



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Κυτταροβιολογική μελέτη αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων που προορίζονται για μετάγγιση»

Μήτσια Μαγδαληνή (DML16009)

Επιβλέπων: Κριεμπάρδης Αναστάσιος

Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Αιματολογίας – Παθοφυσιολογίας

Διατήρησης του Ερυθροκυττάρου και Αιμοδοσίας

Τριμελής Επιτροπή: Κριεμπάρδης Αναστάσιος

Φούντζουλα Χριστίνα

Γεωργατζάκου Χαρά

ΑΘΗΝΑ, 2019

UNIVERSITY OF WESTERN ATTICA
SCHOOL OF HEALTH AND WELFARE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

POSTGRADUATE STUDY PROGRAM

“BIOMEDICAL METHODS AND TECHNOLOGIES IN DIAGNOSIS”

THESIS

“Cellular and Biological study of inactivated platelets
intended for transfusion”

Mitsia Magdalini (DML16009)

Supervisor: Kriebardis Anastasios

Associate Professor

Thesis Committee: Kriebardis Anastasios

Foutzoula Christina

Georgatzakou Hara

ATHENS (2019)

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή: Εισηγητής - Κριεμπάρδης Αναστάσιος
Μέλος - Φούντζουλα Χριστίνα
Μέλος - Γεωργατζάκου Χαρά

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα	iv
Περίληψη	1
Abstract	2
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
2 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	5
2.1 Μεταδιδόμενα με την Μετάγγιση Παθογόνα.....	5
2.1.1 Γνωστά παθογόνα.....	6
2.1.2 Αναδυόμενα και άλλα παθογόνα	10
2.1.3 Λοιπά βακτηριακά παθογόνα	14
2.2 Τεχνικές Αδρανοποίησης Παθογόνων	16
2.2.1 Αδρανοποίηση Με Χημικά και Φωτοδυναμικά Μέσα	17
2.2.2 Amatosalen (S-59)/UVA light.....	17
2.2.3 Amustaline (S303)/Glutathione	18
2.2.4 Riboflavin (B ₂)/UV light.....	19
2.2.5 Methylen Blue/light.....	20
2.2.6 UVC light.....	21
2.2.7 γ-ακτινοβολία	21
2.2.8 Solvent detergent.....	22
2.3 Αιμοπετάλια	23
2.3.1 Λειτουργία αιμοπεταλίων.....	23
2.3.2 Βιομορία αιμοπεταλίων	30
2.3.3 Μετάγγιση Αιμοπεταλίων.....	36
2.3.4 Αποθήκευση Αιμοπεταλίων – Αποθηκευτική βλάβη	39
2.4 Τεχνικές αδρανοποίησης Αιμοπεταλίων	41
3 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	43
3.1 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	43
3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	43
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
4.1 Amatosalen (S-59)/UVA light	45
4.2 Riboflavin (B₂)/UV light	51
4.3 UVC Light.....	58
4.4 Ριβοφλαβίνη vs Αματοσαλένιο	59
5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	64
5.1 Amatosalen (S-59)/UVA light	64

5.2	Riboflavin (B ₂)/UV light	68
5.3	UVC Light.....	74
6	Συμπεράσματα	76
7	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	80
	Παράρτημα εικόνων	90
	Παράρτημα πινάκων	90
	Συντμήσεις	91

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μετάγγιση αιμοπεταλίων αποτελεί μία σημαντική ιατρική πρακτική υποστηρικτικής θεραπείας, δεν παύει όμως, όπως κάθε μετάγγιση, να επιφέρει κινδύνους αντιδράσεων και μετάδοσης γνωστών, αναδυόμενων και μη γνωστών παθογόνων. Τα αιμοπετάλια είναι ασταθή παράγωγα και λόγω των συνθηκών αποθήκευσης είναι εύκολη και συνήθης η ανάπτυξη και η διατήρηση των παθογόνων.

Οι τεχνικές αδρανοποίησης βρίσκουν ολοένα και περισσότερη εφαρμογή τα τελευταία χρόνια, για να καλύψουν το παραπάνω πρόβλημα τόσο για την αδρανοποίηση παθογόνων που δύνανται να μεταδοθούν εξ' αίματος, όσο και για την ελαχιστοποίηση αντιδράσεων που εμφανίζονται στους ασθενείς οφειλόμενες στα λευκά αιμοσφαίρια. Οι σύγχρονες τεχνικές διακρίνονται σε φωτοχημικές ή φωτοδυναμικές, αναλόγως με το αν χρησιμοποιούν έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία σε συνδυασμό με κάποιο χημικό παράγοντα. Η κάθε διαφορετική τεχνική έχει ως στόχο τα νουκλεϊκά οξέα, την αποτροπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς και τη μεταγραφή. Οι τεχνικές που εφαρμόζονται στα αιμοπετάλια τη δεδομένη στιγμή, είναι η αδρανοποίηση με αματοσαλένιο/UVA, ριβοφλαβίνη/UVB και UVC, με την τελευταία να βρίσκεται σε φάση κλινικών δοκιμών.

Τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη διατήρηση της αιμοστατικής ισορροπίας, στην αγγειογένεση και στη φλεγμονή, σηματοδοτώντας πολλά διαφορετικά μοριακά μονοπάτια. Η λειτουργική τριάδα προσκόλληση, έκκριση και συσσώρευση αφορά μηχανισμούς σημαντικούς στην ενεργοποίηση τους κατά την πρωτογενή αιμόσταση. Τα αιμοπετάλια στερούνται πυρήνα, οπότε φαίνεται ιδανική η εφαρμογή των τεχνικών αδρανοποίησης, όμως περιέχουν νουκλεϊκά οξέα (mRNAs, microRNAs και mtDNA) για την λειτουργία τους. Επομένως η αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων, του χημικό παράγοντα και της υπεριώδους ακτινοβολίας, μπορεί να επιφέρει αλλαγές στα βιομόρια του και στην σηματοδότηση μοριακών μονοπατιών, με αποτέλεσμα την αλλαγή της λειτουργίας του.

ABSTRACT

Platelet components' transfusion is an important tool to supportive care. Despite that, it may still prompt adverse reactions and there is probability of hazardous effects such as transmission of known, emerging and unknown pathogens. Due to storage conditions, platelet components are unstable and capable to lead to pathogen growth and proliferation.

Lately, pathogen inactivation techniques are implemented even more; in order to deal with problems like transfusion transmitted diseases and simultaneously aim to the minimization of adverse events occurred to patient, related to white blood cells. Depending on, whether there is a chemical compound or not, current techniques are divided into photochemical and photodynamic categories. Each methodology uses ultraviolet radiation exposure and targets nucleic acids. Consequently, DNA and RNA transcription is impeded, as well as proliferation. Nowadays, three different techniques are implemented in order to inactivate platelets; amatosalen/UVA, riboflavin/UVB and UVC. The latter technique is still undergoing through clinical trial.

Being part in many different signal transduction pathways, platelets are playing an important role in hemostasis, inflammation and angiogenesis. Adhesion, secretion and aggregation are significant mechanisms that taking place in platelet activation, during primary hemostasis. As, platelets are cells without nucleus, implementation of pathogen inactivation techniques seems optimum methodology. Despite that, platelets contain nucleic acids such as mRNAs, microRNAs and mtDNA that participate in cell's functions. Consequently, the interaction of platelets, chemical compound and ultraviolet radiation may cause changes to molecules and signal transduction of platelets, and similarly may impair their function.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μετάγγιση του αίματος και των παραγώγων του, αποτελεί ανεκτίμητο μέσο του κλινικού ιατρού, για τη υποστηρικτική θεραπεία ασθενών με αιμορραγία, βαριές αναιμίες και διαταραχές της πήξης. Η επεξεργασία του ολικού αίματος οδηγεί στην δημιουργία των παραγώγων: Συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια (ΣΕ ή pRBCs), Φρέσκο Κατεψυγμένο πλάσμα\Κατεψυγμένο πλάσμα (FFP\FP) και αιμοπετάλια (PLTs), τα οποία βοηθούν στην εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση του ασθενούς. Όμως παρά την σπουδαιότητα της, όπως αναφέρεται και από το κ. Φλέσσα «Εκεί όπου η μετάγγιση αίματος δεν έχει ένδειξη, έχει απόλυτη αντένδειξη».¹ Ασφαλής μετάγγιση είναι αυτή που δεν πραγματοποιήθηκε ποτέ, διότι αυτή καθ' αυτή σαν πράξη, εκθέτει τον ασθενή σε κίνδυνο εμφάνισης ανεπιθύμητων αντιδράσεων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα εναπομείναντα λευκοκύτταρα και οι κυταρροκίνες που είναι δυνατόν να προκαλέσουν αντιδράσεις στον ασθενή και η μετάδοση εξ' αίματος γνωστών και αναδυόμενων παθογόνων.

Πιο εξειδικευμένα η βακτηριακή επιμόλυνση των αιμοπεταλίων παραμένει πρόκληση για την ιατρική των μεταγγίσεων. Υπολογίζεται ότι 1/1.000 – 1/10.000 μονάδες αιμοπεταλίων επιμολύνονται ανάλογα με την χώρα και την μέθοδο παραγωγής και 1/4 μονάδες αιμοπεταλίων οδηγούν σε αντίδραση μετάγγισης. Η μετάγγιση αιμοπεταλίων επιφέρει μεγαλύτερο κίνδυνο μετάδοσης λοιμογόνων παραγόντων, λόγω των συνθηκών αποθήκευσης (20-24°C) που ευνοούν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό παθογόνων. Το χρονικό περιθώριο χρήσης τους έχει καθοριστεί στις 5-7 ημέρες κυρίως λόγω της αποθηκευτικής βλάβης, της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού μικροοργανισμών. Σύμφωνα με αρκετούς ερευνητές, η ποιότητα των συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως η προετοιμασία, η αποθήκευση, ο τύπος του ασκού και η τεχνική αδρανοποίησης των παθογόνων παραγόντων.²

Λόγω της αναγκαιότητας ασφαλούς και αποτελεσματικής μετάγγισης, ολοένα και περισσότερες τεχνικές αναπτύσσονται γύρω από το συγκεκριμένο τομέα, καθώς και περισσότερες μελέτες ασχολούνται με τον ποιοτικό έλεγχο και την ασφάλεια εφαρμογής των συγκεκριμένων τεχνικών. Μία από τις παραπάνω τεχνικές, αποτελεί η αδρανοποίηση αίματος και παραγώγων η οποία αν και πολλά υποσχόμενη είναι

ακόμα υπό επιτήρηση για τις ενδεχόμενες επιδράσεις που μπορεί να επιφέρει. Ιδανικά μια μέθοδος αδρανοποίησης για να είναι αποτελεσματική πρέπει να αντιμετωπίζει ταυτόχρονα και με επιτυχία πολλαπλές μορφές πολλών παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ παράλληλα, θα πρέπει να εξασφαλίζεται η λειτουργική ακεραιότητα των κυτταρικών στοιχείων (ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια) και η δραστηκότητα των παραγόντων αίματος.

Στην παρούσα μελέτη θα ερευνηθούν οι τεχνικές αδρανοποίησης παραγώνων αιμοπεταλίων, και κατά πόσο η εφαρμογή τους, επηρεάζει την κυτταρική τους λειτουργία. Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι να ερευνήσει τις διαφορές, μεταξύ των τεχνικών αδρανοποίησης που εφαρμόζονται στα αιμοπετάλια, καθώς και τις βλάβες, σε βιοχημικό και μοριακό επίπεδο που μπορεί αυτές να επιφέρουν στα PLTs και κατ' επέκταση στους μεταγγιζόμενους ασθενείς. Ο τελικός στόχος αυτής της ανασκόπησης είναι να συνοψίσει τα μέχρι τώρα δεδομένα και να βρεθεί η βέλτιστη τεχνική, σχετικά με τις παρενέργειες στα αιμοπετάλια.^{1,3}

2 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΑ

Τη δεκαετία του 40', η σύφιλη αποτέλεσε το πρώτο μεταδιδόμενο παθογόνο, το οποίο εκτελούνταν στην ρουτίνα ορολογικού ελέγχου των αιμοδοσιών. Πιο μετά, οι μεταδιδόμενοι ιοί ηπατίτιδας και ο ιός HIV, προκάλεσαν τεράστιο πλήγμα στις αιμοδοσίες, με αποτέλεσμα η ανοσολογική και μοριακή ανίχνευση τους, να απασχολήσει πολύ την επιστημονική κοινότητα. Εκείνη την περίοδο η συνέντευξη των αιμοδοτών, αποτελούσε και το μοναδικό τρόπο περιορισμού των ασθενειών. Αργότερα, ο υποχρεωτικός ιολογικός έλεγχος των παθογόνων (donor screening), κατάφερε να περιορίσει αρκετά την έκθεση στους λοιμώδεις παράγοντες. Ωστόσο, είναι πρακτικά ανέφικτο, το δείγμα να εξεταστεί για όλα τα παθογόνα, που εν δυνάμει μπορούν να μεταδοθούν εξ' αίματος. Αφενός λόγω κόστους, αφετέρου διότι υπάρχει η περίπτωση ο αιμοδότης είτε να διανύει την περίοδο του «παραθύρου», που δεν είναι δυνατή η ανίχνευση του παθογόνου, είτε να είναι μολυσμένος με ένα νέο ή αναδυόμενο παθογόνο. Η περίοδος του «παραθύρου», δηλαδή η περίοδος από την μόλυνση μέχρι την παραγωγή ικανοποιητικού τίτλου αντισωμάτων ικανών να ανιχνευτούν από την αντίστοιχη ορολογική μέθοδο ανίχνευσης, μειώθηκε, όταν έγινε δυνατή η ανίχνευση του αντιγόνου και ακόμα περισσότερο, όταν εισήχθηκε η ανίχνευση των νουκλεϊκών οξέων (NAT).³⁻⁶

Στους φορείς υγείας η ασφάλεια των προϊόντων αίματος εξαρτάται από μία σειρά μέτρων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται α) η συνεχή επιτήρηση και αναγνώριση των αναδυόμενων ασθενειών, που πιθανά μεταδίδονται μέσω της μετάγγισης, β) η προσεκτική επιλογή των αιμοδοτών μέσω ερωτηματολογίου και κλινικού ιστορικού, γ) ο εργαστηριακός έλεγχος με ορολογικές και μοριακές μεθόδους, για μολυσματικές νόσους, δ) τα συστήματα ποιότητας και διαπίστευσης των μεθόδων, καθώς και συστήματα ασφαλείας, όπως τα τοπικά πληροφοριακά συστήματα και λογισμικά. Όλες οι παραπάνω μέθοδοι έχουν ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ασφαλείας του αίματος και σχεδόν τον εκμηδενισμό της μετάδοσης ασθενειών στις αναπτυγμένες χώρες.⁷

Στην ετήσια αναφορά σοβαρών κινδύνων μετάγγισης αναφέρεται ότι από την περίοδο 2005 μέχρι το 2009, η κύρια μεταδιδόμενη ασθένεια αφορούσε βακτηριακά παθογόνα τα οποία μεταδίδονταν μέσω αιμοπεταλίων. Στην συνέχεια, ο μεγαλύτερος κίνδυνος μη βακτηριακής μόλυνσης είναι η ηπατίτιδα Β με μία ή δύο καταγεγραμμένες μολύνσεις ετησίως, ενώ το τελευταίο χρονικό διάστημα επικρατεί η ηπατίτιδα Ε. Το τελευταίο καταγεγραμμένο περιστατικό μόλυνσης από ιό ηπατίτιδας C ήταν το 1997, από HIV το 2002 και από ελονοσία το 2003. Δεν έχει καταγραφεί μόλυνση με τον Ανθρώπινο Τ-λεμφοτρόπο ιό (HTLV) τα τελευταία 30 χρόνια, ενώ έχουν καταγραφεί τέσσερα περιστατικά με την νόσο Creutzfeldt-Jakob.^{8,9}

Την δεδομένη στιγμή στην Ελληνική επικράτεια σε κάθε μονάδα αίματος, προτού διατεθεί στη κυκλοφορία, εκτελείται υποχρεωτικά ο εργαστηριακός έλεγχος των παρακάτω εξετάσεων: 1) HBV για την ανίχνευση ηπατίτιδας Β, 2) HCV για την ανίχνευση ηπατίτιδας C, 3) HIV I/II για την ανίχνευση του συνδρόμου επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS), 4) HTLV I/II για την ανίχνευση του ανθρώπινου Τ-λεμφοτροπικού ιού, 5) Syphilis ή RPR για την ανίχνευση σύφιλης, 6) NAT για την μοριακή ανίχνευση του HBV, HCV και HIV. Τέλος, λόγω της ιδιαιτερότητας κάθε υποψήφιου αιμοδότη και κάθε μεταγγιζόμενου ασθενή, έκαστο κέντρο αιμοδοσίας εκτελεί επιπλέον ελέγχους, με βάση τον επιπολασμό των μεταδιδόμενων παθογόνων, που προκύπτουν από επιδημιολογικές έρευνες.^{6,10-12}

2.1.1 ΓΝΩΣΤΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ

– **Ιός ηπατίτιδας Β (HBV)**

Ο HBV πρόκειται για έναν DNA ιό, ο οποίος προσβάλλει τα ηπατοκύτταρα και προκαλεί τύπου Β, οξεία ή χρόνια ηπατίτιδα. Ο ιός θεωρείται υπεύθυνος για την εμφάνιση κίρρωσεως του ήπατος και ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Η HBV λοίμωξη αποτελεί σοβαρό πρόβλημα της δημόσιας υγείας και υπολογίζεται ότι υπάρχουν 250 εκατομμύρια φορείς της ασθένειας σε παγκόσμιο επίπεδο. Εκτός από αιματογενώς, ο ιός μεταδίδεται ακόμα με τη σεξουαλική επαφή, παρεντερικά και από μητέρα στο παιδί κατά την κύηση ή τον τοκετό (κάθετη μετάδοση). Η Ελλάδα το 2017 μεταπίπτει από τις χώρες ενδιάμεσης ενδημικότητας, στις χώρες χαμηλής ενδημικότητας (<2%). Στη μείωση του επιπολασμού της νόσου και ειδικότερα της οξείας ηπατίτιδας, σε

εθνική και παγκόσμια κλίμακα, συνέβαλε σημαντικά η εφαρμογή του υποχρεωτικού εμβολιασμού έναντι του ιού.¹³

Η ανίχνευση του αυστραλιανού αντιγόνου (HbsAg) έχει ενταχθεί στον υποχρεωτικό έλεγχο των αιμοδοτών από το 1971. Επιπλέον ηπατικοί δείκτες εφαρμόζονται για την ανίχνευση της φάσης της νόσου ή της ύπαρξης ικανοποιητικών τίτλων αντισωμάτων από τον εμβολιασμό. Σήμερα στην ρουτίνα ελέγχου των αιμοδοτών είναι υποχρεωτική η εφαρμογή ορολογικής ανίχνευσης του ιϊκού αντιγόνου επιφανείας HbsAg, καθώς εφαρμόζονται και μοριακές τεχνικές (NAT) για την ανίχνευση του HBV-DNA. Σε περίπτωση θετικότητας του HbsAg ή σε περιοχές με ομάδες πληθυσμού μεγαλύτερου επιπολασμού του ιού, εφαρμόζονται επιπλέον ηπατικοί δείκτες: anti-HBc ολικό (IgG και IgM αντισώματα), HbeAg, anti-Hbe και anti-HBs. Σημαντικό πρόβλημα αποτελεί η διαφορά ευαισθησίας από μέθοδο σε μέθοδο με αποτέλεσμα να υπάρχουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.^{14,15}

– **Ιός ηπατίτιδας C (HCV)**

Ο HCV είναι ένας RNA-ιός, ο οποίος ταυτοποιήθηκε το 1989 και προσβάλλει τα ηπατοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα, οδηγώντας στην ανάπτυξη της ηπατίτιδας C. Η πλειονότητα των ασθενών είναι ασυμπτωματικοί και η διάγνωση πραγματοποιείται τυχαία στις περισσότερες των περιπτώσεων. Το 50% των μολυσμένων ασθενών από τον ιό πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα και το 20-30% δύναται να εμφανίσουν κίρρωση του ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Η μετάδοση του ιού πραγματοποιείται αιματογενώς. Η κάθετη μετάδοση από μητέρα σε παιδί ή η μετάδοση μέσω σεξουαλικής επαφής είναι λιγότερο συνήθης και αυξάνεται η πιθανότητα μόλυνσης σε περίπτωση συλλοίμωξης με HIV. Στις Η.Π.Α. το 55% των HCV (+) ασθενών είναι χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, ενώ σύμφωνα με το ΚΕΕΛΠΝΟ το 50-70% των χρηστών μολύνεται από το ιό μέσα στα πρώτα 5 χρόνια χρήσης.¹³

Ορολογικά ανιχνεύονται αντισώματα (anti-HCV IgG) στο 50-70% των ασθενών με την έναρξη των συμπτωμάτων και σε 90% αυτών μετά από 3 μήνες από την έναρξη της λοίμωξης. Το «παράθυρο» της νόσου στο παρελθόν ήταν 2 μήνες, λόγω της ύπαρξης μόνο ορολογικών δοκιμασιών. Η ανεύρεση anti-HCV αντισωμάτων, δεν είναι ακριβής σχετικά με την φάση της νόσου, ενώ μπορεί να υπάρξουν ψευδώς

θετικά αποτελέσματα. Η επιβεβαίωση με διαφορετική μέθοδο κρίνεται αναγκαία και πραγματοποιείται με ειδικές εξετάσεις (RIBA, NAT, HCV RNA).¹³

Σήμερα έχει ενταχθεί στον υποχρεωτικό έλεγχο των αιμοδοτών, η ορολογική και μοριακή ανίχνευση του ιού μέσω ELISA και NAT αντιστοίχως. Ο μέσος όρος του «παράθυρου» από την μέρα της έκθεσης του ασθενή στον ιό, μέχρι την ημέρα ανίχνευσης του είναι πλέον 7,4 ημέρες. Σύμφωνα με τις Η.Π.Α, ο κίνδυνος μετάδοσης του ιού μέσω μετάγγισης υπολογίζεται στο 1 περιστατικό στις 1,1 εκατομμύριο μεταγγίσεις αίματος και παραγώγων.¹⁴

– Σύφιλη

Η συγκεκριμένη ασθένεια προκαλείται από το βακτήριο ωχρά σπειροχαίτη ή *Treponema pallidum*. Παρατηρείται χαμηλός κίνδυνος μετάδοσης του βακτηρίου μέσω μετάγγισης, πιθανότατα λόγω της χαμηλής ενδημικότητας της νόσου και επιπρόσθετα, εξαιτίας της αποθήκευσης του αίματος. Σημειώνεται ότι το συγκεκριμένο βακτήριο αν παραμείνει για 72 ώρες σε θερμοκρασία ψυγείου (4° C) , καταστρέφεται. Από την άλλη πλευρά υπάρχει κίνδυνος μετάδοσης μέσω μετάγγισης αιμοπεταλίων (αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου) και ως εκ τούτου συνίσταται να εφαρμόζεται στο βασικό ορολογικό έλεγχο των αιμοδοτών. Η ανίχνευση του βακτηρίου, πραγματοποιείται με προσδιορισμό των μη τρεπονημικών αντισωμάτων (ανίχνευση ενεργής λοίμωξης) ή των τρεπονημικών αντισωμάτων. Δεν χρησιμοποιούνται μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση του. Συγκεκριμένα πραγματοποιείται ανίχνευση με την συγκολλητινοαντίδραση VDRL ή με την δοκιμασία RPR.^{1,14}

– Ιός ανθρώπινης ανοσοεπάρκειας (HIV)

Είναι κοινώς αποδεκτό, ότι η ανάδυση του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας ή HIV, την δεκαετία του 90', προβλημάτισε σε παγκόσμιο επίπεδο και περισσότερο από κάθε άλλη φορά την ιατρική κοινότητα και τα κέντρα αίματος. Ο ρετροϊός διακρίνεται σε δύο τύπους το HIV-1 και το HIV-2 και μεταδίδεται αιματογενώς, μέσω της σεξουαλικής επαφής και συγγενώς από την μολυσμένη μητέρα στο νεογνό.¹³

Η ιδιαιτερότητα και τα χαρακτηριστικά του, κατέστησαν αναγκαίο τον έλεγχο των αιμοδοτών, ώστε να εκμηδενιστεί ο κίνδυνος χορήγησης μολυσμένου παραγώγου σε ασθενείς. Το 1985 στις Η.Π.Α. εντάχθηκε στον υποχρεωτικό έλεγχο των αιμοδοτών, η ανίχνευση των αντισωμάτων για τον HIV-1 τύπο, ενώ το 1992 προστέθηκε και η ανίχνευση του τύπου HIV-2. Σήμερα είναι υποχρεωτική η εφαρμογή ορολογικής ανίχνευσης των IgG και IgM αντισωμάτων, έναντι του ιού, με ανοσοενζυμικές μεθόδους (ELISA) και μεθόδους χημειοφωταύγειας (CLIA), καθώς εφαρμόζονται και μοριακές τεχνικές (NAT), για την ανίχνευση του HIV στους αιμοδότες. Η χρήση της μοριακής εξέτασης NAT κατάφερε να περιορίσει σημαντικά την περίοδο του παραθύρου στις 9.1 μέρες και ο κίνδυνος μετάδοσης του HIV μέσω μετάγγισης, υπολογίζεται περίπου στο 1 περιστατικό στις 1.500.000 μονάδες.¹⁶

– **Ανθρώπινος T-Λεμφοτρόπος ιός (HTLV)**

Ο ανθρώπινος T-λεμφοτρόπος ιός διακρίνεται σε δύο τύπους HTLV-I και HTLV-II και είναι ο πρώτος ανθρώπινος ρετροϊός που ανιχνεύτηκε. Συνήθως πρόκειται για ασυμπτωματική ασθένεια, ωστόσο ο ιός μολύνει τα λεμφοκύτταρα και το άτομο παραμένει δια βίου φορέας. Ο ιός είναι λεμφοτρόπος και νευροτρόπος και ο τύπος HTLV-I έχει συσχετιστεί με νεοπλασματικές νόσους. Φαίνεται να μεταδίδεται μέσω αίματος, σεξουαλικής επαφής και πιθανά μέσω θηλασμού. Εφόσον παρατηρείται ότι μεταδίδεται μέσω των λευκών αιμοσφαιρίων, με την εφαρμογή μετάγγισης λευκαφαιρεμένων παραγώγων μπορεί να μειωθεί ο κίνδυνος μετάδοσης μέσω αίματος. Ο έλεγχος των αιμοδοτών περιλαμβάνει την ορολογική ανίχνευση IgG αντισωμάτων έναντι των δύο διαφορετικών τύπων HTLV-I και HTLV-II.^{13,14}

– **Κυτταρομεγαλοϊός (CMV)**

Ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) είναι DNA ιός, αποτελεί μέλος της οικογένειας των ερπητοϊών και προσβάλλει τα λεμφοκύτταρα ή μονοκύτταρα του ξενιστή. Όπως και υπόλοιποι ερπητοϊοί, προκαλεί χρόνια λοίμωξη και παραμένει σε λανθάνουσα φάση. Μεταδίδεται αιματογενώς μέσω των ακέραιων λευκών αιμοσφαιρίων που υπάρχουν στα κυτταρικά προϊόντα αίματος. Οι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί και παράγουν αντισώματα έναντι του ιού. Ο ιός δεν εμφανίζει κάποια σοβαρή επιπλοκή, ενώ η πλειονότητα των ενηλίκων είναι οροθετικοί. Ωστόσο, σε ειδικές ομάδες ασθενών (όπως βρέφη, ανοσοκατεσταλμένοι και μεταμοσχευμένοι ασθενείς) σε περίπτωση μόλυνσης, υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης βαρύτατων επιπλοκών και για αυτό το λόγο,

προτείνεται να λαμβάνουν λευκαφαιρεμένα και CMV-αρνητικά προϊόντα αίματος. Ο προσδιορισμός αντισωμάτων έναντι του ιού δεν αποτελεί μέρος του υποχρεωτικού ορολογικού ελέγχου των δοτών αλλά πραγματοποιείται κατ' επίκληση.^{13,17}

– **Ιός Ebstein Barr (EBV)**

Η μόλυνση των B-λεμφοκυττάρων από τον EBV συχνά οδηγεί σε λοιμώδη μονοπυρήνωση, η οποία συνήθως είναι ασυμπτωματική. Πρόκειται για ενδημικό ιό και το 90% των αιμοδοτών έχουν αντισώματα έναντι του ιού. Ο ιός μεταδίδεται σπάνια μέσω του αίματος από φορείς της νόσου, και η συγκεκριμένη επιπλοκή εμφανίζεται κυρίως σε νεαρούς ασθενείς. Ο συγκεκριμένος ιός δεν αποτελεί μέρος του υποχρεωτικού ελέγχου των αιμοδοτών ούτε συνίσταται να πραγματοποιείται, λόγω του μεγάλου αριθμού φορέων και της μη εμφάνισης συμπτωμάτων.¹

2.1.2 ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ

Αναδυόμενες μολυσματικές ασθένειες είναι τα λοιμώδη νοσήματα, που έχουν εμφανιστεί στον ανθρώπινο πληθυσμό και υπάρχουν από παλαιά, αλλά πρόσφατα έχουν παρουσιάσει αύξηση της επίπτωσης ή της γεωγραφικής διασποράς τους.¹⁸

– **Ελονοσία**

Η αιτία της συγκεκριμένης νόσου είναι το ενδοερυθροκυτταρικό παράσιτο, πλασμώδιο. Μεταδίδεται μέσω μετάγγισης ολικού αίματος ή Σ.Ε., αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων. Η βαρύτητα της νόσου που προκύπτει από μετάγγιση εξαρτάται από το είδος του πλασμωδίου. Υπάρχουν τα είδη *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* και *P. malariae*. Ειδικότερα αναγράφεται ότι για την μόλυνση ατόμου από το *Plasmodium vivax*, αρκεί να μεταγγιστούν μόνο δέκα παράσιτα. Εκτός των μεταγγίσεων η κύρια μετάδοση στον ανθρώπινο πληθυσμό πραγματοποιείται μέσω μολυσμένων κωνόπων. Ακόμα εξαιρώντας τα εισαγόμενα κρούσματα που αναφέρονται ετησίως, από το 2009 υπάρχουν κρούσματα στον ελλαδικό χώρο με δείκτη εγχώριας μετάδοσης. Αναφορικά το 2011 σύμφωνα με το ΚΕΕΛΠΝΟ καταγράφηκαν τα περισσότερα κρούσματα (42 αριθμητικά). Από την πλευρά της αιμοδοσίας, αποκλείονται οι περιοχές που υπάρχει ενδημικότητα της νόσου και οι αιμοδοτές που έχουν ταξιδέψει σε αυτές. Τέλος, για δύο έτη από την πλήρη ίαση της ελονοσίας, τα άτομα που νόσησαν αποκλείονται από την αιμοδοσία.^{19,20}

– Νόσος variant Creutzfeldt-Jakob

Η παραλλαγή της νόσου Creutzfeld – Jakob (vCJD), είναι μία σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια, που προκύπτει μετά από την έκθεση στην παθολογική ισομορφή της πρωτεΐνης *prion*, η οποία συσσωρεύεται στον εγκέφαλο. Η αιτία έκθεσης είναι η κατανάλωση μολυσμένων με *prions* βοοειδών. Λόγω της έξαρσης στην Αγγλία το 1989, ονομάστηκε νόσος των τρελών αγελάδων. Προληπτικά μέτρα που εφαρμόζονται στην αιμοδοσία είναι: η λευκαφαίρεση των προϊόντων, η μη κλασματοποίηση των παραγώγων από το Ηνωμένο Βασίλειο, καθώς και η ενσωμάτωση στο ερωτηματολόγιο του αιμοδότη αν έχει διαμείνει στο Ηνωμένο Βασίλειο κατά το χρονικό διάστημα 1980 – 1996.¹⁷

Στο Ηνωμένο Βασίλειο έχουν αναφερθεί τέσσερα κρούσματα μετάδοσης της νόσου, μέσω μετάγγισης μη λευκαφαιρεμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων, αιμοδοτών που διένυαν την ασυμπτωματική φάση της νόσου, ενώ υπάρχουν ενδείξεις και για ένα μη επιβεβαιωμένο περιστατικό μετάδοσης σε αιμορροφιλικό ασθενή έπειτα από χορήγηση παράγοντα VIII. Μόνο σε πειραματόζωα υπάρχουν ενδείξεις μετάδοσης μέσω χρήσης κλασματοποιημένων παραγόντων ενώ κλινικά στο ανθρώπινο γένος παραμένει μόνο σε θεωρητικό επίπεδο.^{21,22} Ακόμα πειραματικά έχει αποδειχθεί ότι η αδρανοποίηση των παραγώγων δε βοηθά στην αδρανοποίηση των *prions*. Η διάγνωση της νόσου είναι εξαιρετικά δύσκολη, δεδομένου του ότι διαγιγνώσκεται μέσω των συμπτωμάτων, δεν υπάρχουν εργαστηριακές μέθοδοι διάγνωσης και ταυτοποιείται μόνο μεταθανάτια κατόπιν βιοψίας εγκεφάλου.^{23,24} Άρα ύψιστης σημασίας παγκοσμίως θεωρείται η συγκεκριμένη νόσος για τις υπηρεσίες αιμοδοσίας και των κέντρων αίματος.

– Ιός του Δυτικού Νείλου (WNV)

Ο ιός του δυτικού Νείλου, ανήκει στην οικογένεια Flaviviridae και είναι ένας RNA ιός. Φυσική δεξαμενή του ιού είναι τα πτηνά και ο τρόπος μετάδοσης στον άνθρωπο, είναι μέσω μολυσμένου κώνωπα, ο οποίος είναι ενδιάμεσος ξενιστής. Το 2002 καταγράφεται η πρώτη μετάδοση μέσω μετάγγισης αίματος. Το 80% των περιστατικών εμφανίζεται ασυμπτωματικό, το 20% εμφανίζει ήπια κλινικά συμπτώματα μίας αυτό-περιοριζόμενης εμπύρετης φλεγμονής, ενώ λιγότερο από το 1% μπορεί να εμφανίσει σοβαρή κλινική εικόνα, με συμμετοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως μηνιγγιοεγκεφαλίτιδα ή οξεία χαλαρή παράλυση.

Σύμφωνα με το ΚΕΕΛΠΝΟ, το 2010 εμφανίστηκε για πρώτη φορά επιδημία της νόσου στην Βόρεια Ελλάδα, με 262 εργαστηριακά επιβεβαιωμένα κρούσματα. Σε συνέχεια της εποχικής ενδημικότητας της νόσου, πλέον θεωρείται αναγκαία η εργαστηριακή διερεύνηση των δοτών αίματος. Σε περίοδο έξαρσης και σε περιοχές με ενδημικότητα πραγματοποιείται έλεγχος των αιμοδοτών έναντι του ιού μέσω ορολογικών, αλλά και μοριακών μεθόδων, ενώ οι περιοχές με ενδημικότητα αποκλείονται προσωρινά από την αιμοδοσία.^{13,25}

– **Treponema Cruzi (νόσος Chagas)**

Το πρωτόζωο *Treponema Cruzi* είναι η αιτία εκδήλωσης της νόσου Chagas, η οποία ενδημεί στην Νότια και Κεντρική Αμερική. Η εμφάνιση της νόσου σε μη ενδημικές περιοχές, οφείλεται στην μαζική μετανάστευση, γεγονός που καθιστά το *Treponema cruzi* ένα αναδυόμενο παθογόνο. Όπως και τα υπόλοιπα παθογόνα, η μετάδοση της νόσου μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω μετάγγισης μολυσμένου αίματος. Αποτελεί ένα παθογόνο ήπιας συμπτωματολογίας, και το 30-40% των ασθενών που δεν λαμβάνουν θεραπεία αναπτύσσουν καρδιόπαθεια και γαστρεντερική δυσλειτουργία, σαν τελική επιπλοκή της χρόνιας νόσου.^{4,13}

Στην Αμερική στην οποία ενδημεί κατά κύριο λόγο το παθογόνο, η ανίχνευση του στους αιμοδοτές, πραγματοποιείται με ανοσοενζυμικές μεθόδους. Επιπρόσθετα, υπάρχουν συμπληρωματικές επιβεβαιωτικές μέθοδοι, όπως η ράδιο-ανοσοκαθίζηση (RIPA) . Λόγω της αυξανόμενης μετανάστευσης παραμένει υψηλός ο κίνδυνος μετάδοσης μέσω μετάγγισης.²⁶

– **Babesia**

Το παθογόνο *Babesia* είναι ένα ενδοερυθροκυτταρικό παράσιτο, το οποίο προκαλεί την Μπαμπεσίωση, μία ζωνόσο με ήπια συμπτωματολογία. Το παράσιτο μεταδίδεται μέσω του αρthropόδου κρότωνα, που είναι ενδιάμεσος ξενιστής, αλλά και μέσω μολυσμένου αίματος. Αναφέρεται ότι είναι το πιο συχνό μεταδιδόμενο παθογόνο μέσω μετάγγισης στις Η.Π.Α. Τα αυξημένα περιστατικά μετάδοσης προκύπτουν λόγω του γεγονότος, ότι οι φορείς - αιμοδοτές δεν εμφανίζουν συμπτώματα για πολλούς μήνες από την περίοδο της έκθεσης μέχρι την εκδήλωση της νόσου, με παράλληλη παρασιταϊμία. Στην περίπτωση μετάγγισης, ειδικές ομάδες ασθενών, όπως οι ανοσοκατεσταλμένοι, έχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης σοβαρών επιπλοκών. Σε

περιοχές που ενδημεί η νόσος, πραγματοποιείται ορολογικός και μοριακός έλεγχος των αιμοδοτών, μέσω ανοσοφθορισμού και ανίχνευσης DNA. Ωστόσο δεν συμπεριλαμβάνεται στον υποχρεωτικό έλεγχο των αιμοδοτών καθώς καμία μέθοδος δεν είναι εγκεκριμένη από το Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των Η.Π.Α. (F.D.A.).^{27,28}

– **Borrelia**

Η *Borrelia burgdorferi* είναι ένα βακτήριο το οποίο προκαλεί την βορρελίωση ή νόσο του Lyme. Μεταδίδεται μέσω κρότωνα και τα τελευταία χρόνια έχει προβληματίσει αρκετά την επιστημονική κοινότητα, σχετικά την ασφάλεια του μεταγγιζόμενου αίματος. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι ενδεχομένως το συγκεκριμένο βακτήριο να ακολουθεί την ίδια οδό αιματογενώς, όπως και η σύφιλη. Ασθενείς στην πρώτη φάση της νόσου χωρίς να έχουν λάβει θεραπεία εμφανίζουν βακτηραιμία. Ακόμα είναι σημαντικό το γεγονός ότι καταφέρνει να διατηρήσει την βιωσιμότητα του και μετά την επεξεργασία των παραγώγων. Ωστόσο, δεν έχει καταγραφεί κάποιο περιστατικό μετάδοσης μέσω μετάγγισης, γεγονός το οποίο είναι πιθανό να οφείλεται στην βασική θεραπεία με αντιβιοτικά των νοσηλευόμενων ασθενών.²⁹⁻³¹

– **Άλλοι παράγοντες**

Φυσικά υπάρχουν και άλλοι παράγοντες, άξιοι αναφοράς, που απασχολούν τους επιστήμονες ως αναδυόμενα παθογόνα, όπως ο ιός της ηπατίτιδας E (HEV), ιός της ηπατίτιδας A (HAV), ο Parvovirus B19, ο ιός *Coxiella burnetii*, η *Leishmania*, η *Ehrlichia*, ο ιός του Δάγγειου πυρετού, ο ιός *Chikungunya*, ο ιός Zika, και κορωνοϊοί όπως ο SARS-CoV και MERS-CoV.³²⁻³⁴

Ο HEV είναι γνωστό ότι μεταδίδεται μέσω της κοπροστοματικής οδού, ωστόσο τα τελευταία έτη υποστηρίζεται ότι υπάρχει δυνατότητα μετάδοσης μέσω αίματος, λόγω της υψηλής ιαιμίας σε αιμοδότες.³⁵

Ο HAV είναι ένας μη ελυτροφόρος ιός ο οποίος προβλημάτισε τον τελευταίο καιρό την επιστημονική κοινότητα. Η μετάδοση του ιού πραγματοποιείται διαμέσου της κοπροστοματικής οδού και δεν υπάρχουν χρόνιοι φορείς. Η πιθανότητα μετάδοσης του ιού, ενός ασυμπτωματικού φορέα θεωρείται σπάνιο και για το λόγο τα κέντρα αίματος δεν προβαίνουν σε εξέταση του συγκεκριμένου ιού. Ωστόσο έχουν βρεθεί περιστατικά μετάδοσης από ασυμπτωματικούς αιμοδότες με ιαιμία.³⁶

Ο ανθρώπινος παρβοϊός B19 είναι ένας μη ελντροφόρος ιός, ο οποίος έχει επιβεβαιωθεί ότι μεταδίδεται μέσω του αίματος και των παραγώγων του. Η συμπτωματολογία εξαρτάται από την ηλικία και την κατάσταση του ατόμου. Μέχρι τώρα δεν υπάρχει εγκεκριμένη εξέταση από τον FDA που να έχει συμπεριληφθεί στον έλεγχο των αιμοδοτών.^{13,32,37}

Το Gram (-) βακτήριο *Coxiella burnetii*, αίτιο της εμφάνισης του πυρετού Q, είναι ένα παθογόνο το οποίο μεταδίδεται μέσω αερολυμάτων και μέσω του μολυσμένου γάλακτος. Ακόμα, έχει βρεθεί ότι μεταδίδεται μέσω μετάγγισης μολυσμένου αίματος και παραγώγων. Συγκεκριμένα, έχει ταυτοποιηθεί περιστατικό μετάδοσης μέσω αίματος στην μεγάλη επιδημία στην Ολλανδία το διάστημα 2007-2010.^{32,37}

Το παράσιτο *Ehrlichia*, αίτιο της ζωνόσου ερλιχίωσης μεταδίδεται μέσω κροτώνων. Υπάρχει δυνατότητα μετάδοσης μέσω μετάγγισης προϊόντων αίματος σύμφωνα με πηγές.^{32,38}

Δύο ακόμα μεταδιδόμενες λοιμώξεις μέσω αρθροπόδων ο ιός του Δάγγειου πυρετού και ο ιός Chikungunya, έχουν την απαιτούμενη προσοχή από το επιστημονικό κοινό σχετικά με την ασφάλεια των μεταγγίσεων, λόγω της μη ύπαρξης εγκεκριμένων εμπορικών εξετάσεων ελέγχου.³⁹ Έχουν ταυτοποιηθεί 3 περιστατικά μέχρι σήμερα μετάδοσης του Δάγγειου πυρετού.³²

Η έξαρση και η επιδημία του ιού Zika το 2015, είχε ως αποτέλεσμα τέσσερα ύποπτα περιστατικά μετάδοσης μέσω μετάγγισης αίματος, σε ενδημικές περιοχές του ιού. Δεν έχει επιβεβαιωθεί ωστόσο, αν ο ιός μεταδίδεται μέσω αίματος.³⁴

2.1.3 ΛΟΙΠΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ

Η βακτηριακή επιμόλυνση του αίματος, συνεχίζει να αποτελεί πρόκληση για τις υπηρεσίες αιμοδοσίας, και να προκαλεί ανεπιθύμητα συμβάματα έως και σηπτικό σοκ σε μεταγγιζόμενους ασθενείς. Η αντίδραση από την μετάγγιση μολυσμένου παραγώγου, εξαρτάται από την μικροβιακή πυκνότητα αυτού, ενώ η βαρύτητα της αντίδρασης καθορίζεται και από το τύπου του μικροβίου. Αίτια θεωρούνται Gram (+) ή (-) μικροοργανισμοί, με τους πρώτους να θεωρούνται λιγότεροι επικίνδυνοι και τους δεύτερους να θεωρούνται περισσότερο επικίνδυνοι λόγω του shock που

προκαλούν μετά την έκλυση της ενδοτοξίνης. Στις μεταγγίσεις RBCs, η συχνότητα εμφάνισης βακτηριακής επιμόλυνσης είναι 1:100.000. (Πίνακας 1)^{1,8}

Η προέλευση των βακτηρίων, μπορεί να είναι η φυσιολογική χλωρίδα δέρματος του δότη, το περιβάλλον, ή και ο ίδιος ο δότης σε περίπτωση ασυμπτωματικής βακτηριαμίας. Η βακτηριακή επιμόλυνση μπορεί επίσης να προκύψει, έπειτα από την μη σωστή διαχείριση του ασκού κατά την αποθήκευση και επεξεργασία του. Αποτελεί πρόκληση η ανίχνευση μιας εν δυνάμει βακτηριακής επιμόλυνσης, καθώς μετά την λήψη τα βακτήρια είναι σε χαμηλά επίπεδα. Τα αιμοπεταλιακά παράγωγα αίματος, πρέπει να παρακολουθούνται περισσότερο, καθώς φυλάσσονται σε ευνοϊκότερες συνθήκες για το πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών.^{13,40}

Τα παράγωγα αιμοπεταλίων είναι περισσότερο επιρρεπή στην βακτηριακή επιμόλυνση, λόγω των ευνοϊκών συνθηκών αποθήκευσης, ως προς την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των παθογόνων. Στις Η.Π.Α. η πιο συνήθης μέθοδος ανίχνευσης παθογόνων στα αιμοπεταλιακά παράγωγα, είναι η καλλιέργεια μετά την πρώτη μέρα αποθήκευσης. Για το περιορισμό του κινδύνου μετάγγισης βακτηριακά επιμολυσμένου παραγώγου, έχουν εφαρμοστεί επιπλέον μέθοδοι όπως η προσεκτική επιλογή αιμοδοτών, η αποστειρωμένη φλεβοτομή, η θερμοθέτηση ακριβών χειρισμών των ασκών από το προσωπικό της αιμοδοσίας, η ενίσχυση των μεθόδων ανίχνευσης των βακτηρίων και η διαρκή ανάπτυξη των μεθόδων αδρανοποίησης των παθογόνων.^{41,42}

Πίνακας 1: Πιο συχνά αίτια βακτηριακής επιμόλυνσης στην Αιμοδοσία

Gram (+) βακτήρια	Gram (-) βακτήρια
Staphylococcus aureus	Accinobacter
Staphylococcus epidermidis	Klebsiella
Corynebacterium species	Escherichia coli
Micrococcus species	Enterobacter
Streptococcus pneumoniae	Pseudomonas
Streptococcus viridans	Salmonella species
	Serratia Marsescens
	Yersinia enterocolitica

2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ

Οι νέες μοριακές και ορολογικές μέθοδοι ανίχνευσης των παθογόνων, μεγαλύτερης ακρίβειας και ευαισθησίας, έχουν συμβάλει στην ασφάλεια του αίματος. Ωστόσο, όσο και εξελιγμένα τεχνολογικά και με υψηλή τεχνογνωσία να είναι τα κέντρα αίματος, συνεχίζει να ελλοχεύει κίνδυνος επιμόλυνσης και μετάδοσης νέων, αναδυόμενων αλλά και ήδη γνωστών παθογόνων. Αυτό το γεγονός, οδήγησε στην ανάπτυξη τεχνικών που στοχεύουν στην εκμηδένιση του κινδύνου, όπως οι τεχνικές αδρανοποίησης οι οποίες εφαρμόζονται τα τελευταία 20 χρόνια.^{17,43}

Οι τεχνικές περιορισμού των παθογόνων (*Pathogen Reduction Technologies - PRT*) αναφέρονται στο σύνολο των διαφόρων μεθόδων και τεχνικών, οι οποίες έχουν ως σκοπό την ελαχιστοποίηση των παθογόνων και των αντιδράσεων κατά την μετάγγιση. Οι PRT κατατάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες και σχετίζονται με την α) αριθμητική μείωση των παθογόνων (reduction) και β) την αδρανοποίησή τους (inactivation). Όσον αφορά στην μείωση των παθογόνων η πιο διαδεδομένη πρακτική, είναι η νανοδιήθηση με τη χρήση υψηλής διήθησης φίλτρων και νανοφίλτρων. Άλλες κοινές πρακτικές που χρησιμοποιούνται είναι η καθυστέρηση της ψύξης του ολικού αίματος, με αποτέλεσμα να φαγοκυτταρώνονται τα μικρόβια από τα λευκά αιμοσφαίρια και η λευκαφαίρεση.⁴⁴

Από την άλλη πλευρά υπάρχουν οι τεχνικές αδρανοποίησης των παθογόνων (*Pathogen Inactivation - PI*) οι οποίες στοχεύουν στην μείωση των επιπέδων της μολυσματικότητας και παθογονικότητας των μικροοργανισμών με χρήση χημικών μέσων συνήθως σε συνδιασμό με ακτινοβολία. Εκτός της χρήσης των συγκεκριμένων τεχνικών για την αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών, χρησιμοποιούνται επιπρόσθετα ως μέτρο πρόληψης έναντι συχνών αντιδράσεων μετάγγισης, που εμφανίζονται στους πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς (TA-GvHD). Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει κάποια κατευθυντήρια οδηγία που να υποχρεώνει την ένταξη των τεχνικών αδρανοποίησης, στη ρουτίνα προετοιμασίας του αίματος αλλά εφαρμόζονται σε αρκετές χώρες.^{43,45-47}

Στην σύγχρονη εποχή υπάρχουν αρκετές τεχνικές αδρανοποίησης με διαφορετική αποτελεσματικότητα ανά παράγωγο, διαφορετικό εύρος παθογόνων

μικροοργανισμών και διαφορετική αρχή λειτουργίας. Μια βασική κατάταξη των μεθόδων αφορά στον παράγοντα που χρησιμοποιείται και τις διακρίνει σε φυσικές, χημικές και φωτοδυναμικές. Στην παρούσα εργασία θα παρουσιαστούν οι σύγχρονες τεχνικές. Φυσικές τεχνικές όπως η παστερίωση, και η θέρμανση (δια ατμού ή ξηρή θέρμανση), είναι τεχνικές με αρκετά μειονεκτήματα όπως το εύρος κάλυψης παθογόνων και δεν χρησιμοποιούνται με την ίδια συχνότητα.⁴⁸

2.2.1 ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΑ ΜΕΣΑ

Οι μέθοδοι αδρανοποίησης παθογόνων μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το στόχο δράσης τους:

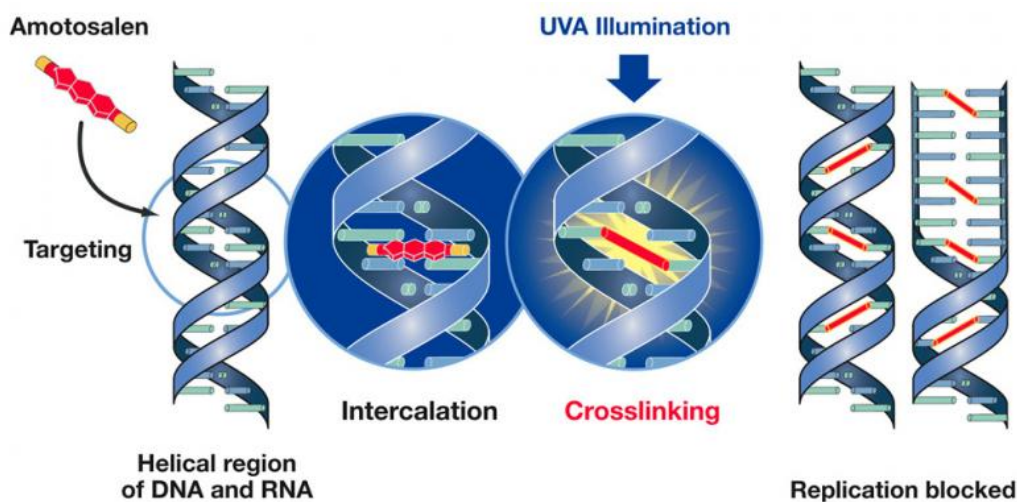
- Μέθοδοι που καταστρέφουν τα λιπίδια
- Μέθοδοι που καταστρέφουν/αδρανοποιούν τα νουκλεϊκά οξέα

Η αδρανοποίηση των παραγώγων αίματος στηρίζεται σε μεθόδους, που χρησιμοποιούν χημικά μέσα, ακτινοβολία ή και συνδυασμό των δύο παραπάνω. Οι φωτοχημικές αρχές μεθόδου (PhC) βασίζονται στην αλληλεπίδραση ενός χημικού παράγοντα με τα νουκλεϊκά οξέα, ενώ οι φωτοδυναμικές (PhD) μέθοδοι βασίζονται στην καταστροφή των νουκλεϊκών οξέων ή στην παρεμπόδιση των επιδιορθωτικών μηχανισμών τους. Στις πιο ευρέως διαδεδομένες τεχνικές υπάρχει συνδυασμός των μεθόδων στις οποίες ο χημικός παράγοντας αλληλεπιδρά με τα νουκλεϊκά οξέα, κατόπιν έκθεσης τους σε συγκεκριμένη ακτινοβολία.⁴⁴ Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να δημιουργήσει μη αναστρέψιμη βλάβη στα νουκλεϊκά οξέα. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να αναχαιτιστεί ο πολλαπλασιασμός και η ανάπτυξη των μεταδιδόμενων, με την μετάγγιση, παθογόνων μικροοργανισμών. Ωστόσο, οι συγκεκριμένες μέθοδοι δεν φαίνεται να αποδίδουν σε μη ελυτροφόρους ιούς, βακτηριακά σπόρια, και prions.⁴⁹

2.2.2 ΑΜΑΤΟΣΑΛΕΝ (S-59)/UVA LIGHT

Η τεχνική αματοσαλενίου ή S-59 (Intercept®, Cerus, USA) χρησιμοποιεί το φωτοευαίσθητο χημικό παράγοντα αματοσαλένιο σε συνδυασμό με υπεριώδη ακτινοβολία Α (UVA). Το υδροχλωρικό αματοσαλένιο αποτελεί συνθετική ένωση του ψωραλενίου, που ανήκει στην οικογένεια των φουροκουμαρινών, η οποία έχει την ιδιότητα να διαπερνά κυτταρικές - πυρηνικές μεμβράνες και το ΐκό καψίδιο και να

παρεμβάλλεται αντιστρεπτά (cross-linking) στην ελικοειδή περιοχή των νουκλεϊκών οξέων. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργούνται ομοιοπολικοί δεσμοί ανάμεσα στο υδροχλωρικό αματοσαλένιο και στις πυριμιδίνες των νουκλεϊκών οξέων και η αντίδραση είναι ειδική. Η έκθεση σε UVA (320-400nm) προκαλεί μία φωτοχημική αντίδραση η οποία μετασχηματίζει τους ήδη υπάρχοντες ομοιοπολικούς δεσμούς σε μη αντιστρεπτούς, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η αντιγραφή και η μεταγραφή των νουκλεϊκών οξέων.⁵⁰ (Εικόνα 1)



Εικόνα 1. Μηχανισμός δράσης της τεχνικής με αματοσαλένιο (Holbro et al., 2013). Στο παραπάνω σχήμα φαίνεται σε σχηματική αναπαράσταση ο μηχανισμός δράσης της αδρανοποίησης αιμοπεταλίων μέσω της τεχνικής INTERCEPT®

Ωστόσο, λόγω ότι η μέθοδος έχει ως στόχο το κυτταρικό DNA/RNA δημιουργεί προβληματισμό, σχετικά με τις μεταλλαξιγόνες επιπτώσεις στους μεταγγιζόμενους ασθενείς. Διάφορες μελέτες αναφέρουν ότι δεν υπάρχει τοξικότητα στην συγκέντρωση που χρησιμοποιείται.⁵¹ Ωστόσο, η εταιρεία συστήνει να μην χορηγούνται αδρανοποιημένα προϊόντα με περίσσεια αματοσαλενίου, για την μέγιστη ασφάλεια των ασθενών. Οπότε στην συγκεκριμένη τεχνική τελικό βήμα, μετά την έκθεση σε UVA, αποτελεί η αφαίρεση της επιπρόσθετης ποσότητας αματοσαλενίου με τελική συγκέντρωση < 2mM. Η συγκεκριμένη τεχνική φαίνεται να είναι αποτελεσματική για παράγωγα πλάσματος και αιμοπεταλίων και επιτρέπει την αδρανοποίηση ελάχιστης ποσότητας νουκλεϊκών οξέων, παρουσία άλλων βιομορίων.^{52,53}

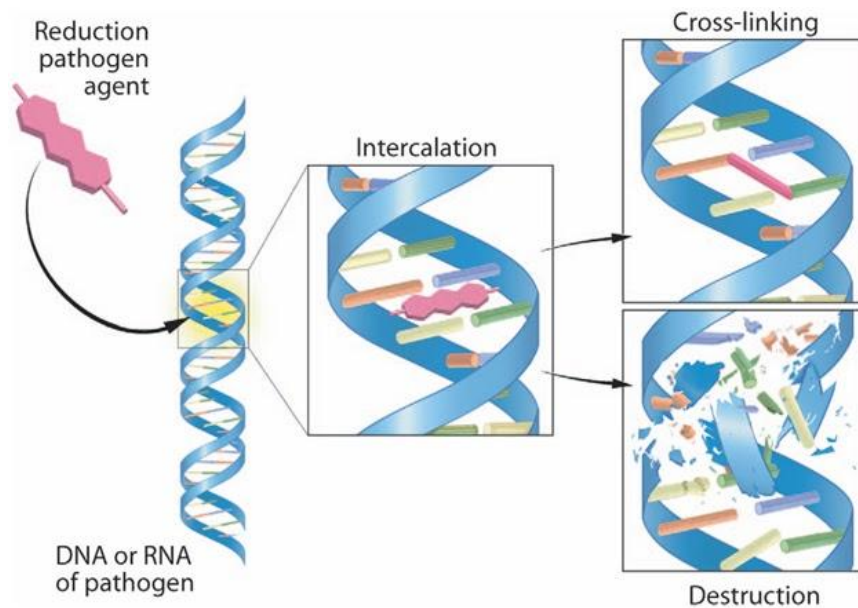
2.2.3 AMUSTALINE (S303)/GLUTATHIONE

Η συγκεκριμένη τεχνική αφορά στον συνδυασμό amustaline (S303) και γλουταθειόνης (Intercept®, Cerus, USA). Ο παράγοντας S303 είναι ένα μικρό μόριο που ανήκει στην κατηγορία FRALE (Frangible Anchor Linker Effector) και είναι επίσης ψωραλένιο. Χρησιμοποιείται αποκλειστικά σε προϊόντα αίματος και βρίσκεται σε κλινική μελέτη για την λειτουργία του, στα αιμοπετάλια. Το S303 παρεμβάλλεται στα νουκλεϊκά οξέα και πιο συγκεκριμένα συνδέεται ομοιοπολικά με τις αζωτούχες βάσεις, μέσω του δακτυλίου της ακριδίνης του S303. Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται όταν το pH μεταβάλλεται από όξινο σε ουδέτερο. Το αποτέλεσμα της μεταβολής αυτής, είναι η υδρόλυση και ο σχηματισμός του υποπροϊόντος S300 το οποίο είναι αδρανής χημική ένωση. Το μη συνδεδεμένο προϊόν αποδόμησης απομακρύνεται καθώς μεταβολίζεται. Το προϊόν σχηματίζεται παρουσία γλουταθειόνης για την αναστολή των παρενεργειών.⁵⁴⁻⁵⁶

2.2.4 RIBOFLAVIN (B₂)/UV LIGHT

Η τεχνική αδρανοποίησης Mirasol® (Terumo BCT, USA) χρησιμοποιεί την ριβοφλαβίνη, ως φωτοευαίσθητο παράγοντα, σε συνδυασμό με υπεριώδη ακτινοβολία. Η δομή του μορίου είναι επίπεδη με τρεις δακτυλίους και έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων νουκλεϊκών οξέων. Έπειτα από έκθεση σε ευρύ φάσμα ακτινοβολίας UVA/UVB (280-360 nm), ενεργοποιείται οξειδώνει την γουανίνη και σχηματίζονται ενεργές ρίζες οξυγόνου. Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου επιφέρουν μη αντιστρεπτή μεταβολή στις αζωτούχες βάσεις γουανίνης, που εμποδίζει την αντιγραφή και αποκατάσταση του DNA με την δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών.⁵⁷ (Εικόνα 2)

Η ριβοφλαβίνη ή B₂ είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη, η οποία ανευρίσκεται φυσικά στον ανθρώπινο οργανισμό και η παρουσία της είναι απαραίτητη. Λόγω της φυσικής της ιδιότητας δεν απαιτείται απομάκρυνση μετά την αδρανοποίηση και αυτό αποτελεί πλεονέκτημα συγκριτικά με την μέθοδο του S-59. Η συγκεκριμένη τεχνική θεωρείται ασφαλής και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα παράγωγα αίματος αν και υπάρχει έντονη μελέτη ως προς τις επιδράσεις στα έμμορφα στοιχεία.^{52,58,59}



Εικόνα 2. Μηχανισμός δράσης ριβοφλαβίνης σε συνδιασμό με UVB (Bryant and Klein, 2007. Στο παραπάνω σχήμα φαίνεται σε σχηματική αναπαράσταση ο μηχανισμός δράσης της αδρανοποίησης αιμοπεταλίων μέσω της τεχνικής Mirasol®

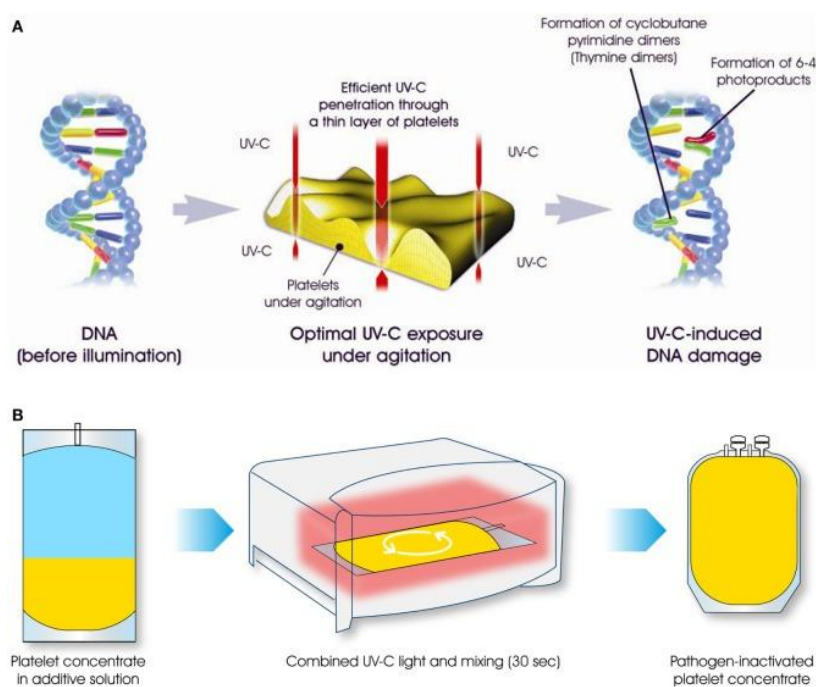
2.2.5 METHYLEN BLUE/LIGHT

Η τεχνική αδρανοποίησης κυανού του μεθυλενίου ή Methylene blue αποτέλεσε την πρώτη φωτοχημική τεχνική αδρανοποίησης παθογόνων και χρησιμοποιεί την φωτοδυναμική χρωστική Methylene Blue σε συνδυασμό με έκθεση σε ορατό φώς. Η συγκεκριμένη χρωστική έχει υψηλή συγγένεια προς τα αρνητικά φορτισμένα σωματίδια, όπως το ιϊκό περίβλημα και τα νουκλεϊκά οξέα. Ακόμα, σε ορατό φώς (590 nm) έχει την ιδιότητα να σχηματίζει ενεργές ρίζες οξυγόνου, με αποτέλεσμα την οξείδωση της γουανίνης, και να «σπάει», εν τέλει, την έλικα του νουκλεϊκού οξέος. Σύμφωνα με το παραπάνω, παρεμποδίζεται η αντιγραφή του DNA/RNA και ο πολλαπλασιασμός των παθογόνων.^{44,60}

Η αντίδραση είναι μη ειδική και οι ρίζες οξυγόνου αντιδρούν με νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια. Η τεχνική χρησιμοποιείται ευρέως στην Ευρώπη για την αδρανοποίηση κλασματοποιημένου πλάσματος. Ωστόσο σε πολλές χώρες καταργήθηκε λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης του Methylene Blue και της συσχέτισης τους με αλλεργικές αντιδράσεις. Ως αποτέλεσμα, θεωρείται απαραίτητη η απομάκρυνση της χρωστικής πριν τη χρήση.⁶⁰

2.2.6 UVC LIGHT

Η ακτινοβολία UVC (Theraflex®, Macopharma, France) μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο DNA, χωρίς την προσθήκη άλλης ουσίας. Η συγκεκριμένη τεχνική δεν χρησιμοποιεί κάποιο φωτοευαίσθητο παράγοντα, παρά μόνο ακτινοβολία UVC (200-280 nm). Η έκθεση σε ακτινοβολία με παράλληλη ανάδευση του παραγώγου, επάγει το σχηματισμό κυκλοβουτανικών - πυριμιδικών διμερών και εν τέλει την παρεμπόδιση της μεταγραφής των νουκλεϊκών οξέων. (Εικόνα 3) Ωστόσο, φαίνεται ότι δεν δρα με την ίδια αποτελεσματικότητα ως προς τα παθογόνα, όσο οι τεχνικές με S-59 και ριβοφλαβίνη. Επίσης η τεχνική βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές φάσης III και δεν έχει πιστοποιηθεί ακόμα για ευρεία χρήση.^{57,59,61}



Εικόνα 3. Μηχανισμός δράσης ακτινοβολία UVC (Seltsam, 2017). Στο παραπάνω σχήμα φαίνεται σε σχηματική αναπαράσταση ο μηχανισμός δράσης της αδρανοποίησης αιμοπεταλίων μέσω της τεχνικής Theraflex®

2.2.7 Γ-AΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

Η γ-ακτινοβολία αποτελεί μία φωτοδυναμική μέθοδο αδρανοποίησης, η οποία παράγεται από φωτόνια και είναι δυνατόν να πραγματοποιήσει αλλαγές σε επίπεδο μορίων. Όταν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί εκτίθενται σε γ-ακτινοβολία,

καταστρέφεται το DNA τους και είναι αδύνατος ο πολλαπλασιασμός τους. Συνήθως χρησιμοποιείται γ-ακτινοβολία έντασης 20-25 Gy.

2.2.8 SOLVENT DETERGENT

Η τεχνική αδρανοποίησης με SD (Solvent detergent), αποτελεί χημική μέθοδο και είναι μία από τις πρώτες τεχνικές PRT, που χρησιμοποιήθηκαν ευρέως την δεκαετία του 1980 σε δεξαμενοποιημένα FP/FFP για την αδρανοποίηση ιών και παρασίτων. Η αρχή μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα του διαλύτη/απορρυπαντικού SD να δρα στα λιπίδια της μεμβράνης. Με αυτό τον τρόπο, παρεμποδίζεται η πρόσδεση και ο πολλαπλασιασμός των ιών στα ανθρώπινα κύτταρα. Επιπρόσθετα, δρα σε άλλα παθογόνα όπως βακτήρια, πρωτόζωα και ενδοκυττάρους ιούς. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σε κυτταρικά παράγωγα λόγω διάλυσης των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών.⁴⁸

2.3 ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Τα αιμοπετάλια ή θρομβοκύτταρα αποτελούν ένα από τα βασικότερα κύτταρα του αίματος. Πρόκειται για απύρηντα θραύσματα κυττάρων, τα οποία έχουν σχήμα δισκοειδές (2-4μm), προέρχονται από τα μεγακαρυοκύτταρα και ο μέσος όρος ζωής τους είναι 5 ημέρες. Λειτουργούν ως κύριοι ρυθμιστές της αιμοστατικής ισορροπίας και έχουν καθοριστικό ρόλο στην θρόμβωση και την αιμορραγία.⁶²

2.3.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Τα αιμοπετάλια προέρχονται από το κυτταρόπλασμα των μεγακαρυοκυττάρων, τα οποία ανευρίσκονται στο μυελό των οστών και σε μικρότερο αριθμό στους πνεύμονες. Ο σχηματισμός τους αποτελεί μία διαδικασία αυτόματα ρυθμισμένη από τον οργανισμό. Βασικό χαρακτηριστικό τους είναι η απουσία πυρήνα, οπότε υπάρχει περιορισμένη δυνατότητα για *de novo* πρωτεϊνοσύνθεση. Παρόλα αυτά στα αιμοπετάλια υπάρχουν άλλα οργανίδια τα οποία επιτελούν σημαντικές λειτουργίες. Παραδείγματα αυτών, αποτελούν τα μιτοχόνδρια, το πυκνό σωληνοειδές σύστημα και τρεις διαφορετικούς τύπους κοκκίων που αναλύονται παρακάτω. Λόγω της έλλειψης πυρήνα και της ισχυρής ροής με παράλληλη υψηλή πίεσης που δέχονται στη κυκλοφορία, τα αιμοπετάλια ζουν μόλις 5 με 7 ημέρες. Κατά την διάρκεια της ζωής τους μειώνονται σε μέγεθος και με αυτό τον τρόπο διαχωρίζονται από τα νεαρά αιμοπετάλια. Στο τέλος της ζωής τους, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται ή ενσωματώνονται σε θρόμβους, διαφορετικά απομακρύνονται από τη κυκλοφορία μέσω των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων και μεταφέρονται στον σπλήνα για απομάκρυνση από τον οργανισμό.⁶³

Βασική λειτουργία των αιμοπεταλίων είναι ο σχηματισμός θρόμβων διαδραματίζοντας καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της αιμόστασης και της φυσιολογικής ροής του αίματος μέσα στα αγγεία. Κατά τη διαδικασία της αιμόστασης, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από το κατεστραμμένο ενδοθήλιο, από αλλαγές της αιματικής ροής, και από χημικούς διεγέρτες, με αποτέλεσμα την έκφραση της λειτουργικής τριάδας **προσκόλληση, έκκριση και συσσώρευση**. Τα φαινόμενα αυτά αλληλοκαλύπτουν το ένα το άλλο με τελικό αποτέλεσμα τον

αιμοπεταλιακό θρόμβο στον οποίο συμμετέχουν κι άλλα έμμορφα στοιχεία του αίματος.⁶⁴

Στο σημείο της ιστικής βλάβης αποκαλύπτονται ίνες κολλαγόνου, της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η **προσκόλληση** του αιμοπεταλίου στο κολλαγόνο, επιτυγχάνεται μέσω ειδικών υποδοχέων (γλυκοπρωτεΐνες) που διαθέτει και συνδέεται άμεσα ή έμμεσα. Έμμεση σύνδεση είναι μέσω του συμπλόκου της γλυκοπρωτεΐνης GPIb/V/IX με τον παράγοντα von Willebrand και η σύνδεση τους μεταβάλλει την στερεοδομή των αιμοπεταλίων. Αποτελεί την κύρια σύνδεση λόγω της αφθονίας της συγκεκριμένης γλυκοπρωτεΐνης στα αιμοπετάλια και της υψηλής πυκνότητας του παράγοντα vWF στην κυκλοφορία. Εξίσου σημαντικός μηχανισμός προσκόλλησης των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο που επικαλύπτει το ενδοθήλιο, είναι οι υποδοχείς GPVI, η θρομβοσπονδίνη, και οι GPIa/IIa που συνδέονται απευθείας με το κολλαγόνο της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM).⁶⁵⁻⁶⁷

Όλα τα μόρια σηματοδότησης οδηγούν στο τελικό κοινό μονοπάτι της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Οι ιντεγκρίνες στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, διαμορφώνονται καθ' αυτόν τον τρόπο και μεταβάλλεται η αρχικά χαμηλή συγγένεια σε υψηλή, προς τα σημεία πρόσδεσης. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν τρεις β1 ιντεγκρίνες: την α2β1 (GPIa/IIa) η οποία συνδέεται με το κολλαγόνο, την α5β1 που συνδέεται με την φμπρονεκτίνη και την α6β1 που συνδέεται με την λαμινίνη. Οι τρεις παραπάνω ουσίες αποτελούν μέρος της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Ακόμα εκφράζονται δύο τύποι β3 ιντεγκρινών: η ανβ3 που συνδέεται με την βιτρονεκτίνη και η αIIbβ3 (GPIIb/IIIa) που συνδέεται κυρίως με το ινωδογόνο.⁶⁸

Κατά το φαινόμενο της προσκόλλησης τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και αλλάζουν το σχήμα τους από δισκοειδές σε σφαιρικό, δημιουργούν ψευδοπόδια και μέσω φωσφορυλιώσεων κάποιων πρωτεϊνών αποκαλύπτονται υποδοχείς όπως ο GPIIb/IIIa οι οποίοι βοηθούν στην συσσώρευση κι άλλων αιμοπεταλίων στο σημείο της ιστικής βλάβης. Η ενεργοποίηση των ιντεγκρινών οδηγεί στην μεταβολή του κυτταροσκελετού και στην έκταση και συστολή του θρόμβου. Σε αυτό το στάδιο ενεργοποιείται η φωσφολιπάση A₂ στα αιμοπετάλια. Τέλος διαδραματίζει μεγάλο ρόλο η P-σελεκτίνη και ο υποδοχέας της PSGL-1 για την σύνδεση των αιμοπεταλίων με τα λευκοκύτταρα.⁶⁵⁻⁶⁷

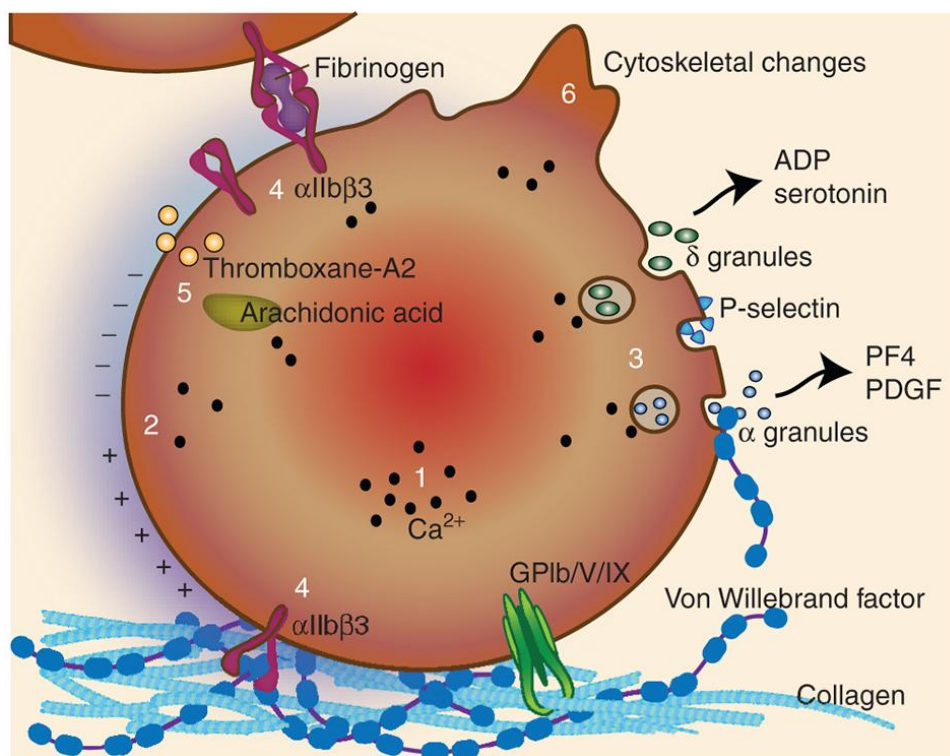
Η δεύτερη σημαντικότερη λειτουργία των αιμοπεταλίων είναι η **έκκριση** των κοκκίων του. Το κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων είναι άφθονο σε κοκκία. Τα αιμοπεταλιακά κοκκία απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους στο πλάσμα του αίματος μέσω καναλιών που ανοίγονται στο κυτταρόπλασμα. Τα συστατικά των κοκκίων των αιμοπεταλίων συμμετέχουν σε λειτουργίες οι οποίες αφορούν στην αιμόσταση, την φλεγμονή, την αγγειογένεση και την επούλωση των ιστών.⁶⁹

Τα κοκκία που περιέχουν διακρίνονται στα:

1. **πυκνά κοκκία:** Κάθε αιμοπετάλιο περιέχει 3 έως 8 πυκνά κοκκία από τα οποία καθένα περιέχει περισσότερα από 200 μικρά μόρια, όπως ATP, ADP, 5-HT, ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) και επινεφρίνη. Τα πυκνά κοκκία συγχωνεύονται στη μεμβράνη πλάσματος του αιμοπεταλίου με τη βοήθεια του συμπλόκου SNARE και VAMP8 και απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους στον εξωκυττάριο χώρο.
2. **α-κοκκία:** Το κάθε αιμοπετάλιο έχει 50-80 α-κοκκία τα οποία περιέχουν έναν αριθμό μεγαλύτερων πρωτεϊνών που απελευθερώνονται στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου ή στη κυκλοφορία του αίματος μετά από έκκριση των κοκκίων. Τα πρωτεϊνικά μόρια αφορούν σε χημεικίνες, αυξητικούς παράγοντες, παράγοντες πηκτικότητας και ινωδόλυσης καθώς και μόρια προσκόλλησης. Ένας από τους δείκτες ενεργοποίησης αιμοπεταλίων που απελευθερώνεται από τα α-κοκκία είναι η P-σελεκτίνη. Η P-σελεκτίνη προσκολλάται στο εξωτερικό της μεμβράνης πλάσματος του αιμοπεταλίου μετά από έκκριση των α-κοκκίων και λειτουργεί ως μέσο πρόσδεσης μεταξύ των αιμοπεταλίων και άλλων κυττάρων της κυκλοφορίας.⁶⁹⁻⁷¹
3. **λυσοσώματα:** Τα λυσοσώματα έχουν σημαντικό ρόλο καθώς είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι σημαντικές για την ενεργοποίηση τους και την έγκαιρη προσέλευση τους, όπου υπάρχει ανάγκη για σχηματισμό θρόμβου.⁷²

Από τις κυριότερες χημειοτακτικές ουσίες που εκκρίνονται είναι το ADP, η σεροτονίνη και η θρομβοξανή (TXA_2) που ενεργοποιούν και προσελκύουν περισσότερα αιμοπετάλια. Η σύνθεση της TXA_2 πραγματοποιείται μέσω του ενζύμου κυκλοξυγενάση-1 (COX-1) από τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Το ADP εκκρίνεται από τα πυκνά κοκκία. Μέσω των ουσιών που περιέχονται στα κοκκία και

των αντίστοιχων υποδοχέων τους ενεργοποιούνται αυτόματα κι άλλα αιμοπετάλια της κυκλοφορίας, χωρίς να έρθουν απαραίτητα σε επαφή με το κολλαγόνο. Τα αιμοπετάλια που προσελκύονται και αυτά με την σειρά τους αυτόματα εκκρίνουν ADP και TXA₂ ενεργοποιώντας ολοένα και περισσότερα αιμοπετάλια οδηγώντας στο επόμενο στάδιο που είναι η **συσσώρευση των αιμοπεταλίων**. Επιπρόσθετα στο κολλαγόνο, το ADP και την TXA₂ υπάρχουν κι άλλοι ενεργοποιητές των αιμοπεταλίων. Ο πιο σημαντικός που ανήκει στους ισχυρούς αγωνιστές μαζί με το κολλαγόνο, είναι η θρομβίνη. Με την έναρξη της πρωτογενούς αιμόστασης μέσω της εξωγενούς οδού, ενεργοποιείται ο καταρράκτης της πήξης και παράγεται μια μικρή ποσότητα θρομβίνης. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται μέσω των δύο ειδικών υποδοχέων που φέρουν για την θρομβίνη PAR-1 και PAR-4 και συμβάλλουν στην διαδικασία της δευτερογενούς αιμόστασης.^{73,74}



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση αιμοπεταλίου και λειτουργιών του. (Haley et al, Nature, 2014)

Παρουσιάζονται οι μηχανισμοί της προσκόλλησης, ενεργοποίησης, έκκρισης και συσσώρευσης του αιμοπεταλίου

Μόλις ενεργοποιηθούν τα αιμοπετάλια και αντίστοιχα η φωσφολιπάση A₂, γίνεται οξείδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στις οξειδωμένες δραστικές μορφές τους. Στο αιμοπετάλιο, το πιο κοινό λιπαρό οξύ στη μεμβράνη των φωσφολιπιδίων είναι το αραχιδονικό οξύ (AA). Το αραχιδονικό οξύ μεταβολίζεται και οδηγεί στη

δημιουργία θρομβοξάνης, κατά το βήμα της έκκρισης και συσσώρευσης. Στην οξείδωση συμμετέχουν δυο ένζυμα η κυκλοοξυγενάση-1 (COX-1) και η 12-λιποξυγενάση (12-LOX). (Εικόνα 4) Τα ένζυμα αυτά έχουν υποδοχείς που συζευγνύονται με την πρωτεΐνη G (GPCRs) στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Το 12-LOX οξειδώνει ελεύθερα λιπαρά οξέα για σχηματίσουν εικοσανοειδή (HETEs) που συμβάλλουν στη κυκλοφορία των κύτταρων στους ιστούς.⁷⁵

Κατά την σύνδεση μορίων στους υποδοχείς των αιμοπεταλίων, ενεργοποιούνται διάφορα μοριακά μονοπάτια τα οποία καταλήγουν στην κυτταρική ενεργοποίηση. Η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C- γ 2 (PLC- γ) ακολουθείται με την αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων των ιόντων ασβεστίου. Η αύξηση των ιόντων είναι προαπαιτούμενο για να πραγματοποιηθεί η έκκριση των κοκκίων, η ενεργοποίηση των ιντεγκρινών και η πηκτικής δραστηριότητα. Παράλληλα, η σύνδεση του ADP στους υποδοχείς P2Y₁₂ και P2Y₁ ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες G_i G_q και η θρομβοξάνη τον υποδοχέα της, TP. Η θρομβίνη ενεργοποιεί τους υποδοχείς PAR (PAR1 και PAR4) που αντίστοιχα ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες G_{12/13} και G_q. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες G οδηγούν στην αύξηση των ιόντων ασβεστίου και στην αλλαγή του κυτταροσκελετού.^{76,77}

Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια δεν εκκρίνουν μόνο ενεργοποιητές των υπόλοιπων αιμοπεταλίων αλλά παρουσία ιόντων Ca²⁺ συνδέονται και με το ινωδογόνο, που βρίσκεται στην κυκλοφορία, μέσω της άφθονης ιντεγκρίνης GPIIb/IIIa που υπάρχει στην κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Το ινωδογόνο μπορεί την ίδια στιγμή να συνδέεται με δύο γλυκοπρωτεΐνες GPIIb/IIIa δύο διαφορετικών αιμοπεταλίων λειτουργώντας με αυτό τον τρόπο σαν συνδετικός κρίκος ανάμεσα στα αιμοπετάλια.^{67,78,79}

Αυτή η σύνδεση αιμοπετάλιο-ινωδογόνο-αιμοπετάλιο εκκινεί την συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την συνέχιση της έκκρισης και απελευθέρωσης ουσιών από τα αιμοπετάλια. Ένας ακόμη, αλλά όχι κύριος τρόπος σύνδεσης των αιμοπεταλίων στο στάδιο αυτό μέσω των GPIIb/IIIa είναι μέσω μετατόπισης του παράγοντα vW. Κάθε αιμοπετάλιο φέρει στην κυτταρική του μεμβράνη περίπου 40.000 - 80.000 αντίγραφα της ιντεγκρίνης GPIIb/IIIa. Με αυτό το τρόπο σχηματίζονται πολλές συνδέσεις μεταξύ των αιμοπεταλίων και δημιουργούν ένα συσσωμάτωμα το οποίο ονομάζεται **αιμοπεταλιακός ή λευκός θρόμβος**.^{67,79,80}

Σημαντική είναι η προσφορά της επιφάνειας της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και πιο συγκεκριμένα, της αρνητικά φορτισμένης φωσφατιδυλοσερίνης (PS) η οποία, υπό φυσιολογικές συνθήκες, βρίσκεται στο εσωτερικό μέρος της διπλοστιβάδας των αιμοπεταλίων. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων αυξάνεται η ενεργότητα μεμβρανικών πρωτεϊνών (τρανσλοκάση, φλοπάση, σκραμπλάση). Σε αυτό το σημείο υπάρχει μετακίνηση και αύξηση ιόντων ασβεστίου και ενέργειας στο εσωτερικό των αιμοπεταλίων η οποία προκαλεί την **αναστροφή ή flip-flop** των ανιονικών φωσφολιπιδίων και της φωσφατιδυλοσερίνης από το εσωτερικό στρώμα της διπλοστιβάδας στο εξωτερικό μέσω των παραπάνω μεμβρανικών πρωτεϊνών. Με αυτό τον τρόπο η κυτταρική μεμβράνη φορτίζεται αρνητικά και η PS αλληλεπιδρά με τις θετικά φορτισμένες περιοχές του γ-καρβοξυλογλουταμινικού οξέος (Gla) των εξαρτώμενων από την βιταμίνη K παραγόντων που οδηγεί στην δευτερογενή αιμόσταση. Συνεπώς είναι σημαντική η συμβολή τους στην πήξη του αίματος.⁸¹

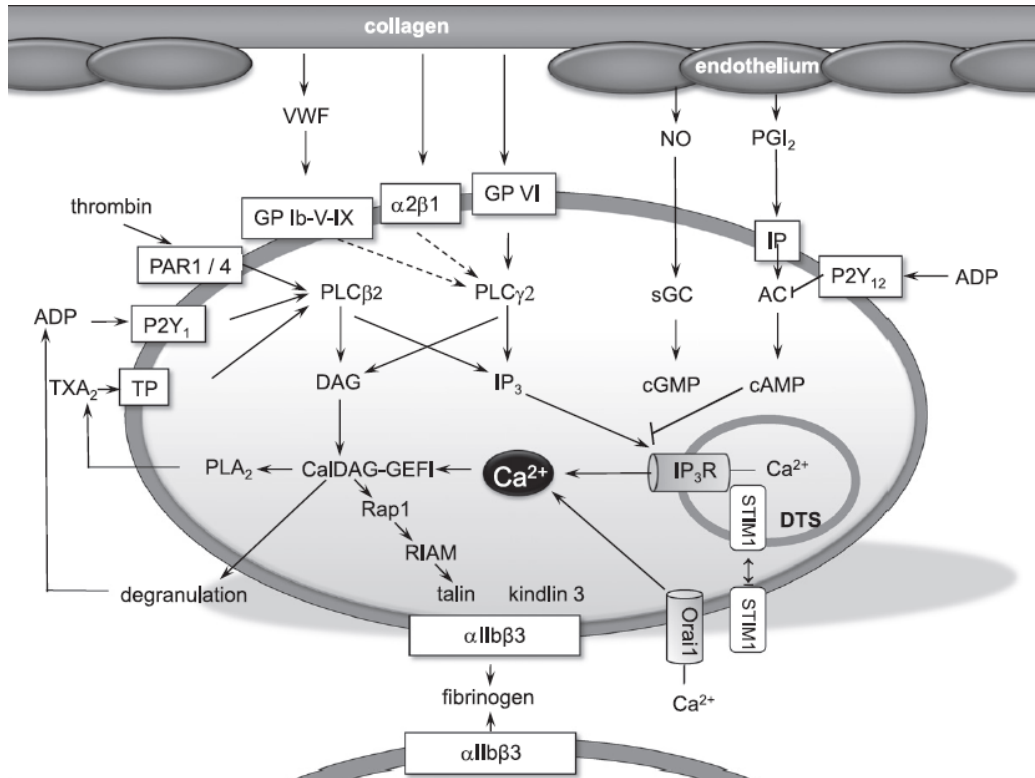
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και μέσω των μορίων που εκκρίνονται, όπως το ADP, η θρομβίνη και η TXA₂ ενισχύεται ακόμα περισσότερο η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνη G (GPCRs) και τις παρακείμενες πρωτεΐνες G (G_q, G_{12/13}, G_{j/z}) που επάγουν την πλήρη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και το σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου.⁸²

Κατόπιν της σύνδεσης με ενεργοποιητές, το αιμοπετάλιο αναδιαμορφώνεται. Η συγκεκριμένη διαδικασία πυροδοτεί τα μονοπάτια ενέργειας στο αιμοπετάλιο. Για την διατήρηση των επιπέδων ενέργειας φαίνεται ότι τα αιμοπετάλια χρησιμοποιούν τόσο τα μονοπάτια γλυκόλυσης όσο και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης για την σύνθεση μορίων ATP. Αναλόγως με τον παράγοντα ενεργοποίησης που συνδέεται στα αιμοπετάλια ενεργοποιείται είτε η γλυκόλυση είτε η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Είναι βέβαιο ότι και οι δύο οδοί μεταβολισμού και παραγωγής ATP έχουν ενεργό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας. Τα αιμοπετάλια χρησιμοποιούν το 57% της μιτοχονδριακής τους λειτουργίας ενώ η σύνθεση του ATP μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, αποτελεί το 60% του ολικού ATP.⁸³⁻⁸⁷

Η ενέργεια που χρειάζεται για την συνεχή παραγωγή ATP, από ADP και AMP παρέχεται κατά κύριο λόγο από την γλυκόζη και το γλυκογόνο. Ακόμα τα λιπαρά οξέα συνεισφέρουν στην παραγωγή ενέργειας, ενώ δεν είναι σίγουρη η αξιοποίηση

των αμινοξέων ως πηγή ενέργειας. Τα αιμοπετάλια στην αδρανή τους μορφή έχουν χαμηλά επίπεδα γλυκόλυσης και το περισσότερο ATP προέρχεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση του ADP. Κατόπιν της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης, αυξάνεται η σύνθεση ATP τόσο από την οξειδωτική φωσφορυλίωση όσο και την γλυκόλυση. Ωστόσο, αναστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης δεν επηρεάζει το σχήμα του αιμοπεταλίου, την συσσωρευτική ικανότητα, και την έκκριση των κοκκίων.⁸⁸

Τα αιμοπετάλια δεν είναι ικανά να συνθέσουν *de novo* αρκετή ποσότητα νουκλεοτιδίων αδενίνης. Ωστόσο μπορούν να συνθέσουν ATP από αδενίνη ή αδενοσίνη που προστίθεται τεχνητά στο υπόστρωμα του πλάσματος. Η αδενοσίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να μεταφερθεί από το πλάσμα, στο αιμοπεταλιακό κυτταρόπλασμα και ενδοκυττάρια μετατρέπεται μέσω φωσφορυλίωσης από ATP σε μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) μέσω κατάλυσης από την κινάση αδενοσίνης. Η αδενοσίνη συνεισφέρει στην αύξηση του αιμοπεταλιακού κυκλικού AMP (cAMP) μέσω του αναστολέα της φωσφοδιεστεράσης (IP). Το αιμοπεταλιακό cAMP αποτρέπει την αύξηση των ιόντων ασβεστίου που θα οδηγούσε σε ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου.⁸³⁻⁸⁷ (Εικόνα 5)



Εικόνα 5. Μοριακά μονοπάτια ενεργοποίησης και αναστολές αιμοπεταλίου (K. Broos et al. Thrombosis Research, 2012)

2.3.2 ΒΙΟΜΟΡΙΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

2.3.2.1 GPIba

Ο GPIba είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια υποδοχέων πλουσίων σε λευκίνη. Η συγκεκριμένη γλυκοπρωτεΐνη αποτελεί τον μοναδικό υποδοχέα που ανευρίσκεται στο μη ενεργοποιημένο αιμοπετάλιο και απαντάται στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη σε 50.000 αντίγραφα. Έχει υψηλή συγγένεια με τον vWF και συνδέεται με την A1 υπομονάδα του, μέσω του συμπλόκου με άλλες γλυκοπρωτεΐνες GPIIb/IX/V. Η παραπάνω σύνδεση επιτρέπει στα αιμοπετάλια να μεταφερθούν προς το σημείο της ιστικής βλάβης (προσκόλληση) και να αλληλεπιδράσουν με το υπενδοθήλιο, οδηγώντας στα επόμενα βήματα ενεργοποίησης άλλων υποδοχέων σύνδεσης με το κολλαγόνο. Κατά την διαδικασία αυτή αλλάζει η στερεοδομή του αιμοπεταλίου. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έχει θέση σύνδεσης για τη θρομβίνη. Έλλειψη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης (σύνδρομο Bernard – Soulier) ή του vWF (νόσος von Willebrand), προκαλεί σοβαρή αιμορραγική διαταραχή, γεγονός που αποδεικνύει το σπουδαίο ρόλο της αλληλεπίδρασης των παραπάνω παραγόντων στην αιμόσταση.⁸⁹⁻

92

2.3.2.2 GPVI

Ο GPVI είναι μία γλυκοπρωτεΐνη 60-65 kDa η οποία ανευρίσκεται στα αιμοπετάλια και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Ig). Αποτελεί έναν υποδοχέα σύνδεσης των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο. Η σύνδεση με το κολλαγόνο γίνεται απευθείας και δεν διαμεσολαβεί ο vWF. Παρά το γεγονός ότι η GPVI είχε αναγνωριστεί ως στοιχείο των αιμοπεταλίων, η σαφής λειτουργία της έγινε γνωστή τα τελευταία χρόνια. Η ανίχνευση ασθενών με έλλειψη ή ανεπάρκεια του GPVI ήταν ένα σημαντικό βήμα στην ταυτοποίηση αυτής της γλυκοπρωτεΐνης ως κρίσιμου υποδοχέα κολλαγόνου. Η πλήρης ή μερική ανεπάρκεια του GPVI είναι μια σπάνια ασθένεια, η οποία όταν εμφανίζεται προκαλεί ήπια αιμορραγική διαταραχή και τα αιμοπετάλια παρουσιάζουν μειωμένη συσσωρευτική ικανότητα μέσω του κολλαγόνου *in vitro*.⁸⁹

Στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη ο GPVI είναι συνδεδεμένος με τον υποδοχέα Fc της γ-αλυσίδας (FcR-γ). Αυτός ο υποδοχέας φέρει μοτίβα ενεργοποίησης ανοσοϋποδοχέων μέσω τυροσινών (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs, ITAMs) που είναι ενδοκυττάρια μεταγωγείς σήματος. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ο GPVI σε συνδυασμό με το κολλαγόνο οδηγούν σε μια οδό σηματοδότησης που περιλαμβάνει τη κινάση Syk και τη φωσφολιπάση Cγ2 (PLCγ2). Αυτά με την σειρά τους επάγουν την παραγωγή IP₃ και DAG η οποία οδηγεί σε αύξηση των ενδοκυττάρια επιπέδων ασβεστίου.^{65,90}

Ο ρόλος της συγκεκριμένης γλυκοπρωτεΐνης φαίνεται να αφορά περισσότερο την σηματοδότηση παρά τη δημιουργία σταθερής σύνδεσης αιμοπεταλίων. Αυτό συμπεραίνεται από το γεγονός, ότι η γλυκοπρωτεΐνη έχει χαμηλή συγγένεια σύνδεσης με το κολλαγόνο, ενώ το σύμπλοκο GPVI/FcR-γ σηματοδοτεί την αιμοπεταλιακή προσκόλληση στο κολλαγόνο.^{66,90}

2.3.2.3 GPIa/IIa

Ο GPIa/IIa ή ιντεγκρίνη α₂β₁ είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια β₁ των ιντεγκρινών. Ανευρίσκεται σε 2.000 - 4.000 αντίγραφα στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη και αποτελεί υποδοχέα σύνδεσης με το κολλαγόνο τύπου I και IV. Η σύνδεση με το κολλαγόνο είναι απευθείας και δεν διαμεσολαβεί ο vWF. Η συγκεκριμένη ιντεγκρίνη αποτελείται από δύο υπομονάδες α₂ για την σύνδεση με το κολλαγόνο και την β₁. Η σύνδεση της με το κολλαγόνο, οδηγεί ενδοκυττάρια στο κυτταρικό μονοπάτι της PLCγ₂ με παραγωγή IP₃ και αύξηση των ιόντων ασβεστίου.^{89,90}

2.3.2.4 GPIIb/IIIa

Η γλυκοπρωτεΐνη GPIIb/IIIa ή ιντεγκρίνη αIIbβ₃ αποτελείται από 2 υπομονάδες. Η υπομονάδα GPIIb ή αIIb αποτελείται από δύο ομοιοπολικά συνδεδεμένες αλυσίδες με δισουλφιδικούς δεσμούς, την μεγάλη (MB = 115 kDa) και τη μικρή (MB = 22 kDa). Η γλυκοπρωτεΐνη IIIa έχει μόνο μία πολυπεπτιδική αλυσίδα (MB = 90 kDa). Οι

συγκεκριμένες γλυκοπρωτεΐνες εμφανίζονται αποκλειστικά στα κύτταρα της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς ενώ στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη ανευρίσκονται σε 60.000 - 80.000 αντίγραφα καθιστώντας την ως την πρωτεΐνη με την υψηλότερη πυκνότητα στα αιμοπετάλια.^{67,79,90,93-96}

Η συγκεκριμένη ιντεγκρίνη διατηρεί θέσεις πρόσδεσης με το ινωδογόνο, την φιβρονεκτίνη, τον vWF και την βιτρονεκτίνη. Η συγγένεια της γλυκοπρωτεΐνης αλλάζει σύμφωνα με την κατάσταση του αιμοπεταλίου. Στα αδρανή αιμοπετάλια η GPIIb/IIIa εμφανίζει χαμηλή συγγένεια με το ινωδογόνο, ενώ κατά την ενεργοποίηση τους και την αλλαγή της στερεοδομής των αιμοπεταλίων εμφανίζει υψηλή συγγένεια με το ινωδογόνο. Στα αδρανή αιμοπετάλια απαντάται τόσο στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη αλλά και σε ένα σημαντικό ποσοστό στην μεμβράνη των α-κοκκίων. Όταν το αιμοπετάλιο εκκρίνει τα κοκκία, οι μεμβράνες των κοκκίων ενσωματώνονται στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη και εξωτερικεύονται επιπρόσθετοι υποδοχείς GPIIb/IIIa. Κατά την ενδοκυτταρική σηματοδότηση και την αύξηση των ιόντων ασβεστίου, πραγματοποιείται αναδιαμόρφωση και ενεργοποιείται ο GPIIb/IIIa ο οποίος είναι ικανός για σύνδεση με το ινωδογόνο. Κάθε μόριο ινωδογόνου διαθέτει δύο θέσεις πρόσδεσης για το GPIIb/IIIa και συνδέεται με δύο αιμοπετάλια συμμετέχοντας στην συσσώρευση αιμοπεταλίων. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που συμβαίνει μετά από ενδοθηλιακή βλάβη ή θραύση μιας αθηρωματικής πλάκας οδηγεί σε ενεργοποίηση του GPIIb/IIIa και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στην περιοχή.^{68,82,89,94-96}

Η δέσμευση των μορίων από το GPIIb/IIIa προκαλείται από την αλληλουχία αργινίνης-γλυκίνης-ασπαρτικού οξέος (RGD) και του γαλακτικού δωδεκαπεπτιδίου. Αυτή η αλληλουχία αναγνωρίστηκε αρχικά στη φιβρονεκτίνη, αλλά στη συνέχεια βρέθηκε στο ινωδογόνο, στο παράγοντα von Willebrand και στην βιτρονεκτίνη. Τα πεπτίδια που περιέχουν την αλληλουχία RGD είναι ικανά να αναστείλουν την αλληλεπίδραση GPIIb/IIIa και ινωδογόνου. Παρόλο που διάφορες συγκολλητικές πρωτεΐνες μπορούν να συνδεθούν με GPIIb/IIIa υπό κατάλληλες συνθήκες, το ινωδογόνο είναι η κύρια πρωτεΐνη που μεσολαβεί στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, και ο παράγοντας von Willebrand διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο και συνδέεται σε αυξημένη διατμητική τάση.⁹⁷

2.3.2.5 PAC-1

Η PAC-1 είναι μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιείται ως δείκτης ενεργοποίησης στα αιμοπετάλια. Συνδέεται με την ιντεγκρίνη $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) όταν αυτή εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη. Πιο συγκεκριμένα, η δεσμευμένη PAC-1 χρησιμοποιεί ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τη θέση σύνδεσης ινωδογόνου που εκτίθεται στην ενεργοποιημένη μορφή του GPIIb/IIIa υποδοχέα. Σύμφωνα με το παραπάνω, θετικότητα στο βιοδείκτη σημαίνει ενεργοποίηση της GPIIb/IIIa.. Με αυτό τον τρόπο, μέσω της κυτταρομετρίας ελέγχεται η ενεργότητα των αιμοπεταλίων.⁹⁸

2.3.2.6 Φωσφατιδυλοσερίνη - Αννεξίνη V

Η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) αποτελεί φωσφολιπίδιο της κυτταρικής μεμβράνης. Ακόμα φαίνεται ότι ρυθμίζει την πρόσληψη ιόντων ασβεστίου, την σύνδεση του υποστρώματος και την διέγερση της δραστηριότητας ενζύμων όπως η ακετυλοχολινεστεράση και ATP-άση. Στον άνθρωπο η συγκέντρωση της PS πραγματοποιείται σε όργανα με υψηλή μεταβολική δραστηριότητα.^{99,100}

Ακόμα, φαίνεται να έχει σπουδαίο ρόλο στην κυτταρική απόπτωση. Στο μοριακό μονοπάτι της απόπτωσης συμμετέχουν οι κασπάσες, οι οποίες είναι πρωτεάσες εκ των οποίων η κασπάση-3 συμβάλει στην αρχή του φαινομένου. Κατά το φαινόμενο αυτό, το κύτταρο μεταβάλλει την κατανομή των φωσφολιπιδίων στην εσωτερική και εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Η PS μεταφέρεται από την εσωτερική πλευρά στην εξωτερική όπου δρα ως σήμα αναγνώρισης και απομάκρυνσης του κυττάρου μέσω των φαγοκυττάρων. Συσχετίζοντας το παραπάνω μόριο με τα αιμοπετάλια με παρόμοιο μηχανισμό και μεταφορά του μορίου στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, συμμετέχει στην ενεργοποίηση τους και συμβάλει στην αιμόσταση με την προσφορά της αρνητικά φορτισμένης κυτταρομεμβράνης όπου λαμβάνει χώρα ο καταρράκτης της πήξης. Τα αιμοπετάλια αλλάζουν το δισκοειδές σχήμα τους σε σφαιρικό, μέσα σε 20 δευτερόλεπτα και με την έκκριση ATP από πυκνά σώματα γίνονται κανονικά μέσα σε 1 μόλις λεπτό.^{81,93,101}

Η Αννεξίνη V ή ανεξίνη A5 είναι μια πρωτεΐνη με αντισυγκολλητικές ιδιότητες που έχει υψηλή συγγένεια σύνδεσης και δεσμεύεται στο ανιόν της φωσφολιπιδικής ομάδας, όπως η φωσφατιδυλοσερίνη παρουσία ιόντων ασβεστίου. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη παράγεται φυσιολογικά από τον ανθρώπινο οργανισμό και έχει ανιχνευθεί σε διάφορους ιστούς και κύτταρα, όπως μυοκάρδιο, ενδοθήλιο αγγείων, χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες, γλοιοκύτταρα, αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα, κύτταρα Schwann, σκελετικά μυϊκά κύτταρα, οπτικό νεύρο, ηπατοκύτταρα και βρόγχους. Η χρήση της εργαστηριακά αποσκοπεί στην δέσμευση και ανίχνευση της έκφρασης της φωσφατιδυλοσερίνης στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων και κυρίως χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων.^{102,103}

Σχετικά με το ποσοστό της Αννεξίνης V, που υπάρχει στα διεγερμένα αιμοπετάλια, τα μέχρι τώρα στοιχεία δείχνουν πως φτάνει και σε ποσοστά έως 70%. Τα διεγερμένα αιμοπετάλια, προκαλούν διέγερση της ακτίνης και με τη σειρά της προκαλεί μια σειρά από άλλες αντιδράσεις που επιδρούν στην αναδιαμόρφωση της. Η σύνδεση της με την ακτίνη είναι πιο έντονη όταν υπάρχουν υψηλά ποσοστά ασβεστίου. Η δέσμευσή της στα αιμοπετάλια, γίνεται μετά από διέγερση της με κολλαγόνο ή/και με ADP. Επομένως η ανεξίνη V παίζει σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση διέγερσης και ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.^{104,105}

2.3.2.7 P-σελεκτίνη (CD62P)

Η P-σελεκτίνη είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στις επιφάνειες των ενεργοποιημένων κυττάρων. Στα μη ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, η P-σελεκτίνη αποθηκεύεται στα κοκκία Weibel-Palade, ενώ στα αδρανή αιμοπετάλια αποθηκεύεται στα α-κοκκία.

Η P-σελεκτίνη είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου 1 η οποία ανευρίσκεται στα α-κοκκία αιμοπεταλίων και μεγακαρυοκυττάρων. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η σύντηξη των α-κοκκίων με τη κυτταρική μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση της P-σελεκτίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Εκεί, ο πρωταρχικός ρόλος της P-σελεκτίνης είναι να μεσολαβήσει και να αλληλεπιδράσει με λευκοκύτταρα (κυρίως με μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα), μέσω της σύνδεσής της

με τους αντίστοιχους υποδοχείς αυτών των κυττάρων στις θέσεις αγγειακής βλάβης. Συνεπώς, η P-σελεκτίνη χρησιμοποιείται συνήθως ως δείκτης έκκρισης α-κοκκίων και μη αναστρέψιμης ενεργοποίησης αιμοπεταλίων.¹⁰⁶

Η έκθεση σε ερέθισμα ενεργοποίησης όπως η θρομβίνη, έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία μετατόπιση της P-σελεκτίνης στην κυτταρική επιφάνεια, αποφεύγοντας την ανάγκη μεταγραφής ή μετάφρασης. Η P-σελεκτίνη εκκρίνεται στην κυκλοφορία ως συστατικό των μικροσωματιδίων που προέρχονται από τα αιμοπετάλια και από τα μεγακαρυοκύτταρα ή, σε μικρές ποσότητες, ως ελεύθερο μόριο που δεν προσκολλάται στις διαμεμβρανικές περιοχές. Αυτές οι δύο μορφές διαλυτής P-σελεκτίνης είναι αυξημένες στον ανθρώπινο οργανισμό, σε περιπτώσεις αθηροσκλήρωσης και θρόμβωσης, και αποτελεί παράγοντα πρόβλεψης για μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάντα, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου και το εγκεφαλικό επεισόδιο. Τα επίπεδα της P-σελεκτίνης είναι επίσης αυξημένα σε περιόδους συστηματικής θρόμβωσης, διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης και επαγόμενης από ηπαρίνη θρομβοπενίας.

Η P-σελεκτίνη διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην αρχική προσκόλληση και την προσέλκυση αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων σε περιοχές τραυματισμού και φλεγμονής. Η πρόσδεση των κυττάρων στην P-σελεκτίνη υλοποιείται μέσω του υποδοχέα P-σελεκτίνης, την γλυκοπρωτεΐνη πρόσδεσης της P-σελεκτίνης -1 (PSGL-1). Η P-σελεκτίνη παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση και τη θρόμβωση μέσω σηματοδότησης της PSGL-1 σε λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια και της GPIIb στα αιμοπετάλια.¹⁰⁷

2.3.2.8 TRAP-6

Ο παράγοντας TRAP-6 ή το πεπτίδιο ενεργοποίησης του υποδοχέα της θρομβίνης (Thrombin Receptor Activator Peptide - SFLLRN) είναι ένας αγωνιστής του υποδοχέα PAR-1. Η θρομβίνη συνδέεται με τους υποδοχείς PAR-1 και τον PAR-4 και ενεργοποιεί τα σχετικά μοριακά μονοπάτια. Το παραπάνω πεπτίδιο είναι συνθετικό και μιμείται την δράση της θρομβίνης στον υποδοχέα PAR-1. Η χρήση του πεπτιδίου TRAP-6 έγκειται στην μελέτη της συσσωρευτικής ικανότητας έναντι συγκεκριμένων αγωνιστών. Η προσθήκη του πεπτιδίου TRAP-6 σε δείγμα

αιμοπεταλίων προκαλεί ισχυρή απόκριση ενεργοποίησης στη θρομβίνη χωρίς τις επιπλοκές της θρομβίνης όπως είναι η αναδιαμόρφωση του ινωδογόνου και ο σχηματισμός θρόμβου.^{89,108-111}

2.3.2.9 VASP

Η πρωτεΐνη VASP ή φωσφοπρωτεΐνη επαγόμενη από αγγειοδιαστολείς, είναι μία ενδοκυτταρική πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει στο μοριακό μονοπάτι cAMP, το οποίο συμβάλει στην αναστολή της ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου και της ενεργοποίησης – έκθεσης των GPIIb/IIIa. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ενεργοποίηση του αιμοπεταλίων μέσω του ADP, η σύνδεση του μορίου στον υποδοχέα του P2Y₁₂, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με μια G_i πρωτεΐνη, οδηγεί στην απελευθέρωση των δύο υπομονάδων της G_i, α_i και β_γ. Η α_i αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση, ελαττώνει τα επίπεδα του cAMP και της φωσφορυλιωμένης μορφής της VASP. Επίσης, η πρωτεΐνη VASP ρυθμίζει την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού μέσω της ακτίνης και είναι άμεσα συσχετισμένη με την έκκριση κυστιδίων. Η φωσφορυλιωμένη μορφή είναι ανενεργή.^{112,113}

2.3.2.10 Μόριο p38MAPK

Η p38MAPK ανήκει στην οικογένεια των ενεργοποιημένων πρωτεϊνικών κινασών από μιτογόνους παράγοντες και συμμετέχει στην μεταγωγή σημάτων και μοριακών μονοπατιών στα κύτταρα. Συγκεκριμένα σχετίζεται με την σηματοδότηση και ρύθμιση πολλών λειτουργιών, με κυριότερη αυτή της απόπτωσης. Ακόμα φαίνεται πως συμμετέχει στη μιτοχονδριακή λειτουργία και στην απελευθέρωση κυστιδίων και μιτοχονδρίων. Η ενεργοποίηση της p38 κινάσης πραγματοποιείται κατόπιν σχετικού ερεθίσματος, το οποίο οφείλεται είτε σε αγωνιστές των υποδοχέων των G-συζευγμένων πρωτεϊνών, είτε σε διάφορες μορφές κυτταρικού στρες. Στα αιμοπετάλια, η φωσφορυλίωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι συνυφασμένη με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω αγωνιστή καθώς και με φαινόμενα αποθηκευτική βλάβης και απόπτωσης.¹¹⁴⁻¹¹⁶

2.3.3 ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Η μετάγγιση των αιμοπεταλίων έχει στόχο είτε τη διακοπή είτε τη πρόληψη της αιμορραγίας σε ασθενείς που είτε έχουν υποστεί τραύμα, είτε είναι θρομβοκυτταροπενικοί ή τα αιμοπετάλια του οργανισμού τους έχουν κάποια δυσλειτουργία. Η μετάγγιση αιμοπεταλίων γίνεται σε ασθενείς με εμφανή αιμορραγία ή σε ασθενείς με αιμοπετάλια <500/μL. Την δεδομένη στιγμή στον ελλαδικό χώρο χρησιμοποιούνται στις μεταγγίσεις, δυο τύποι αιμοπεταλίων, τα αιμοπετάλια ανάκτησης και τα αιμοπετάλια αφαίρεσης. Μία τυπική μετάγγιση αιμοπεταλίων αποδίδει $3,0 \times 10^{11}$ αιμοπετάλια αιμοδότη σε θρομβοπενικό ασθενή.¹¹⁷

Για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας μετάγγισης αιμοπεταλίων σε ασθενή υπολογίζεται ο δείκτης διόρθωσης της αύξησης αιμοπεταλίων ή CCI (Corrected Count Increment).¹¹⁸ Για τον υπολογισμό του παραπάνω δείκτη απαιτείται να πραγματοποιηθεί μέτρηση του αριθμού αιμοπεταλίων πριν την μετάγγιση και 24 ώρες μετά την μετάγγιση. Ο τύπος που εφαρμόζεται είναι ο κάτωθι:

$$CCI = \frac{PLTs \text{ μετα την μετάγγιση} - PLTs \text{ προ μεταγγίσεως} \left(\frac{\text{count}}{\mu L} \right) * \text{Επιφάνεια σώματος} (m^2)}{\text{Σύνολο μεταγγισθέντων PLTs} * 10^{-11}}$$

Τα αιμοπετάλια ανάκτησης παράγονται από μια μονάδα αίματος, ύστερα από φυγοκέντρηση, εντός 6 ωρών μετά την αιμοδοσία. Τα αιμοπετάλια λαμβάνονται μετά από φυγοκέντρηση ολικού αίματος και διαχωρισμό τους από τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος.

Συνολικά μια μονάδα ολικού αίματος δίνει το 1/5 των αιμοπεταλίων που χρειάζεται για να συμπληρωθεί μια μονάδα πλάσματος. Μια μονάδα περιέχει συνολικά $45 - 85 \times 10^9$ PLTs σε 50 – 60 ml πλάσματος. Για την παραγωγή μίας μονάδας αιμοπεταλίων ανάκτησης χρειάζεται δόση από 4-6 αιμοδότες. Η μονάδα από αιμοπετάλια ανάκτησης προτού μεταγγιστεί ελέγχεται για βακτήρια και στη συνέχεια ακτινοβολείται προκειμένου να μειωθούν τα παθογόνα και ο κίνδυνος που υπάρχει λόγω των πολλαπλών δοτών. Οι κίνδυνοι σε μετάγγιση μονάδας ανάκτησης είναι αρκετοί. Ο λήπτης έχει κίνδυνο για εμφάνιση οξείας πνευμονικής βλάβης, εξαιτίας της μεγάλης ποσότητας πλάσματος που εισέρχεται στον οργανισμό του.

Το πλεονέκτημα των αιμοπεταλίων ανάκτησής είναι ότι ο συνδυασμός των δοτών δίνει μια τελική μονάδα προς μετάγγιση που είναι κοντά στο φαινότυπο του αίματος

του ασθενή. Αυτό μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης HLA, η οποία είναι συχνή σε περίπτωση μοναδικού δότη και μοναδικού λήπτη.¹¹⁹

Τα αιμοπετάλια αφαίρεσης συλλέγονται από έναν δότη. Καθημερινά, ο ανθρώπινος οργανισμός, παράγει αιμοπετάλια σε μεγάλες ποσότητες. Επομένως η συχνή αφαίρεση τους δεν βλάπτει τον δότη, αφού ο οργανισμός τα αντικαθιστά άμεσα. Συγκεκριμένα, για τη συλλογή τους χρησιμοποιείται ένα αυτόματο μηχάνημα κυτταροαφαίρεσης. Η μετάγγιση αιμοπεταλίων ενός δότη αποτελεί προτέρημα για τον λήπτη – ασθενή καθώς εκτίθεται σε ένα δότη και έτσι οι κίνδυνοι για μετάδοση παθογόνων ή δημιουργία αλλεργικών αντιδράσεων είναι λιγότεροι. Οι λήπτες είναι συνήθως καρκινοπαθείς που υποβάλλονται σε χημειοθεραπείες και εξαιτίας αυτού το ανοσοποιητικό τους σύστημα έχει εξασθενήσει. Ωστόσο, αυξάνεται ο κίνδυνος για αιμολυτικές αντιδράσεις σε περίπτωση που χορηγηθεί μονάδα ασύμβατη κατά ABO με τα αντισώματα του πλάσματος του λήπτη.

Η συλλογή των αιμοπεταλίων αφαίρεσης πραγματοποιείται συνεπικουρικά με τα αιμοπετάλια ανάκτησης, ενώ σε ορισμένες υπηρεσίες αιμοδοσίας δεν υπάρχουν προϊόντα αφαίρεσης. Η χρήση αυτόματου μηχανήματος δεν είναι χρονοβόρα για το προσωπικό, αλλά είναι χρονοβόρα η αιμοδοσία του δότη. Η μη κοινή χρήση παρά τα οφέλη της αιμοπεταλιαφαίρεσης οφείλεται στο υψηλότερο κόστος παραγωγής μία μονάδας αφαίρεσης συγκριτικά με τα κοινά αιμοπετάλια ανάκτησης.¹¹⁷

Σε περίπτωση μετάγγισης αιμοπεταλίων πραγματοποιείται έλεγχος των προαπαιτούμενων προϋποθέσεων. Είναι απαραίτητο οι μονάδες να χορηγούνται σε ασθενείς οι οποίοι έχουν άμεση ανάγκη για αιμοπετάλια. Αποτελεί βέλτιστη πρακτική να μεταγγίζονται συμβατές μονάδες κατά το ABO σύστημα, ώστε να μειώνονται οι πιθανότητες αντίδρασης. Η χορήγηση των αιμοπεταλίων πραγματοποιείται εντός 5-7 ημερών, διάστημα στο οποίο τα αιμοπετάλια διατηρούν τη λειτουργικότητά τους.¹²⁰

Ο απαιτούμενος αριθμός αιμοπεταλίων προς χορήγηση διαφέρει κατά περίπτωση. Σε περιπτώσεις αιμορραγίας χορηγείται δόση 10.000/μl PLTs, ενώ σε αναιμίες η δόση αυξάνεται σε 15.000 με 20.000/μl PLTs. Σε ασθενείς με σοβαρή και απειλητική για τη ζωή αιμορραγία χορηγείται μεγάλη δόση των 30.000-50.000/μL PLTs. Μεγάλο ποσοστό κλινικών ιατρών χορηγούν προεγχειρητικά αιμοπετάλια στους ασθενείς τους καθώς πιστεύεται πως χρειάζεται να έχουν τουλάχιστον 25.000/μL PLTs προκειμένου να αποφευχθούν οι αιμορραγίες κατά τη διάρκεια του χειρουργείου. Μια μεγάλη

δόση αιμοπεταλίων, μπορεί να προκαλέσει προβλήματα πήξης στο λήπτη, όπως για παράδειγμα θρομβώσεις. Σε ασθενείς με μη λειτουργικά αιμοπετάλια, μπορεί να πραγματοποιηθεί χορήγηση αιμοπεταλίων ακόμα και για τοπικές επεμβάσεις ή βιοψίες.¹²¹

2.3.4 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ – ΑΠΟΘΗΚΕΥΤΙΚΗ ΒΛΑΒΗ

Τα αιμοπετάλια αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου 20-24° C υπό ήπια ανάδευση μέσω ειδικών συσκευών ώστε να αποφευχθεί η συγκόλληση τους. Το διάστημα αποθήκευσης εξαρτάται από την τεχνική επεξεργασίας, το μέσο αποθήκευσης (πλάσμα ή άλλο πρόσθετο διάλυμα) και την τεχνική αδρανοποίησης. Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων πραγματοποιείται για μικρό χρονικό διάστημα 5-7 ημερών καθώς ακόμα και σε ιδανικές συνθήκες υπάρχει μειωμένη αιμοπεταλιακή λειτουργία και αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Κατά την συλλογή, παρασκευή και αποθήκευση των αιμοπεταλίων παρατηρείται ανάπτυξη μεταβολών στην δομή τους, στις ιδιότητες της αιμοπεταλιακής μεμβράνης, καθώς και στην φυσιολογία, τη βιοχημεία και το μεταβολισμό των αιμοπεταλίων. Όλες οι παραπάνω αλλαγές ονομάζονται αποθηκευτική βλάβη. Η αποθηκευτική βλάβη είναι μία πολυσύνθετη βιοχημική διαδικασία.

Το παραπάνω φαινόμενο είναι αποτέλεσμα της δράσης πολλών παραγόντων και του τρόπου με τον οποίον αυτοί επιδρούν στα αιμοπετάλια. Οι βιοχημικές μεταβολές συμβαίνουν παράλληλα και διακρίνονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες. Αρχικά, στα αιμοπετάλια που αποθηκεύονται, παρατηρείται αυξημένη γλυκόλυση, αλλαγή στο σχήμα και στην μορφή (από δισκοειδές σε σφαιρικό), ενεργοποίηση η οποία οδηγεί στην έκκριση των α-κοκκίων και επιπλέον επαγωγή του μηχανισμού της απόπτωσης, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του αριθμού και του χρόνου επιβίωσης.^{57,122-124}

Ο αυξημένος μεταβολισμός της γλυκόζης, οδηγεί μείωση του pH και στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. Ακόμα έχει καταγραφεί αυξημένη ενεργότητα των αιμοπεταλίων, που φαίνεται από την αλλαγή του σχήματος και την αύξηση στην έκφραση της Ρ-σελεκτίνης και της φωσφατιδυλοσερίνης στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη. Παράλληλα,

αναφέρεται αυξημένο οξειδωτικό στρες κατά το οποίο σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αυξημένη έκκριση αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων. Πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι η αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε κιτρικά άλατα, συμμετέχει στην αύξηση των φαινομένων της αποθηκευτικής βλάβης. Τα κιτρικά άλατα χρησιμοποιούνται ως αντιπηκτικό στα αιμοπετάλια αφαίρεσης. Ωστόσο, λόγω της μειωμένης διάρκειας χρήσης των αιμοπεταλίων στις 5-7 ημέρες υπάρχει ικανοποιητικό ποσοστό ανάκτησης της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων, *in vivo*, μετά τη μετάγγιση.^{89,125-127}

Αν και ένα μέρος της αποθηκευτικής βλάβης είναι αναστρέψιμο μετά την μετάγγιση και τα αιμοπετάλια ανακτούν την λειτουργικότητα τους, θα ήταν ωφέλιμο να υπάρχουν δείκτες που θα καθόριζαν την αποθηκευτική βλάβη. Υπάρχει αντικειμενική δυσκολία στην μελέτη της αιμοπεταλιακής λειτουργίας καθώς ο χειρισμός τους μπορεί να οδηγήσει πολύ εύκολα στην ενεργοποίησή τους. Ακόμα τα αποτελέσματα μετρήσεων *in vitro* δεν μπορούν να προβλέψουν την λειτουργία των αιμοπεταλίων μετά την μετάγγιση.^{128,129}

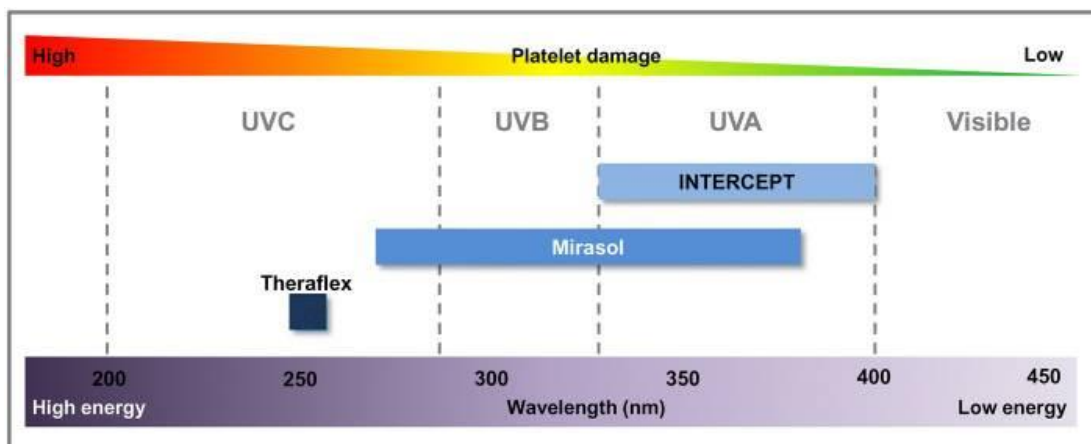
2.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν διάφορες τεχνικές αδρανοποίησης με διαφορετική αρχή μεθόδου και στόχο. Βάσει αυτού, για το κάθε ασταθές παράγωγο αίματος υπάρχουν ξεχωριστές τεχνικές που έχουν εγκριθεί και εφαρμόζονται ή βρίσκονται σε κλινικές φάσεις δοκιμών. Στην περίπτωση των Αιμοπεταλίων σύμφωνα με την βιβλιογραφία υπάρχουν τρεις συμβατές τεχνικές: Amatosalen (S-59)/UVA light Riboflavin (B2)/UV light, και UVC light. Από τις παραπάνω τεχνικές η τεχνική με υδροχλωρικό αματοσαλένιο και ριβοφλαβίνη έχουν εγκριθεί στην Ευρώπη και η ακτινοβολία με UVC είναι σε φάση δοκιμών.⁵⁹

Διάφοροι ερευνητές αναφέρουν ότι το οικονομικό κόστος αυξάνεται αρκετά και αποτελεί σημαντικό αποτρεπτικό παράγοντα για την καθολική εφαρμογή των συγκεκριμένων τεχνικών. Στον αντίποδα βρίσκονται εκείνοι που αναφέρουν, ότι οι μέθοδοι αδρανοποίησης είναι αποδοτικοί όσον αφορά στο κόστος, συγκριτικά με οποιαδήποτε παρέμβαση και επεξεργασία αίματος, που έχει ως στόχο την ασφάλεια. Την δεδομένη χρονική στιγμή, οι τεχνικές αδρανοποίησης εφαρμόζονται σε όλα τα PLTs που παράγονται στις χώρες Γαλλία, Ελβετία και Βέλγιο.¹³⁰⁻¹³²

Η βασική διαφορά των παραπάνω τεχνικών είναι το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και εν δυνάμει τα επίπεδα ενέργειας που χρησιμοποιούνται στα αιμοπετάλια. Σε μικρό μήκος κύματος υπάρχει αύξηση των επιπέδων ενέργειας, που πιθανά επάγει κυτταρικές βλάβες και επηρεάζει την κυτταρική λειτουργία. Οι μεταβολές που προκαλούνται έχουν απασχολήσει αρκετά την επιστημονική κοινότητα.¹³³ (Εικόνα 6)

Μία επιπλέον διαφορά είναι το χρονικό όριο ζωής των αιμοπεταλίων που στην περίπτωση του αματοσαλενίου και της ριβοφλαβίνης επιμηκύνεται στις 7 ημέρες ενώ στην χρήση ακτινοβολίας UVC είναι στις 5 ημέρες. Οι τρεις τεχνικές καλύπτουν μεγάλο εύρος παθογόνων όπως βακτήρια (Gram+/-), ιούς (ελυτροφόρους) και παράσιτα. Δεν υπάρχει η ίδια αποτελεσματικότητα στους μη ελυτροφόρους ιούς εξαιτίας του ιϊκού καψιδίου που λειτουργεί σαν εμπόδιο για τον φωτοευαίσθητο παράγοντα. Αντίστοιχα η αδρανοποίηση δεν είναι αποτελεσματική για τα *prions*, από τα οποία απουσιάζουν τα νουκλεϊκά οξέα.^{52,57,133,134}



Εικόνα 6. Συσχέτιση μήκους κύματος - ενέργειας μεθόδων και των βλαβών στα αιμοπετάλια (Levy et al., 2018)

Ο στόχος της αδρανοποίησης είναι πάντα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η αντιγραφή του γενετικού υλικού των παθογόνων και των υπολειπόμενων λευκοκυττάρων. Επομένως, οι συγκεκριμένες τεχνικές φαίνεται πως δεν επηρεάζουν το αιμοπετάλιο που είναι απύρηνο και στερείται της δυνατότητας πολλαπλασιασμού. Ωστόσο, αν και δεν διαθέτει πυρήνα, φέρει νουκλεϊκά οξέα όπως: mRNAs, miRNA, ριβοσωμικό RNA και μιτοχondριακής προέλευσης DNA (mtDNA), τα οποία είναι πολύ πιθανό να επηρεάζονται από τις παραπάνω τεχνικές. Η αλληλεπίδραση του χημικού παράγοντα, της υπεριώδους ακτινοβολίας και των αιμοπεταλίων μπορεί να επιφέρει αλλαγές στα υπόλοιπα βιομόρια.^{135,136}

3 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο τη κυτταροβιολογική μελέτη των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων, που προορίζονται για μετάγγιση. Για την καλύτερη κατανόηση της θεωρίας και την ολοκληρωμένη παρουσίαση του θέματος, παρακάτω θα πραγματοποιηθεί μια συστηματική ανασκόπηση, με στόχο την εύρεση και την ανάλυση των βιομορίων που εμπεριέχονται στα αιμοπετάλια, παίζουν καθοριστικό ρόλο στη μετάγγιση και επηρεάζεται η δομή και η λειτουργία τους από τις τεχνικές αδρανοποίησης.

3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η πραγματοποίηση της συστηματικής ανασκόπησης πραγματοποιήθηκε μέσα από την εύρεση άρθρων, σχετικά με τα βιομόρια των αιμοπεταλίων που επηρεάζονται από την αδρανοποίηση. Συγκεκριμένα, διεξήχθη μια αναδρομική μελέτη στην διαδικτυακή διεθνή βάση δεδομένων “*PubMed*”, στη οποία δημοσιεύονται εγκεκριμένες έρευνες με ορθά επιστημονικά αποτελέσματα.

Για την εύρεση των κατάλληλων άρθρων και μελετών αναζητήθηκε στη μηχανή αναζήτησης, ο όρος «inactivation AND platelets». Ακόμα επιλέχθηκε ως φίλτρο τα άρθρα να έχουν δημοσιευθεί τη τελευταία δεκαετία δηλαδή από το 2009 έως το 2019 και τα περιοδικά που δημοσίευσης να έχουν υψηλό δείκτη απήχησης. Για να υπάρξει ολοκληρωμένη παρουσίαση των αποτελεσμάτων και των αλλαγών που έχουν συμβεί με το πέρασμα των χρόνων, στις τεχνικές αδρανοποίησης αιμοπεταλίων, αναζητήθηκαν με τον ίδιο όρο άρθρα, που είχαν δημοσιευθεί από το 2000 έως το 2008. Τα αποτελέσματα των δυο αναζητήσεων, παρουσιάζονται και συγκρίνονται παρακάτω.

Όλα τα άρθρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρακάτω συστηματική ανασκόπηση είναι γραμμένα στην αγγλική γλώσσα. Το αποτέλεσμα της αναζήτησης οδήγησε στην

εύρεση 321 άρθρων σχετικά με το θέμα που είχαν δημοσιευθεί τη τελευταία δεκαετία και 243 τη περίοδο 2000 - 2008. Για την επιλογή των κατάλληλων μελετών, οι οποίες σχετίζονταν άμεσα με το θέμα, έγινε επιλογή των άρθρων σύμφωνα με το δείκτη απήχησης του ερευνητικού περιοδικού, την ανάγνωση των περιλήψεων των άρθρων και τη σύγκριση αυτών. Στο τέλος, επιλέχθηκαν συνολικά 39 άρθρα τα οποία πληρούσαν όλα τα απαραίτητα κριτήρια, τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 AMATOSALEN (S-59)/UVA LIGHT

Από τις πρώτες μελέτες που έγιναν, ήταν αυτή των van Rhenen και των συνεργατών του, το 2000, όπου παρατήρησαν τις μεταβολές στην λειτουργία συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων *in vitro*, μετά από επεξεργασία με αματοσαλένιο και υπεριώδη ακτινοβολία UVA. Συνολικά συγκρίθηκαν 4 διαφορετικές ομάδες αιμοπεταλίων εκ των οποίων οι δύο ομάδες λειτούργησαν ως ομάδες ελέγχου. Οι ομάδες ήταν οι εξής: α) συμπυκνωμένα αιμοπετάλια σε προσθετικό διάλυμα T-Sol, β) συμπυκνωμένα PLTs σε προσθετικό διάλυμα PAS III, γ) συμπυκνωμένα PLTs σε προσθετικό διάλυμα PAS III, αδρανοποιημένα PLTs με αματοσαλένιο και 9 ώρες σε SRD για την αφαίρεση της περίσσειας αματοσαλενίου και δ) συμπυκνωμένα PLTs σε πλάσμα με προσθετικό διάλυμα PAS III, αδρανοποιημένα με αματοσαλένιο και 16 ώρες σε SRD για την αφαίρεση της περίσσειας αματοσαλενίου. Ύστερα από 7 μέρες αποθήκευσης έγινε ανάλυση των δειγμάτων σε παράγοντες όπως: pH, pO₂, pCO₂, HCO₃, Αριθμός PLTs, MPV, εξωκυττάρια συγκέντρωση γλυκόζης, εξωκυττάρια συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, total ATP, έκφραση P-σελεκτίνης (CD62P), αντίδραση σε υποτονικό σοκ (HSR) και πραγματοποιήθηκε παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Το pH τους ήταν σταθερό ως την 3^η μέρα, ενώ μετά μειώθηκε ραγδαία. Το pCO₂ μειώθηκε με σταθερούς ρυθμούς σε όλα τα δείγματα, το γαλακτικό οξύ αυξήθηκε σε όλες τις ομάδες και τα επίπεδα της γλυκόζης παρέμειναν σταθερά. Η μέθοδος HSR έδειξε ότι τα αιμοπετάλια έχουν επαρκή λειτουργικότητα. Τέλος βρέθηκε αυξημένη έκφραση της p-σελεκτίνης στα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.¹³⁷

Οι Jansen και οι συνεργάτες το 2004 πραγματοποίησαν μία επέκταση της προηγούμενης μελέτης. Στην συγκεκριμένη έρευνα μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά των δεξαμενοποιημένων και αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων. Η τεχνική αδρανοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη μελέτη αφορούσε αιμοπετάλια που έχουν επεξεργαστεί με αματοσαλένιο/UVA. Για την έρευνα τους χρησιμοποίησαν δύο ομάδες συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων που αδρανοποιήθηκαν με το σύστημα επεξεργασίας και αφαίρεσης περίσσειας αματοσαλενίου α) T-bag S-59

που ήταν σε πειραματικό στάδιο και β) το εμπορικό μοντέλο του Wafer SRD, ενώ υπήρχε και μια ομάδα ελέγχου συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων σε προσθετικό διάλυμα PAS III. Καθ' όλη την διάρκεια αποθήκευσης των αιμοπεταλίων (11 ημέρες), μετρήθηκαν μεταβλητές που αφορούσαν την ποιότητα, τη λειτουργικότητα (συσσωρευτική ικανότητα και ενεργοποίηση), την απόπτωση και τη λύση των αιμοπεταλίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δυο ομάδες σχετικά με την έκφραση της αννεξίνης V, τα επίπεδα γλυκόζης, pO_2 ή pCO_2 , pH, HCO_3 , γαλακτικού οξέος, ATP και HSR. Η ομάδα ελέγχου είχε εξίσου μειωμένη, αλλά καλύτερη συσσωρευτική ικανότητα συγκριτικά με τις ομάδες αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων. Στην ομάδα Wafer SRD βρέθηκε υψηλότερη συγκέντρωση αιμοπεταλίων. Όλες ομάδες είχαν αύξηση των επιπέδων της P-σελεκτίνης.¹³⁸

Το 2004 δημοσιεύθηκε μια μελέτη των Picker, Speer και Gathof σχετικά με τα χαρακτηριστικά των αιμοπεταλίων που υποβλήθηκαν σε αγωγή με αματοσελένιο (S-59) και UVA φως (320-400 nm). Η έρευνα τους βασίστηκε στα αποτελέσματα της σύγκρισης μεταξύ των αδρανοποιημένων PLTs που ακτινοβολήθηκαν και αποθηκεύτηκαν για 7 ημέρες σε προσθετικό διάλυμα PAS III και της ομάδας ελέγχου συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων σε PAS II. Ο όγκος και ο αριθμός των αιμοπεταλίων μειώθηκε σημαντικά και στα δυο δείγματα όπως έγινε και με το pH και τα διτανθρακικά. Το διοξείδιο του άνθρακα (pCO_2) μειώθηκε στην ομάδα έρευνας με σταθερό ρυθμό. Ακόμη, οι δυο ομάδες έδειξαν μείωση της γλυκόζης, του γαλακτικού οξέος ενώ η LDH αυξήθηκε στα ακτινοβολημένα PLTs. Η HSR παρέμεινε σταθερή ενώ η έκφραση της P-σελεκτίνης αυξήθηκε σημαντικά κατά την αποθήκευση και στις δυο ομάδες. Τέλος βρέθηκε λίγο μειωμένη συσσωρευτικότητα των αιμοπεταλίων ως προς τον αγωνιστή ριστοσετίνη στην ομάδα των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων.¹³⁹

Το 2004, ο Snyder και οι συνεργάτες του ερεύνησαν την ικανότητα ανάκτησης και τη βιωσιμότητα των αδρανοποιημένων PLTs. Στην έρευνα που πραγματοποίησαν πραγματοποιήθηκαν τρεις υπομελέτες. Σε υγιείς δότες, χορηγήθηκαν αυτόλογα αδρανοποιημένα PLTs, που είχαν υποβληθεί σε αδρανοποίηση με αματοσελένιο/UVA, στη δεύτερη που είχαν επιπλέον επεξεργαστεί με την συσκευή απομάκρυνσης αματοσελενίου (CAD) και στη τρίτη ομάδα αιμοπετάλια με γ -ακτινοβολία. Για την έρευνα τα αιμοπετάλια σημάνθηκαν με το ισότοπο indium-111. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως οι ομάδες των αιμοπεταλίων, στην οποία

πραγματοποιήθηκε επεξεργασία με CAD και γ -ακτινοβολία, είχαν μικρότερη διάρκεια ζωής και δυνατότητα ανάκτησης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.¹⁴⁰

Ο Lin και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν μια μελέτη το 2005, σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις που έχει η υπεριώδη ακτινοβολία A (UVA) στα συστατικά των αιμοπεταλίων. Το αντικείμενο της έρευνας ήταν ο σχηματισμός νεοαντιγόνων μετά από αδρανοποίηση και σύγκριναν τα αποτελέσματα της ομάδα αδρανοποιημένων PLTs και της ομάδας αιμοπεταλίων που είχαν ακτινοβολήσει με UVA και συγκεκριμένα με 3 J/cm^2 . Και στις δύο ομάδες πραγματοποιήθηκε προσρόφηση του αματσαλενίου με την συσκευή CAD. Τα δείγματα εξετάστηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) μετά την επεξεργασία. Μετά την μετάγγιση πραγματοποιήθηκε έλεγχος με ELISA στο πλάσμα των ασθενών, για αντισώματα σε ενδεχόμενα νεοαντιγόνα έναντι του αματσαλενίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως στα ακτινοβολημένα αιμοπετάλια σχηματίστηκαν ελεύθερα φωτοπροϊόντα, ενώ δεν ανιχνεύθηκε κανένα νεοαντιγόνο μετά την ακτινοβολία.⁵³

Οι Bruchmüller et al. το 2005 πραγματοποίησαν μια μελέτη, σχετικά με τον αντίκτυπο που έχει η αδρανοποίηση με αματσαλενίου S-59 και η ακτινοβολία UVA στο mtDNA των συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων. Στην έρευνα τους χρησιμοποίησαν 4 όμοιες σε ABO ομάδες αιμοπεταλίων στις οποίες χορήγησαν αγωγή με 3 J/cm^2 UVA στις οποίες χρησιμοποίησαν δύο μοριακές μεθόδους για την ανίχνευση ποσοτικών και ποιοτικών διαφορών στο mtDNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σήμα PCR από το mtDNA απουσίασε στο δείγμα που είχε εφαρμοστεί αδρανοποίηση. Το αματσαλενίου παρεμβάλλεται στο μιτοχονδριακής προέλευσης DNA και αυτές οι αλλαγές μπορούν να ταυτοποιηθούν με PCR.¹⁴¹

Ο Bakkour et. al πραγματοποίησαν το 2016 μία μελέτη σχετική της προηγούμενης των Bruchmüller. Οι συγκεκριμένοι προχώρησαν και ποσοτικοποίηση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) αιμοπεταλίων, που είχαν επεξεργαστεί με αματσαλενίου και υπεριώδη ακτινοβολία A (INTERCEPT). Για την διερεύνηση των αλλαγών συνέκριναν μια ομάδα αδρανοποιημένων συμπυκνωμένων PLTs και μια ομάδα που δεν εφαρμόστηκε καμία τεχνική αδρανοποίησης. Αφού αποθηκεύτηκαν για 7 ημέρες, στη συνέχεια τα δυο δείγματα αναλύθηκαν με RT-PCR. Η ανάλυση έδειξε ότι είναι δυνατή η εφαρμογή της RT-PCR, καθώς το προϊόν ενίσχυσης δεν

επηρεάζεται από την τεχνική αδρανοποίησης και επομένως το mtDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης ποιότητας της εφαρμογής της συγκεκριμένης τεχνικής.¹⁴²

Το 2006 ο Apelseth et al. έκαναν μια έρευνα, σχετικά με τη συσσώρευση κυτταροκινών στα αδρανοποιημένα PLTs αφαίρεσης κατά την αποθήκευση. Το δείγμα PLTs που συλλέχθηκε, αδρανοποιήθηκε με αματοσαλένιο και χωρίστηκε σε δυο μέρη. Το ένα μέρος συγκρίθηκε με ομάδα ελέγχου, ενώ το δεύτερο με αιμοπετάλια που ακτινοβολήθηκαν με γ-ακτινοβολία. Τα δείγματα επεξεργάστηκαν, αποθηκεύτηκαν και μετρήθηκαν με τις ίδιες μεθόδους (κυτταρομετρία ροής - ELISA). Το δείγμα μελέτης είχε αυξημένους τους δείκτες CD62P και τις κυτταροκίνες CCL5 (RANTES), CXCL4 (PF4), CCL3 (MIP-1α), CXCL8 (IL-1β) καθώς και τα επίπεδα του TGF-β. Οι κυτταροκίνες αιμοπεταλιακής προέλευσης εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα στα αδρανοποιημένα PLTs, ειδικά κατά την αποθήκευση, ενώ οι κυτταροκίνες που προέρχονταν από τα λευκά αιμοσφαίρια εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα σε ίδιο βαθμό με την ομάδα ελέγχου (IL-6, IL-10, IL-11, IL-12, TNF, ιντερφερόνη-γ).¹⁴³

Μετά από ένα έτος η ίδια ομάδα, συνέχισε με μία επιπλέον μελέτη η οποία αξιολόγησε τις μεταβολές των βιομορίων των αιμοπεταλίων μετά από την ακτινοβολήση τους. Οι ερευνητές συνέλεξαν 14 ασκούς αιμοπεταλίων τους οποίους χώρισαν σε τέσσερις ομάδες. Στην πρώτη και τρίτη ομάδα πραγματοποιήθηκε αδρανοποίηση με αματοσαλένιο και UVA, η δεύτερη λειτούργησε ως ομάδα ελέγχου και στην τελευταία εφαρμόστηκε γ-ακτινοβολία που λειτούργησε επίσης ως ομάδα ελέγχου. Τα αιμοπετάλια αποθηκεύτηκαν και πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές δοκιμές και δοκιμασίες με κυτταρομετρία ροής για τις επόμενες 12 ημέρες. Στα PCT αιμοπετάλια με αματοσαλένιο ο αριθμός των PLTs μειώθηκε, ενώ επιταχύνθηκαν οι μεταβολικές διεργασίες. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από τα αυξημένα επίπεδα των μεταβολικών δεικτών γαλακτικό οξύ και LDH συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου. Επιπλέον παρατηρήθηκε υψηλότερος ρυθμός σχηματισμού μικροσωματιδίων (CD61+) και μειωμένη συσσωρευτική ικανότητα με αγωνιστή τη θρομβίνη. Τέλος, μετά την 5^η μέρα τα PCT αιμοπετάλια εμφανίζουν αυξημένη ενεργότητα όπως υποδεικνύει η αύξηση της έκφρασης των P-σελεκτίνης και CD42b (GPIIb). Η αδυναμία ρύθμισης της έκφρασης της P-σελεκτίνης και του CD42b παρατηρήθηκε σε αδρανοποιημένα PLTs μετά από διέγερση τους με ADP ή TRAP.¹⁴⁴

Το 2007, ο Lozano και οι συνεργάτες του ασχολήθηκαν με την επίδραση που έχει η εφαρμογή αματοσαλενίου/UVA, στην αιμοστατική ικανότητα ανακτηθέντων αιμοπεταλίων. Για την μελέτη τους χρησιμοποίησαν 18 δείγματα λευκαφαιρεμένων ανακτηθέντων αιμοπεταλίων από 9 υγιείς εθελοντές με ίδια ομάδα αίματος κατά ABO. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε δυο ομάδες (9 ασκοί σε κάθε ομάδα), εκ των οποίων στην πρώτη εφαρμόστηκε αδρανοποίηση και η δεύτερη χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου. Η τελική μέτρηση έδειξε πως η πρώτη ομάδα είχε μείωση αιμοπεταλίων κατά 6.5% την 5^η ημέρα και 10,2% την 7^η ημέρα. Η μείωση οφείλεται στην τεχνική της αδρανοποίησης, αλλά και στις δύο ομάδες η δυνατότητα προσκόλλησης και συσσωρευτική ικανότητας παρέμεινε σε επαρκή επίπεδα μέχρι την 7^η ημέρα.¹⁴⁵

Το 2008 δημοσιεύτηκε η μελέτη των Tynngård et al. οι οποίοι διερεύνησαν την αιμοστατική ικανότητα των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων με αματοσαλένιο. Έγινε έλεγχος σε αιμοπετάλια υγείων δοτών τα οποία αδρανοποιήθηκαν με INTERCEPT σε προσθετικό διάλυμα INTERSOL. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα των αιμοπεταλίων στα οποία χορηγήθηκε T-Sol και αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου. Τα δύο δείγματα αναλύθηκαν μέσω ρεομετρίας και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματά τους. Τα αιμοπετάλια με INTERCEPT είχαν βραχύτερο χρόνο πήξης και υψηλότερα επίπεδα P – σελεκτίνης από την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, δεν βρέθηκε συσχετισμός στους δύο προαναφερόμενους παράγοντες. Συνολικά φαίνεται ότι υπάρχει επαρκής ικανότητα σχηματισμού θρόμβου στα αδρανοποιημένα PLTs.¹⁴⁶

Το 2012 η ομάδα Thiele et al., πραγματοποίησε μία πρωτομική ανάλυση για να ερευνήσει τις μεταβολές των πρωτεϊνών των PCs PLTs. Πιο συγκεκριμένα, μελέτησε την εφαρμογή των τεχνικών αδρανοποίησης με αματοσαλένιο/UVA και γ-ακτινοβολία. Οι ερευνητές δημιούργησαν 3 ομάδες αιμοπεταλίων. Η πρώτη ομάδα λειτούργησε ως ομάδα ελέγχου, χωρίς κάποια επεξεργασία αδρανοποίησης, η δεύτερη ομάδα είχε επεξεργαστεί με αματοσαλένιο/UVA και η τρίτη με γ-ακτινοβολία. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν για 5 ημέρες και στη συνέχεια εφαρμόστηκε συνδυασμός τεχνικών ανάλυσης LC-ESI-MS/MS. Τα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια εμφάνισαν υψηλότερη έκφραση της P-σελεκτίνης από τις υπόλοιπες ομάδες. Ακόμα, από την ανάλυση βρέθηκε ότι στα αιμοπετάλια, συνολικά, υπάρχουν 948 πρωτεΐνες. Την πρώτη ημέρα στα αδρανοποιημένα με αματοσαλένιο αιμοπετάλια ταυτοποιήθηκαν 23 μεταβολές πρωτεϊνών, ενώ στη ομάδα που εφαρμόστηκε γ-

ακτινοβολία εμφανίστηκαν 49 μεταβολές με 11 μεταβολές κοινές και στις δύο ομάδες. Μετά την αποθήκευση, την 5η ημέρα παρατηρήθηκαν 58 και 50 μεταβολές αντίστοιχα ενώ στην ομάδα ελέγχου είχαμε 36 μεταβολές. Από την ανάλυση των δεδομένων βρέθηκαν τρεις πρωτεΐνες οι οποίες επηρεάζονται αποκλειστικά από την αδρανοποίηση με αματοσαλένιο. Η πρώτη αφορά την πρόδρομη μορφή της πρωτεΐνης PEAR-1 οποία ανευρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη και συμμετέχει στην προσκόλληση στα ενδοθηλιακά κύτταρα και συσσώρευση των αιμοπεταλίων αλληλεπιδρώντας με την GPIIb/IIIa. Επίσης, φαίνεται αλλαγή στην πρωτεΐνη σουλφοτρανσφεράση της τυροσίνης, η οποία κατά την σύνδεση των χημειοκινών στους υποδοχείς τους, οδηγεί σε ενεργοποίηση του αιμοπεταλίου. Τέλος, αυξάνονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης CLIC 4, η οποία είναι μία ενδοκυτταρική πρωτεΐνη και έχει την ιδιότητα να σχηματίζει διαύλους ιόντων σε οργανίδια. Τα οργανίδια στα οποία απαντάται, σχετίζονται με την μετατόπιση μεμβρανών, την διαφοροποίηση του κυττάρου και την αγγειογένεση. Ακόμα, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη φαίνεται να συμμετέχει στο μοριακό μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από το οξειδωτικό στρες που συγκεντρώνεται στα μιτοχόνδρια. Συνολικά, βρέθηκε ότι τα PC PLTs με αματοσαλένιο πυροδοτούν αλλοιώσεις στις αιμοπεταλιακές πρωτεΐνες, με πιθανές επιπτώσεις στην αποθηκευτική βλάβη.¹⁴⁷

Οι Hechler et al. (2013) δημοσίευσαν μια μελέτη σχετικά με την επίδραση του αματοσαλενίου και της υπεριώδους ακτινοβολίας A (UVA), στην λειτουργικότητα και βιοχημεία των αιμοπεταλίων. Οι ερευνητές μελέτησαν την αντίδραση των συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων που συλλέχθηκαν μέσα από τη διαδικασία της αιμοδοσίας. Μελετήθηκε ένα δείγμα PCs που προέρχονταν από 5 αιμοδότες με 35% συγκέντρωση πλάσματος. Το δείγμα χωρίστηκε σε 4 μέρη, επεξεργάστηκε με τη τεχνική INTERCEPT και αποθηκεύτηκε για 6,5 μέρες. Τα αποτελέσματα της παραπάνω ομάδας συγκρίθηκαν με ομάδα ελέγχου αιμοπεταλίων που δεν εφαρμόστηκε κάποια επεξεργασία. Ως μέθοδοι για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν κυτταρομετρία ροής και πρωτεομική ανάλυση με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση διαφοράς σε πήκτωμα (2D-DIGE). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι GPIIb/IIIa, GPIa/IIa και GPVI παρέμειναν σταθερές κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και δεν υπήρχαν διαφορές στα δυο δείγματα, το PAC-1 βρέθηκε σε χαμηλά επίπεδα και στις δύο ομάδες, η Annexin A5 αυξήθηκε και στις δυο ομάδες και η συσσωρευτική ικανότητα σχετικά με τους αγωνιστές ADP και θρομβίνη είχε

παρόμοιες αυξομειώσεις και στα δυο δείγματα. Συνολικά αν και η πρωτεομική ανάλυση δεν εμφάνισε πολλές αλλαγές στο πρωτέομα, παρουσίασε μεταβολές σε τρεις πρωτεΐνες, που συμβαίνουν αποκλειστικά στα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια.¹⁴⁸

Οι Sandgren και Diedrich το 2014 δημοσίευσαν μια έρευνα σχετικά με την επίδραση της αδρανοποίησης με αματοσαλένιο (INTERCEPT), στα αιμοπετάλια που προορίζονται για μετάγγιση. Οι ερευνητές σύγκριναν μονάδες PLTs, τις οποίες είχαν επεξεργαστεί με αματοσαλένιο και μονάδες που δεν είχε πραγματοποιηθεί καμία τεχνική αδρανοποίησης. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν για την μελέτη των αιμοπεταλίων κατά την διάρκεια αποθήκευσης (7 ημέρες). Παρατηρήθηκαν μικρές διαφορές στον αριθμό των αιμοπεταλίων στο pH, pCO₂ και την γλυκόζη. Ωστόσο δεν βρέθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές στα επίπεδα της, του ATP, του ESC, του HSR και της έκφρασης των CD62P, PAC-1, CD42b και PECAM-1. Το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης διατηρήθηκε μέχρι και την 7η ημέρα σε όλες τις μονάδες PLTs.¹⁴⁹

Οι Feys et. al (2017), μελέτησαν κατά πόσο οι μέθοδοι αδρανοποίησης παθογόνων επηρεάζουν την εξέλιξη της αποθηκευτικής βλάβης στα συμπυκνωμένα αιμοπετάλια, συγκριτικά με τα αιμοπετάλια αφαίρεσης. Στους ασκούς εφαρμόστηκε η τεχνική αδρανοποίησης παθογόνων με αματοσαλένιο (INTERCEPT). Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων τους με ομάδα ελέγχου και αναλύθηκαν μεταβολικοί παράγοντες, πριν και μετά την ακτινοβόληση όπως το pH, τα επίπεδα της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στις μονάδες αιμοπεταλίων, που χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη τεχνική τα επίπεδα γλυκόζης και το pH μειώθηκαν σε πολύ σε μικρό χρονικό διάστημα, ενώ το γαλακτικό οξύ αυξήθηκε με ταχύ ρυθμό. Ακόμα, φαίνεται ότι υπάρχει πιο γρήγορη εξέλιξη της αποθηκευτικής βλάβης στα αιμοπετάλια αφαίρεσης, από ότι στα ανακτηθέντα αιμοπετάλια από την λευκοκυτταρική στοιβάδα λόγω του μεγάλου πληθυσμού αιμοπεταλίων.¹⁵⁰

4.2 RIBOFLAVIN (B₂)/UV LIGHT

Οι Perez-Pujol, et al. (2005) ερευνήσαν τις νέες τεχνικές αδρανοποίησης των παθογόνων στα παράγωγα των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα, μελέτησαν την αντίδραση των αιμοπεταλίων, ύστερα από έκθεση τους σε Riboflavin/UVB. Τα αιμοπετάλια που συλλέχθηκαν μέσω αιμοδοσίας (δείγματα από 8 αιμοδότες),

χωρίστηκαν σε ομάδες και εκτέθηκαν σε 6,2 J ανά mL και σε 12,3 J ανά mL αιμοπεταλίων. Οι δύο ομάδες, μελέτης και ελέγχου, αναλύθηκαν ως προς τα βιοχημικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τους μέσω κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η πρωτεΐνη GPIIb μειώθηκε στα δείγματα που έλαβαν ακτινοβολία 12,3 J/mL. Από την άλλη πλευρά, οι GPIIb-IIIa ή GPIV δεν είχαν διαφορές στις δυο δόσεις αδρανοποίησης, όπως επίσης και τα επίπεδα των vWF, Ινωδογόνου και FVa ούτε μετά την ακτινοβολήση - αποθήκευση. Η φιμπρονεκτίνη βρέθηκε σε αυξημένα επίπεδα στα δείγματα που έλαβαν ακτινοβολία 12,3 J/mL. Ακόμα, κατά την αποθήκευση των PLTs που εκτέθηκαν σε ακτινοβολία 12,3 J, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα ανεξίνης V και P-σελεκτίνης που υποδηλώνουν υψηλή ενεργότητα.¹⁵¹

Το 2005 ο Li και οι συνεργάτες του, πραγματοποίησαν μια έρευνα σχετικά με τις αλλαγές στην λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων των αιμοπεταλίων που έχουν αδρανοποιηθεί με ριβοφλαβίνη (Mirasol). Στην έρευνα αυτή αξιολογείται η ακεραιότητα των αιμοπεταλίων, μέσα από την καταγραφή των μεταβολών των μιτοχονδριακών τους ενζύμων. Αδρανοποιημένα αιμοπετάλια αποθηκεύτηκαν για 7 ημέρες και στη συνέχεια, μετρήθηκε το pH τους και αναλύθηκαν μέσω των τεχνικών MIT, της δοκιμασίας JC-1 και έγινε μέτρηση του ATP. Τα αιμοπετάλια λίγες ώρες μετά την αδρανοποίηση, εμφάνισαν φυσιολογικά αποτελέσματα σε όλες τις παραπάνω δοκιμές. Από το μέσο της διάρκειας της αποθήκευσης μέχρι το τέλος των 7 ημερών το pH υπέστη μείωση. Τα αποτελέσματα JC-1, έδειξαν ότι η αγωγή είχε ελάχιστη επίδραση επί του δυναμικού μιτοχονδριακής μεμβράνης στα επεξεργασμένα PLT. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την δοκιμασία MIT, έδειξε ότι η δραστηριότητα των μιτοχονδρίων, διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα μετά το τέλος της αποθήκευσης. Τέλος, το ATP βρέθηκε μειωμένο. Σύμφωνα με τα δεδομένα αν και υπάρχουν μεταβολές, η αδρανοποίηση με ριβοφλαβίνη δεν μεταβάλλει τη δραστηριότητα των μιτοχονδρίων.¹⁵²

Οι AuBuchon et al. πραγματοποίησαν μια μελέτη το 2005, για την αποτελεσματικότητα των αιμοπεταλίων που αδρανοποιήθηκαν με ριβοφλαβίνη. Συγκρίθηκαν δείγματα που επεξεργάστηκαν με την τεχνική Mirasol και δείγματα χωρίς να έχει γίνει εφαρμογή κάποιας τεχνικής αδρανοποίησης. Στην συνέχεια, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν για 5 ημέρες και ακολούθησε ποιοτική και ποσοτική ανάλυση κυρίως βιοχημικών παραγόντων, πριν και μετά την αποθήκευση. Ο αριθμός

των αιμοπεταλίων μετά την αποθήκευση δεν είχε διαφορές με το προς σύγκριση δείγμα. Στο ακτινοβολημένο δείγμα, υπήρχε αυξημένος μεταβολισμός και γλυκόλυση και αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος. Επομένως, τα επίπεδα γλυκόζης βρέθηκαν μειωμένα καθώς και το pH, το οποίο μειώθηκε με φυσιολογικό ρυθμό. Τα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια, εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα ανάκτησης και επιβίωσης συγκριτικά με την ομάδα έλεγχου. Ωστόσο, συνολικά οι μεταβολές που εμφανίστηκαν είναι παρόμοιες και επομένως, πιθανά σε θρομβοπενικούς ασθενείς η μετάγγιση αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων να παρέχει αποτελεσματική υποστηρικτική θεραπεία.¹⁵³

Το 2008 οι Picker, Steisel και Gathof έκαναν μια έρευνα σχετικά με τις βλάβες που προκαλούνται σε συμπυκνωμένα PLTs που έχουν αδρανοποιηθεί με την τεχνική Mirasol. Η ομάδα των αδρανοποιημένων PLTs με ριβοφλαβίνη συγκρίθηκε με ομάδα ελέγχου PLTs, που δεν είχαν λάβει ακτινοβολία/αδρανοποίηση και με ομάδα PLTs που είχε εκτεθεί σε γ-ακτινοβολία. Τα δείγματα αναλύθηκαν μέσα από εργαστηριακές και βιοχημικές μεθόδους, μετά το πέρας της περιόδου αποθήκευσης τους για 7 ημέρες. Η LDH, η απελευθέρωση ιόντων καλίου (K^+) και ο αριθμός των αιμοπεταλίων βρέθηκαν χωρίς σημαντική διαφορά και στα τρία δείγματα, γεγονός το οποίο δείχνει ότι η ακτινοβολία δεν προκαλεί κυτταρική λύση. Από την άλλη, οι δείκτες ενεργοποίησης αυξήθηκαν και στα τρία δείγματα. Στα αδρανοποιημένα δείγματα τα επίπεδα γλυκόζης μειώθηκαν, λόγω της αυξημένης γλυκολυτικής ροής. Το σήμα JC-1, για την μέτρηση του μιτοχονδριακού δυναμικού, παρέμεινε αμετάβλητο σε όλα τα δείγματα. Ακόμα παρατηρήθηκαν άμεσα μετά την επεξεργασία (1^η ημέρα) μείωση του δείκτη HRS, και της συσσωρευτικής ικανότητας, ενώ η P-σκελετίνη αυξήθηκε. Τελικά, τα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια με ριβοφλαβίνη φαίνεται ότι διατηρούν ακέραιη τη μιτοχονδριακή λειτουργία τους έως την 5^η ημέρα της αποθήκευσης.¹⁵⁴

Το 2009, η ίδια ομάδα ερευνητών, μελέτησαν τη συσσώρευση κυτταροκινών στα αιμοπετάλια που έχουν αδρανοποιηθεί με ριβοφλαβίνη. Στην έρευνα συγκρίθηκαν τρεις ομάδες δειγμάτων, εκ των οποίων, η πρώτη ομάδα αφορούσε PLTs αδρανοποιημένα με Mirasol, η δεύτερη PLTs με γ-ακτινοβολία και η τρίτη αποτέλεσε ομάδα ελέγχου χωρίς κάποια επεξεργασία. Τα δείγματα αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν μέσω κυτταρομετρίας για τις κυτταροκίνες που προέρχονται από τα λευκά αιμοσφαίρια (WBCs) και μέσω ELISA για τις κυτταροκίνες αιμοπεταλιακής

προέλευσης. Στο δείγμα που επεξεργάστηκε με Mirasol βρέθηκε αυξημένη η P – σελεκτίνη και οι κυτταροκίνες αιμοπεταλιακής προέλευσης εκτός από την MPI-1. Τα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια με ριβοφλαβίνη, εμφάνισαν στο τέλος αυξημένη ενεργοποίηση, ενώ δεν επηρέαζαν τις κυτταροκίνες που προέρχονται από τα WBCs. Συμπερασματικά, την 5^η ημέρα αποθήκευσης των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων με ριβοφλαβίνη παρουσιάστηκε αυξημένη ενεργότητα και υψηλά επίπεδα κυτταροκινών συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες.¹⁵⁵

Μελετήθηκε εκ νέου το 2012, η συσσώρευση κυτταροκινών στα αιμοπετάλια που έχουν δεχτεί θεραπεία αδρανοποίησης. Όπως και στη προηγούμενη έρευνα συγκρίθηκαν αιμοπετάλια στα οποία είχε πραγματοποιηθεί αδρανοποίηση με Mirasol με την διαφορά ότι πραγματοποιήθηκε προσθήκη του προσθετικού διαλύματος PAS και συγκρίθηκαν με ομάδα ελέγχου που δεν είχε δεχτεί κάποια επεξεργασία. Το δείγμα με Mirasol, παρουσίασε αυξημένη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και αυξήση των επιπέδων των κυτταροκινών, αλλά με πολύ μικρή διαφορά συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Το μέσο αποθήκευσης, η περιεκτικότητα του σε μαγνήσιο και κάλιο καθώς και ο τρόπος συλλογής, είναι σημαντικοί παράγοντες όσον αφορά την παραγωγή κυτταροκινών κατά την αποθήκευση.¹⁵⁶

Μία ακόμη μελέτη από την ίδια ομάδα επιστημόνων το 2009, στις ίδιες ομάδες δειγμάτων με την προηγούμενη μελέτη πραγματοποιεί ανάλυση βιοχημικών μορίων και δεικτών λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων και της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Όπως και οι προηγούμενες μελέτες, δεν βρέθηκε διαφορά στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης (JC-1), ούτε αυξημένη μιτοχονδριακή ενζυματική ενεργότητα και απελευθέρωση LDH. Γενικά συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της p-σελεκτίνης και αυξημένη κατανάλωση της γλυκόζης και του οξυγόνου, τα οποία συσχετίζονται με την αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέος και τα μειωμένα επίπεδα pH.¹⁵⁷

Οι Reid et. al μελέτησαν την επίδραση που έχουν οι τεχνικές αδρανοποίησης στις πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων και τις επιπτώσεις που έχουν στη ποιότητα και ποσότητα των PLTs, αλλά και στους δείκτες απόπτωσης, κατά την αποθήκευσή τους. Η μελέτη που σχεδίασαν περιελάμβανε αδρανοποιημένα με ριβοφλαβίνη αιμοπετάλια, τα οποία αποθηκεύτηκαν 7 ημέρες και αναλύθηκαν ως προς προαποπτωτικούς παράγοντες με κυτταρομετρία ροής και ανοσοαποτύπωμα κατά

Western. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι η οικογένεια πρωτεϊνών BCL-2 των Bak και Bax είχαν αυξηθεί περισσότερο εξαιτίας της τεχνικής όπως επίσης και η απελευθέρωση του κυτοχρώματος-C και της κασπάσης-3 σε αντίθεση με τα αιμοπετάλια στα οποία δεν είχε χορηγηθεί επεξεργασία. Γενικότερα, υπήρχε αύξηση στα μόρια σηματοδότησης απόπτωσης σε όλες τις ομάδες που μελετήθηκαν. Στην ομάδα μελέτης με ριβοφλαβίνη ωστόσο, παρατηρήθηκε πιο αυξημένη προαποπτωτική λειτουργία και επομένως τα αιμοπετάλια θα πρέπει να αξιολογούνται μετά την 5^η ημέρα αποθήκευσης για το αν πρέπει να μεταγγιστούν ή όχι.¹⁵⁸

Ο Schubert μαζί με την ομάδα του το 2012, δημοσίευσαν μια έρευνα τους, σχετικά με τις επιπτώσεις της ριβοφλαβίνης και της υπεριώδους ακτινοβολίας στην ποιότητα των αιμοπεταλίων και συγκεκριμένα, στην αγγειοδιασταλτική φωσφορυλιωμένη φωσφοπρωτεΐνη (VASP) - Ser-239. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μια ομάδα συμπυκνωμένων αδρανοποιημένων PLTs με ριβοφλαβίνη, και μία δεύτερη χωρίς να εφαρμόσουν κάποια τεχνική αδρανοποίησης (ομάδα ελέγχου). Η ανάλυση των αιμοπεταλίων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης, υγρή χρωματογραφία και φασματομετρίας μάζας. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι υπάρχουν πολλές αλλαγές στην λειτουργία του κυτταροσκελετού των αιμοπεταλίων και στην πρωτεΐνη VASP. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι υπάρχει ενίσχυση της φωσφορυλίωσης στην θέση Ser-23, η οποία ευθύνεται για την ενεργοποίηση της VASP η οποία σχετίζεται με την δυναμική της ακτίνης και την ενεργοποίηση των GPIIb/IIIa.¹⁵⁹

Οι Picker, Tauszig, και Gathof δημοσίευσαν το 2012 μια έρευνα, σχετικά με την ποιότητα των αιμοπεταλίων, ύστερα από επεξεργασία με ριβοφλαβίνη και υπεριώδη ακτινοβολία (Mirasol) και πρόσθετο διάλυμα (PAS). Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν αιμοπετάλια αφαίρεσης, στα οποία κάθε μονάδα διαχωρίστηκε σε δύο μέρη και το ένα μέρος αδρανοποιήθηκε, ενώ το άλλο χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου. Τα αιμοπετάλια αφαίρεσης, αποθηκεύτηκαν για 8 ημέρες, και κατόπιν ελέγχθηκαν για μεταβολικούς δείκτες, δείκτες λειτουργικότητας, ενεργότητας, απόπτωσης και συσσωρευτικής ικανότητας. Την 7^η ημέρα αποθήκευσης παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα ενεργότητας των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων. Επιπρόσθετα, φαίνεται μείωση του pH και αύξηση της γλυκόλυσης. Επιπλέον, βρέθηκε αυξημένη κατανάλωση του O₂, καθώς και αυξημένη μιτοχονδριακή ενζυματική δραστηριότητα. Ακόμη, είχαν μειωμένη HSR, αυξημένα επίπεδα ανεξίνης-V, και μειωμένη

συσσωρευτική ικανότητα (TRAP-6). Γενικά παρατηρήθηκε ότι η PRT με ριβοφλαβίνη αυξάνει την οξειδωτική οδό και την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, ακόμα και παρουσία προσθετικού διαλύματος κατά την αποθήκευση, ενώ παράλληλα το ATP και η μιτοχονδριακή λειτουργία διατηρούνται παρουσία προσθετικού διαλύματος.¹⁶⁰

Ο Schubert και οι συνεργάτες του (2013) ανέλυσαν την επίδραση της τεχνικής Mirasol, σε συμπυκνωμένα αιμοπετάλια μετά την σήμανση κινασών που θεωρούνται σημαντικοί μοριακοί ρυθμιστές στη σηματοδότηση μοριακών μονοπατιών. Οι ερευνητές μελέτησαν αιμοπετάλια, τα οποία είχαν αδρανοποιηθεί με ριβοφλαβίνη και αιμοπετάλια χωρίς την εφαρμογή τεχνικής αδρανοποίησης. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση βιοχημικών δεικτών και μεταβολιτών, αερίων αίματος και εφαρμόστηκε ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την ανάλυση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνικών κινασών (p38MAPK, ERK, MEK, AKT, MSK, GSK3β, β-κατενίνη, Hck και Fyn).

Οι ερευνητές παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα κατά τέσσερις φορές περισσότερο, στην φωσφορυλιωμένη p38MAPK κινάση, στα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια, όπως και στο υποστρώμα που δρα η συγκεκριμένη. Με την εφαρμογή αναστολέων οι επιστήμονες συσχέτισαν ότι η αδρανοποίηση επηρεάζει άμεσα το μοριακό μονοπάτι της p38MAPK κινάσης. Λόγω του αυξημένου μεταβολισμού των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος και μείωση της γλυκόζης και του pH, φαινόμενα τα οποία εξελίσσονταν με πιο αργό ρυθμό όταν εφαρμόστηκε αναστολέας της κινάσης p38. Η τεχνική Mirasol, μεταβάλλει την ποιότητα των αιμοπεταλίων μέσω της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνικών κινασών, εκ των οποίων, η p38MAPK φαίνεται να επηρεάζει την έκθεση των γλυκοπρωτεϊνών GPIIb και GPV. Συνολικά, η υπεριώδη ακτινοβολία σε συνδυασμό με την ριβοφλαβίνη και την αποθήκευση, προκαλούν αλλαγές στη μοριακή δομή των αιμοπεταλίων οι οποίες οδηγούν σε ενεργοποίηση, αυξημένο μεταβολισμό και απόπτωση των αιμοπεταλίων.¹⁶¹

Το 2014 ο Tereda et. al, μελέτησε ενός επιδράσεις ενός αδρανοποίησης με υπεριώδη ακτινοβολία και ριβοφλαβίνη στο σχηματισμό θρόμβου. Λευκαφαιρεμένα PLTs ενός δότη τα οποία αδρανοποιήθηκαν με Mirasol και αποθηκεύτηκαν για 5 ημέρες, υποβλήθηκαν σε συγκεκριμένη ανάλυση CPA σχετική με την ικανότητα

σχηματισμού θρόμβου την 1η, 3η και 5^η ημέρα. Τα ευρήματα έδειξαν ότι η αδρανοποίηση με ριβοφλαβίνη οδηγεί στην ενίσχυση σχηματισμού θρόμβου έναντι του κολλαγόνου, η οποία σχετίζεται με την ενεργοποίηση της GPIIb/IIIa. Η ενεργοποιημένη γλυκοπρωτεΐνη ωστόσο δεν συνδέεται με το ινωδογόνο αλλά με το PAC-1.¹⁶²

Το 2017 η ίδια ομάδα εξέλιξε την προηγούμενη μελέτη, που αφορούσε ικανότητα σχηματισμού και σταθεροποίησης του θρόμβου. Οι ερευνητές επεξεργάστηκαν λευκαφαιρεμένα συμπτωκνωμένα αιμοπετάλια που έλαβαν, εκθέτοντάς τα σε ριβοφλαβίνη/UV (Mirasol), ενώ στη συνέχεια για την αξιολόγηση του σχηματισμού θρόμβου, εφαρμόστηκε ανάλυση μέσω της μεθόδου μικροκαναλιού (CPA). Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ της ομάδος μελέτης και της ομάδος ελέγχου, ως προς την επιφανειακή κάλυψη στο κολλαγόνο σε διαφορετική διατμητική πίεση. Στα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια παρουσιάστηκε ενίσχυση στην δημιουργία του θρόμβου, η οποία δεν οφείλεται στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων, αλλά στην απλή εναπόθεση τους. Ακόμα, εξετάστηκε η ικανότητα σχηματισμού θρόμβου παρουσία αναστολέα της GPIIb/IIIa και κατά πόσο υπάρχει συσχέτιση, μεταξύ των μεταβλητών ενίσχυσης του σχηματισμού θρόμβου και της συγκεκριμένης γλυκοπρωτεΐνης. Όταν χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας, δεν υπήρχε η ίδια αντίδραση από τα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η αδρανοποίηση με ριβοφλαβίνη ενισχύει την εναπόθεση αιμοπεταλίων στα προσκολλημένα αιμοπετάλια διαμέσου της GPIIb/IIIa. Τέλος, παρατηρήθηκε αυξημένη σταθερότητα του θρόμβου στα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια.¹⁶³

Το 2016 ο Tereda συμμετείχε και σε μια άλλη έρευνα αυτή τη φορά για τις αλλαγές που συμβαίνουν στο σχήμα των αιμοπεταλίων, εξαιτίας της αγωγής που χορηγούνται με υπεριώδη ακτινοβολία και ριβοφλαβίνη. Για την έρευνα αδρανοποιήθηκαν αιμοπετάλια με την τεχνική Mirasol και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν για 5 ημέρες. Τα δείγματα αναλύθηκαν την 1^η, 3^η και 5^η ημέρα για μεταβολές του σχήματός τους απευθείας μετά την αδρανοποίηση και ύστερα από ενεργοποίηση με ADP. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ως τεχνική, τη σκέδαση του φωτός με τη χρήση φθορόμετρου στη περιοχή 300 έως 360 nm. Τα δισκοειδή PLTs μειώθηκαν στο δείγμα με Mirasol. Ως προς την ενεργοποίηση με ADP και την ικανότητα αλλαγής σχήματος, η προς μελέτη ομάδα, έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με την ομάδα

ελέγχου. Το μειωμένο pH και η αυξημένη έκφραση P-σελεκτίνης, σχετίζονται άμεσα με το τελικό τους σχήμα.¹⁶⁴

Το 2014 πραγματοποιήθηκε μια έρευνα σχετικά με τις επιδράσεις της ριβοφλαβίνης και ης υπερϊόδους ακτινοβολίας στην δραστικότητα των αιμοπεταλίων. Οι ερευνητές πραγματοποίησαν μια *in vitro* δοκιμή για τον προσδιορισμό της λειτουργικότητας των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων με Mirasol, τα οποία αποθήκευσαν για 8 ημέρες και ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής, ανοσοαποτύπωμα κατά Western και την τεχνική PMA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα CD62P, CD42b ήταν αυξημένα. Τα επίπεδα CD31 παρέμειναν σταθερά. Την 8^η ημέρα αποθήκευσης μετά από ενεργοποίηση με θρομβίνη ο PF4 και η P – σελεκτίνη εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η αδρανοποίηση με ριβοφλαβίνη στην αρχή υπερδραστηριοποιεί τα αιμοπετάλια, τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη έκκριση κοκκίων. Αργότερα το φαινόμενο αυτό καταλήγει σε μειωμένη ικανότητα αποκοκκίωσης των αιμοπεταλίων κατόπιν ερεθίσματος.¹⁶⁵

Το 2015 δημοσιεύθηκε η έρευνα των van der Meer και των συνεργατών του, σχετικά με την προστασία που προσφέρει, το διάλυμα PAS, όταν προστίθεται σε σύγκριση με το πλάσμα, στα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια με ριβοφλαβίνη. Τα αιμοπετάλια που έλαβαν αγωγή συγκρίθηκαν με εκείνα δίχως αγωγή, μέσω κυτταρομετρίας ροής και βιοχημικών δοκιμασιών. Τα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια παρουσίασαν αύξηση του μεταβολισμού της γλυκόζης και ως αποτέλεσμα, αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος. Ακόμα, παρουσιάστηκε αυξημένη έκφραση της P-σελεκτίνης και μείωση του σήματος JC-1, που υποδηλώνει χαμηλότερο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το γαλακτικό οξύ και η αννεξίνη V βρέθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα στα αιμοπετάλια που είχαν αποθηκευτεί σε προσθετικό διάλυμα. Για αυτό το λόγο, η χρήση προθετικού διαλύματος PAS επηρεάζει θετικά την παραγωγή και την λειτουργία των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων με ριβοφλαβίνη.¹⁶⁶

4.3 UVC LIGHT

Σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μεθόδους αδρανοποίησης αιμοπεταλίων η γ-ακτινοβολία, δεν περιέχει κάποιο χημικό παράγοντα ή βιομόριο. Η συγκεκριμένη τεχνική δεν έχει εγκριθεί ακόμα, και βρίσκεται στην πρώτη φάση κλινικών δοκιμών, οπότε και η βιβλιογραφία είναι περιορισμένη.

Ο Mohr και οι συνεργάτες το 2009, εφάρμοσαν UVC ακτινοβολία σε αιμοπετάλια. Ο σκοπός της μελέτης ήταν διττός: κατά πόσο η θεραπεία, με το συγκεκριμένο τύπο ακτινοβολίας, αδρανοποιεί αποτελεσματικά τα παθογόνα και επιπλέον, κατά ποιον τρόπο επιδρά στο μεταβολισμό και στην λειτουργία των αιμοπεταλίων. Πραγματοποιήθηκαν διάφορες αναλύσεις, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεομικής ανάλυσης των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων. Η εφαρμογή αδρανοποίησης ήταν ικανοποιητική, ως προς τους παθογόνους παράγοντες που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα της πρωτεομικής ανάλυσης, συγκρίθηκαν με αλλαγές, που προκαλούνται μόνο από την εφαρμογή γ-ακτινοβολίας και UVB αντίστοιχως. Στο σύνολο μελετήθηκαν 792 πρωτεΐνες. Οι δείκτες λειτουργικότητας, ενεργοποίησης και μεταβολισμού των αιμοπεταλίων, ήταν σε παρόμοια επίπεδα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μεθόδους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χρήση UVC επάγει αλλαγές σε 107 πρωτεϊνικά σημεία/47 πρωτεϊνών, η UVB επάγει αντίστοιχα σε 140 πρωτεϊνικά σημεία/67 πρωτεϊνών ενώ η χρήση γ-ακτινοβολίας επάγει αλλαγές σε 161 πρωτεϊνικά σημεία/87 πρωτεϊνών. Η UVC ακτινοβολία έφερε 92 κοινά πρωτεϊνικά σημεία (48 πρωτεΐνες) με τους άλλους τύπους ακτινοβολίας, ενώ βρέθηκαν 2 μοναδικά πρωτεϊνικά σημεία που μεταβάλλονται από την ακτινοβολία UVC. Οι πρωτεΐνες που αφορούν είναι οι IQGAP2 και η ERp72 εκ των οποίων μόνο η τελευταία επηρεάζεται αποκλειστικά από την ακτινοβολία UVC. Οι πρωτεϊνικές αλλαγές στην ακτινοβολία με UVC είναι λιγότερες συγκριτικά με τις υπόλοιπες.¹⁶⁷

Μία ακόμη μελέτη από τους Thiele et. al (2015) έχει δημοσιευτεί μέχρι σήμερα και αφορά στην συγκεκριμένη τεχνική. Οι ερευνητές παρατήρησαν, στην πρώτη φάση δοκιμών, τα αιμοπετάλια έντεκα υγιών εθελοντών, αφού αδρανοποιήθηκαν με UVC, αποθηκεύτηκαν για 48 ώρες και επαναχορηγήθηκαν αυτόλογα. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των ζωτικών σημείων των εθελοντών, βασικός έλεγχος της αιμόστασης καθώς και ανάλυση βιοχημικών και αιματολογικών δεικτών. Ακόμα, υπολογίστηκε ο δείκτης CCI για την διόρθωση του αριθμού αιμοπεταλίων ο οποίος φάνηκε ότι δεν είχε διαφορά με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός νεοαντιγόνων έναντι των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων, ούτε η εμφάνιση ανεπιθύμητων αντιδράσεων.¹⁶⁸

4.4 ΡΙΒΟΦΛΑΒΙΝΗ vs. ΑΜΑΤΟΣΑΛΕΝΙΟ

Οι Picker, Schneider και Gathof πραγματοποίησαν μια έρευνα το 2009, η οποία είχε ως σκοπό τη αξιολόγηση της αδρανοποίησης παθογόνων σε παράγωγα αιμοπεταλίων και τις μεταβολές που προκαλούν οι τεχνικές αδρανοποίησης στα PLTs, πριν την μετάγγιση τους. Οι ερευνητές συνέλεξαν αιμοπετάλια από υγιείς δότες και τα χώρισαν σε ομάδες στις οποίες πραγματοποίησαν δύο διαφορετικές τεχνικές αδρανοποίησης. Στη μια ομάδα εφαρμόσαν τεχνική αδρανοποίησης με ριβοφλαβίνη (MIRASOL), στην άλλη τεχνική αδρανοποίησης με αματοσαλένιο (INTERCEPT), ενώ στη τρίτη ομάδα των PLTs δεν πραγματοποιήθηκε καμία επεξεργασία και χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα ελέγχου. Σε κάθε κατηγορία τα αιμοπετάλια αναλύθηκαν, τις επόμενες 8 μέρες, ως προς την αιμοπεταλιακή λειτουργία μέσω της μεθόδου CPA, την έκφραση της P-σελεκτίνης με κυτταρομετρία ροής (CD62P) και τη συσσωρευτική ικανότητα μετά από διέγερση με ενεργοποιητή του υποδοχέα της θρομβίνης - πεπτιδίου 6 (TRAP-6). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως σε όλες τις ομάδες, αυξήθηκε η έκφραση της P-σελεκτίνης, όπως και της GPIIb/IIIa και CD41. Παράλληλα, η συσσωρευτική ικανότητα μετά από διέγερση με TRAP-6 μειώθηκε στα αδρανοποιημένα PLTs. Κατά την σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο ομάδων προέκυψε ότι η συσσωρευτική ικανότητα μετά από διέγερση με TRAP-6 μειώθηκε σε μεγαλύτερο βαθμό στα αιμοπετάλια που είχαν αδρανοποιηθεί με την μέθοδο Intercept.¹⁶⁹

Η Picker και συνεργάτες το 2009 υλοποίησαν ακόμα μια έρευνα, για τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων που έχουν ακτινοβοληθεί με υπερϊώδη ακτινοβολία και έχει χορηγηθεί αματοσαλένιο ή ριβοφλαβίνη. Οι ερευνητές σύγκριναν τις μεταβολές και τα αποτελέσματα από τη κυτταρομετρία ροής και τους βιοχημικούς δείκτες, των ομάδων που αδρανοποιήθηκαν αντίστοιχα με ριβοφλαβίνη, αματοσαλένιο και της ομάδας ελέγχου. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων και στις τρεις ομάδες παρέμεινε αμετάβλητος, γεγονός που σημαίνει ότι δεν υπάρχει κυτταρική λύση. Επιπλέον παρατηρήθηκε και στις δύο τεχνικές αδρανοποίησης, αυξημένη αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση και αυξημένος μεταβολισμός της γλυκόζης που συνεπάγει την αύξηση του γαλακτικού οξέος και την μείωση του pH. Η συσσωρευτική ικανότητα, μειώθηκε ανάλογα και στις τρεις ομάδες, κατά την διάρκεια της αποθήκευσης.

Τα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια με ριβοφλαβίνη υπερείχαν ως προς το αματοσαλένιο στους δείκτες HSR και JC-1 και TRAP-6., ανεξίτη V, pH, pCO₂ και του pO₂ και τα επίπεδα ATP. Στα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια με αματοσαλένιο, παρατηρείται πιο γρήγορη κατανάλωση της γλυκόζης. Στις τρεις ομάδες παρατηρήθηκε αύξηση του γαλακτικού οξέος και του pH. Η οξειδωτική αναπνοή ήταν αυξημένη στην αδρανοποίηση με ριβοφλαβίνη. Ωστόσο φάνηκε να υπάρχει καλύτερη συντήρηση του ATP και βιωσιμότητα των αιμοπεταλίων σε σύγκριση με την τεχνική του αματοσαλενίου.¹⁷⁰

Ο Prudent και οι συνεργάτες του, το 2014 δημοσίευσαν μια μελέτη που είχαν πραγματοποιήσει, με θέμα τις οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται από τις τεχνικές αδρανοποίησης, στα πεπτιδία των αιμοπεταλίων. Στη παρούσα μελέτη, αξιολογούνται οι επιδράσεις που επιφέρει η έκθεση των πεπτιδίων των αιμοπεταλίων σε αματοσαλένιο/UVA (Intercept) και ριβοφλαβίνη/UVB (Mirasol) και συγκεκριμένα στα αμινοξέα κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, ιστιδίνη και τυροσίνη. Η αξιολόγηση των δειγμάτων, έγινε με συζευγμένη υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζων (LC-MS/MS). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα που ακτινοβολήθηκαν με αματοσαλένιο/UVA και περιείχαν στα πεπτιδία τους κυστεΐνη, σχημάτισαν δισουλφιδικές γέφυρες (R-SS-R, -2 KDa), ενώ αυτά που έλαβαν ριβοφλαβίνη/UVB σχημάτισαν σουλφονικά οξέα (R-SOH, + 16 KDa, R-SO₃H, +48 KDa). Τα υπόλοιπα αμινοξέα (τρυπτοφάνη, ιστιδίνη και τυροσίνη) έδειξαν μικρές αλλαγές που εμπίπτουν σε διαφορά + 4-34 kDa. Όπως φάνηκε, τα αμινοξέα επηρεάζονται με διαφορετικό τρόπο σε κάθε τεχνική. Συνολικά βέβαια, η αδρανοποίηση με ριβοφλαβίνη δείχνει ότι παράγει περισσότερες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου από ότι με αματοσαλένιο, χωρίς την δημιουργία φωτοπροϊόντων.¹⁷¹

Ο Osman και οι συνεργάτες του το 2015, δημοσίευσαν την έρευνα τους, σχετικά με την επίδραση που έχουν οι τεχνικές αδρανοποίησης των παθογόνων, στα microRNA και mRNAs των αιμοπεταλίων και την σχετική επίδραση τους στην ενεργοποίηση και λειτουργία των αιμοπεταλίων. Οι ερευνητές συνέλεξαν 50 δείγματα αιμοπεταλίων ενός δότη και τα χώρισαν σε 5 ομάδες οι οποίες ήταν: α) η ομάδα ελέγχου δηλαδή αιμοπετάλια αποθηκευμένα σε πλάσμα αιμοδοτών, β) αιμοπετάλια χωρίς επεξεργασία αποθηκευμένα σε προσθετικό διάλυμα SSP+, γ) αιμοπετάλια που δέχθηκαν επεξεργασία με γ-ακτινοβολία, δ) αιμοπετάλια που αδρανοποιήθηκαν με την τεχνική Mirasol (ριβοφλαβίνη/UVB) και ε) αιμοπετάλια που αδρανοποιήθηκαν με την

τεχνική Intercept (αματοσαλένιο/UVA) αποθηκευμένα σε προσθετικό διάλυμα SSP+. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η θεραπεία με ριβοφλαβίνη δεν μειώνει τα επίπεδα microRNA σε αντίθεση με την αγωγή με αματοσαλένιο. Ακόμη φάνηκε ότι δεν επηρεάζεται η λειτουργία και η σύνθεση των microRNAs των αιμοπεταλίων. Ωστόσο, τα μειωμένα επίπεδα microRNAs που βρέθηκαν στην επεξεργασία με αματοσαλένιο, σχετίζονται με την αυξημένη ενεργότητα των αιμοπεταλίων και την μειωμένη συσσωρευτική ικανότητα έναντι του αγωνιστή ADP. Τα PLTs που τους χορηγήθηκε ριβοφλαβίνη μετά τις 7 ημέρες αποθήκευσης είχαν μειωμένο όγκο αιμοπεταλίων σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Όλες οι ομάδες εκτός της ομάδας ελέγχου, είχαν αύξηση του δείκτη CD62P, ενώ η συσσωρευτική ικανότητα έναντι του αγωνιστή TRAP παρέμεινε υψηλή μόνο στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα που εφαρμόστηκε ριβοφλαβίνη.¹⁷²

Οι ερευνητές Abonnenc et al. το 2015, πραγματοποίησαν μια *in vitro* μελέτη, σχετικά με τις βλάβες που προκαλούνται στα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια από την υπεριώδη ακτινοβολία B. Στόχος τους ήταν να ανακαλύψουν κατά πόσο πιο ασφαλή είναι τα αιμοπετάλια για μετάγγιση μετά την αδρανοποίηση τους, καθώς και η σύγκριση των διαφορετικών μεθόδων αδρανοποίησης. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε συμπυκνωμένα αιμοπετάλια, που δέχθηκαν όλα παρόμοια επεξεργασία. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές επεξεργασίες αιμοπεταλίων με αματοσαλένιο/UVA, με ριβοφλαβίνη/UVB, και μόνο UVB. Τα αιμοπετάλια που συλλέχθηκαν μοιράστηκαν σε τέσσερις ομάδες. Η πρώτη ήταν η ομάδα ελέγχου, στην δεύτερη χορηγήθηκε αματοσαλένιο/UVA, στη τρίτη ριβοφλαβίνη/UVB με και στη τέταρτη UVB με την προσθήκη διαλύματος Intersol. Τα αποτελέσματα των ομάδων αξιολογήθηκαν μέσα από την κυτταρομετρία ροής, η οποία έδειξε ότι τα αιμοπετάλια της ομάδας που επεξεργάστηκε με UVA και της ομάδας ελέγχου είχαν μικρές διαφορές. Αντιθέτως, τα αιμοπετάλια που επεξεργάστηκαν με ριβοφλαβίνη / UVB και μόνο UVB έδειξαν μεταβολικές αλλαγές και συγκεκριμένα αύξηση των CD62P, αννεξίνη V και PAC-1 και μείωση του JC-1. Η μελέτη επιβεβαιώνει την αρνητική επίδραση της ακτινοβολίας UVB, στην *in vitro* λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων και την αυξημένη απελευθέρωση ελεύθερων ριζών O₂.¹⁷³

Όσον αφορά στη θεραπεία με αματοσαλένιο και ριβοφλαβίνη, το 2015 δημοσιεύθηκε μια έρευνα, σχετικά με τις επιδράσεις που έχει στην κινητική των αιμοπεταλίων και στη δημιουργία θρόμβων. Συγκρίθηκαν *in vitro* αιμοπετάλια, που είχαν

αδρανοποιηθεί με αματοσαλένιο και αιμοπετάλια στα οποία είχε χορηγηθεί ριβοφλαβίνη, μετά από 7ήμερη αποθήκευση τους. Τα δείγματα αναλυθήκαν με δοκιμασία συσσώρευσης, έναντι αγωνιστών και κυτταρομετρία ροής. Οι τεχνικές έδειξαν πως η συσσωρευτική ικανότητα των αιμοπεταλίων, μειώθηκε για όλους τους αγωνιστές του δείγματος με ριβοφλαβίνη, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και την γ-ακτινοβολία. Στην ομάδα δειγμάτων που αδρανοποιήθηκαν με αματοσαλένιο, βρέθηκαν παρόμοια αποτελέσματα με την ριβοφλαβίνη, με μεγαλύτερη μείωση στην συσσωρευτική ικανότητα με τον αγωνιστή ριστοσετίνη. Επιπλέον, στο πρώτο δείγμα ο η γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa ενεργοποιήθηκε αυτόματα και μη αντιστρεπτά αμέσως μετά την αδρανοποίηση, κάτι το οποίο δεν συνέβη στην αδρανοποίηση με αματοσαλένιο. Στην αδρανοποίηση με αματοσαλένιο, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται μέσω του υποδοχέα PAR1 την 2^η ημέρα αποθήκευσης, κατόπιν δοκιμής με PAR1AP. Γενικότερα, οι δύο τεχνικές εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα σχηματισμού θρόμβου *in vitro* και οι διαφορές στις δύο τεχνικές έγκειται στους μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα αιμοπετάλια για την παραγωγή των θρόμβων. Η ριβοφλαβίνη οδηγεί σε αυξημένη και γρηγορότερη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με απώλεια της δυνατότητας ενίσχυσης, ενώ τα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια με αματοσαλένιο είναι λιγότερο ευαίσθητα για πολλούς αγωνιστές.¹⁷⁴

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη παρούσα ανασκόπηση, μελετήθηκαν οι τεχνικές αδρανοποίησης που εφαρμόζονται σε αιμοπετάλια, τα οποία προορίζονται για μετάγγιση και οι μεταβολές που προκαλούν, στην δομή και τη δράση των βιομορίων τους. Για την πραγματοποίηση της μελέτης, αναλύθηκαν και παρουσιάστηκαν οι σημαντικότερες έρευνες που έχουν γίνει από το 2000 έως το 2019. Συνολικά επιλέχθηκαν 39 έρευνες. Το χρονικό εύρος των 19 ετών που καλύπτουν οι έρευνες θεωρήθηκε ιδανικό, καθώς μπορούν να παρουσιαστούν όλες οι αλλαγές και οι καινοτομίες που έγιναν στην εξέλιξη του χρόνου, με σκοπό οι τεχνικές αδρανοποίησης να είναι αποτελεσματικές δίχως να προκαλούν βλάβες στην ποιότητα των αιμοπεταλίων. Η πλειοψηφία των ερευνών είχε ως στόχο να βρουν τις διαφορές μεταξύ της λειτουργικότητας και της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων που έχουν επεξεργαστεί με τεχνική αδρανοποίησης σε σύγκριση με άλλες τεχνικές ή με αιμοπετάλια που δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία.

Σήμερα, οι τεχνικές αδρανοποίησης που χρησιμοποιούνται είναι τρεις. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σε αυτές τις τρεις μεθόδους και βασίστηκε κυρίως σε συγκριτικές έρευνες, μεταξύ των τεχνικών που έχουν πραγματοποιηθεί. Οι τεχνικές αυτές είναι: η επεξεργασία των αιμοπεταλίων με αματοσαλένιο (Amatosalen/S-59) και υπεριώδης ακτινοβολία UVA, η επεξεργασία με ριβοφλαβίνη και υπεριώδης ακτινοβολία UVB και η υπεριώδης ακτινοβολία C (UVC). Οι πρώτες δυο τεχνικές είναι αυτές που χρησιμοποιούνται πιο συχνά, οπότε και η πλειοψηφία των ερευνών αφορούσε τις συγκεκριμένες.

5.1 AMATOSALEN (S-59)/UVA LIGHT

Η θεραπεία με αματοσαλένιο (S-59) και UVA, είναι η πιο δημοφιλής από τις τρεις και εκείνη που χρησιμοποιείται πιο συχνά από τους ειδικούς ως τεχνική αδρανοποίησης. Στη παρούσα μελέτη αναλύθηκαν 15 έρευνες που έχουν γίνει αποκλειστικά για την τεχνική αυτή, από τις οποίες οι 10 πραγματοποιήθηκαν το χρονικό διάστημα 2000 – 2008 και οι 5 το διάστημα μεταξύ 2009 – 2019. Ο αριθμός των ερευνών δείχνει πως την προηγούμενη δεκαετία έγιναν έρευνες σχετικά με την ποιότητα της διαδικασίας, ενώ την δεκαετία που διανύουμε έγιναν συμπληρωματικές

έρευνες που αφορούσαν την σύγκριση τους με άλλες τεχνικές καθώς και νέα δεδομένα πάνω σε αυτή.

Το αματοσαλένιο (S-59) σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, στοχεύει στο DNA/RNA των παθογόνων και των υπολειπόμενων λευκών αιμοσφαιρίων. Τα αιμοπετάλια είναι απύρνηνα κύτταρα, αλλά αυτό δεν σημαίνει πως δεν διαθέτουν DNA και RNA ή ότι δεν επηρεάζεται η δράση των βιομορίων, που συμμετέχουν στις διάφορες λειτουργίες του. Ακόμα, το αματοσαλένιο φέρει τοξικές ιδιότητες αν και στην συγκέντρωση που χρησιμοποιείται, κατά την εφαρμογή αδρανοποίησης, φαίνεται να μην επιφέρει τοξικές αντιδράσεις στους μεταγγιζόμενους ασθενείς. Σε κλινικές έρευνες φάνηκε ότι οι ασθενείς που λαμβάνουν αδρανοποιημένα αιμοπετάλια με αματοσαλένιο χρήζουν πιο συχνών μεταγγίσεων. Επίσης, υπάρχει παρεμβολή και μεταβολή στο μιτοχονδριακή προέλευσης DNA το οποίο μπορεί να ανιχνευτεί με PCR. Τα μιτοχόνδρια παίζουν καθοριστικό ρόλο στην τροφοδοσία ενέργειας των αιμοπεταλίων. Το αματοσαλένιο έχει την ιδιότητα να προσκολλάται στα λιπίδια και να δημιουργεί φωτοπροϊόντα, οπότε ενδεχομένως ένας πιθανός μηχανισμός δράσης της συγκεκριμένης τεχνικής είναι να παρεμβάλλεται στην μιτοχονδριακή μεμβράνη.^{52,53,141,175}

Οι έρευνες που έγιναν μεταξύ του 2000 – 2008 αφορούσαν κυρίως τα βιομόρια των αιμοπεταλίων και τις επιδράσεις που έχουν σε αυτά οι τεχνικές αδρανοποίησης. Τα αποτελέσματα των ερευνών προέρχονται από συγκριτικές μελέτες, που έγιναν την περίοδο αυτή.

Ένας σημαντικός παράγοντας που βρέθηκε αυξημένος στα αιμοπετάλια, τα οποία δέχθηκαν επεξεργασία με αματοσαλένιο/UVA ήταν η έκφραση της P-σελεκτίνης. Η P-σελεκτίνη είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που βρίσκεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και των μεγακαρυοκυττάρων και λειτουργεί κυρίως ως μεσολαβητής προσέλκυσης των λευκοκυττάρων. Εκτός του κυρίαρχου ρόλου της, χρησιμοποιείται εργαστηριακά στην διερεύνηση της ενεργότητας των αιμοπεταλίων. Αύξηση του συγκεκριμένου δείκτη, είναι ταυτόσημο της έκκρισης των α-κοκκίων. Συμπερασματικά ο παραπάνω δείκτης μπορεί να προβάλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Ακόμα, η P-σελεκτίνη αποτελεί βασικό παράγοντα στα φαινόμενα της αιμόστασης και της θρόμβωση. Η αυξημένη έκφραση της μετά από τις τεχνικές αδρανοποίησης,

αυξάνει με την σειρά του την προπηκτική δραστηριότητα, καθώς συμβάλλει στην εύκολη προσκόλληση των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων με λευκά αιμοσφαίρια ενώ παράλληλα συμβάλλει στην σταθεροποίηση του αιμοπεταλιακού θρόμβου.^{137-139,146,147} Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η P-σελεκτίνη αυξάνεται και στην αποθηκευτική βλάβη, όπως και στην αδρανοποίηση με άλλους παράγοντες. Η αυξημένη έκφραση της, έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για θρόμβωση λόγω της προπηκτικής δραστηριότητας.¹⁷⁶

Ένας άλλος παράγοντας, ο οποίος αναλύθηκε από αρκετές έρευνες, αφορά στην συσσωρευτική ικανότητα έναντι στον αγωνιστή TRAP-6. Το TRAP-6 είναι ένα πεπτίδιο αγωνιστής του υποδοχέα PAR1 όπου συνδέεται η θρομβίνη. Σε όλες τις μελέτες αναφέρεται μειωμένη συσσωρευτική ικανότητα στο TRAP-6.^{144,169,170} Μειωμένη συσσωρευτική ικανότητα έναντι στο TRAP-6, υποδηλώνει μειωμένη αιμοπεταλιακή λειτουργικότητα με ενδεχόμενο εμφάνισης αιμορραγικής διαταραχής.

Η ανεξίνη V ή A5 είναι ένα ακόμη βιομόριο των αιμοπεταλίων, που επηρεάζεται από την αδρανοποίηση με αματοσαλένιο/UVA. Η ανεξίνη χρησιμεύει εργαστηριακά για την ανίχνευση της έκφρασης της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην αιμοπεταλιακή μεμβράνη. Ο ρόλος της PS είναι καταλυτικός για την ενεργοποίηση και την διέγερση των αιμοπεταλίων καθώς και στην σηματοδότηση απόπτωσης τους.^{102,105} Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία 20 χρόνια και αφορούν την ανεξίνη, έχουν δείξει ότι υπάρχουν αυξημένα επίπεδα. Πιο συγκεκριμένα, σε έρευνα του 2013 κατά την διάρκεια 36 έως 156 ωρών από την αδρανοποίηση, παρατηρείται ότι τα αυξημένα επίπεδα της ομάδας ελέγχου μειώνονται, ενώ στα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια αυξάνονται περισσότερο. Αυτό υποδηλώνει ότι η ανεξίνη αυξάνεται αντιστρεπτά, μετά την επεξεργασία των αιμοπεταλίων. Σε συγκριτική έρευνα που πραγματοποιήθηκε παρουσιάζονται πιο υψηλά επίπεδα ανεξίνης στα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια με αματοσαλένιο, συγκριτικά με την τεχνική της ριβοφλαβίνης. Ακόμα κατά την αποθήκευση, φαίνεται ότι τα επίπεδα του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης μειώνονται σε πιο μεγάλο βαθμό συγκριτικά με την ριβοφλαβίνη^{148,170}

Η ανεξίνη βρίσκεται σε αυξημένες ποσότητες στα αιμοπετάλια το οποίο σημαίνει και αυξημένη προπηκτική δραστηριότητα. Ωστόσο, αν δεχτούμε το γεγονός πως οι τεχνικές αδρανοποίησης προκαλούν αλλοιώσεις στις κυτταρικές πρωτεΐνες, τότε θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.¹⁴⁷ Σε έρευνα που έγινε το 2004 δεν βρέθηκαν

μεταβολές στα επίπεδα της ανεξίνης όσον αφορά στο μέσο αποθήκευσης, ύστερα από επεξεργασία των αιμοπεταλίων με τη μέθοδο INTERCEPT. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι το μέσο αποθήκευσης έχει σημαντικό ρόλο στα επίπεδα έκφρασης της φωσφατιδυλοσερίνης και βελτιώνει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.¹³⁸

Όσον αφορά στα υπόλοιπα βιομόρια των αιμοπεταλίων μετά την επεξεργασία τους με τη μέθοδο INTERCEPT, αναλύονται αναφορικά παρακάτω. Η PAC -1 αποτελεί ένα αντίσωμα των αιμοπεταλίων, που συνδέεται στην ενεργοποιημένη GPIIb/IIIa και αποτελεί δείκτη ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Στις μελέτες που αναλύθηκαν παραπάνω, βρέθηκε ότι μετά την επεξεργασία με την τεχνική αδρανοποίησης, η έκφραση της είτε αυξήθηκε σε μικρό βαθμό είτε δεν παρατηρήθηκε μεταβολή. Οι συγκεκριμένες μελέτες υλοποιήθηκαν την τρέχουσα δεκαετία, ενώ μελέτες της προηγούμενης δεν αναφέρθηκαν σε αυτό το παράγοντα.^{147,149,173} Η PAC-1 φαίνεται πως είναι ένα βιομόριο ευμετάβλητο και χρειάζεται περαιτέρω εξέταση και διερεύνηση. Οι γλυκοπρωτεΐνες GPIIb/IIIa (σύνδεση με ινωδογόνο) και GPIa/IIa (σύνδεση με κολλαγόνο) αποτελούν παράγοντες ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.⁹⁷ Μετά από την επεξεργασία των αιμοπεταλίων με την παραπάνω τεχνική, έρευνες έδειξαν διαφορετικά αποτελέσματα. Σε ορισμένες μελέτες τα επίπεδα GPIa/IIa παραμένουν σταθερά, ενώ τα επίπεδα GPIIb μειώνονται (μετά από αγωνιστή) ή παραμένουν σταθερά.^{144,148} Αυτό μπορεί να οφείλεται καθώς στην μία μελέτη χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένο μέσο αποθήκευσης. Σε αυτή την μελέτη φάνηκαν ηπιότερες και παρόμοιες μεταβολές με την ομάδα ελέγχου που αποδεικνύει ότι το μέσο αποθήκευσης έχει καταλυτικό ρόλο στις μεταβολές.¹⁴⁸ Στην ίδια μελέτη η GPVI που είναι υποδοχέας του κολλαγόνου, βρέθηκε ότι μετά από αδρανοποίηση με αματοσαλένιο/UVA δεν υπάρχουν μεταβολές στη δράση της.¹⁴⁸

Συνολικά στα αιμοπετάλια έχουν ανιχνευθεί 948 πρωτεΐνες. Σε πρωτεομική ανάλυση των πρωτεϊνικών μεταβολών μεταξύ των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων με αματοσαλένιο/UVA και της ομάδας ελέγχου αναφέρεται ότι κατά την διάρκεια αποθήκευσης τους, αυξάνεται ο αριθμός των πρωτεϊνών που μεταβάλλονται. Από την 1^η έως την 5^η μέρα συνολικά μεταβάλλονται 58 πρωτεΐνες στην ομάδα των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων, ενώ στην ομάδα ελέγχου 36. Η αποθηκευτική βλάβη προκαλεί όπως φαίνεται πρωτεϊνικές μεταβολές, οι οποίες όμως είναι περισσότερες κατά την αδρανοποίηση με το αματοσαλένιο. Αυτό προκαλεί αλλοιώσεις στα αιμοπετάλια, στη λειτουργικότητα και τον μεταβολισμό τους.^{147,148}

Σχετικά με την ποσότητα - ποιότητα, τη βιωσιμότητα, αλλά και με τα μόρια που σχετίζονται με το μεταβολισμό των αιμοπεταλίων, οι έρευνες που υλοποιήθηκαν ασχολήθηκαν εκτενώς με το θέμα, τόσο οι πρώτες όσο και οι σύγχρονες. Ο απώτερος στόχος τους είναι να βρουν την καταλληλότερη τεχνική, η οποία δεν θα επηρεάζει τον αριθμό και την ποιότητα των αιμοπεταλίων, καθώς και θα επεκτείνει τις μέρες ζωής τους. Τα αποτελέσματα των ερευνών έγιναν μετά από ανάλυση των επεξεργασμένων αιμοπεταλίων τα οποία είχαν αποθηκευτεί για 5 με 7 ημέρες.

Όσον αφορά στην τεχνική αδρανοποίησης με αματοσαλένιο/UVA, οι έρευνες έδειξαν μείωση των διαθέσιμων επιπέδων ATP και του pH (το οποίο δεν μειώθηκε κάτω από τα αποδεκτά επίπεδα 6,4), και παράλληλα παρατηρήθηκε αύξηση στο γαλακτικό οξύ, ως απόρροια του αυξημένου μεταβολισμού.^{137,144,150} Το LDH παραμένει σχετικά σε σταθερά επίπεδα και φαίνεται να αυξάνεται κατά την αποθήκευση.^{144,173} Ακόμα τα επίπεδα της γλυκόζης παρέμειναν σταθερά ή μειώθηκαν αισθητά. Παρόμοιες αλλαγές παρατηρούνται και στην αποθηκευτική βλάβη, μόνο που στην αδρανοποίηση με αματοσαλένιο υπάρχει ακόμα μεγαλύτερη αύξηση του μεταβολισμού ειδικότερα μετά το πέρας των 7 ημερών. Ο μηχανισμός δράσης της ενεργοποίησης στα αιμοπετάλια που έχουν αδρανοποιηθεί με αματοσαλένιο, διαφέρει και φαίνεται να επηρεάζει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω των υποδοχέων αγωνιστών.

Ο αριθμός των αιμοπεταλίων που επεξεργάστηκαν με την τεχνική φαίνεται πως μειώνεται με το πέρασμα των ημερών. Την 5^η ημέρα αποθήκευσης η μείωση αγγίζει το 6,5% και την 7^η το 10%. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων που χάνεται είναι μεγάλος και υποδεικνύει κυτταρική λύση γι' αυτό χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή. Ωστόσο η ενεργότητα τους παραμένει σε υψηλά επίπεδα ακόμη και μετά την 5^η ημέρα αποθήκευσης, ενώ παράλληλα μπορεί να μειώνεται αλλά δεν χάνουν την ικανότητα τους για σχηματισμό θρόμβου.^{144,145}

Η συγκέντρωση κυτταροκινών είναι αναμενόμενη, όπως συμβαίνει και κατά την αποθηκευτική βλάβη, χωρίς την χρήση κάποιας τεχνικής αδρανοποίησης. Έρευνα έδειξε σε αιμοπετάλια που αδρανοποιήθηκαν με Intercept ότι αυξάνονται ακόμα περισσότερο τα επίπεδα κυτταροκινών αιμοπεταλιακής προέλευσης.¹⁴³

5.2 RIBOFLAVIN (B₂)/UV LIGHT

Σε αντίθεση με το αματοσαλένιο, στην τεχνική της ριβοφλαβίνης έχουν πραγματοποιηθεί περισσότερες έρευνες και ειδικότερα την τελευταία δεκαετία. Συγκεκριμένα μέχρι το 2009 αναλύθηκαν στη παρούσα ανασκόπηση μόνο 6 μελέτες, ενώ για το 2012 μέχρι σήμερα έγινε ανάλυση 10 μελετών. Η τεχνική αδρανοποίησης με ριβοφλαβίνη ή τεχνική με το σύστημα Mirasol, είναι μια από τις βασικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την αδρανοποίηση των αιμοπεταλίων, σε συνδυασμό με ακτινοβολία UVA/UVB. Η χρήση της ριβοφλαβίνης, σύμφωνα με τα στοιχεία της βιβλιογραφίας, αποτελεί βασικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ριβοφλαβίνη είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη, η οποία ανευρίσκεται φυσιολογικά στον οργανισμό, οπότε δεν χρειάζεται η αφαίρεση της περίσσειας μετά το πέρας της εφαρμογής της, σε αντίθεση με το αματοσαλένιο. Επιπλέον, πέρα από τα αιμοπετάλια η τεχνική αυτή έχει κριθεί ασφαλής για χρήση σε όλα τα παράγωγα αίματος.^{52,177}

Οι μελέτες που έγιναν και αναλύθηκαν στη παρούσα ανασκόπηση, ασχολήθηκαν με τα βιομόρια, τον αριθμό των αιμοπεταλίων, τον μεταβολισμό τους και τις αλλαγές που συμβαίνουν σε συνάρτηση με τις ημέρες αποθήκευσης τους. Κύρια μεταβολή της συγκεκριμένης τεχνικής στα αιμοπετάλια είναι ότι εμφανίζεται αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα, γεγονός που οδηγεί σε επιτάχυνση των φαινομένων αποθηκευτικής βλάβης, με παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και ελεύθερων ριζών. Το παραπάνω φαινόμενο φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της UVB και όχι του χημικού παράγοντα. Τα φαινόμενα που αναλύονται παρακάτω και είναι απόρροια του αυξημένου μεταβολισμού φαίνεται να διορθώνονται όταν τα αιμοπετάλια αποθηκεύονται σε προσθετικό διάλυμα.^{166,173}

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η P-σελεκτίνη έχει ουσιαστικό ρόλο στον αιμοστατικό μηχανισμό, κατά την διάρκεια προσκόλλησης και σχηματισμού του θρόμβου. Όπως και η τεχνική INTERCEPT έτσι και η Mirasol οδηγεί στην αύξηση της P – σελεκτίνης στα αιμοπετάλια που έχουν αδρανοποιηθεί και αποθηκευτεί για 5 έως 7 ημέρες.^{151,154,155,157,164} Σε συγκριτική μελέτη των δύο τεχνικών, η τεχνική της ριβοφλαβίνης εμφάνισε πιο υψηλά επίπεδα της P-σελεκτίνης, σε σχέση με την τεχνική του αματοσαλενίου.¹⁷⁴

Όσον αφορά στον παράγοντα ανεξίνη V, οι έρευνες που σχετίζονται με τα αιμοπετάλια που έχουν επεξεργαστεί με ριβοφλαβίνη, αναφέρουν ότι υπάρχει αύξηση των επιπέδων της έκφρασης του βιομορίου όπως και στην P-σελεκτίνη. Θετικότητα στο μόριο της ανεξίνης, σημαίνει έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης. Οι παράγοντες P-σελεκτίνη και αννεξίνη οι οποίοι ανευρίσκονται σε υψηλά επίπεδα, υποδηλώνουν αυξημένη αιμοπεταλιακή ενεργότητα και προπηκτική δραστηριότητα.^{151,154,160,172}

Ωστόσο, οι παραπάνω παράγοντες, φέρουν επιπλέον αποτελέσματα, βάσει των ερευνητών και των μεθόδων που χρησιμοποιούν. Σε έρευνες που μελετήθηκαν οι παραπάνω παράγοντες, εμφανίστηκαν μειωμένα τα επίπεδα έκφρασης τους σε αδρανοποιημένα αιμοπετάλια με ριβοφλαβίνη/UVA. Συγκεκριμένα για τη P-σελεκτίνη αναφέρεται ότι μειώθηκε στα αιμοπετάλια μετά την 8^η ημέρα αποθήκευσης κατόπιν ενεργοποίησης με θρομβίνη.¹⁶⁵ Παρόλα αυτά η αποθήκευση των αιμοπεταλίων συνιστάται για 5 έως 7 ημέρες γιατί μετά χάνουν τη λειτουργικότητα τους. Επομένως το γεγονός ότι βρέθηκαν μειωμένα, είναι δυνατόν να οφείλεται στην παρατεταμένη μελέτη και τις μέρες αποθήκευσης τους. Σχετικά με τα επίπεδα ανεξίνης, βρέθηκαν μειωμένα σε έρευνα στην οποία τα αιμοπετάλια, πέρα από την επεξεργασία τους με Mirasol, είχε ενσωματωθεί πρόσθετο διάλυμα αποθήκευσης PAS.¹⁶⁶ Φαίνεται, πως η χρήση προσθετικού διαλύματος, όπως το PAS επηρεάζει τα επίπεδα της ανεξίνης στα αιμοπετάλια που προορίζονται για μετάγγιση και βελτιώνει την αυξημένη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Η PAC-1 όπως έχει προαναφερθεί αποτελεί βιοδείκτη ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Οι μελέτες που αναγράφονται στην παρούσα ανασκόπηση, συσχετίζουν τη ριβοφλαβίνη με το συγκεκριμένο παράγοντα. Τα αποτελέσματα των ερευνών υποστηρίζουν πως η PAC-1 εμφανίζει υψηλά επίπεδα και υπάρχει άμεσος συσχετισμός με την αυξημένη ενεργοποίηση του GPIIb/IIIa.^{162,163} Ειδικότερα, στην ριβοφλαβίνη ο συγκεκριμένος παράγοντας εμφανίζεται σε πιο αυξημένα επίπεδα, συγκριτικά με την τεχνική του αματοσαλένιου.¹⁷⁴ Ο GPIIb/IIIa είναι σημαντική γλυκοπρωτεΐνη για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, αποτελεί υποδοχέα του ινωδογόνου και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αιμόσταση και την λειτουργικότητα των μεταγγιζόμενων αιμοπεταλίων.

Όπως και στη τεχνική INTERCEPT, με τον ίδιο τρόπο και στην περίπτωση της τεχνικής Mirasol, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη δράση και στα επίπεδα των

υπόλοιπων παραγόντων.^{151,161-163} Ωστόσο, η τεχνική φαίνεται πως επηρεάζει μόρια τα οποία σχετίζονται άμεσα με τις πρωτεΐνες και την λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. Κατόπιν πρωτεομικής ανάλυσης αιμοπεταλίων αφαίρεσης, που είχαν αδρανοποιηθεί με ριβοφλαβίνη, βρέθηκαν αλλαγές στην δομή και λειτουργία πρωτεϊνών του αιμοπεταλιακού κυτταροσκελετού. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε αυξημένη φωσφορυλίωση στην θέση ser-234 της πρωτεΐνης VASP κατά την διάρκεια αποθήκευσης. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη σχετίζεται με την δυναμική της ακτίνης και την ενεργοποίηση της GPIIb/IIIa και στην συγκεκριμένη ερεύνα φαίνεται πως υπάρχει συσχέτιση με τα αυξημένα επίπεδα της P-σελεκτίνης. Η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης εμπλέκεται σε μοριακό μονοπάτι αναστολής της ενεργοποίησης της GPIIb/IIIa.^{113,159} Ακόμα μία έρευνα παρουσίασε κατά ανάλυση των πρωτεϊνών, αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης στην p38MAPK κινάση στα αιμοπετάλια που είχαν αδρανοποιηθεί με ριβοφλαβίνη. Το ενδιαφέρον σημείο της παραπάνω έρευνας είναι ότι κατά την εφαρμογή αναστολέα υπήρχε βελτίωση στους δείκτες μεταβολισμού. Η p38MAPK είναι υπεύθυνη για την έκκριση κοκκίων και την συστολή του θρόμβου, καθώς φαίνεται να επηρεάζει και την έκθεση των γλυκοπρωτεϊνών GPIIb και GPV.¹⁶¹ Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, δείχνουν ότι η επεξεργασία με ριβοφλαβίνη επηρεάζει την λειτουργία σημαντικών κινασών, που είναι υπεύθυνες για την μεταγωγή σημάτων και για την ενεργοποίηση μοριακών μονοπατιών. Αυτό πιθανότατα όπως και ο αυξημένος μεταβολισμός στην αδρανοποίηση με ριβοφλαβίνη πρέπει να οφείλεται στην παραγωγή ελεύθερων ριζών και ROS.¹⁷³

Όσον αφορά στη γλυκοπρωτεΐνη GPVI που είναι υποδοχέας του κολλαγόνου, σε έρευνες που αφορούν τη ριβοφλαβίνη δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές.¹⁵¹ Τέλος ο δείκτης TRAP-6 φαίνεται πως επηρεάζεται από την συγκεκριμένη τεχνική. Σύμφωνα με τις έρευνες η ριβοφλαβίνη εργαστηριακά οδηγεί σε μειωμένη συσσωρευτική ικανότητα έναντι στο TRAP-6. Ακόμα αναφέρεται μειωμένη συσσωρευτική ικανότητα σε όλους τους αγωνιστές, η οποία αποδίδεται στο ότι η τεχνική επιδρά στο μοριακό μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης C η οποία σηματοδοτεί την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η παρουσία των δραστικών μορφών οξυγόνου φαίνεται να μεταβάλλει τις κινάσες του αιμοπεταλίου.^{165,169,173,174}

Σχετικά με το μεταβολισμό των κυττάρων φαίνεται να υπάρχει πιο έντονη μεταβολική δραστηριότητα κατά την τεχνική Mirasol, συγκριτικά με το Intercept.

Παρατηρούμε μειωμένα επίπεδα pH στη τεχνική, το οποίο συμβαίνει κατά την αποθήκευση.¹⁵² Παράλληλα, φαίνεται πως η αγωγή δεν επηρεάζει την ακεραιότητα των κυττάρων, καθώς δεν επηρεάζει την μιτοχονδριακή ενζυματική δραστηριότητα.¹⁵² Το παραπάνω αντικρούεται με άλλη έρευνα στην οποία τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά τη 5^η μέρα αποθήκευσης η λειτουργία των μιτοχονδρίων των αιμοπεταλίων αρχίζει και μειώνεται.¹⁵⁴ Ωστόσο το συγκεκριμένο φαινόμενο φαίνεται να αναιρείται αν τα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια αποθηκευτούν σε προσθετικό διάλυμα PAS.^{154,160}

Κατά την αποθήκευση αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων με ριβοφλαβίνη, θα ήταν αναμενόμενη, λόγω αυξημένης ενεργότητας, να υπάρχει μεγάλη αύξηση στα επίπεδα κυτταροκινών. Πράγματι σε συγκεκριμένη έρευνα μέχρι την 5^η ημέρα φαίνεται πως η ενεργότητα όλων των κυτταροκινών είναι σε αρκετά υψηλά επίπεδα.¹⁵⁵ Αυτή η θεωρία ανετράπη από έρευνα, κατά την οποία τα επίπεδα των κυτταροκινών βρέθηκαν πολύ λίγο αυξημένα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, το οποίο λόγω της αυξημένης ενεργότητας, δεν ήταν αναμενόμενο. Μία πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου είναι επειδή η τεχνική αδρανοποίησης επιδρά στα νουκλεϊκά οξέα, ίσως να επηρεάζεται η *de novo* σύνθεση κυτταροκινών, το οποίο εν τέλει επιδρά θετικά στα αιμοπετάλια αφού η συσσώρευση κυτταροκινών οδηγεί σε κυτταρική λύση. Κατά την χρήση προσθετικού διαλύματος PAS τα επίπεδα βρέθηκαν ελάχιστα πιο μειωμένα ή σε ίδια επίπεδα.¹⁵⁶

Σχετικά με τον αριθμό των αιμοπεταλίων φαίνεται πως δεν μεταβάλλεται το οποίο αποτελεί θετικό στοιχείο της τεχνικής.¹⁵⁴ Οι μεταβολικές ιδιότητες των αιμοπεταλίων αυξάνονται πολύ εξαιτίας της ριβοφλαβίνης. Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκόζης είναι αυξημένος λόγω του αυξημένου μεταβολισμού της και ως αποτέλεσμα αυξάνονται τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος κατά την αποθήκευση και πιο συγκεκριμένα μετά την 5^η ημέρα.¹⁵² Από το σύνολο των ερευνών, υποστηρίζεται ότι λόγω υψηλής ενεργότητας και αντίστοιχα της πρόωρης έκκρισης κοκκίων, υπάρχουν υψηλές ανάγκες σε μόρια ATP. Τα αιμοπετάλια αλλάζουν την μεταβολική οδό της αερόβιας γλυκόλυσης και χρησιμοποιούν το μονοπάτι της αναερόβιας γλυκόλυσης. Αυτό επιβεβαιώνεται από τα επίπεδα CO₂ τα οποία ανευρίσκονται μειωμένα, ενώ όταν παράγεται ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αυξάνονται.¹⁷³ Οι λόγοι που οφείλονται οι αλλαγές αυτές είναι οι ίδιοι με αυτούς που γίνεται στη τεχνική INTERCEPT, ωστόσο ο μοριακός μηχανισμός πιθανά είναι διαφορετικός. Οι

μετρήσεις του καλίου και της LDH δεν εμφάνισαν μεταβολές. Γενικά παρατηρείται ότι η ριβοφλαβίνη εντείνει και επιταχύνει τα φαινόμενα της αποθηκευτικής βλάβης. Ωστόσο φαίνεται διόρθωση των μεταβολών που οφείλονται στον αυξημένο αιμοπεταλιακό μεταβολισμό, όταν η αποθήκευση των αιμοπεταλίων πραγματοποιείται σε προσθετικό διάλυμα και όχι σε αυτόλογο πλάσμα.

Επομένως, είναι προφανές, πως οι δυο τεχνικές αδρανοποίησης δεν έχουν πολλές διαφορές μεταξύ τους. Η τεχνική Mirasol φαίνεται πως δεν μειώνει τον αριθμό των αιμοπεταλίων σε τέτοιο βαθμό όπως η τεχνική INTERCEPT. Ωστόσο η μείωση που προκαλεί το αματοσαλένιο δεν είναι σε τέτοια επίπεδα, ώστε να θεωρείται ως μειονέκτημα της τεχνικής.^{170,172} Επιπλέον, η ριβοφλαβίνη έχει ένα βασικό πλεονέκτημα, καθώς δεν είναι απαραίτητη η απομάκρυνση της, πριν την μετάγγιση των αιμοπεταλίων στους ασθενείς, σε αντίθεση με το αματοσαλένιο, το οποίο πρέπει να απομακρυνθεί.

Για την καλύτερη κατανόηση των διαφορών των δυο τεχνικών έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες που σύγκριναν αυτές τις δύο τεχνικές. Οι συγκριτικές έρευνες που έχουν γίνει εστιάζουν στον αριθμό των αιμοπεταλίων και στη λειτουργικότητα τους. Οι συγκριτικές έρευνες επιβεβαίωσαν ότι οι δύο τεχνικές οδηγούν σε αυξημένη ενεργότητα δηλαδή σε αυξημένη έκφραση της P-σελεκτίνης και αυξημένη εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης και της GPIIb/IIIa.¹⁶⁹ Ο μεταβολισμός των αιμοπεταλίων αυξάνεται και στις δυο τεχνικές γι' αυτό και παρατηρείται αύξηση του γαλακτικού οξέος και μείωση του pH. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί πως και οι δυο τεχνικές εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα σχηματισμού θρόμβου in vitro στα αιμοπετάλια.¹⁷⁴

Οι έρευνες ασχολήθηκαν αρκετά, σχετικά με τη συσσωρευτική ικανότητα των αιμοπεταλίων. Από τα αποτελέσματα των ερευνών φάνηκε ότι όσες περισσότερες μέρες περνάνε από την αποθήκευση των αιμοπεταλίων, τόσο περισσότερο μειώνεται η συσσωρευτική τους ικανότητα, ανεξαρτήτως τεχνικής.¹⁷⁰ Ωστόσο, φαίνεται πως μειώνεται περισσότερο, στα αιμοπετάλια που έχει χορηγηθεί ριβοφλαβίνη, ενώ η αδρανοποίηση με αματοσαλένιο εμφανίζει μειωμένη συσσωρευτική ικανότητα έναντι του αγωνιστή TRAP και της ριστοσετίνης.^{169,174}

Όσον αφορά στα αμινοξέα, η κάθε τεχνική τα επηρεάζει διαφορετικά. Το αματοσαλένιο οδηγεί σε σχηματισμό δισουλφιδικών γεφυρών (R-SS-R, -2 KDa), ενώ

η ριβοφλαβίνη σε σχηματισμό σουλφονικών οξέων (R-SOH, + 16 KDa, R-SO₃H, +48 KDa). Αν και υπάρχει αυξημένη ενεργοποίηση και μεταβολισμός και στις δύο τεχνικές η τεχνική με ριβοφλαβίνη οδηγεί σε πιο αυξημένα επίπεδα και παράγει περισσότερες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.^{171,173}

Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των τεχνικών αυτών αναφέρονται παρακάτω. Η τεχνική INTERCEPT και συγκεκριμένα το αματοσαλένιο επηρεάζουν τους δείκτες HSR και JC-1 και TRAP-6, ανεξίτη V, pH, pCO₂ και του pO₂ και την κατανάλωση ATP. Στα μειονεκτήματα κατατάσσεται η αυξημένη και γρήγορη κατανάλωση της γλυκόζης η οποία οφείλεται στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, καθώς και η δημιουργία φωτοπροϊόντων.¹⁷⁰ Το αματοσαλένιο προκαλεί αυξημένη ενεργότητα των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα να μειώνονται περισσότερο τα επίπεδα των microRNA συγκριτικά με την ριβοφλαβίνη.¹⁷² Συγκριτικά με την ριβοφλαβίνη, η τεχνική με αματοσαλένιο εμφανίζει πιο αυξημένα επίπεδα ανεξίτης και πιο μειωμένα επίπεδα ATP.

Από την άλλη πλευρά, η τεχνική Mirasol και η ριβοφλαβίνη οδηγεί σε αυξημένο μεταβολισμό και αύξηση των ROS.^{161,170,171} Η παραγωγή των ROS είναι αποτέλεσμα που προκύπτει από την ακτινοβολία με UVB.¹⁷³ Παράλληλα, λόγω των αυξημένων αναγκών σε ATP, επάγεται η αναερόβια γλυκόλυση, με παραγωγή γαλακτικού οξέος.¹⁶⁶ Επιπλέον, τα αιμοπετάλια έχουν καλύτερη συντήρηση, και παρά τις μεγαλύτερες ανάγκες ενέργειας, τα επίπεδα του ATP διατηρούνται και συνεπώς υπάρχει πιθανότητα καλύτερης βιωσιμότητας.¹⁷⁰ Επίσης ο δείκτης HSR ανευρίσκεται σε πιο μειωμένα επίπεδα στην τεχνική αδρανοποίησης με ριβοφλαβίνη, όμως υπάρχει ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης.¹⁷⁰ Παράλληλα στην συγκεκριμένη τεχνική παρατηρούνται πιο αυξημένη έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης και της πρωτεΐνης GPIIb/IIIa. Ένα ακόμα πλεονέκτημα της τεχνικής αποτελεί το γεγονός ότι δεν επηρεάζει τα επίπεδα του microRNA.¹⁷² Τέλος η μέθοδος μειονεκτεί σε σύγκριση με αυτή του αματοσαλενίου στο ότι εμφανίζεται πιο μειωμένη συσσωρευτική ικανότητα προς περισσότερους αγωνιστές.

5.3 UVC LIGHT

Πέρα από τις τεχνικές INERCEPT και Mirasol σήμερα χρησιμοποιείται η τεχνική Theraflex που χρησιμοποιεί υπεριώδη ακτινοβολία C ή UVC. Σε αντίθεση με τις

παραπάνω μεθόδους δεν περιέχει κάποιο χημικό παράγοντα. Ωστόσο, το γεγονός πως είναι η νεότερη από τις τεχνικές και η έλλειψη βιβλιογραφίας δεν την κάνει αξιόπιστη. Η μέθοδος δεν εφαρμόζεται στη ρουτίνα ακόμη, και βρίσκεται στην φάση κλινικών δοκιμών ΙΙΙ, γι' αυτό και υπάρχουν λίγες έρευνες σχετικά με αυτή.

Σύμφωνα με τις υπάρχουσες έρευνες, η UVC φέρνει αλλαγές σε συνολικά 47 πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων σε αντίθεση με τις άλλες τεχνικές όπως η ριβοφλαβίνη που φέρει αλλαγές σε 67 πρωτεΐνες. Επομένως, αυτό αποτελεί ένα βασικό της πλεονέκτημα μεθόδου. Είναι σημαντικό να αναφερθεί σε αυτό το σημείο, ότι αν και η τεχνική φέρει λιγότερες μεταβολές, βρέθηκε σημείο μεταλλαγής (πρωτεΐνη ERp72) που επηρεάζεται αποκλειστικά από την μέθοδο UVC, οπότε κρίνεται απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες, συγκριτικά με την συγκεκριμένη πρωτεΐνη.¹⁶⁷ Επιπλέον, σε μια ακόμη πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε πως δεν προκαλεί μεταβολές στον αριθμό των αιμοπεταλίων, αλλά ούτε υπήρξε σχηματισμός νεοαντιγόνων έναντι των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων.¹⁶⁸ Στα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι το μικρότερο χρονικό όριο χρήσης των αιμοπεταλίων (5 ημέρες) για την μέθοδο UVC συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους (7 ημέρες).⁵⁹ Η τεχνική χρήζει περαιτέρω έρευνας και μελέτης, προτού εφαρμοστεί.

6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι τεχνικές αδρανοποίησης αιμοπεταλίων φαίνεται ότι είναι κατάλληλες και αποδοτικές, για αρκετά μεγάλο εύρος παθογόνων που εν δυνάμει μπορούν να μεταδοθούν μέσω της μετάγγισης. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι δεν αποτελούν πανάκεια, καθώς δεν υπάρχει πρόβλεψη για τα *prions*, τους μη ελυτροφόρους ιούς, τα σπόρια και την περίπτωση υψηλού τίτλου ιαιμίας. Στα γενικότερα πλεονεκτήματα των μεθόδων αδρανοποίησης, κατατάσσεται επίσης, το χαρακτηριστικό ότι σε καμία μελέτη δεν έχει παρατηρηθεί η δημιουργία ανεπιθύμητων αντιδράσεων σε μεταγγιζόμενους ασθενείς και δεν φαίνεται να σχηματίζονται νεοαντιγόνα, που αποτέλεσε τον αρχικό προβληματισμό σε θεωρητικό επίπεδο.^{32,178}

Παράλληλα, εμποδίζουν την εμφάνιση του συνδρόμου TA-GvHD, το οποίο δημιουργείται από τα υπολειπόμενα λευκά αιμοσφαίρια κατά την μετάγγιση αιμοπεταλίων και πλάσματος. Από την άλλη πλευρά, σε μία σχετικά πρόσφατη ανασκόπηση αναφέρεται ότι η χορήγηση αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων φαίνεται να αυξάνουν την συχνότητα μεταγγίσεων. Σύμφωνα με τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι οι τεχνικές αδρανοποίησης σε γενικές γραμμές είναι ασφαλείς και οι ασθενείς εμφανίζουν σχετικά καλή κλινική εικόνα. Υπάρχουν ερωτήματα αναπάντητα ωστόσο για την αποδοτικότητα των εφαρμογών αδρανοποίησης, καθώς υπάρχουν μεταβολές στην ακεραιότητα της μεμβράνης, στην σηματοδότηση μοριακών μονοπατιών και στην λειτουργία των miRNAs. Όλα τα παραπάνω οδηγούν σε μειωμένη ικανότητα ανάκτησης και επιβίωσης των αιμοπεταλίων.^{45,47,140,153,178-180}

Αυτό που έγινε αντιληπτό, είναι ότι κάθε στοιχείο που υπάρχει στο πρωτόκολλο κάθε τεχνικής, επιδρά με διαφορετικό τρόπο στα αιμοπετάλια και συνεπικουρικά όλοι οι παράγοντες, διαμορφώνουν το τελικό αποτέλεσμα. Τα μειονεκτήματα που παρατηρούνται σε όλες τις τεχνικές είναι η αυξημένη ενεργότητα των αιμοπεταλίων και η αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα. Οι μηχανισμοί ωστόσο που οδηγούν στα παραπάνω φαινόμενα είναι διαφορετικοί για την κάθε τεχνική. Παράλληλα, στην αδρανοποίηση παρατηρείται επιτάχυνση ορισμένων φαινομένων της αποθηκευτικής βλάβης. Συγκριτικά με την αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε ποσότητα αυτόλογου πλάσματος, το προσθετικό διάλυμα αποθήκευσης φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο

στην μείωση της αποθηκευτικής βλάβης και παράλληλα στην καταστολή του αυξημένου μεταβολισμού, που συμβαίνει στην αδρανοποίηση.^{46,166,181} Τέλος, στα γενικά χαρακτηριστικά είναι οι μεταβολές στο mtDNA και μειωμένη ικανότητα σχηματισμού θρόμβου *in vitro*.^{141,142,174,182}

Για τον χημικό φωτοευαίσθητο παράγοντα του αματοσαλενίου, υπήρχε προβληματισμός σχετικά με την τοξικότητα του, το οποίο αναιρείται λόγω της χαμηλής συγκέντρωσής στην οποία χρησιμοποιείται. Ωστόσο, στο πρωτόκολλο εφαρμογής του Intercept, υπάρχει οδηγία αφαίρεσης της περίσσειας του αματοσαλενίου με ειδική συσκευή.⁵¹ Επιπρόσθετα το αματοσαλένιο, αν και φάνηκε να μειώνει τον CCI και οι ασθενείς να χρειάζονται περισσότερες μεταγγίσεις, προσφέρει καλή αποτελεσματικότητα ως προς τα παθογόνα και υπάρχουν αποδεκτά αποτελέσματα λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων για 7 ημέρες.^{137,144,146,148,149,183}

Είναι αξιοσημείωτο, ότι δημιουργούνται φωτοπροϊόντα, κατόπιν πρόσδεσης του αματοσαλενίου σε λιπιδιακές μεμβράνες, όμως οι ασθενείς δεν εμφανίζουν νεοαντιγόνα.^{53,122} Ακόμα φαίνεται να παρεμβάλλεται στο μιτοχονδριακό DNA και να μεταβάλλει το πρωτέομα.^{141,142,147,148} Οι μοριακές αλλαγές στο mtDNA δεν αλλάζουν το δυναμικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων, οπότε το παραπάνω φαινόμενο δεν οδηγεί σε εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και πιθανά η μείωση του pH να προέρχεται από διαφορετικό μηχανισμό. Βέβαια, το δυναμικό της μεμβράνης μειώνεται κατά την αποθήκευση των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων.¹⁷⁰ Στην τεχνική αδρανοποίησης με αματοσαλένιο μειώνεται 3 φορές περισσότερο, σε σύγκριση με την ριβοφλαβίνη, και αυτό σχετίζεται και με την έκφραση της ανεξίνης που ανευρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα στα αδρανοποιημένα PLTs με αματοσαλένιο.¹⁷⁰ Ακόμα παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα στα miRNAs συγκριτικά με την μέθοδο της ριβοφλαβίνης.¹⁷² Η τεχνική αδρανοποίησης με αματοσαλένιο φαίνεται να επιδρά στην ενεργοποίηση των PLTs. Κατά την αποθήκευση των αδρανοποιημένων αιμοπεταλίων με αματοσαλένιο, υπάρχει αυξημένη ενεργότητα, με μειωμένη ικανότητα συσσώρευσης.^{137-139,143,144,148,150,169,172}

Ο χημικός παράγοντας της ριβοφλαβίνης υπερέχει βιοχημικά έναντι του αματοσαλενίου, καθώς πρόκειται για υδατοδιαλυτή βιταμίνη που ανευρίσκεται στον ανθρώπινο οργανισμό. Οπότε και δεν απαιτείται απομάκρυνση του χημικού παράγοντα, όπως στην τεχνική αδρανοποίησης με αματοσαλένιο. Η ριβοφλαβίνη

φαίνεται ότι ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια σε μεγαλύτερο βαθμό από το αματοσαλένιο, τα οποία εμφανίζονται με αυξημένη ενεργότητα και περισσότερο αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα. Η πρόωρη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων οδηγεί σε επιτάχυνση των φαινομένων της αποθηκευτικής βλάβης. Η αυξημένη οξειδωση, οδηγεί σε παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και ελεύθερων ριζών το οποίο προκαλείται από την UVB.^{171,173} Μετά την εφαρμογή της τεχνικής, εμφανίζεται πρόωρη έκκριση κοκκίων, το οποίο παρατηρείται σε εντονότερο βαθμό σε σχέση με τις υπόλοιπες τεχνικές.¹⁷²

Υπάρχει ομοφωνία ως προς την θεωρία ότι κατά την τεχνική αδρανοποίηση με ριβοφλαβίνη αυξάνεται το μονοπάτι της αναερόβιας γλυκόλυσης για την παραγωγή ATP.¹⁷³ Η αυξημένη φωσφορυλίωση της p38MARK και VASP που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού φαίνεται ότι επηρεάζει την σηματοδότηση μοριακών μονοπατιών που σχετίζονται με την έκφραση των γλυκοπρωτεϊνών GPIIb και GPV καθώς και με την ενεργοποίηση της ακτίνης και της GPIIb/IIIa αντίστοιχα.^{113,161} Λόγω της πρόωρης έκκρισης κοκκίων κατά την διάρκεια αποθήκευσης, μετέπειτα υπάρχει μειωμένη ικανότητα ανάκτησης.^{153,155,159-161,164}

Τα φαινόμενα που προκύπτουν από τον αυξημένο μεταβολισμό, μπορούν να ανασταλούν αν χρησιμοποιηθεί προσθετικό διάλυμα PAS, έναντι του αυτόλογου πλάσματος.^{160,166,181} Ωστόσο, οι μελέτες δείχνουν ότι τα αιμοπετάλια που έχουν αδρανοποιηθεί με ριβοφλαβίνη, εμφανίζουν επαρκή επίπεδα λειτουργικότητας και δράσης in vivo και στις περισσότερες μελέτες διατηρείται ακέραιη η μιτοχονδριακή λειτουργία. Στα αδρανοποιημένα αιμοπετάλια με ριβοφλαβίνη έχουμε λειτουργικά μιτοχόνδρια, όμως λόγω των αυξημένων αναγκών σε ADP επάγεται η οξειδωση της γλυκόζης και η παραγωγή γαλακτικού οξέος.^{152,154,157,165,166}

Από την συγκεκριμένη ανασκόπηση και την υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν φαίνεται να υπερέχει κάποια συγκεκριμένη τεχνική έναντι των υπολοίπων, καθώς οι δύο τεχνικές που έχουν κύρια εφαρμογή στα αιμοπετάλια και έχουν μελετηθεί περισσότερο, εμφανίζουν τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Από την άλλη πλευρά, η αδρανοποίηση με υπεριώδη ακτινοβολία UVC είναι αρκετά υποσχόμενη, καθώς πλεονεκτεί στο ότι δεν χρησιμοποιείται κάποιος φωτοευαίσθητος χημικός παράγοντας. Ωστόσο, η ακτινοβολία UVC έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος, που σημαίνει υψηλότερα επίπεδα ενέργειας, έναντι των άλλων ακτινοβολιών. Βέβαια η

δόση ακτινοβολίας που εφαρμόζεται είναι σε χαμηλότερα επίπεδα (0.25 J/cm^2), συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους. Για αυτό το λόγο, κρίνεται απαραίτητη για την τελική αξιολόγηση της, να πραγματοποιηθούν περισσότερες έρευνες.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι κάθε παράγοντας, όπως ο τύπος ακτινοβολίας, ο φωτοευαίσθητος χημικός παράγοντας, το προσθετικό διάλυμα αποθήκευσης ή ακόμα και ο τύπος του δείγματος (αιμοπετάλια αφαίρεσης, ανάκτησης ή απλό δείγμα PRP) επιδρά με διαφορετικό τρόπο στο τελικό αποτέλεσμα των αιμοπεταλίων.^{122,150} Ακόμα, οι μεταβολές διαφέρουν ανάλογα την τεχνική και την ημέρα αποθήκευσης που πραγματοποιήθηκε η ανάλυση. Κρίνεται σκόπιμη η διενέργεια μεγάλων, τυφλών και στανταρισμένων συγκριτικών μελετών, για την ταυτοποίηση των μοριακών μονοπατιών που επηρεάζουν διαφορετικά τα αιμοπετάλια στην κάθε τεχνική αδρανοποίησης. Η αποθήκευση των αιμοπεταλίων σε ψύχος παρουσιάζει αντίθετα αποτελέσματα, συγκριτικά με την αδρανοποίηση. Μελλοντικά, θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί, αν τα φαινόμενα της αυξημένης ενεργότητας και μεταβολικής δραστηριότητας, τα οποία λαμβάνουν χώρα στις τεχνικές αδρανοποίησης, αναστέλλονται από τα φαινόμενα της αποθήκευσης των αιμοπεταλίων σε ψύχος, καθώς το τελευταίο καιρό οι συνθήκες αποθήκευσης απασχολούν αρκετά την επιστημονική κοινότητα.

Η διερεύνηση των βιομορίων που μεταβάλλονται, καθώς και των μονοπατιών που αυτά συμμετέχουν, θα οδηγήσει στην βελτίωση και ανάπτυξη της ιδανικής μεθόδου αδρανοποίησης, η οποία θα αδρανοποιεί ένα μεγάλο φάσμα παθογόνων, χωρίς κυτταρική βλάβη, με μεταβολές αντίστοιχες με αυτές των κυττάρων που δεν έχουν δεχθεί αδρανοποίηση. Τέλος, είναι σημαντικό η μέθοδος να μπορεί να εφαρμόζεται καθολικά σε όλα τα παράγωγα, καθώς και η εφαρμογή της να είναι απλή στην παραγωγή και προσιτή σε κόστος.

7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Τσεβρένης Κ-Γ. *ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας*; 1991.
2. Erony SM, Marshall CE, Gehrie EA, et al. The epidemiology of bacterial culture-positive and septic transfusion reactions at a large tertiary academic center: 2009 to 2016. *Transfusion*. Aug 2018;58(8):1933-1939.
3. Σπηλιωτοπούλου ΕΓ-Ι. *ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ: Ελληνική αιματολογική εταιρεία*; 2010.
4. Perkins HA, Busch MP. Transfusion-associated infections: 50 years of relentless challenges and remarkable progress. *Transfusion*. Oct 2010;50(10):2080-2099.
5. Ammann AJ, Cowan MJ, Wara DW, et al. Acquired immunodeficiency in an infant: possible transmission by means of blood products. *Lancet*. Apr 30 1983;1(8331):956-958.
6. Fiedler SA, Oberle D, Chudy M, et al. Effectiveness of blood donor screening by HIV, HCV, HBV-NAT assays, as well as HBsAg and anti-HBc immunoassays in Germany (2008-2015). *Vox sanguinis*. Jul 2019;114(5):443-450.
7. Shaz BH, Hillyer CD. *Transfusion medicine and hemostasis: clinical and laboratory aspects*: Newnes; 2013.
8. Bolton-Maggs PH. SHOT conference report 2016: serious hazards of transfusion - human factors continue to cause most transfusion-related incidents. *Transfusion medicine*. Dec 2016;26(6):401-405.
9. Bolton-Maggs PHB. Serious hazards of transfusion - conference report: celebration of 20 years of UK haemovigilance. *Transfusion medicine*. Dec 2017;27(6):393-400.
10. Lieshout-Krikke RW, Domanovic D, De Kort W, et al. Selection strategies for newly registered blood donors in European countries. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. Oct 2017;15(6):495-501.
11. Lieshout-Krikke RW, Zaaijer HL, van de Laar TJ. Predonation screening of candidate donors and prevention of window period donations. *Transfusion*. Feb 2015;55(2):373-378.
12. Politou M, Koutras D, Kaparos G, et al. Seroprevalence of HHV-6 and HHV-8 among blood donors in Greece. *Virology journal*. Aug 27 2014;11:153.
13. Mark K. Fung, Brenda J. Grossman, Christopher D. Hillyer, WesthofL CM. *Technical Manual*. 18th ed: American Association of Blood Banks (AABB); 2014.
14. Di Minno G, Perno CF, Tiede A, et al. Current concepts in the prevention of pathogen transmission via blood/plasma-derived products for bleeding disorders. *Blood reviews*. Jan 2016;30(1):35-48.
15. Datta S, Chatterjee S, Veer V. Recent advances in molecular diagnostics of hepatitis B virus. *World journal of gastroenterology*. Oct 28 2014;20(40):14615-14625.
16. Busch MP, Glynn SA, Stramer SL, et al. A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion*. Feb 2005;45(2):254-264.
17. Ainley LI, Hewitt PE. Haematology patients and the risk of transfusion transmitted infection. *British journal of haematology*. Feb 2018;180(4):473-483.
18. Morse SS, Hughes JM. Developing an integrated epidemiologic approach to emerging infectious diseases. *Epidemiologic reviews*. 1996;18(1):1-3.
19. Bruce-Chwatt LJ. Transfusion associated parasitic infections. *Progress in clinical and biological research*. 1985;182:101-125.
20. Domanovic D, Kitchen A, Politis C, et al. Targeting of blood safety measures to affected areas with ongoing local transmission of malaria. *Transfusion medicine*. Jun 2016;26(3):161-165.

21. Chohan G, Llewelyn C, Mackenzie J, et al. Variant Creutzfeldt-Jakob disease in a transfusion recipient: coincidence or cause? *Transfusion*. May 2010;50(5):1003-1006.
22. Brown P, Cervenakova L, McShane LM, Barber P, Rubenstein R, Drohan WN. Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *Transfusion*. Nov-Dec 1999;39(11-12):1169-1178.
23. Bellon A, Comoy E, Simoneau S, et al. Decontamination of prions in a plasma product manufacturing environment. *Transfusion*. Apr 2014;54(4):1028-1036.
24. Rohwer RG. Scrapie infectious agent is virus-like in size and susceptibility to inactivation. *Nature*. Apr 12-18 1984;308(5960):658-662.
25. Pisani G, Cristiano K, Pupella S, Liumbruno GM. West Nile Virus in Europe and Safety of Blood Transfusion. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. May 2016;43(3):158-167.
26. Otani MM, Vinelli E, Kirchhoff LV, et al. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion*. Jun 2009;49(6):1076-1082.
27. Levin AE, Krause PJ. Transfusion-transmitted babesiosis: is it time to screen the blood supply? *Current opinion in hematology*. Nov 2016;23(6):573-580.
28. Tonnetti L, Townsend RL, Deisting BM, Haynes JM, Dodd RY, Stramer SL. The impact of Babesia microti blood donation screening. *Transfusion*. Feb 2019;59(2):593-600.
29. Gabitzsch ES, Piesman J, Dolan MC, Sykes CM, Zeidner NS. Transfer of Borrelia burgdorferi s.s. infection via blood transfusion in a murine model. *The Journal of parasitology*. Aug 2006;92(4):869-870.
30. Ginzburg Y, Kessler D, Kang S, Shaz B, Wormser GP. Why has Borrelia burgdorferi not been transmitted by blood transfusion? *Transfusion*. Nov 2013;53(11):2822-2826.
31. Pavia CS, Plummer MM. Transfusion-Associated Lyme Disease - Although Unlikely, It Is Still a Concern Worth Considering. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:2070.
32. Stramer SL. Current perspectives in transfusion-transmitted infectious diseases: emerging and re-emerging infections. *ISBT science series*. Jul 2014;9(1):30-36.
33. Franca AO, Pompilio MA, Pontes E, et al. Leishmania infection in blood donors: A new challenge in leishmaniasis transmission? *PloS one*. 2018;13(6):e0198199.
34. Jimenez A, Shaz BH, Bloch EM. Zika Virus and the Blood Supply: What Do We Know? *Transfusion medicine reviews*. Jan 2017;31(1):1-10.
35. Ankcorn MJ, Tedder RS. Hepatitis E: the current state of play. *Transfusion medicine*. Apr 2017;27(2):84-95.
36. Hettmann A, Juhasz G, Dencs A, et al. Phylogenetic analysis of a transfusion-transmitted hepatitis A outbreak. *Virus genes*. Feb 2017;53(1):15-20.
37. He M, Wang J, Chen L, Liu J, Zeng P. The Impact of Emerging Infectious Diseases on Chinese Blood Safety. *Transfusion medicine reviews*. Apr 2017;31(2):94-101.
38. Regan J, Matthias J, Green-Murphy A, et al. A confirmed Ehrlichia ewingii infection likely acquired through platelet transfusion. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. Jun 2013;56(12):e105-107.
39. Tomashek KM, Margolis HS. Dengue: a potential transfusion-transmitted disease. *Transfusion*. Aug 2011;51(8):1654-1660.
40. Palavecino EL, Yomtovian RA, Jacobs MR. Bacterial contamination of platelets. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. Feb 2010;42(1):71-82.

41. Blajchman MA, Goldman M, Baeza F. Improving the bacteriological safety of platelet transfusions. *Transfusion medicine reviews*. Jan 2004;18(1):11-24.
42. Benjamin RJ, Kline L, Dy BA, et al. Bacterial contamination of whole-blood-derived platelets: the introduction of sample diversion and prestorage pooling with culture testing in the American Red Cross. *Transfusion*. Nov 2008;48(11):2348-2355.
43. Klein HG, Glynn SA, Ness PM, Blajchman MA, Components NWGoROftPRIoB. Research opportunities for pathogen reduction/inactivation of blood components: summary of an NHLBI workshop. *Transfusion*. Jun 2009;49(6):1262-1268.
44. Di Minno G, Navarro D, Perno CF, et al. Pathogen reduction/inactivation of products for the treatment of bleeding disorders: what are the processes and what should we say to patients? *Annals of hematology*. Aug 2017;96(8):1253-1270.
45. Fast LD, DiLeone G, Cardarelli G, Li J, Goodrich R. Mirasol PRT treatment of donor white blood cells prevents the development of xenogeneic graft-versus-host disease in Rag2-/-gamma c-/- double knockout mice. *Transfusion*. Sep 2006;46(9):1553-1560.
46. van der Meer PF, de Korte D. Platelet Additive Solutions: A Review of the Latest Developments and Their Clinical Implications. *Transfusion medicine and hemotherapy : offzielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. Apr 2018;45(2):98-102.
47. Bianchi M, Vaglio S, Pupella S, et al. Leucoreduction of blood components: an effective way to increase blood safety? *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. May 2016;14(2):214-227.
48. Pelletier JP, Transue S, Snyder EL. Pathogen inactivation techniques. *Best practice & research. Clinical haematology*. 2006;19(1):205-242.
49. Osman A, Hitzler WE, Provost P. Peculiarities of studying the effects of pathogen reduction technologies on platelets. *Proteomics. Clinical applications*. Aug 2016;10(8):805-815.
50. Irsch J, Seghatchian J. Update on pathogen inactivation treatment of plasma, with the INTERCEPT Blood System: Current position on methodological, clinical and regulatory aspects. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. Apr 2015;52(2):240-244.
51. Ciaravino V, McCullough T, Cimino G. The role of toxicology assessment in transfusion medicine. *Transfusion*. Oct 2003;43(10):1481-1492.
52. Kaiser-Guignard J, Canellini G, Lion N, Abonnenc M, Osselaer JC, Tissot JD. The clinical and biological impact of new pathogen inactivation technologies on platelet concentrates. *Blood reviews*. Nov 2014;28(6):235-241.
53. Lin L, Conlan MG, Tessman J, Cimino G, Porter S. Amotosalen interactions with platelet and plasma components: absence of neoantigen formation after photochemical treatment. *Transfusion*. Oct 2005;45(10):1610-1620.
54. Rios JA, Hambleton J, Viele M, et al. Viability of red cells prepared with S-303 pathogen inactivation treatment. *Transfusion*. Oct 2006;46(10):1778-1786.
55. Mufti NA, Erickson AC, North AK, et al. Treatment of whole blood (WB) and red blood cells (RBC) with S-303 inactivates pathogens and retains in vitro quality of stored RBC. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*. Jan 2010;38(1):14-19.
56. Laughhunn A, Santa Maria F, Broult J, et al. Amustaline (S-303) treatment inactivates high levels of Zika virus in red blood cell components. *Transfusion*. Mar 2017;57(3pt2):779-789.

57. Waters L, Cameron M, Padula MP, Marks DC, Johnson L. Refrigeration, cryopreservation and pathogen inactivation: an updated perspective on platelet storage conditions. *Vox sanguinis*. May 2018;113(4):317-328.
58. Goodrich RP, Edrich RA, Li J, Seghatchian J. The Mirasol PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. Aug 2006;35(1):5-17.
59. Mundt JM, Rouse L, Van den Bossche J, Goodrich RP. Chemical and biological mechanisms of pathogen reduction technologies. *Photochemistry and photobiology*. Sep-Oct 2014;90(5):957-964.
60. Seghatchian J, Putter JS. Pathogen inactivation of whole blood and red cell components: an overview of concept, design, developments, criteria of acceptability and storage lesion. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. Oct 2013;49(2):357-363.
61. Seltsam A, Muller TH. UVC Irradiation for Pathogen Reduction of Platelet Concentrates and Plasma. *Transfusion medicine and hemothrapy : offzielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. 2011;38(1):43-54.
62. Πάγκαλης ΓΑ. «Αιματολογία στην κλινική πράξη». 1η εκδ. ed. Αθήνα: Π.Χ. Πασχαλίδης; 2008.
63. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer metastasis reviews*. Jun 2017;36(2):195-198.
64. Ι. Γ. «Αιμόσταση, διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις». 1st ed. Θεσσαλονίκη 2004.
65. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. Jul 15 2003;102(2):449-461.
66. Nuyttens BP, Thijs T, Deckmyn H, Broos K. Platelet adhesion to collagen. *Thrombosis research*. Jan 2011;127 Suppl 2:S26-29.
67. Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood*. Sep 15 2004;104(6):1606-1615.
68. Bennett JS, Berger BW, Billings PC. The structure and function of platelet integrins. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. Jul 2009;7 Suppl 1:200-205.
69. Walsh TG, Li Y, Wersall A, Poole AW. Small GTPases in platelet membrane trafficking. *Platelets*. 2019;30(1):31-40.
70. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews*. Jul 2009;23(4):177-189.
71. Chen CH, Lo RW, Urban D, Pluthero FG, Kahr WH. alpha-granule biogenesis: from disease to discovery. *Platelets*. Mar 2017;28(2):147-154.
72. Yeung J, Hawley M, Holinstat M. The expansive role of oxylipins on platelet biology. *Journal of molecular medicine*. Jun 2017;95(6):575-588.
73. de Witt SM, Verdoold R, Cosemans JM, Heemskerk JW. Insights into platelet-based control of coagulation. *Thrombosis research*. May 2014;133 Suppl 2:S139-148.
74. Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cosemans JM. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. Jan 2013;11(1):2-16.
75. Koupenova M, Mick E, Mikhalev E, Benjamin EJ, Tanriverdi K, Freedman JE. Sex differences in platelet toll-like receptors and their association with cardiovascular risk factors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Apr 2015;35(4):1030-1037.

76. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Dec 2010;30(12):2341-2349.
77. Estevez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology*. Mar 2017;32(2):162-177.
78. Reed GL, Fitzgerald ML, Polgar J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood*. Nov 15 2000;96(10):3334-3342.
79. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan RE. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood*. Aug 1 1996;88(3):907-914.
80. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*. Jan 26 1996;84(2):289-297.
81. Lentz BR. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Progress in lipid research*. Sep 2003;42(5):423-438.
82. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circulation research*. Dec 8 2006;99(12):1293-1304.
83. Murer EH, Hellem AJ, Rozenberg MC. Energy metabolism and platelet function. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1967;19(3):280-282.
84. Doery JC, Hirsh J, Cooper I. Energy metabolism in human platelets: interrelationship between glycolysis and oxidative metabolism. *Blood*. Aug 1970;36(2):159-168.
85. Corona de la Pena N, Gutierrez-Aguilar M, Hernandez-Resendiz I, Marin-Hernandez A, Rodriguez-Enriquez S. Glycoprotein Ib activation by thrombin stimulates the energy metabolism in human platelets. *PLoS one*. 2017;12(8):e0182374.
86. Obydennyy SI, Sveshnikova AN, Ataullakhanov FI, Panteleev MA. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. Sep 2016;14(9):1867-1881.
87. Reuter H, Gross R. Platelet metabolism. *Supplementum ... ad Thrombosis and haemostasis*. 1978;63:87-95.
88. Longenecker G. *The Platelets: Physiology And Pharmacology*: Elsevier Science; 2012.
89. Michelson AD. *Platelets*: Elsevier Science; 2013.
90. Broos K, De Meyer SF, Feys HB, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Blood platelet biochemistry. *Thrombosis research*. Mar 2012;129(3):245-249.
91. Ruggeri ZM, Zarpellon A, Roberts JR, Mc Clintock RA, Jing H, Mendolicchio GL. Unravelling the mechanism and significance of thrombin binding to platelet glycoprotein Ib. *Thrombosis and haemostasis*. Nov 2010;104(5):894-902.
92. Dormann D, Clemetson KJ, Kehrel BE. The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood*. Oct 1 2000;96(7):2469-2478.
93. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thrombosis and haemostasis*. Aug 2002;88(2):186-193.
94. Bennett JS. Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3. *The Journal of clinical investigation*. Dec 2005;115(12):3363-3369.
95. Xiao T, Takagi J, Collier BS, Wang JH, Springer TA. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature*. Nov 4 2004;432(7013):59-67.

96. Quinn MJ, Byzova TV, Qin J, Topol EJ, Plow EF. Integrin alphaIIb beta3 and its antagonism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Jun 1 2003;23(6):945-952.
97. Schneider DJ. Anti-platelet therapy: glycoprotein IIb-IIIa antagonists. *British journal of clinical pharmacology*. Oct 2011;72(4):672-682.
98. Michelson AD. Methods for the measurement of platelet function. *The American journal of cardiology*. Feb 2 2009;103(3 Suppl):20A-26A.
99. Kingsley MI, Wadsworth D, Kilduff LP, McEneny J, Benton D. Effects of phosphatidylserine on oxidative stress following intermittent running. *Medicine and science in sports and exercise*. Aug 2005;37(8):1300-1306.
100. Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chemistry and physics of lipids*. Jun 2000;106(1):1-29.
101. Majumder R, Weinreb G, Lentz BR. Efficient thrombin generation requires molecular phosphatidylserine, not a membrane surface. *Biochemistry*. Dec 27 2005;44(51):16998-17006.
102. Tzima E, Walker JH. Platelet annexin V: the ins and outs. *Platelets*. Aug 2000;11(5):245-251.
103. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology today*. Mar 1993;14(3):131-136.
104. Ramstrom S, O'Neill S, Dunne E, Kenny D. Annexin V binding to platelets is agonist, time and temperature dependent. *Platelets*. 2010;21(4):289-296.
105. Tzima E, Trotter PJ, Orchard MA, Walker JH. Annexin V relocates to the platelet cytoskeleton upon activation and binds to a specific isoform of actin. *European journal of biochemistry*. Aug 2000;267(15):4720-4730.
106. Smith CW, Raslan Z, Parfitt L, et al. TREM-like transcript 1: a more sensitive marker of platelet activation than P-selectin in humans and mice. *Blood advances*. Aug 28 2018;2(16):2072-2078.
107. Bergan JJ. *The Vein Book*: Elsevier Science; 2006.
108. Gremmel T, Calatzis A, Steiner S, et al. Is TRAP-6 suitable as a positive control for platelet reactivity when assessing response to clopidogrel? *Platelets*. 2010;21(7):515-521.
109. Kaufmann R, Patt S, Kraft R, et al. PAR 1-type thrombin receptors are involved in thrombin-induced calcium signaling in human meningioma cells. *Journal of neuro-oncology*. Apr 1999;42(2):131-136.
110. Hunter RW, Mackintosh C, Hers I. Protein kinase C-mediated phosphorylation and activation of PDE3A regulate cAMP levels in human platelets. *The Journal of biological chemistry*. May 1 2009;284(18):12339-12348.
111. Chow TW, Hellums JD, Thiagarajan P. Thrombin receptor activating peptide (SFLLRN) potentiates shear-induced platelet microvesiculation. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. Jan 2000;135(1):66-72.
112. Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, et al. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *The EMBO journal*. Jan 4 1999;18(1):37-48.
113. Sudo T, Ito H, Kimura Y. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets. *Platelets*. Sep 2003;14(6):381-390.
114. Obata T, Brown GE, Yaffe MB. MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Critical care medicine*. Apr 2000;28(4 Suppl):N67-77.
115. Chen Z, Schubert P, Culibrk B, Devine DV. p38MAPK is involved in apoptosis development in apheresis platelet concentrates after riboflavin and ultraviolet light treatment. *Transfusion*. Apr 2015;55(4):848-857.

116. Chen Z, Schubert P, Bakkour S, Culibrk B, Busch MP, Devine DV. p38 mitogen-activated protein kinase regulates mitochondrial function and microvesicle release in riboflavin- and ultraviolet light-treated apheresis platelet concentrates. *Transfusion*. May 2017;57(5):1199-1207.
117. Slichter SJ. Background, rationale, and design of a clinical trial to assess the effects of platelet dose on bleeding risk in thrombocytopenic patients. *Journal of clinical apheresis*. Apr 2006;21(1):78-84.
118. Davis KB, Slichter SJ, Corash L. Corrected count increment and percent platelet recovery as measures of posttransfusion platelet response: problems and a solution. *Transfusion*. Jun 1999;39(6):586-592.
119. Heal JM, Blumberg N. Optimizing platelet transfusion therapy. *Blood reviews*. Sep 2004;18(3):149-165.
120. Estcourt LJ, Stanworth SJ, Doree C, Hopewell S, Trivella M, Murphy MF. Comparison of different platelet count thresholds to guide administration of prophylactic platelet transfusion for preventing bleeding in people with haematological disorders after myelosuppressive chemotherapy or stem cell transplantation. *The Cochrane database of systematic reviews*. Nov 18 2015(11):CD010983.
121. Blumberg N, Heal JM, Phillips GL. Platelet transfusions: trigger, dose, benefits, and risks. *F1000 medicine reports*. Jan 27 2010;2:5.
122. Feys HB, Van Aelst B, Compennolle V. Biomolecular Consequences of Platelet Pathogen Inactivation Methods. *Transfusion medicine reviews*. Jan 2019;33(1):29-34.
123. Hegde S, Akbar H, Zheng Y, Cancelas JA. Towards increasing shelf life and haemostatic potency of stored platelet concentrates. *Current opinion in hematology*. Nov 2018;25(6):500-508.
124. Bakry R, Sayed D, Galal H, Shaker S. Platelet function, activation and apoptosis during and after apheresis. *Therapeutic apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy*. Oct 2010;14(5):457-464.
125. Wang L, Xie R, Fan Z, et al. The contribution of oxidative stress to platelet senescence during storage. *Transfusion*. Jul 2019;59(7):2389-2402.
126. Klinger MH. The storage lesion of platelets: ultrastructural and functional aspects. *Annals of hematology*. Sep 1996;73(3):103-112.
127. Getz TM, Turgeon A, Wagner SJ. Sodium citrate contributes to the platelet storage lesion. *Transfusion*. Jun 2019;59(6):2103-2112.
128. B EK, M FB. State of the art in platelet function testing. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. Apr 2013;40(2):73-86.
129. Rinder HM, Smith BR. In vitro evaluation of stored platelets: is there hope for predicting posttransfusion platelet survival and function? *Transfusion*. Jan 2003;43(1):2-6.
130. Cicchetti A, Coretti S, Sacco F, et al. Budget impact of implementing platelet pathogen reduction into the Italian blood transfusion system. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. Nov 2018;16(6):483-489.
131. Moeremans K, Warie H, Annemans L. Assessment of the economic value of the INTERCEPT blood system in Belgium. *Transfusion medicine*. Feb 2006;16(1):17-30.
132. Benjamin RJ, Braschler T, Weingand T, Corash LM. Hemovigilance monitoring of platelet septic reactions with effective bacterial protection systems. *Transfusion*. Dec 2017;57(12):2946-2957.
133. Levy JH, Neal MD, Herman JH. Bacterial contamination of platelets for transfusion: strategies for prevention. *Critical care*. Oct 27 2018;22(1):271.

134. Prowse CV. Component pathogen inactivation: a critical review. *Vox sanguinis*. Apr 2013;104(3):183-199.
135. Schwertz H, Koster S, Kahr WH, et al. Anucleate platelets generate progeny. *Blood*. May 6 2010;115(18):3801-3809.
136. Bray PF, McKenzie SE, Edelstein LC, et al. The complex transcriptional landscape of the anucleate human platelet. *BMC genomics*. Jan 16 2013;14:1.
137. van Rhenen DJ, Vermeij J, Mayaudon V, Hind C, Lin L, Corash L. Functional characteristics of S-59 photochemically treated platelet concentrates derived from buffy coats. *Vox sanguinis*. 2000;79(4):206-214.
138. Jansen GA, van Vliet HH, Vermeij H, et al. Functional characteristics of photochemically treated platelets. *Transfusion*. Mar 2004;44(3):313-319.
139. Picker SM, Speer R, Gathof BS. Functional characteristics of buffy-coat PLTs photochemically treated with amotosalen-HCl for pathogen inactivation. *Transfusion*. Mar 2004;44(3):320-329.
140. Snyder E, Raife T, Lin L, et al. Recovery and life span of 111indium-radiolabeled platelets treated with pathogen inactivation with amotosalen HCl (S-59) and ultraviolet A light. *Transfusion*. Dec 2004;44(12):1732-1740.
141. Bruchmuller I, Losel R, Bugert P, et al. Effect of the psoralen-based photochemical pathogen inactivation on mitochondrial DNA in platelets. *Platelets*. Dec 2005;16(8):441-445.
142. Bakkour S, Chafets DM, Wen L, et al. Assessment of nucleic acid modification induced by amotosalen and ultraviolet A light treatment of platelets and plasma using real-time polymerase chain reaction amplification of variable length fragments of mitochondrial DNA. *Transfusion*. Feb 2016;56(2):410-420.
143. Apelseh TO, Hervig TA, Wentzel-Larsen T, Bruserud O. Cytokine accumulation in photochemically treated and gamma-irradiated platelet concentrates during storage. *Transfusion*. May 2006;46(5):800-810.
144. Apelseh TO, Bruserud O, Wentzel-Larsen T, Bakken AM, Bjorsvik S, Hervig T. In vitro evaluation of metabolic changes and residual platelet responsiveness in photochemical treated and gamma-irradiated single-donor platelet concentrates during long-term storage. *Transfusion*. Apr 2007;47(4):653-665.
145. Lozano M, Galan A, Mazzara R, Corash L, Escolar G. Leukoreduced buffy coat-derived platelet concentrates photochemically treated with amotosalen HCl and ultraviolet A light stored up to 7 days: assessment of hemostatic function under flow conditions. *Transfusion*. Apr 2007;47(4):666-671.
146. Tynngard N, Johansson BM, Lindahl TL, Berlin G, Hansson M. Effects of intercept pathogen inactivation on platelet function as analysed by free oscillation rheometry. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. Feb 2008;38(1):85-88.
147. Thiele T, Sablewski A, Iuga C, et al. Profiling alterations in platelets induced by Amotosalen/UVA pathogen reduction and gamma irradiation--a LC-ESI-MS/MS-based proteomics approach. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. May 2012;10 Suppl 2:s63-70.
148. Hechler B, Ohlmann P, Chafey P, et al. Preserved functional and biochemical characteristics of platelet components prepared with amotosalen and ultraviolet A for pathogen inactivation. *Transfusion*. Jun 2013;53(6):1187-1200.
149. Sandgren P, Diedrich B. Pathogen inactivation of double-dose buffy-coat platelet concentrates photochemically treated with amotosalen and UVA light: preservation of in vitro function. *Vox sanguinis*. May 2015;108(4):340-349.
150. Feys HB, Devloo R, Sabot B, De Pourcq K, Coene J, Compernelle V. High platelet content can increase storage lesion rates following Intercept pathogen inactivation primarily in platelet concentrates prepared by apheresis. *Vox sanguinis*. Nov 2017;112(8):751-758.

151. Perez-Pujol S, Tonda R, Lozano M, et al. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. *Transfusion*. Jun 2005;45(6):911-919.
152. Li J, Lockerbie O, de Korte D, Rice J, McLean R, Goodrich RP. Evaluation of platelet mitochondria integrity after treatment with Mirasol pathogen reduction technology. *Transfusion*. Jun 2005;45(6):920-926.
153. AuBuchon JP, Herschel L, Roger J, et al. Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultraviolet light for pathogen reduction. *Transfusion*. Aug 2005;45(8):1335-1341.
154. Picker SM, Steisel A, Gathof BS. Effects of Mirasol PRT treatment on storage lesion development in plasma-stored apheresis-derived platelets compared to untreated and irradiated units. *Transfusion*. Aug 2008;48(8):1685-1692.
155. Picker SM, Steisel A, Gathof BS. Evaluation of White Blood Cell- and Platelet-Derived Cytokine Accumulation in MIRASOL-PRT-Treated Platelets. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. 2009;36(2):114-120.
156. Tauszig ME, Picker SM, Gathof BS. Platelet derived cytokine accumulation in platelet concentrates treated for pathogen reduction. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. Feb 2012;46(1):33-37.
157. Picker SM, Steisel A, Gathof BS. Cell integrity and mitochondrial function after Mirasol-PRT treatment for pathogen reduction of apheresis-derived platelets: Results of a three-arm in vitro study. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. Apr 2009;40(2):79-85.
158. Reid S, Johnson L, Woodland N, Marks DC. Pathogen reduction treatment of buffy coat platelet concentrates in additive solution induces proapoptotic signaling. *Transfusion*. Oct 2012;52(10):2094-2103.
159. Schubert P, Culibrk B, Coupland D, Scammell K, Gyongyossy-Issa M, Devine DV. Riboflavin and ultraviolet light treatment potentiates vasodilator-stimulated phosphoprotein Ser-239 phosphorylation in platelet concentrates during storage. *Transfusion*. Feb 2012;52(2):397-408.
160. Picker SM, Tauszig ME, Gathof BS. Cell quality of apheresis-derived platelets treated with riboflavin-ultraviolet light after resuspension in platelet additive solution. *Transfusion*. Mar 2012;52(3):510-516.
161. Schubert P, Coupland D, Culibrk B, Goodrich RP, Devine DV. Riboflavin and ultraviolet light treatment of platelets triggers p38MAPK signaling: inhibition significantly improves in vitro platelet quality after pathogen reduction treatment. *Transfusion*. Dec 2013;53(12):3164-3173.
162. Terada C, Mori J, Okazaki H, Satake M, Tadokoro K. Effects of riboflavin and ultraviolet light treatment on platelet thrombus formation on collagen via integrin alphaIIb beta3 activation. *Transfusion*. Jul 2014;54(7):1808-1816.
163. Terada C, Shiba M, Nagai T, Satake M. Effects of riboflavin and ultraviolet light treatment on platelet thrombus formation and thrombus stability on collagen. *Transfusion*. Jul 2017;57(7):1772-1780.
164. Terada C, Shiba M, Satake M, Tadokoro K. Real-time measurement of platelet shape change by light scattering under riboflavin and ultraviolet light treatment. *Transfusion*. Mar 2016;56(3):587-595.
165. Zeddies S, De Cuyper IM, van der Meer PF, et al. Pathogen reduction treatment using riboflavin and ultraviolet light impairs platelet reactivity toward specific agonists in vitro. *Transfusion*. Sep 2014;54(9):2292-2300.
166. van der Meer PF, Bontekoe IJ, Daal BB, de Korte D. Riboflavin and UV light treatment of platelets: a protective effect of platelet additive solution? *Transfusion*. Aug 2015;55(8):1900-1908.

167. Mohr H, Steil L, Gravemann U, et al. A novel approach to pathogen reduction in platelet concentrates using short-wave ultraviolet light. *Transfusion*. Dec 2009;49(12):2612-2624.
168. Thiele T, Pohler P, Kohlmann T, et al. Tolerance of platelet concentrates treated with UVC-light only for pathogen reduction--a phase I clinical trial. *Vox sanguinis*. Jul 2015;109(1):44-51.
169. Picker SM, Schneider V, Gathof BS. Platelet function assessed by shear-induced deposition of split triple-dose apheresis concentrates treated with pathogen reduction technologies. *Transfusion*. Jun 2009;49(6):1224-1232.
170. Picker SM, Oustianskaia L, Schneider V, Gathof BS. Functional characteristics of apheresis-derived platelets treated with ultraviolet light combined with either amotosalen-HCl (S-59) or riboflavin (vitamin B2) for pathogen-reduction. *Vox sanguinis*. Jul 2009;97(1):26-33.
171. Prudent M, Sonogo G, Abonnenc M, Tissot JD, Lion N. LC-MS/MS analysis and comparison of oxidative damages on peptides induced by pathogen reduction technologies for platelets. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. Apr 2014;25(4):651-661.
172. Osman A, Hitzler WE, Meyer CU, et al. Effects of pathogen reduction systems on platelet microRNAs, mRNAs, activation, and function. *Platelets*. 2015;26(2):154-163.
173. Abonnenc M, Sonogo G, Crettaz D, et al. In vitro study of platelet function confirms the contribution of the ultraviolet B (UVB) radiation in the lesions observed in riboflavin/UVB-treated platelet concentrates. *Transfusion*. Sep 2015;55(9):2219-2230.
174. Van Aelst B, Feys HB, Devloo R, Vanhoorelbeke K, Vandekerckhove P, Compennolle V. Riboflavin and amotosalen photochemical treatments of platelet concentrates reduce thrombus formation kinetics in vitro. *Vox sanguinis*. May 2015;108(4):328-339.
175. Magron A, Laugier J, Provost P, Boilard E. Pathogen reduction technologies: The pros and cons for platelet transfusion. *Platelets*. 2018/01/02 2018;29(1):2-8.
176. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Dec 2003;23(12):2131-2137.
177. Reikvam H, Marschner S, Apelseh TO, Goodrich R, Hervig T. The Mirasol Pathogen Reduction Technology system and quality of platelets stored in platelet additive solution. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. Jul 2010;8(3):186-192.
178. Infanti L, Holbro A, Passweg J, et al. Clinical impact of amotosalen-ultraviolet A pathogen-inactivated platelets stored for up to 7 days. *Transfusion*. Oct 1 2019.
179. Ambruso DR, Thurman G, Marschner S, Goodrich RP. Lack of antibody formation to platelet neoantigens after transfusion of riboflavin and ultraviolet light-treated platelet concentrates. *Transfusion*. Dec 2009;49(12):2631-2636.
180. Estcourt LJ, Malouf R, Hopewell S, et al. Pathogen-reduced platelets for the prevention of bleeding. *The Cochrane database of systematic reviews*. Jul 30 2017;7:CD009072.
181. Leitner GC, List J, Horvath M, Eichelberger B, Panzer S, Jilma-Stohlavetz P. Additive solutions differentially affect metabolic and functional parameters of platelet concentrates. *Vox sanguinis*. Jan 2016;110(1):20-26.
182. Kim S, Handke W, Gravemann U, et al. Mitochondrial DNA multiplex real-time polymerase chain reaction inhibition assay for quality control of pathogen inactivation by ultraviolet C light in platelet concentrates. *Transfusion*. Mar 2018;58(3):758-765.
183. McCullough J, Vesole DH, Benjamin RJ, et al. Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation: the SPRINT Trial. *Blood*. Sep 1 2004;104(5):1534-1541.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Μηχανισμός δράσης της τεχνικής με αματοσαλένιο (Holbro et al., 2013). Στο παραπάνω σχήμα φαίνεται σε σχηματική αναπαράσταση ο μηχανισμός δράσης της αδρανοποίησης αιμοπεταλίων μέσω της τεχνικής INTERCEPT®	18
Εικόνα 2. Μηχανισμός δράσης ριβοφλαβίνης σε συνδιασμό με UVB (Bryant and Klein, 2007. Στο παραπάνω σχήμα φαίνεται σε σχηματική αναπαράσταση ο μηχανισμός δράσης της αδρανοποίησης αιμοπεταλίων μέσω της τεχνικής Mirasol®.....	20
Εικόνα 3. Μηχανισμός δράσης ακτινοβολία UVC (Seltsam, 2017). Στο παραπάνω σχήμα φαίνεται σε σχηματική αναπαράσταση ο μηχανισμός δράσης της αδρανοποίησης αιμοπεταλίων μέσω της τεχνικής Theraflex®.....	21
Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση αιμοπεταλίου και λειτουργιών του. (Haley et al, Nature, 2014) Παρουσιάζονται οι μηχανισμοί της προσκόλλησης, ενεργοποίησης, έκκρισης και συσσώρευσης του αιμοπεταλίου	26
Εικόνα 5. Μοριακά μονοπάτια ενεργοποίησης και αναστολείς αιμοπεταλίου (K. Broos et al. Thrombosis Research, 2012).....	29
Εικόνα 6. Συσχέτιση μήκους κύματος - ενέργειας μεθόδων και των βλαβών στα αιμοπετάλια (Levy et al., 2018).....	42

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2: Πιο συχνά αίτια βακτηριακής επιμόλυνσης στην Αιμοδοσία.....	15
--	----

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Σύντμηση	Επεξήγηση
12-LOX	12-λιποξυγενάση
AA	Αραχιδονικό Οξύ
ADP	Adenosine Diphosphate
AIDS	Acquired Immunodeficiency syndrome
AMP	Adenosine monophosphate
ATP	Adenosine Triphosphate
Ca	Ασβέστιο
CAD	Συσκευή Απομάκρυνσης Αματοσαλενίου
cAMP	κυκλικό AMP ή κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CCI	Corrected Count Increment
CD62P	P-σελεκτίνη
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendments
CMV	Κυτταρομεγαλοϊός
COX-1	Κυκλοξυγενάση-1
CPA	Cone and plate(let) analyzer
DAG	Διαγλυκερόλη
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EBV	Ιός Ebstein Barr
ECM	Εξωκυττάρια Θεμέλια Ουσία
ELISA	Enzyme-linked immunoserological assay
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
F.D.A.	Οργανισμός Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των Η.Π.Α.
FFP	Φρέσκο Κατεψυγμένο πλάσμα
FP	Κατεψυγμένο πλάσμα
FRALE	Frangible Anchor Linker Effector
Gla	γ-καρβοξυλογλουταμινικό οξύ
HAV	Ιός της ηπατίτιδας Α
HbsAg	Αυστραλιανό Αντιγόνο
HBV	Ιός της ηπατίτιδας Β

HCO ₃	Διττανθρακικά
HCV	Ιός της ηπατίτιδας C
HEV	Ιός της ηπατίτιδας E
HIV	Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
HLA	Human leukocyte antigen
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
HSR	Υποτονικό Σοκ
HTLV	Ανθρώπινος T-Λεμφοτρόπος Ιός
IP	Αναστολέας της φωσφοδιεστεράσης
IP ₃	Τριφωσφορική ινοσιτόλη
ITAMs	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
LC	Liquid chromatography
LDH	Γαλακτική αφυδρογονάση
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome - Coronavirus
miRNA	microRNA
MPV	Mean Platelet Volume
mRNAs	Αγγελιαφόρο RNA
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
mtDNA	Μιτοχονδριακής Προέλευσης DNA
NAT	Nucleic Acid Amplification Testing
PAS	Platelet Additive Solutions
pCO ₂	Carbon Dioxide
PCR	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
PhC	Φωτοχημικές Αρχές Μεθόδου
PhD	Φωτοδυναμικές Αρχές Μεθόδου
PI	Pathogen Inactivation
PLC- γ	Φωσφολιπάση C γ_2
PLTs	Αιμοπετάλια
pO ₂	Pressure Of Oxygen
pRBCs	Συμπυκνωμένα Ερυθρά Αιμοσφαίρια
Prion	πρωτεΐνη που οδηγεί στην νόσο των τρελών αγελάδων
PRT	Pathogen Reduction Technologies

PS	Φωσφατιδυλοσερίνη
PSGL-1	Γλυκοπρωτεΐνη πρόσδεση της P-σελεκτίνης -1
RBCs	Ερυθρά αιμοσφαίρια
RIBA	Recombinant ImmunoBlot Assay
RIPA	Ράδιο-ανοσοκαθίζηση
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Δραστικές Μορφές Οξυγόνου
RPR	Rapid plasma reagin
SARS-CoV	Severe acute respiratory syndrome - Coronavirus
SD	Solvent detergent
SRD	S-59 reduction device
TA-GvHD	Transfusion-associated graft-versus-host disease
TRALI	Transfusion-related acute lung injury
TRAP-6	Thrombin Receptor Activator Peptide 6
TXA2	Θρομβοξάνη
UVA	Υπεριώδη Ακτινοβολία Α
UVB	Υπεριώδη Ακτινοβολία Β
UVC	Υπεριώδη Ακτινοβολία Γ
VASP	Αγγειοδιασταλτική Φωσφορυλιωμένη Φωσφοπρωτεΐνη
vCJD	Νόσος Creutzfeld – Jakob
VDRL	Venereal disease research laboratory
VWF	von Willebrand factor
WBCs	Λευκά Αιμοσφαίρια
WNV	Ιός του Δυτικού Νείλου
ΣΕ	Συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια