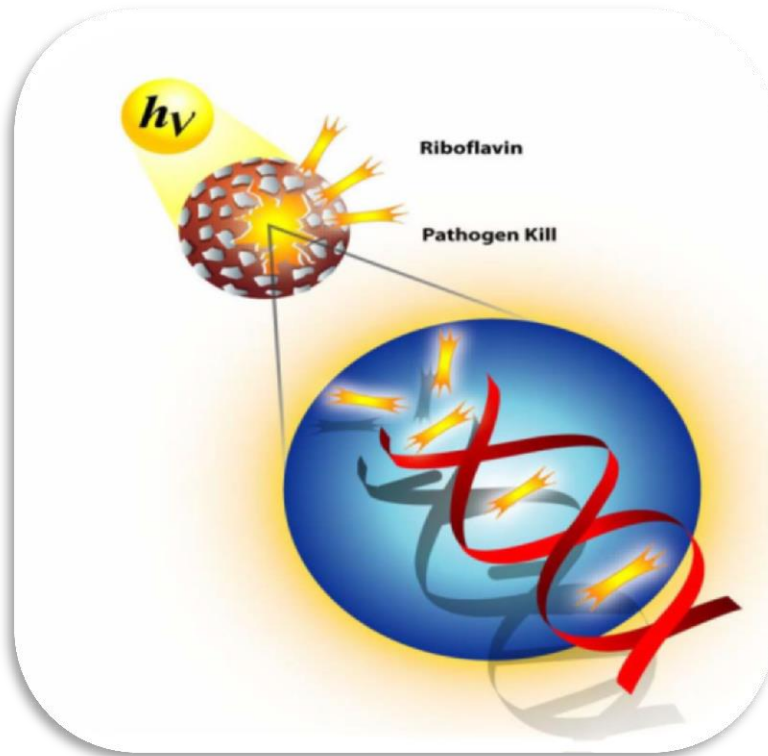


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΩΝ ΛΕΥΚΩΝ  
ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ  
ΠΗΞΗΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ  
ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΜΕ ΡΙΒΟΦΛΑΒΙΝΗ

---



ΑΓΓΕΛΗ ΜΑΡΙΝΑ

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

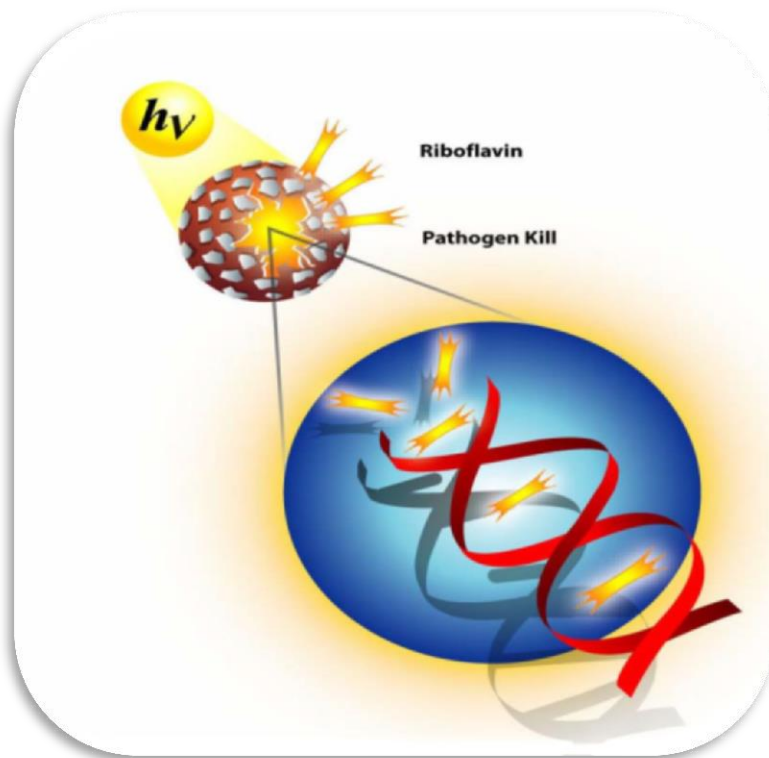
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ, ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2013

TECHNOLOGICAL EDUCATIONAL INSTITUTE OF ATHENS  
FACULTY OF HEALTH AND CARING PROFESSIONS  
DEPARTMENT OF MEDICAL LABORATORIES

# STUDY OF RESIDUAL WHITE BLOOD CELLS AND COAGULATION FACTORS IN RIBOFLAVIN TREATED PLASMA

---



**ANGELI MARINA**

SUPERVISOR: DR. KRIEMPARDIS ANASTASIOS

LECTURER OF HAEMATOLOGY AND TRANSFUSION  
MEDICINE

ATHENS, NOVEMBER 2013

*Εικόνα εξωφύλλου: Παρεμβολή μορίου ριβοφλαβίνης στο γενετικό υλικό υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Ανατύπωση από: Terumoto, BCT*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ .....	1
1.1.1. Γνωστά και αναδυόμενα παθογόνα .....	3
Α. Γνωστά παθογόνα .....	4
Β. Βακτηριακά παθογόνα .....	6
Γ. Αναδυόμενα και άλλα παθογόνα .....	7
1.1.2. Υπολειπόμενα λευκά αιμοσφαίρια .....	13
Α. Σχετιζόμενη με τη μετάγγιση αντίδραση μοσχεύματος έναντι ξενιστή .....	13
Β. Αλλογενής μετάγγιση .....	14
1.1.3. Παράγοντες πήξης .....	15
Α. Αντιαιμορροφιλικός παράγων ή παράγων VIII .....	15
Β. Ινωδογόνο .....	17
1.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ .....	18
1.2.1. Αδρανοποίηση με διαλύτη και απορρυπαντικό .....	20
1.2.2. Αδρανοποίηση με ψωραλένιο .....	22
1.2.3. Αδρανοποίηση με κυανό του μεθυλενίου .....	23
1.2.4. Αδρανοποίηση με FRALE .....	24
1.2.5. Αδρανοποίηση με ριβοφλαβίνη .....	25
1.3. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΑΣ .....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	29
2.1. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ .....	29
2.1.1. Η ριβοφλαβίνη .....	29
2.1.2. Η δράση της ριβοφλαβίνης .....	30
2.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	32
2.2.1. Επεξεργασία του δείγματος .....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	36
3.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΩΝ ΛΕΥΚΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΩΝ .....	36
3.1.1. Αιματολογικός αναλυτής .....	36
3.1.2. Κυτταρομετρία ροής .....	37
3.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΗΞΗΣ .....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	40
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	45
ΑΒSTRACT .....	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	48

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

Θα ήθελα να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου πρωτίστως στην κα Κατσαρού Όλγα, Διευθύντρια του 2<sup>ου</sup> Περιφερειακού Κέντρου Αιμοδοσίας του Γ.Ν.Α. «Λαϊκό», για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο της Αιμοδοσίας του νοσοκομείου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και την κα Γαβαλάκη Μαρία, για την επίβλεψη και την καθοδήγησή της σε κάθε στάδιο της έρευνας.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά, την κα Μαρινάκη Αλίκη, υπεύθυνη για την εκπαίδευσή μου και για την πολύτιμη πρακτική βοήθειά της, τις κυρίες Αναστασοπούλου Ιωάννα και Κανελλοπούλου Γεωργία και τους κυρίους Παπαχρόνη Ανδρέα και Χανό Ανέστη, για την συνεργασία τους, καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ και τον εισηγητή μου, κ. Κριεμπάρδη Αναστάσιο, για την καθοδήγηση, τη βοήθεια και τις συμβουλές του

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

Το αίμα αποτελεί πηγή ζωής για τον ανθρώπινο οργανισμό, με τη μετάγγισή του να είναι σωτήρια για τις ζωές των ασθενών με ακατάσχετη αιμορραγία, καθώς και εκείνων που δεν μπορούν να το παράγουν αποτελεσματικά λόγω διαταραχών της αιμοποίησης τους. Το ολικό αίμα μπορεί να παραγωγιστεί στα συστατικά του, όπως τα συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια (pRBCs – packed Red Blood Cells), το φρέσκο καταψυγμένο πλάσμα (FFP – Fresh Frozen Plasma) και τα αιμοπετάλια (PLTs – Platelets), τα οποία χρησιμοποιούνται για την αναπλήρωση της απώλειας του εκάστοτε παραγώγου ή ως προφυλακτική θεραπεία [1]. Με τις διάφορες πρακτικές ασφαλείας του αίματος που έχουν εφαρμοσθεί στις αναπτυγμένες χώρες, ο κίνδυνος της μετάδοσης νοσημάτων μέσω του αίματος έχει μειωθεί σημαντικά, ενώ με τον έλεγχο (screening) των αιμοδοτών επιτυγχάνεται μείωση, αλλά όχι και πλήρης εξάλειψη των μολυσματικών κινδύνων από την μετάγγιση του αίματος [2]. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα του ελέγχου των αιμοδοτών περιορίζεται από ορισμένους παράγοντες, όπως αναφέρεται και στο εγχειρίδιο πρακτικών της Αμερικανικής Ένωσης Κέντρων Αιμοδοσίας (AABB – American Association of Blood Banks) [3] :

1. *«Δεν είναι πρακτικά εφικτό να εξεταστούν όλοι οι αιμοδότες ως προς όλες τις ασθένειες που θεωρητικά μπορούν να μεταδοθούν μέσω του αίματος.*
2. *Για κάθε εξέταση, υπάρχει ένα χρονικό περιθώριο από τη στιγμή που το άτομο μολύνεται μέχρι τη στιγμή που η εξέταση θα ανιχνεύσει τη μόλυνση (το γνωστό «παράθυρο»).*
3. *Κάθε δοκιμασία έχει έναν περιορισμό στην ευαισθησία της.*

4. *Η δημιουργία μιας δοκιμασίας για τον έλεγχο των αιμοδοτών είναι μια μεγάλη, πολυσταδιακή διαδικασία, που περιλαμβάνει την ταυτοποίηση του παθογόνου παράγοντα, την επιλογή μιας αποτελεσματικής διαδικασίας για την απαγόρευση των μολυσματικών μονάδων (πχ. Ορολογικές ή μοριακές εξετάσεις (NAT – Nucleic acid Amplification Testing) ), τη δημιουργία μιας δοκιμασίας κατάλληλης για τον έλεγχο των δοτών, την αποδοτικότητα των κλινικών δοκιμών και την τελική έγκριση για την εφαρμογή της. Μέχρι να σχεδιαστεί μια τέτοια εξέταση, οι μεταδιδόμενες με το αίμα μολύνσεις εξακολουθούν να μεταδίδονται μέσω των μεταγγίσεων».*

Πέρα όμως από τα γνωστά παθογόνα που μεταδίδονται μέσω του αίματος, τα αναδυόμενα παθογόνα εξακολουθούν να αποτελούν πρόκληση, όπως αποδεικνύεται από την εμφάνιση του ιού του Δυτικού Νείλου (WNV - West Nile Virus) στις Η.Π.Α. και της επιδημίας του ιού Chikungunya στον Ινδικό Ωκεανό το 2005 [2, 4]. Στην περίπτωση των αναπτυσσόμενων χωρών, σημαντικοί κίνδυνοι ενέχονται στην βακτηριακή επιμόλυνση και στα πρωτόζωα που μεταδίδονται μέσω της μετάγγισης παραγώγων του αίματος, ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες, εξαιτίας της ανεπαρκούς χρηματοδότησης και οργάνωσης των υπηρεσιών υγείας, ο κίνδυνος των μεταδιδόμενων με το αίμα νοσημάτων παραμένει υψηλός [2].

Πρόκληση αποτελεί και η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος των ανοσοανεπαρκών ασθενών. Πρόκειται για ένα θέμα με ολοένα αυξανόμενη σημασία, δεδομένου ότι οι ασθενείς αυτοί με την πάροδο του χρόνου, την χορήγηση χημειοθεραπειών για κακοήθειες ή ανοσοκατασταλτικής αγωγής έπειτα από μεταμόσχευση μυελού των οστών ή συμπαγών οργάνων, αποτελούν την πλειοψηφία των μεταγγιζόμενων ασθενών. Η συγκεκριμένη ομάδα ασθενών, λόγω της έκθεσης τους σε πολλούς διαφορετικούς δότες, είναι επιρρεπής στις λοιμώξεις, με τους χαμηλούς τίτλους παθογόνων να είναι αρκετοί για να προκαλέσουν την ανάπτυξη σοβαρών κλινικών συμπτωμάτων. Συχνό είναι και το φαινόμενο της επανενεργοποίησης ιών, των οποίων τις λοιμώξεις έχουν αντιμετωπίσει στο παρελθόν, θέτοντας έτσι το θέμα της διαφοροδιάγνωσης μεταξύ μεταδιδόμενου με το αίμα νοσήματος ή επανενεργοποίησης [5].

Επιπλέον, η παρουσία των εναπομεινάντων λευκών αιμοσφαιρίων στα παράγωγα του αίματος είναι δυνατόν να έχει ανεπιθύμητες επιπτώσεις στους

ασθενείς που θα λάβουν τα συγκεκριμένα προϊόντα, όπως είναι η TA-GVHD (Σχετιζόμενη με τη Μετάγγιση Αντίδραση Μοσχεύματος έναντι Ξενιστή) [6] και η αλλοανοσοποίηση [7].

Η τεχνολογία μείωσης των παθογόνων (PRT – Pathogen Reduction Technology) μέσω της αδρανοποίησης, αναφέρεται στις διαδικασίες που μειώνουν την μολυσματικότητα των υπολειμματικών παθογόνων στα παράγωγα του αίματος [3]. Με την προσέγγιση αυτή μπορεί να ελαττωθεί τόσο η μετάδοση των παραγόντων για τα οποία δεν ελέγχονται οι δότες και δεν υπάρχουν ακόμα διαθέσιμες διαγνωστικές δοκιμασίες, όπως το παράσιτο *Babesia* ή ο ιός του Δάγγειου πυρετού, να περιοριστεί ακόμα και ο υπολειπόμενος κίνδυνος της μετάδοσης γνωστών παραγόντων, αλλά και να περιοριστεί το χρονικό διάστημα του «παραθύρου» στους ιούς [8].

Έτσι, οι προσδοκίες από την εφαρμογή των μεθόδων αδρανοποίησης αφορούν την επίτευξη δύο στόχων, αφενός την ελαχιστοποίηση και κατά το δυνατόν πλήρη εξάλειψη των ιογενών, βακτηριακών και αναδυόμενων παθογόνων από τα προϊόντα του αίματος, αφετέρου την αδρανοποίηση και των υπολειπόμενων λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα και τα παράγωγά του.

### 1.1.1. Γνωστά και αναδυόμενα παθογόνα

Εδώ και μισό αιώνα, οι προσπάθειες για τη διασφάλιση της ασφάλειας του αίματος, και κατά συνέπεια των μεταγγίσεων, έχουν εστιαστεί στους μολυσματικούς παράγοντες. Σήμερα, ο κίνδυνος της μετάδοσης ορισμένων παθογόνων μέσω της μετάγγισης αίματος έχει ελαττωθεί σημαντικά, ενώ μεγάλη προσοχή έχει δοθεί και στα αναδυόμενα παθογόνα τα οποία μεταδίδονται δια της μετάγγισης αίματος. Παράγοντες όπως το «παραθύρο», οι απόδημοι πληθυσμοί και το είδος του προϊόντος αίματος, πρέπει να αξιολογούνται προτού μεταγγιστεί κάποιο παράγωγο αίματος στους ασθενείς [9].



## A. Γνωστά παθογόνα

### ◆ HIV

Λίγα γεγονότα έχουν θορυβήσει την παγκόσμια τράπεζα αίματος, όσο η είσοδος του ιού HIV στην παροχή αίματος. Το γεγονός αυτό ήταν αρκετό για να ακολουθήσει μια ριζική επαναξιολόγηση των πρακτικών και της ιατρικής των μεταγγίσεων, με απώτερο σκοπό την εξασφάλιση της ακεραιότητας και της ασφάλειας του αίματος.

Ο ιός της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου (Human Immunodeficiency Virus – HIV) είναι ένας μολυσματικός παράγοντας που απειλεί σε παγκόσμιο επίπεδο την ασφάλεια του αίματος και των παραγώγων του. Οι ιδιαιτερότητές του που επιτρέπουν την αποτελεσματική μετάδοση και μόλυνση των ατόμων, κατέδειξαν την ανάγκη για τον συστηματικό έλεγχο των αιμοδοτών, του αίματος των, καθώς και την εισαγωγή νέων μεθόδων εξάλειψής του. Ήδη από την έναρξη του ελέγχου των αιμοδοτών για τον HIV το 1985, έχουν εισαχθεί νέες μέθοδοι που διασφαλίζουν πως ο ιός δεν θα παρεμβάλλεται στην παροχή αίματος και δεν θα μεταγγίζεται στους ασθενείς [9]. Σήμερα, ο έλεγχος για τον HIV (των τύπων 1 και 2) περιλαμβάνει ανίχνευση του RNA του ιού με NAT (Nucleic Acid Testing), και ανίχνευση των IgG και IgM αντισωμάτων με ορολογικές μεθόδους (χημειοφωταύγεια ή ανοσοενζυμικές) και έχει μειώσει την περίοδο του «παράθυρου» στις 9 μέρες, ενώ ο κίνδυνος μετάδοσής του είναι 1 περιστατικό ανά 1,5 εκατομμύρια μονάδες αίματος [3].

### ◆ HBV

Ο ιός της ηπατίτιδας B αποτελεί τον πιο διαδεδομένο και παθογόνο ιό παγκοσμίως, ο οποίος ευθύνεται για την κίρρωση του ήπατος αρχικά, και μετά από χρόνια για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα στους πάσχοντες ασθενείς. Αν και οι λοιμώξεις από τον ιό της Ηπατίτιδας B έχουν περιοριστεί σημαντικά στο πλαίσιο των εμβολιασμών σε παγκόσμιο επίπεδο των επαγγελματιών υγείας και των νεαρών ατόμων, του προγεννητικού ελέγχου και της μετέπειτα θεραπείας του νεογέννητου, καθώς και του αποτελεσματικού screening των αιμοδοτών, η μετάδοση της νόσου παραμένει δυνατή μέσω της μετάγγισης μολυσμένων μονάδων αίματος [3, 9]. Ο έλεγχος των αιμοδοτών περιλαμβάνει ανίχνευση του DNA του ιού με NAT, και ανίχνευση των HBsAg και anti-HBc (IgG και IgM αντισώματα) [3]. Ωστόσο, παρά τη

διαρκή πρόοδο για τον αποτελεσματικότερο έλεγχο των μονάδων αίματος, η ηπατίτιδα Β παραμένει μια σοβαρή απειλή για την ασφάλεια του αίματος και των προϊόντων του, κυρίως λόγω της παρατεταμένης χρονικής διάρκειας του «παραθύρου» της νόσου. Ύψιστης σημασίας είναι η ανάπτυξη διαγνωστικών μεθόδων με ακόμα πιο αυξημένη ευαισθησία για την ανίχνευση της νόσου κατά τη διάρκεια του «παραθύρου» [9].

#### ◆ HCV

Ο ιός της ηπατίτιδας C ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1980 και η λοίμωξη που προκαλούσε ήταν αρχικά γνωστή ως μη-A, μη-B ηπατίτιδα (non-A, non-B hepatitis). Παρά την απουσία εμβολίου για την ηπατίτιδα C, ο έλεγχος των αντισωμάτων (IgG) και η NAT για την ανίχνευση του ιικού RNA, έχουν συμβάλει στην μείωση του συνολικού κινδύνου των μετά την μετάγγιση περιστατικών ηπατίτιδας (PTH - Post Transfusion Hepatitis) που σχετίζονται με τον ιό HCV. Ο εκτιμώμενος κίνδυνος για την μετάδοση του ιού HCV ανά μονάδα αίματος είναι 1:1.600.000 [9], με τη διάρκεια του «παραθύρου» να είναι κατά μέσο όρο 7,4 ημέρες [3]. Ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς οι οποίοι έχουν απαλλαχθεί από τον ιό της ηπατίτιδας C, είτε λόγω αυτοϊασης είτε επειδή έχουν λάβει αντιική θεραπεία, δεν εμφανίζουν επανενεργοποίηση του ιού. Αντιθέτως, χειρότερη πρόγνωση έχουν οι οροθετικοί ασθενείς οι οποίοι πάσχουν ταυτόχρονα από HIV λοίμωξη ή έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού [5].

#### ◆ HTLV-I/II

Ο ιός HTLV ήταν ο πρώτος ρετροϊός που ανιχνεύτηκε και απομονώθηκε το 1978. Και οι δύο τύποι του ιού προσβάλουν τα λεμφοκύτταρα προκαλώντας χρόνιες λοιμώξεις, που ως επί το πλείστον είναι ασυμπτωματικές. Σύμφωνα με το AABB [3] το 2-5% των ασθενών με λοίμωξη από τον HTLV-I θα εμφανίσει T-λεμφοκυτταρική λευχαιμία σε διάστημα 20-30 ετών, ενώ ένα μικρότερο ποσοστό μπορεί να εμφανίσει μια νευρολογική ασθένεια που ονομάζεται HTLV- σχετιζόμενη μυελοπάθεια. Ο έλεγχος των αιμοδοτών περιλαμβάνει την ανίχνευση των IgG αντισωμάτων έναντι και των δύο τύπων του ιού. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο ιός

εκτιμάται πως μεταδίδεται μόνο μέσω των λευκών αιμοσφαιρίων που υπάρχουν στα παράγωγα αίματος.

#### ◆ CMV – Κυτταρομεγαλοϊός

Ο CMV, ως ένας ακόμη ιός που μεταδίδεται αιματογενώς, προκαλεί χρόνιες λοιμώξεις παραμένοντας σε λανθάνουσα φάση, αλλά με υπαρκτή την πιθανότητα να επανενεργοποιηθεί [3]. Η πλειονότητα των ενηλίκων έχει αντισώματα έναντι του ιού, αλλά ο CMV μπορεί να μεταδοθεί μέσω του ολικού αίματος στο 30-60% των περιπτώσεων σε οροαρνητικούς ασθενείς. Έχει παρατηρηθεί πως με την διατήρηση των συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων στους 4° C πριν την μετάγγιση η πιθανότητα μετάδοσής του πέφτει στο 1%, ενώ αν προηγηθεί και λευκαφαίρεση με χρήση ειδικών φίλτρων, τότε η πιθανότητα μετάδοσής του CMV σχεδόν δεν υφίσταται [10]. Αποτελεί τον μεγαλύτερο κίνδυνο για τους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (ασθενείς με AIDS και καρκινοπαθείς που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική θεραπεία) και εκείνους στους οποίους μεταμοσχεύτηκαν αρχέγονα κύτταρα (stem cells) ή συμπαγή όργανα, καθώς και για τα λιποβαρή πρόωρα νεογνά με οροθετικές μητέρες [3, 9, 10].

#### ◆ Σύφιλη

Το βακτήριο *Treponema pallidum* αποτελεί το αίτιο της σύφιλης, για το οποίο οι αιμοδότες ελέγχονται για περισσότερα από 60 χρόνια. Οι αρχικές εξετάσεις περιελάμβαναν μη ειδικές τρεπτονεμικές δοκιμασίες (π.χ. RPR – Rapid Plasma Reagin), ενώ πλέον ανιχνεύονται κυρίως ειδικά αντισώματα έναντι του βακτηρίου, καθώς οι εξετάσεις αυτές λαμβάνουν χώρα σε αυτοματοποιημένα όργανα. Ωστόσο, η αξία του ελέγχου για το τρεπτόνημα είναι αμφιλεγόμενη, διότι δεν έχουν αναφερθεί περιστατικά μετάδοσης του βακτηρίου μέσω της μετάγγισης του αίματος μετά τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο. [3]

## **B. Βακτηριακά παθογόνα**

Η βακτηριακή επιμόλυνση του αίματος και των παραγώγων του αποτέλεσε την πρώτη γνωστή απειλή για τις τράπεζες αίματος. Παρόλο που τα αποστειρωμένα

συστήματα για τη συλλογή του αίματος έχουν συμβάλει στην μείωση της βακτηριακής επιμόλυνσης, εξακολουθεί να αποτελεί έναν δυνητικά θανάσιμο κίνδυνο. Μελέτες έχουν καταδείξει πως ένας θάνατος από σήψη σχετιζόμενος με την μετάγγιση αίματος παρατηρείται για ένα εκατομμύριο μεταγγιζόμενες μονάδες αιμοπεταλίων, ενώ για τις μεταγγιζόμενες μονάδες ερυθρών αιμοσφαιρίων το ποσοστό ανέρχεται σε έναν θάνατο στις δέκα εκατομμύρια μονάδες. Οι πηγές για την βακτηριακή επιμόλυνση δεν είναι πάντοτε εύκολο να ανιχνευθούν. Η μόλυνση δύναται να προκύψει από τη φυσιολογική χλωρίδα του δέρματος του ασθενούς, από μη αποστειρωμένα σωληνάρια αίματος ή ακόμα και από το περιβάλλον στο οποίο θα λάβει χώρα η αιμοληψία. Επίσης, μια βακτηριακή μόλυνση είναι δυνατό να προκύψει όταν ο δότης έχει ασυμπτωματική βακτηραιμία. Άλλες έρευνες [2], έδειξαν πως η πλειοψηφία των θανάτων που σχετίζονται με την μετάγγιση ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων οφείλονται σε gram αρνητικούς μικροοργανισμούς.

Οι συνθήκες αποθήκευσης των αιμοπεταλίων (20-24°C) είναι ιδανικές για την ανάπτυξη ορισμένων βακτηρίων, κυρίως των κοαγκουλάση αρνητικών σταφυλόκοκκων, οι οποίοι ευθύνονται για το 25% των περιπτώσεων βακτηριακής μόλυνσης των δεκτών. Οι ασθενείς στους οποίους χορηγούνται ερυθρά αιμοσφαίρια, βρίσκονται στον ίδιο κίνδυνο, γεγονός που καθιστά τα βακτηριακά παθογόνα τη μεγαλύτερη απειλή για τους αποδέκτες των μονάδων αίματος. Όσον αφορά τα ερυθρά αιμοσφαίρια, ο κυριότερος παράγοντας μόλυνσης είναι η *Yersinia enterocolitica*, ακολουθούμενη από την *Pseudomonas spp* και την *Serratia spp*.

Η βακτηριακή μόλυνση μπορεί να περιοριστεί με την προσεκτική και αποστειρωμένη φλεβοτομή, την ενίσχυση των μεθόδων ανίχνευσης των βακτηρίων και τη διαρκή ανάπτυξη μεθόδων αδρανοποίησης των παθογόνων.

### **Γ. Αναδυόμενα και άλλα παθογόνα**

Σύμφωνα με το IOM (Institute of Medicine) [5], ως αναδυόμενες μολυσματικές ασθένειες, ορίζονται εκείνες των οποίων η εμφάνιση τους στους ανθρώπους έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δύο δεκαετίες ή απειλούν να αυξηθούν στο εγγύς μέλλον.

#### ◆ WNV – Ιός του Δυτικού Νείλου

Ο ιός του Δυτικού Νείλου ανήκει στην οικογένεια των Flaviviridae και μεταδίδεται μέσω των μολυσμένων κωνώπων. Περίπου το 80% των περιπτώσεων είναι ασυμπτωματικό, το 20% σχετίζεται με μια αυτό-περιοριζόμενη εμπύρετη κατάσταση, ενώ λιγότερο από το 1% σχετίζεται με σοβαρή νευροεπεκτατική ασθένεια, όπως η μηνιγγοεγκεφαλίτιδα [3]. Η πρώτη επίσημη αναφορά μετάδοσης του ιού μέσω της μεταγγίσης αίματος έγινε το 2002 στην Αμερική, με τον αριθμό των λοιμώξεων από τον ιό να αγγίζει τις 400.000 εκείνο το έτος [10] εκ των οποίων 28 ήταν τα καταγεγραμμένα περιστατικά μετάδοσης μέσω των μεταγγίσεων του αίματος. Από τότε ακολούθησε ραγδαία εφαρμογή του ελέγχου των αιμοδοτών σε ολόκληρο το δυτικό ημισφαίριο με ανίχνευση του RNA του ιού με NAT και λιγότερο με ορολογικές εξετάσεις. Χάρη σε αυτές τις αποτελεσματικές δοκιμασίες ελέγχου του αίματος, ο κίνδυνος της μετάδοσής του WNV μέσω της μεταγγίσης του αίματος έχει περιοριστεί [3, 5, 9].

#### ◆ Παρβοϊός B19

Ο Παρβοϊός B19 είναι ένας ιός που μολύνει έως και το 50% των ατόμων μέχρι την ηλικία των 15, προκαλώντας την πέμπτη νόσο [11]. Η πλειοψηφία των ασθενών εμφανίζει ένα χαρακτηριστικό εξάνθημα σε παιδική ηλικία χωρίς περαιτέρω επιπλοκές από τη λοίμωξη, ενώ σε ανοσοεπαρκείς πληθυσμούς, η ασθένεια είναι αυτοϊάσιμη [5]. Ωστόσο, η λοίμωξη μπορεί να προκαλέσει μια πληθώρα συμπτωμάτων που εξαρτώνται από τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την αιματολογική κατάσταση του ξενιστή. Η λοίμωξη από τον ιό προκαλεί αρθραλγίες στο 10% των παιδιών, ενώ φτάνει το 50% των ενηλίκων, κυρίως στις γυναίκες. Έχει επίσης συνδεθεί με την απλασία των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς [5, 11]. Ως επακόλουθο της λοίμωξης, ορισμένοι ασθενείς μπορούν να αναπτύξουν χρόνια αρθρίτιδα που κλινικά μοιάζει με την ρευματοειδή αρθρίτιδα.

Ο σχετικά μεγάλος επιπολασμός της λοίμωξης από τον παρβοϊό στον γενικό πληθυσμό σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθος του, καθώς και η αντοχή του στην αδρανοποίηση με τις διαθέσιμες μεθόδους, έχει οδηγήσει στην μετάδοση του μέσω των προϊόντων πλάσματος που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της αιμορροφιλίας. Η προσεκτική παρακολούθηση και οι συνεχείς μελέτες απαιτούνται

για να ελαττωθεί ο κίνδυνος εξάπλωσης του Παρβοϊού Β19 μέσω των προϊόντων αίματος. [9]

◆ *Trypanosoma cruzi*

Το *Trypanosoma cruzi* είναι ένα παράσιτο το οποίο προκαλεί τη νόσο Chagas και ενδημεί σε ορισμένες περιοχές της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής. Ωστόσο, η μαζική μετανάστευση πληθυσμών από αυτές τις χώρες έχει οδηγήσει στην εξάπλωση του παρασίτου και σε μη ενδημικές περιοχές, γεγονός που το καθιστά ως αναδυόμενο παθογόνο. Ορισμένοι ασθενείς διατηρούν μια χρόνια ασυμπτωματική λοίμωξη που ανέρχεται σε ποσοστό 60% στις Η.Π.Α. [9]. Η οξεία λοίμωξη από το *Trypanosoma cruzi*, στην περίπτωση που είναι συμπτωματική, συνοδεύεται από ήπια συμπτωματολογία, με την χρόνια όμως μορφή της στους ασθενείς να είναι απειλητική για τη ζωή τους, διότι εξασθενεί την καρδιακή και την γαστρεντερική λειτουργία [10]. Ο έλεγχος για το *Trypanosoma cruzi* περιλαμβάνει ανοσοενζυμικές μεθόδους για την ανίχνευση αντισωμάτων και τεχνικές ραδιοανοσοκαθίζησης (RIPA – radioimmunoprecipitation) ως συμπληρωματικές των πρώτων [3, 5]. Παρά τον έλεγχο για την ασθένεια ο κίνδυνος μετάδοσής της μέσω των μεταγγίσεων αίματος παραμένει υψηλός λόγω της εκτεταμένης διάρκειας επώασης της ασυμπτωματικής παρασιταϊμίας και της διαρκώς αυξανόμενης μετανάστευσης από την Λατινική Αμερική [9].

◆ *Babesia* spp

Η *Babesia* spp είναι ένα ενδοερυθροκυτταρικό παράσιτο που αποτελεί το αίτιο της μπαμπεσίωσης, μιας νόσου που ενδημεί στις Η.Π.Α. με ποσοστό οροθετικότητας 1,5% [5]. Περιστατικά μετάδοσης μπαμπεσίωσης μέσω των μεταγγίσεων ανιχνεύονται ολοένα και με μεγαλύτερη συχνότητα, ενώ κάποια μπορούν να αποβούν μοιραία για τους πάσχοντες. Οι λοιμώξεις από τη *Babesia* είναι ζωνοόσοι και μεταδίδονται στον άνθρωπο μέσω ενδιάμεσων ξενιστών όπως ο κρότων *Ixodes scapularis*. Η νόσος είναι συνήθως ασυμπτωματική, ακόμα και αν τα παράσιτα κυκλοφορούν στο αίμα για μήνες ή χρόνια. Σε ορισμένους ασθενείς η νόσος εκδηλώνεται ως μια πολύ βαριάς μορφής ελονοσία που μπορεί να οδηγήσει στον θάνατο. Τη δεδομένη χρονική στιγμή δεν υπάρχουν διαθέσιμες

αποτελεσματικές εξετάσεις, ενώ η πρόληψη, μέσω των ερωτηματολογίων κατά το screening των αιμοδοτών, δεν είναι ευαίσθητη ούτε ειδική μέθοδος. Διάφορες έρευνες επικεντρώνονται στην μελλοντική εφαρμογή του ανοσοφθορισμού και της PCR ως εξετάσεις ελέγχου [5]. Σε αυξημένο κίνδυνο βρίσκονται οι ανοσοκατασταλμένοι, οι ηλικιωμένοι και οι ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε σπληνεκτομή [3, 10]. Αν αναγνωρισθεί έγκαιρα, μπορεί να αντιμετωπιστεί με αντιβιοτικά.

#### ◆ Ελονοσία

Το πλασμώδιο της ελονοσίας είναι ένα άλλο ενδοερυθροκυτταρικό παρασίτο που μεταδίδεται στους ανθρώπους μέσω των μολυσμένων κωνώπων. Ο Π.Ο.Υ. εκτιμά πως 350-500εκατομμύρια περιστατικά σημειώνονται κυρίως σε παιδιά στην υποσαχάρια Αφρική, με περισσότερους από ένα εκατομμύριο θανάτους [5] και μια παγκόσμια αύξηση στην εμφάνιση της παγκοσμίως. Εν τούτοις, ο έλεγχος των αιμοδοτών πραγματοποιείται μόνο μέσω ερωτήσεων καθώς δεν υπάρχει εγκεκριμένη από το FDA (Food and Drug Administration) δοκιμασία ελέγχου του πλασμωδίου.

#### ◆ Variant Creutzfeldt-Jacob disease (vCJD)

Η νόσος Creutzfeldt-Jacob προκαλείται από μια πρωτεΐνη prion η οποία είναι το αίτιο της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας στα βοοειδή και η κύρια οδός της μετάδοσής του στους ανθρώπους είναι η κατανάλωση μολυσμένων με το prion βοοειδών [5, 10]. Τέσσερα περιστατικά μετάδοσης του prion από μετάγγιση έχουν καταγραφεί στο Ηνωμένο Βασίλειο, 6,5 - 8,5 χρόνια [5] μετά την μετάγγιση μη λευκαφαιρεμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Οι τρεις από τους τέσσερεις δέκτες των προϊόντων εμφάνισαν συμπτωματική νόσο από το prion, ενώ στον τέταρτο η επιβεβαίωση της νόσου έγινε κατά την αυτοψία της σπληνός και των λεμφαδένων του. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως και οι δότες των συγκεκριμένων παραγώγων εμφάνισαν την νόσο. Στις Η.Π.Α. αν και έχουν εμφανιστεί σποραδικά περιστατικά vCJD, δεν υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν την μετάδοση της νόσου μέσω της μετάγγισης του αίματος και έως και τη δεδομένη χρονική στιγμή, οι αιμοδότες που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για τη συγκεκριμένη ασθένεια

απορρίπτονται [3, 5]. Ωστόσο, υπάρχει αναφορά σε ένα περιστατικό στο Ηνωμένο Βασίλειο όπου ένας αιμορροφιλικός ασθενής έλαβε τον παράγοντα πήξης VIII από παράγωγο πλάσματος προερχόμενο από δότη που αργότερα εμφάνισε vCJD, υποδεικνύοντας έτσι πιθανή μετάδοση του vCJD μέσω των συμπυκνωμένων παραγόντων πήξης [3, 9]. Μελέτες σε ζώα έδειξαν πως η μετάδοση του vCJD μέσω του αίματος είναι δυνατή κατά την φάση επώασης του prion και κατά την εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων. Μέχρι στιγμής, ο μόνος τρόπος διάγνωσης της νόσου είναι η μεταθανάτια βιοψία εγκεφάλου, αν και έχουν γίνει προσπάθειες ανίχνευσης του prion κατά την ασυμπτωματική περίοδο με φίλτρα συγγένειας (affinity filters) και μεθόδους αδρανοποίησης [5, 10]. Επομένως εξέχουσας σημασίας είναι η παρακολούθηση του αναδυόμενου αυτού παθογόνου διότι δεν υπάρχουν ειδικές εξετάσεις ή ευαίσθητες δοκιμασίες διαθέσιμες [9].

#### ◆ HAV

Είναι γνωστό πως ο ιός της ηπατίτιδας Α δεν μεταδίδεται κατά κανόνα μέσω του αίματος. Εκτιμάται, ωστόσο, πως στο ένα εκατομμύριο των μονάδων αίματος που μεταγγίζονται, είναι πιθανό να σημειωθεί ένα περιστατικό μετάδοσης του ιού μέσω της μετάγγισης [9].

#### ◆ HEV

Ο ιός της ηπατίτιδας Ε μεταδίδεται πρωτίστως διαμέσου της πρωκτο-στοματικής οδού και δευτερευόντως από μολυσμένα ύδατα και κατανάλωση μη καλοψημένου χοιρινού κρέατος. Είναι αυτό-περιοριζόμενος και ευθύνεται για την οξεία ιογενή ηπατίτιδα που ενδημεί συνήθως στην Ασία, την Αφρική και την Κεντρική και Νότια Αμερική. Η μακρά φάση επώασης του ιού, καθιστά την μετάδοσή του μέσω του μολυσμένου με τον ιό αίματος πιθανή. Υπάρχουν δύο καταγεγραμμένα περιστατικά με αιματογενή μετάδοση του HEV σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ιαπωνία, το ένα ανιχνεύτηκε κατά τη διάρκεια μιας ανασκοπικής εξέτασης τεσσάρων ασθενών που υποβλήθηκαν σε αιμοκαθάρσεις και το δεύτερο, σε έναν ασθενή που υποβλήθηκε σε εγχείριση ανοιχτής καρδιάς που αργότερα παρουσίασε οξεία ηπατίτιδα. Ο HEV-θετικός αιμοδότης ήταν ασυμπτωματικός και μόνιμος κάτοικος της Ιαπωνίας, περιοχή όπου ο HEV δεν θεωρείτο ενδημικός. Μια άλλη μελέτη στην



Ευρώπη έδειξε πως σε μια μη ενδημική περιοχή το ποσοστό οροθετικότητας των αιμοδοτών δεν υπερβαίνει το 3%, σε αντίθεση με τις ενδημικές περιοχές, όπως η Κίνα, όπου το ποσοστό ανέρχεται στο 16% [9]. Στις περιοχές αυτές έχει εφαρμοστεί η ανίχνευση του RNA του ιού με NAT.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, ο ιός της ηπατίτιδας Ε, θα πρέπει να θεωρηθεί ως μια αναδυόμενη απειλή της ασφάλειας του αίματος [9], καθώς ο ιός αυτός δεν μπορεί να αδρανοποιηθεί αποτελεσματικά μέσω της αδρανοποίησης με Διαλύτη και Απορρυπαντικό, απειλώντας έτσι την ασφάλεια των μεταγγιζόμενων πλάσμάτων [10].

#### ◆ Άλλα αναδυόμενα παθογόνα

Άλλες δύο μεταδιδόμενες μέσω ενδιάμεσων ξενιστών λοιμώξεις που απαιτούν την προσοχή της παγκόσμιας τράπεζας αίματος, είναι ο ιός του Δάγγειου πυρετού και ο ιός Chikungunya [3], καθώς δύνανται να προκαλέσουν επιδημίες και δεν υπάρχουν διαθέσιμες διαγνωστικές εξετάσεις για την πρόληψή τους [5].

Πιθανή απειλή για την μετάγγιση του αίματος και των παραγώγων του είναι το gram αρνητικό βακτήριο *Coxiella burnettii* που προκαλεί τον Q πυρετό (Q fever), το οποίο αν και μεταδίδεται κυρίως μεταξύ των οικόσιτων ζώων, μπορεί να μεταδοθεί μέσω αερολυμάτων και του γάλακτος στους ανθρώπους. Στην πρόσφατη επιδημία από το βακτήριο στην Ολλανδία, έχει καταγραφεί ένα περιστατικό μετάδοσης του μέσω της μετάγγισης αίματος [10]. Για να αξιολογήσουν τη βαρύτητα της απειλής και την έκταση της βακτηριαιμίας, οι Ολλανδοί επιστήμονες συμπεριέλαβαν την μέθοδο NAT για τον έλεγχο των αιμοδοτών. Ωστόσο, μέτρα πρέπει να ληφθούν για την καταπολέμηση της νόσου στα οικόσιτα ζώα, ώστε να εξαλειφθεί το φαινόμενο και στους ανθρώπους [10].

Τέλος, εξαιτίας της σοβαρότητας και της ταχύτητας της εξάπλωσης του ιού SARS από την Κίνα, σε όλο τον υπόλοιπο πλανήτη, υπάρχει η υπόθεση πως μπορεί να μεταδοθεί και μέσω της μετάγγισης του αίματος, αν και ένα τέτοιο ενδεχόμενο είναι σπάνιο να παρατηρηθεί σε λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος. Στο πλαίσιο όμως της πρόληψης, και χωρίς να υπάρχει κάποιο άλλο μέσο ελέγχου διαθέσιμο, οι υποψήφιοι αιμοδότες με ιστορικό που περιλαμβάνει την

μετακίνηση σε χώρες που έχουν προσβληθεί με τον ιό, αποκλείονται από τη αιμοδότηση.

### 1.1.2. Υπολειπόμενα λευκά αιμοσφαίρια

#### **A. Σχετιζόμενη με τη μετάγγιση αντίδραση μοσχεύματος έναντι ξενιστή (TA-GVHD)**

Η οξεία TA-GVHD είναι μια σπάνια επιπλοκή αλλογενούς μεταμόσχευσης προγονικών κυττάρων και προκύπτει από την παρουσία βιώσιμων λεμφοκυττάρων στο αλλομόσχευμα τα οποία αναγνωρίζουν τον HLA αντιγονικό τύπο του ξενιστή ως ξένο, καταλήγοντας έτσι σε μια χαρακτηριστική ανοσιακή απάντηση [6]. Η κλινική εικόνα περιλαμβάνει πυρετό, διάρροια, δυσλειτουργία του ήπατος και ένα χαρακτηριστικό ερύθημα που κυρίως παρατηρείται στις παλάμες. Παρεμφερής εικόνα μπορεί να προκληθεί και από την μετάγγιση βιώσιμων λεμφοκυττάρων σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς σε απουσία αλλογενούς μεταμόσχευσης βλαστικών κυττάρων (stem cells). Η περίπτωση αυτή μπορεί να καταλήξει και σε απλασία του μυελού των οστών και πανκυτταροπενία.

Η TA-GVHD εμφανίζεται σε 8 με 10 μέρες μετά την μετάγγιση [6]. Είναι σχεδόν ολοκληρωτικά θανατηφόρα, με τον θάνατο να παρατηρείται μέσα σε έναν μήνα στο 90% των περιπτώσεων. Δεν έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις, αφενός λόγω της έλλειψης αναγνώρισης, αφετέρου λόγω της έλλειψης καθοριστικών διαγνωστικών μελετών.

Η TA-GVHD μπορεί να παρατηρηθεί και σε μη ανοσοκατασταλμένους ξενιστές, ιδιαίτερα στις εγκύους, σε άτομα που υποβάλλονται σε καρδιαγγειακές και κοιλιακές επεμβάσεις, σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και σε ορισμένες περιπτώσεις τραυματισμού. Βέβαια, δεν αναπτύσσουν όλοι οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς TA-GVHD και θα πρέπει να υπάρχουν επιπλέον παράγοντες που να προδιαθέτουν τους ασθενείς στην κατάσταση αυτή. Οι κυριότερες προϋποθέσεις για την ανάπτυξη GVHD όπως αναφέρει η ClareTaylor με τους συνεργάτες της [6] είναι:

- i. *«οι HLA τύποι που μοιράζονται ο δέκτης και ο δότης, αλλά με διαφορές που θα κάνουν τον δότη να αναγνωρίσει τον δέκτη ως ξένο,*

- ii. *η παρουσία ανοσοεπαρκών κυττάρων στα μεταγγιζόμενα προϊόντα του αίματος, και*
- iii. *η ανικανότητα του ξενιστή να απορρίψει τα ανοσοεπαρκή λεμφοκύτταρα»*

Σε έναν υγιή αποδέκτη, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού του συστήματος θα ξεπερνούσαν σε αριθμό τα Τ-λεμφοκύτταρα του δότη, τα οποία περιορίζονται τελικά από την αντίδραση ξενιστή προς το μόσχευμα. Ωστόσο, αν μεταγγιστεί ένας μικρός αριθμός λειτουργικών Τ-λεμφοκυττάρων που προέρχονται από έναν δότη ο οποίος είναι ομόζυγος για έναν από τους HLA απλότυπους του δέκτη, ο δέκτης δεν θα αναγνωρίσει τα κύτταρα αυτά ως ξένα. Τα Τ-λεμφοκύτταρα του δότη, όμως, θα αναγνωρίσουν τον ξενιστή ως ξένο, θα επεκταθούν και θα προκαλέσουν την TA-GVHD. Η κατάσταση αυτή αναφέρεται ως μονόδρομη HLA συμβατότητα (one-way HLA match) και η TA-GVHD αναμένεται να συμβεί ασχέτως της ανοσιακής κατάστασης του ξενιστή [6].

Επειδή δεν υπάρχει διαθέσιμη αποτελεσματική θεραπεία για την TA-GVHD και το ποσοστό θνητότητας είναι ιδιαίτερα υψηλό, ιδιαίτερη έμφαση τίθεται στην πρόληψη της κατάστασης [12]. Ανοσοκατασταλτικές θεραπείες έχουν εφαρμοστεί με περιορισμένη επιτυχία, και έχουν αποδειχθεί περισσότερο αποτελεσματικές στην περίπτωση της μεταμόσχευσης βλαστικών κυττάρων, παρά στην TA-GVHD. Στην περίπτωση αυτή εξέχουσα σημασία έχει η πρόληψη της κατάστασης η οποία πραγματοποιείται με την ακτινοβολία και την αδρανοποίηση του αίματος προτού μεταγγιστεί [6].

## **B. Αλλογενής μετάγγιση**

Όπως επισημαίνει και ο Oren [7] «η αλλογενής μετάγγιση αίματος είναι μια μορφή προσωρινής μεταμόσχευσης», καθώς με τη διαδικασία αυτή εισάγεται στον δέκτη πλήθος ξένων αντιγόνων και ζώντων κυττάρων. Ένας ανοσοεπαρκής δέκτης αναπτύσσει ανοσιακή απάντηση έναντι των αντιγόνων του δότη, οδηγώντας έτσι σε διάφορες κλινικές καταστάσεις οι οποίες εξαρτώνται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα ειδικά αντιγόνα που εμπλέκονται. Πρόκειται για αντιγόνα HLA κλάσης I, που υπάρχουν τόσο στα λευκά αιμοσφαίρια, όσο και στα αιμοπετάλια, και κλάσης II σε ορισμένα λευκοκύτταρα, τα ειδικά για τα κοκκιοκύτταρα αντιγόνα, τα ειδικά για τα αιμοπετάλια αντιγόνα (HPA - Human Platelet Antigen) και τέλος, τα ειδικά για τα ερυθρά αιμοσφαίρια αντιγόνα [7].

Ορισμένες από τις επιπτώσεις της αλλοανοσοποίησης περιλαμβάνουν: α) Οξεία ενδοαγγειακή αιμολυτική αντίδραση μετά τη μετάγγιση, Επιβραδυνόμενη αιμολυτική αντίδραση μετά τη μετάγγιση και αιμολυτική νόσο του νεογνού, από αλλοανοσοποίηση έναντι των ερυθρών αιμοσφαιρίων, β) Μετά μετάγγιση πορφύρα και Νεογνική αλλοάνοση θρομβοκυτταροπενία, από αλλοανοσοποίηση έναντι αιμοπεταλίων, γ) Πυρετική μη αιμολυτική αντίδραση από τη μετάγγιση (Febrile nonhemolytic transfusion reactions – FNHTR) και Σχετιζόμενη με τη μετάγγιση οξεία πνευμονική βλάβη (Transfusion-Related Lung Injury - TRALI), και τέλος δ) Απόρριψη μοσχεύματος, λόγω αλλοανοσοποίησης έναντι HLA αντιγόνων ή αλλοανοσοποίησης έναντι αντιγόνων στα κύτταρα του αίματος (στην μεταμόσχευση μυελού των οστών) [7].

Ο μηχανισμός της αλλοανοσοποίησης έναντι των αντιγόνων που υπάρχουν στα κύτταρα που μεταγγίζονται περιλαμβάνει την παρουσίαση των αντιγόνων του δότη από τα αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα του ιδίου στα T-λεμφοκύτταρα του δέκτη. Η αναγνώριση των αλλοαντιγόνων της κλάσης I του MHC (Major Histocompatibility Complex – Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας) από τα CD4<sup>+</sup> κύτταρα του δέκτη και η ενεργοποίησή τους απαιτεί επιπλέον διέγερση είτε από τον δότη ή τα αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα του δέκτη, ενώ τα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα εκκρίνουν τις ιντερλευκίνες (IL)–4, IL-5, IL-6, και IL-10 που ενεργοποιούν τα B-λεμφοκύτταρα και ξεκινούν την παραγωγή αντισωμάτων [7].

### *1.1.3. Παράγοντες πήξης*

Ο αντιαιμορροφιλικός παράγων (FVIII) και το ινωδογόνο, αποτελούν μέρος του αιμοστατικού μηχανισμού του οργανισμού. Ο μηχανισμός αυτός είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τη ζωή, καθώς ο ρόλος του είναι η παρεμπόδιση της απώλειας του αίματος μετά από τραυματισμό αγγείων και η διασφάλιση της ομαλής ροής του αίματος εντός αυτών [13].

#### **A. Αντ αιμορροφιλικός παράγων ή παράγων VIII**

Ο παράγοντας VIII παράγεται από τα ηπατικά κύτταρα και συμμετέχει στην ενδογενή οδό πήξης. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη – συνένζυμο που κυκλοφορεί στο αίμα συνδεδεμένη με ένα άλλο μόριο, τον παράγοντα von Willebrand και βρίσκεται

σε ανενεργή μορφή. Όταν προκύψει κάποιος τραυματισμός στα αγγεία, ο παράγων VIII ενεργοποιείται (VIIIa), απομακρύνεται από τον von Willebrand και παρουσία των ιόντων ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ), των φωσφολιπιδίων και του ενεργοποιημένου παράγοντα IX (ενδογενής δεκάση), αλληλεπιδρά και τελικά ενεργοποιεί τον παράγοντα X, πυροδοτώντας μια σειρά από χημικές αντιδράσεις που καταλήγουν στον σχηματισμό θρόμβου που θα κλείσει προσωρινά το τραύμα [14].

Η έλλειψη του παράγοντα VIII, λόγω γενετικών βλαβών στο γονίδιο F8 που ρυθμίζει την παραγωγή του, οδηγεί σε μια παθολογική κατάσταση, την αιμορροφιλία A, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παράταση της αιμόστασης μετά από τραυματισμούς ή χειρουργικές επεμβάσεις, με καθυστερημένη ή επαναλαμβανόμενη αιμορραγία εξαιτίας του ατελούς σχηματισμού του ινώδους. Πρόκειται για τη σοβαρότερη κληρονομική διαταραχή της πήξης του αίματος, ενώ μπορεί να προκύψει και από τυχαία μετάλλαξη στο γονίδιο F8 ή με τη δημιουργία αυτοαντισωμάτων έναντι του αντιαιμορροφιλικού παράγοντα [14]. Η βαρύτητα και η συχνότητα των αιμορραγικών εκδηλώσεων εξαρτάται τόσο από την συγκέντρωση του FVIII, όσο και από τον βαθμό στον οποίο παραμένει λειτουργικός [13-17].

Σε ασθενείς με σοβαρή αιμορροφιλία A, χαρακτηριστικό σύμπτωμα αποτελεί η χωρίς προφανή αιτία «αυτόματη» αιμορραγία (spontaneous bleeding) των αρθρώσεων ή των εν τω βάθει μυών. Στην περίπτωση αυτή η διάγνωση τίθεται από την βρεφική ηλικία, ενώ σπανίως μπορεί να παρατηρηθεί και ενδοκρανιακή αιμορραγία μετά από τραυματισμό στο κεφάλι. Οι ασθενείς που δεν λαμβάνουν προφυλακτική θεραπεία, εμφανίζουν έως και πέντε αυτόματες αιμορραγίες σε έναν μήνα [14].

Σε ασθενείς με μέτριας βαρύτητας ή ήπια αιμορροφιλία A, παρατηρείται καθυστερημένη πήξη μετά από μικρο-τραυματισμούς ή μικρές χειρουργικές επεμβάσεις, όπως η εξαγωγή των δοντιών. Χωρίς τη λήψη προφυλακτικής θεραπείας, η συχνότητα των αιμορραγικών εκδηλώσεων κυμαίνεται σε ένα μηνιαίως ή ετησίως [14].

Η θεραπεία της αιμορροφιλίας A, περιλαμβάνει την ανακούφιση από τον πόνο των συμπτωμάτων, με κοινές αναλγητικές ουσίες, τη θεραπεία υποκατάστασης, με άμεση ενδοφλέβια χορήγηση ανασυνδυασμένου ή συμπυκνωμένου πλασματικού παράγοντα VIII, την προφυλακτική θεραπεία, με

σκευάσματα του ελλείποντος παράγοντα, την εναλλακτική μορφή θεραπείας, με DDAVP (ημισυνθετική βασοπρεσίνη) και την αντιμετώπιση των αναστολέων, με ανοσοανοχή (ITT - Immune Tolerance Therapy) [14, 16, 18].

## **B. Ινωδογόνο**

Το ινωδογόνο κατέχει εξέχοντα ρόλο στον αιμοστατικό μηχανισμό του οργανισμού. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη οξείας φάσης του πλάσματος, που συντίθεται στο ήπαρ, με εύρος φυσιολογικών τιμών 150-350mg/dL [19]. Το αποτέλεσμα από την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξεως είναι η διάσπαση και στη συνέχεια ο πολυμερισμός του ινωδογόνου υπό την επίδραση του ενζύμου θρομβίνη, το οποίο οδηγεί στον σχηματισμό του αδιάλυτου ινώδους, το οποίο σταθεροποιείται και αποκτά ανθεκτικότητα μετά την ενεργοποίηση του παράγοντα XIII. Επιπλέον, το ινωδογόνο συμμετέχει και στην ινωδόλυση, τη λύση δηλαδή του ινώδους, στην επούλωση των ιστών και στη φλεγμονώδη αντίδραση [19, 20].

Η συγγενής ανεπάρκεια του ινωδογόνου, αν και σπάνια, διακρίνεται σε δύο τύπους: τις ποσοτικές ανωμαλίες, δηλαδή την ανιδωγοναιμία (ελαττωματική σύνθεση ινωδογόνου και μεταλλάξεις διαγραφής) και τις ποιοτικές, δηλαδή την δυσινωδογοναιμία (μεταλλάξεις σε λειτουργικό επίπεδο) [19, 21].

Οι επίκτητες δυσινωδογοναιμίες συσχετίζονται με ηπατικές βλάβες, και τα επίπεδα ινωδογόνου εμφανίζονται μειωμένα. Μείωση των επιπέδων του ινωδογόνου παρατηρείται επίσης στην Διάχυτη Ενδαγγειακή Πήξη (ΔΕΠ), σε θρομβολυτική θεραπεία και σε καταστάσεις αυξημένης ινωδόλυσης [21].

Για την αποκατάσταση των επιπέδων του ινωδογόνου στις δύο παραπάνω παθολογικές καταστάσεις, χορηγείται ενδοφλεβίως 0.8 -1 g/L συμπυκνωμένου πλασματικού ινωδογόνου στους ενήλικες, και 30-100 mg/kg σε παιδιά ανάλογα το βαθμό της ανεπάρκειας. Εναλλακτικά, μπορεί να χορηγηθεί κρουκαθίζημα που περιέχει 100-250 mg [21].

Όπως φαίνεται από τις δύο παραπάνω περιπτώσεις, τόσο στην ανεπάρκεια του παράγοντα VIII, όσο και στην ανεπάρκεια του ινωδογόνου, χορηγούνται μέσω

της ενδοφλέβιας οδού οι ελλείποντες παράγοντες, οι οποίοι αποτελούν προϊόντα της επεξεργασίας του πλάσματος. Για τον λόγο αυτό, για να διασφαλιστεί η ποιότητα, αλλά και η ασφάλεια των προϊόντων και κατά συνέπεια των ασθενών, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η απομάκρυνση των πιθανών μολυσματικών παραγόντων που μπορεί να περιέχονται στο πλάσμα. Οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι: η κατακρήμνιση με αλκοόλη, εφαρμόζεται στην αλβουμίνη και τις ανοσοσφαιρίνες, η θέρμανση σε υδατικό διάλυμα, για προϊόντα αλβουμίνης, θέρμανση λυοφιλοποιημένων προϊόντων, αδρανοποίηση με διαλύτη και απορρυπαντικό (η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά σε επόμενο κεφάλαιο) , με φιλτράρισμα των ιών, εφαρμόζεται σε προϊόντα με μεγάλο μοριακό βάρος και με μείωση του pH, για παράγωγα ανοσοσφαιρινών [22].

## 1.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Όπως γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό από τα παραπάνω, η PRT αποτελεί πλέον ένα σημαντικό κομμάτι της διαδικασίας παρασκευής προϊόντων του πλάσματος [3]. Διάφορες μέθοδοι αδρανοποίησης των παθογόνων έχουν αναπτυχθεί με στόχο την ελάττωση της μολυσματικότητας τους, με τις περισσότερες από τις οποίες να μπορούν να αδρανοποιήσουν και τα υπολειμματικά λευκά αιμοσφαίρια που ενδέχεται να παραμένουν μετά την επεξεργασία τους με φίλτρα λευκαφαίρεσης. Οι περισσότερες μέθοδοι αδρανοποίησης έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία στα αιμοπετάλια και το πλάσμα, ενώ έχουν γίνει αρκετές, ανεπιτυχείς όμως, προσπάθειες για εφαρμογή τους στα ερυθρά αιμοσφαίρια, εξαιτίας της αυξημένης ανοσογονικότητας που παρατηρήθηκε ή της καταστροφής των κυττάρων [23].

Η αδρανοποίηση στα προϊόντα πλάσματος προερχόμενα από δεξαμενές (pooled plasma products) έχει πρακτικά εξαλείψει τον κίνδυνο διασποράς των μεταδιδόμενων με το αίμα νοσημάτων λόγω των πολλών σταδίων επεξεργασίας και εξουδετέρωσης των παθογόνων παραγόντων [8]. Η αδρανοποίηση με διαλύτη και απορρυπαντικό (solvent/ detergent treatment), η οποία χρησιμοποιείται αποτελεσματικά στα προϊόντα κλασματοποίησης του πλάσματος, λύει τις κυτταρικές μεμβράνες, επομένως δεν μπορεί να εφαρμοσθεί στα έμμορφα συστατικά του αίματος [2, 8, 23]. Ωστόσο, και ο πιθανός εναπομείναν κίνδυνος μόλυνσης από

άγνωστους παράγοντες εξαιτίας της δεξαμενοποίησης υπερκαλύπτεται από την εξάλειψη του TRALI (Transfusion-related acute lung injury - Σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας σχετιζόμενο με μετάγγιση παραγώγων αίματος), την σημαντική μείωση αλλεργικών αντιδράσεων και την προτυποποίηση του παραγόμενου προϊόντος [8]. Η στοχοποίηση των νουκλεϊκών οξέων αποτελεί μια άλλη μέθοδο αδρανοποίησης του πλάσματος και ενδεχομένως τη μόνη πιθανή προσέγγιση αδρανοποίησης των κυτταρικών συστατικών του αίματος [2].

Η αδρανοποίηση με κυανό του μεθυλενίου (Methylene blue light treatment) έχει περιορισμένη εφαρμογή στην αδρανοποίηση του πλάσματος, διότι επηρεάζει τις πρωτεΐνες του πλάσματος περισσότερο. Η αδρανοποίηση με ψωραλένιο (Psoralen light treated plasma) ενδείκνυται για την αδρανοποίηση του πλάσματος, αλλά η εφαρμογή της στα ερυθρά αιμοσφαίρια παρουσιάζει προβλήματα, διότι μέρος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται, απορροφάται από την αιμοσφαιρίνη [23]. Πέραν όμως της μείωσης των παθογόνων, οι παραπάνω μέθοδοι καταλήγουν και σε μια μείωση της δράσης των παραγόντων πήξης [2].

Ωστόσο, καμία από τις παραπάνω διαδικασίες, δεν μπορεί να εφαρμοσθεί αποτελεσματικά στα έμμορφα στοιχεία του αίματος [3]. Για τα αιμοπετάλια, μόνο η αδρανοποίηση με ψωραλένιο και με ριβοφλαβίνη εφαρμόζονται. Και οι δύο μέθοδοι έχουν πιστοποίηση CE στην Ευρώπη, ενώ στην Αμερική έχουν εγκριθεί μόνο για κλινικές δοκιμές. Οι μέθοδοι επηρεάζουν την δράση των αιμοπεταλίων, αλλά έχουν ως αποτέλεσμα κλινικά αποδεκτά αιμοπετάλια με ελαφρώς μειωμένη ανταπόκριση στη μετάγγιση [2].

Η αδρανοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με τη μέθοδο FRALE (S-303) ή την INACTINE (PEN110) έχει οδηγήσει στο σχηματισμό αντισωμάτων έναντι των νέο-επιτόπων (neo-epitopes) στα ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ υπό μελέτη βρίσκεται η πολλά υποσχόμενη μέθοδος αδρανοποίησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων με ριβοφλαβίνη. Οι δύο πρώτες μέθοδοι έχουν εγκαταλειφθεί, λόγω των ανεπιθύμητων επιδράσεων που είχαν πάνω στα ερυθροκύτταρα [23].

Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να αποδειχθεί πως οι διάφορες μέθοδοι αδρανοποίησης δεν εισάγουν νέους κινδύνους για τους ασθενείς, για αυτό και απαιτούνται κλινικές και προκλινικές μελέτες στις Η.Π.Α. για να εγκριθεί μια τέτοια μέθοδος [3]. Οι τοξικολογικές εξετάσεις είναι σημαντικές, καθώς οι περισσότεροι



από αυτούς τους παράγοντες παρεμβάλλονται στο γενετικό υλικό, αυξάνοντας την θεωρητική πιθανότητα ανάπτυξης καρκινογένεσης και τερατογένεσης. Τα αδρανοποιημένα προϊόντα θα πρέπει να εξεταστούν για τον σχηματισμό νέων αντιγόνων (neoantigen formation) και για τον αντίκτυπο τους στην αποτελεσματικότητα του τελικού προϊόντος. Η τεκμηριωμένη μετάδοση νέων παθογόνων παραγόντων για τους οποίους δεν υπάρχουν εξετάσεις ελέγχου των δοτών, θα μπορούσε να επηρεάσει την σχέση κινδύνου – οφέλους των μεθόδων αδρανοποίησης. Δεν πρέπει να ξεχνιέται το γεγονός πως δεν αδρανοποιούνται όλοι οι παράγοντες σε όλες τις μεθόδους [3].

Οι μέθοδοι αδρανοποίησης θα πρέπει να απομακρύνουν ή να αδρανοποιούν όλους τους τύπους μικροοργανισμών, χωρίς να εισάγουν νέο-αντιγόνα ή να μειώνουν τη λειτουργία και τη διάρκεια ζωής των προϊόντων, ούτε να υπάρχουν τοξικά υπόλοιπα από την εφαρμογή τους ή προϊόντα αποικοδόμησης. Ο κίνδυνος των προϊόντων από τις μεθόδους αυτές πρέπει οπωσδήποτε να είναι μικρότερος από τον κίνδυνο των μεταδιδόμενων με την μετάγγιση νοσημάτων του αρχικού προϊόντος.

## **Σύγχρονες μέθοδοι**

### *1.2.1. Αδρανοποίηση με διαλύτη και απορρυπαντικό (Solvent/detergent treatment - SD)*

Η αδρανοποίηση με διαλύτη και απορρυπαντικό (SD) επιδρά στην λιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης των ελυτροφόρων ιών, των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων [2, 8, 24, 25]. Ο συνηθέστερος συνδυασμός είναι το 1% tri-(N-butyl)-phosphate (TNBP), ως οργανικός διαλύτης, και το 1% poly-oxyethylene-p-t-octylphenol (Triton X-100), ως απορρυπαντικό, με το TNBP να απομακρύνει τα λιπίδια από τις μεμβράνες, ενώ το Triton X-100 να σταθεροποιεί το TNBP και να διασπά τις λιπιδικές διπλοστοιβάδες για ευκολότερη απόσπασση των λιπιδίων [2]. Επειδή η αδρανοποίηση με SD αποσυνθέτει τις κυτταρικές μεμβράνες, δεν μπορεί να εφαρμοστεί για την αδρανοποίηση των έμμορφων συστατικών του αίματος. Ούτε το TNBP, ούτε και το Triton X-100 στοχεύουν ιδιαίτερα τις πρωτεΐνες. Η μέθοδος δεν αδρανοποιεί μη ελυτροφόρους

ιούς, επομένως σαν συμπληρωματικές μέθοδοι επεξεργασίας εφαρμόζονται το νανο-φιλτράρισμα (nano-filtration) και η αδρανοποίηση θερμότητας (heat treatment) [2]. Η ανησυχία για τους μη ελυτροφόρους ιούς, όπως είναι ο Παρβοϊός Β9 (Parvovirus B19) και ο ιός της ηπατίτιδας Α, περιορίζονται χάρη στον έλεγχο του αρχικού προϊόντος με τη μέθοδο NAT. Επιπλέον, με την προσθήκη της στήλης αφαίρεσης των prions (affinity ligand gel column, Octaplas LG®) κατά τη διαδικασία παραγωγής των αδρανοποιημένων πλάσμάτων, ελαττώνεται και η πιθανότητα μόλυνσης των τελικών προϊόντων με prions (vCJD) [8].

Τα αντιδραστήρια της SD μεθόδου, απομακρύνονται αποτελεσματικά με την υδρόφοβη χρωματογραφία, ενώ μόνο μη τοξικά ίχνη των αντιδραστηρίων παραμένουν στο τελικό προϊόν [2, 24].

#### ◆ SD παράγωγα αίματος

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αδρανοποίηση SD διασπά τις κυτταρικές μεμβράνες, επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για αδρανοποίηση του πλάσματος και των προϊόντων του. Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο αδρανοποίησης, καθώς 40-50 εκατομμύρια SD αδρανοποιημένα προϊόντα έχουν δοθεί έως τώρα χωρίς να έχει σημειωθεί μετάδοση ελυτροφόρων ιών [2].

Η SD αδρανοποίηση εφαρμόζεται τόσο σε ατομικές μονάδες πλάσματος (single donor unit plasma), όσο και σε δεξαμενοποιημένο πλάσμα.

Η αδρανοποίηση με διαλύτη και απορρυπαντικό είναι ήπια και αποφέρει έως και 90% ανάκτηση της λειτουργικότητας των παραγόντων πήξης (ινωδογόνο, FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI), των φυσικών ανασταλτών (πρωτεΐνη C και S και αντιθρομβίνη), της α2-αντιπλάσμινης, των ολικών πρωτεϊνών, αλβουμίνης και των γ-σφαιρινών [2, 24]. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν πως οι συγκεντρώσεις των TNBP και Triton X-45 είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές για την μείωση των ιών, των βακτηρίων και των εναπομεινάντων λευκών αιμοσφαιρίων στο πλάσμα, ωστόσο επιπλέον μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν για να επικυρωθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου [2].

Στην Ευρώπη περισσότερες από 5 εκατομμύρια μονάδες έχουν μεταγγιστεί, χωρίς καμία αναφορά για μετάδοση ιών ή TRALI. Επιπλέον, τα δεδομένα αιμοεπαγρύπνωσης αποδεικνύουν πως οι πυρετικές αλλεργικές ή αναφυλακτικές αντιδράσεις μειώθηκαν έως και 80% στα αδρανοποιημένα με SD προϊόντα [2].

### 1.2.2. Αδρανοποίηση με ψωραλένιο (*Psoralen light treatment*)

Οι φουροκουμαρίνες που περιλαμβάνουν τα ψωραλένια, είναι ενεργά στοιχεία που απομονώνονται από τα φυτά και είναι γνωστές ως φωτοδυναμικές ουσίες από τα αρχαία χρόνια [2, 8, 26]. Το υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο, γνωστό και ως S-59, διαπερνά αποτελεσματικά τις πλασματικές μεμβράνες, παρεμβάλλεται αντιστρεπτά (cross-linking) στην ελικοειδή περιοχή του μονόκλωνου ή του δίκλωνου DNA ή RNA και με την έκθεση στη UVA ακτινοβολία συνδέεται ομοιοπολικά με τις πυριμιδίνες. Έτσι, το 15% του αρχικού S-59 που προστέθηκε παραμένει συνδεδεμένο στο πλάσμα ακόμα και μετά την απομάκρυνση αυτού και των φωτοπαραγόνων του [2, 8, 24, 26].

Η αδρανοποίηση με το S-59 έχει αποδειχθεί πως αδρανοποιεί ένα ευρύ φάσμα ελυτροφόρων ιών, βακτηρίων, πρωτόζωων και εναπομεινάντων λευκών αιμοσφαιρίων [2]. Εφαρμόζεται για την αδρανοποίηση πλάσματος και αιμοπεταλίων, ενώ λόγω της ενεργοποίησης του S-59 από την UV-A ακτινοβολία, η οποία απορροφάται από την αιμοσφαιρίνη, η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να εφαρμοστεί στα ερυθρά αιμοσφαίρια [26].

#### ◆ PLT παράγωγα αίματος

Το σύστημα INTERCEPT που αναπτύχθηκε από τη Cerus χρησιμοποιεί το S-59, UVA ακτινοβολία, συσκευή για την απομάκρυνση του S-59 και μεταβολίτες[24]. Στην Ευρώπη το σύστημα κατέχει πιστοποίηση CE για τα αιμοπετάλια από το 2002 και για το πλάσμα από το 2006 [2]. Όμως, η χρήση του στις Η.Π.Α. και τον Καναδά είναι μόνο ερευνητική [8].

Τα αδρανοποιημένα με το σύστημα INTERCEPT αιμοπετάλια, παρουσιάζουν φυσιολογικές λειτουργίες, έπειτα από in vitro μελέτες [24, 25]. Εξαιτίας, όμως, της πολυπλοκότητας του συστήματος και της παρουσίας της UV ακτινοβολίας, ο αριθμός τους μπορεί να υποστεί μείωση έως 8-10% [24].

Μείωση της τάξεως του 17-30% σημειώνεται και στους παράγοντες πήξης, ενώ η δραστικότητα των ανασταλτών επηρεάζεται λιγότερο [2, 24].

Μετά την πιστοποίηση CE η μέθοδος εφαρμόζεται σε αρκετά νοσοκομεία. Αν και μέχρι στιγμής δεν έχει παρατηρηθεί σχηματισμός νέο-αντιγόνων, ούτε και τοξικολογικές επιδράσεις από την εφαρμογή της μεθόδου, περεταίρω μελέτες ίσως αποκαλύψουν τέτοιες επιδράσεις λόγω της σύνδεσης του S-59 με τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες [2].

### *1.2.3. Αδρανοποίηση με κυανό του μεθυλενίου (Methylene blue light treatment - MBLT)*

Το κυανό του Μεθυλενίου (MB) είναι μια ισχυρά κατιονική χρωστική που έχει υψηλή συγγένεια με τα αρνητικά φορτισμένα στοιχεία, όπως είναι π.χ. τα νουκλεϊκά οξέα. Όταν το MB ενεργοποιείται από το ορατό φως, μια φωτοδυναμική αντίδραση λαμβάνει χώρα παράγοντας ενώσεις ενεργού οξυγόνου, οι οποίες φωτο-οξειδώνουν τη γουανίνη καταστρέφοντας, κατά συνέπεια, το γενετικό υλικό. Η αδρανοποίηση με MB είναι αποτελεσματική στην περίπτωση των ελυτροφόρων ιών (π.χ. HIV και WNV) και ορισμένων μη ελυτροφόρων (Parvovirus B19) [24]. Λόγω της μικρής διεισδυτικότητας του στην κυτταρική μεμβράνη, η μέθοδος αυτή δεν αδρανοποιεί ενδοκυτταρικά παθογόνα, βακτήρια ή λευκά αιμοσφαίρια [24]. Η σύνδεσή του, όμως, με τις πρωτεΐνες, επηρεάζει την λειτουργικότητα των πρωτεϊνών αυτών και δεν θεωρείται κατάλληλη για κυτταρικά παράγωγα [2, 8].

#### ◆ MB προϊόντα

Η διαδικασία παραγωγής αδρανοποιημένου με κυανό του μεθυλενίου πλάσματος, κυκλοφορεί ως Theraflex MB-plasma System από την εταιρία

Macopharma. Η εταιρία αυτή, εισήγαγε φίλτρα λευκαφαίρεσης και απομάκρυνσης του εναπομείναντος κυανού του μεθυλενίου και των παραπροϊόντων του [8](Ανθή Γάφου, 2011). Έχει πιστοποίηση CE και εφαρμόζεται σε αρκετές Ευρωπαϊκές χώρες [2].

Ως προς την ποιότητα των αδρανοποιημένων με MB πλασμάτων, έχει παρατηρηθεί μείωση της δραστικότητας του ινωδογόνου κατά 20-25% [24], του παράγοντος V 4-32%, του παράγοντος VIII κατά 13-33%, του παράγοντος IX κατά 11-23% και του παράγοντος XI κατά 17-27% [2].

#### *1.2.4. Αδρανοποίηση με FRALE (Frangible Anchor Linker Effectors)*

Το S-303 είναι και αυτό ψωραλένιο και ανήκει στην ομάδα των FRALE, και δρα ως αλκυλιωτικός παράγων [8]. Παρεμβάλλεται μεταξύ των νουκλεϊκών οξέων των παθογόνων μέσω του δακτυλίου της ακριδίνης και δημιουργεί ομοιοπολικούς δεσμούς. Η αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή του pH και δεν επηρεάζεται από την ακτινοβολία [2, 8, 26].

Η μεθοδολογία αδρανοποίηση με το S-303 αναπτύχθηκε από την εταιρεία Cerus για την αδρανοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στην διαδικασία προστίθεται μια σύνθετη απορροφητική συσκευή (Compound absorbing device - CAD) που απομακρύνει το υπόλοιπο s-303 και τα αντιδραστήρια [2].

Το S-303 αδρανοποιεί ιούς, βακτήρια πρωτόζωα και λευκά αιμοσφαίρια, ενώ διατηρεί τις ιδιότητες των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε αποδεκτά επίπεδα. Εκτεταμένες τοξικολογικές μελέτες έδειξαν πως η μέθοδος είναι ασφαλής [2, 26].

#### ◆ FRALE παράγωγα αίματος

Η αδρανοποίηση με το FRALE έχει εφαρμοστεί στα ερυθροκύτταρα και το μοναδικό διαθέσιμο πρωτόκολλο είναι εκείνο του Cerus με το S-303.

Έπειτα από *in vivo* δοκιμασίες στις Η.Π.Α. παρατηρήθηκε σχηματισμός αντισωμάτων έναντι των αδρανοποιημένων με S-303 ερυθρών αιμοσφαιρίων, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί και αιμόλυση. Ο Solheim [2] περιγράφει πως ορισμένοι ασθενείς παρουσίασαν τέτοια αντισώματα πριν μεταγγισθούν με το S-303 RBCs, εξηγώντας έτσι το γεγονός πως το S-303 μπορεί να αλκυλιώσει τις πρωτεΐνες.

#### *1.2.5. Αδρανοποίηση με ριβοφλαβίνη (Riboflavin light treatment)*

Η Ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B2), γενικά χαρακτηρίζεται ως ασφαλής ουσία. Η ριβοφλαβίνη και τα φωτοπαράγωγά της είναι παρόντα σε μεγάλο εύρος τροφίμων και φυσικών προϊόντων, ενώ είναι ανιχνεύσιμα και στο αίμα.

Η ουσία αυτή έχει την ικανότητα να συνδέεται με τα νουκλεϊκά οξέα, έπειτα από φωτοενεργοποίηση με την ακτινοβολία UV, και να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και RNA οξειδώνοντας τη γουανίνη με αποτέλεσμα το σπάσιμο των αλυσίδων των νουκλεϊκών οξέων και κατά συνέπεια των μικροοργανισμών (Ανθή Γάφου, 2011) [2, 23-26]. Η αδρανοποίηση με ριβοφλαβίνη έχει αποδειχθεί αποτελεσματική έναντι μεγάλου αριθμού παθογόνων, όπως τα βακτήρια, οι ελυτροφόροι και ορισμένοι μη ελυτροφόροι ιοί, τα πρωτόζωα και τα λευκά αιμοσφαίρια.

#### ◆ RB παράγωγα αίματος

Η εταιρεία Terumo BCT έχει αναπτύξει το σύστημα Mirasol® για την αδρανοποίηση παθογόνων με ριβοφλαβίνη. Το σύστημα μοιάζει με το σύστημα INTERCEPT, εκτός από το γεγονός πως δεν απαιτείται απομάκρυνση των αντιδραστηρίων. Μέχρι στιγμής το σύστημα Mirasol® εφαρμόζεται για αδρανοποίηση των αιμοπεταλίων και του πλάσματος, ενώ η αδρανοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων βρίσκεται υπό ανάπτυξη [2].

Η αδρανοποίηση με το Mirasol είναι λιγότερο περίπλοκη σε σχέση με το INTERCEPT, εξαιτίας της μη απομάκρυνσης των αντιδραστηρίων. Παρόλα αυτά, και η μέθοδος αυτή οδηγεί σε αυξημένη ενεργότητα των αιμοπεταλίων, όπως αυτή

προκύπτει από την μέτρηση του P-selectin. Τα αδρανοποιημένα με το Mirasol αιμοπετάλια παρουσιάζουν επιπλέον και αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα. Ωστόσο, η λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων και in vitro ενεργότητα δεν επηρεάζονται [2, 24].

Οι πρωταρχικές μελέτες έδειξαν πως η ενεργότητα των πρωτεϊνών πήξης, επηρεάζεται σε αποδεκτό βαθμό από το σύστημα Mirasol® [24]. Οι προκλινικές μέθοδοι ήταν πολλά υποσχόμενες και μέχρι νεοτέρας δεν έχει παρατηρηθεί σχηματισμός νέο-αντιγόνων [2].

Όσον αφορά την αδρανοποίηση των ερυθροκυττάρων με ριβοφλαβίνη, η μεθοδολογία αυτή επιτρέπει την διατήρηση των επιπέδων του ATP στα RBCs σε αποδεκτά επίπεδα [27], αλλά η χρήση τους παραμένει ερευνητική.

Στην Ευρώπη η αδρανοποίηση με ριβοφλαβίνη έχει CE σφραγίδα ενώ στην Αμερική βρίσκεται στο στάδιο III της έρευνας. Μέχρι στιγμής, δεν έχουν παρατηρηθεί νέο-αντιγόνα [2].

Περισσότερες πληροφορίες για την μέθοδο περιγράφονται σε επόμενο κεφάλαιο.

Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας με τις ιδιότητες των προαναφερθεισών μεθόδων αδρανοποίησης. (Πίνακας 1).

<b>ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>SD</b>	<b>S-59</b>	<b>MB</b>	<b>S-303</b>	<b>RB</b>
<b>ΣΤΟΧΟΣ</b>	Λιπιδικές διπλοστιβάδες	Πυριμιδίνες	Γουανίνη	DNA	Γουανίνη
<b>ΕΦΑΡΜΟΓΗ</b>	Πλάσμα	Πλάσμα, Αιμοπετάλια	Πλάσμα	RBCs/ WB (ερευνητικό)	Πλάσμα, Αιμοπετάλια
<b>ΦΥΣΗ</b>	χημική	Φωτοδυναμική (UV 320-400nm)	Φωτοδυναμική (ορατό φως 620-670 nm)	Φωτοχημική	Φωτοδυναμική

<b>ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ</b>	TNBP +TritonX100	Υδροχλωρικό αμοτοσαλένιο, CAD)	MB, φίλτρο απομάκρυνσης		Ριβοφλαβίνη
<b>ΕΜΠΟΡΙΚΟ ΟΝΟΜΑ</b>	OctaplasLG® Octapharma	Cerus INTERCEPT Blood System	Theraflex MB Plasma System, MacoPharma	Cerus INTERCEPT Blood System	Mirasol® Pathogen Reduction System, TerumoBCT
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟ</b>	Ελυτροφόροι ιοί, Βακτήρια, Πρωτόζωα	Ιοί, βακτήρια, πρωτόζωα	Ελυτροφόροι ιοί, λίγοι με ελυτροφόροι, <i>Tr. cruzi</i>		Ιοί, βακτήρια, πρωτόζωα
<b>ΜΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟ</b>	Μη ελυτροφόροι ιοί, vCJD (προσθήκη στήλης συγγένειας)		Βακτήρια		
<b>ΑΡΝΗΤΙΚΑ</b>	Απομάκρυνση ουσίας, πολύπλοκη /πολυσταδιακή, ↓ παραγόντων πήξης	Απομάκρυνση ουσίας, ↓17- 30% παραγόντων πήξης, ↓8- 10% PLTs, πιθανός κίνδυνος μεταλλάξεων	Απομάκρυνση ουσίας, ↓10- 30% Παραγόντων πήξης, ↓ 20- 25% Ινωδογόνου, ↓δράσης PLTs, ασαφές τοξικό προφίλ		↓ παραγόντων πήξης

**Πίνακας 1:** Σύγκριση των χαρακτηριστικών των μεθόδων αδρανοποίησης.



### 1.3. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Λαμβάνοντας υπόψη όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, και την αναγκαιότητα της παρασκευής ασφαλών και ποιοτικών παραγώγων αίματος, ο σκοπός πραγματοποίησης της συγκεκριμένης έρευνας ήταν η μελέτη των αδραντοποιημένων με ριβοφλαβίνη πλάσμάτων (σύστημα Mirasol® της Terumo BCT) ως προς την αποτελεσματικότητά της έναντι των υπολειπόμενων λευκών αιμοσφαιρίων, καθώς και η διερεύνηση του βαθμού με τον οποίο επηρεάζονται οι παράγοντες πήξεως και συγκεκριμένα το ινωδογόνο και ο αντισταθμιστικός παράγων A (παράγων VIII) σε φρέσκα κατεψυγμένα πλάσματα που προορίζονται για μετάγγιση.

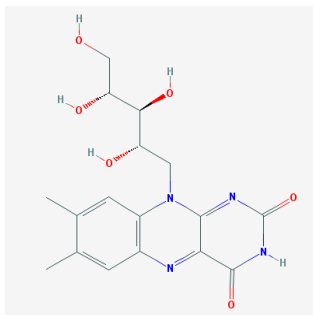
Οι αδραντοποιήσεις, καθώς και όλες οι περαιτέρω μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα εργαστήρια Αιμοδοσία του 2<sup>ου</sup> Περιφερειακού Κέντρου Αιμοδοσίας του Γ.Ν.Α. «Λαϊκό».

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η γενικότερη αρχή της αδρανοποίησης των παθογόνων με ριβοφλαβίνη στηρίζεται στη φωτοδυναμική ιδιότητα της ριβοφλαβίνης, δηλαδή στην ικανότητά της να αντιδρά και να προκαλεί μη αντιστρεπτή μεταβολή στα νουκλεϊκά οξέα μετά την έκθεση της στην UV ακτινοβολία. Η ριβοφλαβίνη που προστίθεται στο πλάσμα δεν λειτουργεί ως φαρμακευτικό προϊόν και κατά συνέπεια, δεν στοχεύει στην επίτευξη ενός φαρμακολογικού αποτελέσματος με την εισαγωγή των αδρανοποιημένων προϊόντων στον οργανισμό [28].

#### 2.1.1. Η ριβοφλαβίνη



**Εικόνα 1:** Μοριακή δομή ριβοφλαβίνης [29]

Η ριβοφλαβίνη, γνωστή και ως βιταμίνη B2 του συμπλέγματος βιταμινών B, είναι ένα απαραίτητο για τον οργανισμό θρεπτικό συστατικό που συναντάται σε διάφορες τροφές όπως τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα αυγά, τα όσπρια, το άπαχο κρέας, το ψωμί και τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά [30]. Είναι ουσία εγκεκριμένη από την Ευρωπαϊκή Επιστημονική Επιτροπή Τροφίμων (European Scientific Committee on Food) ενώ χαρακτηρίζεται ως «Ασφαλής» (GRAS – Generally Recognized as Safe) από τον FDA (Food and Drug Administration) [31]. Η Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη (Σ.Η.Π.) της στους ενήλικες, φτάνει το 1,3 mg/ημέρα για τους άνδρες και το 1,1 mg/ημέρα για τις γυναίκες, ενώ αγγίζει το 1,6 mg/ημέρα για τις θηλάζουσες γυναίκες [32]. Σε περίπτωση ανεπάρκειας στη ριβοφλαβίνη, η συνιστώμενη θεραπευτική δόση της είναι  $\leq 30$  mg/ημέρα για τους ενήλικες. Η ασφάλεια της

ριβοφλαβίνης είναι αποδεδειγμένη για χορήγησή της από του στόματος (per os), υποδόρια, ενδοπεριτοναϊκά και ενδοφλέβια (TerumoBCT, 2008) [1, 28].

Ο ρόλος της ριβοφλαβίνης είναι πολλαπλός για τον ανθρώπινο οργανισμό καθώς αποτελεί πρόδρομη ένωση σημαντικών συνενζύμων (FMN και FAD) που συμμετέχουν σε βιοχημικές διεργασίες οξειδοαναγωγής και παραγωγής ενέργειας μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας [32]. Η φωτοδυναμική της ιδιότητα ανακαλύφθηκε το 1932 από τους Warburg και Christian [28] ενώ το 1976 ο Speck με την επιστημονική του ομάδα πρότειναν τη χρήση της ως φωτο-ευαισθητοποιητή των νουκλεϊκών οξέων. Με τις μελέτες που επακολούθησαν, αποδείχθηκε η ικανότητα της ριβοφλαβίνης να καταστρέφει τους παθογόνους μικροοργανισμούς, η αποτελεσματικότητά της ως φωτο-ευαισθητοποιητής και η δυνατότητά της να παρεμβάλλεται στους δεσμούς των νουκλεϊκών οξέων παρουσία ακτινοβολίας.

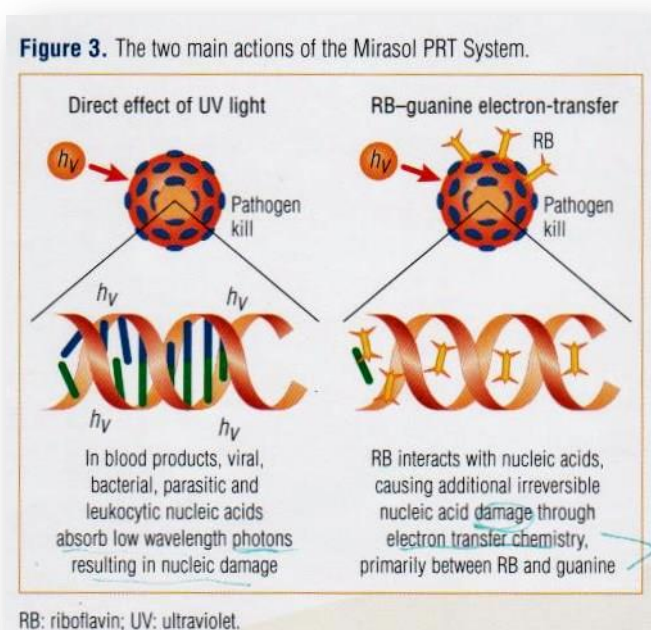
Με την έκθεση των προϊόντων που περιέχουν ριβοφλαβίνη στο φως του ηλίου, η ριβοφλαβίνη μετατρέπεται στα τέσσερα κύρια φωτο-προϊόντα της (2'-κετοφλαβίνη, 4'-κετοφλαβίνη, formylmethylflavin και LC), τα οποία αποτελούν και φυσικά προϊόντα του καταβολισμού της, με το καθένα από αυτά να έχει ανιχνευτεί και σε μη αδρανοποιημένα αιμοπετάλια. Η παρουσία των μεταβολιτών αυτών στα μη αδρανοποιημένα παράγωγα αίματος αποδεικνύει πως η PRT με ριβοφλαβίνη δεν εισάγει στον οργανισμό νέες χημικές ουσίες [1, 28].

Όσον αφορά την ασφάλεια και την χαμηλή τοξικότητα [28] της χρήσης της ριβοφλαβίνης για την αδρανοποίηση των παθογόνων, ως χαρακτηριστικό παράδειγμα αναφέρεται η χρήση συμπληρωμάτων της για την θεραπεία του νεογνικού ίκτερου, διότι το υπεριώδες φως που χρησιμοποιείται για την μετατροπή της χολερυθρίνης σε υδατοδιαλυτά ισομερή της [33] επιδρά ομοίως και στην φυσιολογικά παραγόμενη ριβοφλαβίνη. Δεν έχουν αναφερθεί δυσμενείς επιπτώσεις από την χρήση της σε κλινικό επίπεδο [28].

### *2.1.2. Η δράση της ριβοφλαβίνης*

Η διάσπαση των νουκλεϊκών οξέων από τη ριβοφλαβίνη και την UV ακτινοβολία επιτυγχάνεται με δύο κύριους και ανεξάρτητους μηχανισμούς. Ο ένας σχετίζεται με το αποτέλεσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας και μόνο, ενώ ο δεύτερος με την μεταφορά ηλεκτρονίων από την άμεση αλληλεπίδραση της φωτοδιεγερμένης

ριβοφλαβίνης με τις βάσεις των νουκλεϊκών οξέων [28]. Πιθανός είναι και ο σχηματισμός των ενώσεων ενεργού οξυγόνου από την έκθεση της ριβοφλαβίνης στην ακτινοβολία. Πρόκειται όμως για μια ειδική αντίδραση. Με το σύστημα Mirasol® η παραπάνω αντίδραση μπορεί να αποφευχθεί αφενός με την εκτόνωση του αέρα από τους ασκούς πριν την αδρανοποίηση, αφετέρου με την επιλογή κατάλληλου μήκους κύματος που επιλεκτικά ενεργοποιεί τη δεσμευμένη ριβοφλαβίνη παρά την ελεύθερη [28].



**Εικόνα 2:** Μηχανισμοί δράσης της ριβοφλαβίνης. Ανατύπωση από: Terumo BCT[28].

Η παρουσία της ριβοφλαβίνης έχει ως αποτέλεσμα μη αντιστρεπτές μεταβολές στους δεσμούς μεταξύ των αζωτούχων βάσεων των νουκλεϊκών οξέων (κυρίως σε εκείνους της γουανίνης), και κατά συνέπεια αποτρέπει την αναπαραγωγή των παθογόνων. Στην πραγματικότητα, με την παρουσία της ριβοφλαβίνης ενισχύεται η δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας, καθιστώντας με τον τρόπο αυτό, πιο ευαίσθητους τους μικροοργανισμούς στην UV ακτινοβολία («the photosensitization effect») [28]. Το φαινόμενο αυτό προκαλεί περισσότερες βλάβες απ' ό τι η UV ακτινοβολία μόνη της, με τις βλάβες που δημιουργούνται να είναι μη αντιστρεπτές. Σε αντίθεση με την χρήση της UV ακτινοβολίας μόνο, όπου οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA είναι δυνατόν να αναστρέψουν ορισμένη από

την βλάβη που προκλήθηκε, εξουδετερώνοντας το αποτέλεσμα. Το σύστημα Mirasol εκμεταλλεύεται τον συνδυασμό των δύο μηχανισμών για την επίτευξη ευρέως και εκτεταμένου βαθμού αδρανοποίησης.

## 2.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

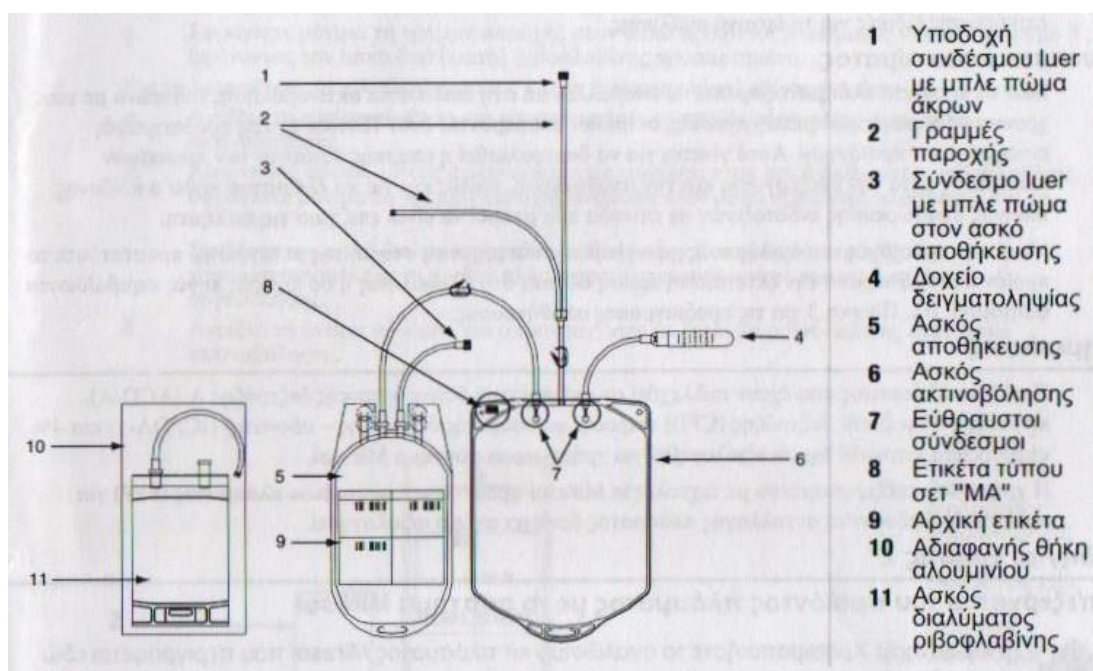
Για την διεξαγωγή της μελέτης, χρησιμοποιήθηκε φρέσκο καταψυγμένο πλάσμα (FFP), από ολικό αίμα όλων των ομάδων (A, B, AB, O) σύμφωνα με τις ακριβείς οδηγίες χρήσης που αναφέρει η Terumo BCT: *«Το πλάσμα που προέρχεται από ολικό αίμα θα πρέπει να υποβάλλεται σε επεξεργασία και να καταψύχεται σε θερμοκρασία  $-30^{\circ}\text{C}$  εντός 6 ωρών από το διαχωρισμό. Το πλάσμα μπορεί να αποθηκευτεί σε μορφή ολικού αίματος στους  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  ή  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  έως και 18 ώρες πριν από το διαχωρισμό»*. Στην διαδικασία αδρανοποίησης με το σύστημα Mirasol υποβλήθηκαν 30 ασκοί FFP από διπλής φυγοκέντρωσης ολικό αίμα. Ο αρχικός όγκος των ασκών, σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο Χρήσης του Συστήματος Mirasol* ήταν εντός του εύρους των 170-360mL. Σε καθέναν από τους 30 ασκούς FFP λήφθηκαν 3 δείγματα από 3 στάδια της διαδικασίας. Πριν την αδρανοποίηση των FFPs λήφθηκε δείγμα από τον αρχικό ασκό (ΠΡΟ), μετά την προσθήκη της ριβοφλαβίνης και πριν την αδρανοποίηση λήφθηκε το ενδιάμεσο δείγμα (ΕΝΔ), και το τελικό δείγμα λήφθηκε μετά την ολοκλήρωση τη αδρανοποίησης (ΜΕΤΑ). Τα δείγματα αυτά υποβλήθηκαν σε 3 διαδικασίες για τον υπολογισμό των υπολειμματικών λευκών αιμοσφαιρίων και των παραγόντων πήξης (Ινωδογόνο και FVIII):

1. Αναλυτής αίματος: Στα δείγματα (ΠΡΟ) και (ΜΕΤΑ): Μέτρηση WBCs
2. Κυτταρομετρία ροής: Στα δείγματα (ΠΡΟ) και (ΜΕΤΑ): Μέτρηση WBCs
3. Πηξιολογική μέθοδος: Στα δείγματα (ΠΡΟ), (ΕΝΔ) και (ΜΕΤΑ): Υπολογισμός ινωδογόνου και FVIII.

### 2.2.1. Επεξεργασία του δείγματος

Το αναλώσιμο κιτ πλάσματος για το σύστημα Mirasol περιλαμβάνει:

1. Υποδοχή luer συνδέσμου με μπλε πώμα.
2. Γραμμές παροχής.
3. Luer σύνδεσμο με μπλε πώμα στον ασκό αποθήκευσης.
4. Δοχείο δειγματοληψίας.
5. Ασκό αποθήκευσης.
6. Ασκό ακτινοβόλησης.
7. Ευθραύστους συνδέσμους στον ασκό ακτινοβόλησης.
8. Ετικέτα με γραμμωτό κώδικα διάκρισης τύπου προϊόντος (πλάσμα ή αιμοπετάλια) ("MA" set type label)
9. Ετικέτα στον ασκό αποθήκευσης
10. Θήκη αλουμινίου
11. Ασκός διαλύματος ριβοφλαβίνης
12. Σφιγκτήρες



**Εικόνα 3:** Αναλώσιμο κιτ Mirasol. (Εγχειρίδιο χρήσης Συστήματος Mirasol. Ανατύπωση από: Terumo BCT.

#### Στάδια διαδικασίας:

- 1) Έλεγχος του αρχικού ασκού πλάσματος αν πληροί τις προδιαγραφές χρόνου και όγκου, καθώς και επισκόπηση της ποιότητας το προϊόντος.
- 2) Άνοιγμα της συσκευασίας του αναλώσιμου κιτ, αφαίρεση του σετ ακτινοβόλησης και επισκόπηση του για τυχόν αλλοιώσεις.
- 3) Μόνιμο σφράγισμα και αποκοπή της γραμμής με τον σύνδεσμο luer με το μπλε πώμα από τον ασκό αποθήκευσης.
- 4) Με την χρήση του TSCD® II Sterile Tubing Welder, συσκευή στείρας συγκόλλησης, πραγματοποιείται σύνδεση του αρχικού ασκού με τη γραμμή luer με το μπλε πώμα του ασκού ακτινοβόλησης. Απόρριψη του συνδέσμου και φύλαξη της γραμμής από τον αρχικό ασκό που περιέχει δείγμα (ΠΡΟ).
- 5) Σήμανση του ασκού αποθήκευσης με τα στοιχεία του προϊόντος (γραμμωτός κώδικας, ομάδα αίματος, ημερομηνία παραγωγής προϊόντος).
- 6) Άνοιγμα θήκης αλουμινίου, αφαίρεση ασκού με το διάλυμα ριβοφλαβίνης και επισκόπηση του για πιθανές αλλοιώσεις.
- 7) Άσηπτη συγκόλληση ασκού διαλύματος ριβοφλαβίνης με την δεύτερη γραμμή παροχής του ασκού ακτινοβόλησης. Ταυτόχρονη μεταφορά του διαλύματος ριβοφλαβίνης και του αρχικού προϊόντος πλάσματος στον ασκό ακτινοβόλησης.

**Σημείωση:** Η μεταφορά του διαλύματος ριβοφλαβίνης και του αρχικού προϊόντος πλάσματος μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονα ή να μεταφερθούν ένα ένα.

- 8) Εκτόνωση του συσσωρευμένου αέρα από τον ασκό ακτινοβόλησης στον ασκό του διαλύματος ριβοφλαβίνης ή τον αρχικό ασκό πλάσματος. Κλείσιμο του σφιγκτήρα στη γραμμή παροχής.
- 9) Μόνιμη σφράγιση και απόρριψη του ασκού της ριβοφλαβίνης και του αρχικού ασκού. Μόνιμη σφράγιση της γραμμής παροχής κατά το δυνατόν πιο κοντά στον ασκό ακτινοβόλησης, χωρίς ωστόσο να είναι μικρότερη από 2,5 cm για καλύτερη εφαρμογή στην συσκευή ακτινοβόλησης.

**Σημείωση:** Ο ασκός της ριβοφλαβίνης σφραγίζεται μόνιμα περιέχοντας ελάχιστη ποσότητα αρχικού προϊόντος αναμεμιγμένου με ριβοφλαβίνη και φυλάσσεται το περιεχόμενό του ως δείγμα (ΕΝΔ) προτού απορριφθεί.

- 10) Τοποθέτηση του ασκού ακτινοβόλησης στην συσκευή ακτινοβόλησης σύμφωνα με τις οδηγίες του *Εγχειριδίου χρήσης της συσκευής*

ακτινοβόλησης *Mirasol*. Η διαδικασία της ακτινοβόλησης ολοκληρώνεται σε 4-6 λεπτά ανάλογα τον όγκο του πλάσματος.

- 11) Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, λαμβάνεται δείγμα από το αδρανοποιημένο πλάσμα (META) καταστρέφοντας τον εύθραυστο σύνδεσμο στον ασκό της ακτινοβόλησης. Μετά την πλήρωση του δοχείου δειγματοληψίας, σφραγίζεται μόνιμα η γραμμή και απομακρύνεται από τον ασκό.
- 12) Μεταφορά του αδρανοποιημένου προϊόντος στον ασκό αποθήκευσης ανοίγοντας τον σφιγκτήρα και σπάζοντας τον δεύτερο εύθραυστο σύνδεσμο στον ασκό ακτινοβόλησης.
- 13) Μετά την πλήρη αποστράγγιση του προϊόντος στον ασκό αποθήκευσης εκτονώνεται ο υπολειπόμενος αέρας προς τον ασκό της ακτινοβόλησης. Μόνιμη σφράγιση της γραμμής παροχής του ασκού αποθήκευσης κατά το δυνατόν πιο κοντά στον ασκό αποθήκευσης. Αποσύνδεση και απόρριψη του ασκού ακτινοβόλησης.
- 14) Σήμανση του αδρανοποιημένου πλάσματος με την ετικέτα επιβεβαίωσης επιτυχούς ολοκλήρωσης της αδρανοποίησης.
- 15) Το αδρανοποιημένο προϊόν είναι διαθέσιμο για άμεση μετάγγιση σε ασθενή ή αποθήκευση σε θερμοκρασία  $\leq -30^{\circ}\text{C}$  για έως και 2 χρόνια από την ημέρα συλλογής.

**Σημείωση 1:** Μέχρι τη στιγμή της μετάγγισης το αδρανοποιημένο προϊόν φυλάσσεται σε σκιερό μέρος χωρίς να έρχεται σε άμεση επαφή με το ηλιακό φως ή πηγές έντονου φωτισμού.

**Σημείωση 2:** Στο Εγχειρίδιο Χρήσης του Συστήματος *Mirasol* της *Terumo BCT* για χρήση κατεψυγμένου αδρανοποιημένου FFP αναφέρεται πως «Το επεξεργασμένο με τεχνολογία *Mirasol* φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα (FFP) πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την απόψυξη και είναι εγκεκριμένο για χρήση για έως και 6 ώρες μετά την απόψυξη.»

Τα δείγματα που έχουν φυλαχθεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας (ΠΡΟ), (ΕΝΔ) και (META) μεταφέρονται σε επισημασμένα με τον κωδικό του ασκού του αρχικού προϊόντος και το είδος του δείγματος [(ΠΡΟ), (ΕΝΔ) ή (META)] σωληνάρια *erpendorf*, αντιστοίχως. Για κάθε ένα δείγμα που ακτινοβολείται λαμβάνονται συνολικά 6 δείγματα, εκ των οποίων: 1 δείγμα (ΠΡΟ), 1 (ΕΝΔ) και 2 (META) φυλάσσονται στην κατάψυξη στις ίδιες συνθήκες που φυλάσσεται ο ασκός



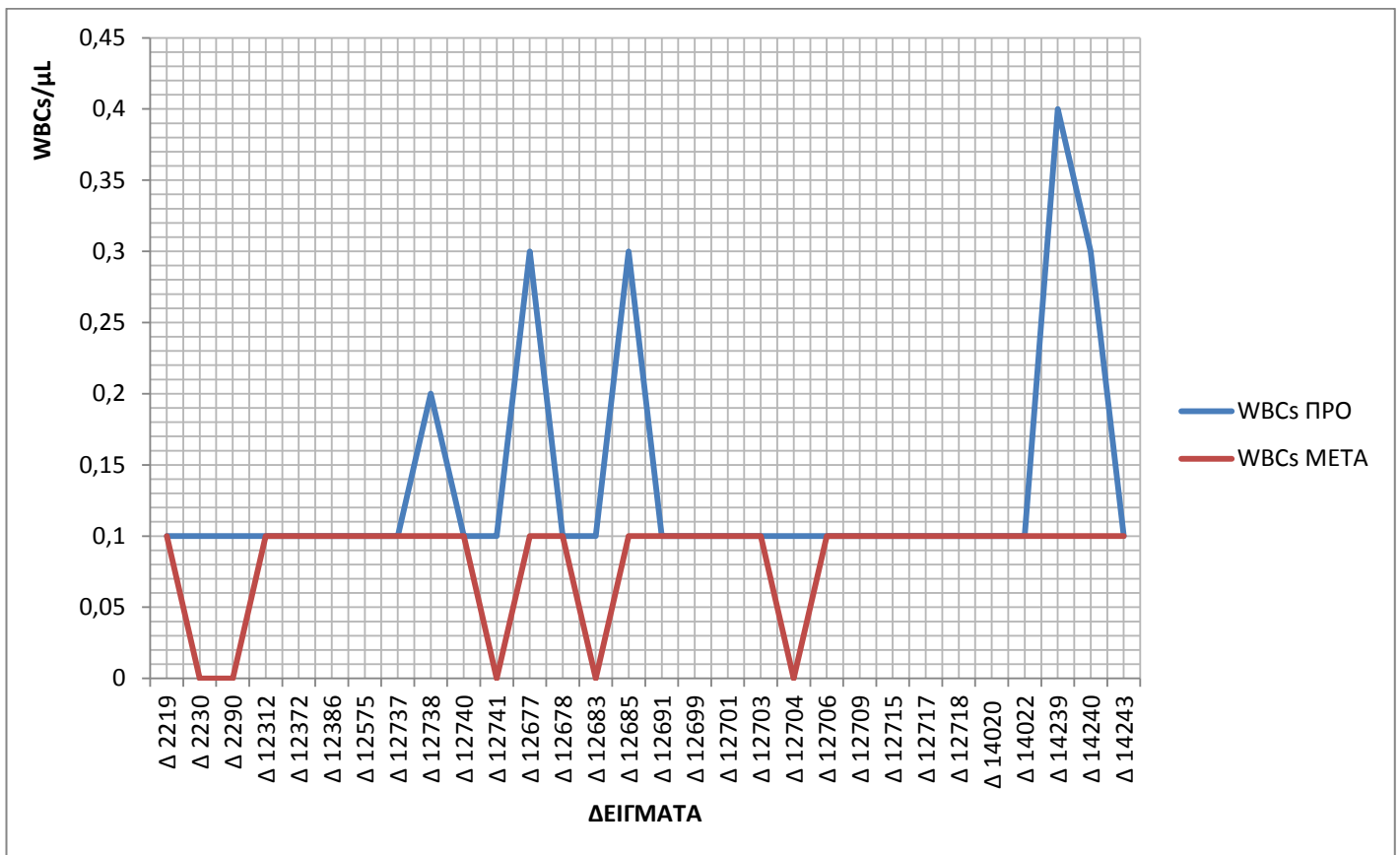
αποθήκευσης (βλ. στάδιο 15) για μέτρηση των παραγόντων πήξης, ενώ 1 (ΠΡΟ) και 1 (ΜΕΤΑ) φυλάχθηκαν στους  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  για έως και 7 ημέρες από την ημέρα αδρανοποίησης για μέτρηση των υπολειπόμενων WBCs με αναλυτή αίματος και κυτταρομετρία ροής.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΩΝ ΛΕΥΚΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΩΝ

#### 3.1.1. Αιματολογικός αναλυτής

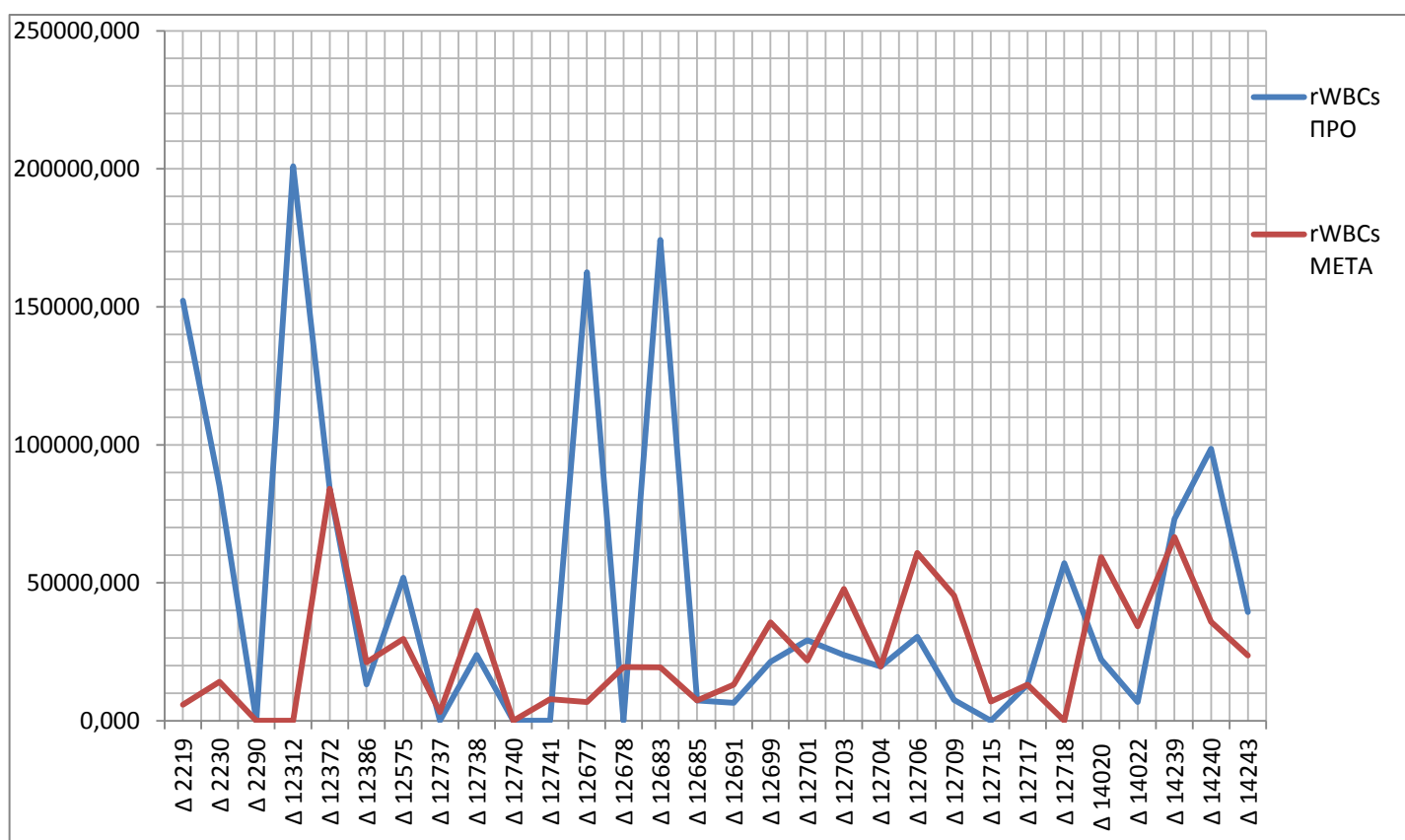
Με την μέτρηση των δειγμάτων (ΠΡΟ) και (ΜΕΤΑ) για κάθε ασκό με τον αναλυτή αίματος, όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 1), προέκυψε πως στο σύνολο των 30 ασκών FFP, το 66,6% των δειγμάτων (n=20), οι τιμές των λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs/μL) των (ΠΡΟ) και (ΜΕΤΑ) δεν παρουσιάζουν διαφορά (0,1/μL), ενώ μείωση παρατηρήθηκε στο 33,3% (n=10) των δειγμάτων, από το οποίο, το 50% (n=5) έδειξε απουσία λευκών αιμοσφαιρίων (0,0/μL).



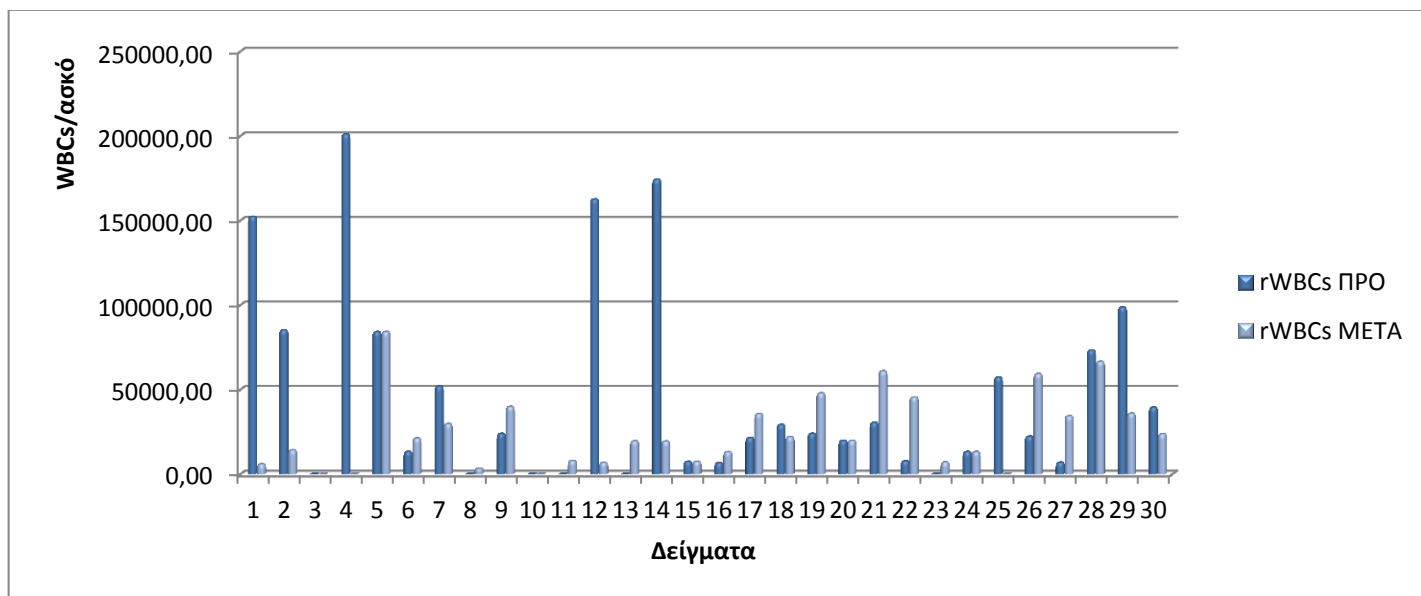
Σχήμα 1: Διάγραμμα τιμών WBCs/μL πριν και μετά την αδρανοποίηση.

### 3.1.2. Κυτταρομετρία ροής

Επειδή η γενική αίματος, αν και έδωσε μια ενδεικτική εικόνα του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων, υστερεί σε ευαισθησία όσον αφορά τον υπολογισμό του απόλυτου αριθμού των κυττάρων, ακολούθησε η μέτρηση των λευκών αιμοσφαιρίων στα ίδια δείγματα, (ΠΡΟ) και (ΜΕΤΑ), με κυτταρομετρία ροής (κυτταρομετρητής ροής *PARTEC CyFlow® SL* με λογισμικό *Partec FloMax® Report*) με τη βοήθεια *DNA marker (Cytognos Leucofinder™)*. Τα αποτελέσματα από τη συγκεκριμένη μέθοδο ήταν παρεμφερή με εκείνη της γενικής αίματος. Συγκεκριμένα, στα δείγματα (ΜΕΤΑ) παρατηρήθηκε μείωση της τιμής των λευκών αιμοσφαιρίων στο 30% (n=9) των δειγμάτων, ίδια τιμή πριν και μετά την αδρανοποίηση στο 13,3% (n=4), στο 13,3% (n=4) η τιμή των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν 0/ασκό FFP, ενώ αύξηση παρατηρήθηκε στο 43,3% (n=13) των δειγμάτων. Η διακύμανση των τιμών φαίνεται στο [Σχήμα 2](#) και στο [Σχήμα 3](#).

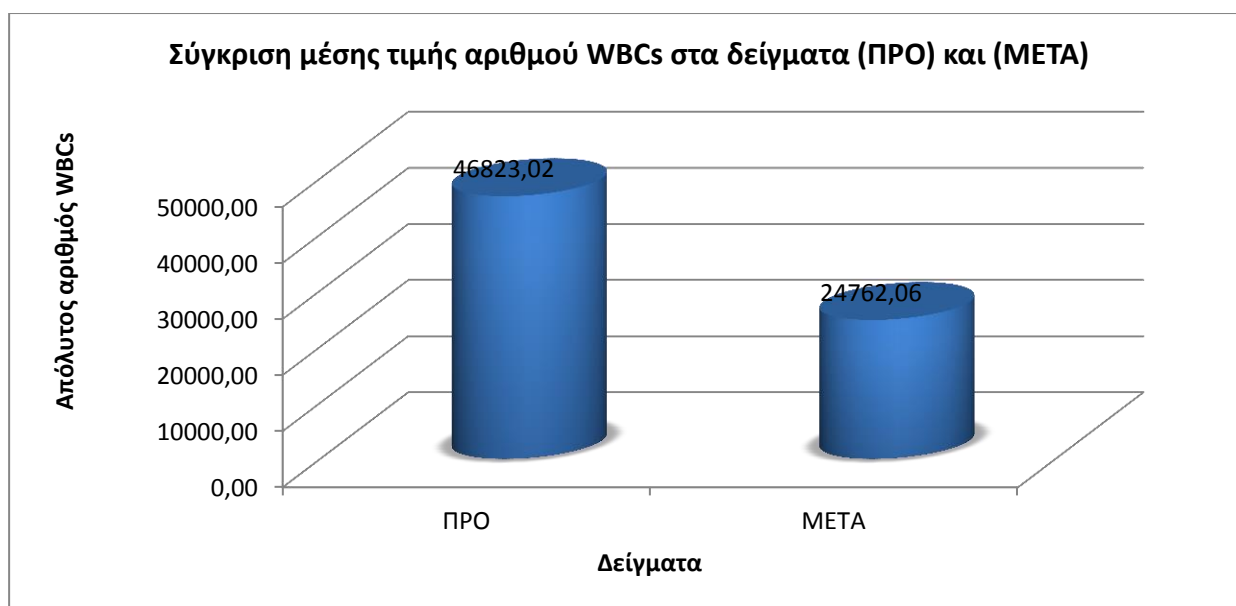


**Σχήμα 2:** Διάγραμμα τιμών WBCs/ασκό πριν και μετά την αδρανοποίηση.



**Σχήμα 3:** Διάγραμμα τιμών WBCs/ασκό πριν και μετά την αδρανοποίηση.

Με τον υπολογισμό του μέσου όρου των τιμών των λευκών αιμοσφαιρίων στο σύνολο των 30 ασκών, η εικόνα διαφοροποιήθηκε λίγο: η μέση τιμή προ αδρανοποίησης είναι κατά απόλυτη τιμή 46823,0 WBCs/ασκό και 24762,059 WBCs/ασκό μετά αδρανοποίησης (Σχήμα 4), με την συνολική μείωση στον απόλυτο αριθμό τους να ανέρχεται στο 47,11%.



**Σχήμα 4:** Διάγραμμα μέσης τιμής WBCs/ασκό πριν & μετά την αδρανοποίηση.

### 3.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΗΞΗΣ

Έπειτα από τη μέτρηση του παράγοντα VIII και του ινωδογόνου με πηξιολογική μέθοδο (*STAGO STA-R Evolution® Expert Series*), παρατηρήθηκε, όπως ήταν άλλωστε αναμενόμενο, μείωση στις τιμές των παραγόντων αυτών μετά την αδρανοποίηση των πλασμάτων με ριβοφλαβίνη σε σχέση με τις αρχικές, πριν την αδρανοποίηση, τιμές τους. Κατά μέσο όρο η μείωση στο σύνολο των αδρανοποιημένων ασκών αγγίζει το 44,19% για τον FVIII και το 38,48% για το ινωδογόνο.

Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει η μείωση των τιμών των δύο παραγόντων μεταξύ των δειγμάτων (ΕΝΔ) και (ΜΕΤΑ), με μέση τιμή μείωσης 13,36% και 18,18%, για τον FVIII και το ινωδογόνο αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές είναι πιθανώς ποιοτικά σωστότερες, καθώς τα δείγματα (ΜΕΤΑ) έχουν υποστεί την ίδια αραίωση μετά την προσθήκη της ριβοφλαβίνης με τα δείγματα (ΕΝΔ), σε αντίθεση με τα προ αδρανοποίησης δείγματα, όπου οι παράγοντες πήξης δεν περιελάμβαναν ριβοφλαβίνη. Τα επίπεδα των δειγμάτων και η μείωση τους μετά της αδρανοποίηση φαίνονται στον Πίνακα 1.

ΠΑΡΑΓΩΝ	(ΠΡΟ)	(ΕΝΔ)	(ΜΕΤΑ)	ΜΕΙΩΣΗ (Π-Μ)	ΜΕΙΩΣΗ (Ε-Μ)
VIII (%)	46,90±15,87	27,17±13,56	25,80±10,71	44,89%	13,36%
ΙΝΩΔΟΓΟΝΟ (mg/dL)	208,03±38,72	149,13±39,61	127±27,47	38,48%	11,61%

**Πίνακας 2:** Μέση τιμή και τυπική απόκλιση για τα δείγματα (ΠΡΟ), (ΕΝΔ), (ΜΕΤΑ) για τον FVIII και το Ινωδογόνο. Μείωση (Μ.Ο.) των επιπέδων των δύο παραγόντων μεταξύ των δειγμάτων (ΠΡΟ)-(ΜΕΤΑ) και (ΕΝΔ)-(ΜΕΤΑ)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι διάφορες μέθοδοι αδρανοποίησης έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές, σε διαφορετικό βαθμό η κάθε μια, στην μείωση των παθογόνων παραγόντων (ιών, βακτηρίων, πρωτόζωων), καθώς και των λευκών αιμοσφαιρίων σε προϊόντα πλάσματος και των αιμοπεταλίων. Ωστόσο, όλες τους έχουν την αδυναμία να μειώνουν, αν και παραμένουν σε αποδεκτά πλαίσια, τα ποσοστά των παραγόντων πήξης στα αδρανοποιημένα παράγωγα του αίματος.

Στην συγκεκριμένη μελέτη, έγινε μια προσπάθεια διερεύνησης και αξιολόγησης της ποιότητας του φρέσκου κατεψυγμένου πλάσματος μετά από την αδρανοποίηση του με το σύστημα Mirasol®, ως προς τον αριθμό των υπολειπόμενων λευκών αιμοσφαιρίων και το ποσοστό μείωσης του αντιαιμορροφιλικού παράγοντα (FVIII) και του ινωδογόνου.

Τόσο ο αιματολογικός αναλυτής, όσο η κυτταρομετρίας ροής για τον υπολογισμό των υπολειμματικών λευκών αιμοσφαιρίων, παρουσίασαν μια μείωση στον αριθμό τους μετά την αδρανοποίηση, της τάξεως του 33,3% και 47,11%, αντιστοίχως. Η μείωση αυτή, ήταν ελάχιστος σημασίας ωστόσο. Ο συνδυασμός της ριβοφλαβίνης με την UV ακτινοβολία επιδρούν στο DNA των κυττάρων καθιστώντας τα μη λειτουργικά. Επομένως, μετά την καταστροφή του γενετικού τους υλικού, τα λευκοκύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση, σε ταχύτερο, όπως παρατήρησε η Jackman και οι συνεργάτες της [34] ρυθμό, σε σχέση με τα μη αδρανοποιημένα λευκοκύτταρα. Συγκεκριμένα αναφέρεται πως μετά από 72 ώρες παρακολούθησης της κινητικής του κυτταρικού θανάτου, σχεδόν όλα τα κύτταρα είναι νεκρά μετά το πέρας των 48ωρών [34]. Επιπλέον, στα τελικά στάδια της απόπτωσης, το κύτταρο διασπάται στα αποπτωτικά σωμάτια, τα οποία είναι δυνατό να ανιχνευθούν από τον κυτταρομετρητή ροής [35, 36]. Έτσι πιθανολογείται και η αύξηση στο 43,3% των (META) δειγμάτων σε σχέση με τα (ΠΡΟ), όπως αυτό προέκυψε από την κυτταρομετρία ροής, ενώ ο σταθερός αριθμός των WBCs στο 13,3% των δειγμάτων (META) δεν αποδεικνύει ότι τα κύτταρα αυτά δεν έχουν ήδη εισέλθει στον αποπτωτικό τους κύκλο.

Οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η αδρανοποίηση των παθογόνων και των WBCs, είναι μεταξύ άλλων η ένταση και η διάρκεια της ακτινοβολήσης, όπως και ο τύπος των κυττάρων που υπόκεινται σε αδρανοποίηση. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται πως αυτό που είναι χρήσιμο να μετρηθεί, είναι η

ενεργότητα των κυττάρων και ο βαθμός στον οποίο εκείνα παραμένουν λειτουργικά και ικανά πρόκλησης ανοσολογικής αντίδρασης. Ο αριθμός των υπολειπόμενων λευκών αιμοσφαιρίων δεν είναι ενδεικτικός των παραπάνω και για το λόγο αυτό οι περισσότερες έρευνες πάνω στο αντικείμενο δεν εστιάζονται σε αυτόν.

Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως στο *Εγχειρίδιο Χρήσης του Συστήματος Mirasol*, ο ελάχιστος αριθμός των υπολειπόμενων λευκών αιμοσφαιρίων πρέπει είναι  $<1 \times 10^9/L$  φρέσκου κατεψυγμένου πλάσματος, με τον μέσο όρο των τιμών των λευκών αιμοσφαιρίων στην παρούσα έρευνα, τόσο πριν, όσο και μετά την αδρανοποίηση με ριβοφλαβίνη να ικανοποιεί το κριτήριο αυτό. Και εδώ, όμως, υφίσταται το ερώτημα για το κατά πόσο τα αποτελέσματα των μετρήσεων αντιστοιχούν όντως σε λευκά αιμοσφαίρια ή θραύσματά τους, όπως σημειώθηκε παραπάνω.

Μια εναλλακτική προσέγγιση αξιολόγησης της μεθόδου ως προς την αποτελεσματικότητά της στην αδρανοποίηση των λευκοκυττάρων, θα μπορούσε να είναι η δοκιμασία διέγερσης ή/και ενεργοποίησης των αδρανοποιημένων λευκοκυττάρων, η ικανότητα αναπαραγωγής τους, η μέτρηση των επιπέδων έκκρισης των κυτταροκινών, η ανάλυση της απόπτωσης, η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των υποπληθυσμών των λευκών αιμοσφαιρίων, η λειτουργικότητα των αντιγόνο-παρουσιαστικών κυττάρων και η ικανότητα σύνδεσης με άλλα λευκοκύτταρα [12, 34, 37-39].

Φυσικά, ακριβέστερα αποτελέσματα θα μπορούσαν να ληφθούν μέσω κλινικών ερευνών τόσο σε μοντέλα σε ζώα, αλλά και σε ανθρώπους, παρεμφερή με εκείνα που περιγράφονται στην έρευνα της Fast και συν [12] και στην κλινική δοκιμασία MIRACLE (Mirasol Clinical Evaluation) [40] ώστε να κατανοηθεί σε βάθος η ανοσογονικότητα των υπολειπόμενων λευκών αιμοσφαιρίων.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε όλες τις μεθόδους αδρανοποίησης που χρησιμοποιούνται σήμερα, πέρα από τις επιθυμητές επιπτώσεις πάνω στην ελάττωση της μετάδοσης των μεταδιδόμενων με το αίμα νοσημάτων και των ανοσιακών καταστάσεων από τα λευκά αιμοσφαίρια, υπάρχουν και οι αρνητικές επιπτώσεις που αφορούν την μείωση των παραγόντων πήξης και των ζώντων κυττάρων. Όπως αναφέρεται και στην βιβλιογραφία, η απώλεια και η αποδόμηση

των πρωτεϊνών του πλάσματος, είναι σχεδόν αναπόφευκτες, με άμεση συνέπεια την επιδείνωση της ποιότητας του παραγώγου που θα μεταγγισθεί στους ασθενείς.

Ο παράγων που επηρεάζεται περισσότερο από όλους είναι ο αντιαιμοροφιλικός παράγων (FVIII) καθότι είναι ο πιο ασταθής. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται ως κριτήριο για την ποιότητα των αδρανοποιημένων προϊόντων, με τη μείωση του να κυμαίνεται μεταξύ 20-30% σε όλες τις μεθόδους αδρανοποίησης [8, 28, 41, 42]. Αντιθέτως, οι φυσικοί ανασταλτές επιδεικνύουν μεγαλύτερο βαθμό ανάκτησης [1].

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή στον *Οδηγό της για την Διασφάλιση της Προετοιμασίας, της Χρήσης και Ποιότητας των Συστατικών του Αίματος* [43] αναφέρει ως κριτήρια για την ποιότητα του αδρανοποιημένου FFP τα επίπεδα του FVIII και του Ινωδογόνου να είναι όχι χαμηλότερα από 50-70 IU ανά 100 mL και  $\geq 60\%$  της δραστικότητας της φρέσκιας συλλεγμένης μονάδας πλάσματος, αντιστοίχως. Στον ίδιο οδηγό, τα επίπεδα του FVIII σε μη αδρανοποιημένο FFP ορίζονται ως  $\geq 70$  IU ανά 100 mL.

Στην παρούσα μελέτη, το εύρος αναφοράς του αναλυτή *STAGO STA-R Evolution® Expert Series*, για τους δύο παράγοντες πήξης που μετρήθηκαν, ορίστηκε ως 60-150% για τον αντιαιμοροφιλικό παράγοντα και 200-400 mg/dL για το ινωδογόνο. Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις έδειξαν πολύ μειωμένες τιμές για τον FVIII, τόσο στα αδρανοποιημένα δείγματα (META), όσο και στα μη (ΠΡΟ) και (ΕΝΔ) ( $25,80 \pm 10,71$ ,  $46,90 \pm 15,87$  και  $27,17 \pm 13,56$  αντιστοίχως). Η μειωμένη τιμή στα αδρανοποιημένα δείγματα ήταν αναμενόμενη, και συγκρινόμενη με την τιμή των ενδιάμεσων δειγμάτων (δεδομένου ότι περιέχουν την ίδια ποσότητα ριβοφλαβίνης) η μείωση στο αδρανοποιημένο δείγμα αγγίζει το 13,36%. Η μείωση αυτή δυσχεραίνει ακόμα περισσότερο τις ήδη χαμηλές τιμές του συγκεκριμένου παράγοντα, γεγονός που καθιστά το αδρανοποιημένο πλάσμα ακατάλληλο για θεραπεία ασθενών με έλλειψη του αντιαιμοροφιλικού παράγοντα. Όσον αφορά το ινωδογόνο, η μείωση των επιπέδων μεταξύ των ενδιάμεσων (ΕΝΔ) και των αδρανοποιημένων (META) δειγμάτων, φτάνει το 18,18%, με αποτέλεσμα να ισχύει ό,τι και για τον παράγοντα VIII.

Πέρα από την αναπόφευκτη επίδραση της αδρανοποίησης με ριβοφλαβίνη στις τιμές των παραγόντων πήξης, μέρος της μείωσης αυτής, οφείλεται και στον τρόπο παρασκευής των FFP. Χρησιμοποιήθηκε πλάσμα από ολικό αίμα, το οποίο



διατηρήθηκε στους  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  για 18 ώρες πριν τον διαχωρισμό του στα συστατικά του. Βάσει της μελέτης που διεξήγαγε η Cardigan και η επιστημονική της ομάδα [44], η ποιότητα των FFP που παρασκευάζονται με τον παραπάνω τρόπο συγκρινόμενη με εκείνη των FFP που παρασκευάζονται εντός 8 ωρών μετά την λήψη του αίματος, είναι ελάχιστα υποδεέστερη αλλά με αποδεκτές τιμές ανάκτησης των παραγόντων πήξης. Συγκεκριμένα, αναφέρεται 12% μείωση στην τιμή του ινωδογόνου και 23% μείωση στον παράγοντα VIII.

Επειδή το πλάσμα περιέχει έναν μεγάλο αριθμό από απαραίτητα οργανικά αλλά και ανόργανα συστατικά, αποτελεί βασική θεραπεία για την αντιμετώπιση αρκετών επίκτητων διαταραχών της πήξης, ιδιαίτερα εκείνων που εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα περισσότερων του ενός παράγοντα πήξης. Εναλλακτικά, μπορεί να χορηγηθεί και ως υποκατάστατο μεμονωμένων παραγόντων, όταν εκείνοι δεν είναι διαθέσιμοι, για την αντιμετώπιση της Διάχυτης Ενδαγγειακής Πήξης ή της Θρομβωτικής Θρομβοπενικής Πορφύρας. Επιπλέον, όπως έχει επισημανθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, εξαιτίας της πολυπλοκότητας των πρωτεϊνών του πλάσματος, αλλά και των υπόλοιπων πιθανών συστατικών του (π.χ. λευκά αιμοσφαίρια, παθογόνοι μικροοργανισμοί) ενδείκνυται να προκαλέσει διάφορες παθοφυσιολογικές αντιδράσεις, όπως η αλλοανοσοποίηση ή το σύνδρομο TRALI. Για τον λόγο αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό να διασφαλιστεί η ποιότητα του, αλλά και η ασφάλειά του.

Στον αντίποδα της αδρανοποίησης με ριβοφλαβίνη, και γενικότερα των μεθόδων αδρανοποίησης, βρίσκεται μια ευρέως χρησιμοποιούμενη και αποδεκτή μέθοδος για την διασφάλιση της ποιότητας και ασφάλειας των προϊόντων που πρόκειται να μεταγγιστούν σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, η ακτινοβόληση των παραγώγων του αίματος με γάμμα ακτινοβολία. Μια πρακτική που εξακολουθεί να εφαρμόζεται σε αρκετές χώρες παγκοσμίως. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική ως προς την πρόληψη της TA-GVHD και λιγότερο ως προς την μείωση της εμφάνισης ανοσολογικών καταστάσεων, ενώ δεν προλαμβάνει την μετάδοση των αιματογενώς μεταδιδόμενων νοσημάτων. Σε αντίθεση όμως με την ακτινοβόληση, οι μέθοδοι αδρανοποίησης μπορεί να εμφανίζουν την ίδια αποτελεσματικότητα με την γάμμα ακτινοβολία για την πρόληψη της TA-GVHD, αλλά υπερέχουν σαφώς στην εξάλειψη των ανοσολογικών συνεπειών από την μετάγγιση, καθώς στα αδρανοποιημένα παράγωγα δεν υπάρχουν ενεργά αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα, και στην πρόληψη της μετάδοσης των μεταδιδόμενων με το αίμα νοσημάτων [1, 12, 34].

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα όσα έχουν αναφερθεί στην παρούσα μελέτη, όλες οι δυσμενείς καταστάσεις που μπορούν να προκύψουν από την μετάγγιση του αίματος και των προϊόντων του, μπορούν να βελτιωθούν ή να εξαλειφθούν μέσω της αδρανοποίησης με το σύστημα Mirasol®. Οι περεταίρω *in vitro* δοκιμασίες, οι έρευνες σε ζωικό μοντέλο, και τα ανθρώπινα κλινικά δεδομένα είναι θεμελιώδους σημασίας να πραγματοποιηθούν ώστε να παρέχουν στην επιστημονική κοινότητα τις απαραίτητες γνώσεις για την τρέχουσα αποτελεσματικότητα και ασφάλεια, αλλά και την εξέλιξη της μεθόδου ώστε να είναι στο μέλλον εφικτή η ασφαλής εφαρμογή στα ερυθρά αιμοσφαίρια και στο ολικό αίμα, πάντα σε ικανοποιητικό πλαίσιο σχέσης κόστους-ωφέλειας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ:** Το αίμα που προορίζεται για μετάγγιση είναι πιο ασφαλές από ποτέ, λόγω του συστηματικού ελέγχου των αιμοδοτών. Ωστόσο, παρά τις αξιοσημείωτες προόδους ελέγχου του αίματος και των προϊόντων του, οι κίνδυνοι από την μετάδοση των μεταδιδόμενων με το αίμα νοσημάτων, συνεχίζουν να υφίστανται εξαιτίας της περιόδου του «παραθύρου», ενώ τα αναδυόμενα παθογόνα παραμένουν μια διαρκή απειλή, καθώς δεν μπορούν να ελεγχθούν ή να προβλεφθούν. Επιπλέον, η παρουσία των λευκών αιμοσφαιρίων στα προϊόντα του αίματος, δυνητικά προκαλεί ανοσολογικές αντιδράσεις στους ασθενείς. Μια σοβαρή ανοσολογική αντίδραση εξαιτίας των υπολειπόμενων λευκών αιμοσφαιρίων είναι η «Σχετιζόμενη με τη Μετάγγιση Νόσος Μοσχεύματος έναντι Ξενιστή». Έτσι, οι διάφορες μέθοδοι αδρανοποίησης που έχουν αναπτυχθεί, ενισχύουν την ασφάλεια των μεταγγίσεων, καθώς καθιστούν τα παθογόνα μη λειτουργικά, ενώ αρκετές πιθανά να αδρανοποιούν και τα εναπομείναντα λευκά αιμοσφαίρια. Όμως, αν και η αποτελεσματικότητά τους, σε διαφορετικό βαθμό η κάθε μια, είναι αποδεδειγμένη, το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους είναι ότι μειώνουν, σε αποδεκτά επίπεδα, τους παράγοντες πήξης του αίματος.

**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:** Στην παρούσα μελέτη, έγινε μια προσπάθεια εκτίμησης της αποτελεσματικότητας της μεθόδου αδρανοποίησης με ριβοφλαβίνη (σύστημα Mirasol®), μέσω του υπολογισμού του αριθμού των υπολειπόμενων λευκών αιμοσφαιρίων και του ποσοστού μείωσης του αντιαιμορροφιλικού παράγοντα (FVIII) και του ινωδογόνου, σε φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα (n=30) από υγιείς αιμοδότες.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η μέθοδος αδρανοποίησης ήταν αμφιλεγόμενη για τα λευκά αιμοσφαίρια, καθώς επιδρά στο γενετικό υλικό των παθογόνων και των λευκών αιμοσφαιρίων, χωρίς να είναι μείζονος σημασίας ο αριθμός τους, ενώ η μείωση του παράγοντα VIII και του ινωδογόνου ήταν αναμενόμενη.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ:** Ανεξάρτητα από τα αποτελέσματα, η αποτελεσματικότητα της αδρανοποίησης με ριβοφλαβίνη έχει περιγραφεί και αποδειχθεί μέσα από πολυάριθμες μελέτες *in vitro*. Εξέχουσας σημασίας είναι η διεξαγωγή *in vivo* μελετών, ώστε στο μέλλον να αποκομιστούν συμπεράσματα για την απόδοσή της στην αδρανοποίηση των λευκών αιμοσφαιρίων, καθώς και η εξέλιξη της μεθόδου, ώστε να επηρεάζονται κατά το δυνατόν λιγότερο τα επίπεδα των παραγόντων πήξης.

## ABSTRACT

---

**INTRODUCTION:** The blood used in transfusions is safer than ever before, due to the constant screening of blood donors. However, despite the remarkable improvements in the screening of blood and its products, there is still the risk of Transfusion Transmitted Infections, because of the “window” period, while emerging pathogens remain an unremitting threat, as they cannot be tested or prevented. Furthermore, the presence of residual white blood cells in blood components has the potential to cause immunological implications in patients. A serious immunological reaction due to the residual white blood cells is Transfusion Associated – Graft Versus Host Disease. The development of several pathogen reduction technologies can therefore reinforce blood safety, as they render pathogens non-functional, while some of which, can possibly inactivate the remaining white blood cells. Although the efficacy of these methods has been proven, their major drawback is the decrease in the levels of the coagulation factors, in an acceptable percentage, though.

**MATERIALS AND METHODS:** The current study was an endeavor in the evaluation of riboflavin-based pathogen reduction technology (Mirasol® pathogen reduction system), via the estimation of white blood cells’ number and the percentage loss of clotting factor VIII and fibrinogen, in fresh frozen plasma (n=30) derived from healthy donors.

**RESULTS:** According to the results, the pathogen reduction technology performed has been proven controversial for its efficacy on residual white blood cells, as it affects cells’ genome, rendering cells’ number of minor importance. On the other hand, the decreased levels of factor VII and fibrinogen, was expected.

**CONCLUSION – DISCUSSION:** Despite the results, the effectiveness of riboflavin-based pathogen reduction technology has been proven via numerous in vitro studies. As for the future goals, of prime importance is the implementation of clinical studies, so that more conclusive information of the method’s performance will be taken, and secondly, much effort should be put on the further development of this method, in order to affect the coagulation factors in a lesser rate.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. Marschner, S. and R. Goodrich, *Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets, Plasma and Whole Blood Using Riboflavin and UV Light*. *Transfus Med Hemother*, 2011. **38**(1): p. 8-18.
2. Solheim, B.G., *Pathogen reduction of blood components*. *Transfus Apher Sci*, 2008. **39**(1): p. 75-82.
3. AABB (American Association of Blood Banks), *Technical Manual*. 17th ed. 2011.
4. Rasongles, P., et al., *Transfusion of platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment during a Chikungunya virus epidemic in Ile de La Reunion*. *Transfusion*, 2009. **49**(6): p. 1083-91.
5. Allain, J.P., et al., *Transfusion-transmitted infectious diseases*. *Biologicals*, 2009. **37**(2): p. 71-7.
6. Taylor, C., C. Navarrete, and M. Contreras, *Immunological Complications of Blood Transfusion*. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine*, 2008. **10**(3): p. 112-126.
7. Oren, E., *Alloimmunization From Transfusions* 2012.
8. Γαφού, Α. and Ν. Βγόντζα, *Αδρανοποίηση παθογόνων στα ασταθή παράγωγα του αίματος - Υπέρ και κατά*. *Αίμα (Haema)*, 2011. **2**(1): p. 55-75.
9. Trimble, S.R., et al., *Assessing emerging infectious threats to blood safety for the blood disorders community*. *Am J Prev Med*, 2010. **38**(4 Suppl): p. S468-74.
10. Dodd, R.Y., *Emerging pathogens in transfusion medicine*. *Clin Lab Med*, 2010. **30**(2): p. 499-509.
11. Centers for Disease Control and Prevention. *Parvovirus B19 and Fifth Disease*. [cited 2013; Available from: <http://www.cdc.gov/parvovirusb19/fifth-disease.html>].
12. Fast, L.D., G. DiLeone, and S. Marschner, *Inactivation of human white blood cells in platelet products after pathogen reduction technology treatment in comparison to gamma irradiation*. *Transfusion*, 2011. **51**(7): p. 1397-404.
13. Schwartz, R.A., et al. *Medscape*. 2013.
14. Konkle, B.A., et al., *Hemophilia A*, in *GeneReviews*, R.A. Pagon, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
15. *Genetics HomeReference*. U.S. National Library of Medicine, 2013.
16. Zaiden, R.A., et al. *Hemophilia A*. 2013 [cited 2013; Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/779322-overview>].
17. Schwartz, R.A., et al., *Factor VIII*, 2013.
18. Βαγιάνου, Ι.Η., *ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VIII ΜΕ ΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΣΕ ΑΙΜΟΡΡΟΦΙΛΙΚΑ ΠΑΙΔΙΑ* in *Ιατρική Σχολή 2012-2013*, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης: Θεσσαλονίκη. p. 152.
19. Bornikova, L., et al., *Fibrinogen replacement therapy for congenital fibrinogen deficiency*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(9): p. 1687-704.
20. Παρασρατίδης, Ι.Κ., *ΕΞΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΘΗΡΩΜΑΤΩΣΗΣ* in *Ιατρική Σχολή 2009-2010*, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης: Θεσσαλονίκη. p. 173.
21. Balasa, V.V., *Inherited Abnormalities of Fibrinogen*, 2012.

22. European Medicines Agency, *Guideline on plasma-derived medicinal products*, E.M. Agency, Editor 2011.
23. Goodrich, R.P., S. Doane, and H.L. Reddy, *Design and development of a method for the reduction of infectious pathogen load and inactivation of white blood cells in whole blood products*. *Biologicals*, 2010. **38**(1): p. 20-30.
24. McClaskey, J., et al., *Clinical trials for pathogen reduction in transfusion medicine: a review*. *Transfus Apher Sci*, 2009. **41**(3): p. 217-25.
25. McCullough, J., *Pathogen inactivation: a new paradigm for preventing transfusion-transmitted infections*. *Am J Clin Pathol*, 2007. **128**(6): p. 945-55.
26. Blajchman, M.A., *Protecting the blood supply from emerging pathogens: the role of pathogen inactivation*. *Transfus Clin Biol*, 2009. **16**(2): p. 70-4.
27. Seghatchian, J., T. Hergig, and J.S. Putter, *Effect of pathogen inactivation on the storage lesion in red cells and platelet concentrates*. *Transfus Apher Sci*, 2011. **45**(1): p. 75-84.
28. Terumo BCT, *A novel Approach to Blood Safety: The Mirasol PRT System*, 2008. p. 60.
29. NCBI.PubChem Compound. *Riboflavin - Compound Summary* [cited 2013; Available from: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=493570#itabs-2d>].
30. MedlinePlus. *Riboflavin*. 2013 [cited 2013; Available from: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002411.htm>].
31. U.S. Food and Drug Administration, *Code of Federal Regulations*, in 21, U.S.D.o.H.a.H. Services, Editor.
32. World Health Organization Food and Agricultural Organization of the United Nations, *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*. 2nd ed. 2004.
33. Χατζηωαννίδης, Κ., *Νεογνικός ίκτερος*, in *Νεογνολογία*, Β. Σούρμπαση-Γρίβα, Editor 2008, Υπηρεσία Δημοσιευμάτων ΑΠΘ,: Θεσσαλονίκη. p. 185-200.
34. Jackman, R.P., et al., *Understanding loss of donor white blood cell immunogenicity after pathogen reduction: mechanisms of action in ultraviolet illumination and riboflavin treatment*. *Transfusion*, 2009. **49**(12): p. 2686-99.
35. Edwards, A.M., et al., *Apoptosis induction in nonirradiated human HL-60 and murine NSO/2 tumor cells by photoproducts of indole-3-acetic acid and riboflavin*. *Photochem Photobiol*, 1999. **70**(4): p. 645-9.
36. Edwards, A.M., et al., *Visible light effects on tumoral cells in a culture medium enriched with tryptophan and riboflavin*. *J Photochem Photobiol B*, 1994. **24**(3): p. 179-86.
37. Fast, L.D., et al., *Functional inactivation of white blood cells by Mirasol treatment*. *Transfusion*, 2006. **46**(4): p. 642-8.
38. Kumar, V., et al., *Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level*. *Photochem Photobiol*, 2004. **80**: p. 15-21.
39. Marschner, S., et al., *White blood cell inactivation after treatment with riboflavin and ultraviolet light*. *Transfusion*, 2010. **50**(11): p. 2489-98.
40. Mirasol Clinical Evaluation Study, G., *A randomized controlled clinical trial evaluating the performance and safety of platelets treated with MIRASOL pathogen reduction technology*. *Transfusion*, 2010. **50**(11): p. 2362-75.
41. Larrea, L., et al., *The influence of riboflavin photochemistry on plasma coagulation factors*. *Transfus Apher Sci*, 2009. **41**(3): p. 199-204.
42. Prowse, C., *Properties of pathogen-inactivated plasma components*. *Transfus Med Rev*, 2009. **23**(2): p. 124-33.

43. European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion, *Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components*. 16th ed, ed. S. Keitel. 2010: Council of Europe,.
44. Cardigan, R., et al., *The quality of fresh-frozen plasma produced from whole blood stored at 4 degrees C overnight*. *Transfusion*, 2005. **45**(8): p. 1342-8.