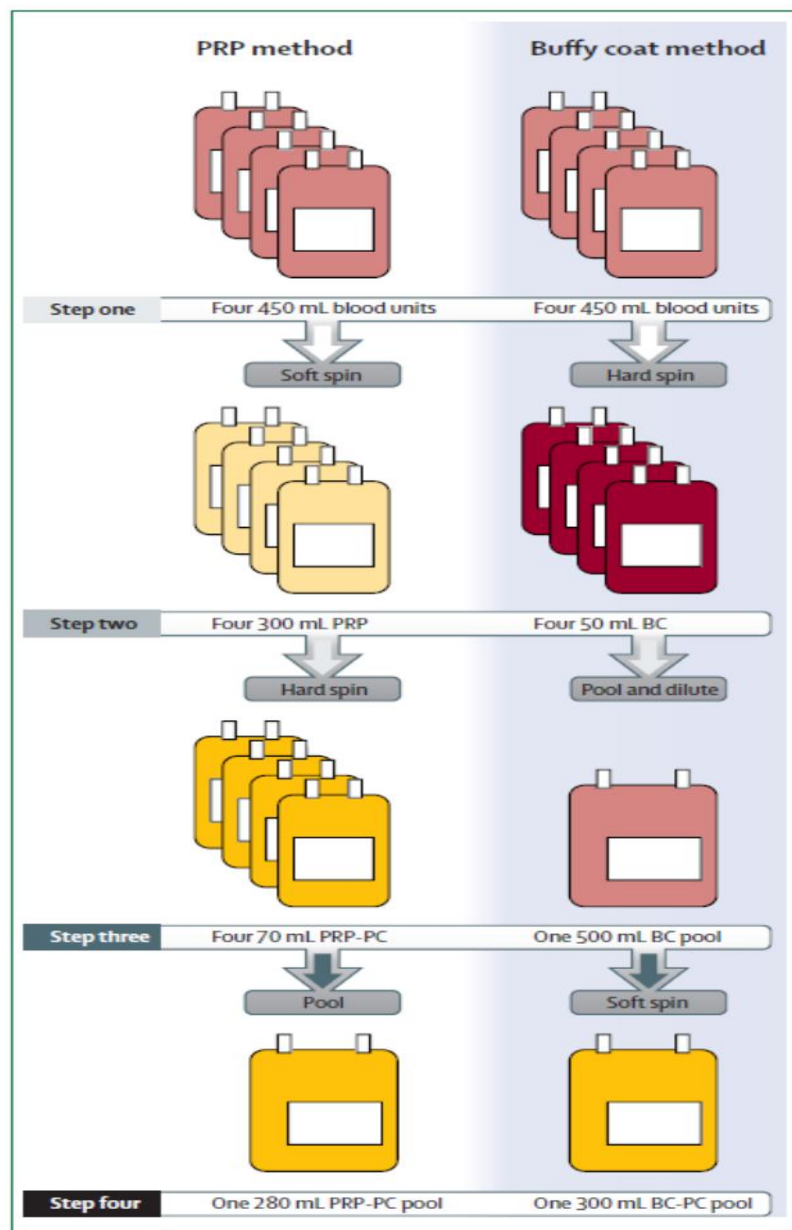


Εικόνα 7: Αλγόριθμος παράσκευής συμπληκνωμάτων μέσω μεθόδου Buffy coat. Πηγή: Basu D, Kulkarni R. Overview of blood components and their preparation. Indian J Anaesth 2014;58:529-37.





Εικόνα 9: Διαχωρισμός αίματος από φυγοκέντρηση. Πηγή: stanfordbloodcenter.org



Εικόνα 8: Σύγκριση μεθόδων PRP και BC. Πηγή: Stroncek DF, Rebull P: Platelet transfusions. Lancet 2007; 370:427–438

### 2.3 Προϊόντα αιμοπεταλίων

Ανακτηθέντα αιμοπετάλια μίας μονάδας ολικού αίματος (Recovered SU – Rec, SU): είναι παρασκεύασμα αιμοπεταλίων που προέρχεται από μια μονάδα ολικού αίματος. Περιέχει την πλειονότητα του αρχικού αριθμού αιμοπεταλίων, εναιωρημένων σε πλάσμα. Τα ΑΜΠ (Rec, SU) περιέχουν περισσότερα από  $60 \times 10^9$  αιμοπετάλια. Ο αριθμός των εναπομείναντων λευκοκυττάρων είναι  $0,2 \times 10^9$  κύτταρα στην περίπτωση που

παρασκευάζονται με τη μέθοδο του PRP και έως  $0,05 \times 10^9$  λευκοκύτταρα, εάν παρασκευαστούν με τη μέθοδο του buffy coat αντίστοιχα. Συντηρούνται σε θερμοκρασία μεταξύ  $+20$  και  $+24$  °C υπό συνεχή ανακίνηση προκειμένου να διασφαλιστεί η μέγιστη βιωσιμότητα και λειτουργικότητά τους. Υπό αυτές τις συνθήκες δύνανται να αποθηκευτούν έως και 5 ημέρες ενώ ο χρόνος αποθήκευσης μπορεί να μεγιστοποιηθεί στις 7 ημέρες εφόσον μπορεί να επιτευχθεί έγκαιρη ανίχνευση και αντιμετώπιση βακτηριακής μόλυνσης. Η τιμή του pH είναι  $>6.4$  ( $+22$ °C). Η χρήση των ΑΜΠ (Rec, SU) ενδείκνυται για μετάγγιση νεογνών και βρεφών ενώ για να επιτευχθεί μία πρότυπη δόση ενήλικα απαιτούνται 4 -6 μονάδες του συγκεκριμένου παραγώγου.[47]

Ανακτηθέντα αιμοπετάλια δεξαμενής - pool (Platelets, Recovered, Pooled - Rec, Pool): Παράγωγο αιμοπεταλίων προερχόμενο από 4 -6 μονάδες ολικού αίματος. Ο ελάχιστος αριθμός αιμοπεταλίων που περιέχει είναι  $2 \times 10^{11}$  ενώ ο μέγιστος αριθμός λευκοκυττάρων είναι  $1 \times 10^9$ . Παράγονται είτε από τα Buffy coats των μονάδων ολικού αίματος είτε από την δεξαμενοποίηση (pool) 4 -6 μονάδων ΑΜΠ (Rec, SU). Οι συνθήκες συντήρησης και αποθήκευσης είναι οι ίδιες με τα ΑΜΠ (Rec, SU) ενώ σε περίπτωση που τα ΑΜΠ (Rec, Pool) παρασκευαστούν σε ανοιχτό σύστημα ο χρόνος αποθήκευσής τους δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος των 6 ωρών.

Ανακτηθέντα αιμοπετάλια δεξαμενής - pool, λευκαφαιρεμένα (Platelets, Recovered, Pooled, Leucocyte-Depleted - Rec, Pool, LD): Πρόκειται ουσιαστικά για παράγωγο ΑΜΠ (Rec, Pool) που κατά την διαδικασία παρασκευής του έχει υποστεί λευκαφαίρεση. Ο ελάχιστος αριθμός αιμοπεταλίων που περιέχονται σε μία μονάδα ΑΜΠ (Rec, Pool, LD) είναι  $2 \times 10^{11}$  ενώ αντίστοιχα ο μέγιστος αριθμός λευκοκυττάρων είναι  $1 \times 10^6$ . Η λευκαφαίρεση επιτυγχάνεται με διήθηση μέσω φίλτρων. Το φιλτράρισμα των λευκοκυττάρων συνιστάται κατά προτίμηση πριν την αποθήκευση του παραγώγου ή έστω λίγο πριν την μετάγγιση. Οι συνθήκες συντήρησης και αποθήκευσης παραμένουν οι ίδιες.

Ανακτηθέντα αιμοπετάλια δεξαμενής - pool, σε προσθετικό διάλυμα (Rec, Pool, AS): Παρασκεύασμα αιμοπεταλίων το οποίο προκύπτει από 4 -6 μονάδες ολικού αίματος. Περιέχει την πλειονότητα του αρχικού αριθμού αιμοπεταλίων, εναιωρημένο σε ένα μίγμα αποτελούμενο από πλάσμα (30 -40%) και προσθετικό διάλυμα -AS (60- 70%). Περιλαμβάνει αριθμό αιμοπεταλίων  $2 \times 10^{11}$  κατ' ελάχιστον ενώ αντίστοιχα μέγιστο αριθμό λευκοκυττάρων  $0.3 \times 10^9$ . Παρασκευάζεται με την μέθοδο buffy coat με τέτοιο τρόπο ώστε 4- 6 συμβατά κλάσματα δεξαμενοποιούνται υπό άσηπτες συνθήκες και εν συνεχεία εναιωρούνται σε προσθετικό διάλυμα.

Ανακτηθέντα αιμοπετάλια δεξαμενής - pool, λευκαφαιρεμένα σε προσθετικό διάλυμα (Rec, Pool, LD-AS): Πρόκειται για παράγωγο αιμοπεταλίων

όμοιο με τα ΑΜΠ (Rec, Pool, AS) που έχει υποστεί λευκαφαίρεση. Λόγω της τελευταίας ο μέγιστος αριθμός λευκοκυττάρων είναι  $1.0 \times 10^6$  κύτταρα ενώ ο ελάχιστος αριθμός αιμοπεταλίων όπως και οι συνθήκες συντήρησης και αποθήκευσης παραμένουν ίδια με τα υπόλοιπα ΑΜΠ ανάκτησης. Τα ΑΜΠ (Rec, Pool, LD-AS) παρασκευάζονται από κλάσματα Buffy coat και εν συνεχεία ακολουθεί λευκαφαίρεση με διήθηση μέσω φίλτρων. Η τελευταία συνίσταται να γίνεται έως και 6 ώρες μετά την παρασκευή και πριν την αποθήκευση.

Αιμοπετάλια δεξαμενής- pool , μετά από μείωση – αδρανοποίηση παθογόνων (Pool, PR): Παράγωγο αιμοπεταλίων προερχόμενο από 4 -6 μονάδες ολικού αίματος. Ο ελάχιστος αριθμός αιμοπεταλίων που περιέχει είναι  $2 \times 10^{11}$  ενώ ο μέγιστος αριθμός λευκοκυττάρων είναι  $1 \times 10^6$ . Περιέχει την πλειονότητα του αρχικού αριθμού αιμοπεταλίων, εναιωρημένο σε ένα μίγμα αποτελούμενο από πλάσμα (30 -40%) και προσθετικό διάλυμα – AS (60- 70%).

Στη συνέχεια ακολουθεί επιπλέον επεξεργασία με εγκεκριμένη και επικυρωμένη τεχνική αδρανοποίησης παθογόνων (pathogen reduction technology - PRT). Με χρήση της τελευταίας επιτυγχάνεται η ελαχιστοποίηση της πιθανότητας μόλυνσης με ιούς (πχ EBV, HCV, HIV) και βακτήρια (εκτός βακτηριακών σπόριων). Μάλιστα κάποιες τεχνικές αδρανοποίησης έχει αποδειχτεί ότι αδρανοποιούν τα λεμφοκύτταρα οπότε σε αυτές τις περιπτώσεις δεν απαιτείται ακτινοβολία του παραγώγου προκειμένου να αποφευχθεί η αντίδραση μοσχεύματος εναντίον ξενιστή μετά μετάγγιση (TA-GvHD).

Η παρασκευή γίνεται μέσω της μεθόδου buffy coat όπως και στα υπόλοιπα παράγωγα ενώ οι απαιτούμενες συνθήκες συντήρησης και αποθήκευσης παραμένουν οι ίδιες. Μέθοδοι αδρανοποίησης όπως το σύστημα Intercept Cerus χρησιμοποιώντας έναν χημικό παράγοντα (amotosalen) ο οποίος ενεργοποιείται από UVA, κατορθώνουν να κλειδώσουν το DNA ή RNA των παθογόνων δεσμεύοντας τα νουκλεϊκά οξέα, συνθήκη που οδηγεί στην αδυναμία πολλαπλασιασμού αυτών.

Αιμοπετάλια αφαίρεσης ( Aph): Λαμβάνονται από έναν δότη με την χρήση αυτοματοποιημένης διάταξης διαχωρισμού κυττάρων. Το αντιπηκτικό που χρησιμοποιείται είναι το ACD (acid-citrate-dextrose). Τα αιμοπετάλια δεσμεύονται από την συσκευή του διαχωρισμού ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος επιστρέφουν μέσω του κυκλώματος στον δότη. Τα ΑΜΠ (Aph) ως παρασκεύασμα περιέχουν κατ' ελάχιστο αριθμό αιμοπεταλίων  $2 \times 10^{11}$  ενώ ο μέγιστος αριθμός λευκοκυττάρων είναι  $0.3 \times 10^9$ . Συντηρούνται σε θερμοκρασία μεταξύ  $+ 20$  και  $+ 24$  ° C υπό συνεχή ανακίνηση. Υπό αυτές τις συνθήκες δύνανται να αποθηκευτούν έως και 5 ημέρες ενώ ο χρόνος αποθήκευσης μπορεί να μεγιστοποιηθεί στις 7 ημέρες

εφόσον μπορεί να επιτευχθεί έγκαιρη ανίχνευση και αντιμετώπιση βακτηριακής μόλυνσης.

Η τιμή του pH είναι  $>6.4$  ( $+22^{\circ}\text{C}$ ). Τα αιμοπετάλια αφαίρεσης ανάλογα με τις τεχνικές επεξεργασίας στις οποίες υπόκεινται (λευκαφαίρεση, προσθήκη θρεπτικών συστατικών, αδρανοποίηση) ή και με συνδυασμό αυτών, διακρίνονται και σε άλλα παράγωγα. Οι συνθήκες συντήρησης και αποθήκευσης για όλα τα παράγωγα αιμοπεταλίων που πτοκούνται από αφαίρεση παραμένουν οι ίδιες.

Αιμοπετάλια αφαίρεσης, λευκαφαιρεμένα (Aph, LD): Είναι αιμοπετάλια που έχουν αφαιρεθεί από τον δότη χρησιμοποιώντας αυτοματοποιημένο εξοπλισμό σε συνδυασμό με επεξεργασία λευκαφαίρεσης. Χρησιμοποιείται πρωτόκολλο φυγοκέντρωσης και διήθησης ή και άλλων τεχνικών για την μείωση των λευκοκυττάρων κατά την διαδικασία της αφαίρεσης αιμοπεταλίων. Ο ελάχιστος αριθμός των αιμοπεταλίων είναι ο ίδιος με τα υπόλοιπα παράγωγα ενώ ο μέγιστος αριθμός λευκοκυττάρων διαμορφώνεται σε  $1 \times 10^6$  κύτταρα.

Αιμοπετάλια αφαίρεσης σε προσθετικό διάλυμα (Aph, AS): Παράγονται κατά την ίδια αρχή μεθόδου με τα υπόλοιπα ΑΜΠ από αφαίρεση με την διαφορά ότι αποθηκεύονται σε μίγμα πλάσματος (30 -40%) και πρόσθετου διαλύματος – AS (60- 70%). Ο ελάχιστος αριθμός που περιέχονται στο παράγωγο είναι  $2 \times 10^{11}$  ενώ ο μέγιστος αριθμός λευκοκυττάρων είναι  $0.3 \times 10^9$  κύτταρα.

Αιμοπετάλια από αφαίρεση, λευκαφαιρεμένα σε προσθετικό διάλυμα (Aph, LD-AS): Παράγωγο που έχει προκύψει με την μέθοδο της αιμοπεταλιοαφαίρεσης, έχει υποστεί λευκαφαίρεση και είναι εναιωρημένο σε μίγμα πλάσματος και πρόσθετου διαλύματος. Περιέχει ελάχιστο αριθμό αιμοπεταλίων  $2 \times 10^{11}$  και μέγιστο αριθμό λευκοκυττάρων  $1 \times 10^6$  κύτταρα.

Αιμοπετάλια αφαίρεσης, μετά από μείωση – αδρανοποίηση παθογόνων (Aph, PR): Πρόκειται για παρασκεύασμα που έχει προκύψει με την μέθοδο της αιμοπεταλιοαφαίρεσης. Τα αιμοπετάλια είναι εναιωρημένα σε πλάσμα ή σε μίγμα πλάσματος και πρόσθετου διαλύματος. Τα αιμοπετάλια υφίστανται επεξεργασία για αδρανοποίηση παθογόνων με κάποια εγκεκριμένη τεχνολογία αδρανοποίησης (PRT). Και εδώ προβλέπεται ως ελάχιστος ο αριθμός αιμοπεταλίων  $2 \times 10^{11}$  και ως μέγιστος αριθμός λευκοκυττάρων  $1 \times 10^6$  κύτταρα.

Κρυοσυντηρημένα αιμοπετάλια (Cryo): Είναι παράγωγο που παρασκευάζεται με την κατάψυξη ΑΜΠ (Aph, LD) έως και 24 ώρες μετά την λήψη χρησιμοποιώντας κρυοσυντηρικό παράγοντα. Κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται δύο τεχνικές κρυοσυντήρησης

α) χρησιμοποιώντας DMSO (6% w/v) ή

β) χρησιμοποιώντας γλυκερόλη (5%w/v)

Τα ΑΜΠ (Cryo) πρέπει να έχουν όγκο 50 – 200ml και μετά την ανασύστασή τους περιέχουν περισσότερα από το 40% του αρχικού προϊόντος προ κατάψυξης. Πριν από τη χορήγηση, τα αιμοπετάλια αποψύχονται, πλένονται και επαναιωρούνται σε αυτόλογο πλάσμα ή σε ανάλογο προσθετικό διάλυμα. Τα ΑΜΠ (Cryo) καταψύχονται σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$  όταν αποθηκεύονται σε ηλεκτρικό καταψύκτη και στους  $-150^{\circ}\text{C}$  με αποθήκευση σε υγρό άζωτο. Συνίσταται εφόσον πρόκειται να αποθηκευτούν για άνω του ενός έτους να καταψύχονται στη δεύτερη θερμοκρασία ( $-150^{\circ}\text{C}$ ).

## **2.4 Εναλλακτικοί τρόποι αποθήκευσης αιμοπεταλίων**

Ο συνηθισμένος τρόπος αποθήκευσης των ασκών των αιμοπεταλίων είναι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος υπό ανακίνηση. Πάρα ταύτα τα τελευταία χρόνια πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με εναλλακτικούς τρόπους αποθήκευσης των ασκών των αιμοπεταλίων, κυρίως με γνώμονα την θερμοκρασία αποθήκευσης.

### **2.4.1 Αποθήκευση αιμοπεταλίων σε ψύξη (Cold-PLTs).**

Η ψύξη στους  $2-8^{\circ}\text{C}$  είναι ο πιο γνωστός εναλλακτικός τρόπος αποθήκευσης, κυρίως λόγω της βακτηριακής επιμόλυνσης του ασκού, στην θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί βρέθηκε ότι τα αποθηκευμένα σε ψύξη αιμοπετάλια (COLD-PLTs) απομακρύνονται πιο γρήγορα από την κυκλοφορία μετά τη μετάγγιση από τα ηπατοκύτταρα και τα μακροφάγα με αποτέλεσμα να μειώνεται ο χρόνος ημίσειας ζωής τους, περίπου 1,3 ημέρες σε σύγκριση με τις 4 ημέρες των αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αιμοπεταλίων (RT-PLTs). Αυτό συμβαίνει ενδεχομένως λόγω των αλλοιώσεων που υφίστανται τα αιμοπετάλια κατά την ψυχρή αποθήκευση.[104,105]

Στον αντίποδα, υπάρχουν και μελέτες που έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα, ως προς την αποτελεσματικότητα των αιμοπεταλίων που έχουν αποθηκευτεί σε ψύξη. Συγκεκριμένα, τα αποθηκευμένα σε ψύξη αιμοπετάλια (Cold-PLTs), φαίνεται να έχουν αυξημένες αιμοστατικές ικανότητες, αν και αυτό συνοδεύεται από αυξημένο σχηματισμό μικροσωματιδίων.[106]

### 2.4.1.1 Λειτουργικότητα αποθηκευμένων αιμοπεταλίων σε ψύξη (Cold-PLTs)

Πέραν της επιβίωσης των αιμοπεταλίων απαιτείται, τα αιμοπετάλια μετά την ψυχρή αποθήκευση, να είναι λειτουργικά. Η αποτελεσματικότητα των συγκεκριμένων αιμοπεταλίων συνδέεται τόσο με την λειτουργικότητα όσο και με την ποιότητά τους, σε ασθενείς με αιμορραγία. Αυτό όμως, είναι δύσκολο να μετρηθεί και επομένως, έχουν εισαχθεί διάφορα εναλλακτικά *in vitro* και *in vivo* μέτρα αιμοστατικής λειτουργίας. Τα μέτρα αυτά αποσκοπούν στην αξιολόγηση της ικανότητας των αιμοπεταλίων να εκτελούν τις βασικές τους λειτουργίες *in vivo*, δηλαδή να ενεργοποιούνται, να προσκολλώνται και να συσσωρεύονται, αφού μεταγγιστούν, στο λήπτη. Όλες οι μέθοδοι αποθήκευσης αιμοπεταλίων αξιολογούνται χρησιμοποιώντας συνδυασμό *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* με τη χρήση ζωικών μοντέλων ή εθελοντών ανθρώπων. Ωστόσο, υπάρχει μια κακή κατανόηση του τρόπου με τον οποίο αυτές οι μελέτες συνδέονται με την ανάκτηση, την επιβίωση και αιμοστατική αποτελεσματικότητα όταν τα αιμοπετάλια μεταγγίζονται σε θρομβοκυτοπενικούς ή ενεργούς αιμορραγικούς ασθενείς.[107 – 109].

Ένας κοινώς χρησιμοποιούμενος *in vitro* δείκτης είναι η έκφραση των υποδοχέων της επιφάνειας αιμοπεταλίων, η μέτρηση των οποίων γίνεται χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρία ροής. Οι σημαντικότεροι από αυτούς τους υποδοχείς έχουν αναφερθεί στο κεφάλαιο 2.1. Ενδεικτικά αναφέρονται οι συνηθέστερα μετρούμενοι υποδοχείς οι οποίοι είναι οι γλυκοπρωτείνες GPIb, GPIIb-IIIa, η P-σελεκτίνη και η φωσφατιδυλοσερίνη. Σε αυτούς τους υποδοχείς έχουν παρατηρηθεί μεταβολές κατά την διάρκεια της ψυχρής αποθήκευσης εν μέρει λόγω της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.[110]

Υπάρχουν διαθέσιμοι, διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων που σχετίζονται με την προσκόλληση, την συσσώρευση, την δημιουργία θρομβίνης και γενικά της αιμοστατικής ικανότητας *in vitro*. [107 -109] Η απόκριση στην συσσώρευση είναι η πιο συχνή μέτρηση, η οποία όμως δεν συσχετίζεται με την ανάκτηση αιμοπεταλίων και την επιβίωση τους μετά τη μετάγγιση.[107] Επίσης ελάχιστα στοιχεία υπάρχουν σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο η μέτρηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων *in vitro* συνδέεται με την αιμοστατική αποτελεσματικότητα *in vivo*. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η *in vitro* συσσώρευση είναι μετρίως καλά συνδεδεμένη με τα αποτελέσματα συσσώρευσης σε ένα μοντέλο μεταγγίσεως *ex vivo*, [111], ενώ κλινικά, κατά την εκτέλεση καρδιοχειρουργικών επεμβάσεων, η μέθοδος μεταβολής αντίστασης συσσώρευσης αιμοπεταλίων (*impedance aggregometry*) είναι στενά συνδεδεμένη με την αιμορραγία

και την μετάγγιση.[112-113] Αυτό υποδηλώνει ότι αυτές οι *in vitro* δοκιμασίες της λειτουργικότητας μπορεί να είναι ένας χρήσιμος δείκτης της αιμοστατικής αποτελεσματικότητας αλλά όχι της ανάκτησης και επιβίωσης, αν και απαιτείται περαιτέρω τεκμηρίωση αυτών των μεθόδων.

Η αιμοστατική αποτελεσματικότητα μετά τη μετάγγιση μπορεί να εκτιμηθεί σε εθελοντές με τη μέτρηση του χρόνου ροής, με τη δοκιμασία αυτή μετράται ο χρόνος που απαιτείται μέχρι να σταματήσει η ροή του αίματος, μετά από προτυποποιημένη τομή ορισμένου μήκους και βάθους στο δέρμα [107]. Ενώ αυτό είναι μια άμεση εκτίμηση της *in vivo* αιμοστατικής λειτουργίας, υπάρχουν πολλές μεταβλητές που επηρεάζουν το παραπάνω αποτέλεσμα και για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιείται σπάνια. Εναλλακτικά, ζωικά μοντέλα παρέχουν ελεγχόμενες, τυποποιημένες συνθήκες για δοκιμή της αιμοστατικής αποτελεσματικότητας *in vivo*, αλλά με κάποιους περιορισμούς που οφείλονται στις μεταξύ των ειδών διαφορές. Η αποτελεσματικότητα διαφόρων προϊόντων αιμοπεταλίων στον έλεγχο της ενεργού αιμορραγίας έχει δοκιμαστεί σε μια ποικιλία ζωικών μοντέλων[107].

#### **2.4.2 Κατεψυγμένα Αιμοπετάλια (Frozen PLTs)**

Γενικά είναι γνωστοί διάφοροι μέθοδοι κρυοσυντήρησης των κυττάρων του αίματος και έχουν χρησιμοποιηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η αποθήκευση του αίματος στην κατεψυγμένη κατάσταση παρουσίαζε έναν από τους εναλλακτικούς τρόπους αποθήκευσης των συστατικών του αίματος και η δυνατότητα αυτή διερευνήθηκε εντατικά κατά τη δεκαετία του 1950 και του 1960, όταν η διάρκεια ζωής των μη καταψυγμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων δεν ξεπερνούσε τις 21 ημέρες εκείνη την εποχή. Αυτός ο περιορισμός του χρόνου μείωσε σημαντικά την ευελιξία της χρήσης των προϊόντων RBC και συνέβαλε στη δραματικά υψηλή σπατάλη τους, που έφθασε το 30%. Η σύντομη διάρκεια ζωής των RBCs είχε ως αποτέλεσμα οι υπηρεσίες μετάγγισης να μην είναι σε θέση να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις των εξελισσόμενων χειρουργικών ειδικοτήτων, ιδιαίτερα της καρδιαγγειακής χειρουργικής και της χειρουργικής ογκολογίας. Στη στρατιωτική και επείγουσα υγειονομική περίθαλψη, η χρησιμοποίηση αυτών των προϊόντων λόγω του περιορισμένου χρόνου αποθήκευσης ήταν ακόμη πιο περίπλοκη και σχεδόν αδιάνοητη. Επομένως, η αποθήκευση των κατεψυγμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων παρουσίαζε μια πολλά υποσχόμενη προοπτική[114]

Επιπλέον θεραπευτικά προβλήματα περιπτώσεων ανοσο-αιματολογίας μπορούν να επιλυθούν με την αποθήκευση σπάνιων ομάδων αίματος, αποθήκευση αυτόλογου αίματος για ασθενείς με σπάνια ερυθροκυτταρικά και αιμοπεταλιακά αντιγόνα και αποθήκευση αυτόλογου αίματος σε

ασθενείς με αλλοαντισώματα ερυθρών αιμοσφαιρίων ή HLA / HPA αιμοπεταλίων. [114]

Εάν ο σύντομος χρόνος αποθήκευσης και η διάρκεια ζωής μπορεί να είναι προβληματικός στα φρέσκα ερυθρά αιμοσφαίρια, αυτό το μειονέκτημα ενισχύεται σημαντικά στα πρότυπα προϊόντα αιμοπεταλίων. Τα νωπά αιμοπετάλια, που φυλάσσονται σε θερμοκρασία 20-24 ° C, έχουν διάρκεια ζωής 5-7 ημέρες. Αυτό αποκλείει την παραγωγή μεγαλύτερων προμηθειών και καθιστά την υλοποίησή τους, τη διανομή και τη χρήση τους δυσκολότερη. Αυτό είναι ιδιαίτερα περιοριστικό για τα κέντρα τραύματος, τις επείγουσες εισαγωγές στο νοσοκομείο και τις μονάδες εντατικής θεραπείας που ασχολούνται με περιπτώσεις μαζικών αιμορραγιών. Εξαιρετικά δύσκολη είναι η εφαρμογή της μετάγγισης αιμοπεταλίων στην στρατιωτική ιατρική, στις απομακρυσμένες περιοχές και στην προ-νοσοκομειακή περίθαλψη.

Η ανεξέλεγκτη αιμορραγία είναι η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου σε ασθενείς με σοβαρά τραύματα. Στα θύματα της μάχης με σοβαρή απώλεια αίματος, τα αιμοπετάλια είναι συχνά ελλιπή λόγω απώλειας αίματος και επειδή τα αιμοπετάλια καταναλώνονται κατά τη διάρκεια της πήξης του αίματος. Επίσης σε πολλές περιπτώσεις, τα κατεψυγμένα αιμοπετάλια χορηγούνται προφυλακτικά και οι αυτόλογες ή HLA / HPA κατεψυγμένες αιμοπεταλιακές μεταγγίσεις έχουν καταστεί σημαντικό μέρος της υποστηρικτικής φροντίδας των λευχαιμικών ασθενών κατά τη διάρκεια της θεραπείας συντήρησης και επαναπρόσληψης, όταν υπάρχει αλλοανοσοποίηση. Στις μέρες μας όλες οι προαναφερόμενες καταστάσεις αναγκών καθιστούν την κρυσυντήρηση των αιμοπεταλίων ως ένα σημαντικό πεδίο μελέτης και έρευνας.

#### **2.4.2.1 Μέθοδοι κρυσυντήρησης των κυττάρων του αίματος**

Η προστασία των κυττάρων από την κατάψυξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη κρυοπροστατευτικών ουσιών. Δεδομένου ότι αυτά τα κρυοπροστατευτικά συνήθως προκαλούν σημαντική αύξηση της ώσμωσης, είναι απαραίτητο να παρακολουθούνται όλες οι διαδικασίες και να ελέγχονται οι ωσμωτικές μεταβολές, προκειμένου να αποφευχθεί μια μη αναστρέψιμη βλάβη στις κυτταρικές δομές και τις μεμβράνες. [107] Κυρίως, ενδοκυτταρικά (διδεισδυτικά) κρυοπροστατευτικά, όπως γλυκερόλη και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), χρησιμοποιούνται για την κρυσυντήρηση των κυττάρων του αίματος. Αυτές οι ουσίες διεισδύουν στην κυτταρική μεμβράνη και δεν παρουσιάζουν κανένα τοξικό κίνδυνο για το κύτταρο όταν βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση. Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται κυρίως για την κρυσυντήρηση των ερυθρών



αιμοσφαιρίων και το DMSO για την κατάψυξη των αιμοπεταλίων καθώς και αιμοποιητικών κυττάρων. Ο μηχανισμός της επίδρασης των διεισδυτικών κρυοπροστατευτικών δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως.

Αρχικά, η βλάβη των κυττάρων συνδέθηκε μόνο με την επίδραση των κρυστάλλων πάγου. Οι κρυοπροστατευτικές ουσίες, παρότι περιορίζουν τη δημιουργία των κρυστάλλων τροποποιούν επίσης το σχήμα και το μέγεθος αυτών και επιπλέον μεταβάλλοντας την ιοντική τους αναλογία ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά εξαλείφουν επίσης τη βλάβη που προκαλείται από το ωσμωτικό σοκ, η οποία συμβαίνει κατά τη διάρκεια της κατάψυξης. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κατάψυξης, τα διεισδυτικά κρυοπροστατευτικά αυξάνουν την παραγωγή του ενδοκυτταρικού ύδατος, διατηρώντας την ωσμωτική ισορροπία σε ένα μερικώς παγωμένο εξωκυτταρικό διάλυμα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα όχι μόνο τη μείωση του όγκου των κυττάρων αλλά και τη μείωση του ωσμωτικού φορτίου.[114-116]

Τα εξωκυτταρικά (μη διεισδυτικά) κρυοπροστατευτικά είναι μακρομοριακές ουσίες οι οποίες λόγω της μοριακής μάζας τους, δεν διεισδύουν στην κυτταρική μεμβράνη και χρησιμοποιούνται κυρίως για γρήγορη και εξαιρετικά ταχεία κατάψυξη. Ο μηχανισμός του μη διεισδυτικού αποτελέσματος των κρυοπροστατευτικών προϊόντων έγκειται στην ικανότητά τους να σταθεροποιούν την κυτταρική μεμβράνη καθώς επίσης και στην αποκαλούμενη υαλοποίηση. Όταν υπάρχει νερό (με θερμοκρασία κάτω από τους 0 ° C) που μετατρέπεται σε πάγο, τα μη διεισδυτικά κρυοπροστατευτικά παραμένουν εκτός των κυττάρων, όπου εξασφαλίζουν τη δημιουργία διάκενων ανάμεσα στην κυτταρική μεμβράνη και το εξωκυτταρικό περιβάλλον. Οι ηλεκτρολύτες που διαχωρίζονται από τα διαλύματα ψύξης συγκεντρώνονται σε αυτές τις ενδιάμεσες θέσεις.[114]

#### **2.4.2.2 Κρυοπροστατευτικά ( CPAs)**

Το CPA, το οποίο είναι συνήθως ένα υγρό, μειώνει τη βλάβη κατάψυξης από τη διαδικασία κρυοσυντήρησης. Τα CPAs πρέπει να είναι βιολογικά αποδεκτά, να είναι ικανά να διεισδύσουν στα κύτταρα και να έχουν χαμηλή τοξικότητα.[117] Αναπτύχθηκαν διάφορα CPAs, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη μείωση της ποσότητας πάγου που σχηματίζεται σε οποιαδήποτε δεδομένη θερμοκρασία, ανάλογα με τον τύπο κυττάρων, την ψύξη και τον ρυθμό θέρμανσης.[117]. Για να επιτευχθεί ο καλύτερος ρυθμός επιβίωσης των κυττάρων και των ιστών, ο όγκος του δείγματος, ο ρυθμός ψύξης, ο ρυθμός θέρμανσης και οι συγκεντρώσεις των CPAs θα πρέπει να επιλεγούν ανάλογα με τους διαφορετικούς τύπους των κυττάρων και ιστών.[118] Πρέπει να αναφερθεί ότι η μακροσκοπική φυσική διάσταση του ιστού είναι ένα σημαντικό σημείο που πρέπει να οριστεί σε

ένα πρωτόκολλο κρυοσυντήρησης λόγω των περιορισμών μεταφοράς θερμότητας και μάζας σε αυτά τα συστήματα όγκων . Τα CPAs μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: (1) τα μεμβράνο- διαπερατά κρυοπροστατευτικά, όπως διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), γλυκερόλη, και 1,2-προπανοδιόλη. Και (2) τα με μή-μεμβρανική διαπερατότητα κρυοπροστατευτικά, όπως 2-μεθυλο-2,4-πεντανοδιόλη και πολυμερή όπως πολυβινυλοπυρρολιδόνη, υδροξυαιθυλο άμυλο και διάφορα σάκχαρα.[117-119]

Εκτός από τα συνθετικά χημικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν βιοϊλικά όπως αλγινικά, πολυβινυλική αλκοόλη και χιτοζάνη ώστε να εμποδίσουν την ανάπτυξη κρυστάλλων πάγου.[119] Η άμεση αναστολή του σχηματισμού κρυστάλλων πάγου και η εφαρμογή αντιοξειδωτικών και άλλων ενώσεων έχουν χρησιμοποιηθεί για την προσπάθεια να μειωθεί ο κυτταρικός θάνατος από διαδικασίες όπως η απόπτωση κατά τη διάρκεια του κύκλου κατάψυξης και απόψυξης.[120]

Τα κοινώς χρησιμοποιούμενα CPAs είναι α) η γλυκερόλη, β) το DMSO, γ) τα πολυμερή, και δ) οι πρωτεΐνες.

#### **2.4.2.3 Λειτουργικότητα κρυοσυντηρημένων αιμοπεταλίων**

Τα αιμοπετάλια μπορούν να καταψυχθούν χρησιμοποιώντας διάφορους τύπους κρυοπροστατευτικών: ενδοκυτταρικό (DMSO και γλυκερόλη) ή εξωκυτταρικό (hydroxyethyl starch HES και δεξτράνη). Η HES και η δεξτράνη βρέθηκαν ανεπαρκείς ως κρυοπροστατευτικά. Τα κρυοσυντηρημένα αιμοπετάλια σε γλυκερόλη έδωσαν χαμηλότερες τιμές απόδοσης και χαμηλή in vitro βιωσιμότητα σε σύγκριση με αυτές των αιμοπεταλίων που κρυοσυντήθηκαν σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), το οποίο είναι το πλέον κατάλληλο κρυοπροστατευτικό για τα αιμοπετάλια.

Το 1956, ο Klein και οι συνεργάτες του ανέφεραν τη χρήση κατεψυγμένων αιμοπεταλίων σε ενεργά αιμορραγικό θρομβοκυτταροπενικό ασθενή και από τότε έχουν αναφερθεί πολυάριθμες μελέτες τόσο για την in vitro όσο και για in vivo αποτελεσματικότητα των κρυοσυντηρημένων αιμοπεταλίων.[122]

Από τη μελέτη του Schiffer και των συνεργατών του, το 1976 σχετικά με τη χρήση αυτόλογων αιμοπεταλίων για τη θεραπεία ασθενών με λευχαιμία, οι σχετικές μελέτες μέχρι τη δεκαετία του 1990 έδειξαν ότι τα αιμοπετάλια υπέστησαν σημαντική βλάβη από τη διαδικασία ψύξης που μείωσε την αποτελεσματικότητά τους σε σύγκριση με τα νωπά αιμοπετάλια.[123] Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίχθηκαν από άλλες μελέτες που

αξιολόγησαν τις πρωτογενείς αιμοστατικές λειτουργίες των αιμοπεταλίων. Έχει αποδειχθεί ότι οι *in vivo* αιμοστατικές λειτουργίες των κρυοσυντηρημένων APC ήταν ανώτερες από τα φρέσκα διατηρημένα αιμοπετάλια. [124]

#### **2.4.2.4 Περιορισμοί κρυοσυντήρησης**

Παρόλο που υπάρχουν πολλές χρήσεις της τεχνικής κρυοσυντήρησης, τόσο στη βασική όσο και στην κλινική έρευνα, εξακολουθούν να υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί. Τα κύτταρα δεν μεταβολίζουν σχεδόν τίποτα σε χαμηλές θερμοκρασίες, το οποίο έχει αναπόφευκτες παρενέργειες, συμπεριλαμβανομένης μιας γενετικής απόκλισης προς βιολογικές παραλλαγές μεταβολών των λιπιδίων και πρωτεϊνών που σχετίζονται με το κύτταρο, τη κυτταρική δραστηριότητα και τη δομή. Εάν δεν υπήρχε όριο στην ποσότητα του κρυοπροστατευτικού διαλύματος που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί, τα κύτταρα θα διατηρούνταν σε καλύτερη κατάσταση. Σε συμβατικές όμως, ρυθμίσεις, τα ίδια τα CPA μπορεί να είναι επιβλαβή για τα κύτταρα, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα, υπάρχει η πιθανότητα ότι το DMSO να μπορεί να μεταβάλει τη σταθερότητα του χρωμοσώματος, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε κίνδυνο σχηματισμού όγκων. Εκτός από τις ενδογενείς μεταβολές στα κύτταρα, πρέπει να προληφθεί η πιθανή μόλυνση ή μόλυνση με κύτταρα όπως εκείνα των όγκων. [125]

#### **2.4.2.5 Χαρακτηριστικά και ποιότητα των κρυοσυντηρημένων αιμοπεταλίων**

Τα κατεψυγμένα αιμοπετάλια είναι αποτελεσματικά στην πρωτογενή αιμόσταση μετά την απόψυξη. Συνεισφέρουν αποτελεσματικά στη διακοπή της αιμορραγίας ως μέρος της σύνθετης θεραπείας μετάγγισης ή ανάνηψης του ελέγχου βλάβης σε πολυτραυματίες και σε ασθενείς με μαζική αιμορραγία. Μερικές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι μετά την ανασύσταση, η διάρκεια ζωής των κρυοσυντηρημένων αιμοπεταλίων χρησιμοποιώντας DMSO στην ανθρώπινη κυκλοφορία είναι συγκρίσιμη με τα συμβατικά αιμοπετάλια *in vitro*. [124,126,128]

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η ανασύσταση των κρυοσυντηρημένων αιμοπεταλίων στο αποψυγμένο πλάσμα, αλλά δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των αιμοπεταλίων που έχουν ανασυσταθεί σε άλλα διαλύματα, όπως αλατούχο ή PAS. [124,130]

Αν και τα κρυοσυντηρημένα αιμοπετάλια είναι αποτελεσματικά στην αιμόσταση, φαίνεται να εμφανίζουν έναν αριθμό λειτουργικών ελαττωματικών μεταβολών κατά την αποθήκευση και την προετοιμασία

για μετάγγιση. Η διαδικασία της κατάψυξης και απόψυξης προκαλεί αλλαγές στη μορφολογία των αιμοπεταλίων και επηρεάζει τη λειτουργία τους. Περίπου 15% των κρυσυντηρημένων αιμοπεταλίων έχασε την επιφανειακά δεσμευμένη GPIb, ενώ δεν υπήρξε μετρήσιμη απώλεια GPIIb / IIIa κατά τη διάρκεια της κρυσυντήρησης. Τα κρυσυντηρημένα αιμοπετάλια έδειξαν επίσης σημαντική μείωση στην ικανότητα συγκόλλησης με τη ριστοσετίνη, αλλά όχι απώλεια απόκρισης στον ισχυρότερο αγωνιστή, τη θρομβίνη. Παρόλο που τα ελαττώματα αυτά είναι μικρής κλινικής σημασίας και τα αιμοπετάλια που έχουν κρυσυντηρηθεί αποδεδειγμένα είναι ασφαλή και αποτελεσματικά για τη θεραπεία της αιμορραγίας, εξακολουθεί να είναι απαραίτητο να ληφθούν υπόψη οι αλλαγές αυτές.[131, 132]

Με χρήση δοκιμασίας κυτταρομετρίας ροής, φαίνεται ότι τα κατεψυγμένα αιμοπετάλια περιέχουν περίπου το 85% των σωματιδίων στην περιοχή των μικροκυστιδίων και μόνο το 15% περίπου των σωματιδίων στην περιοχή των αιμοπεταλίων. Για τα νωπά αιμοπετάλια, αυτή η αναλογία είναι περίπου 20% των μικροκυστιδίων και 80% των αιμοπεταλίων. Το ερώτημα είναι σε ποιο βαθμό οι αυξημένες υψηλότερες ποσότητες μικροκυστιδίων είναι υπεύθυνες για την παρατηρηθείσα υψηλότερη αιμοστατική αποτελεσματικότητα των κρυσυντηρημένων αιμοπεταλίων.

Επιπλέον, τα κρυσυντηρημένα αιμοπετάλια είναι σημαντικά μικρότερα από τα νωπά αιμοπετάλια και έχουν χαμηλότερη κατακόρυφη σκέδαση φωτός, αντανakλώντας όχι μόνο το μικρό τους μέγεθος αλλά και το σφαιρικό σχήμα τους. Σε αντίθεση με τα νωπά αιμοπετάλια, τα κατεψυγμένα αιμοπετάλια είναι εξαιρετικά θετικά για τη δέσμευση της Annexin V. Αυτό μπορεί να συνεισφέρει στην υψηλότερη δυναμική δημιουργίας θρομβίνης και σε χαμηλότερη διάρκεια παραμονής στην κυκλοφορία.[133]

Η κρυσυντήρηση των αιμοπεταλίων συνδέεται με την απελευθέρωση σωματιδίων της μεμβράνης αιμοπεταλίων και την παραγωγή θρομβίνης. Τα μικροκυστίδια που σχηματίζονται από την κρυσυντήρηση φέρουν φωσφατιδυλοσερίνη στην επιφάνειά τους και έτσι είναι φαινοτυπικά διαφορετικά από αυτά που βρέθηκαν πριν από την κατάψυξη. Τα κρυσυντηρημένα αιμοπετάλια παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδογενές δυναμικό θρομβίνης από τα νωπά αιμοπετάλια.[134]

Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η απελευθέρωση από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ουσιών που ενισχύουν την ανάπτυξη της δημιουργίας θρομβίνης λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της κρυσυντήρησης και της επακόλουθης ανασύστασης. Αυτό είναι ένα σύνολο λόγων για τους οποίους τα κατεψυγμένα αιμοπετάλια παρουσιάζουν αυξημένη προπηκτική δραστηριότητα που οδηγεί σε

ταχύτερο σχηματισμό θρόμβων με ταυτόχρονη μείωση της αντοχής του θρόμβου. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από τις μετρήσεις θρομβοελαστογραφίας. Οι καμπύλες TEG δείχνουν προφανώς μια μείωση στον χρόνο έναρξης της πήξης, δηλαδή μεγαλύτερη προπηκτική δραστηριότητα και γρηγορότερο σχηματισμό θρόμβου (ευρύτερη γωνία α), και μειωμένη λειτουργικότητα των κρυσυντηρημένων αιμοπεταλίων σε σύγκριση με εκείνη των νωπών αιμοπεταλίων (μειωμένη MCF/MCE και παράταση CFT) ωστόσο, επαρκής για την αρχική πήξη.[135]

Η προπηκτική ικανότητα, αυξάνεται περαιτέρω με την ανασύσταση σε κατεψυγμένο πλάσμα. Τα αιμοπετάλια που επαναιωρήθηκαν με αυτόν τον τρόπο είναι πιο αποτελεσματικά σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια που έχουν επαναιωρηθεί σε προσθετικό διάλυμα.

Μερικές παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δείχνουν διάσπαση της πλασματικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων και εμφάνιση μικροκυστιδίων στο 60% των αποψυγμένων αιμοπεταλίων. Περισσότερο από τα μισά εκ των κρυσυντηρημένων αιμοπεταλίων εμφανίζουν σημάδια βλάβης της μεμβράνης τους με σημαντική αύξηση της ρευστότητάς της, που προκαλείται μόνο από το 6% DMSO και από τη διαδικασία κατάψυξης και απόψυξης. Για να επιταχυνθεί η ανασύσταση των κρυσυντηρημένων αιμοπεταλίων στο πλάσμα, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί πλάσμα αποθηκευμένο σε θερμοκρασία 4 °C, πράγμα που σημαίνει ότι τα προϊόντα μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν εντός 15 λεπτών.

Η χορήγηση κρυσυντηρημένων αιμοπεταλίων συνήθως δεν ακολουθείται από οποιαδήποτε αύξηση στον αριθμό των αιμοπεταλίων, όπως στην περίπτωση των νωπών αιμοπεταλίων και η χρήση του διορθωμένου αριθμού αύξησης των αιμοπεταλίων (CCI) κατ' επέκταση είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθεί. για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορες αιτίες.

Πρώτον είναι η κατεστραμμένη δομή και το σχήμα των αποψυγμένων αιμοπεταλίων που συνδέονται με την υψηλότερη ποσότητα φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια τους, γεγονός που προφανώς συμβάλλει στον μικρότερο χρόνο επιβίωσης στην κυκλοφορία και οδηγεί στην άμεση κατανάλωσή τους σε κατά της αιμοστατικής διαδικασίας. Ένας άλλος λόγος μπορεί να είναι η πιο δύσκολη αντίχνευσή τους από τους αιματολογικούς αναλυτές. Στην ομάδα των ασθενών που μεταγγίσθηκαν με φρέσκα αιμοπετάλια, βρέθηκε σημαντικά υψηλότερος αριθμός αιμοπεταλίων στο περιφερικό αίμα σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν μεταγγισθεί με κρυσυντηρημένα αιμοπετάλια. Άλλες εργαστηριακές και κλινικές παράμετροι (κλινική αποτελεσματικότητα)

είναι συγκρίσιμες. Ωστόσο, αυτός είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους τα κρυσυντηρημένα παρασκευάσματα αιμοπεταλίων συνιστώνται κυρίως για υποκατάσταση σε καταστάσεις που σχετίζονται με σοβαρή αιμορραγία και λιγότερο για προφυλακτική θεραπεία θρομβοπενίας.

Είναι επίσης απαραίτητο να λάβουμε υπόψη τις διαφορές που σχετίζονται με τα κρυσυντηρημένα αιμοπετάλια, όπως τους παράγοντες πήξης με δεσμό μεμβράνης V και X, τον αυξημένο σχηματισμό θρομβοζάνης B2 και τη σημαντική παρουσία των απελευθερωμένων μικροσωματιδίων. Ωστόσο, αυτές οι παρατηρήσεις είναι απίθανο να έχουν μεγάλη κλινική σημασία για τη χρήση των κρυσυντηρημένων αιμοπεταλίων στη θεραπεία της μαζικής αιμορραγίας, ιδιαίτερα όσον αφορά οποιαδήποτε πιθανή επίδραση στη δράση της πήξης.

Παρομοίως, η κλινική αποτελεσματικότητα δεν επηρεάζεται από τον μειωμένο αριθμό αιμοπεταλίων στο παρασκεύασμα ή από τον χαμηλότερο ρυθμό ανάκτησης μετά την απόψυξη. Αυτά αντισταθμίζονται επαρκώς από μια συγκρίσιμη διάρκεια ζωής στην κυκλοφορία του ασθενούς, όπως δείχνουν προηγούμενες κλινικές μελέτες σε υγιείς εθελοντές.

Σε μελέτες που έχουν δημοσιευθεί μέχρι τώρα, δεν αναφέρθηκαν σοβαρές αντιδράσεις μετά τη χορήγηση κατεψυγμένων αιμοπεταλίων. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε ούτε αρνητική επίδραση λόγω της αυξημένης αιμοστατικής δραστηριότητας των κρυσυντηρημένων αιμοπεταλίων.[137-138]

#### **2.4.2.6 Χρήση και προοπτικές των κρυσυντηρημένων αιμοπεταλίων**

Η κρυσυντήρηση και η αποθήκευση των κατεψυγμένων αιμοπεταλίων μπορεί να παρατείνει σημαντικά (ή απεριόριστα) τη διάρκεια ζωής τους. Έτσι, τα κατεψυγμένα αιμοπετάλια παρέχουν μακρόχρονη διαθεσιμότητα σε καταστάσεις όπου τα φρέσκα και γηγενή προϊόντα δεν αρκούν ή δεν υπάρχει τρόπος απόκτησης αυτών. Η παραγωγή των κρυσυντηρημένων αιμοπεταλίων δεν είναι τεχνολογικά απαιτητική και επιπλέον μπορούν εύκολα να αποψυχθούν και να ανασυσταθούν.

Η πρώιμη μαζική και σύνθετη θεραπεία μετάγγισης, εξαιρουμένης της υποκατάστασης ερυθροκυττάρων, συμβάλλει σημαντικά στη διόρθωση του αιμοστατικού μηχανισμού και στην ελάττωση της αιμορραγίας. Η ταχεία χορήγηση ολόκληρου του φάσματος προϊόντων μετάγγισης αποδεικνύεται ότι έχει θετικό αντίκτυπο στην επιβίωση των ασθενών. Επομένως, τα περισσότερα από τα πρωτόκολλα πρωτογενούς μετάγγισης και οι διαδικασίες αιμοστατικής αναζωογόνησης βασίζονται στη

συγχορήγηση ερυθροκυττάρων και πλάσματος, συμπληρωμένα με μετάγγιση αιμοπεταλίων. [139, 140]

Η διαθεσιμότητα των αιμοπεταλίων για την έγκαιρη εφαρμογή ενός σύγχρονου μαζικού πρωτοκόλλου μετάγγισης κατά την έναρξη της αιμορραγίας είναι συχνά προβληματική. Επιπλέον, τα περισσότερα νοσοκομεία δεν μπορούν να αντέξουν οικονομικά να έχουν μόνιμα διαθέσιμα αιμοπετάλια λόγω της σύντομης λήξης και του υψηλού κόστους. Ακόμη και τα πανεπιστημιακά νοσοκομεία και τα μεγάλα κέντρα μπορεί να βιώσουν περιορισμένη διαθεσιμότητα αιμοπεταλίων σε περιπτώσεις επείγουσας ανάγκης για μεγάλες ποσότητες. Η διασφάλιση της διαθεσιμότητας των αιμοπεταλίων στα στρατιωτικά νοσοκομεία, κατά τις περιόδους στρατιωτικών επιχειρήσεων, είναι ακόμα πιο προβληματική.

Αν και η διαδικασία αποψύξεως και ανασύστασης περιγράφει τη χρήση ενός στείρου συγκολλητή σωληνώσεων ασκών κατά τη σύνδεση των ασκών των αιμοπεταλίων και πλάσματος, η χρήση μιας αποστειρωμένης συσκευής σύνδεσης δεν είναι απαραίτητη. Στις τράπεζες αίματος που δεν διαθέτουν αυτή την τεχνολογία, είναι εφικτό να συνδέονται οι ασκοί χρησιμοποιώντας απλές σωληνώσεις με αιχμές και στα δύο άκρα.

Η σχετικά βραχεία διάρκεια ζωής των κρυοσυντηρημένων αιμοπεταλίων (2 χρόνια) βασίζεται στην ευρωπαϊκή οδηγία και δεν έχει πραγματική αποδεικτική βάση. Τα στοιχεία από μια μελέτη που διεξήχθη σε εργαστήριο της Militaire Bloedbank στο Leiden της Νότιας Ολλανδίας βρίσκονται υπό επεξεργασία. Σύμφωνα με τις προκαταρκτικές πληροφορίες, τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν τη δυνατότητα παράτασης της διάρκειας ζωής για τουλάχιστον 4 χρόνια. Η διάρκεια ζωής 6 ωρών, μετά την απόψυξη και την ανασύσταση, βασίζεται στο γεγονός ότι η διαδικασία προσθήκης του DMSO πριν από την κατάψυξη δεν λαμβάνει χώρα σε ένα εντελώς κλειστό σύστημα και ταυτόχρονα επιτρέπει τη χρήση σωληνώσεων για να προστεθεί το μέσο επαναιώρησης. Εάν το DMSO παρασκευαστεί σε ασκό, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο συγκολλητή, θα ήταν δυνατό να παραταθεί η διάρκεια ζωής των κρυοσυντηρημένων αιμοπεταλίων ακόμα και μετά την ανασύσταση.

Τα τελευταία χρόνια, υπήρξε σχετικά μεγάλο ενδιαφέρον για τα κρυοσυντηρημένα αιμοπετάλια ως ένα πολλά υποσχόμενο προϊόν αίματος, το οποίο χρησιμοποιείται, ελέγχεται και επικυρώνεται σε πολλές χώρες και ιδρύματα. Επομένως, τα κρυοσυντηρημένα αιμοπετάλια αποτελούν μια κατάλληλη εναλλακτική λύση, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί από την Ολλανδική Στρατιωτική Υπηρεσία Υγείας και άλλες χώρες για κάποιο χρονικό διάστημα.[141] Η εύκολη διαθεσιμότητα, η συμβατότητα, η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των κρυοσυντηρημένων προϊόντων βελτίωσαν σημαντικά τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με πολεμικά

τραύματα που αντιμετωπίστηκαν κατά τη διάρκεια διεθνών αποστολών στα ολλανδικά νοσοκομεία του στρατού το 2001-2012. Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα αποθήκευσης συμβατών αιμοπεταλίων HLA / HPA, σπάνιων ομάδων αιμοπεταλίων καθώς και αυτόλογων αιμοπεταλίων.

### **2.4.3 Κυκλική Θέρμανση Αιμοπεταλίων (TC)**

Ο McGill απέδειξε ότι οι μεταβολές που προκαλούνται από την ψυχρή θερμοκρασία στα αιμοπετάλια κατά την αποθήκευση είναι αναστρέψιμες με την αναθέρμανση, αν η έκθεση στο κρύο (4° C) διαρκεί λιγότερο από 18 ώρες.[142] Οι Xu και συνεργάτες επανεξέτασαν τις επιδράσεις της κύκλικής θέρμανσης με την αποθήκευση των αιμοπεταλίων στο κρύο για 12 ή 24 ώρες και στη συνέχεια επώαση στους 37 ° C για 30 λεπτά πριν επιστρέψουν στην ψυκτική αποθήκευση (αιμοπετάλια με κύκλους θερμοκρασίας ,TC-PLTs ).[143] Τα TC-PLT στις 12 ώρες, αλλά όχι και στις 24 ώρες, δεν έχασαν το δισκοειδές σχήμα τους, είχαν αυθόρμητη συσσωμάτωση, διατήρησαν μια φυσιολογική ανταπόκριση στη συσσώρευση που προκλήθηκε από αγωνιστή, διατήρησαν την ικανότητά τους για ανάκτηση ωσμωτικού σοκ και παρέμειναν στην κυκλοφορία, σε σοβαρές περιπτώσεις μικτών ανοσοανεπαρκειών σε ποντίκια, περισσότερο από τα αποθηκευμένα αιμοπετάλια σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν τα εν ψυχρώ αποθηκευμένα αιμοπετάλια και τα TC-PLTs επισημάνθηκαν με φθορισμό, τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν εν ψυχρώ κατά προτίμηση απομακρύνθηκαν από το ήπαρ ενώ τα TC-PLTs έτειναν να συσσωρεύονται στο σπλήνα όπως τα RT αιμοπετάλια.

### **2.4.4 Ανασυσταμένα (Λυοφιλοποιημένα) Αιμοπετάλια**

Μελέτες με επανυδατωμένα λυοφιλοποιημένα PLTs έγιναν αρχικά στη δεκαετία του 1950. Ωστόσο, μελέτες σε πειραματόζωα με τα διαθέσιμα παρασκευάσματα στη συνέχεια απέτυχαν να δείξουν οποιαδήποτε αιμοστατική αποτελεσματικότητα *in vivo*. Στη δεκαετία του 1990 χρησιμοποιήθηκαν πλυμένα PLTs με 1.8% παραφορμαλδεΐδη, κατεψυγμένα σε 5% αλβουμίνη και ακολούθως λυοφιλοποιημένα σε προκλινικές δοκιμές. [144] Τα επανυδατωμένα λυοφιλοποιημένα PLTs είναι δομικά παρόμοια στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με τα φρέσκα PLTs και έχουν αποδειχθεί ότι εκφράζουν στο μεγαλύτερο μέρος των αιμοπεταλίων, γλυκοπρωτεΐνες, αν και σε μειωμένη συγκέντρωση / πυκνότητα. Οι μεμβράνες των ανασυσταθέντων, λυοφιλοποιημένων PLT



εμφανίζονται ικανές να υποστηρίξουν την δημιουργία θρομβίνης και την αύξηση της εναπόθεσης φωσφόρου σε εκτεθειμένο υποενδοθήλιο σε πειραματικά μοντέλα αγγειακής αιμάτωσης. In vitro, τα επανυδατωμένα λυοφιλοποιημένα PLTs έχουν αξιολογηθεί σε ζώϊκά μοντέλα και έχουν αποδειχθεί ότι είναι αιμοστατικά αποτελεσματικά σε ζώα με θρομβοπενία. [145] Η διάρκεια της αιμοστατικής δράσης τους in vitro είναι βραχεία (περίπου 4-6 ώρες) και εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή τους με τον FVIIa. [146-148] Τα λυοφιλοποιημένα PLTs συνήθως παρασκευάζονται από 5-10 μονάδες της ομάδας O αιμοπεταλίων, που έχουν υποβληθεί σε λευκαφαίρεση με την παρουσία τρεαλόζης ως κρυοπροστατευτικό. [149]. Παρέχονται σε λυοφιλοποιημένη μορφή, μπορούν να ετοιμαστούν για χρήση σε 5 σε 10 λεπτά με την προσθήκη αποστειρωμένου ύδατος και έχουν αποδείξει τη διατήρηση των βασικών χαρακτηριστικών που απαιτούνται για τον σχηματισμό θρόμβου, την πρωταρχική προσκόλληση στη θέση του τραυματισμού που οδηγεί σε συσσώρευση, την παραγωγή θρομβίνης, τη δέσμευση του ινωδογόνου, τον σχηματισμό ινικής και την επούλωση του τραύματος. [150] Η προκαταρκτική ανάλυση ασφαλείας, χρησιμοποιώντας εξαιρετικά μικρές δόσεις freeze-dried αιμοπεταλίων, δεν έχει εντοπίσει κανένα σημαντικό σήμα ασφαλείας (χειρόγραφο υπό αναθεώρηση). Μια ανοιχτή μελέτη φάσης I, κλιμακούμενης, κλινικής δόσης, βρίσκεται υπό εξέταση (NCT03394755) σε αιματολογικούς / ογκολογικούς ασθενείς με θρομβοπενία.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3.1 Απόπτωση κυττάρων

Η απόπτωση, ή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι ένας ενεργειακά εξαρτώμενος φυσιολογικός μηχανισμός που ρυθμίζει τη διάρκεια ζωής των κυττάρων και χρησιμεύει για ελεγχόμενη διαγραφή κατεστραμμένων ή «ανεπιθύμητων» κυττάρων ως απόκριση σε διαφορετικά ερεθίσματα. Η κυτταρική απόπτωση αρχικά ανακαλύφθηκε από τον Kerr και τους συνεργάτες του το 1972 [152] για να περιγράψει έναν μορφολογικά διακριτό μηχανισμό «διαγραφής κυττάρων», ενώ πλέον είναι πολύ καλά τεκμηριωμένη σε βιοχημικό επίπεδο. Συνιστά μια προγραμματισμένη διαδικασία κυτταρικού θανάτου, την οποία χρησιμοποιούν σχεδόν όλοι οι κυτταρικοί τύποι για ανάπτυξη και μορφογένεση, για τον έλεγχο του αριθμού των κυττάρων και για την εξάλειψη των ασθενών ή και γηρασμένων αυτών. Από την ανακάλυψή της και για τα επόμενα χρόνια η κυτταρική απόπτωση ως διαδικασία

αποδόθηκε αποκλειστικά σε εμπύρηνια κύτταρα. Αναφέρεται σε δύο συγκλίνουσες οδούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου: την εξωγενή και την ενδογενή. Αυτά δεν πρέπει να μπερδεύονται ή να συγχέονται με άλλους προγραμματισμένους τρόπους θανάτου των κυττάρων, όπως η πυρόπτωση (με τη μεσολάβηση κασπάσης-1 και γκασδερίνης), νεκρόπτωση (μεσολαβούμενη από τις RIP κινάσες και την ψευδοκινάση Mkl), ή σιδηρόπτωση (μεσολαβούμενη από υπεροξειδωση λιπιδίων εξαρτώμενη από σίδηρο) [151-156]

### **3.1.1 Ενδογενής, εξαρτώμενη από τα μιτοχόνδρια, οδός.**

Τα μιτοχόνδρια αποδείχτηκε ότι βρίσκονται στο επίκεντρο της ενδογενούς οδού απόπτωσης, ενσωματώνοντας έναν αριθμό προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών σημάτων. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες BCL-2 (BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W και A1) διατηρούν την κυτταρική βιωσιμότητα με άμεσο και έμμεσο περιορισμό των προ-αποπτωτικών BAK και BAX, των δύο πρωτεϊνών των οποίων η λειτουργία καθορίζει την πορεία ενδογενούς απόπτωσης. Κατά την έκθεση σε στρες ή αναπτυξιακές ενδείξεις, τα αντι-αποπτωτικά σήματα κατακλύζονται, επιτρέποντας στα BAK και BAX να ενεργοποιηθούν, με αποτέλεσμα να ολιγομερίζονται στην μιτοχονδριακή εξωτερική μεμβράνη και να σχηματίζουν πόρους, απελευθερώνοντας μιτοχονδριακά συστατικά συμπεριλαμβανομένου του κυτοχρώματος c. Το τελευταίο ενεργοποιεί τον αποπτωτικό καταρράκτη κασπάσης, ο οποίος ξεκινά με τον εκκινητή κασπάση-9, και καταλήγει στην ενεργοποίηση των τελεστών, κασπάση-3 και κασπάση-7. Αυτά τα δύο ένζυμα διασπών εκατοντάδες (δυναμικά χιλιάδες) ενδοκυτταρικά υποστρώματα με αποτέλεσμα βλάβη στο DNA, καταστολή της μεταγραφής και μετάφρασης πρωτεϊνών και την απενεργοποίηση πολλών άλλων βασικών κυτταρικών διεργασιών.[153, 155-157]

### **3.1.2 Εξωγενής οδός απόπτωσης**

Η εξωκυτταρική οδός ενεργοποιείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ συνδετών θανάτου (που ανήκουν στην υπεροικογένεια του παράγοντα νέκρωσης όγκων - TNF) και στους υποδοχείς TNF της κυτταρικής επιφάνειας. Ξεκινά από την έκκριση «συνδετών θανάτου» της υπεροικογένειας TNF, όπως ο FasL, που συνδέονται με την εξωκυτταρική περιοχή των υποδοχέων θανάτου (CD95 ή Fas, στην περίπτωση του FasL), διεγείροντας έτσι το σχηματισμό του σύμπλεγματος σηματοδότησης θανάτου (DISC). Το DISC διευκολύνει την πρωτεολυτική διάσπαση και την ενεργοποίηση της κασπάσης-8, η οποία μπορεί να θανατώσει τα κύτταρα τύπου I (π.χ. λεμφοκύτταρα) απευθείας, ενεργοποιώντας τις

κασπάσες-3/7. Στα κύτταρα τύπου 2 (π.χ. ηπατοκύτταρα), απαιτείται η πρόσθετη στρατολόγηση της ενδογενούς οδού για την πρόκληση κυτταρικού θανάτου. Αυτό επιτυγχάνεται από την κάθαρση, μέσω της κασπάσης 8, της πρωτεΐνης BID, η οποία στη συνέχεια κινητοποιεί άμεσα την ενεργοποίηση BAK / BAX [155-156]

Πλήθος δεικτών έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση της απόπτωσης στα εμπύρηννα κύτταρα. Τέτοιοι δείκτες απόπτωσης είναι η συμπύκνωση χρωματίνης, ο κατακερματισμός DNA και πυρηνική διάσπαση, η κατάρρευση εσωτερικής μεμβράνης μιτοχονδρίων ( $\Delta\Psi_m$ ) και σχηματισμός πόρων μετάπτωσης μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP), η ενεργοποίηση κασπασών, η μετατόπιση φωσφατιδυλοσερίνης (PS) από το εσωτερικό στον εξωτερικό φλοιό μεμβράνης πλάσματος, η συρρίκνωση των κυττάρων καθώς και η απόρριψη κυστιδίων (αποπτωτικά σώματα). Στα εμπύρηννα κύτταρα, η αποπόλωση  $\Delta\Psi_m$  έχει οριστεί ως ανάντη (upstream) δείκτης απόπτωσης ενώ ως κατάντη (downstream) δείκτες ορίζονται η εξωτερίκευση PS και οι μορφολογικές μεταβολές στο επίπεδο ολόκληρου του κυττάρου, όπως συρρίκνωση κυττάρων και απόρριψη κυστιδίων. Οι τελευταίοι δείκτες (downstream) χαρακτηρίζουν την τελική «φάση αποδόμησης» της απόπτωσης.[151-153]

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

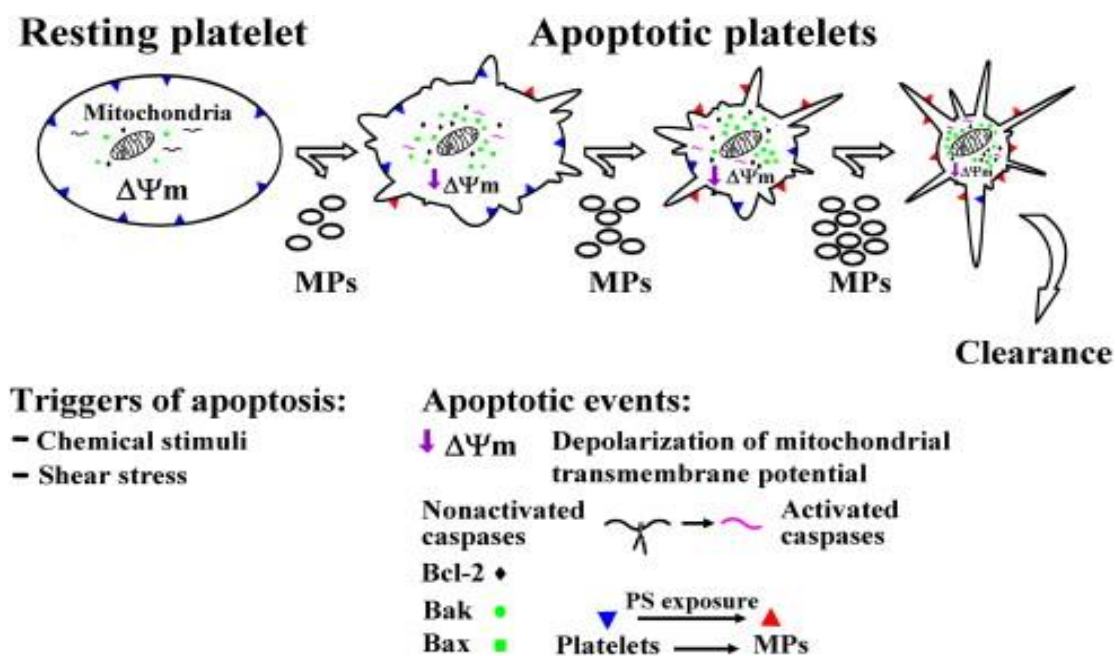
#### 4.1 Απόπτωση αιμοπεταλίων

Ύστερα από την ανακάλυψη της απόπτωσης στα εμπύρηννα κύτταρα μεσολάβησαν παραπάνω από 20 έτη μέχρι την απόδειξη του μηχανισμού απόπτωσης στα αιμοπετάλια. Από την πρωτοποριακή μελέτη του Vanags και των συνεργατών του το 1997 [158] ακολούθησε πλήθος δημοσιεύσεων σχετικά με την απόπτωση αιμοπεταλίων, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης που προκαλείται από χημικά ερεθίσματα και πολύ υψηλές τάσεις διάτμησης, καθώς και την απόπτωση που προκλήθηκε από τη γήρανση των αιμοπεταλίων τόσο *in vitro* και όσο και *in vivo*.

Πλέον έχει αναφερθεί αυξημένη απόπτωση αιμοπεταλίων σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων, όπως ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα (ITP), σύνδρομο Bernard – Soulier, χρόνια ουραιμία, λοίμωξη από το βακτηρίδιο *Helicobacter pylori*, ελονοσία και διαβήτη τύπου 2 σε ανθρώπους, και ζωικά μοντέλα. Διάφορα μοντέλα απόπτωσης αιμοπεταλίων έχουν περιγραφεί συμπεριλαμβανομένων της ενδογενούς οδού απόπτωσης, της εξωγενούς αλλά και της επίδρασης στην απόπτωση ,επιφανειακών υποδοχέων των αιμοπεταλίων όπως του ενεργοποιημένου με πρωτεάση υποδοχέα 1 (PAR-1), των GPIIbIIIa και του GPIIb. [151,153,155]

Διάφοροι παράγοντες μπορούν να πυροδοτήσουν την κυτταρική απόπτωση των αιμοπεταλίων και κατά συνέπεια την ανίχνευση των ανάλογων δεικτών απόπτωσης όπως αποπόλωση μιτοχονδριακού δυναμικού ( $\Delta\Psi_m$ ), έκφραση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl 2, ενεργοποίηση των κασπασών (3 και 9), έκθεση PS, σχηματισμός μικροκυστιδίων(MP) που προέρχονται από αιμοπετάλια καθώς και συρρίκνωση του αιμοπεταλίου. Η απόπτωση των αιμοπεταλίων μπορεί να προκληθεί από πολλαπλά χημικά εξωκυτταρικά ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένων των αγωνιστών αιμοπεταλίων θρομβίνης και ιονοφόρου ασβεστίου A23187, προ-αποπτωτικών αντισωμάτων κατά των αιμοπεταλίων, παράγοντα von Willebrand (VWF) σε συνδυασμό με το αντιβιοτικό ristocetin, μιμητές του «BH3-μόνο» της οικογένειας προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και άλλα χημικά ερεθίσματα , καθώς και

από έκθεση αιμοπεταλίων σε πολύ υψηλές παθολογικές καταμητικές τάσεις ( Very high shear stress). Αυτά τα χημικά και φυσικά ερεθίσματα προκαλούν μετασχηματισμό της κατάστασης των ήρεμων αιμοπεταλίων από μη-αποπτωτική σε αποπτωτική κατάσταση.[151, 153]



Εικόνα 10: Μοντέλο απόπτωσης και κάθαρσης αιμοπεταλίων που προκαλείται από χημικά ερεθίσματα και τάσεις διάτμησης. Πηγή: Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev.* 2012 Mar;26(2):51-63. doi: 10.1016/j.blre.2011.10.002. *Epub* 2011 Nov 4. PMID: 22055392.

Λόγω των μεταβολών στην μεμβράνη τους, τα προβληματικά αιμοπετάλια μπορούν να αναγνωριστούν από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα ως «ανεπιθύμητα» κύτταρα και έπειτα αφαιρούνται από την κυκλοφορία. Όπως προαναφέρθηκε για τα υπόλοιπα κύτταρα έτσι και στα αιμοπετάλια περιγράφονται διαφορετικές οδοί που κινητοποιούν την απόπτωση τους, αντίστοιχες με αυτές των άλλων κυττάρων. Η ενδογενής οδός απόπτωσης που εξαρτάται από τα μιτοχόνδρια στα αιμοπετάλια έχει μελετηθεί και τεκμηριωθεί καλά. Σε αντίθεση με την ενδογενή οδό απόπτωσης αιμοπεταλίων δεν είναι απολύτως σαφές εάν η απόπτωση στα αιμοπετάλια μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω της εξωγενούς οδού.[151,153,154]

Εκτός από την ενεργοποίηση της ενδογενούς οδού απόπτωσης, χημικά ερεθίσματα και ρεολογικές δυνάμεις προκαλούν κατάντη εξω-μιτοχονδριακές αποπτωτικές αποκρίσεις, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης του εκτελεστή κασπάση-3, διάσπασης της γελσολίνης και άλλων κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών. Έχει επίσης αναφερθεί ότι το

TPEN και η ρεσβερατρόλη προκαλούν ενεργοποίηση της κασπάσης-8.[151,153]

Η έκθεση των κυκλοφορόντων αιμοπεταλίων σε αποπτογενή χημικά ερεθίσματα και υψηλές παθολογικές καταταμητικές τάσεις μπορεί να προκαλέσει πολλές εκδηλώσεις απόπτωσης αιμοπεταλίων, συμπεριλαμβανομένης της έκφρασης PS στην μεμβρανική επιφάνεια, και των αποπτωτικών συμβάντων της τελικής «φάσης αποδόμησης» της απόπτωσης η οποία χαρακτηρίζεται από συρρίκνωση κυττάρων και απόρριψη MPs, οδηγώντας στην κάθαρση των αποπτωτικών αιμοπεταλίων από την κυκλοφορία. Η εξωγενής οδός της απόπτωσης αιμοπεταλίων έχει μελετηθεί για φρέσκα συμπυκνώματα αιμοπεταλίων (PC) και παρασκευάσματα αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται υπό διάφορες συνθήκες στις τράπεζες αίματος.[153]

#### 4.2 Δείκτες απόπτωσης

Ανάλογα με τη φύση του παράγοντα απόπτωσης, ο μετασχηματισμός του αιμοπεταλίου σε αποπτωτική κατάσταση συνοδεύεται από διέγερση διαφόρων αποπτωτικών συμβάντων, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν[151,153]:

- αποπόλωση μιτοχονδριακού δυναμικού ( $\Delta\Psi_m$ )
- σχηματισμό πόρων μετάπτωσης μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP),
- έκφραση, ενεργοποίηση και μετατόπιση των προ-αποπτωτικών μελών της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 ( Bax, Bak και Bid) στα μιτοχόνδρια,
- απελευθέρωση αποπτογόνου κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτοσόλιο,
- ενεργοποίηση κασπάσων,
- διάσπαση πρωτεϊνών κυτταροσκελετού,
- έκθεση PS στον εξωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης,
- συρρίκνωση αιμοπεταλίων,
- απελευθέρωση μικροκυστιδίων (MP) αιμοπεταλίων και
- σχηματισμός διογκώσεων (blebbing) και προσεκβολών (filopod) στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων .

#### **Μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό δυναμικό ( $\Delta\Psi_m$ )**

Το μιτοχονδριακό δυναμικό εσωτερικής μεμβράνης ( $\Delta\Psi_m$ ) είναι το κύριο συστατικό ανάπτυξης ηλεκτροχημικού δυναμικού πρωτονίων ( $\Delta\mu H$ ) κατά

μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, και ως εκ τούτου αποτελεί μία σημαντική παράμετρο για την αξιολόγηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι οι αλλαγές ή η κατάρρευση του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού η οποία επέρχεται από διάφορους παράγοντες. Σε φυσιολογικά μη κατεστραμμένα κύτταρα, τα μιτοχόνδρια έχουν υψηλό ΔΨm. Η διάσπαση του ΔΨm είναι χαρακτηριστική της πρόιμης απόπτωσης. Τα αιμοπετάλια περιέχουν μιτοχόνδρια που διασφαλίζουν το μεταβολισμό της ενέργειας τους. Όπως και σε άλλα κύτταρα, το ΔΨm σε αιμοπετάλια μπορεί να μετρηθεί με τους ανιχνευτές JC-1 και DiOC6 . Συγκεκριμένα στα αιμοπετάλια η αποπόλωση του ΔΨm μπορεί να επέλθει ύστερα από επεξεργασία με παράγοντες που προκαλούν μεταξύ των άλλων αποπτωτική τάση όπως η έκθεση των αιμοπεταλίων σε θρομβίνη καθώς και η έκθεση σε ιονοφόρο ασβέστιο A23187.[151,153]

### Πρωτεΐνες Bcl-2

Οι πρωτεΐνες Bcl-2 σχηματίζουν μία μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών που είτε προάγουν είτε αναστέλλουν την απόπτωση. Η οικογένεια αυτών των πρωτεϊνών χωρίζεται συνήθως σε τρεις ομάδες ανάλογα με τη δομική ομολογία και τη λειτουργία τους. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2, Bcl-XL και την πρωτεΐνη κυτταρικής διαφοροποίησης 1 (Mcl-1). Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, Bcl-2-πρωτεΐνη X (Bax) και τον ομόλογο ανταγωνιστή Bcl-2 (Bak). Η τρίτη ομάδα είναι επίσης προαποπτωτική και περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Bcl-2 ομολογίας 3 (BH3-μόνο), συμπεριλαμβανομένων των αλληλοεπιδρώντων μεσολαβητών Bcl-2 του κυτταρικού θανάτου (Bim), του ανταγωνιστή Bcl-2 του κυτταρικού θανάτου (Bad) και του Bcl-2- αλληλοεπιδρώντος φονέα (Bik). Μια ομοιότητα σχεδόν όλων των μελών αυτής της οικογένειας είναι η ικανότητα ρύθμισης της διαπερατότητας των ενδοκυτταρικών μεμβρανών στα ιόντα και τις πρωτεΐνες. Η ρυθμιστική επίδραση των εντοπισμένων στα μιτοχόνδρια μελών της οικογένειας Bcl-2 στην απελευθέρωση κυτοχρώματος c, είναι αναμφισβήτητα σημαντική λόγω του κεντρικού ρόλου του κυτοχρώματος c ως διαμεσολαβητή στην ενεργοποίηση των κασπασών κατά την απόπτωση.[157]

Η ακεραιότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (OMM) ρυθμίζεται από πρωτεΐνες μέλη της οικογένειας Bcl-2. Ύστερα από την έκθεση σε προ-αποπτωτικά ερεθίσματα η ισορροπία μεταξύ των ρυθμιστικών πρωτεϊνών Bcl-2 μετατοπίζεται προς την ανάλογη προ-αποπτωτική κατεύθυνση. Οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 αλληλεπιδρούν με την OMM, με αποτέλεσμα τη διαπερατότητα της

μεμβράνης και την απελευθέρωση αποπτωτικών παραγόντων. Οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 μεσολαβούν στην απόπτωση απελευθερώνοντας  $Ca^{2+}$  από το ενδοπλασματικό δίκτυο και επίσης ενισχύοντας την πρόσληψη  $Ca^{2+}$  από τα μιτοχόνδρια. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 μπορούν να κάνουν διάκριση μεταξύ προ-αποπτωτικών σημάτων  $Ca^{2+}$  και σημάτων  $Ca^{2+}$  που σχετίζονται με την επιβίωση αναστέλλοντας τα πρώτα και ενισχύοντας παράλληλα τα τελευταία.[157]

Η συμβολή των πρωτεϊνών BAK και BAX στην κυτταρική απόπτωση όπως επίσης και η λειτουργία των των πρωτεϊνών MCL-1 και BCL-XL ως αναστολείς της απόπτωσης έχει περιγραφεί σε διάφορες έρευνες.[159-164]

Οι Kutler και συνεργάτες καθόρισαν την έκφραση mRNA πρωτεϊνών Bcl-2 σε φρέσκα αιμοπετάλια. Σε αυτή την μελέτη οι ερευνητές απέδειξαν ότι τα αιμοπετάλια εξέφρασαν mRNA για ορισμένα μέλη της οικογένειας Bcl-2, συμπεριλαμβανομένων των επαγωγέων (Bak, Bax, Bad) και των αναστολέων (Bcl-XL, Bfl-1, Mcl-1) απόπτωσης, αλλά δεν βρήκαν προ-αποπτωτικές Bik και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-W.[165]

Οι Vanags και συνεργάτες απέδειξαν την έκφραση mRNA για Bcl-2 και Bax σε φρέσκα μη διεγερμένα αιμοπετάλια χρησιμοποιώντας δοκιμασία RT-PCR.[166]

Οι Plenchette και συνεργάτες απέδειξαν ότι οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bid, και το Bcl-2 ομόλογο Bcl-XL, εκφράστηκαν σε συμπυκνώματα αιμοπεταλίων στην πρώτη ημέρα και η έκφρασή τους παρέμεινε αμετάβλητη κατά την αποθήκευσή τους έως και 11 ημέρες. Δεν βρέθηκε έκφραση πρωτεΐνης Bcl-2 σε αντίθεση με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bim-(BH3-μόνο).[167]

### **Κασπάσες**

Οι κασπάσες είναι μια οικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης των οποίων οι λειτουργίες συνδέονται άρρηκτα με τη διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ή απόπτωσης. Η πρωτεολυτική διάσπαση που προκαλούν οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων όπως στην μεμβράνη, ο κατακερματισμός του DNA, η εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην κυτταρική επιφάνεια και ο σχηματισμός αποπτωτικών κυστιδίων. Η οικογένεια των κασπασών στον άνθρωπο χωρίζεται σε τρεις κύριες ομάδες, βασισμένες στην ομοιότητα αλληλουχίας και τη βιολογική λειτουργία. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις κασπάσες φλεγμονής 1, 4 και 5. Η δεύτερη ομάδα σχηματίζεται από τους αποπτωτικούς τελεστές κασπάσες 3, 6 και 7 οι οποίες



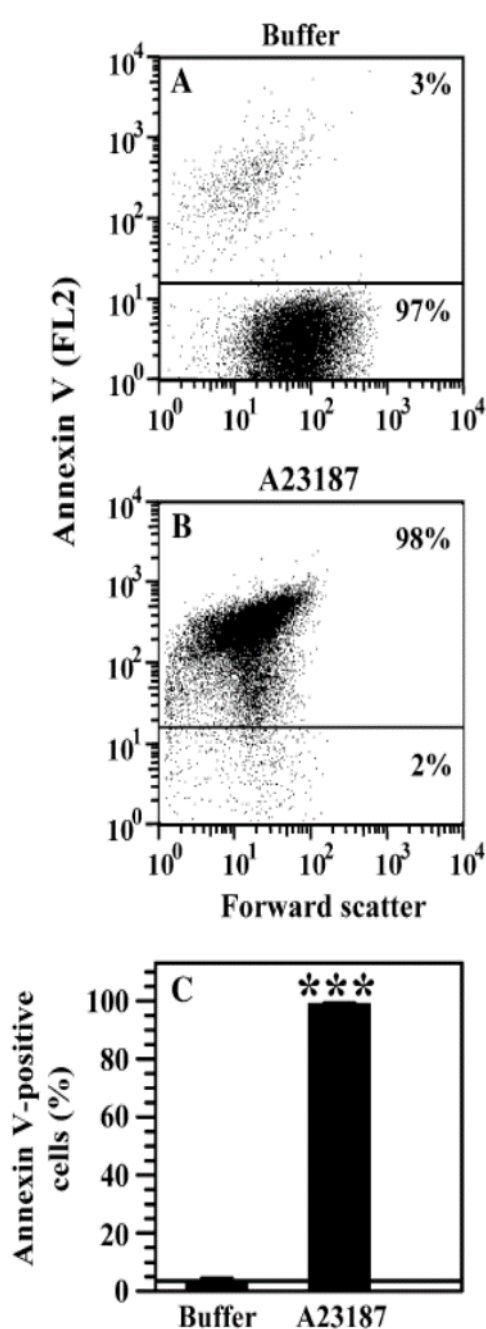
χαρακτηρίζονται ως «εκτελεστές της απόπτωσης» και τέλος η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τις ανθρώπινες κασπάσες εκκινητές 8, 9 και 10. Έχει πλέον αποδειχτεί ότι η κυτταρική απόπτωση μπορεί να προκληθεί από εξωγενείς παράγοντες, όπως η πρόσδεση στους συνδετές TRAIL και FAS, η οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση της κασπάσης 8, που ακολούθως κινητοποιεί την ενεργοποίηση των εκτελεστών κασπασών 3 και 7 οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Η απόπτωση μπορεί επίσης όπως αναφέρθηκε παραπάνω να προκληθεί από ενδογενείς παράγοντες, όπως βλάβη στο DNA, που οδηγεί σε ενεργοποίηση της κασπάσης 9 μέσω απελευθέρωσης κυτοχρώματος c, ολιγομερισμού Araf1 και τελικά ενεργοποίηση των κασπασών 3 και 7. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 αποτελεί έναν κυτοσολικό δείκτη απόπτωσης αιμοπεταλίων.[156]

Το mRNA για διαφορετικές κασπάσες έχει αναλυθεί σε φρέσκα συμπυκνώματα αιμοπεταλίων. Αποδείχθηκε ότι το mRNA για τις προκασπάσες 1, 2, 3, 4, 6, 8 και 9 εκφράζεται σε αιμοπετάλια σε σχετικά υψηλά επίπεδα, ενώ δεν ανιχνεύθηκε το mRNA για τις προκασπάσες 5, 7 και 10.[153]

#### **Απελευθέρωση κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια**

Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων είναι μία από τις βασικές ενδείξεις απόπτωσης της ενδογενούς οδού που πραγματοποιείται δια μέσω της διαπερατότητας OMM. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c οδηγεί στο σχηματισμό αποπτωσωμάτων στο κυτοσόλιο και στην ενεργοποίηση της κασπάσης 9, μιας εναρκτήριας κασπάσης της ενδογενούς οδού. Η απελευθέρωση κυτοχρώματος c στα αιμοπετάλια μπορεί να προκληθεί από τοπικά αναισθητικά όπως διβουκαΐνη και τετρακαΐνη, θρομβίνη, υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και το προ-αποπτωτικό μιμητικό BH3 ABT-737 ενώ προσδιορίζεται με υποκυτταρική κλασμάτωση και δοκιμασία Western Blot. [151,153]

### Απελευθέρωση φωσφατιδυλοσερίνης (PS)



Εικόνα 11: Έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων που έχουν υποστεί επεξεργασία με A23187. Πηγή: Gyulkhandanyan, A.V., Mutlu, A., Freedman, J. et al. *Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. J Thromb Thrombolysis* 33, 397–411 (2012).

Τα αιμοπετάλια παρέχουν την απαραίτητη επιφάνεια για τον σχηματισμό των συμπλοκών τενάσης και προθρομβινάσης, διαδικασία που οδηγεί αρχικά στο σχηματισμό θρομβίνης και τελικά θρόμβου ιώδους. Ο σχηματισμός συμπλέγματος περιλαμβάνει ως διαδικασία, τη μετατόπιση της αρνητικά φορτισμένης φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Αυτή η μετατόπιση θεωρείται ότι οφείλεται σε μια πρωτεΐνη που ονομάζεται σκραμπλάση, η οποία παρουσία αυξημένων επιπέδων ενδοκυττάριου ασβεστίου, ρυθμίζει μια γρήγορη, μη εκλεκτική, αμφίδρομη κίνηση φωσφολιπιδίων πάνω από τη μεμβράνη σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.[168] Η απελευθέρωση PS αποτελεί επίσης έναν δείκτη απόπτωσης που σχετίζεται με την λειτουργία της πλασματικής μεμβράνης αιμοπεταλίων κατά την αποπτωτική διαδικασία. Όταν τα αιμοπετάλια γίνονται *in vitro* αποπτωτικά λόγω της αναστολής Bcl-xL (επεξεργασία με ABT-737 ή Navitoclax), υπόκεινται σε διαπερατότητα εξωτερικής μεμβράνης μιτοχονδρίων (MOMP), απελευθερώνουν το κυτόχρωμα c, ενεργοποιούν τις κασπάσες και εξωτερικεύουν PS. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, η φωσφατιδυλοσερίνη μετατοπίζεται από το εσωτερικό του κυττάρου, στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης πλάσματος. Έχει αποδειχθεί η έκφραση PS για αιμοπετάλια ενεργοποιημένα με ιονοφόρο ασβέστιο, θρομβίνη, κολλαγόνο και ADP. Εμφανίστηκε επίσης σε αποθηκευμένα συμπυκνώματα αιμοπεταλίων και σε αιμοπετάλια γηρασμένα σε καλλιέργειες αλλά και *in vivo*.

Η εξωτερικήευση της PS ως βασικό χαρακτηριστικό της απόπτωσης μπορεί να ανιχνευθεί με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας ανιχνευτή

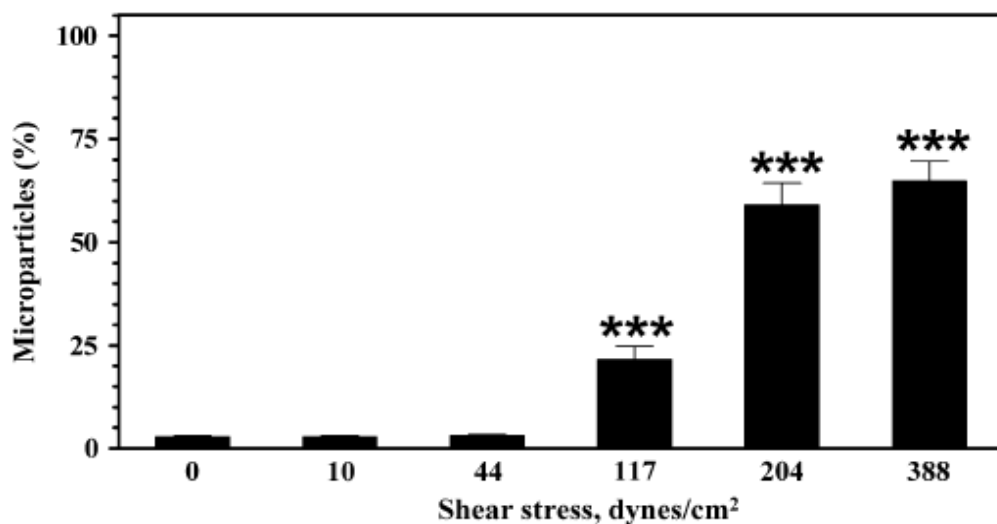
αννεξίνης V συζευγμένο με -PE ή FITC. Όπως φαίνεται στην εικόνα 12 μετά από επεξεργασία αιμοπεταλίων με ιονοφόρο ασβέστιο A23187, σχεδόν όλα τα κύτταρα εκθέτουν PS στην επιφάνειά τους όπως προσδιορίζεται από το ποσοστό των θετικών ως προς την αννεξίνη κυττάρων. Η αδυναμία των αιμοπεταλίων να διατηρήσουν μια ασύμμετρη κατανομή για την έκθεση PS είναι μια ισχυρή ένδειξη απόπτωσης τους.[151,153]

### **Σχηματισμός μικροκυστιδίων (MPs) και συρρίκνωση αιμοπεταλίων.**

Τα μικροκυστιδία των αιμοπεταλίων είναι πολύ μικρά θραύσματα μεγέθους 0,1-1  $\mu\text{m}$ . Αποβάλλονται από την πλασματική μεμβράνη των αιμοπεταλίων που υφίστανται ενεργοποίηση, στρες ή απόπτωση. Τα αποπτωτικά αιμοπετάλια αποβάλλουν MPs μέσω δυναμικής εκροής μεμβράνης που καθοδηγείται από τη συσταλτική δύναμη των κυτταροσκελετικών δομών ακτίνης-μυοσίνης. Έχουν δομή βασισμένη σε φωσφολιπίδια και εκφράζουν διάφορα επιφανειακά αντιγόνα όπως, GrIb, PECAM-1, GrIb-IIIa, P-σελεκτίνη, CD 63, CD41a και CD 61. Δεδομένου ότι είναι τα πιο άφθονα μικροσωματίδια στο αίμα και εκφράζουν την προπηκτική φωσφατιδυλοσερίνη, τα MPs πιθανώς συμπληρώνουν, εάν δεν ενισχύουν, τις λειτουργίες των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση, τη θρόμβωση, και τη φλεγμονή, αλλά ενεργούν επίσης ως προωθητές της αναγέννησης ιστών.[169,170]

Ο σχηματισμός μικροκυστιδίων εμφανίστηκε ως συνέπεια της *in vitro* διέγερσης των αιμοπεταλίων με διάφορους αγωνιστές όπως ιονοφόρο ασβέστιο, θρομβίνη, κολλαγόνο και ADP, καθώς και κατά την αποθήκευση των αιμοπεταλίων. Οι Fox και συνεργάτες απέδειξαν ότι ο σχηματισμός MPs απαιτεί σοβαρή κυτταροσκελετική αποδόμηση, σε συνδυασμό με ενεργοποίηση καλπαΐνης. Η απελευθέρωση μικροκυστιδίων προκλήθηκε επίσης σε μοντέλο ποντικού *in vivo* από ελονοσία και έγχυση TNF ή με την χρήση αντισωμάτων κατά των αιμοπεταλίων. Η θεραπεία ποντικών με αναστολέα κασπάσης ZVAD-fmk μείωσε τον αριθμό των MPs, υποδηλώνοντας έναν αιτιώδη ρόλο των κασπάσεων στον κατακερματισμό των αιμοπεταλίων.[151,153,171]

Ως συνέπεια της απόρριψης των ΜΡ που προκαλούνται από διάτμηση, τα «υπολειπόμενα» αιμοπετάλια έχουν μειωμένο κυτταρικό όγκο. Η συρρίκνωση των αιμοπεταλίων, π.χ., που προκαλείται από έκθεση σε πολύ υψηλές τάσεις διάτμησης [εικόνα 12], μπορεί να διερευνηθεί χρησιμοποιώντας δοκιμασία κυτταρομετρίας ροής, μπροστινής σκέδασης φωτός (FSC), καθώς η ένταση σήματος φωτός FSC έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται με το μέγεθος των κυττάρων.[151]



Εικόνα 12: Σχηματισμός ΜΡs από υψηλές διατμητικές τάσεις. Πηγή: Gyulkhandanyan, A.V., Mutlu, A., Freedman, J. et al. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J Thromb Thrombolysis* 33, 397–411 (2012).

### 4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την απόπτωση

Πολλοί δείκτες απόπτωσης στα αιμοπετάλια μπορούν να εντοπιστούν ως απόκριση σε διάφορους παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι:

- διάφορα εξωκυτταρικά ερεθίσματα από δυαλυτούς αγωνιστές αιμοπεταλίων όπως η θρομβίνη, το ιονοφόρο ασβέστιο και τα αντισώματα έναντι των αιμοπεταλίων
- φυσικές ρεολογικές δυνάμεις του αίματος (πολύ υψηλές τάσεις διάτμησης - high shear stress)
- μακροχρόνια αποθήκευση αιμοπεταλίων σε τράπεζες αίματος υπό τις ανάλογες συνθήκες συντήρησης όπως αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία 37 ° C, στους 4 ° C και υπό συμβατικές συνθήκες συντήρησης των αιμοπεταλίων στους 22 ° C.

#### Απόπτωση αιμοπεταλίων επαγόμενη από Θρομβίνη

Η Θρομβίνη είναι ένας φυσικός αγωνιστής αιμοπεταλίων. Είναι γνωστό ότι η Θρομβίνη αποτελεί έναν ισχυρό επαγωγέα ενεργοποίησης και συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων, καθώς και έναν παράγοντα πήξης που μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδες συμβάλλοντας έτσι στην πήξη του

αίματος. Ωστόσο, σε διάφορες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η θρομβίνη μπορεί επίσης να προκαλέσει απόπτωση αιμοπεταλίων.[153]

Οι Leytin και συνεργάτες, απέδειξαν ότι η ανθρώπινη α-θρομβίνη επάγει τις βασικές αποκρίσεις της ενδογενούς οδού απόπτωσης αιμοπεταλίων.

Ποιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε:

- αποπόλωση ΔΨm , και
- ισχυρή έκφραση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και Bak αλλά μόνο ασθενής έκφραση αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2.

Έχει επίσης αναφερθεί ότι η θρομβίνη προκαλεί

- ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και Bid,
- μετατόπιση του Bak και των ενεργών Bax και Bid στα μιτοχόνδρια,
- απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από το μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό διάστημα στο κυττόςολιο,
- ενεργοποίηση της εκκινήτριας κασπάσης-9 της ενδογενούς αποπτωτικής οδού, και μετατόπιση της προκασπάσης-9 και ενεργής κασπάσης-9 στον κυτταροσκελετό

Ακόμα έχουν διαπιστωθεί και εξω-μιτοχονδριακές αποπτωτικές αποκρίσεις επαγόμενες από την θρομβίνη:

- ενεργοποίηση του εκτελεστή απόπτωσης, κασπάσης-3,
- μετατόπιση της προκασπάσης-3 και ενεργής κασπάσης-3 στον κυτταροσκελετό,
- διέγερση έκθεσης της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων.

Υποδοχείς της μεμβράνης του αιμοπεταλίου φαίνεται ότι μεσολαβούν στην επαγόμενη από θρομβίνη απόπτωση. Τέτοιοι υποδοχείς είναι ο PAR-1 (protease-activated receptor 1) και η γλυκοπρωτεΐνη GP IIb-IIIa.

Η θρομβίνη προκαλεί ενεργοποίηση και συσσώρευση αιμοπεταλίων μέσω αλληλεπίδρασης των υποδοχέων PARs με πρωτεΐνες G. Δεδομένου ότι η θρομβίνη πυροδοτεί έναν αριθμό αποπτωτικών συμβάντων στα αιμοπετάλια οι Leytin και συνεργάτες πρότειναν ότι η δράση της θρομβίνης στην απόπτωση αιμοπεταλίων μπορεί επίσης να μεσολαβείται από PARs ενώ οι Lopez και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι η επεξεργασία ανθρώπινων αιμοπεταλίων με SFLLRN (πεπτιδικός αγωνιστής του PAR-1), προκαλεί μετατόπιση του ενεργών Bax και Bid στο μιτοχονδριακό τμήμα των αιμοπεταλίων. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η διάσπαση του PAR-1 με θρομβίνη που έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση ενεργοποίησης και συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων πυροδοτεί επίσης απόπτωση αιμοπεταλίων ενώ παράλληλα ο PAR-1 υποδοχέας

αιμοπεταλίων φαίνεται να συμμετέχει εμμέσως στην επαγόμενη από θρομβίνη απόπτωση.[153]

Τα φάρμακα ανταγωνιστές του υποδοχέα GPIIb/IIIa, επιφιμιπατίδη (Integrilin) και η τιροφιμπάνη (Aggrastat), αναστέλλουν την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 σε ανθρώπινα αιμοπετάλια διεγερμένα με θρομβίνη, υποδεικνύοντας ότι όχι μόνο ο PAR-1, αλλά και ο υποδοχέας GPIIb/IIIa, εμπλέκεται στην απόπτωση των αιμοπεταλίων που προκαλείται από θρομβίνη.

Η επεξεργασία αιμοπεταλίων με θρομβίνη προκαλεί δημιουργία αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), και κυρίως υπεροξειδίου υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Η έκθεση των αιμοπεταλίων σε εξωγενές  $H_2O_2$  προκαλεί παρόμοιες αποπτωτικές αποκρίσεις με αυτές της έκθεσης σε θρομβίνη. Οι Jobe και συνεργάτες παρουσίασαν σε μελέτη τους ότι η συν-διέγερση των αιμοπεταλίων ποντικού με θρομβίνη και  $H_2O_2$  ενίσχυσε σημαντικά την αποπόλωση ΔΨm και την έκφραση PS σε σχέση με την μεμονωμένη διέγερση μέσω θρομβίνης ή  $H_2O_2$ . [153]

Στην επαγόμενη από θρομβίνη απόπτωση αιμοπεταλίων φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιον ρόλο η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και ο πολυμερισμός της ακτίνης. Η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και η οργάνωση και διάσπαση του κυτταροσκελετού εμπλέκονται στην απόπτωση των εμπύρηνων κυττάρων. Οι Ben Amor και συνεργάτες ανέφεραν ότι η προεπεξεργασία ανθρώπινων αιμοπεταλίων με αναστολείς PKC (Ro-31-8220) και πολυμερισμό νημάτων ακτίνης (κυτοχλασίνη D) πριν από τη διέγερση με θρομβίνη ανέστειλε σημαντικά την ενεργοποίηση και μετατόπιση στον κυτταροσκελετό των κασπάσων 3 και 9. Επίσης κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση PKC και ο πολυμερισμός ακτίνης εμπλέκονται στην ενεργοποίηση αυτών των κασπάσων καθώς και στη συσχέτισή τους με τον κυτταροσκελετό σε διεγερμένα με θρομβίνη αιμοπετάλια.[172]

Για να διευκρινιστεί η επίδραση της θρομβίνης στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και στις αποπτωτικές αποκρίσεις, οι Leytin και συνεργάτες χρησιμοποίησαν διαφορετικές συγκεντρώσεις θρομβίνης στα αιμοπετάλια *in vitro*. Για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της ενεργοποίησης και της απόπτωσης αιμοπεταλίων, χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής με μέθοδο διπλής χρώσης, όπου τα αιμοπετάλια βάφτηκαν με αντίσωμα έναντι P-σελεκτίνης (αντι-CD62) για ανίχνευση ενεργοποίησης αιμοπεταλίων σε συνδυασμό με άλλους ανιχνευτές που ανιχνεύουν είτε αποπόλωση ΔΨm, είτε ενεργοποίηση κασπάσης-3 είτε έκφραση PS. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι χαμηλότερες δόσεις θρομβίνης προκαλούν ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, ενώ υψηλές και πολύ υψηλές δόσεις προκαλούν απόπτωση αιμοπεταλίων.

Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι τα αιμοπετάλια που διεγείρονται με χαμηλότερες δόσεις θρομβίνης είναι ικανά να εκτελούν την αιμοστατική τους λειτουργία μέσω ενεργοποίησης και συσσώρευσης, αλλά εμπλέκονται ανεπαίσθητα στο πρόγραμμα κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης. Αντιθέτως, πολύ υψηλά επίπεδα θρομβίνης, τα οποία προκύπτουν κατά τη φάση σχηματισμού και πολλαπλασιασμού της θρομβίνης και στη θρομβογένεση, μπορούν αποτελεσματικά να προκαλέσουν απόπτωση αιμοπεταλίων, υποδηλώνοντας ότι οι υπερηλεκτικές και θρομβωτικές καταστάσεις μπορεί να σχετίζονται με αυξημένο αριθμό αποπτωτικών αιμοπεταλίων. Η απόπτωση αιμοπεταλίων που προκαλείται από θρομβίνη μπορεί επομένως δυνητικά να συμβάλει στην παθοφυσιολογία της θρομβοκυτταροπενίας σε ασθένειες που σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή θρομβίνης, όπως σήψη και διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη. [173]

### **Απόπτωση αιμοπεταλίων και GPIIbIIIa**

Ο υποδοχέας GPIIbIIIa (αIIbβ3 ιντεγκρίνη) χαρακτηρίζεται ως ο πιο άφθονος υποδοχέας ινωδογόνου και παράγοντα von Willebrand (VWF) στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Σχετίζεται με την ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαδραματίζοντας έτσι βασικό ρόλο στην αιμόσταση και θρόμβωση. Ωστόσο υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι εκτός από αυτές τις κύριες λειτουργίες, ο GPIIbIIIa συμμετέχει επίσης στην απόπτωση αιμοπεταλίων.

Ένας αριθμός αντισωμάτων κατά των αιμοπεταλίων, ιδιαίτερα κατά των GPIIbIIIa και GPIIb, προκαλούν ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα (ITP) σε ανθρώπους και ποντίκια. Σε ITP μοντέλα ποντικών, έχει αποδειχθεί ότι η ειδικότητα του αντιγόνου στόχου που αναγνωρίζεται από αντισώματα έναντι των αιμοπεταλίων καθορίζει τον μηχανισμό της κάθαρσης των αιμοπεταλίων μέσω της φαγοκυττάρωσης. Οι μελέτες των Piguet και Vesin[174] καθώς και του Lazarus και των συνεργατών[175] του σε μοντέλα ποντικών αφορούσε την χορήγηση πολυκλωνικών ή μονοκλωνικών αντισωμάτων με στόχο υπομονάδες της GPIIbIIIa. Ανιχνεύοντας δείκτες απόπτωσης όπως η ενεργοποίηση κασπασών, η απελευθέρωση αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων (MPs) αλλά και αποπόλωση ΔΨm και έκφραση PS οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η απόπτωση αιμοπεταλίων μπορεί να εμπλέκεται στην ανάπτυξη ITP, η οποία μπορεί να προκληθεί από προ-αποπτωτικά αντισώματα και να προληφθεί από αναστολείς απόπτωσης και αντι-αποπτωτικά αντισώματα.

Η σχέση μεταξύ απόπτωσης αιμοπεταλίων και ITP έχει επίσης αποδειχθεί σε ανθρώπους. Οι Catani και συνεργάτες ανέφεραν ότι τα αιμοπετάλια που

απομονώθηκαν από ενήλικες ασθενείς με χρόνια ITP είχαν σημαντικά υψηλότερο επίπεδο έκφρασης PS από ότι τα αιμοπετάλια από υγιείς ενήλικες εθελοντές ενώ οι Speer και συνεργάτες στην μελέτη τους ανέφεραν ότι η απόπτωση αιμοπεταλίων, όπως μετράται από την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και την έκφραση PS, αυξάνεται σε παιδιατρικούς ασθενείς με οξεία ITP σε σύγκριση με τα υγιή παιδιά ελέγχου. [176]

### **Απόπτωση αιμοπεταλίων και GPIIb**

Ο GPIIb αποτελεί άλλο ένα παράδειγμα γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων της επιφάνειας αιμοπεταλίων που συμμετέχουν στην πυροδότηση απόπτωσης των κυττάρων αυτών. Σε μελέτη των Li και συνεργατών του αναφέρεται ότι η αλληλεπίδραση μέσω ριστοσεΐνης και του VWF με τον υποδοχέα VWF GPIIb, προκάλεσε έναν αριθμό αποπτωτικών συμβάντων σε ανθρώπινα αιμοπετάλια, συμπεριλαμβανομένης της αποπόλωσης ΔΨm, της αυξημένης έκφρασης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bak and Bax, της διάσπασης της γελσολίνης και της έκφρασης PS. [177]

Άλλη μελέτη των van der Wal και συνεργατών έδειξε ότι η απόπτωση αιμοπεταλίων μπορεί να προκληθεί από την συσταδοποίηση GPIIb που προκαλείται από επώαση αιμοπεταλίων στους 0 ° C για 4 ώρες. Η απόπτωση συσχετίστηκε με 14-3-3ζ σηματοδότηση, αποφωσφορυλίωση και ενεργοποίηση Bad, προ-αποπτωτικές αλλαγές στα Bax / Bcl- XL, μετατόπιση του Bax στα μιτοχόνδρια, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, ενεργοποίηση της κασπάσης-9 και έκφραση PS. [178]

Συμπερασματικά, η απόπτωση αιμοπεταλίων μπορεί να προκληθεί από την αλληλεπίδραση του VWF με τον υποδοχέα GPIIb υπό χημικών ερεθισμάτων ή μηχανικών ρεολογικών δυνάμεων (πολύ υψηλές τάσεις διάτμησης) καθώς και από συστάδες GPIIb που προκαλούνται από ψυχρές θερμοκρασίες.

### **Μιτοχονδριακός έλεγχος της απόπτωσης αιμοπεταλίων**

Ο σχηματισμός πόρων μετάβασης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας (MPTP), η αποπόλωση ΔΨm και η ενεργοποίηση της κασπάσης-9 είναι οι βασικές εκδηλώσεις της ενδογενούς οδού απόπτωσης στα εμπύρνηνα κύτταρα. Το MPTP αποτελείται από πολλαπλές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης από την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (ANT), και την πρωτεΐνη μιτοχονδριακού δικτύου που αλληλεπιδρά με την ANT, κυκλοφιλίνη D (CypD). Η τελευταία είναι απαραίτητη για την ρύθμιση του σχηματισμού MPTP. [153]



Η κυκλοσπορίνη A (CsA), που αλληλεπιδρά με το CypD, είναι ένας πολύ γνωστός ισχυρός αναστολέας του σχηματισμού MPTP σε απομονωμένα μιτοχόνδρια και άθικτα πυρηνικά κύτταρα. Χρησιμοποιώντας την CsA, οι Leytin και συνεργάτες, μελέτησαν τον ρόλο του MPTP στον έλεγχο διαφορετικών εκδηλώσεων απόπτωσης, σε αιμοπετάλια διεγερμένα με ιονοφόρο ασβέστιο A23187, συμπεριλαμβανομένων της μιτοχονδριακής εκδήλωσης (αποπόλωση ΔΨm), κυτταροπλασματικής (ενεργοποίηση κασπάσης-3), μεμβράνης πλάσματος (έκθεση σε PS) και τελικών κυτταρικών αποπτωτικών αποκρίσεων (συρρίκνωση αιμοπεταλίων και σχηματισμός MPs).[179]

Διαπιστώθηκε ότι η CsA ανέστειλε την απόπτωση αιμοπεταλίων που διεγείρεται από το A23187, αποτρέποντας πλήρως την αποπόλωση ΔΨm, την ενεργοποίηση του εκτελεστή απόπτωσης κασπάση-3, όπως επίσης και την συρρίκνωση και κατακερματισμό αιμοπεταλίων σε MP. Ωστόσο ανέστειλε μόνο μερικώς την έκθεση PS στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Αυτή η μελέτη καταδεικνύει ότι ο σχηματισμός MPTP εντοπίζεται πριν από την αποπόλωση ΔΨm, την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, τη συρρίκνωση των αιμοπεταλίων και την απελευθέρωση των MPs και ελέγχει αυστηρά αυτές τις αποπτωτικές αποκρίσεις σε αιμοπετάλια που διεγείρονται με ιονοφόρο ασβέστιο. Αντίθετα, παρόλο που ορισμένες διαδικασίες που εμπλέκονται στην εξωτερίκευση της PS μπορεί να εντοπιστούν κατάντη και να ελεγχθούν από το σχηματισμό MPTP σε αιμοπετάλια που έχουν υποστεί επεξεργασία με το A23187, η έκθεση της PS ελέγχεται ως επί το πλείστον από ανεξάρτητους μηχανισμούς των MPTP. Σύμφωνα με το παραπάνω οι Jobe et al. ανέφεραν ότι ένα άλλο ιονοφόρο ασβέστιο, η ιονομυκίνη, αύξησε την έκφραση PS στο ίδιο επίπεδο τόσο σε μάρτυρες (CypD + / +) όσο και CypD-ανεπαρκή (CypD - / -) αιμοπετάλια ποντικού. [180]

Οι Arachiche και συνεργάτες έδειξαν ότι η έκθεση PS σε ανθρώπινα αιμοπετάλια προκαλείται από υψηλή αύξηση κυτοσολικού ασβεστίου παρά από αποπόλωση ΔΨm.[181]

Οι Schoenwaelder και συνεργάτες ανέφεραν την ύπαρξη δύο διαφορετικών οδών που ρυθμίζουν την έκθεση PS στα αιμοπετάλια, μία εξαρτώμενη από Bax / Bak και μία άλλη εξωκυτταρική οδό εξαρτώμενη από ασβέστιο. [182]

Στις περισσότερες οδούς απόπτωσης, η διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων είναι ένα υψίστης σημασίας συμβάν καθώς οδηγεί στην μείωση της μιτοχονδριακής ηλεκτροχημικής διαβάθμισης και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C. Το CCCP είναι ένα λιποειδές διαλυτό πρωτονόφορο και παράγοντας αποσύνδεσης για την οξειδωτική φωσφορυλίωση, η δράση του οποίου επηρεάζει τη μιτοχονδριακή

διαπερατότητα και την απώλεια μεμβρανικού δυναμικού. Όταν τα αιμοπετάλια προεπεξεργάζονται με CCCP, η ανάκτηση τους μετά τη μετάγγιση είναι χαμηλή, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μεγαλύτερο μέρος των αιμοπεταλίων που έχουν υποστεί επεξεργασία με CCCP καθαιρούνται ποιο γρήγορα in vivo. Άξιο λόγου είναι ό,τι η επεξεργασία με CCCP προκαλεί μέτρια έκθεση PS, αλλά σημαντική πρωτεολυτική κατάπτωση της γλυκοπρωτεΐνης Iba (GPIba, CD42b) στα αιμοπετάλια.

### *Απόπτωση αιμοπεταλίων επαγόμενη από διατμητικές τάσεις (Shear stress)*

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, η απόπτωση αιμοπεταλίων μπορεί να προκληθεί από πλήθος χημικών ερεθισμάτων. Ωστόσο έχει αποδειχθεί σε μελέτες ότι η έκθεση σε παθολογικές ρεολογικές δυνάμεις (Shear stress) διεγείρει την ενεργοποίηση αιμοπεταλίων καθώς και την μεταγωγή σημάτων από τα αιμοπετάλια ακόμα και εν απουσία εξωγενών χημικών ερεθισμάτων. Σε μελέτη τους οι Leytin και συνεργάτες διερευνώντας την πιθανή απόπτωση αιμοπεταλίων υπό διατμητικού στρες in vitro, διαπίστωσαν ότι οι παθολογικές, υψηλές τάσεις διάτμησης, όπως αυτές που εμφανίζονται σε στενωτικά αγγεία, πυροδότησαν έναν αριθμό αποπτωτικών συμβάντων. Ποιο συγκεκριμένα παρατήρησαν αποπόλωση ΔΨm, ενεργοποίηση κασπάσης-3, απελευθέρωση PS, συρρίκνωση αιμοπεταλίων και κατακερματισμό σε MPs. Επίσης παρατηρήθηκε ό,τι η έκθεση σε τέτοιου είδους υψηλές διατμητικές τάσεις προκαλεί απελευθέρωση P-σελεκτίνης αλλά και μειωμένη έκφραση της γλυκοπρωτεΐνης GPIba στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. [183]

Ορισμένα από αυτά τα αποπτωτικά γεγονότα που προκαλούνται από shear stress, όπως η αποπόλωση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και η ενεργοποίηση της κασπάσης-3, συμβαίνουν στο εσωτερικό του αιμοπεταλίου, υποδηλώνοντας ότι η επίδραση των δυνάμεων αυτών στην απόπτωση αιμοπεταλίων γίνεται διαμέσου μηχανικών υποδοχέων οι οποίοι μεταδίδουν προ-αποπτωτικά σήματα στο εσωτερικό του κυττάρου. Έχει υποτεθεί ότι ο υποδοχέας GPIba που έχει εκτεθεί σε shear stress, μπορεί να λειτουργήσει ως τέτοιου είδους μηχανικός υποδοχέας, υπόθεση που επιβεβαιώθηκε τελικά από μελέτη των Li και συνεργατών. Καταλήγοντας, η προ-αποπτωτική σηματοδότηση μέσω του GPIba συμβαίνει σε δύο στάδια: πρώτον, οι υψηλές τάσεις διάτμησης πυροδοτούν την μετάβαση της κατάστασης του GPIba από μη ενεργή σε ενεργή, και δεύτερον, ο VWF συνδέεται με το ενεργοποιημένο από stress GPIba με αποτέλεσμα την επαγωγή απόπτωσης αιμοπεταλίων.[177,183]

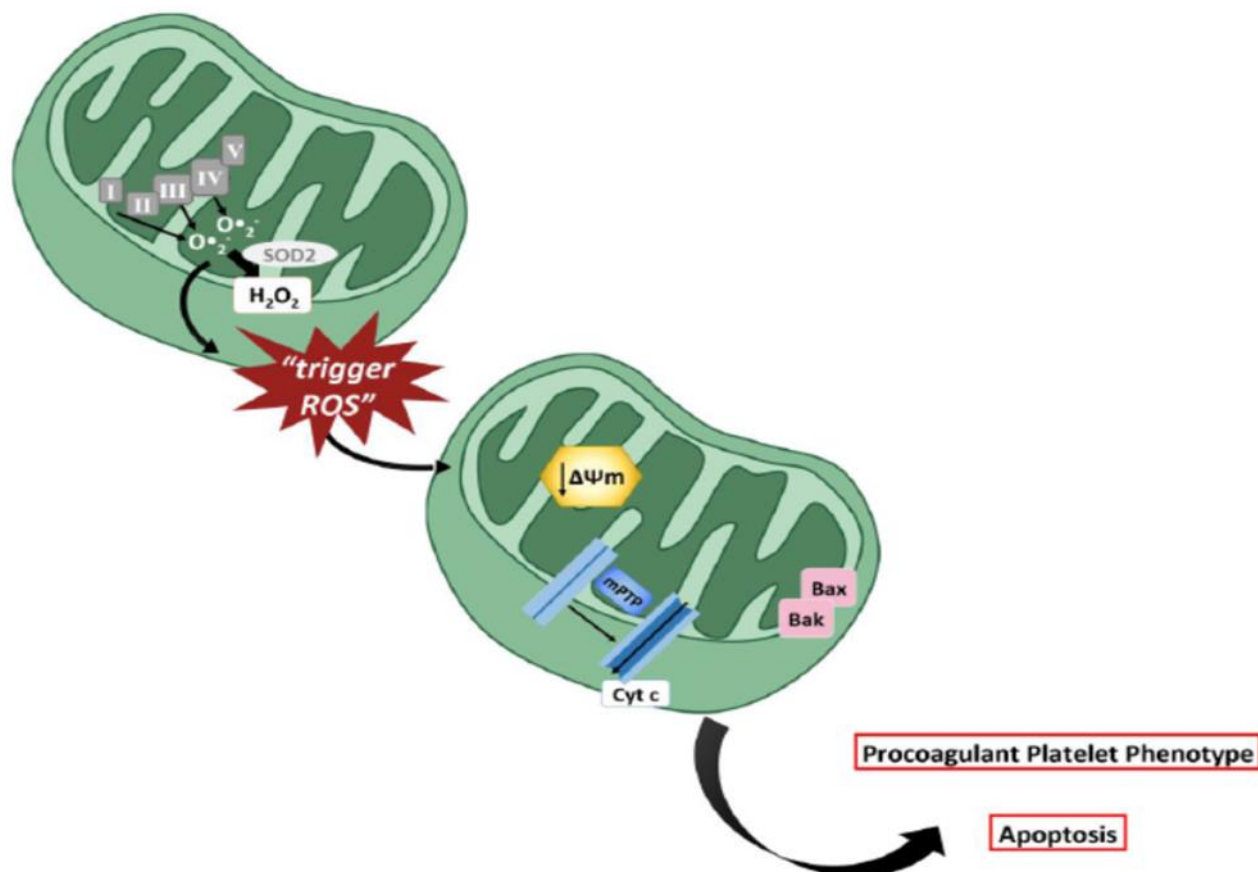
Αν και το φαινόμενο της απόπτωσης αιμοπεταλίων που προκαλείται από διατμητικές δυνάμεις έχει αποδειχθεί *in vitro*, τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι κατά την κυκλοφορία των αιμοπεταλίων *in vivo*, μπορεί να εφαρμοστούν τάσεις διάτμησης υπό παθολογικών καταστάσεων, που προκαλούν απόπτωση στα αιμοπετάλια. Οι μηχανικές δυνάμεις μπορούν να προκαλέσουν αποπτωτικές αλλοιώσεις της επιφανειακής μεμβράνης και της μορφολογίας των αιμοπεταλίων, συμπεριλαμβανομένης της εξωτερίκευσης PS, σφαιροποίηση κυττάρων, συρρίκνωση, σχηματισμό εξογκωμάτων, ανάπτυξη ψευδοποδίων και απελευθέρωση MPs. Τα αιμοπετάλια που έχουν εκτεθεί σε υψηλές διατμητικές τάσεις μπορεί να αναγνωριστούν από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα ως «ανεπιθύμητα» κύτταρα και να αφαιρεθούν από την κυκλοφορία. [177,188]

### **Οξειδωτικό στρες - δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species –ROS) και απόπτωση αιμοπεταλίων.**

Το οξειδωτικό στρες αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) είναι πολύ αντιδραστικά μόρια, που δημιουργούνται ως απόκριση τόσο σε ενδογενή όσο και σε εξωγενή ερεθίσματα. Τα πιο σημαντικά κυτταρικά ROS / RNS περιλαμβάνουν τόσο ριζικά όσο και μη ριζικά μόρια με βάση οξυγόνο, όπως το ανιόν υπεροξειδίου ( $O^{2-}$ ), υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), ρίζα υδροξυλίου ( $\bullet OH$ ), ιόν υδροξυλίου ( $OH_2$ ) καθώς και μόρια με βάση το άζωτο, συμπεριλαμβανομένων του αζώτου ( $\bullet NO$ ), της ρίζας διοξειδίου του αζώτου ( $\bullet NO_2$ ) και του υπεροξυνιτρώδους ( $ONOO^-$ ).

Τα ROS παράγονται φυσιολογικά από την οξειδάση NADPH (NOX), ένα ενζυματικό σύμπλεγμα κυτταρικής μεμβράνης και από τα μιτοχόνδρια ως προϊόντα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) ενώ δρουν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι που ρυθμίζουν διάφορες οδούς σηματοδότησης. Η κυτταρική συγκέντρωση των ROS ρυθμίζεται από ενζυματικά και μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά συστήματα για τη διατήρηση της κυτταρικής ισορροπίας. Η ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, λόγω της αυξημένης παραγωγής ROS και / ή των μειωμένων αντιοξειδωτικών δραστηριοτήτων, οδηγεί σε οξειδωτικό στρες που προάγει τη βλάβη των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA.

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η αύξηση του ROS και η επακόλουθη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία οδηγούν σε απόπτωση αιμοπεταλίων, η οποία ως εκ τούτου έχει θεωρηθεί στρατηγική κάθαρσης για την εξάλειψη των υπερ-ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων από την κυκλοφορία του αίματος. Ισχυροί αγωνιστές αιμοπεταλίων, όπως η θρομβίνη και η ιονομυκίνη, καθορίζουν το σχηματισμό MPTPs που οδηγεί σε δραστική αποπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και αύξηση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Εικόνα 13: Μιτοχόνδρια αιμοπεταλίων σε οξειδωτική ισορροπία. Κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, τα μιτοχόνδρια παράγουν ROS. Το σύμπλεγμα I και III του ETC (αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων) είναι οι κύριες πηγές του μιτοχονδριακού ROS, που ονομάζεται trigger ROS. Το Trigger ROS απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και, μέσω θετικής ανατροφοδότησης, έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή ROS. Η έκρηξη και η απελευθέρωση του ROS προκαλούν την κατάρρευση του δυναμικού των μιτοχονδριακών μεμβρανών ( $\Delta\Psi m$ ) και το άνοιγμα των πόρων μετάβασης διαπερατότητας των μιτοχονδρίων (MPTP). Αυτά τα τελευταία γεγονότα οδηγούν σε έκθεση φωσφοτιδυλοσερίνης, κατακράτηση ινωδογόνου, απελευθέρωση κυτοχρώματος c και ενεργοποίηση και μετατόπιση των Bak and Bax, συμβάλλοντας στον προπηκτικό φαινότυπο αιμοπεταλίων και την απόπτωση αιμοπεταλίων. Πηγή: Masselli E, Pozzi G, Vaccarezza M, Mirandola P, Galli D, Vitale M, Carubbi C, Gobbi G. ROS in Platelet Biology: Functional Aspects and Methodological Insights. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 9;21(14):4866

Πράγματι, οι MPTPs είναι μη εκλεκτικοί πόροι πολλαπλών πρωτεϊνών που διασχίζουν την εσωτερική και εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και

προκαλούν ταχεία κατάρρευση του ΔΨm, λόγω της εξασθενημένης μετατόπισης πρωτονίων προς τον μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο. Ο σχηματισμός MPTP παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, προκαλώντας τη μετάβαση των αιμοπεταλίων από μια «ενεργοποιημένη» σε μια «εξαιρετικά ενεργοποιημένη» κατάσταση που χαρακτηρίζεται από κυστοποίηση, εξωσκόπηση, εξωτερίκευση υψηλών επιπέδων φωσφατιδυλοσερίνης (PS) και κατακράτηση ινωδογόνου. Επιπλέον, οι MPTPs και τα ROS συνδέονται με την ενεργοποίηση και τη μετατόπιση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bid, Bak και Bax στα μιτοχόνδρια. Αυτά τα επαγόμενα από τη θρομβίνη συμβάντα, μειώνονται σημαντικά από την καταλάση, υποδεικνύοντας τον κεντρικό ρόλο των ROS στην απόπτωση αιμοπεταλίων.

Σημειωτέον, το ROS έχει προταθεί να μεταβάλει άμεσα τη διαπερατότητα των μιτοχονδριακών μεμβρανών που οδηγεί στην απελευθέρωση προ-αποπτωτικών παραγόντων, όπως το κυτόχρωμα C και οι κασπάσες, στο κυττόςολιο. Πράγματι, στην απόπτωση αιμοπεταλίων που προκαλείται από υπερθερμία, το αυξημένο μιτοχονδριακό ROS οξειδώνει εύκολα την καρδιολιπίνη, ένα σημαντικό συστατικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, που προωθεί τη μιτοχονδριακή μετατόπιση του Bax, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος-C, την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, την έκθεση PS και την αποπόλωση ΔΨm. [180,184]

#### **4.4 Απόπτωση και βλάβες στα αιμοπετάλια κατά την αποθήκευση**

##### **Βλάβες αποθήκευσης αιμοπεταλίων (Platelet Storage Lesions – PSL)**

Οι μεταγγίσεις συμπυκνωμάτων αιμοπεταλίων (PC) είναι ζωτικής σημασίας για τον έλεγχο και την πρόληψη της αιμορραγίας σε ασθενείς με καρκίνο, ασθενείς με αιματολογικά νοσήματα καθώς και αυτούς που υποβάλλονται σε χειρουργεία ή αυτούς που αντιμετωπίζουν τραυματισμούς. Η διαθεσιμότητα και η ασφάλεια των PCs περιορίζονται από την ανάπτυξη βλαβών αποθήκευσης αιμοπεταλίων (PSL – Platelet storage lesions) και τον κίνδυνο βακτηριακής μόλυνσης. Οι PSL είναι μια σειρά βιοχημικών, δομικών και λειτουργικών αλλαγών που συμβαίνουν από τη συλλογή αίματος έως τη μετάγγιση.[185]

### **PSL και διαδικασία προετοιμασίας παραγώγων αιμοπεταλίων**

Κατά την διαδικασία παραγωγής των PCs η έκθεση των αιμοπεταλίων στις τεχνητές επιφάνειες και οι υψηλές δυνάμεις φυγοκέντρωσης προκαλούν κυτταρική ενεργοποίηση, κατακερματισμό και απελευθέρωση βιοχημικών ουσιών [101,186]. Ο βαθμός ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων ποικίλλει ανάλογα με την μέθοδο παρασκευής. Τα συμπυκνωμένα αιμοπετάλια από PRP εμφανίζουν αυξημένους δείκτες ενεργοποίησης, σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια αφαίρεσης, όπως η έκθεση P-σελεκτίνης, ενεργοποίηση GPIIb/IIIa, απώλεια GPIb και δραστικότητα παράγοντα αιμοπεταλίων 4 (PF4) καθώς σφαιροποιούνται με την αλληλεπίδρασή τους στα τοιχώματα του ασκού συλλογής κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης υψηλών στροφών[101]. Αντιθέτως, τα αιμοπετάλια BC προστατεύονται από την επιφάνεια του ασκού μέσω του ιζήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης υψηλών στροφών με αποτέλεσμα την ελάχιστη ενεργοποίηση που προκαλείται από την φυγοκέντρωση. Έτσι όπως η τεχνολογία αδρανοποίησης παθογόνων (PRT) επιδρά στα παθολογικά νουκλεικά οξέα, με παρόμοιο τρόπο μπορεί να αδρανοποιήσει το RNA αιμοπεταλίων επηρεάζοντας έτσι την ενεργοποίησή τους. Τα PC που επεξεργάστηκαν με PRT ήταν λιγότερο ανταποκρινόμενα στην *in vitro* διέγερση τους από αγωνιστές αιμοπεταλίων όπως το κολλαγόνο, το ADP και η θρομβίνη.[185]

### **PSL και αποθήκευση συμπυκνωμάτων αιμοπεταλίων**

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, οι αλληλεπιδράσεις των αιμοπεταλίων με την επιφάνεια του ασκού, η θερμοκρασία συντήρησης καθώς και η ανάδευση σχετίζονται με την λύση και ενεργοποίηση αιμοπεταλίων. Αυτό αντικατοπτρίζεται από την προοδευτική συσσώρευση στο μέσο αποθήκευσης, γαλακτικής αφυδρογονάσης(LDH), περιεχομένων α και δ κοκκίων (vWF, αυξητικού αιμοπεταλιακού παράγοντα PWF, 5-HT) παράλληλα με αυξημένη έκθεση P-σελεκτίνης (CD62P) και φωσφατιδυλοσερίνης (PS). Ενώ τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια από PCs μπορεί να έχουν βελτιωμένα αιμοστατικά αποτελέσματα, η αυξημένη έκθεση P-σελεκτίνης και η μείωση του GPIIb/IIIa σχετίζονται με μειωμένη επιβίωση των αιμοπεταλίων μετά τη μετάγγιση. [185]

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου, η αυξημένη γλυκόλυση και η μειωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία οδηγούν

σε μείωση της γλυκόζης, συσσώρευση γαλακτικού και αύξηση της οξύτητας του προϊόντος. Η εξασθενημένη παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μειώνει την ικανότητα των αιμοπεταλίων να εκτελούν ενεργειακά απαιτητικές διαδικασίες όπως υποτονικές αποκρίσεις στο στρες και ενεργοποίηση - συσσωμάτωση. Οι προκαλούμενες από την αποθήκευση μεταβολές στις πρωτεΐνες της επιφάνειας των αιμοπεταλίων, όπως οι υποδοχείς θρομβίνης και οι γλυκοπρωτεΐνες, μειώνουν τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, υπάρχει συσσώρευση ανοσοδραστικών πρωτεϊνών όπως λευκοκυτταρικές κυτοκίνες (παράγοντας νέκρωσης όγκου  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ιντερλευκίνης (IL) - 1 $\alpha$ , IL-6, IL-8) και διαλυτός προσδέτης CD40 (sCD40L) που μπορεί να συμμετέχει σε σχετιζόμενες με μετάγγιση οξείες πνευμονικές βλάβες και μη αιμολυτικές αντιδράσεις. Τα μικροσωματίδια (MPs) που προκαλούνται από την αποθήκευση έχουν συνδεθεί με ενισχυμένη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος. [185]

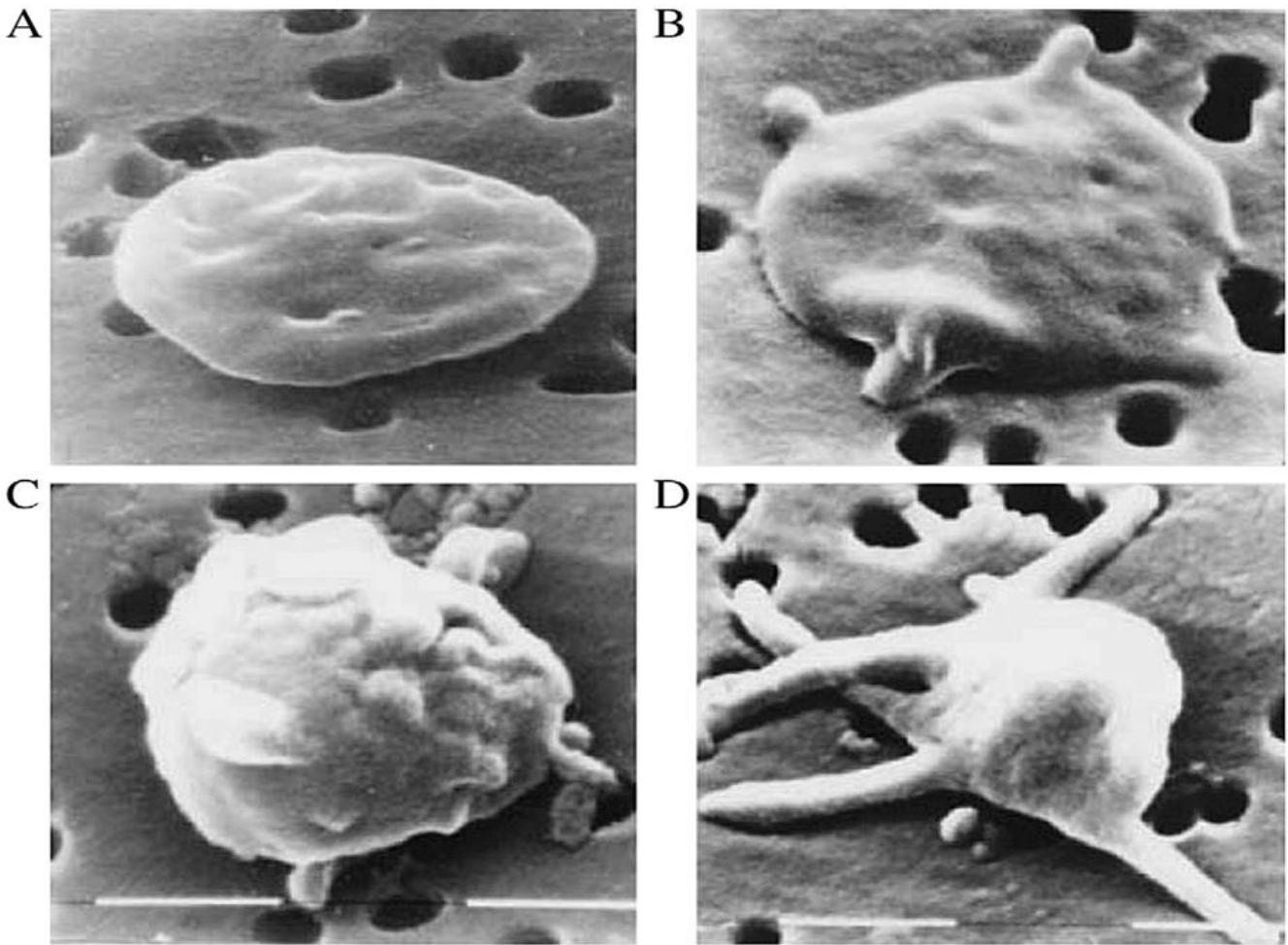
Κατά την αποθήκευση των συμπυκνωμάτων αιμοπεταλίων οι τροποποιήσεις στη δημιουργία ATP, στην έκφραση των επιφανειακών υποδοχέων αλλά και οι διαφοροποιήσεις που διενεργούνται στην οδό του μονοξειδίου του αζώτου καθώς και ο σχηματισμός των μικροκυστιδίων συντελούν στην εμφάνιση αυτών των επαγόμενων από την αποθήκευση βλαβών.

Όσον αφορά τον χρόνο αποθήκευσης των συμπυκνωμάτων αιμοπεταλίων φάνηκε να σχετίζονται με την ποιότητα των παραγώγων αυτών. Σε μία μετα-ανάλυση 46 εργασιών, οι Caram-Deelder και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι τα PCs που αποθηκεύτηκαν για 0-2 ημέρες ήταν ποιοτικά ανώτερα από εκείνα που είχαν αποθηκευτεί για 5-7 ημέρες. Η ανάκτηση μετά την μετάγγιση και η επιβίωση των αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν για πέντε έως επτά ημέρες ως ποσοστό των αντιστοίχων στις μηδέν έως δύο ημέρες ήταν 80% και 71%, αντίστοιχα [187]. Αυτές οι *in vitro* ενδείξεις επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι τα αιμοπετάλια στα PCs υφίστανται φθορές γεγονός που επηρεάζει τη βιωσιμότητα τους καθώς και προκαλεί απόπτωση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης τους [105].

### **Μορφολογία αποπτωτικού αιμοπεταλίου**

Η μορφολογία των αποπτωτικών αιμοπεταλίων, μοιάζει με εκείνη των υπόλοιπων κυττάρων. Παρατηρήθηκε όταν τα αιμοπετάλια διεγέρθηκαν από αγωνιστές όπως θρομβίνη, ιονοφόρο ασβέστιο, αραχιδονικό οξύ και U46619 (αγωνιστής υποδοχέα θρομβοξάνης A<sub>2</sub>). Οι μορφολογικές αλλαγές περιελάμβαναν τη συρρίκνωση των αιμοπεταλίων, τη συμπύκνωση του κυτταροπλάσματος, τον σχηματισμό προεξοχών της

πλασματικής μεμβράνης και την ανάπτυξη ψευδοπόδιων. Τα αποθηκευμένα αιμοπετάλια χάνουν το χαρακτηριστικό τους σε κατάσταση ηρεμίας σχήμα, υποβάλλονται σε κυτταροσκελετικές αλλαγές, σχηματίζουν ψευδοπόδια και αποβάλλουν μικροσωματίδια, χαρακτηριστικό ενός ενεργοποιημένου φαινοτύπου που αναφέρεται ως «βλάβη αποθήκευσης αιμοπεταλίων».[Εικόνα 14] [188]



Εικόνα 14: Μορφολογία αποπτωτικού αιμοπεταλίου. Ήρεμο φυσιολογικό αιμοπετάλιο (A), η αποπτωτική μορφολογία των αιμοπεταλίων χαρακτηρίζεται από κυστοποίηση (B,C) προεκβολή φιλοποδίων (D), συρίκνωση (D) και απόρριψη μικροκυστιδίων (C,D). Πηγή: Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev.* 2012 Mar;26(2):51-63.

Αυτή η επιβλαβής επίδραση στην ποιότητα των αιμοπεταλίων πηγάζει από έναν συνδυασμό παραγόντων καθώς τα αιμοπετάλια παραμένουν εκτός της κυκλοφορίας, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στο pH, της μηχανικής καταπόνησης, της ενεργοποίησης από εκκριμένους παράγοντες



και των μεταβολικών ανωμαλιών. Επιπλέον, η αποθήκευση αιμοπεταλίων απαιτεί υποφυσιολογικές θερμοκρασίες (ιδανικά μεταξύ 20 και 24 C) που έχουν ως αποτέλεσμα την κινητοποίηση ασβεστίου, συναρμολόγηση ακτίνης, μεταβολές περιφερικής ζώνης και αλλαγή σχήματος που σχετίζεται με την ενεργοποίηση αιμοπεταλίων. Αρχικά, αυτές οι αλλαγές περιγράφηκαν ως «ενεργοποίηση αιμοπεταλίων» και μόνο από το 1997 ορισμένοι ερευνητές [158] άρχισαν να θεωρούν αυτές τις μορφολογικές αλλαγές ως αποπτωτικές.

### **Μηχανισμός απόπτωσης αιμοπεταλίων κατά την αποθήκευση**

Έχει πραγματοποιηθεί μία μεγάλη σειρά δοκιμών in vitro για τη μελέτη των αποθηκευμένων συμπυκνωμάτων αιμοπεταλίων (PC). Χρησιμοποιώντας μικροσκόπια φαίνεται πως το λεπτό δισκοειδές σχήμα των φυσιολογικών αιμοπεταλίων χάνεται κατά την αποθήκευση και τα αιμοπετάλια γίνονται πιο σφαιρικά και δενδριτικά σε σχήμα καθώς πραγματοποιείται ο μετασχηματισμός από δισκοειδές σε σφαιρικό σχήμα. Το μέσο μέγεθος των αιμοπεταλίων μειώνεται κατά την αποθήκευση καθώς θραύονται σε μικροκυτίδια. Κατά τη διάρκεια παρατεταμένης αποθήκευσης, οι μεταβολικές μεταβολές αντικατοπτρίζονται από αλλαγή στις τιμές του pH των συμπυκνωμάτων και αυξήσεις της LDH. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται όταν αποθηκεύονται όπως αποδεικνύεται από την αυξημένη έκφραση της θρομβογλοβουλίνης ( $\beta$ -TG), του CD62P (P-σελεκτίνη) και την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS). [189]

Διάφορες έρευνες έχουν γίνει στο παρελθόν ώστε να καθοριστεί ο μηχανισμός απόπτωσης των αιμοπεταλίων κατά την αποθήκευση καθώς και για να συγκεκριμενοποιηθούν οι σχετικοί δείκτες που θα μπορούσαν να χαρακτηρίσουν αυτήν την αποπτωτική διαδικασία. Αποδείχτηκε ότι όντως τα αιμοπετάλια εμφανίζουν χαρακτηριστικούς δείκτες απόπτωσης κατά την αποθήκευσή τους. Τα αιμοπετάλια χάνουν τη βιωσιμότητά τους, όπως μετράται από την έκπτωση στην λειτουργικότητα της μεμβράνης, την απελευθέρωση της LDH και την μείωση της δυνατότητας συσσωμάτωσης. Η αύξηση των επιπέδων LDH καθώς και η έκθεση PS ήταν χαρακτηριστικοί δείκτες σε παλαιότερα πειράματα. Η σήμανση με Ανεξίνη- V και η δοκιμασία μείωσης MTS (cell viability assay) αποτέλεσαν απαραίτητες μεθόδους ανίχνευσης αυτών των δεικτών. [158,185]

Τα αιμοπετάλια εκφράζουν αρκετές από τις κασπάσες, υποδοχέα θανάτου και πρωτεΐνες μέλη της οικογένειας Bcl-2. Κατά την αποθήκευση επιβεβαιώθηκε η ενεργοποίηση της κασπάσης- 3. Ωστόσο τα επίπεδά της φάνηκαν να αυξάνονται ανάλογα με τον χρόνο αποθήκευσης. Αν και τα

περισσότερα κυτταρικά υποστρώματα για την κασπάση 3 είναι πυρηνικές πρωτεΐνες, η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη γελσολίνη αποτελεί ένα κυτταροπλασματικό υπόστρωμα για την κασπάση 3 και εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα αιμοπετάλια. Η ενεργοποίηση της κασπάσης -3 έχει ως αποτέλεσμα την πρωτεόλυση της γελσολίνης καθώς η τελευταία φαίνεται να αποτελεί στόχο της ενεργοποιημένης κασπάσης- 3 στα αιμοπετάλια.[158,185]

Κατά την αποθήκευση, τα αιμοπετάλια χάνουν την κυτταρική βιωσιμότητα και λειτουργία τους γεγονός που οδήγησε στην διενέργεια ερευνών μέχρι τις ημέρες μας που σχετίζονται με το μοριακό υπόβαθρο της απόπτωσης αιμοπεταλίων κατά την αποθήκευση, τους δείκτες απόπτωσης σε παράγωγα με διαφορετικούς τρόπους παρασκευής καθώς και την ανίχνευση αντίστοιχων δεικτών σε παράγωγα αιμοπεταλίων που συντηρούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Πολλοί δείκτες έχουν ανιχνευτεί ή μετρηθεί κατά την διάρκεια των ερευνών αυτών όπως: η μέτρηση αριθμού και μεγέθους PLT, η τιμή του pH, η μέτρηση της κατανάλωσης οξυγόνου, η μέτρηση του δυναμικού των μιτοχονδριακών μεμβρανών, η μέτρηση φωσφατιδυλοσερίνης και γλυκοπρωτεϊνών , η έκφραση P-σελεκτίνης , η LDH καθώς και η ανίχνευση μικροκυστιδίων.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

### **Δείκτες απόπτωσης και γήρανσης ασκών αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται σε ψυχρές θερμοκρασίες**

Τα ζητήματα που προκύπτουν από την αποθήκευση αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία δωματίου, όπως ο αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης βακτηρίων και η μείωση της αιμοστατικής λειτουργίας τους με τον χρόνο αποθήκευσης, οδήγησαν στην επανεμφάνιση ενδιαφέροντος για τα αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε ψυχρές θερμοκρασίες που προορίζονται για θεραπευτική μετάγγιση. Η αποθήκευση αιμοπεταλίων σε ψυχρές θερμοκρασίες (4° C) μπορεί να μειώσει τη βακτηριακή μόλυνση καθώς και τον κίνδυνο επιπλοκών που σχετίζονται με τη μετάγγιση. Τα αιμοπετάλια που έχουν αποθηκευτεί σε ψύχος (4° C) βρίσκονται υπό διερεύνηση για την μετάγγιση τους σε ασθενείς με αιμορραγία. Προς το παρόν δεν είναι γνωστό πόσο καιρό μπορούν να αποθηκευτούν προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε κλινικές εφαρμογές.

Εκτεταμένες έρευνες έχουν προσπαθήσει να βρουν τους βέλτιστους τρόπους αποθήκευσης αιμοπεταλίων που προορίζονται για μετάγγιση. Έχουν γίνει γνωστές πολλές πληροφορίες για τα υλικά ασκών αποθήκευσης, τα συνθετικά διαλύματα και καθώς και για τον τρόπο με τον οποίο η θερμοκρασία αποθήκευσης επηρεάζει τη βιωσιμότητα και τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. Ενώ η αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου διατηρεί 24ωρη *in vivo* ανάκτηση και επιβίωση των αιμοπεταλίων, υπάρχει μεγαλύτερος κίνδυνος για βακτηριακή ανάπτυξη. Επομένως, η ψυχρή αποθήκευση έχει γίνει ελκυστική λόγω της μείωσης του δυνητικού πολλαπλασιασμού των βακτηρίων και της διατήρησης της λειτουργίας των αιμοπεταλίων πέραν των 5 ημερών αποθήκευσης. Ωστόσο, τα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια έχουν τις δικές τους προκλήσεις. Τα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται μέσω πολλών μηχανισμών. Οι μορφολογικές και μοριακές αλλαγές που συμβαίνουν λόγω της έκθεσης στο κρύο ενισχύουν την ικανότητά τους να συμμετέχουν στην αιμοστατική διαδικασία με κόστος όμως την ταχεία κάθαρση από την κυκλοφορία.[190]

Η ψυχρή αποθήκευση των αιμοπεταλίων έχει ως πιθανό πλεονέκτημα την παράταση του χρόνου αποθήκευσης, ενώ μειώνει την πιθανότητα μόλυνσης μετά τη μετάγγιση, δεδομένης της μικρής πιθανότητας ανάπτυξης βακτηρίων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η αποθήκευση PLTs στο κρύο (1 - 6 °C) οδήγησε σε σημαντική μείωση της ανάκτησης και της επιβίωσης *in vivo* σε σύγκριση με τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου αιμοπετάλια όταν αποθηκεύτηκαν για την ίδια χρονική περίοδο λόγω των επαγόμενων από το ψύχος βλαβών αποθήκευσης. Ενώ οι πλήρεις λόγοι για τις βλάβες αποθήκευσης σε ψυχρές θερμοκρασίες παραμένουν ασαφείς, έχει περιγραφεί ένας μηχανισμός εκκαθάρισης << ψυχρών >> αιμοπεταλίων που αφορά τον σχηματισμό συστάδων γλυκοπρωτεΐνης (GP)Ib στην επιφάνειά τους και στην *in vivo* σύνδεση με μακροφάγα και υποδοχείς ηπατοκυττάρων. Μελέτες *in vitro* δείχνουν ότι τα ψυχρά αποθηκευμένα PLT έχουν ανώτερες αιμοστατικές ιδιότητες σε σύγκριση με τα αποθηκευμένα σε RT (Θερμοκρασία δωματίου – Room temperature) PLT. Τα ψυχρά (Cold storage – CS) PLT διόρθωσαν το χρόνο αιμορραγίας γρηγορότερα από τα RT- PLTs σε ασθενείς με θρομβοκυτταροπενία όταν τα CS- PLTs διατηρήθηκαν στο πλάσμα σε ψυχρή θερμοκρασία για 72 ώρες ή λιγότερο. Ωστόσο, πολλά αποδεικτικά στοιχεία δεν ευνοούν την ψυχρή αποθήκευση PLT.[191]

Πολλές μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι τα PLT διατηρούν καλές αιμοστατικές ιδιότητες όταν αποθηκεύονται για περιόδους έως και 21 ημέρες σε ψυχρές συνθήκες, αλλά δεν έχει εντοπιστεί πλήρως ακόμα ο λόγος για τον οποίο τα μακροχρόνια αποθηκευμένα ψυχρά αιμοπετάλια

(> 5 ημέρες) δεν λειτουργούν όπως και αυτά που αποθηκεύονται βραχυπρόθεσμα (<3 ημέρες) στις ίδιες συνθήκες.[191,192]

### **5.1 Διαφοροποιήσεις στην φυσιολογία ψυχρών αιμοπεταλίων**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω κατά την αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε ψυχρές θερμοκρασίες παρατηρείται ένας μηχανισμός ενεργοποίησης αυτών. Αυτό συμβαίνει λόγω της επίδρασης αυτών των μη φυσιολογικών θερμοκρασιών στα αιμοπετάλια. Διάφοροι δείκτες που αποδεικνύουν την ενεργοποίηση έχουν περιγραφεί. Οι δείκτες αυτοί μπορεί να είναι ενδεικτικοί για την απόπτωση καθώς και για την κάθαρση των αιμοπεταλίων από την κυκλοφορία. Η αποθήκευση αιμοπεταλίων στο ψύχος προκαλεί δομικές, μοριακές και μεταβολικές αλλαγές. Αυτές οι αλλαγές, που χαρακτηρίζονται και ως αποθηκευτικές βλάβες ψυχρών αιμοπεταλίων, επιδεικνύουν και κάποια μορφή ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Αν και τα ψυχρά αιμοπετάλια υπόκεινται σε αλλαγή σχήματος, εκφράζουν αυξημένους δείκτες ενεργοποίησης στην επιφάνεια τους ή εκθέτουν PS, πιστεύεται ότι είναι ικανά και έτοιμα να συμμετάσχουν στην αιμοστατική διαδικασία.[190]

Κατά την αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε ψυχρές θερμοκρασίες εντοπίζονται διαφοροποιήσεις στην φυσιολογία τους όπως:

- Αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων επαγόμενη από το ψύχος
- Διαρροή ενδοκυττάριου ασβεστίου προκαλούμενη από τις ψυχρές θερμοκρασίες συντήρησης
- Διαφοροποιήσεις στον μιτοχονδριακό έλεγχο του μεταβολισμού των κυττάρων και στην απελευθέρωση δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS)
- Συσταδοποίηση της γλυκοπρωτεΐνης GPIb στην επιφάνεια των ψυχρών αιμοπεταλίων

#### **Αλλαγή του σχήματος αιμοπεταλίων**

Τα αιμοπετάλια κυκλοφορούν σε δισκοειδή μορφή και κατά την ενεργοποίηση από ενδογενή ερεθίσματα, υφίστανται μορφολογικές αλλαγές. Ενώ η αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετικού συστήματος συνήθως πραγματοποιείται από συμβάντα δέσμευσης και σηματοδότησης των υποδοχέων αιμοπεταλίων, μελέτες έχουν δείξει ότι η θερμοκρασία από μόνη της μπορεί να κινητοποιήσει μορφολογικές αλλαγές. Όταν τα αιμοπετάλια εκτίθενται σε χαμηλές θερμοκρασίες (15 ° C ή λιγότερο), υφίστανται αλλαγή σχήματος που φαίνεται από απώλεια στη δισκοειδή μορφολογία τους [193]. Η αλλαγή στην υπερδομή που προκαλείται από το

κρύο έχει συσχετιστεί με την απώλεια του περιφερειακού δακτυλίου μικροσωληνίσκων εντός δέκα λεπτών μετά την έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία. Τα ψυχρά αιμοπετάλια παρά την απώλεια του δικτύου μικροσωληνίσκων έχουν την δυνατότητα να διατηρούν τα οργανίδια τους τα οποία είναι τυχαία διασπαρμένα. Η ψύξη των αιμοπεταλίων οδηγεί σε αλλαγή σχήματος χρησιμοποιώντας την λειτουργία από τα κύρια κυτταροσκελετικά δίκτυα και εμπλέκοντας τουλάχιστον το δίκτυο μικροσωληνίσκων και τα νημάτια ακτίνης.[190]

### **Διαρροή ενδοκυττάριου ασβεστίου προκαλούμενη από τις ψυχρές θερμοκρασίες συντήρησης**

Τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται στους 4 ° C για μεγάλο χρονικό διάστημα όχι μόνο υφίστανται αλλαγή σχήματος αλλά επίσης απελευθερώνουν τα περιεχόμενα των κοκκίων τους και εκθέτουν φωσφατιδυλοσερίνη στις επιφάνειές τους. Αυτή η ψυχρή ενεργοποίηση αιμοπεταλίων μπορεί να προκληθεί από την αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Οι Oliver και συνεργάτες χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή Indo-1 προσπάθησαν να ανιχνεύσουν την συγκέντρωση ενδοκυττάριου ασβεστίου στα αιμοπετάλια κατά την ψύξη. Τα αποτελέσματα από αυτά τα πειράματα έδειξαν ότι το ασβέστιο αυξήθηκε κατά την διαδικασία ψύξης στους 5 ° C [222]. Το ενδοκυττάριο ασβέστιο αυξήθηκε κυρίως κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ψύξης παρά κατά τη διάρκεια παρατεταμένης ψυχρής αποθήκευσης. Επιπλέον ενδείξεις ότι η εσωτερική διαρροή ασβεστίου σημειώθηκε κατά τη φάση ψύξης επιβεβαιώθηκε με μελέτες που χρησιμοποίησαν ενδοκυτταρικούς χηλικούς παράγοντες ασβεστίου όπως ο BAPTA.

Ο ακριβής μηχανισμός που συμβάλλει στις αυξήσεις του ενδοκυτταρικού ασβεστίου κατά την ψύξη των αιμοπεταλίων παραμένει ασαφής. Στην πραγματικότητα, μπορεί να υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που μπορεί να εξηγούν την αύξησή του. Η πρώτη λογική εξήγηση θα μπορούσε να είναι μια ενεργητική ή παθητική διαρροή από το οργανόλιο αποθήκευσης ασβεστίου των αιμοπεταλίων στο πυκνό σύστημα σωληναρίων. Είναι επίσης εύλογο ότι οι αντλίες ασβεστίου των αιμοπεταλίων θα μπορούσαν να υποστούν βλάβες όταν υποβληθούν σε υποθερμικές καταστάσεις. Επίσης τα μόρια και οι πρωτεΐνες δέσμευσης ασβεστίου επηρεάζονται από τη μείωση των θερμοκρασιών και συχνά οδηγούν σε μειωμένη συγγένεια δέσμευσης για το ασβέστιο. Έτσι, η ψυχρή αποθήκευση των αιμοπεταλίων μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση ενδοκυτταρικού ασβεστίου από μόρια τα οποία κανονικά το δεσμεύουν σε φυσιολογικές θερμοκρασίες.[190]

**Διαφοροποιήσεις μιτοχονδριακού ελέγχου του μεταβολισμού των αιμοπεταλίων και απελευθέρωση δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) κατά την ψυχρή αποθήκευση**

Τα μιτοχόνδρια έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της παραγόμενης μέσω ATP ενέργειας και της λειτουργίας των αιμοπεταλίων ενώ έχει εκτιμηθεί ό,τι το 85% της συνολικής ενέργειας που παράγεται σε ένα ήρεμο αιμοπετάλιο προέρχεται από οξειδωτική φωσφορύλιωση. Επίσης όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται και στον μηχανισμό απόπτωσης των αιμοπεταλίων. Τα ψυχρά αιμοπετάλια εμφανίζουν μειωμένη κατανάλωση γλυκόζης καθώς και μειωμένη παραγωγή γαλακτικού. Αξιολογώντας την μιτοχονδριακή αναπνοή των αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται σε ψυχρές θερμοκρασίες φαίνεται ότι αυτή παρουσιάζεται μειωμένη στα αιμοπετάλια σε κατάσταση ηρεμίας και αυξημένη στα αντίστοιχα που έχουν ενεργοποιηθεί. Τα παραπάνω αποδεικνύουν ό,τι η αποθήκευση σε ψυχρές θερμοκρασίες έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των μεταβολικών απαιτήσεων των αιμοπεταλίων αυτών καθώς και συμβάλει στην διατήρηση της μιτοχονδριακής τους λειτουργίας. Ο μεταβολισμός των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων μέσω των οδών γλυκόλυσης αφορά την διάσπαση της γλυκόζης και κατά συνέπεια την παραγωγή γαλακτικού οξέος, ελεύθερων ιόντων υδρογόνου, διοξειδίου του άνθρακα και νερού. Ο μεταβολισμός υψηλότερων συγκεντρώσεων γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ κατά την διάρκεια της αποθήκευσης προκαλεί μείωση του pH σε τιμές χαμηλότερες του 6.2, οδηγώντας έτσι σε μείωση της βιωσιμότητας και λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Το γαλακτικό οξύ ως ενεργειακό υπόστρωμα των μιτοχονδρίων φαίνεται ότι ενισχύει την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). [190]

Μια βασική παράμετρος που ορίζει τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα είναι ο ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου (OCR). Η αερόβια αναπνοή χαρακτηρίζεται από αυξημένο OCR, ενώ η εναλλακτική αναερόβια αναπνοή είναι ανεξάρτητη από την κατανάλωση οξυγόνου. Ενώ όπως προαναφέρθηκε, η ψυχρή αποθήκευση αναμένεται να έχει χαμηλές μεταβολικές απαιτήσεις, υπάρχουν ενδείξεις που υποδηλώνουν ότι η ψυχρή αποθήκευση προκαλεί ενεργειακά εξαρτημένη σηματοδότηση η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και δυσλειτουργία.[190]

Σε πρόσφατη μελέτη των Hegde και συνεργατών αποδείχτηκε ό,τι η ψυχρή αποθήκευση αιμοπεταλίων (PRP- pooled σε PAS) για χρόνο μεγαλύτερο των 7 ημερών, επάγει την αυξανόμενη, με την πάροδο του χρόνου, μιτοχονδριακή μεταβολική διαταραχή. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές μελέτησαν μεταξύ των άλλων το OCR αποθηκευμένων ψυχρών

αιμοπεταλίων για διάστημα έως και 2 εβδομάδων προκειμένου να βγάλουν κάποιο συμπέρασμα για τις μεταβολικές απαιτήσεις τους. Χρησιμοποιώντας δοκιμασία που προκαλεί μιτοχονδριακό στρες κατέληξαν στο αποτέλεσμα ό,τι τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται υπό αυτές τις συνθήκες για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 7 ημερών, υφίστανται κάποια μιτοχονδριακή αλλαγή η οποία οδηγεί στην εναλλαγή του σχετιζόμενου με ATP OCR σε OCR που σχετίζεται με την διαρροή πρωτονίων. Κατέληξαν ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία εμφανίζεται ουσιαστικά μεταξύ 5ης και 7ης ημέρας ψυχρής αποθήκευσης και στην διαπίστωση πως αυτή η βλάβη στο συγκεκριμένο παρασκεύασμα (PRP – pooled σε PAS) θα μπορούσε να ανιχνευθεί μόνο σε υπό stress συνθήκες. Μία άλλη σημαντική διαπίστωση που έκαναν είναι ότι η απελευθέρωση ROS αυξάνεται σημαντικά στα συγκεκριμένα αιμοπετάλια όταν αυτά αποθηκεύονται σε ψυχρές θερμοκρασίες για χρονικό διάστημα 7 ημερών ή παραπάνω. [191]

### **Συσταδοποίηση της γλυκοπρωτεΐνης GPIb στην επιφάνεια των ψυχρών αιμοπεταλίων**

Το σύμπλεγμα γλυκοπρωτεϊνών Ib-IX-V (GPIb-IX-V) είναι ένας από τους κύριους παράγοντες προσκόλλησης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και αλληλεπιδρά με τον ενεργοποιημένο παράγοντα von Willebrand για την υποστήριξη της πρωτογενούς αιμόστασης. Η συσταδοποίηση της GPIba συμβάλει στην απομάκρυνση των αιμοπεταλίων από την κυκλοφορία. Έρευνες που έχουν γίνει σε ποντικούς έχουν δείξει ότι η ψυχρή αποθήκευση οδηγεί σε συγκέντρωση GPIba στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων γεγονός το οποίο οφείλεται πιθανώς σε εξαρτώμενους από το ψύχος υποκείμενους μηχανισμούς όπως η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου καθώς και οι αναδιατάξεις κυτταροσκελετού-ακτίνης.[190]

## **5.2 Κάθαρση ψυχρών αιμοπεταλίων από την κυκλοφορία**

Μελέτες που αφορούν την αποθήκευση αιμοπεταλίων έδειξαν ό,τι υπήρξε προοδευτική απώλεια GPIba από την επιφάνεια τους με την πάροδο του χρόνου.[194,195] Η μεταλλοπρωτεϊνάση ADAM17 ή TACE, αναγνωρίστηκε ως το ένζυμο που ευθύνεται για τη διάσπαση του GPIba [196]. Η αναστολή της δραστηριότητας της ADAM17 βελτίωσε την ανάκτηση και την επιβίωση των αιμοπεταλίων αποδεικνύοντας έτσι την σχέση μεταξύ άθικτου GPIba και επιβίωσης αιμοπεταλίων. Επίσης όταν τα αιμοπετάλια αποθηκεύονται σε ψυχρές θερμοκρασίες πραγματοποιούνται τροποποιήσεις στις εξωκυττάριες γλυκάνες του GPIba. Αυτές οι τροποποιήσεις αφορούν την αποσιαλλίωση και την

συσταδοποίηση της εκτεθειμένης β-N-ακετυλογλυκοζαμίνης (bGlcNAc). [190]

Τα ψυχρά αιμοπετάλια αποσιαλιώνονται μετά από 48 ώρες αποθήκευσης μέσω μιας διαδικασίας η οποία εμπλέκει την νευραμινιδάση 1 (Neu1). Η έκφραση της Neu1 στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του σιαλικού οξέος από τις γλυκοπρωτεΐνες της μεμβράνης όπως της GPIba. Μόλις συμβεί η αποσιαλίωση, η υποκείμενη και πρόσφατα εκτεθειμένη β-γαλακτοσιδάση (β-gal) στα αιμοπετάλια έχει αποδειχθεί ότι αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς Ashwell-Morell (AMR) των ηπατοκυττάρων ή από τα μακροφάγα του ήπατος (κύτταρα Kupffer) [190].

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η βραχυπρόθεσμη (2 ώρες) ψύξη των αιμοπεταλίων ποντικού οδήγησε στον σχηματισμό συστάδων bGlcNAc.[197] Παρέχονται στοιχεία ότι το συσσωματωμένο bGlcNAc αναγνωρίστηκε από τον υποδοχέα Mac-1 (ιντεγκρίνη αMβ2) σε μακροφάγα και οδήγησε σε κάθαρση αιμοπεταλίων[197]. Ωστόσο τα ποντίκια με έλλειψη του υποδοχέα Mac-1 εμφάνισαν βελτιωμένους χρόνους επιβίωσης των ψυχρών αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία.

Η γαλακτοζυλίωση των υπολειμμάτων GlcNAc με την χρήση UDP-γαλακτόζης αποδείχθηκε ότι βελτιώνει τον χρόνο επιβίωσης στην κυκλοφορία των βραχυπρόθεσμα αποθηκευμένων ψυχρών αιμοπεταλίων, ωστόσο, δεν βελτίωσε την κάθαρση ανθρώπινων αιμοπεταλίων που είχαν αποθηκευτεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (> 48 ωρών) σε ψυχρές θερμοκρασίες [197,198]. Ενδεχομένως και άλλοι μηχανισμοί ή υποδοχείς να οδηγούν σε κάθαρση των ψυχρών αιμοπεταλίων αλλά χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί ο υποδοχέας Fc για IgG, FcγRIIA (CD 32) ο οποίος εκφράζεται σε μακροφάγα αλλά και σε αιμοπετάλια και έχει προταθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσοδιαμεσολαβούμενη κάθαρση των αιμοπεταλίων [190]

### **5.3 Δείκτες απόπτωσης αιμοπεταλίων που έχουν μετρηθεί κατά την αποθήκευση στους 4° C**

Οι λόγοι που αναφέρθηκαν παραπάνω σχετικά με την βιωσιμότητα και την γρήγορη κάθαρση των αιμοπεταλίων από την κυκλοφορία μετά την μετάγγιση καθώς και η αυξημένη ικανότητα ενεργοποίησης των ψυχρών αιμοπεταλίων σε συνδυασμό με τα πλεονεκτήματά τους συγκριτικά με τα αποθηκευμένα αιμοπετάλια στους 20-24° C οδήγησαν κάποιους ερευνητές να διεξάγουν τα τελευταία χρόνια διάφορες μελέτες. Αυτές αφορούσαν την κατανόηση των μηχανισμών απόπτωσης και κατά συνέπεια κάθαρσης από την κυκλοφορία των αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται σε ψυχρές



θερμοκρασίες, τον μέγιστο δυνατό χρόνο αποθήκευσης στους 4° C, την εύρεση και αξιολόγηση των κατάλληλων δεικτών ποιότητας, την καλύτερη δυνατή επιλογή διαλύματος αιμοπεταλίων καθώς και την δυνατότητα εύρεσης ανασταλτικών μηχανισμών που θα μπορούσαν να αναστείλουν την ενεργοποίηση των οδών απόπτωσης κατά την διάρκεια της ψυχρής αποθήκευσης. Νέες τεχνολογίες για την πρόληψη της απόπτωσης και κατά συνέπεια για την αναστολή της φαγοκυττάρωσης και τη διατήρηση της λειτουργικής δραστηριότητας των ψυχρών αιμοπεταλίων θα μπορούσαν να βοηθήσουν τις τράπεζες αίματος να αντιμετωπίσουν τη χρόνια έλλειψη αιμοπεταλίων υψηλής ποιότητας.

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των συμπυκνωμάτων αιμοπεταλίων στις τράπεζες αίματος, η κυτταρική απόπτωση εμφανίζεται με μείωση πρωτεϊνών Bcl-xL, τραυματισμό μιτοχονδριακής μεμβράνης, αυξημένη έκθεση PS, ενεργοποίηση κασπάσης και πρωτεόλυση διαφόρων κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών. Ενώ υπάρχουν αποδείξεις ότι τα PLT που αποθηκεύονται στο κρύο στους 0 ° C εμφανίζουν προ-αποπτωτικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένων της μιτοχονδριακής μετατόπισης της Bax, απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, ενεργοποίησης της κασπάσης-9 και της έκθεσης PS, ο μηχανισμός απόπτωσης που παρουσιάζεται κατά τη διάρκεια παρατεταμένης αποθήκευσης αιμοπεταλίων σε θερμοκρασίες (1-6 ° C) είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστος.[199]

Στα πλαίσια αυτών των ερευνών προκειμένου να αξιολογηθούν τα αποτελέσματά τους μετρήθηκε πλήθος δεικτών που σχετίζονται με τον αριθμό, το μέγεθος, τον μεταβολισμό ,την ενεργοποίηση αλλά και την απόπτωση των αιμοπεταλίων. Παρακάτω παρουσιάζονται δείκτες απόπτωσης αιμοπεταλίων που έχουν μετρηθεί σε ενδεικτικές έρευνες με αντικείμενο την αποθήκευση αιμοπεταλίων, με διαφορετικούς τρόπους παρασκευής και επεξεργασίας, σε ψυχρές θερμοκρασίες.

### **Μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό δυναμικό – ακεραιότητα μιτοχονδριακής μεμβράνης και λειτουργίας**

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο η αποπόλωση του μιτοχονδριακού δυναμικού ( $\Delta\Psi_m$ ) αποτελεί έναν από τους δείκτες απόπτωσης των αιμοπεταλίων. Διάφοροι ερευνητές σε μελέτες τους προκειμένου να αξιολογήσουν την μιτοχονδριακή ακεραιότητα και την πιθανή απόπτωση κατά την ψυχρή αποθήκευση των αιμοπεταλίων περιέλαβαν στις μετρήσεις τους τον συγκεκριμένο δείκτη.

Οι μετρήσεις του  $\Delta\Psi_m$  πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας κυρίως κυτταρομετρία ροής με τους ανιχνευτές DIOC6 [200] και JC-1[201] ανάλογα με την μελέτη ή το πρωτόκολλο WST-1 για την ανίχνευση της

μιτοχονδριακής δραστηριότητας.[202] Ο JC-1 είναι ένας θετικά φορτισμένος ανιχνευτής που συσσωρεύεται στο αρνητικά φορτισμένο εσωτερικό περιβάλλον των υγιών μιτοχονδρίων και κατά την συμύκνωσή του σχηματίζει κόκκινα φθορίζοντα συσσωματώματα-J. Σε ένα αποπτωτικό κύτταρο ο JC-1 εμφανίζεται με μονομερή μορφή αντί με την μορφή των συσσωματωμάτων που έχει στα υγιή. Μετά την αποπόλωση, τα συσσωματώματα J διαλύονται και μπορεί να ανιχνευθεί πράσινος φθορισμός. Όταν η χρωστική συγκεντρώνεται με την μορφή συσσωματωμάτων στο κέντρο των μιτοχονδρίων η μέγιστη ένταση του φθορισμού είναι περίπου 590nm ενώ όταν βρίσκεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα η μέγιστη εκπομπή είναι περίπου 530nm. Η κατάρρευση του ΔΨm ( η οποία δείχνει μιτοχονδριακή αποπόλωση) προκαλεί μειωμένη συσσώρευση του DiOC6 στα μιτοχόνδρια και αντίστοιχη μείωση της έντασης φθορισμού.[201,203]

Τα μιτοχόνδρια των φυσιολογικών και άθικτων αιμοπεταλίων έχουν υψηλό μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό δυναμικό. Αντίθετα η κατάρρευση του τελευταίου είναι ένδειξη πρώιμης απόπτωσης. Έχει φανεί από έρευνα ότι με την χρήση του κατάλληλου κρυοπροστατευτικού παράγοντα όπως η τρεχαλόζη, τα ψυχρά αιμοπετάλια μπόρεσαν να διατηρήσουν το μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό δυναμικό τους έως και για 9 ημέρες ψυχρής αποθήκευσης όπου τόσες ήταν και οι ημέρες δοκιμασίας της έρευνας.[201]. Άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αιμοπετάλια αφαίρεσης (σε 100% πλάσμα) πίστωσε ως σημαντικό πλεονέκτημα της ψυχρής αποθήκευσης , την διατήρηση της μιτοχονδριακής ακεραιότητας παρά το γεγονός ότι σαφώς το ΔΨm επηρεάζεται με την πάροδο του χρόνου. Άξιο λόγου είναι ότι η συγκεκριμένη έρευνα των Stolla και συνεργατών αφορούσε δοκιμασίες σε ψυχρά αιμοπετάλια που είχαν αποθηκευτεί για μέχρι και 20 ημέρες.[203] Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι η ψυχρή αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε πρόσθετο διάλυμα (PAS), συνέβαλε στην ελαχιστοποίηση της μιτοχονδριακής αποπόλωσης μέχρι και την 15η ημέρα αποθήκευσης.[200]

### **Απελευθέρωση PS**

Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης σχετίζεται με την ενεργοποίηση, απόπτωση αλλά και την προπνηκτική δραστηριότητα των αιμοπεταλίων.[204-206] Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης πιστεύεται επίσης ότι είναι το απόλυτο σήμα θανάτου στο μονοπάτι της απόπτωσης καθώς εκκινεί άμεσα την κάθαρση αιμοπεταλίων από το φαγοκυτταρικό σύστημα.[201] Έχει χρησιμοποιηθεί ως χαρακτηριστικός δείκτης για την απόπτωση των ψυχρών αποθηκευμένων αιμοπεταλίων σε διάφορες μελέτες καθώς σχεδόν σε κάθε περίπτωση κατά την ψυχρή αποθήκευση η

φωσφατιδυλοσερίνη εξωτερικεύεται στην επιφάνεια των ψυχρών αιμοπεταλίων προκαλώντας αποπτωτικά συμβάντα. Η ανίχνευσή της γίνεται συνήθως μέσω της δέσμευσης αννεξίνης V. [101] Σε έρευνες που αφορούσαν την ψυχρή αποθήκευση διαφόρων παρασκευασμάτων έχει επιβεβαιωθεί η προοδευτική αύξηση έκθεσης PS η οποία φαίνεται να είναι ανάλογη του χρόνου αποθήκευσης και να επάγεται από την θερμοκρασία στους 4° C . Χαρακτηριστικό είναι ότι σε έρευνα που αφορούσε την ψυχρή αποθήκευση για 7 ημέρες αιμοπεταλίων αφαίρεσης σε PAS, αναφέρεται ότι υψηλότερη έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης (αξιολογούμενη από το ποσοστό θετικών σε αννεξίνη V συμβάντων) ανιχνεύτηκε σε όλη την χρονική περίοδο στην επιφάνεια των PLTs κατά την αποθήκευση τους στην ψυχρή θερμοκρασία των 4° C. Οι ερευνητές σε αυτή την μελέτη επισήμαναν ό,τι η επαγόμενη από το κρύο αύξηση της έκθεσης της φωσφατιδυλοσερίνης δεν συσχετίστηκε με την υπολειμματική συγκέντρωση πλάσματος, υποδεικνύοντας έτσι ότι η ψυχρή αποθήκευση των APCs επηρεάζει την επιβίωση των PLTs προκαλώντας κυτταρική απόπτωση με τρόπο ανεξάρτητο από το πλάσμα.[207] Η αύξηση έκθεσης PS ως δείκτης απόπτωσης σε ψυχρά αιμοπετάλια επιβεβαιώνεται από άλλη μελέτη των Xu και συνεργατών του σε ψυχρά αιμοπετάλια αφαίρεσης με διάρκεια αποθήκευσης 7 ημερών χωρίς ωστόσο να επισημαίνεται συγκριτικά αξιολογία διαφορά από τα υπόλοιπα παρασκευάσματα που έλεγξαν.[208] Αύξηση έκθεσης PS στην επιφάνεια των ψυχρών αιμοπεταλίων αποδεικνύεται και στην πολύ πρόσφατη μελέτη των Stolla και συνεργατών.[203] Πάρα ταύτα οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποίησαν την μέτρηση της φωσφατιδυλοσερίνης στα ψυχρά αιμοπετάλια σε σύγκριση με την αντίστοιχη έκθεση σε παράγωγα αιμοπεταλίων που είχαν αποθηκευτεί σε άλλες θερμοκρασίες.

### **Ενεργοποίηση κασπασών**

Η ενεργοποίηση των κασπασών αποτελεί ένα χαρακτηριστικό συμβάν κυτταρικής απόπτωσης. Η ανίχνευση της ενεργής κασπάσης 3 ως δείκτης απόπτωσης έχει μετρηθεί και αξιολογηθεί σε έρευνες με αντικείμενο την ψυχρή αποθήκευση των αιμοπεταλίων. Η μέτρηση των επιπέδων ενεργής κασπάσης 3 γίνεται κυρίως με την χρήση της μεθόδου ELISA - ανάλυσης χρωμογόνου ενζύμου καθώς και με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τον εξειδικευμένο ανιχνευτή FAM-DEVD-FMK.[151] Ερευνητές όπως οι Liu και συνεργάτες δήλωσαν ότι η συγκέντρωση των κασπασών αυξάνεται κατά την διάρκεια της ψυχρής αποθήκευσης των αιμοπεταλίων[201].

Η ίδια διαπίστωση στηρίχθηκε και σε άλλη πρόσφατη έρευνα των Baghdadí και συνεργατών οι οποίοι ανίχνευσαν υψηλότερα επίπεδα ενεργής κασπάσης-3 την 5η ημέρα ψυχρής αποθήκευσης συμπυκνωμένων

αιμοπεταλίων παρασκευασμένων από PRP, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει την επίδραση της ψυχρής θερμοκρασίας στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3.[202]

Κατά την απόπτωση οι διαταραχές στην μιτοχονδριακή μεμβράνη κινητοποιούν την ενεργοποίηση της κασπάσης 3.[155] Ωστόσο αυτή η αλληλουχία συμβάντων δεν ανιχνεύθηκε στην επίσης πρόσφατη μελέτη των Stolla και συνεργατών ενώ παράλληλα ανιχνεύθηκε μία προοδευτικά αυξητική τάση ενεργοποίησης της κασπάσης-3 την 10η και 15η μέρα ψυχρής αποθήκευσης αιμοπεταλίων αφαίρεσης σε πλάσμα, χωρίς όμως σημαντικά ευρήματα. [203]

Σημαντικά αυξημένη ανίχνευση ενεργής κασπάσης 3/7 παρατηρήθηκε επίσης σε ψυχρά αιμοπετάλια αφαίρεσης σε πλάσμα κατά την 15η ημέρα αποθήκευσης συγκριτικά με τα αιμοπετάλια ελέγχου (1η ημέρα αποθήκευσης).[200] Φαίνεται ότι η ανίχνευση ενεργής κασπάσης 3 είναι ένδειξη της μακροπρόθεσμης ψυχρής αποθήκευσης αιμοπεταλίων καθώς οι σημαντικές αυξήσεις παρατηρούνται με την επιμήκυνση του χρόνου αποθήκευσης.

### **Έκφραση σχετιζόμενων με απόπτωση πρωτεϊνών (Bcl-xL και Bax)**

Τα επίπεδα έκφρασης αντι-αποπτωτικής Bcl-xL και προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax των αποθηκευμένων PLT έχουν εκτιμηθεί σε έρευνες όπου επιχειρήθηκε η μέτρησή τους μέσω της μεθόδου western blot. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών εκτιμήθηκαν ως λόγος αντιαποπτωτικού Bcl-XL / προαποπτωτικού Bax σε μελέτη ψυχρών αιμοπεταλίων αφαίρεσης σε PAS. Στην έρευνα αυτή δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική αύξηση έκφρασης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax στα ψυχρά αιμοπετάλια από την 1η ημέρα ελέγχου έως και την 10η ημέρα αποθήκευσης.[200]

Παρόμοια ευρήματα με αυτά υποστηρίχθηκαν και σε παλαιότερη έρευνα στην οποία τα επίπεδα αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-XL παρέμειναν αμετάβλητα ενώ υπήρξε μία σχετική αύξηση της Bax ως αποτέλεσμα της γήρανσης λόγω αποθήκευσης. Ωστόσο οι Liu και συνεργάτες επισήμαναν ότι το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποκατασταθεί με την προσθήκη τρεχαλόζης στα ψυχρά αιμοπετάλια. [201]

### **Απελευθέρωση μικροκυστιδίων (Platelet microparticles -MPs)**

Η απελευθέρωση MPs αιμοπεταλίων είναι ένας δείκτης για την ενεργοποίησή τους και αυξάνεται ανάλογα με το χρόνο αποθήκευσης στα

προϊόντα αιμοπεταλίων.[209] Ωστόσο τα αιμοπετάλια αποβάλλουν μικροκυστίδια όχι μόνο κατά την ενεργοποίηση, αλλά και κατά τη γήρανσή τους με μια διαδικασία που μοιάζει με απόπτωση.[210] Ενδεικτικά η ανίχνευση των MPs στην μελέτη των Stolla και συνεργατών πραγματοποιήθηκε με την χρήση κυτταρομετρίας ροής. Στην μελέτη αυτή ανιχνεύθηκε μία σταδιακή αύξηση των MPs κατά το διάστημα 5ης έως 20ης ημέρας ψυχρής αποθήκευσης στους 4° C.[203]

Οι κυτταροσκελετικές αλλοιώσεις αποτελούν χαρακτηριστικό συμβάν των βλαβών αιμοπεταλίων που προκαλούνται από την ψυχρή αποθήκευση. Παράλληλα αποτελούν σημαντικό παράγοντα μειωμένης επιβίωσης και λειτουργικής ανεπάρκειας. Αποτέλεσμα της ενεργοποίησης και εξωκυττάρωσης των αιμοπεταλίων είναι ο κατακερματισμός τους που έχει ως συνέπεια την απόρριψη MPs. Οι Hegde και συνεργάτες σε πολύ πρόσφατη μελέτη τους ανίχνευσαν σημαντική αύξηση απελευθέρωσης MPs την 7η ημέρα ψυχρής αποθήκευσης αιμοπεταλίων (PRP Pooled σε PAS).[191]

Άλλοι δείκτες που σχετίζονται με την επιβίωση και ποιότητα των αιμοπεταλίων κατά την διάρκεια της ψυχρής αποθήκευσης και όχι μόνο είναι η μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων ( PLT count) καθώς και η μέτρηση της τιμής του pH. Η τελευταία σχετίζεται με την γήρανση κατά την αποθήκευση όπως επίσης και η κατανάλωση γλυκόζης ή παραγωγή γαλακτικού όπως περιεγράφηκε παραπάνω. Η τιμή του pH κάτω του 6,2 στα αποθηκευμένα αιμοπετάλια (π.χ. από την περίσσεια παραγωγής γαλακτικού οξέος) συσχετίζεται με πολύ αρνητικά αποτελέσματα όσον αφορά την ανάκτηση και επιβίωση. Μια πτώση την τιμής του pH προκαλεί επιδείνωση άλλων εργαστηριακών μετρήσεων που σχετίζονται με την ποιότητα των αιμοπεταλίων. Για παράδειγμα, η απόκριση των αιμοπεταλίων στο υποτονικό σοκ (HSR), επηρεάζεται έντονα από την μεταβολή του pH, καθώς συνδέεται με τη μεμβρανική δραστηριότητα ανταλλαγής  $Ca^{+}$  και  $K^{+}$ , μία διαδικασία η τέλεση της οποίας απαιτεί pH εντός αυστηρών ορίων. [211]

#### **5.4 Δείκτες απόπτωσης και γήρανσης αποθηκευμένων αιμοπεταλίων σε άλλες θερμοκρασίες**

Όπως έχει προαναφερθεί παραπάνω η συντήρηση στις ψυχρές θερμοκρασίες ήρθε ξανά στο προσκήνιο τα τελευταία χρόνια στην διάρκεια των οποίων διεξάχθηκαν μελέτες σχετικές με την βιωσιμότητα, απόπτωση, διαχείριση και χρήση των ψυχρών αιμοπεταλίων ενώ γίνεται απόπειρα να κατανοηθεί πλήρως η επίδραση της ψυχρής θερμοκρασίας στα αιμοπετάλια αποθήκευσης.

Ωστόσο οι δείκτες που έχουν μετρηθεί στα ψυχρά αιμοπετάλια δεν θα μπορούσαν να μην έχουν μετρηθεί, στην κλασική επί δεκαετιών για τις τράπεζες αίματος, μέθοδο αποθήκευσης στους 20 – 24° C. Ωστόσο έχουν μετρηθεί και σε άλλες θερμοκρασίες σε διάφορες μελέτες που αποσκοπούσαν στην κατανόηση μηχανισμών, στον έλεγχο ποιότητας των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων και κυρίως στην εύρεση εναλλακτικών τρόπων συντήρησης και αποθήκευσης για το <<ευαίσθητο>> προϊόν των αιμοπεταλίων.

Το γεγονός ότι υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι παρασκευής των συμπυκνωμάτων αιμοπεταλίων (PCs) έχει ως αποτέλεσμα τα παρασκευάσματα αυτά να διαφέρουν ως προς την ποιότητά τους *in vitro* [212]. Τα συμπυκνώματα αιμοπεταλίων (PC) μπορούν να παραχθούν είτε από μονούς δότες χρησιμοποιώντας αφαίρεση είτε από αρκετές μονάδες ολικού αίματος. Συνήθως χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι παραγωγής PCs από πλήρες αίμα, η μέθοδος του PRP και η μέθοδος του BC (Buffy coat). Υπάρχει μια συνεχής συζήτηση για την επιλογή της καλύτερης πηγής προέλευσης των PCs αξιολογώντας και συγκρίνοντας τους κινδύνους και τα σχετικά οφέλη των παρασκευασμάτων αιμοπεταλίων που προέρχονται από ολικό αίμα έναντι των αιμοπεταλίων αφαίρεσης.[213,214]

Σε μελέτη των Albanyan και συνεργατών εξετάστηκαν δείκτες μεταβολισμού και απόπτωσης σε PCs (Aph) και PCs(BC) κατά την αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία 20 – 22° C για έως και 7 ημέρες. Οι δείκτες αυτοί αφορούσαν την αποπόλωση ΔΨm, την έκφραση PS και γλυκοπρωτεϊνών αιμοπεταλίων καθώς την βιωσιμότητα των αιμοπεταλίων στα παραπάνω παράγωγα κατά την διάρκεια της επταήμερης αποθήκευσης. Η πιο αξιοσημείωτη παρατήρηση σε αυτή τη μελέτη είναι η διαφορά στη μιτοχονδριακή ακεραιότητα μεταξύ των PLTs σε PC (Aph) και PC (BC) αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της έρευνας υποδηλώνουν ότι ενώ και τα δύο προϊόντα υφίστανται μερική αποπόλωση, η πλήρης αποπόλωση ΔΨm επέρχεται μόνο στα PC (BC).[212]

Ωστόσο υπήρξαν και διαφορετικές προσεγγίσεις του τελευταίου συμπεράσματος από άλλους ερευνητές. Παρόλο που ο Verhoeven και οι συνάδελφοί του [215] ανέφεραν αύξηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας σε PC (BC) η οποία αρχίζει να μειώνεται μετά την 5η ημέρα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στους 20 -22o C, ο Li και οι συνεργάτες του δεν παρατήρησαν σημαντικές αλλαγές στην ακεραιότητα των μιτοχονδρίων χρησιμοποιώντας δοκιμασία με τον ανιχνευτή JC-1.[216]

Οι Perrotta και οι συνεργάτες τους σε άλλη μελέτη υποστήριξαν ότι τα αιμοπετάλια που συλλέγονται και αποθηκεύονται υπό τις κλασικές συνθήκες στις τράπεζες αίματος φαίνεται ότι είναι ικανά να διατηρούν το διαμεμβρανικό δυναμικό.[189] Οι διαφορές στην προετοιμασία των

παρασκευασμάτων καθώς και οι διαφοροποιήσεις στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων θα μπορούσαν εν μέρει να δικαιολογήσουν τις ασυμφωνίες μεταξύ των ερευνών. Οι διαφορετικοί βαθμοί αποπόλωσης ΔΨm που ανιχνεύονται σε διάφορα παρασκευάσματα που αποθηκεύονται στους 20 -24° C υποδηλώνουν και διαφορετικούς βαθμούς απόπτωσης αναλόγως με το είδος των συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων.

Η έκφραση PS φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά κατά την διάρκεια της αποθήκευσης συμπυκνωμάτων αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία 20 -24° C. [212]. Τα αποθηκευμένα αιμοπετάλια βρέθηκαν να εκφράζουν περισσότερο PS στις επιφάνειές τους από τα φρέσκα αιμοπετάλια με βάση τη δέσμευση αννεξίνης.[189] Σε άλλη έρευνα αναφέρεται ότι η συγκέντρωση PS στην επιφάνεια της μεμβράνης των αιμοπεταλίων βρέθηκε να αυξάνεται μετά από αποθήκευση 7 ημερών σε θερμοκρασία 20 -24° C, έτσι όπως μετρήθηκε με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής και δέσμευση της αννεξίνης V-FITC. Ειδικά την 9η ημέρα αποθήκευσης ανιχνεύθηκε PS στην επιφάνεια όλων των αιμοπεταλίων.[217]

Για να προσδιοριστεί εάν τα αιμοπετάλια εξέφρασαν τα μοριακά συστατικά του μηχανισμού απόπτωσης, οι κασπάσες, και μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 διερευνήθηκαν σε επίπεδο RNA από ένα σύστημα ανάλυσης πολλαπλών ανιχνευτών RNase [217]. Για να ελεγχθεί εάν η κασπάση ενεργοποιείται κατά την αποθήκευση αιμοπεταλίων, αναλύθηκε η ενζυματική δραστηριότητα της κασπάσης 3 κατά τη διάρκεια 7 ημερών αποθήκευσης σε θερμοκρασία 20 – 24° C. Με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης τα αιμοπετάλια εμφάνισαν αύξηση της δραστηριότητας κασπάσης 3. Η παρατήρηση ότι η κασπάση 3 ενεργοποιείται κατά την διάρκεια της αποθήκευσης επιβεβαιώθηκε και με την χρήση δοκιμασίας western blot. Επίσης επισημάνθηκε ότι η δραστηριότητα της κασπάσης 3 αυξάνεται κατά τη διάρκεια των πρώτων 5 ημερών αποθήκευσης και σχετίζεται με τη διάσπαση ενός από τα υποστρώματά της, της γελσολίνης. [154]

Οι Perrotta και συνεργάτες παρατήρησαν ότι η δραστηριότητα της κασπάσης -3 στα αποθηκευμένα PCs ήταν σημαντικά αυξημένη την 7η ημέρα της αποθήκευσης σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια της Ημέρας 1.[189]

Πραγματοποιήθηκαν και άλλες μετρήσεις στα αποθηκευμένα αιμοπετάλια στους 20 – 24° C προκειμένου να αξιολογηθεί η βιωσιμότητα, η μορφολογία και η μεταβολική τους δραστηριότητα κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Η εκτίμηση αλλαγής του σχήματος των αιμοπεταλίων, η μέτρηση του αριθμού τους, το pH, η κατανάλωση οξυγόνου καθώς και το ποσοστό γαλακτικού οξέος και LDH μετρήθηκαν σε διάφορες φάσεις - ημέρες στα πλαίσια μελετών. Αυτές οι μελέτες αφορούσαν είτε την

αποθήκευση στις επιμέρους θερμοκρασίες είτε χρησιμοποιώντας τα παραπάνω ως συγκριτικούς παράγοντες μεταξύ παραγώγων αιμοπεταλίων που αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες όπως θα αναλυθεί και παρακάτω στην σύγκριση των δεικτών γήρανσης και απόπτωσης των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων.

Ενδεικτικά στην μελέτη των Albanyan και συνεργατών ο αριθμός και το μέγεθος των αιμοπεταλίων μετρήθηκαν τις Ημέρες 1, 5 και 7. Αν και ο αριθμός PLT μειώθηκε σημαντικά και στα δύο παρασκευάσματα που μελετήθηκαν, η μείωση αυτή δεν ήταν ικανή ώστε να επηρεάσει σημαντικά την ποιότητα των προϊόντων. Επίσης το pH και η κατανάλωση οξυγόνου παρέμειναν σε γενικές γραμμές σταθερά και στα δύο παρασκευάσματα (PC Aph και BC) κατά την αποθήκευση τους στην standard θερμοκρασία (20 – 24° C).[212]

Σε μελέτη των Yang και συνεργατών παρατηρήθηκε αύξηση των αιμοπεταλιακών δεικτών MPV και PDW κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία 22° C για 5 ημέρες.[217] Με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) φάνηκε ότι τα PLT που αποθηκεύτηκαν στους 22° C για 1 ημέρα είχαν σχεδόν κυκλικό σχήμα με ελαφρώς ακανόνιστες προεξοχές στην επιφάνειά τους ενώ κάποια από τα αιμοπετάλια είχαν αναπτύξει ψευδοπόδια λόγω ενεργοποίησης. Όταν αποθηκεύτηκαν στους 22° C για 7 και 10 ημέρες, ο αριθμός PLT μειώθηκε και οι όγκοι των αιμοπεταλίων αυξήθηκαν. Τα αιμοπετάλια είχαν σχεδόν κυκλικό σχήμα ενώ κάποια από αυτά εμφάνισαν γύρω τους στεφάνες (halos). Δεν υπήρχαν εμφανής προεξοχές στα PLTs ενώ μόνο ένας περιορισμένος αριθμός από αυτά είχαν ψευδοπόδια. Κατά την αποθήκευσης τους για 5 ημέρες στους 22° C τα αιμοπετάλια παρουσίασαν μία μειωτική τάση όσον αφορά το pH, ανάλογη με την επιμήκυνση του χρόνου αποθήκευσης ενώ η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος αυξήθηκε σημαντικά.[217]

Η απόπτωση έχει επίσης αξιολογηθεί και μετρηθεί κατά την αποθήκευση των αιμοπεταλίων στην στρεσογόνο θερμοκρασία των 37° C. Η αποθήκευση PLT στην θερμοκρασία αυτή οδηγεί σε ταχεία απώλεια της κυτταρικής βιωσιμότητας καθώς και σε αυξημένη βακτηριακή μόλυνση. Η έκπτωση στην ποιότητα και βιωσιμότητα των αιμοπεταλίων σε αυτή την θερμοκρασία επέρχεται στις πρώτες 24 ώρες αποθήκευσης. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης, τα επίπεδα της LDH αυξάνονται ενώ το pH του πλάσματος και ο αριθμός αιμοπεταλίων μειώνονται. Αυτή η ακολουθία ενισχύεται και επιταχύνεται με την αποθήκευση στους 37° C όπως απέδειξε μελέτη των Bertino και συνεργατών. Η μείωση του pH συσχετίστηκε με την ενεργοποίηση της



κασπάσης 3 και τη μείωση της δραστηριότητας του MTS μετά από 1 ημέρα αποθήκευσης στους 37 ° C. [218]

Η δραστηριότητα της κασπάσης 3 άρχισε να αυξάνεται μετά τις πρώτες 3 ώρες ενώ κορυφώθηκε στις 48 ώρες αποθήκευσης στους 37° C. Η αύξηση της δραστηριότητας της κασπάσης 3 συνοδεύτηκε από την διάσπαση την γελσολίνης που αποτελεί υπόστρωμα της πρώτης. Οι ερευνητές παρατήρησαν τα παραπάνω ,εξαρτώμενα από την θερμοκρασία, συμβάντα τόσο σε aliquots (1.7ml) συμπυκνωμάτων αιμοπεταλίων που χρησιμοποίησαν όσο και στο επίπεδο ολόκληρου του ασκού αποθήκευσης. Επιπλέον παρατηρήθηκε εμφάνιση δραστηκής κασπάσης 9 η οποία ανιχνεύθηκε μεταξύ 6 και 9 ωρών αποθήκευσης στους 37° C. Ωστόσο τα επίπεδα πρωτεΐνης Bcl-2 και κυτοχρώματος c παρέμειναν σταθερά τουλάχιστον στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης. Αποτέλεσμα της επίδρασης της στρεσογόνου θερμοκρασίας των 37° C ήταν επίσης και η σημαντική μείωση της BCL-x1 και της κασπάσης 2. Οι Holme και Heaton απέδειξαν ότι τα PLTs που επώαστηκαν in vitro στους 37 ° C για 3 ώρες είχαν σχεδόν διπλάσια κατανάλωση οξυγόνου σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια στην συμβατική θερμοκρασία αποθήκευσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο αυξημένος μεταβολισμός στους 37 ° C μπορεί να μειώσει τη βιωσιμότητα των αιμοπεταλίων. Οι επιβλαβείς επιδράσεις της αποθήκευσης αιμοπεταλίων σε αυτή την θερμοκρασία μπορούν να οδηγήσουν εν μέρει στην ενεργοποίηση των μονοπατιών απόπτωσης. Η ενεργοποίηση αυτής της διαδικασίας μπορεί να σχετίζεται με τον αυξημένο μεταβολισμό, την εξάντληση ενός συγκεκριμένου θρεπτικού συστατικού, την έκκριση ενός επαγωγέα ή την απώλεια κάποιου παράγοντα βιωσιμότητας.[218]

Άξια λόγου είναι επίσης η αναφορά στους δείκτες που έχουν μετρηθεί στα κατεψυγμένα αιμοπετάλια. Τα τελευταία υφίστανται βλάβες κατά την διαδικασία της κατάψυξης αλλά και της απόψυξης. Ο φαινότυπος των κρυοσυντηρημένων αιμοπεταλίων είναι πολύ διαφορετικός από αυτόν των νωπών αιμοπεταλίων και χαρακτηρίζεται από αυξημένη εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και δημιουργία μεγάλου αριθμού προπηκτικών μικροσωματιδίων. Η υψηλή έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης αποτελεί ενδεχομένως την μεγαλύτερη αλλαγή που υφίστανται τα αιμοπετάλια κατά την διάρκεια της κρυοσυντήρησης η οποία μάλιστα εντοπίζεται έως και στο 90% των αιμοπεταλίων με την χρήση δοκιμασίας δέσμευσης αννεξίνης V. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω η εξωτερίκευση PS μπορεί να είναι ένα χαρακτηριστικό ενεργοποίησης αιμοπεταλίων αλλά παράλληλα αποτελεί και ένδειξη απόπτωσης. Για την κατανόηση της σημασίας των παραπάνω αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι στα φρέσκα αιμοπετάλια παρατηρείται χαμηλή εξωτερίκευση PS συγκριτικά κατά την

διάρκεια της συμβατικής αποθήκευσης εκτός και αν αυτά εκτεθούν σε στρεσογόνους παράγοντες ή σε μακροχρόνια αποθήκευση.[219]

### **5.5 Σύγκριση δεικτών γήρανσης και απόπτωσης μεταξύ CSPs και RTPs.**

Η δυνατότητα αποθήκευσης των αιμοπεταλίων που προορίζονται για μετάγγιση με ταυτόχρονη διατήρηση της αιμοστατικής τους λειτουργίας είναι ζωτικής σημασίας για τις τράπεζες αίματος και την ιατρική των μεταγγίσεων. Η ψυχρή συντήρηση των αιμοπεταλίων μειώνει τον κίνδυνο βακτηριακής μόλυνσης και μπορεί να διατηρήσει την λειτουργικότητα τους καλύτερα συγκριτικά με την αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου. Τα οφέλη της ψυχρής αποθήκευσης θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν λιγότερες επιπλοκές που σχετίζονται με τη μετάγγιση, μειωμένο κόστος, βελτιωμένη αιμοστατική ικανότητα σε ασθενείς με οξεία αιμορραγία καθώς και παρατεταμένη διάρκεια ζωής των αιμοπεταλίων στα παρασκευάσματα. Ωστόσο, ο μικρός χρόνος κυκλοφορίας μετά την μετάγγιση (in vivo επιβίωση περίπου 1 ημέρας) οδήγησε στην εγκατάλειψη των CSPs στις δεκαετίες του 1960 και του 1970.[192] Επιπλέον η ψυχρή αποθήκευση μειώνει την επιβίωση των αιμοπεταλίων μέσω της επαγωγής σύνθετων βλαβών αποθήκευσης, οι οποίες ενισχύονται περισσότερο όταν αυτή παρατείνεται. [191]

Οι ισχύοντες κανονισμοί ορίζουν ότι τα αιμοπετάλια δεν πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για περισσότερο από 5-7 ημέρες. Η συγκεκριμένη οδηγία για αποθήκευση αιμοπεταλίων σε RT έχει διάφορες συνέπειες. Κάποιες από αυτές είναι η αμφισβητούμενη αποτελεσματικότητα σε ασθενείς με ενεργή αιμορραγία, ο σημαντικά αυξημένος κίνδυνος για σήψη, η σπατάλη που προκαλείται από τη λήξη και οι συχνές ελλείψεις αιμοπεταλίων στις τράπεζες αίματος.[192]

Η διερεύνηση των αντίκτυπων βλαβών από την μακροχρόνια αποθήκευση των αιμοπεταλίων καθώς και η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων πλάσματος στα συμπυκνώματα αυτών αποτέλεσαν αντικείμενο μελετών οι οποίες συνέκριναν την αποθήκευση των συμπυκνωμάτων αιμοπεταλίων μεταξύ της εναλλακτικής ψυχρής αποθήκευσης και της συμβατικής συντήρησης στους 22 – 24° C. Στις μελέτες αυτές πλέον των παραπάνω διερευνήθηκαν και πιθανοί παράγοντες (π.χ. NAC) που θα μπορούσαν να συμβάλουν στην αντιμετώπιση της ταχείας κάθαρσης των ψυχρών αιμοπεταλίων από την κυκλοφορία. Στα πλαίσια των ερευνών αυτών μετρήθηκαν παράγοντες απόπτωσης και γήρανσης των αιμοπεταλίων και χρησιμοποιήθηκαν ως μέτρο σύγκρισης για την αξιολόγηση της ποιότητας

των συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων ανάλογα με τον χρόνο και την θερμοκρασία αποθήκευσης.

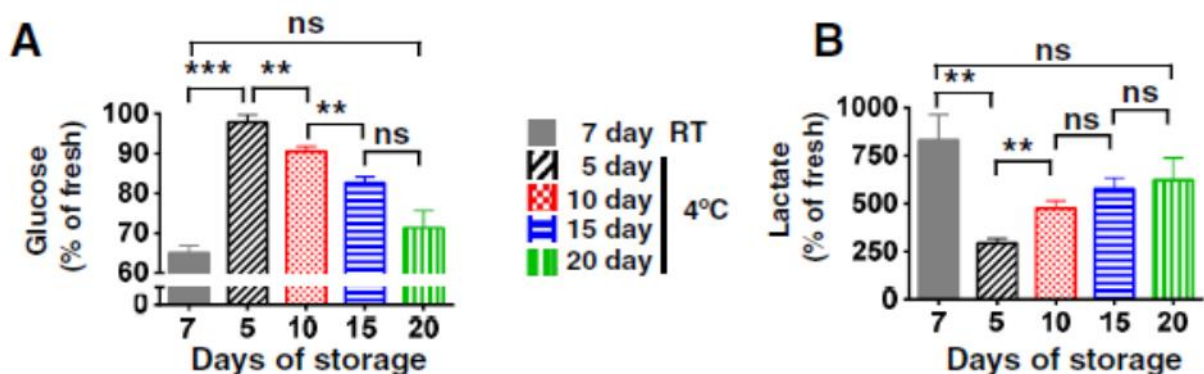
Στην μελέτη των Yang και συνεργατών τους ερευνήθηκαν τα πιθανά πλεονεκτήματα της ψυχρής αποθήκευσης συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων (PC-BC σε πλάσμα) έναντι της συμβατικής αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου. Στην έρευνα αυτή τα αιμοπετάλια αποθηκεύτηκαν στους 4° C για 21 ημέρες ενώ ο αντίστοιχος χρόνος αποθήκευσης στη θερμοκρασία δωματίου (22° C ) ήταν 5 ημέρες. Η μορφολογία των αιμοπεταλίων κατά την αποθήκευση καθώς και η μεταβολική δραστηριότητα τους μελετήθηκε συγκριτικά στις δύο θερμοκρασίες. Παρατηρήθηκε ότι τα αυτά που αποθηκεύτηκαν στους 4° C για 10 έως 14 ημέρες είχαν υψηλότερους αριθμούς PLT καθώς και καλύτερη κυτταρική μορφολογία και δομή από αυτά που αποθηκεύτηκαν στους 22° C για 5 ημέρες. Επίσης τα ψυχρά αιμοπετάλια χαρακτηρίστηκαν από αργή μεταβολική δραστηριότητα καθώς παρατηρήθηκε χαμηλή κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή γαλακτικού οξέος, αργή μείωση του pH ενώ υπήρξαν ενδείξεις ότι μπορούν να διατηρηθούν για 10-14 ημέρες σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια που συντηρήθηκαν σε RT.[217]

Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξε και μελέτη των Reddock και συνεργατών που συνέκρινε αιμοπετάλια αφαίρεσης σε πλάσμα στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης των 4° C και 22° C αντίστοιχα για 5 ημέρες. Ο αριθμός PLT δεν εμφάνισε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο θερμοκρασιών αποθήκευσης. Ο μέσος όγκος αιμοπεταλίων (MPV) παρέμεινε αμετάβλητος και στα δύο γκρουπ ελέγχου (RT και 4° C), γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν υπήρξε σημαντική αλλαγή στο μέγεθος των αιμοπεταλίων. Ο δείκτης MPC (Mean platelet component) μειώθηκε σημαντικά μετά από την αποθήκευση σε RT για 5 ημέρες, υποδηλώνοντας αποκοκκίωση αιμοπεταλίων ενώ ο ίδιος δείκτης παρέμεινε αμετάβλητος στα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν στους 4° C. Τα αποθηκευμένα αιμοπετάλια ελέγχθηκαν οπτικά με την δοκιμασία του στροβιλισμού (swirling) σύμφωνα με τις οδηγίες των Bertolini και Murphy. Τα αποθηκευμένα αιμοπετάλια σε RT διατήρησαν την ικανότητά τους να στροβιλίζονται την 5η ημέρα αποθήκευσης, ενώ αντίστοιχα δεν παρατηρήθηκε το ίδιο στα ψυχρά αποθηκευμένα , πιθανότατα λόγω της αλλαγής του σχήματος που συμβαίνει κατά την αποθήκευση στους 4° C. Αν και στα δύο γκρουπ ελέγχου παρατηρήθηκε αύξηση της μεταβολικής δραστηριότητας χαρακτηριζόμενη από αύξηση κατανάλωσης γλυκόζης και παραγωγή γαλακτικού, τα αποθηκευμένα αιμοπετάλια σε RT παρουσίασαν υπερδιπλασιασμό των δεικτών αυτών σε σύγκριση πάντα με την ψυχρή αποθήκευση. Ωστόσο το pH παρέμεινε σχετικά σταθερό και εντός αποδεκτού εύρους (Εικόνα 15).[194]

	Baseline	RT		4°C	
	Day 1	Day 3	Day 5	Day 3	Day 5
pH	7.24 ± .07	7.45 ± .16	7.28 ± .08	7.45 ± .21	7.44 ± .13
Lactate, mg/dL	1.77 ± 0.6	6.85 ± 0.8*	12.87 ± 2.1*	4.51 ± 0.6*	5.67 ± 0.3*†
Glucose, mg/dL	321.5 ± 8.1	294.0 ± 22.1*	238.3 ± 42.5*	310.2 ± 14.2*	307.5 ± 25.0*†

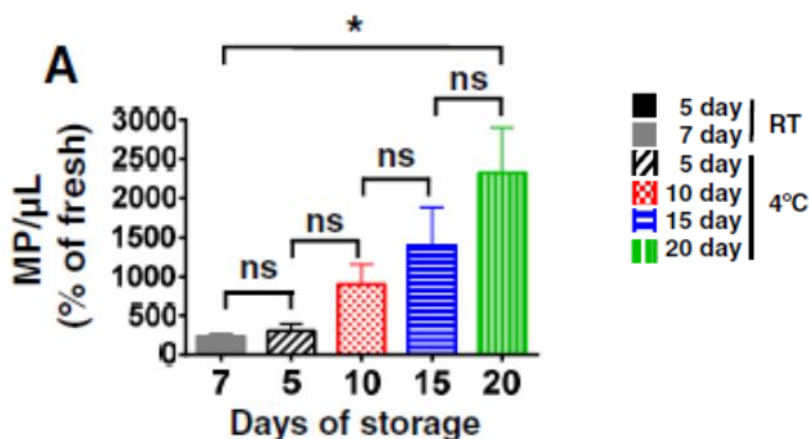
Εικόνα 15: Επίπεδα μεταβολικών δεικτών κατά την αποθήκευση σε πλάσμα. Πηγή: Reddoch KM, Pidcoke HF, Montgomery RK, Fedyk CG, Aden JK, Ramasubramanian AK, et al. Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4 degrees C and 22 degrees C. Shock 2014;41(Suppl 1):54–61

Όσον αφορά την μεταβολική δραστηριότητα, τα παραπάνω συμπεράσματα αποδεικνύονται και στην πολύ πρόσφατη μελέτη των Stolla και συνεργατών.(Εικόνα 16) Οι ερευνητές προκειμένου να αξιολογήσουν την επίδραση της μακροχρόνιας αποθήκευσης στους 4° C συνέκριναν τα αποθηκευμένα ψυχρά αιμοπετάλια με τα αντίστοιχα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία 22° C. Το χρονικό διάστημα της ψυχρής αποθήκευσης στην συγκεκριμένη μελέτη ήταν 20 ημέρες ενώ αντίστοιχα τα αιμοπετάλια ελέγχου αποθηκεύτηκαν σε RT για 7 ημέρες. Τα αποθηκευμένα αιμοπετάλια στους 22° C εμφάνισαν και εδώ αυξημένη κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή γαλακτικού συγκριτικά με τα ψυχρά αιμοπετάλια. Ωστόσο φάνηκε μια σταδιακή αύξηση στην κατανάλωση γλυκόζης μεταξύ 5 και 20 ημερών ψυχρής αποθήκευσης και μία ανάλογη αύξηση γαλακτικού μεταξύ 5 και 10 ημερών αντίστοιχα. Παρ όλα αυτά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μεταξύ της 7ης ημέρας αποθήκευσης σε RT και της 20ης ημέρας αποθήκευσης στους 4° C. [203]



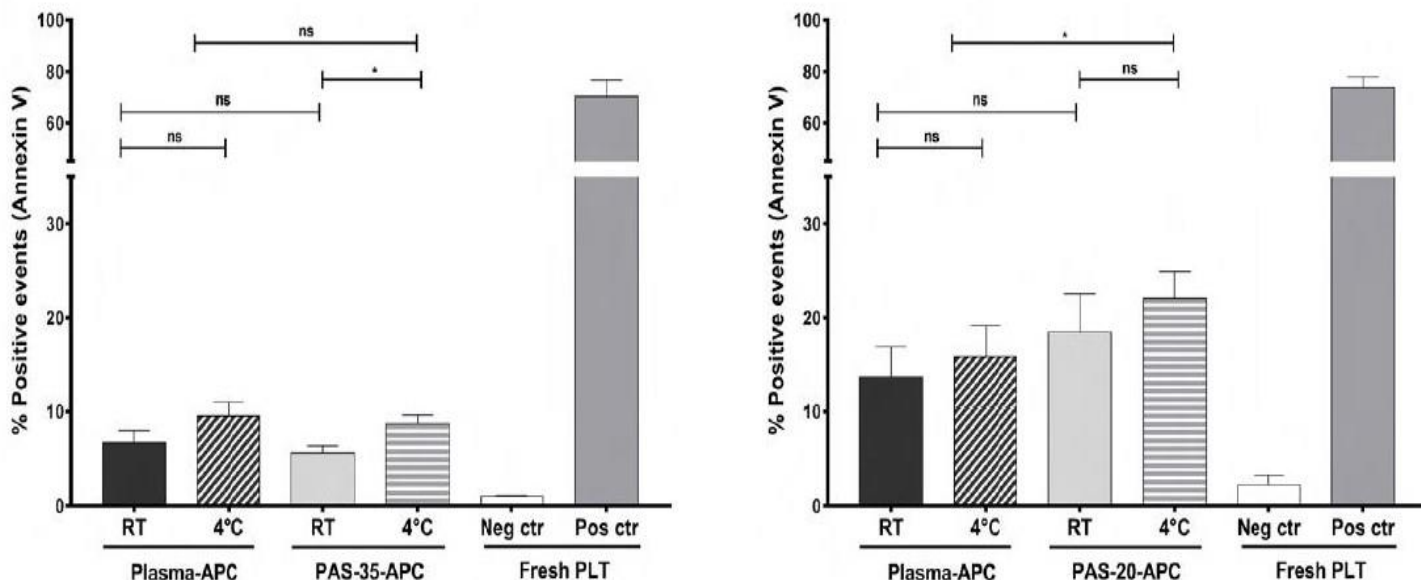
Εικόνα 16: Παράμετροι μεταβολισμού αιμοπεταλίων in vitro. Πηγή: Stolla M, Bailey SL, Fang L, Fitzpatrick L, Gettinger I, Pellham E, Christoffel T. Effects of storage time prolongation on in vivo and in vitro characteristics of 4°C-stored platelets. Transfusion. 2020 Mar;60

Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε επίσης μια σταδιακή αύξηση των μικροσωματιδίων (MPs) στα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν στους 4° C και ειδικά στο διάστημα μεταξύ 5 και 20 ημερών αποθήκευσης (Εικόνα 17). Αυτή η αύξηση χαρακτηρίστηκε ως σημαντική συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μεταξύ των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων στους 22° C την 7η ημέρα και στους 4° C την 20η ημέρα αντίστοιχα.[203]



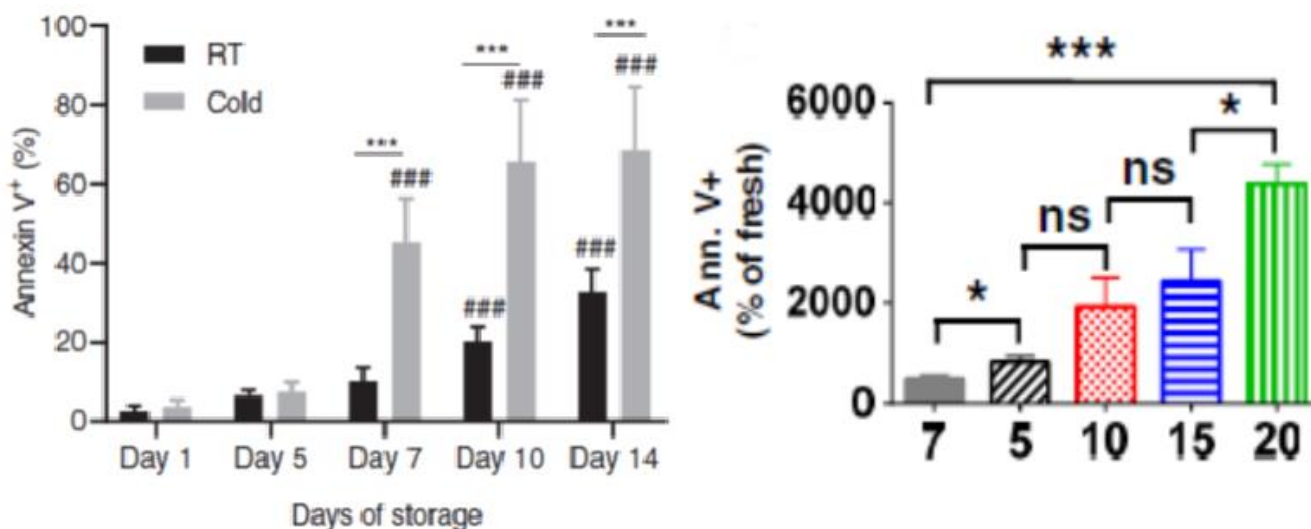
Εικόνα 17: Μέτρηση MPs με χρήση κυτταρομετρίας ροής. Πηγή: Stolla M, Bailey SL, Fang L, Fitzpatrick L, Gettinger I, Pellham E, Christoffel T. Effects of storage time prolongation on in vivo and in vitro characteristics of 4°C-stored platelets. *Transfusion*. 2020 Mar;60

Η έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης (PS), ένας χαρακτηριστικός δείκτης για την απόπτωση, φαίνεται να είναι πάντα υψηλότερη στα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται σε ψυχρές θερμοκρασίες έναντι αυτών που αποθηκεύονται σε RT. Αυτό υποδηλώνει ότι η υψηλή έκθεση PS σχετίζεται άμεσα με την ψυχρή αποθήκευση. Ενδεικτικά, σε μια πρόσφατη μελέτη, οι Marini και συνεργάτες απέδειξαν υψηλότερη έκθεση PS όταν τα αιμοπετάλια αποθηκεύτηκαν στους 4 ° C σε σύγκριση με τους 22 ° C μετά από 7 ημέρες, γεγονός το οποίο ήταν ανεξάρτητο από το ποσοστό πλάσματος στον ασκό αποθήκευσης (Εικόνα 18).[207]



Εικόνα 18: Σύγκριση της απόπτωσης μέσω των θετικών σε Annexin V αιμοπεταλίων. Πηγή: Marini I, Aurich K, Jouni R, Nowak-Harnau S, Hartwich O, Greinacher A, Thiele T, Bakchoul T. Cold storage of platelets in additive solution: the impact of residual plasma in apheresis platelet concentrates. *Haematologica*. 2019 Jan;104(1):207-214

Σε άλλη πρόσφατη μελέτη των Hegde και συνεργατών αναφέρεται ότι ενώ τα αιμοπετάλια που αποθηκεύτηκαν σε RT εμφάνισαν υψηλά επίπεδα PS μεταξύ 10 – 14 ημερών αποθήκευσης, τα αντίστοιχα αποθηκευμένα στη ψυχρή θερμοκρασία παρουσίασαν αυξημένη έκθεση PS από την 7η μέρα η οποία συνέχισε να αυξάνεται σε όλη την διάρκεια ψυχρής αποθήκευσης. [191]. Παρόμοια ευρήματα παρουσίασε και η μελέτη των Stolla και συνεργατών όπου η έκθεση PS ήταν υψηλότερη στα ψυχρά αιμοπετάλια σε όλες τις φάσεις σύγκρισης με τα αιμοπετάλια σε RT (Εικόνα 19).[203]

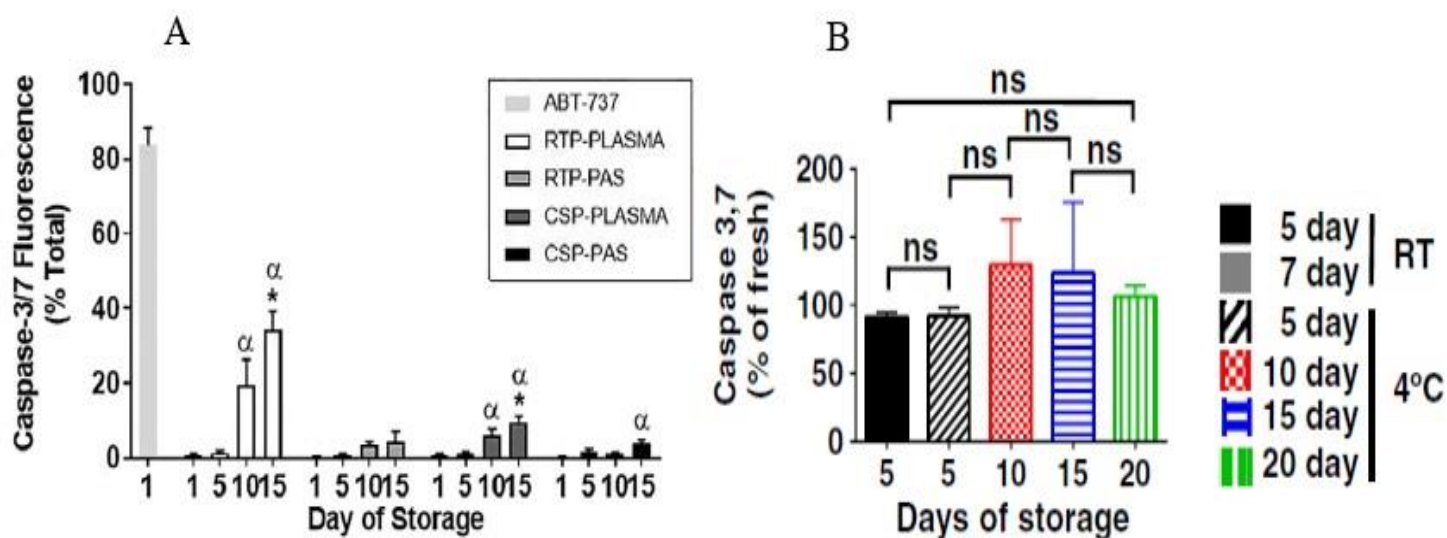


Εικόνα 19: Έκθεση PS. Πηγή: Αριστερά: Hegde et al., Δεξιά: Stolla et al



Συγκριτικά η ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης των αιμοπεταλίων φαίνεται να διατηρείται καλύτερα κατά την διάρκεια της ψυχρής αποθήκευσης. Αν και έχει παρατηρηθεί αύξηση ΔΨm κατά την αποθήκευση και στις δύο θερμοκρασίες (4° C και RT) υπάρχουν ενδείξεις ότι η αποπόλωση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού είναι μικρότερη στα ψυχρά αιμοπετάλια κατά την μακρά αποθήκευση. [199,203]. Μάλιστα στην μελέτη των Reddock – Gardenas και συνεργατών αναφέρεται ότι η ακεραιότητα της μεμβράνης διατηρήθηκε από την αποθήκευση στους 4° C ανεξάρτητα από το μέσο αποθήκευσης (PAS ή πλάσμα). [199]. Στην σύγκριση αιμοπεταλίων αφαίρεσης σε πλάσμα στις δύο θερμοκρασίες την 5η ημέρα αποθήκευσης, αποδείχτηκε ότι τα ψυχρά αιμοπετάλια υπερτερούν σημαντικά στην διατήρηση της μιτοχονδριακής ακεραιότητάς τους ενώ η διαφορά αυτή παρέμεινε σημαντική ακόμα την 20η ημέρα αποθήκευσης στους 4° C σε σύγκριση με την 7η ημέρα σε RT.[203]

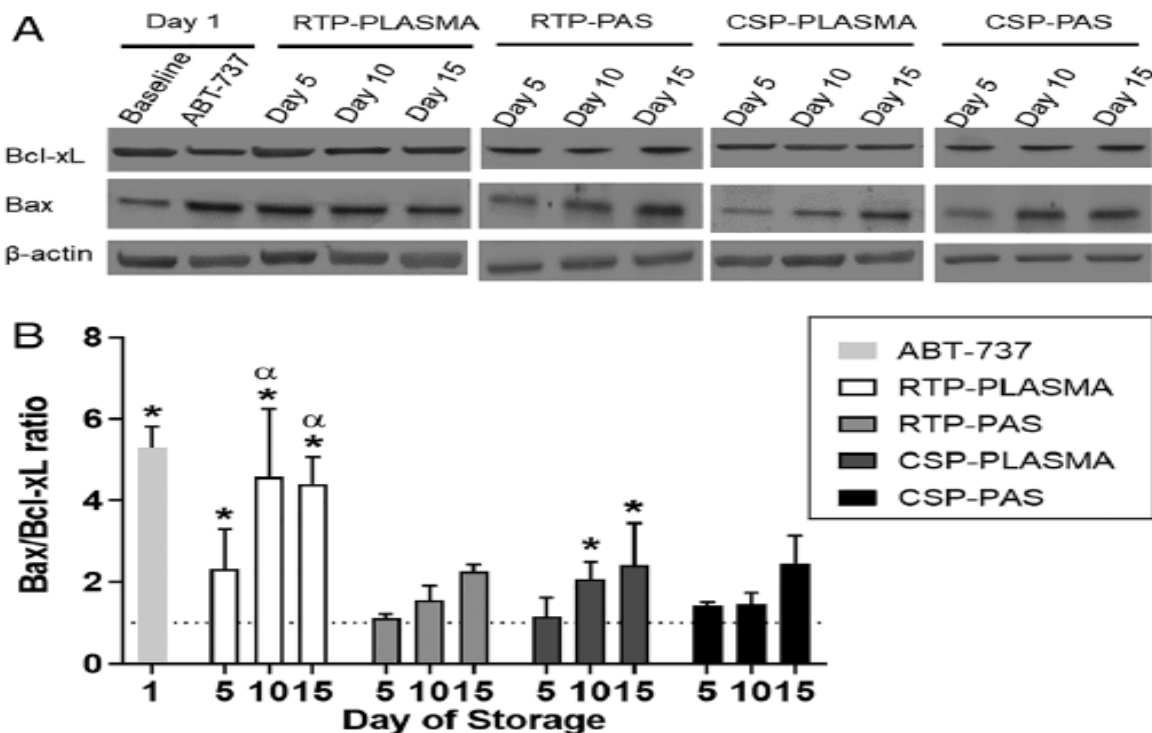
Όπως έχει προαναφερθεί οι διαταραχές στην μιτοχονδριακή μεμβράνη ακολουθούνται από την ενεργοποίηση κασπάσης 3,7. Ωστόσο έχει διαπιστωθεί από συγκεκριμένη μελέτη ότι αυτή η ακολουθία δεν τηρείται απόλυτα κατά την αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε ψυχρή θερμοκρασία ή σε RT.[203] Η αύξηση των επιπέδων της ενεργής κασπάσης 3 φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της μακροχρόνιας αποθήκευσης των αιμοπεταλίων. Παρ' ότι στο παρελθόν έχει ανιχνευτεί αξιόλογη αύξηση των επιπέδων κασπάσης 3 τις πρώτες 7 ημέρες αποθήκευσης σε RT[216], πρόσφατες μελέτες δεν παρατήρησαν την αύξηση αυτή στο ίδιο χρονικό διάστημα ενώ ανιχνεύθηκαν σημαντικά υψηλά επίπεδα μετά την 15η ημέρα αποθήκευσης αιμοπεταλίων.



Εικόνα 20. Μέτρηση επιπέδων ενεργής κασπάσης 3,7. Πηγή: (A):Reddock –Cardenas et al. (B): Stolla et al.

Τα επίπεδα ενεργής κασπάσης 3,7 που ανιχνεύθηκαν από την 10η έως 20η ημέρα ψυχρής αποθήκευσης ήταν συγκρίσιμα με αυτά που παρατηρήθηκαν την 5η ημέρα αποθήκευσης σε RT χωρίς να παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές. Ωστόσο είναι φανερό η αυξητική τάση της κασπάσης 3 κατά την επιμόκνηση του χρόνου ψυχρής αποθήκευσης(Εικόνα 20). [199, 203]

Τα επίπεδα έκφρασης αντι-αποπτωτικής Bcl-xL και προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax των αποθηκευμένων PLT έχουν επίσης εκτιμηθεί συγκριτικά ως προς την θερμοκρασία αποθήκευσης ενώ για την ανίχνευσή τους έχει χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία western blot. Ο λόγος Bax / Bcl-xL αυξήθηκε σημαντικά την 5η ημέρα αποθήκευσης για τα RTP-PLASMA σε σύγκριση με την Ημέρα 1. Την ημέρα 10, τα επίπεδα Bax / Bcl-xL στα RTP-PLASMA ήταν συγκρίσιμα με τα επεξεργασμένα με ABT-737 PLTs που χρησιμοποιήθηκαν ως positive control. Στον αντίποδα, η αναλογία Bax / Bcl-xL στα CSP-PLASMA δεν ήταν σημαντικά διαφορετική από την Ημέρα 1 έως και 10 ημέρες αποθήκευσης . Ωστόσο η αναλογία Bax / Bcl-xL διατηρήθηκε με αποθήκευση σε PAS ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία αποθήκευσης γεγονός που υποδηλώνει την εξάρτηση έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών από το μέσο αποθήκευσης και όχι τόσο από την θερμοκρασία αποθήκευσης στην συγκεκριμένη μελέτη (Εικόνα 21).[199]



Εικόνα 21: Έκφραση προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών στα αποθηκευμένα αιμοπετάλια. (A) Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα δοκιμασίας western blot για δείγματα πλάσματος και PAS, (B) Λόγος έκφρασης πρωτεΐνης Bax / Bcl-xL. Πηγή: . Reddoch-Cardenas et al.



## ΣΥΝΟΨΗ

Η παρούσα ανασκόπηση είχε ως σκοπό την ανάδειξη δεικτών απόπτωσης και γήρανσης αιμοπεταλίων αποθηκευμένων σε ψυχρές θερμοκρασίες όπως αυτοί έχουν μετρηθεί σε διάφορες μελέτες μέχρι σήμερα. Επίσης έγινε αναφορά στα υπάρχοντα μέχρι σήμερα και διαθέσιμα προς μετάγγιση παράγωγα αιμοπεταλίων τα οποία παρασκευάζονται στις τράπεζες αίματος με συγκεκριμένες οδηγίες.[47] Παράλληλα παρουσιάστηκαν εναλλακτικοί τρόποι συντήρησης και αποθήκευσης αιμοπεταλίων που θα μπορούσαν να συμβάλουν στην καλύτερη διαχείριση και διαθεσιμότητα αυτού του <<ευαίσθητου>> προϊόντος από τις τράπεζες αίματος.

Η συμβατική θερμοκρασία αποθήκευσης των αιμοπεταλίων είναι στους 22° C, αλλά δεδομένου του υψηλού κινδύνου βακτηριακής μόλυνσης που σχετίζεται με αυτήν τη μέθοδο, ο χρόνος αποθήκευσης περιορίζεται στις 5-7 ημέρες.[217] Ο περιορισμένος χρόνος αποθήκευσης των αιμοπεταλίων στη συμβατική θερμοκρασία δημιουργεί αρκετές δυσκολίες στις τράπεζες αίματος όπως η σπατάλη διά της απόρριψης των παραγώγων λόγω λήξης τους καθώς και η γενικότερη ανά περιόδους έλλειψή τους. [192]

Μία χαρακτηριστική τέτοια περίοδος είναι και αυτή που διανύουμε το τελευταίο χρονικό διάστημα καθώς η πανδημία της COVID-19 άσκησε μεγάλη πίεση στο απόθεμα και κατά συνέπεια στην διαθεσιμότητα προϊόντων αίματος ανά τον κόσμο. Συγκεκριμένα στις Ηνωμένες Πολιτείες (ΗΠΑ), η αρχική αντίδραση στην πανδημία COVID-19 οδήγησε στο κλείσιμο πολλών εγκαταστάσεων συλλογής αίματος, ιδιαίτερα κινητών μονάδων, με επακόλουθες ελλείψεις στη διαθεσιμότητα των προϊόντων αίματος που προορίζονται για θεραπευτικό σκοπό. Οι αιμοδοσίες στα ανοιχτά κέντρα επηρεάστηκαν επίσης από τη μειωμένη προσέλευση των δοτών, τον αποκλεισμό αυτών λόγω προηγούμενης μόλυνσης ή έκθεσης σε COVID-19 και από τις ελλείψεις προσωπικού λόγω ασθένειας των εργαζομένων ή καραντίνας. Είναι επίσης πιθανό ότι η έλλειψη αίματος μπορεί να επιδεινώθηκε σε ορισμένες περιοχές λόγω της αύξησης του όγκου των ασθενών και της ζήτησης μετάγγισης λόγω δευτερογενών νοσημάτων σχετιζόμενων με COVID-19.[220]

Η ψυχρή αποθήκευση των αιμοπεταλίων στους 4° C λοιπόν αποτελεί μία πρόκληση καθώς πρόκειται για μία σχετικά απλή και εύκολη στην επίτευξή της διαδικασία με χαμηλό κίνδυνο βακτηριακής επιμόλυνσης και δυνατότητα παράτασης του χρόνου αποθήκευσης δεδομένης της μεταβολικής δραστηριότητάς τους. Ωστόσο αυτή η μέθοδος αποθήκευσης έχει απαλειφθεί λόγω του μικρού χρόνου επιβίωσης των αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία μετά την μετάγγιση.[190,191] Κατά τη διάρκεια της

αποθήκευσης, τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν μειωμένη αποτελεσματικότητα και βιωσιμότητα, ενώ αυξάνονται τα επίπεδα προθρομβωτικών και προφλεγμονωδών διαλυτών διαμεσολαβητών καθώς και των μικροσωματιδίων. Αυτή η τάση θα μπορούσε να οφείλεται σε ενεργοποίηση και κυτταρικό θάνατο - απόπτωση των αιμοπεταλίων μέσα στον ασκό με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης.[221] Ένα βασικό χαρακτηριστικό της ψυχρής αποθήκευσης στα αιμοπετάλια είναι η συσταδοποίηση της GPIba στην επιφάνειά τους. Έρευνες που έχουν γίνει σε ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι η ψυχρή αποθήκευση οδηγεί σε συγκέντρωση GPIba στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων γεγονός το οποίο οφείλεται πιθανώς σε εξαρτώμενους από το ψύχος υποκείμενους μηχανισμούς όπως η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου καθώς και οι αναδιατάξεις κυτταροσκελετού-ακτίνης.[178, 190]

Η αποθήκευση αιμοπεταλίων στο ψύχος προκαλεί δομικές, μοριακές και μεταβολικές αλλαγές και έχει ως αποτέλεσμα μια μη αναστρέψιμη μείωση της επιβίωσής τους μετά την μετάγγιση, σε σύγκριση με αυτά που έχουν αποθηκευτεί στη συμβατική θερμοκρασία δωματίου. Οι κυτταρολογικές συνέπειες των επαγόμενων από την ψυχρή αποθήκευση βλαβών αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και δεκαετίες.[190, 192] Αυτές οι συνέπειες περιλαμβάνουν αρκετά συμβάντα που σχετίζονται με την μορφολογία και φυσιολογία των αιμοπεταλίων. Κάποια από αυτά τα είναι η αποσύνθεση των μικροσωληνίσκων και η αναδιάταξη κυτταροσκελετικού δικτύου, η διαστολή των καναλιών του ανοικτού καναλιοειδούς συστήματος, η μερική αποκοκκίωση, ο σχηματισμός εμφανών ψευδοπόδιων καθώς και η αυξημένη συγκέντρωση ενδοκυττάριου ασβεστίου. [190, 193, 194] Τέτοιου είδους αλλαγές που μπορεί να σχετίζονται με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων θα μπορούσαν να συμβάλουν και στην απόπτωση αυτών.

Αν και ο μηχανισμός απόπτωσης που παρουσιάζεται κατά τη διάρκεια παρατεταμένης αποθήκευσης αιμοπεταλίων σε ψυχρές θερμοκρασίες (1-6 °C) είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστος, διάφοροι δείκτες χαρακτηριστικοί για την απόπτωση των αιμοπεταλίων έχουν μελετηθεί κατά την ψυχρή αποθήκευση.[199] Η έκθεση PS, η ενεργοποίηση των κασπασών, η μιτοχονδριακή λειτουργία και ακεραιότητα καθώς και η απελευθέρωση μικροκυστιδίων (MPs) όπως επίσης και η έκφραση σχετιζόμενων με την απόπτωση πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης για την κατανόηση του μηχανισμού απόπτωσης. Ωστόσο τα δεδομένα από αυτές τις μελέτες που αφορούν τον χρόνο εκκίνησης της απόπτωσης ή την ανίχνευση των παραπάνω δεικτών μοιάζουν αμφιλεγόμενα.

Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι ενώ η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) ανιχνεύεται αυξημένη σχεδόν σε όλες τις μελέτες που αναφέρθηκαν στην παρούσα ανασκόπηση[191,203,207,208], δεν μπορούμε να αναγνωρίσουμε την ίδια συμφωνία όσον αφορά τα επίπεδα των κασπασών και ειδικά της κασπάσης 3. Ενώ διάφοροι ερευνητές εντόπισαν αύξηση των επιπέδων της ενεργής κασπάσης 3 κατά την διάρκεια της αποθήκευσης [200 – 202] δεν παρατηρήθηκε το ίδιο σε άλλες μελέτες.[203] Παρόμοια ασυμφωνία όσον αφορά την ανίχνευση ενεργής κασπάσης 3 σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης παρουσιάζεται επίσης και στην συμβατική θερμοκρασία αποθήκευσης στους 22° C.

Η ψυχρή αποθήκευση προκαλεί έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης, γεγονός που θα μπορούσε να υποδηλώνει υψηλότερου βαθμού απόπτωση αιμοπεταλίων.[207] Αν και οι διαφορές στην ανιχνευόμενη έκθεση PS όπως έχουν μετρηθεί δεν ήταν σε όλες τις περιπτώσεις σημαντικές, φαίνεται ότι η αυξητική τάση έκθεσης στις ψυχρές θερμοκρασίες είναι μάλλον δεδομένη.[207, 208] Αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι η εξασθενημένη *in vivo* επιβίωση των ψυχρά αποθηκευμένων αιμοπεταλίων προκαλείται μάλλον από μηχανισμούς που σχετίζονται με την απόπτωση. Ωστόσο είναι δύσκολη η κατάληξη στο συμπέρασμα ότι η έκθεση PS μπορεί από μόνη της να προκαλέσει απόπτωση καθώς υπάρχουν διαφορετικά μονοπάτια για την εξωτερίκευση PS που σχετίζονται με την ενεργοποίηση αλλά και με την απόπτωση αιμοπεταλίων ενώ η πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ τους είναι ασαφής.[155,182]

Αν και η ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης φαίνεται να διατηρείται καλύτερα κατά την αποθήκευση στους 4° C σε σύγκριση με την αντίστοιχη στους 22° C, παρατηρήθηκε μία συνεχόμενη μείωση της πρώτης μετά τις 20 ημέρες αποθήκευσης.[203] Στην ίδια μελέτη οι Stolla και συνεργάτες υποστηρίζουν ότι οι επαγόμενες, από την ψυχρή θερμοκρασία, βλάβες αιμοπεταλίων προκαλούν ενεργοποίησή τους παρόμοια με την απόκριση σε αγωνιστές αλλά δεν οδηγούν στην ενεργοποίηση κλασικών τελεστών απόπτωσης όπως η ενεργοποίηση κασπάσης 3,7.[203] Η ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης φαίνεται ότι διατηρείται καλύτερα με την χρήση PAS κατά την ψυχρή αποθήκευση. Τα CSPs μπορούν να αποθηκευτούν στο PAS με ελάχιστα σημάδια αποπτωτικής δραστηριότητας συγκρίσιμα με αυτά που παρατηρούνται στα συμβατικά RTPs (την 5η ημέρα αποθήκευσης).[199]

Οι Hegde και συνεργάτες σε προσφάτως δημοσιευμένη μελέτη τους διαπίστωσαν ότι η μακροχρόνια αποθήκευση αιμοπεταλίων σε ψυχρές θερμοκρασίες οδηγεί σε δυσμεταβολική μιτοχονδριακή δραστηριότητα, διαρροή πρωτονίων και παραγωγή ROS, η οποία μπορεί να σχετίζεται με

αυξημένη φλεγμονώδη ενεργοποίηση *in vivo*. Μάλιστα οι ερευνητές προτείνουν την προσθήκη του αντιοξειδωτικού NAC σε PAS που περιέχει μαγνήσιο η οποία θα μπορούσε να αναστείλει τα παραπάνω.[191]

Τα CSPs υπερτερούν έναντι των RTPs όσον αφορά την αιμοστατική ικανότητα μετά την μετάγγιση και την μεταβολική τους δραστηριότητα κατά την αποθήκευση. Ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα τους είναι η δυνατότητα μακροχρόνιας αποθήκευσης που θα μπορούσε να επιλύσει σημαντικά προβλήματα διαθεσιμότητας σε σχέση με τον περιορισμένο χρόνο αποθήκευσης των RTPs που οδηγεί σε σπατάλη και έλλειψη. Ωστόσο η ταχεία κάθαρση από την κυκλοφορία εμποδίζει την ένταξή τους στην φαρέτρα των διαθέσιμων προϊόντων αίματος για θεραπευτικό σκοπό.

Οι δυνατότητες για μελλοντικές έρευνες είναι πολυάριθμες και θα μπορούσαν να αποτελέσουν πεδίο δόξης λαμπρόν. Η αναστολή της απόπτωσης φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη μείωση των επαγόμενων από την ψυχρή αποθήκευση βλαβών. Αναμφίβολα, περισσότερες μελλοντικές έρευνες αναμένεται να οδηγήσουν σε καλύτερες μεθόδους ψυχρής αποθήκευσης που θα αποτρέπουν τις βλάβες που προκαλούνται από την ψύξη, διατηρώντας παράλληλα τα θετικά χαρακτηριστικά των CSPs. Η βελτιστοποίηση της επεξεργασίας των συμπυκνωμάτων κατά την διάρκεια της αποθήκευσης παράλληλα με την χρήση πιθανώς αναστολέων ενεργοποίησης ή την εφαρμογή πρωτοκόλλων πλύσης θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο μελλοντικών μελετών. Η περαιτέρω κατανόηση για τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζεται ο μεταβολισμός των αιμοπεταλίων κατά την ψυχρή αποθήκευση θα μπορούσε ενδεχομένως να επιτευχθεί με την χρήση των proteomics και metabolomics. Παρ όλα αυτά η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μονοπατιών ενεργοποίησης και απόπτωσης των CSPs μοιάζει επίσης πολλά υποσχόμενη προοπτική. Ενδεχομένως η παράλληλη μελέτη της οδού ενεργοποίησης-ιντεγκρινών και του μονοπατιού απόπτωσης στα CSPs να μπορούσε να δώσει εξηγήσεις για τις σχετικές αλληλεπιδράσεις και τους υποκείμενους μηχανισμούς που οδηγούν στην κάθαρση των ψυχρών αιμοπεταλίων.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. The Franklin Institute Inc. "Blood – The Human Heart".
2. "Definition of BLOOD".
3. Berne RM, Levy, M. N. (1996) Αίμα και αιμόσταση. In: Κούβελας Η, editor. Αρχές Φυσιολογίας. 2 ed: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. pp. 261-267.
4. Ηλιόπουλος Γ (1999) Φυσιολογία και Φυσιοπαθολογία του Αίματος και των Αιμοποιητικών Οργάνων. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
5. Junqueira, Carlos (Ιανουάριος 2015). JUNQUEIRA'S BASIC HISTOLOGY. -: ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ Π. Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ. σελ. 328-329. ISBN 9789963716890
6. Sherwood, Lauralee (Δεκέμβριος 2016). Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου: Από τα Κύτταρα στα Συστήματα. 0562-0008: Ακαδημαϊκές εκδόσεις. σελ. 494-496. ISBN 9786185135027.
7. Stevens A, Lowe J.S, Ιστολογία του ανθρώπου. .Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 2008.σελ 109-115
8. Ίδρυμα ελληνικής αιματολογικής εταιρείας. Ενημερωτικό φυλλάδιο για ασθενείς και εθελοντές αιμοδότες. Θεσσαλονίκη 2010.
9. Δημήτρης Λουκόπουλος, Μαριάννα Πολίτου ,ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ: Κλινική Αιματολογία, Αιμόσταση, Μετάγγιση Αίματος. ISBN: 978-960-603-445-9
10. Jacobs L, Nawrot TS, de Geus B, Meeusen R, Degraeuwe B, Bernard A, Sughis M, Nemery B, Panis LI (October 2010). "Subclinical responses in healthy cyclists briefly exposed to traffic-related air pollution: an intervention study". Environmental Health. 9 (64): 64. doi:10.1186/1476-069X-9-64. PMC 2984475. PMID 20973949.
11. Waugh DJ, Wilson C (November 2008). "The interleukin-8 pathway in cancer". Clinical Cancer Research. 14 (21): 6735–41. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4843. PMID 18980965. S2CID 9415085.
12. De Larco JE, Wuertz BR, Furcht LT (August 2004). "The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors

- releasing interleukin-8". *Clinical Cancer Research*. 10 (15): 4895–900. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0760. PMID 15297389. S2CID 9782495.
13. Yoo SK, Starnes TW, Deng Q, Huttenlocher A (November 2011). "Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo". *Nature*. 480 (7375): 109–12. Bibcode:2011Natur.480..109Y. doi:10.1038/nature10632. PMC 3228893. PMID 22101434.
14. Barer MR (2012). "The natural history of infection". *Medical Microbiology*. Elsevier. pp. 168–173. doi:10.1016/b978-0-7020-4089-4.00029-9. ISBN 978-0-7020-4089-4.
15. Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JA, Koenderman L (October 2013). "What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited". *Journal of Leukocyte Biology*. 94 (4): 595–601. doi:10.1189/jlb.1112571. PMID 23625199. S2CID 40113921
16. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L (July 2010). "In vivo labeling with  $^2\text{H}_2\text{O}$  reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days". *Blood*. 116 (4): 625–7. doi:10.1182/blood-2010-01-259028. PMID 20410504
17. Uhm TG, Kim BS, Chung IY (March 2012). "Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma". *Allergy, Asthma & Immunology Research*. 4 (2): 68–79. doi:10.4168/aair.2012.4.2.68. PMC 3283796. PMID 22379601.
18. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS (June 2007). "Eosinophil trafficking in allergy and asthma". *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 119 (6): 1303–10, quiz 1311–2. doi:10.1016/j.jaci.2007.03.048. PMID 17481712.
19. Lambrecht BN, Hammad H (January 2015). "The immunology of asthma". *Nature Immunology*. 16 (1): 45–56. doi:10.1038/ni.3049. PMID 25521684.
20. Sanderson, Colin (1992). "Interleukin-5, Eosinophils, and Disease". *Blood*. 79 (12): 3101–3109.
21. Young B, Lowe jo, Stevens A, Heath JW (2006). *Wheater's Functional Histology* (5th ed.). Elsevier Limited. ISBN 978-0-443-06850-8.

22. Park YM, Bochner BS (April 2010). "Eosinophil survival and apoptosis in health and disease". *Allergy, Asthma & Immunology Research*. 2 (2): 87–101. doi:10.4168/aair.2010.2.2.87. PMC 2846745. PMID 20358022evier Limited. ISBN 978-0-443-06850-8.
23. Khurana (2009). *Textbook Of Medical Physiology* (2nd ed.). Elsevier. p. 180. ISBN 978-81-8147-850-4.
24. Voehringer D (December 2009). "The role of basophils in helminth infection". *Trends in Parasitology*. 25 (12): 551–6. doi:10.1016/j.pt.2009.09.004. PMID 19782643
25. Janeway CA Jr.; et al. (2001). *Immunobiology* (electronic full text via NCBI Bookshelf) (5th ed.). Garland Publishing. ISBN 978-0-8153-3642-6.
26. Al-Shura, Anika Niambi (2020). "Lymphocytes". *Advanced Hematology in Integrated Cardiovascular Chinese Medicine*. Elsevier. pp. 41–46. doi:10.1016/b978-0-12-817572-9.00007-0. ISBN 978-0-12-817572-9.
27. Omman, Reeba A.; Kini, Ameet R. (2020). "Leukocyte development, kinetics, and functions". In Keohane, Elaine M.; Otto, Catherine N.; Walenga, Jeanine N. (eds.). *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications* (6th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier. pp. 117–135. ISBN 978-0-323-53045-3
28. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2001). *Immunobiology* (5th ed.). New York and London: Garland Science. ISBN 0-8153-4101-6
29. Janeway-Travers. *Κλινική ανοσοβιολογία Έκδοση 2η* 1996. New York, ISBN 960-399-101-5
30. *Κλινική ανοσολογία (2η έκδοση)*, Παναγιώτα Μπούρα, University Studio Press, ISBN: 978-960-12-2052-9
31. Vinay Kumar; Abul K. Abbas; Nelson Fausto; Richard N. Mitchell (2007). *Robbins Basic Pathology* (8th ed.). Saunders.
32. Harrison, K. L. (1979). "Fetal Erythrocyte Lifespan". *Journal of Paediatrics and Child Health*. 15 (2): 96–97. doi:10.1111/j.1440-1754.1979.tb01197.x. PMID 485998

33. Jain NC (June 1975). "A scanning electron microscopic study of platelets of certain animal species". *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica*. 33 (3): 501–7. PMID 1154309.
34. Michelson, Alan D. (2013). *Platelets* (3rd ed.). Academic. ISBN 9780123878373.
35. Paulus JM (September 1975). "Platelet size in man". *Blood*. 46 (3): 321–36. doi:10.1182/blood.V46.3.321.321. PMID 1097000.
36. Machlus KR, Thon JN, Italiano JE (April 2014). "Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation". *British Journal of Haematology*. 165 (2): 227–36. doi:10.1111/bjh.12758. PMID 24499183.
37. Machlus, Kellie R. (2019). Platelets || Megakaryocyte Development and Platelet Formation. , (), 25–46. doi:10.1016/B978-0-12-813456-6.00002-3
38. Paul L. F. Giangrande, *The history of blood transfusion*, 10.1046/j.1365-2141.2000.02139.x
39. T.J. Greenwalt (1997) *A short history of transfusion medicine* \_ 10.1046\_j.1537-2995.1997.37597293889.x
40. French, Roger. "William Harvey". *Oxford Dictionary of National Biography* (online ed.). Oxford University Press
41. Wilson and Aubrey (1962). "Malter Warner". *Aubrey's Brief Lives*. Michigan U. Press. p. 315
42. *Immunohematology*. Third Edition by Zmijewski, Chester M.: Appleton-Century-Crofts, New York hard, 1st thus
43. *Blood Banking and Transfusion Medicine: Basic Principles and Practice*, 2e:9780443069819
44. Ghartimagar Dilasma Rational Clinical Use of Blood and Blood products – A summary. *Journal of Pathology of Nepal* 2017; 7(1):1111.
45. Department of Transfusion Medicine. *Blood Transfusion Manual*. SGPGIMS
46. WHO (2002) *Safe Blood and Blood Products*. Distance Learning Materials. Revised Edition., Marketing & Dissemination, 1211 Geneva 27, Switzerland. ISBN 92 4 154546 1. Order No. 1150490.200



47. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, Recommendation No. R (95) 15 19th Edition ISBN 978-92-871-8415-3
48. Handbook of Transfusion Medicine, Dr Derek Norfolk, United Kingdom Blood Services 5th edition
49. Basu, Debdatta; Kulkarni, Rajendra (2014). Overview of blood components and their preparation. *Indian Journal of Anaesthesia*, 58(5), 529–. doi:10.4103/0019-5049.144647
50. WHO Drug Information Vol. 27, No. 1, 2013
51. Garraud, Olivier; Tissot, Jean-Daniel (2018). Blood and Blood Components: From Similarities to Differences. *Frontiers in Medicine*, 5(), 84–. doi:10.3389/fmed.2018.00084
52. Κατευθυντήριες οδηγίες μετάγγισης αίματος και παραγώγων του, Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία, τμήμα αιμοδοσίας - αφαίρεσης, Αθήνα 2010
53. Repine TB, Perkins JG, Kauvar DS, Blackburne L. The use of fresh whole blood in massive transfusion. *J Trauma*. 2006 Jun; 60(6 Suppl):S59–69.
54. British Committee for Standards in Haematology, Stainsby D, MacLennan S, Thomas D, Isaac J, Hamilton PJ. Guidelines on the management of massive blood loss. *Br J Haematol*. 2006 Dec;135(5):634–41.
55. Spinella PC. Warm fresh whole blood transfusion for severe hemorrhage: U.S. military and potential civilian applications. *Crit Care Med*. 2008 Jul;36(7 Suppl):S340–5.
56. Γεράσιμος Α. Πάγκαλης, Αιματολογία στην κλινική πράξη, εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης ISBN: 978-960-399-776-4
57. Prevention of red cell storage lesion: a comparison of five different additive solutions Johan W. Lagerberg, Herbert Korsten, Pieter F. van der Meer, Dirk de Korte *Blood Transfus*. 2017 Sep; 15(5): 456–462. Prepublished online 2017 Apr 10. doi: 10.2450/2017.0371-16 PMID: PMC5589708
58. Time to revisit red blood cell additive solutions and storage conditions: a role for “omics” analyses Rosemary L. Sparrow *Blood*

Transfus. 2012 May; 10(Suppl 2): s7–s11. doi: 10.2450/2012.003S  
PMCID: PMC3418618

59. Lu M, Lezzar DL, Vörös E, Shevkoplyas SS (2019). "Traditional and emerging technologies for washing and volume reducing blood products". *Journal of Blood Medicine*. 10: 37–46. doi:10.2147/JBM.S166316. PMC 6322496. PMID 30655711

60. Hirayama F (February 2013). "Current understanding of allergic transfusion reactions: incidence, pathogenesis, laboratory tests, prevention and treatment". *British Journal of Haematology*. 160 (4): 434–44. doi:10.1111/bjh.12150. PMC 3594969. PMID 23215650

61. Richard John Benjamin; Lisa Swinton McLaughlin (2012). Plasma components: properties, differences, and uses. , 52(Supplement s1), 9–19. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03622.x

62. Fasano R, Luban NLC. Blood Component Therapy. *Pediatr Clin North Am*. 2008;55(2):421-445.

63. Duguid J, O’Shaughnessy DF, Atterbury C, et al. Guidelines for the use of fresh frozen plasma, cryoprecipitate and cryosupernatant. *Br J Haematol*. 2004;126(1):11-28.

64. Dombourian M, Holland L. Optimal use of fresh frozen plasma. *J Infus Nurs*. 2012;35(1):28-32

65. Istituto Superiore di Sanità. Rapporti ISTISAN 04/10. Atti del Convegno Nazionale Buon Uso del Sangue, Rome, 25-26 February 2003. Available from: <http://www.iss.it>.

66. Standards for Blood Banks and Transfusion Services, 24th ed, Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2006.

67. Recommendations for the transfusion of plasma and platelets, Giancarlo Liumbruno,<sup>1</sup> Francesco Bennardello,<sup>2</sup> Angela Lattanzio,<sup>3</sup> Pierluigi Piccoli,<sup>4</sup> Gina Rossetti,<sup>5</sup> and as Italian Society of Transfusion Medicine and Immunohaematology (SIMTI) Working Party, *Blood Transfus*. 2009 Apr; 7(2): 132–150., doi: 10.2450/2009.0005-09

68. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the use of fresh-frozen plasma, cryoprecipitate and cryosupernatant. *Br J Haematol* 2004; 126: 11-28.

69. Decreto Legislativo 3 Marzo 2005. Caratteristiche e modalità per la donazione di sangue e di emocomponenti. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, Serie Generale, n. 85 del 13 aprile 2005.
70. Richard John Benjamin; Lisa Swinton McLaughlin (2012). Plasma components: properties, differences, and uses. , 52(Supplement s1), 9–19. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03622.x
71. Gremmel, Thomas; Frelinger, Andrew; Michelson, Alan (2016). Platelet Physiology. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, (), s-0035-1564835–. doi:10.1055/s-0035-1564835
72. Alan D. Michelson, *Platelets Second Edition*, Elsevier ISBN: 978-0-12-369367-9
73. White JG. Platelet structure. In: Michelson AD ed. *Platelets*, 3rd ed. San Diego: Elsevier/Academic Press; 2013:117–144
74. Spencer F.A., Becker R.C. (1997) *Platelets: Structure, Function, and Their Fundamental Contribution to Hemostasis and Pathologic Thrombosis*. In: Becker R.C. (eds) *Textbook of Coronary Thrombosis and Thrombolysis. Developments in Cardiovascular Medicine*, vol 193. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-0-585-33754-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-0-585-33754-8_3)
75. White JG, Escolar G. Current concepts of platelet membrane response to surface activation. *Platelets* 1993;4(4):175–189
76. White JG. The submembrane filaments of blood platelets. *Am J Pathol* 1969;56(2):267–277
77. Hartwig JH, DeSisto M. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J Cell Biol* 1991;112(3):407–425
78. White JG, Krivit W. An ultrastructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling. *Blood* 1967;30(5):625–635
79. White JG. Effects of colchicine and vinca alkaloids on human platelets. II. Changes in the dense tubular system and formation of an unusual inclusion in incubated cells. *Am J Pathol* 1968;53(3): 447–461
80. White JG, Clawson CC. Development of giant granules in platelets during prolonged storage. *Am J Pathol* 1980;101(3):635–646

81. Maynard DM, Heijnen HF, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost* 2007;5(9):1945–1955
82. Nurden P, Jandrot-Perrus M, Combrié R, et al. Severe deficiency of glycoprotein VI in a patient with gray platelet syndrome. *Blood* 2004;104(1):107–114
83. Berger G, Massé JM, Cramer EM. Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V. *Blood* 1996;87(4):1385–1395
84. Flaumenhaft R. Platelet secretion. In: Michelson AD ed. *Platelets*, 3rd ed. San Diego: Elsevier/Academic Press; 2013: 343–366
85. Saboor M, Ayub Q, Ilyas S, Moinuddin. Platelet receptors; an instrumental of platelet physiology. *Pak J Med Sci*. 2013;29(3):891-896. doi:10.12669/pjms.293.3497
86. Kasirer-Friede A, Kahn ML, Shattil SJ. Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunol Rev*. 2007 Aug;218:247-64. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00532.x. PMID: 17624957
87. Chang JC, Chang HH, Lin CT, Lo SJ. The integrin alpha6beta1 modulation of PI3K and Cdc42 activities induces dynamic filopodium formation in human platelets. *J Biomed Sci*. 2005 Dec;12(6):881-98. doi: 10.1007/s11373-005-9021-2. Epub 2005 Oct 14. PMID: 16228294.
88. Diacovo TG, deFougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest*. 1994 Sep;94(3):1243-51. doi: 10.1172/JCI117442. PMID: 8083366; PMCID: PMC295209.
89. Bennett JS. The molecular biology of platelet membrane proteins. *Semin Hematol*. 1990 Apr;27(2):186-204. PMID: 1693446.
90. Bhatt DL, Topol EJ. Current role of platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes. *JAMA*. 2000 Sep 27;284(12):1549-58. doi: 10.1001/jama.284.12.1549. PMID: 11000650.
91. Lischke S, Schneider DJ. Recent developments in the use of antiplatelet agents to prevent cardiovascular events. *Future Cardiol*. 2011 May;7(3):403-13. doi: 10.2217/fca.11.8. PMID: 21627479.
92. Jurk K, Clemetson KJ, de Groot PG, Brodde MF, Steiner M, Savion N, Varon D, Sixma JJ, Van Aken H, Kehrel BE. Thrombospondin-1

mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *FASEB J.* 2003 Aug;17(11):1490-2. doi: 10.1096/fj.02-0830fje. Epub 2003 Jun 17. PMID: 12824298.

93. Baglia, Frank & Badellino, Karen & Li, Chester & Lopez, Jose & Walsh, Peter. (2002). Factor XI Binding to the Platelet Glycoprotein Ib-IX-V Complex Promotes Factor XI Activation by Thrombin. *The Journal of biological chemistry.* 277. 1662-8. 10.1074/jbc.M108319200

94. McEver RP. P-Selectin/PSGL-1 and other interactions between platelets, leukocytes, and endothelium. In: Michelson AD, editor. *Platelets.* 2nd ed. San Diego (CA): Elsevier/Academic Press. 2007:231-249.

95. Berlanga O, Bori-Sanz T, James JR, et al. Glycoprotein VI oligomerization in cell lines and platelets. *J Thromb Haemost* 2007;5(5):1026–1033

96. Miura Y, Takahashi T, Jung SM, Moroi M. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J Biol Chem* 2002;277(48): 46197–46204

97. Freireich EJ. Supportive care for patients with blood disorders. *Br J Haematol* 2000; 111: 68–77.

98. Hersh EM, Bodey GP, Nies BA, Freireich EJ. Causes of death in acute leukemia: a ten-year study of 414 patients from 1954–1963. *JAMA* 1965; 193: 105–09.

99. Stroncek DF, Rebutta P: Platelet transfusions. *Lancet* 2007; 370:427–438

100. Elena Levin; Brankica Culibrk; Maria I. C. Gyöngyössi-Issa; Sandra Weiss; Kenneth Scammell; Wanda LeFresne; Craig Jenkins; Dana V. Devine (2008). Implementation of buffy coat platelet component production: comparison to platelet-rich plasma platelet production. , 48(11), 2331–2337. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01836.x

101. Vassallo RR, Murphy S (2006) A critical comparison of platelet preparation methods. *Curr Opin Hematol* 13: 323-330

102. van der Meer, Pieter F. (2013). Platelet concentrates, from whole blood or collected by apheresis?. *Transfusion and Apheresis Science*, 48(2), 129–131. doi:10.1016/j.transci.2013.02.004
103. Toby L. Simon (1994). The Collection of Platelets by Apheresis Procedures. , 8(2), 132–145. doi:10.1016/s0887-7963(94)70105-x
104. Hoffmeister KM, Falet H, Toker A, et al. Mechanisms of cold-induced platelet actin assembly. *J Biol Chem* 2001;276: 24751-9
105. Shrivastava M. The platelet storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2009;41:105-13.
106. Wood B, Padula MP, Marks DC, et al. Refrigerated storage of platelets initiates changes in platelet surface marker expression and localization of intracellular proteins. *Transfusion* 2016;56: 2548-59
107. Cardigan R, Turner C, Harrison P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. *Vox Sang* 2005;88:153-63.
108. Holme S. Storage and quality assessment of platelets. *Vox Sang* 1998;4 Suppl 2:207-16, Picker SM In-vitro assessment of platelet function. *Transfus Apher Sci* 2011;44:305- 19
109. Panzer S, Gilma P. Methods for testing platelet function for transfusion medicine. *Vox Sang* 2011;101:1-9
110. Hoffmeister KM, Felbinger TW, Falet H, et al. The clearance mechanism of chilled blood platelets. *Cell* 2003;112: 87-97
111. Shams Hakimi C, Hesse C, Wallen H, et al. In vitro assessment of platelet concentrates with multiple electrode aggregometry. *Platelets* 2015;26:132-7.
112. Lindahl TL, Ramstrom S. Methods for evaluation of platelet function. *Transfus Apher Sci* 2009;41:121-5.
113. Gorlinger K, Shore-Lesserson L, Dirkmann D, et al. Management of hemorrhage in cardiothoracic surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2013;27:S20-34
114. Bohonek M. Cryopreservation of blood. In: Kochnar PK et al., editors. *Blood Transfusion in Clinical Practice*. InTech; 2012;233-242.

115. Holley A, Marks DC, Johnson L, Reade MC, Badloe JF, Noorman F. Frozen blood products: clinically effective and potentially ideal for remote Australia. *Anaesth Intensive Care*. 2013;41:10-19
116. Valeri CR, Feingold H, Marhionni LD. A simple method for freezing human platelets using 6% dimethyl sulfoxide and storage at -80°C. *Blood*.1974;43(1): 131-136
117. Pegg D.E. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2007;368:39-57.
118. Yavin S., Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*. 2007;67:81-89.
119. Sambu S.A Bayesian approach to optimizing cryopreservation protocols. *Peer J*.2015;3:1039
120. Safa S., Moghaddam G., Jozani R.J., Daghigh Kia H., Janmohammadi H. Effect of vitamin E and selenium nanoparticles on post-thaw variables and oxidative status of rooster semen. *Anim Reprod Sci*. 2016;174:100-106.
121. C. Polge, A.U. Smith, A.S. Parkes Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures *Nature*, 1949;164: 666.
122. Klein E, Toch R, Farber S, Freeman F, Fiorentino R. Hemostasis in thrombocytopenic bleeding following infusion of stored, frozen platelets. *Blood*. 1956;11:693-699
123. Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH. Frozen autologous platelet transfusion for patients with leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1978;299:7-12.
124. Khuri SF, Healey N, MacGregor H, Brnard MT, Szymanski IO, Birjiniuk B, et al. Comparison of the effects of transfusions of cryopreserved and liquid-preserved platelets on hemostasis and blood loss after cardiopulmonary bypass. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1999;117(1):172-184.
125. Jenkins E.C., Ye L., Silverman W.P. Does the cryogenic freezing process cause shorter telomeres? *Cryobiology*. 2012;65:72-73.
126. Dumont LJ, Cancelas JA, Dumont DF, Siegel AH, Szczepiorkowski ZM, Rugg N, et al. A randomized controlled trial evaluating recovery and survival of 6% dimethyl sulfoxide-frozen autologous platelets in healthy volunteers. *Transfusion* 2013;53:128.,

128. Royce A, Reade MC, Johnson L, Marks DC. CLIP (cryopreserved vs. liquid platelets for surgical bleeding): Protocol for a randomised controlled trial. *Heart, Lung and Circulation*. 2015;24(1): e57-e58
130. Johnson LN et al. Cryopreservation of buffy-coat-derived platelet concentrates in dimethyl sulfoxide and platelet additive solution. *Cryobiology*. 2011;62:100-106.
131. Owens M, Werner E, Holme S, Afferbach C. Membrane glycoproteins in cryopreserved platelets. *Vox Sanguinis*. 1994;67:28-13.,
132. Raynel S, Padula MP, Marks DC, Johnson L. Cryopreservation alters the membrane and cytoskeletal protein profile of platelet microparticles. *Transfusion*. 2015;55(10):2422-2426
133. Johnson L, Coorey CP, Marks DC. The hemostatic activity of cryopreserved platelets is mediated by phosphatidylserine-expressing platelets and platelet microparticles. *Transfusion*. 2014;54(8): 1917-1926
134. Napolitano M et al. Cryopreserved platelets: From in vitro thrombin generation potential to in vivo safety. *Blood*. 2015;126:2339.
135. Perez-Ferrer A, Navarro-Suay R, Viejo-Llorente A, Alcaide-Martin MJ, de Vicente Sanchez J, Butta N, et al. In vitro thromboelastometric evaluation of the efficacy of frozen platelet transfusion. *Thrombosis Research*. 2015;136(2):348-353
136. Badloe J, Noorman J. -80°C Frozen platelets are activated compared to 24 hour liquid stored platelets and quality of frozen platelets is unaffected by a quick preparation method (15 min) which can be used to prepare platelets for the early treatment of trauma patients in military theatre. In: *AABB Annual Meeting; 2012*
137. Johnson L, Reade MC, Hyland RA, Tan S, Marks DC. In vitro comparison of cryopreserved and liquid platelets: Potential clinical implications. *Transfusion*. 2015;55(4):838-847.
138. Vysochin IV, Kobzeva EN, Makarov MC, Glukhov AA, Yurin IA, Klyuev AE, et al Preparation and clinical administration of the cryopreserved red blood cells and platelets. *Almanac of Clinical Medicine*. 2014;30:70-75
139. Bertolini F, Murphy S. A multicenter evaluation of reproducibility of swirling in platelet concentrates. *Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood*



Transfusion. Transfusion. 1994 Sep;34(9):796-801. doi: 10.1046/j.1537-2995.1994.34994378282.x. PMID: 8091470.

140. Holcomb JB, Zarzabal LA, Michalek JE, Kozar RA, Spinella PC, Perkins JG, Matijevic N, Dong JF, Pati S, Wade CE; Trauma Outcomes Group, Holcomb JB, Wade CE, Cotton BA, Kozar RA, Brasel KJ, Vercruysse GA, MacLeod JB, Dutton RP, Hess JR, Duchesne JC, McSwain NE, Muskat PC, Johannigam JA, Cryer HM, Tillou A, Cohen MJ, Pittet JF, Knudson P, DeMoya MA, Schreiber MA, Tieu BH, Brundage SI, Napolitano LM, Brunsvold ME, Sihler KC, Beilman GJ, Peitzman AB, Zenati MS, Sperry JL, Alarcon LH, Croce MA, Minei JP, Steward RM, Cohn SM, Michalek JE, Bulger EM, Nunez TC, Ivatury RR, Meredith JW, Miller PR, Pomper GJ, Marin B. Increased platelet:RBC ratios are associated with improved survival after massive transfusion. *J Trauma*. 2011 Aug;71(2 Suppl 3):S318-28. doi: 10.1097/TA.0b013e318227eddb. PMID: 21814099.

141. Lelkens CCM, Koning JG, de Kort B, Floot IBG, Noorman F. Experiences with frozen blood products in the Netherlands military. *Transfusion and Apheresis Science*. 2006;34:289-298

142. McGill M. Temperature cycling preserves platelet shape and enhances in vitro test scores during storage at 4°C. *J Lab Clin Med* 1978 92:971-972.

143. Xu F, Gelderman MP, Farrell J, Vostal JG. Temperature cycling improves in vivo recovery of cold-stored human platelets in a mouse model of transfusion. *Transfusion* 2013;53:1178-1186

144. Read MS, Reddick RL, Bode AP, et al. Preservation of hemostatic and structural properties of rehydrated lyophilized platelets: potential for long-term storage of dried platelets for transfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:397-401

145. Bode AP, Read MS, Reddick RL. Activation and adherence of lyophilized human platelets on canine vessel strips in the Baumgartner perfusion chamber. *J Lab Clin Med* 1999;133:200-11

146. Bode AP, Read MS. Lyophilized platelets: continued development. *Transfus Sci* 2000;22:99-105., Fischer TH,

147. Merricks EP, Russell KE, et al. Intracellular function in rehydrated lyophilized platelets. *Br J Haematol* 2000;111:167-74.

148. Fischer TH, Wolberg AS, Bode AP, et al. The interaction of factor VIIa with rehydrated, lyophilized platelets. *Platelets* 2008;19:182-91
149. Sum R, Hager S, Pietramaggiore G, et al. Wound-healing properties of trehalose stabilized freeze-dried outdated platelets. *Transfusion* 2007;47:672-9
150. Fitzpatrick GM, Cliff R, Tandon N. Thrombosomes: a platelet derived hemostatic agent for control of non compressible hemorrhage. *Transfusion* 2013;53 (Suppl 1):100S-6S
151. Gyulkhandanyan, A.V., Mutlu, A., Freedman, J. et al. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J Thromb Thrombolysis* 33, 397–411 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11239-012-0688-8>
152. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57. doi: 10.1038/bjc.1972.33. PMID: 4561027; PMCID: PMC2008650.
153. Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev*. 2012 Mar;26(2):51-63. doi: 10.1016/j.blre.2011.10.002. Epub 2011 Nov 4. PMID: 22055392.
154. Li J, Xia Y, Bertino AM, Coburn JP, Kuter DJ. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion*. 2000 Nov;40(11):1320-9. doi: 10.1046/j.1537-2995.2000.40111320.x. PMID: 11099659.
155. McArthur K, Chappaz S, Kile BT. Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage. *Blood*. 2018 Feb 8;131(6):605-610. doi: 10.1182/blood-2017-11-742684. Epub 2017 Dec 19. PMID: 29259001.
156. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*. 2017 Aug;24(8):1380-1389. doi: 10.1038/cdd.2017.44. Epub 2017 May 12. PMID: 28498362; PMCID: PMC5520456.
157. Rong Y, Distelhorst CW. Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:73-91. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.021507.105852. PMID: 17680735.

158. Vanags DM, Orrenius S, Aguilar-Santelises M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. *Br J Haematol* 1997;99:824–31.
159. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001;292(5517):727–730.
160. Ekert PG, Jabbour AM, Manoharan A, et al. Cell death provoked by loss of interleukin-3 signaling is independent of Bad, Bim, and PI3 kinase, but depends in part on Puma. *Blood*. 2006;108(5):1461–1468.
161. White MJ, McArthur K, Metcalf D, et al. Apoptotic Caspases Suppress mtDNA-Induced STING-Mediated Type I IFN Production. *Cell*. 2014;159(7):1549–1562.
162. Rongvaux A, Jackson R, Harman CCD, et al. Apoptotic Caspases Prevent the Induction of Type I Interferons by Mitochondrial DNA. *Cell*. 2014;159(7):1563–1577.
163. Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, et al. Mcl-1 and Bcl-xL regulate Bak/Bax-dependent apoptosis of the megakaryocytic lineage at multistages. *Cell Death Differ*. 2012.
164. Debrincat MA, Josefsson EC, James C, et al. Mcl-1 and Bcl-xL coordinately regulate megakaryocyte survival. *Blood*. 2012;119(24):5850–5858
165. Kuter DJ. Apoptosis in platelets during ex vivo storage. *Vox Sang* 2002;83 (Suppl 1):311–3.
166. Vanags DM, Orrenius S, Aguilar-Santelises M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. *Brit J Haematol* 1997;99:824–31.
167. Plenchette S, Moutet M, Benguella M, NGondara JP, Guigner F, Coffee C, et al. Early increase in DcR2 expression and late activation of caspases in the platelet storage lesion. *Leukemia* 2001;15:1572–81
168. Ramström, Sofia & Rånby, Mats & Lindahl, Tomas. (2003). Platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant activity in clotting whole blood - Different effects of collagen, TRAP and calcium ionophore A23187. *Thrombosis and haemostasis*. 89. 132-41. 10.1055/s-0037-1613552.

169. Burnouf T, Goubran HA, Chou ML, Devos D, Radosevic M. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev.* 2014 Jul;28(4):155-66. doi: 10.1016/j.blre.2014.04.002. Epub 2014 Apr 21. PMID: 24826991.
170. Thushara RM, Hemshekhar M, Basappa, Kemparaju K, Rangappa KS, Girish KS. Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: An outlook. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015 Mar;93(3):149-58. doi: 10.1016/j.critrevonc.2014.11.002. Epub 2014 Nov 15. PMID: 25439323.
171. Marion Lebois & Emma C. Josefsson (2016) Regulation of platelet lifespan by apoptosis, *Platelets*, 27:6, 497-504
172. Ben Amor N, Pariente JA, Salido GM, Bartegi A, Rosado JA. Caspases 3 and 9 are translocated to the cytoskeleton and activated by thrombin in human platelets. Evidence for the involvement of PKC and the actin filament polymerization. *Cell Signal* 2006;18:1252–61
173. Leytin V, Allen DJ, Lyubimov E, Freedman J. Higher thrombin concentrations are required to induce platelet apoptosis than to induce platelet activation. *Br J Haematol* 2007;136:762–4
174. Piguet PF, Vesin C. Modulation of platelet caspases and life-span by anti-platelet antibodies in mice. *Eur J Haematol* 2002;68:253–61.
175. Siragam V, Brinc D, Crow AR, Song S, Freedman J, Lazarus AH. Can antibodies with specificity for soluble antigens mimic the therapeutic effects of intravenous IgG in the treatment of autoimmune disease? *J Clin Invest* 2005;115:155–60.
176. Catani L, Fagioli ME, Tazzari PL, Ricci F, Curti A, Rovito M, et al. Dendritic cells of immune thrombocytopenic purpura (ITP) show increased capacity to present apoptotic platelets to T lymphocytes. *Exp Hematol* 2006;34:879–87.
177. Li S, Wang Z, Liao Y, Zhang W, Shi Q, Yan R, et al. The glycoprotein Iba-von Willebrand factor interaction induces platelet apoptosis. *J Thromb Haemost* 2010;8:341–50.
178. van der Wal DE, Du VX, Lo KS, Rasmussen JT, Verhoef S, Akkerman JW. Platelet apoptosis by cold-induced glycoprotein Iba clustering. *J Thromb Haemost* 2010;8: 2554–62.

179. Leytin V, Allen DJ, Mutlu A, Gyulkhandanyan AV, Mykhaylov S, Freedman J. Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *Lab Invest* 2009;89:374–84.
180. Jobe SM, Wilson KM, Leo L, Raimondi A, Molkenin JD, Lentz SR, et al. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood* 2008;111:1257–65
181. Arachiche A, Kerbiriou-Nabias D, Garcin I, Letellier T, Dachary-Prigent J. Rapid procoagulant phosphatidylserine exposure relies on high cytosolic calcium rather than on mitochondrial depolarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29: 1883–9.
182. Schoenwaelder SM, Yuan Y, Josefsson EC, White MJ, Yao Y, Mason KD, et al. Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood* 2009;114:663–6.
183. Leytin V, Allen DJ, Mykhaylov S, Mis L, Lyubimov EV, Garvey B, et al. Pathologic high shear stress induces apoptosis events in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:303–10.
184. Masselli E, Pozzi G, Vaccarezza M, Mirandola P, Galli D, Vitale M, Carubbi C, Gobbi G. ROS in Platelet Biology: Functional Aspects and Methodological Insights. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 9;21(14):4866
185. Ng MSY, Tung JP, Fraser JF. Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now? *Transfus Med Rev.* 2018 Apr 17:S0887-7963(17)30189-X. doi: 10.1016/j.tmr.2018.04.001. Epub ahead of print. PMID: 29751949.
186. M. Rijkers, F.P. van Alphen, P.F. van der Meer, D. de Korte, F.W.G. Leebeek, A.B. Meijer, J. Voorberg, G.A. Jansen. Label Free Quantitative Mass Spectrometry Identifies Processes Linked to Platelet Degranulation As Early Events during Platelet Storage, *Blood* 2016; 128:2638-2638
187. C. Caram-Deelder, A.L. Kreuger, J. Jacobse, J.G. van der Bom, R.A. Middelburg. Effect of platelet storage time on platelet measurements: a systematic review and meta-analysis, *Vox Sang* 2016
188. Leytin V, Freedman J. Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models. *Transfus Apher Sci.* 2003 Jun;28(3):285-95. doi: 10.1016/S1473-0502(03)00048-X. PMID: 12725956.

189. Perrotta PL, Perrotta CL, Snyder EL. Apoptotic activity in stored human platelets. *Transfusion*. 2003 Apr;43(4):526-35. doi: 10.1046/j.1537-2995.2003.00349.x. PMID: 12662287.
190. Getz TM. Physiology of cold-stored platelets. *Transfus Apher Sci*. 2019 Feb;58(1):12-15. doi: 10.1016/j.transci.2018.12.011. Epub 2018 Dec 30. PMID: 30639086.
191. Hegde S, Wellendorf AM, Zheng Y, Cancelas JA. Antioxidant prevents clearance of hemostatically competent platelets after long-term cold storage. *Transfusion*. 2020 Nov 27. doi: 10.1111/trf.16200. Epub ahead of print. PMID: 33247486.
192. Mack JP, Miles J, Stolla M. Cold-Stored Platelets: Review of Studies in Humans. *Transfus Med Rev*. 2020 Oct;34(4):221-226. doi: 10.1016/j.tmr.2020.08.003. Epub 2020 Sep 16. PMID: 33039263.
193. Zucker MB, Borrelli J. Reversible alterations in platelet morphology produced by anticoagulants and by cold. *Blood* 1954;9:602–8.
194. Reddoch KM, Pidcoke HF, Montgomery RK, Fedyk CG, Aden JK, Ramasubramanian AK, et al. Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4 degrees C and 22 degrees C. *Shock* 2014;41(Suppl 1):54–61
195. Bode AP, Knupp CL. Effect of cold storage on platelet glycoprotein Ib and vesiculation. *Transfusion* 1994;34:690–6.
196. Bergmeier W, Piffath CL, Cheng G, Dole VS, Zhang Y, von Andrian UH, et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates GPIb alpha shedding from platelets in vitro and in vivo. *Circ Res* 2004;95:677–83
197. Hoffmeister KM, Josefsson EC, Isaac NA, Clausen H, Hartwig JH, Stossel TP. Glycosylation restores survival of chilled blood platelets. *Science* 2003;301:1531–4.
198. Wandall HH, Hoffmeister KM, Sorensen AL, Rumjantseva V, Clausen H, Hartwig JH, et al. Galactosylation does not prevent the rapid clearance of long-term, 4 degrees C-stored platelets. *Blood* 2008;111:3249–56
199. Reddoch-Cardenas KM, Peltier GC, Chance TC, Nair PM, Meledeo MA, Ramasubramanian AK, Cap AP, Bynum JA. Cold storage of platelets in platelet additive solution maintains mitochondrial integrity by

- limiting initiation of apoptosis-mediated pathways. *Transfusion*. 2020 Dec 8. doi: 10.1111/trf.16185. Epub ahead of print. PMID: 33294977.
200. Reddoch-Cardenas KM, Bynum JA, Meledeo MA, Nair PM, Wu X, Darlington DN, Ramasubramanian AK, Cap AP. Cold-stored platelets: A product with function optimized for hemorrhage control. *Transfus Apher Sci*. 2019 Feb;58(1):16-22. doi: 10.1016/j.transci.2018.12.012. Epub 2018 Dec 30. PMID: 30704925.
201. Liu Q, Xu L, Jiao SX, Wang TX, Song Y, Wen ZK. Trehalose inhibited the phagocytosis of refrigerated platelets in vitro via preventing apoptosis. *Transfusion*. 2009 Oct;49(10):2158-66. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02254.x. Epub 2009 Jun 23.
202. Baghdadi V, Yari F, Nikougoftar M, Rafiee MH. Platelets Apoptosis and Clearance in The Presence of Sodium Octanoate during Storage of Platelet Concentrate at 4°C. *Cell J*. 2020 Jul;22(2):212-217. doi: 10.22074/cellj.2020.6697. Epub 2019 Oct 14
203. Stolla M, Bailey SL, Fang L, Fitzpatrick L, Gettinger I, Pellham E, Christoffel T. Effects of storage time prolongation on in vivo and in vitro characteristics of 4°C-stored platelets. *Transfusion*. 2020 Mar;60(3):613-621. doi: 10.1111/trf.15669. Epub 2020 Feb 4.
204. Ma R, Xie R, Yu C, et al. Phosphatidylserine-mediated platelet clearance by endothelium decreases platelet aggregates and procoagulant activity in sepsis. *Sci Rep*. 2017;7(1):4978.
205. del Conde I, Nabi F, Tonda R, Thiagarajan P, Lopez JA, Kleiman NS. Effect of P-selectin on phosphatidylserine exposure and surface-dependent thrombin generation on monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):1065–1070.
206. Fager AM, Wood JP, Bouchard BA, Feng P, Tracy PB. Properties of procoagulant platelets: defining and characterizing the subpopulation binding a functional prothrombinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(12):2400–2407.
207. Marini I, Aurich K, Jouni R, Nowak-Harnau S, Hartwich O, Greinacher A, Thiele T, Bakchoul T. Cold storage of platelets in additive solution: the impact of residual plasma in apheresis platelet concentrates. *Haematologica*. 2019 Jan;104(1):207-214. doi: 10.3324/haematol.2018.195057. Epub 2018 Aug 16.

208. Xu F, Gelderman MP, Farrell J, Vostal JG. Temperature cycling improves in vivo recovery of cold-stored human platelets in a mouse model of transfusion. *Transfusion*. 2013 Jun;53(6):1178-86. doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03896.x. Epub 2012 Sep 24
209. Pienimaeki-Roemer A, Kuhlmann K, Bottcher A, et al. Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. *Transfusion* 2015;55:507-21
210. Vasina EM, Cauwenberghs S, Feijge MA, Heemskerk JW, Weber C, Koenen RR. Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation. *Cell Death Dis*. 2011;2(9):e211. Published 2011 Sep 29. doi:10.1038/cddis.2011.94
211. Smethurst PA. Aging of platelets stored for transfusion. *Platelets*. 2016 Sep;27(6):526-34. doi: 10.3109/09537104.2016.1171303. Epub 2016 May 2.
212. Albany AM, Harrison P, Murphy MF. Markers of platelet activation and apoptosis during storage of apheresis- and buffy coat-derived platelet concentrates for 7 days. *Transfusion*. 2009 Jan;49(1):108-17. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01942.x. Epub 2008 Oct 14
213. Chambers LA, Herman JH. Considerations in the selection of a platelet component: apheresis versus whole blood derived. *Transfus Med Rev* 1999;13:311-22.
214. Heal JM, Blumberg N. Optimizing platelet transfusion therapy. *Blood Rev* 2004;18:149-65
215. Verhoeven AJ, Verhaar R, Gouwerok EG, de Korte D. The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. *Transfusion*. 2005 Jan;45(1):82-9. doi: 10.1111/j.1537-2995.2005.04023.x. PMID: 15647022.
216. Li J, de Korte D, Woolum MD, Ruane PH, Keil SD, Lockerbie O, McLean R, Goodrich RP. Pathogen reduction of buffy coat platelet concentrates using riboflavin and light: comparisons with pathogen-reduction technology-treated apheresis platelet products. *Vox Sang*. 2004 Aug;87(2):82-90. doi: 10.1111/j.1423-0410.2004.00548.x. PMID: 15355498.
217. Yang J, Yin W, Zhang Y, Sun Y, Ma T, Gu S, Gao Y, Zhang X, Yuan J, Wang W. Evaluation of the advantages of platelet concentrates



- stored at 4°C versus 22°C. *Transfusion*. 2018 Mar;58(3):736-747. doi: 10.1111/trf.14462. Epub 2017 Dec 21. PMID: 29266276.
218. Bertino, A. M., Qi, X. Q., Li, J., Xia, Y., & Kuter, D. J. (2003). Apoptotic markers are increased in platelets stored at 37°C. *Transfusion*, 43(7), 857–866. doi:10.1046/j.1537-2995.2003.t01-4-00431.x
219. Marks, D. C., & Johnson, L. (2018). Assays for phenotypic and functional characterization of cryopreserved platelets. *Platelets*, 1–8. doi:10.1080/09537104.2018.1514108
220. Warner MA, Kurian EB, Hammel SA, van Buskirk CM, Kor DJ, Stubbs JR. Transition from room temperature to cold-stored platelets for the preservation of blood inventories during the COVID-19 pandemic. *Transfusion*. 2020 Oct 8:10.1111/trf.16148. doi: 10.1111/trf.16148. Epub ahead of print. PMID: 33029791; PMCID: PMC7675729.
221. Sahler J, Grimshaw K, Spinelli SL, Refaai MA, Phipps RP, Blumberg N. Platelet storage and transfusions: new concerns associated with an old therapy. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2011 Summer;8(1-2):e9-e14. doi: 10.1016/j.ddmec.2011.06.001. Epub 2011 Jul 20. PMID: 22662018; PMCID: PMC3361759.
222. Oliver AE, Tablin F, Walker NJ, Crowe JH. The internal calcium concentration of human platelets increases during chilling. *Biochim Biophys Acta* 1999;1416:349–60.