**ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΠΡΟΤΑΣΗΣ**

|  |  |
| --- | --- |
| Αριθμός λέξεων πρότασης | 2029 |
|  |

**Επιστημονική Περιοχή:** Εργαστηριακή Αιματολογία

**Λέξεις Κλειδιά:** Μετάγγιση, εξωκυττάρια κυστίδια (EVs ή ΕΚ), αιμοπετάλια, αποθήκευση αίματος και παραγώγων

**Πανεπιστήμιο/Τμήμα/Τομέας/Εργαστήριο:** Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία (HemQcR)

Γλώσσα: Ελληνική

|  |
| --- |
| **ΤΙΤΛΟΣ ΠΡΟΤΙΝΟΜΕΝΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:** Κυτταροβιολογική μελέτη αποθηκευμένων αιμοπεταλίων που προορίζονται για μετάγγιση |
| **Α. Αναλυτική περιγραφή ερευνητικής πρότασης** |
| Τα αιμοπετάλια έχουν πρωταρχικό ρόλο στη διαμεσολάβηση της αιμόστασης, ο οποίος είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της ακεραιότητας του αγγειακού συστήματος (Clemetson KJ, 2012). Η μετάγγιση αιμοπεταλίων διεκδικεί μια σημαντική θέση ανάμεσα στις απαραίτητες θεραπείες της σύγχρονης ιατρικής. Εστιάζοντας, στους ρόλους που έχει η μετάγγιση των αιμοπεταλίων στην κλινική πράξη, διακρίνεται η μείωση της απώλειας αίματος, της ενεργού αιμορραγίας μετά από τραυματισμό καθώς και η διατήρηση σε ένα ασφαλές επίπεδο του αριθμού των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας (Estcourt LJ et al., 2012, Sahler J et al., 2011, Stroncek DF et al., 2007).Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε θερμοκρασία δωματίου ήταν η κυρίαρχη μέθοδος αποθήκευσης για περισσότερο από 30 χρόνια (Jaroslav G et al., 2017). Τα χρονικά όρια της αποθήκευσης φτάνουν τις πέντε (5) ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου, εξαιτίας των αυξημένων αναγκών. Στις μέρες, τα αιμοπετάλια αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου (20-24°C) με συνεχή ανακίνηση για να εξασφαλίζεται η επιβίωση τους και η επαρκής θεραπευτική αποτελεσματικότητά τους (Marini I et al., 2019).Πολλά έχουν ανακαλυφθεί σχετικά με τα υλικά των μονάδων αποθήκευσης, τα διαλύματα και τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζει η θερμοκρασία τη βιωσιμότητα και τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Η αποθήκευση στις συγκεκριμένες συνθήκες, επηρεάζει τη λειτουργικότητα τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* «βλάβες αποθήκευσης αιμοπεταλίων» (Capocelli KE et al., 2014). Επιπλέον, παρά τον περιορισμένο χρόνο αποθήκευσης, η συχνότητα βακτηριακής επιμόλυνση των αιμοπεταλίων παραμένει υψηλή (Getz TM., 2018, Vostal et al., 2017, Brecher ME et al., 2013).Παρόλο που το κλινικό πλεονέκτημα της μετάγγισης αιμοπεταλίων είναι καλά εδραιωμένο, οι δυσκολίες και οι περιορισμοί εξακολουθούν να αποτελούν σημαντική πρόκληση. Ο τρόπος αποθήκευσης των αιμοπεταλίων πριν τη μετάγγισης ήδη αποτελεί αντικείμενο μελέτης για πολλούς ερευνητές. Η ψυχρή αποθήκευση των αιμοπεταλίων έχει καταστεί ελκυστική λόγω της μείωσης του δυναμικού πολλαπλασιασμού των βακτηρίων και της διατήρησης της λειτουργίας των αιμοπεταλίων πέραν των πέντε (5) ημερών αποθήκευσης. Ωστόσο η ψυχρή αποθήκευση των αιμοπεταλίων αποτελεί μια πρόκληση καθώς δεν είναι γνωστές μέχρι τώρα οι κλινικές επιπτώσεις στον ασθενή.Τα αποθηκευμένα σε ψυχρές συνθήκες αιμοπετάλια ενεργοποιούνται μέσω μηχανισμών κυτταρικής σηματοδότησης ή/και λόγω της έκθεσής τους στο ψύχος και παρουσιάζουν μορφολογικές, μηχανικές και μοριακές μεταβολές/αλλαγές.Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα ψυχρά αποθηκευμένα αιμοπετάλια (4oC) είναι λειτουργικά και μεταβολικά ενεργά και παρατηρήθηκε να είναι ανώτερης ποιότητας από αυτά που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (Reddoch KM et al., 2014, Pidcoke HF et al., 2014, Montgomery RK et al., 2013). Όμως ένας σημαντικός περιορισμός της αποθήκευσης των αιμοπεταλίων σε ψύχος είναι η επιβίωση/βιωσιμότητά τους μετά τη μετάγγιση. Ωστόσο, το ζήτημα αυτό είναι αμφιλεγόμενο. Μερικές μελέτες έχουν δείξει μειωμένη επιβίωση των αποθηκευμένων αιμοπεταλίων σε ψύχος σε σύγκριση με τα αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου (Hoffmeister KM et al., 2003) ενώ άλλοι ερευνητές ανέφεραν ότι τα αιμοπετάλια που φυλάσσονται στους 4°C μπορούν να επιβιώσουν στην κυκλοφορία για αρκετές ημέρες (Pidcoke HFet al., 2013, Jobes D et al., 2011). Ένα ακόμα αμφιλεγόμενο πεδίο είναι η ανάκτηση του αριθμού των αιμοπεταλίων μετά την απόψυξη. Πρόσφατες μελέτες (Yang et al., 2017) έχουν δείξει ότι η αποθήκευση των ασκών αιμοπεταλίων στους +4οC δεν επηρέασε σημαντικά τον απόλυτο αριθμό τους.Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι οι *in vitro* αιμοστατικές λειτουργίες των αιμοπεταλίων που αποθηκεύονται ως «φρέσκο ολικό αίμα» διατηρούνται σε καλό επίπεδο μετά την αποθήκευση στο ψύχος (Yazer et al., 2016). Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη σε αρουραίους, (Wu et al., 2017), η μετάγγιση παγωμένου ολικού αίματος είχε καλύτερα αιμοστατικά αποτελέσματα σε σχέση με τη μετάγγιση φρέσκου ολικού αίματος, όταν τα ζώα υφίστανται απειλητική για τη ζωή τους αιμορραγία (Spinella & Cap., 2016). Μετά τη μετάγγιση η ενεργοποίηση των παγωμένων αιμοπεταλίων ήταν υψηλότερη (Torres Filho, 2017) και παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αιμοπεταλιακός θρόμβος (Walsh et al., 2017). Η μελέτη αυτή υποδηλώνει ότι το αποθηκευμένο/παγωμένο ολικό αίμα συμβάλλει καλύτερα στην αιμοστατική λειτουργία (Cid et al., 2016) και αποτελεί έναν αποτελεσματικό εναλλακτικό τρόπο για τη θεραπεία ασθενών με αιμορραγία από τραυματισμό (Spinella et al., 2016). Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να υποστηρίζουν ότι τα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται κάτω από αυτές τις συνθήκες συμβάλλουν στην αιμόσταση.Θα αποτελέσει ένα μεγάλο επιστημονικό στοίχημα αν αποδειχθεί ότι τα αιμοπετάλια, που συντηρούνται σε ψυχρές συνθήκες, για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από αυτό των πέντε (5) ημερών της θερμοκρασίας δωματίου, έχουν ικανοποιητικούς δείκτες βιωσιμότητας και λειτουργικότητας, γεγονός που θα αποτελέσει προάγγελο για μια νέα προοπτική στο έδαφος της μεταγγισιοθεραπείας. Σε επόμενο στάδιο είναι απαραίτητη η εφαρμογή κλινικών μελετών σε ανθρώπους ώστε να αποδειχτεί η μετά τη μετάγγιση επιβίωση των αιμοπεταλίων στον άνθρωπο.Κύριος **σκοπός** της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής (ΔΔ), είναι η κυτταροβιολογική μελέτη των αιμοπεταλίων που προορίζονται για μετάγγιση στον άνθρωπο και έχουν αποθηκευτεί στο ψύχος (+4oC). Συγκεκριμένα, είναι η μελέτη της κυτταρικής βιολογίας και της φυσιολογίας του ανθρώπινου αιμοπεταλίου που αποθηκεύεται στους (+4oC) χρησιμοποιώντας ως μάρτυρες αιμοπετάλια ανάκτησης που είναι αποθηκευμένα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (+22oC). Στα αιμοπετάλια θα μελετηθεί η λειτουργικότητα, η μορφολογία με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, ο αριθμός και δείκτες κυτταρικής εκκαθάρισης, γήρανσης και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Στο υπερκείμενο πλάσμα θα μελετηθεί το αντιοξειδωτικό δυναμικό καθώς και η έκφραση διαλυτών μορίων προσκόλλησης και απόπτωσης. Τέλος, θα απομονωθούν μικροκυστίδια αιμοπεταλίων από το διαλυτό μέρος της αποθήκευσης (πλάσμα) και θα μελετηθεί η έκφραση μορίων κυτταρικής εκκαθάρισης, προσκόλλησης, γήρανσης και απόπτωσης.**Προοπτικές Μελέτης**Ύστερα από απόδειξη της ύπαρξης ικανοποιητικών δείκτών βιωσιμότητας και λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων που συντηρούνται σε ψυχρές συνθήκες για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από αυτό των πέντε (5) ημερών, σε επόμενο στάδιο είναι σημαντική η επιβεβαίωση των παραπάνω δεδομένων από κλινικές μελέτες σε ανθρώπους με σκοπό να αποδειχτεί η μετά τη μετάγγιση επιβίωση των αιμοπεταλίων στον άνθρωπο. **Απώτερος σκοπός είναι η δημιουργία ενός νέου παραγώγου αίματος, τα κατεψυγμένα ή αποθηκευμένα στο ψύχος αιμοπετάλια.**Οι αιμοδότες θα υπογράψουν τη συγκατάθεσή τους για τη συμμετοχή στη μελέτη και θα πραγματοποιηθεί ενημέρωσή τους για τη χρονική διάρκεια της μελέτης, το σκοπό, τη διαφύλαξη του απορρήτου καθώς και για τη δυνατότητα να αποσυρθούν οποιαδήποτε στιγμή το επιθυμούνΕπιπλέον, η μελέτη θα διεξαχθεί κατόπιν έγκρισης της Επιτροπής Βιοηθικής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής καθώς και της Νοσοκομειακής Υπηρεσίας Αιμοδοσίας του Αρεταίειο Νοσοκομείου Αθηνών για τη συλλογή των δειγμάτων (αιμοδοσία). Οι εργαστηριακές δοκιμασίες θα πραγματοποιηθούν στο Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου της Εργαστηριακή Αιματολογία (HemQcR) του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών.Θα πραγματοποιηθεί συλλογή των δημογραφικών χαρακτηριστικών και χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής όλων των εθελοντών αιμοδοτών καθώς και συλλογή των αιματολογικών και βιοχημικών δεδομένων των τελευταίων τριών μηνών πριν από την αιμοληψία.**Μεθοδολογία του ερευνητικού έργου**Α. Εργαστηριακή ανάλυση δειγμάτων - Αιματολογικός Έλεγχος.1. Έλεγχος Μορφολογίας Αιμοπεταλίων (μικροσκοπική παρατήρηση με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης).2. Δοκιμές λειτουργίας Αιμοπεταλίων.3. Μελέτη δεικτών κυτταρικής εκκαθάρισης και γήρανσης (p-σελεκτίνη, φωσφατιδυλοσερίνη κα.).4. Δοκιμασίες αντιοξειδωτικού δυναμικού και δεικτών απόπτωσης (καρβονυλίωση πρωτεϊνών, ROS, GSH, FRAP).5. Απομόνωση και κυτταροβιολογική ανάλυση κυστιδίων με κυτταρομετρία ροής (CD41, CD144 κα.).6. Mελέτη πρωτεϊνικής σύστασης των αιμοπεταλίων κατά Western.**Β. Μικροβιολογικός Έλεγχος**Ανίχνευση και καταμέτρηση μικροβιακού φορτίου, σε όλους τους ασκούς ανεξαρτήτως θερμοκρασίας αποθήκευσης. **Γ. Στατιστική Ανάλυση αποτελεσμάτων, με το στατιστικό πακέτο SPSS.**Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων θα χρησιμοποιηθεί το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences, έκδοση 22.0). Ο έλεγχος των διαφορών ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών καθώς και της επίδρασης της αιμοκάθαρσης θα γίνει μέσω t-test (independent samples t-test και paired t-test, αντίστοιχα), ενώ οι διαφορές των ομάδων των ασθενών με τα υγιή άτομα θα ελεγχθούν με ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA, one way analysis of variance), αφού πρώτα επιβεβαιωθεί η απουσία ακραίων τιμών στις διάφορες παραμέτρους (outliers). Για την εύρεση των συσχετίσεων μεταξύ των παραμέτρων θα πραγματοποιηθούν έλεγχοι κατά Pearson και Spearmann, ανάλογα με την κανονικότητα της κατανομής των παραμέτρων (κανονική και μη κανονική κατανομή, αντίστοιχα). Ως στατιστικά σημαντικά θα θεωρηθούν τα αποτελέσματα με P<0,05 ή P<0,01. |
| **Β. Καινοτομία της ερευνητικής πρότασης** |
| Από την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής θα απαντηθεί πληθώρα ερωτημάτων σχετικά με τη δυνατότητα της αποθήκευσης των αιμοπεταλίων σε συνθήκες ψύχους και πιο συγκεκριμένα στους 4-8oC, πώς επηρεάζεται η μορφολογία και η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων από τις διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, εάν αλλάζουν τα επίπεδα του μικροβιακού φορτίου και αν τα κύτταρα επιβιώνουν για το ίδιο χρονικό διάστημα μετά από τη μετάγγιση εντός του οργανισμού, ανεξάρτητα από τον τρόπο αποθήκευσης. Όλα τα παραπάνω αποτελούν μέχρι τώρα αναπάντητα ερωτήματα στον τομέα της Ιατρικής των μεταγγίσεων και έχουν ως σκοπό να απαντήσουν τελικά στο ερώτημα αν η συντήρηση των αιμοπεταλίων στο ψύχος (4οC-8oC) μπορεί να αποτελέσει μελλοντικά τον βέλτιστο τρόπο αποθήκευσης και μετάγγισης των αιμοπεταλίων.  |
| **Γ. Χρονοδιάγραμμα και ρεαλιστικότητα του χρονοδιαγράμματος** |
| **Αναλυτικό χρονοδιάγραμμα** Η μελέτη αναμένεται να ολοκληρωθεί σε διάστημα **38 μηνών** ως εξής:

|  |  |
| --- | --- |
| Λήψη άδειας για συλλογή δεδομένων από την Επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής και του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών | 2 μήνες |
| Συγγραφή βιβλιογραφικής ανασκόπησης | 4 μήνες |
| Αιμοδοσία συμμετεχόντων – Συλλογή Ασκών - Παρασκευή Αιμοπεταλίων Ανάκτησης – Χωρισμός σε διπλούς ασκούς | 8 μήνες |
| Μελέτη βιολογίας του Αιμοπεταλίου | 10 μήνες |
| Εργαστηριακή ανάλυση υπερκειμένου | 8 μήνες |
| Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων και συσχετίσεις. Συγγραφή διδακτορικής διατριβής | 6 μήνες |
|  |  |

 |
| **Δ. Βιβλιογραφία** |
| Brecher ME, Blajchman MA, Yomtovian R, Ness P, AuBuchon JP. Addressing the risk of bacterial contamination of platelets within the United States: a history to help illuminate the future. Transfusion. 2013;53(1):221-231.Capocelli KE, Dumont LJ. Novel platelet storage conditions: additive solutions, gas, and cold. Current Opinion in Hematology. 2014;21(6):491-496.Clemetson KJ: Platelets and primary haemostasis. Thromb Res 2012;129:220–224.Cid J, Escolar G, Galan A, López-Vilchez I, Molina P, Díaz-Ricart M, Lozano M, Dumont LJ. In vitro evaluation of the hemostatic effectiveness of cryopreserved platelets. Transfusion. 2016 Mar;56(3):580-6.Estcourt LJ, Birchall J, Lowe D, et al.:Platelet transfusions in haematology patients: are we using them appropriately? Vox Sang 2012; 103:284–293Getz TM. Physiology of cold-stored platelets. Transfusion Apheresis Science. 2018 Dec 30. pii: S1473-0502(18)30481-6. doi: 10.1016/j.transci.2018.12.011.Hoffmeister KM, Felbinger TW, Falet H, et al. The clearance mechanism of chilled blood platelets. Cell. 2003;112(1):87-97.Jobes D, Wolfe Y, O'Neill D, et al. Toward a definition of "fresh" whole blood: an in vitro characterization of coagulation properties in refrigerated whole blood for transfusion. Transfusion. 2011;51(1):43-51.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.Montgomery RK, Reddoch KM, Evani SJ, Cap AP, Ramasubramanian AK. Enhanced shear-induced platelet aggregation due to low-temperature storage. Transfusion. 2013;53(7):1520-1530.Pidcoke HF, Spinella PC, Ramasubramanian AK, et al. Refrigerated platelets for the treatment of acute bleeding: a review of the literature and reexamination of current standards. Shock. 2014;41 Suppl 1:51-53.Pidcoke HF, McFaul SJ, Ramasubramanian AK, et al. Primary hemostatic capacity of whole blood: a comprehensive analysis of pathogen reduction and refrigeration effects overtime. Transfusion. 2013;53 Suppl 1:137S-149S.Sahler J, Grimshaw K, Spinelli SL, et al.: Platelet storage and transfusions: new concerns associated with an old therapy. Drug Discov Today Dis Mech 2011; 8:e9–e14Stroncek DF, Rebulla P: Platelet transfusions. Lancet 2007; 370:427– 438Reddoch KM, Pidcoke HF, Montgomery RK, et al. Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4 degrees C and 22 degrees C. Shock. 2014;41 Suppl 1:54-61.Spinella PC, Pidcoke HF, Strandenes G, Hervig T, Fisher A, Jenkins D, Yazer M, Stubbs J, Murdock A, Sailliol A, Ness PM, Cap AP. Whole blood for hemostatic resuscitation of major bleeding. Transfusion. 2016 Apr;56 Suppl 2:S190-202.Torres Filho IP, Torres LN, Valdez C, Salgado C, Cap AP, Dubick MA. Refrigerated platelets stored in whole blood up to 5 days adhere to thrombi formed during hemorrhagic hypotension in rats.. Journal Thrombosis Haemostasis 2017 Jan;15(1):163-175.Vostal JG, Gelderman MP, Skripchenko A, Xu F, Li Y, Ryan J, Cheng C, Whitley P, Wellington M, Sawyer S, Hanley S, Wagner SJ. Temperature cycling during platelet cold storage improves in vivo recovery and survival in healthy volunteers. Transfusion. 2017 Nov 8. doi: 10.1111/trf.14392. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29119573. Walsh M, Shreve J, Thomas S. The value of cold storage whole blood platelets in trauma resuscitation is like real estate: a function of 'location, location, location'. British Journal of Haematology 2017 Dec;179(5):699-702.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. 2017 Dec 21. doi: 10.1111/trf.14462 |