



Università di Pisa
Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie
in Medicina e Chirurgia

Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica

Titolo della Tesi

Variazione dei parametri di funzionalità piastrinica durante la conservazione di buffy-coat

Relatori:

Prof. ALDO PAOLICCHI

Dott.ssa ROSARIA BONINI

Candidato:

Dott.ssa IRENE FORNACIARI

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

RIASSUNTO	pag.4
INTRODUZIONE	pag.5
1. Piastrine: produzione e struttura	pag.5
<i>1.1 Granuli delle piastrine</i>	pag.5
2. Funzione delle piastrine	pag.6
<i>2.1 L'adesione piastrinica e il cambiamento di forma</i>	pag.6
<i>2.2 Aggregazione piastrinica</i>	pag.7
3. Attività procoagulante delle piastrine	pag.8
4. Meccanismi di azione della terapia antiplastrinica	pag.8
5. Conteggio delle piastrine	pag.9
6. Alterazioni del numero delle piastrine: trombocitopenie	pag.10
7. Indicazioni cliniche per la trasfusione delle piastrine	pag.10
8. Reazioni avverse associate alla trasfusione di piastrine	pag.12
9. Concentrati Piastrinici disponibili	pag.13
<i>9.1 Piastrine recuperate da singola unità di sangue</i>	pag.13
<i>9.2 Piastrine recuperate da un pool</i>	pag.14
<i>9.3 Piastrine da aferesi</i>	pag.14
<i>9.4 Piastrine crioconservate</i>	pag.15
10. Requisiti richiesti e controllo di qualità dei concentrati piastrinici	pag.15
11. Differenza di qualità tra i concentrati piastrinici da buffy coat e da aferesi	pag.16
12. Conservazione dei concentrati piastrinici	pag.17
13. Conservazione dei buffy-coat per la preparazione dei concentrati piastrinici	pag.19
SCOPO DELLA TESI	pag.21
MATERIALI E METODI	pag.22
1. Preparazione del concentrato piastrinico e conservazione dei buffy-coat	pag.22
2. Analisi emocromocitometrica e analisi biochimica di glucosio, lattato, LDH e pH	pag.22
3. Preparazione del plasma ricco di piastrine (PRP) e del plasma povero di piastrine (PPP)	pag.23
4. Analisi citofluorimetrica dell'espressione di P-selectina sulla superficie piastrinica	pag.23
5. Test di aggregazione piastrinico	pag.24

6. Preparazione del campione per la valutazione dei livelli di serotonina	pag.24
7. Valutazione dei livelli di serotonina	pag.24
8. Analisi statistica	pag.25
RISULTATI	pag.26
1. Variazione dei parametri emocromocitometrici (WBC, PLT, MPV, PDW) durante i cinque giorni di conservazione	pag.26
2. Variazioni di parametri biochimici: glucosio, lattato, LDH, pH	pag.27
3. Valutazione della funzionalità piastrinica durante il periodo di conservazione mediante test di aggregazione piastrinico	pag.29
4. Valutazione dell' espressione di P-selectina sulla superficie piastrinica mediante analisi citofluorimetrica	pag.29
5. Valutazione dei livelli di serotonina e correlazione con l' espressione della p-selectina	pag.30
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag.32
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	pag.36

RIASSUNTO

Introduzione: In questi ultimi 10 anni i metodi per la raccolta, la lavorazione e la conservazione dei concentrati piastrinici si sono rapidamente evoluti mentre, di pari passo, si è ampliato il numero delle patologie che si giovano di tale trattamento cosicché, a partire dai primi anni ottanta ad oggi, l'uso dei concentrati piastrinici è aumentato del 400% .

Inizialmente i concentrati piastrinici per uso terapeutico erano allestiti come pool di plasma ricco di piastrine ottenuto da una singola donazione di sangue intero. Sono poi state introdotte nuove metodologie produttive, ad esempio l'allestimento di concentrati piastrinici random a partire da pool di buffy-coat; la conservazione di buffy-coat ha però diversi punti critici, tra i quali quanto tempo possono essere conservati. Attualmente la conservazione dei buffy-coat prima dell'assemblaggio non è definita per cui, alla luce dell'aumentata richiesta di concentrati piastrinici sviluppatasi negli ultimi anni, sarebbe utile conoscere il tempo massimo di conservazione di questi ultimi.

Scopo di questo lavoro è valutare come variano i parametri funzionalità e morfologia piastrinica nel concentrato ottenuto da un pool di buffy-coat conservato fino a 5 giorni.

Materiali e Metodi: da 15 buffy coat di gruppo A è stato preparato un pool conservato in agitazione a 20-24°C. A partire dal giorno della raccolta dei buffy coat (T1), dopo 3 (T3) e 5 giorni (T5) è stato ottenuto il concentrato piastrinico. Su quest'ultimo è stata effettuata l'analisi emocromocitometrica, e determinati alcuni parametri biochimici quali il glucosio, lattato, lattato deidrogenasi (LDH) e pH. È stata inoltre valutata la funzionalità piastrinica mediante test di aggregazione (usando come agonisti l'ADP e il collagene), il grado di attivazione delle piastrine in base all'espressione di P-selectina sulla superficie mediante citofluorimetria e la concentrazione di serotonina mediante HPLC.

Risultati: I risultati ottenuti hanno dimostrato una diminuzione progressiva della concentrazione di glucosio da T1 a T5 accompagnata da un aumento sia della concentrazione del lattato che dell'attività catalitica di LDH. Il pH diminuisce da 6,5 a 6,2 dopo 5 giorni. Anche i parametri relativi alla morfologia piastrinica si modificano nel tempo con un aumento progressivo sia dell'MPV che del PDW. L'espressione della P-selectina va dal 10,3% il primo giorno dopo la raccolta (T1) al 29,4% il terzo giorno (T3) fino ad arrivare al 44,1% a T5. Insieme all'aumentata espressione della P-selectina è stato riscontrato anche un aumento dei livelli di serotonina.

Conclusioni: Da questi primi risultati è possibile concludere che già dopo tre giorni di conservazione i concentrati piastrinici presentano alterazioni biochimiche del mezzo, ed alterazioni morfologiche e di funzionalità delle piastrine. Questo studio preliminare suggerisce che non è consigliabile la conservazione dei buffy-coat oltre i tre giorni.

Parole chiave: Piastrine; buffy-coat; concentrati piastrinici.

INTRODUZIONE

1.Piastrine: produzione e struttura

Le piastrine derivano dai megacariociti presenti nel midollo osseo. I megacariociti, che derivano da un processo di differenziazione a partire da cellule staminali ematopoietiche, vanno incontro a frammentazione del loro citoplasma così producendo le piastrine (1). La produzione delle piastrine è controllata da agenti umorali come la trombopoietina (2).

Esse hanno una struttura cellulare relativamente semplificata nelle quali le membrane cellulari presentano molecole recettoriali di adesione; la loro forma è controllata dal citoscheletro ed in particolare da un fascio circonferenziale di microtubuli, situato all'equatore, e da microfilamenti contrattili ancorati alle membrane cellulari (3). Lo strato più esterno della membrana plasmatica delle piastrine è costituito da una superficie ricoperta di glicoproteine (GP) che giocano un ruolo importante nella funzione piastrinica, incluse l'adesione e l'aggregazione, così contribuendo all'emostasi (4,6).

Ci sono molti recettori sullo strato più esterno della membrana plasmatica delle piastrine, che si legano a vari agenti di adesione, di aggregazione, di inibizione e fattori procoagulanti. Questi comprendono le selectine (come GMP 140 o P-selectina), le integrine (come GP I, GP II, GP III, GP IV, GP V), le immunoglobuline e altri recettori, come quelli per l'adenosina difosfato (ADP), il collagene, l'epinefrina, la trombina etc. che partecipano all'adesione delle piastrine, all'aggregazione e alla coagulazione (5-8).

Per esempio la P-selectina, membro della famiglia dei recettori di superficie cellulare (9), è una molecola ricca di cisteina e glicosilata, con una massa di 140 kDa, ed è localizzata nella membrana dei granuli secretori (α -granuli) e nella membrana dei corpi di Weibel-Palade delle cellule dell'endotelio vascolare (10,11). La P-selectina si ridistribuisce dalla membrana dei granuli alla membrana plasmatica quando le piastrine e le cellule endoteliali si attivano e vanno incontro a degranulazione (12). Così le piastrine attivate esprimono la P-selectina sulla membrana plasmatica che agisce come recettore per i neutrofili e i monociti (13). L'aumento dell'espressione della P-selectina sulla membrana plasmatica nonché l'aumento dei livelli plasmatici sono indicativi di attivazione piastrinica (14, 15). La P-selectina agendo come recettore di adesione permette il contatto cellula-cellula, reclutando sia piastrine che neutrofili nella sede del danno vascolare (16) e dell'infiammazione acuta (17).

1.1 *Granuli delle piastrine*

Le piastrine sono cellule prive di nucleo e gli organelli intracellulari nel citoplasma includono il mitocondrio, i granuli alfa (α), i granuli elettrondensi, il sistema tubulare, i perossisomi e i lisosomi

(18). I granuli alfa conservano varie proteine tra cui il fattore piastrinico 4 (PF4), il fattore di crescita derivante dalle piastrine (PDGF), la beta-tromboglobulina, il fibrinogeno, il fattore di von Willebrand (vWF), la fibronectina e altri fattori che non sono esclusivamente specifici delle piastrine (19). Alcune di queste molecole sono anche secrete dalle cellule endoteliali (per esempio il vWF), altre sono già presenti nel plasma (fibrinogeno), altre sono specifiche delle piastrine (beta-tromboglobulina).

La beta-tromboglobulina è un tetramero e ha subunità identiche di 81 aminoacidi ognuna con peso molecolare di 8851 (20). Un altro componente dei granuli alfa è il PF4 che ha subunità identiche di 70 aminoacidi ognuna con peso molecolare di 7756 (21). Entrambe le molecole sono presenti nei granuli alfa nella stessa quantità e vengono rilasciati durante l'attivazione delle piastrine (22).

L'esatta funzione fisiologica di questi due fattori non è ancora stata chiarita, il PF4 ha un'attività anti-eparina (21) e il suo legame con siti specifici sulla superficie delle piastrine sembra modulare l'aggregazione piastrinica e la secrezione indotta da bassi livelli di agonisti delle piastrine (23).

La trombospondina è una glicoproteina di adesione di 450kDa presente ad alta concentrazione nei granuli alfa delle piastrine, ed è secreta in seguito all'attivazione delle piastrine (24). La sua funzione principale sembra essere quella di mediare l'adesione alle cellule e il riconoscimento piastrina-piastrina durante l'aggregazione irreversibile (25).

I granuli densi delle piastrine contengono invece il calcio, la serotonina e i nucleotidi, come anche l'adenosina difosfato (ADP) (26). Altre strutture includono i lisosomi che contengono enzimi idrolitici e i perossisomi che contengono l'enzima catalasi (26).

2. Funzione delle piastrine

La funzione principale delle piastrine è quella di mediare l'emostasi e la trombosi rispondendo ad uno stimolo che vede l'intervento coordinato della membrana plasmatica, dei granuli e del citoscheletro delle piastrine. È possibile classificare la risposta delle piastrine in risposta "reversibile" che include l'adesione, il cambiamento di forma e l'aggregazione reversibile, e in risposta "irreversibile" delle piastrine che comprende la reazione di rilascio del contenuto dei granuli e la secondaria aggregazione irreversibile (27). L'adesione piastrinica e il cambiamento di forma rappresentano le iniziali risposte fisiologiche verso lo sviluppo del tappo emostatico o la formazione del trombo (28).

2.1 L'adesione piastrinica e il cambiamento di forma

Uno dei primi eventi che si verificano in seguito alla lesione vascolare è l'adesione delle piastrine nell'area della lesione (27). Le piastrine si legano a molti componenti della matrice extracellulare

per fornire un'emostasi adeguata nella lesione vascolare, l'adesione piastrinica porta all'aggregazione piastrinica, così le piastrine attivate che sono coinvolte nell'adesione determinano un'ulteriore attivazione di piastrine inattivate presenti in circolo. Le integrine e le altre glicoproteine sulla membrana plasmatica delle piastrine giocano un ruolo importante nell'adesione piastrinica alla matrice extracellulare. Infatti l'adesione delle piastrine al sottoendotelio in condizioni di flusso è mediata da una varietà di proteine plasmatiche tra cui le più importanti sono il vWF, la fibronectina, il fibrinogeno e la trombospondina (31).

Con l'adesione delle piastrine al sottoendotelio nella sede di lesione vascolare viene generata una cascata di segnali che porta al cambiamento di forma delle piastrine stesse ed alla reazione di rilascio del contenuto dei granuli piastrinici. Il cambiamento di forma è caratterizzato da una veloce trasformazione della classica forma discoidale della piastrina a riposo ad una forma irregolarmente sferica con pseudopodi prima corti poi sempre più lunghi che le fanno assumere un aspetto a sfera spinosa e rendono possibile il contatto tra le piastrine vicine (32).

2.2 Aggregazione piastrinica

Diversi fattori (l'ADP, l'epinefrina, il collagene e la trombina) possono indurre l'aggregazione piastrinica (33). In breve, il vWF e il fibrinogeno legano i recettori su una piastrina e creano legami crociati alle altre piastrine (34).

L'aggregazione piastrinica "reversibile" è indotta da basse concentrazioni di stimoli piastrinici in presenza di calcio (Ca^{2+}) extracellulare e/o magnesio (Mg^{2+}), mentre alte concentrazioni di agonisti possono causare una reazione "irreversibile". Quest'ultima è il risultato della reazione di rilascio delle piastrine, che è in relazione al rilascio dei metaboliti dell'acido arachidonico (35,36), specialmente endoperossidasi e trombossani, e la secrezione dei costituenti dei granuli densi delle piastrine (ADP, ATP, serotonina, Ca^{2+}), dei granuli alfa (beta-tromboglobulina, PF4, PDGF) e dei lisosomi (37-40).

Nei granuli sono presenti in alta concentrazione molecole capaci di mantenere ed amplificare la risposta fin qui limitata ed iniziale. L'ADP, il Ca^{2+} , la serotonina, il fibrinogeno, la trombospondina e la trombina generata dalla contemporanea attivazione della cascata coagulativa, costituiscono dei potenti agonisti dell'aggregazione piastrinica: la superficie piastrinica è infatti dotata di recettori per tali molecole che inducono una potente risposta biochimica. Tali induttori attivano la fosfolipasi C (PLC) che agisce sul fosfatidil-inositolo-difosfato (PIP_2) generando due mediatori il DAG (diacilglicerolo) e l' IP_3 (inositolo trifosfato). Il DAG attiva la protein chinasi C (PKC) che a sua volta regola la secrezione dei granuli piastrinici e la formazione del complesso glicoproteico IIb-IIIa, fondamentale per l'aggregazione piastrinica (3).

L'ADP rilasciato dai granuli densi innesca due vie di trasduzione: una accoppiata all'attivazione del calcio indotta dal fosfatidil inositolo, e una seconda che consiste nell'attivazione diretta della fosfolipasi A₂. La fosfolipasi A₂ porta alla liberazione dell'acido arachidonico, nelle piastrine per azione sequenziale degli enzimi ciclo ossigenasi e trombossano-sintetasi, così ha origine il trombossano A₂ (TXA₂) (41).

Con la produzione di TXA₂, le piastrine rilasciano il più potente agonista dell'aggregazione piastrinica, innescando un potente circuito autocrino/paracrino di amplificazione di questo fenomeno.

Pertanto in risposta allo stimolo trombogenero si forma dapprima un aggregato piastrinico che prende il nome di tappo emostatico primario, che è reversibile. Successivamente, dove vi è stata adesione e aggregazione primaria si ha la formazione di un aggregato irreversibile, tappo emostatico secondario (3).

3. Attività procoagulante delle piastrine

Una volta formato l'aggregato piastrinico, c'è la tendenza della fibrina a depositarsi su esso e formare il coagulo. Questo processo è facilitato dalle piastrine, possibilmente mediante più meccanismi. I fosfolipidi di membrana delle piastrine potenziano la via intrinseca della coagulazione che alla fine porta alla formazione di trombina dalla protrombina mediante l'attivazione del fattore X (42). La superficie delle piastrine protegge inoltre i fattori della coagulazione attivati dalla loro inattivazione mediata dai loro naturali inibitori (43). Le reazioni dei costituenti dei granuli rilasciati dalle piastrine giocano un ruolo importante nella formazione del trombo. Per esempio il PF4 sembra possedere una attività antieparina, e il fibrinogeno rilasciato potrebbe contribuire ulteriormente alla formazione del trombo (44).

Recentemente è stato inoltre dimostrato che il fattore V della coagulazione, localizzato nei granuli alfa delle piastrine, viene espresso sulla membrana plasmatica quando le piastrine sono attivate simultaneamente da due agonisti come la trombina e la convulsiva o la trombina e certi sottotipi di collagene (45).

4. Meccanismi di azione della terapia antiplastrinica

Alcuni farmaci possono modificare l'aggregazione piastrinica andando ad interferire con uno o più meccanismi implicati nel processo di aggregazione piastrinica.

Per esempio l'aspirina inibisce irreversibilmente la cicloossigenasi nelle piastrine acetilandola così diminuendo l'amplificazione dell'aggregazione prodotta dagli intermedi (trombossano A₂) della via dell'acido arachidonico (46).

Gli antagonisti del recettore per l'ADP, come la ticlopidina o il clopidogrel, interferiscono con il legame dell'ADP al suo recettore, prevenendo così i cambiamenti che avvengono all'interno delle piastrine che portano all'aggregazione, incluso il processo di amplificazione che risulta dal rilascio dell'ADP conservato nei granuli (47). Gli antagonisti del complesso GP IIb/IIIa, come l'abciximad, il tirofiban e l'integrenil, inibiscono l'aggregazione piastrinica interferendo con il sito di legame del complesso GP IIb/IIIa (47).

Un importante fattore limitante l'uso di questi farmaci sembra essere la loro potenziale azione su altri sistemi dell'organismo e le difficoltà della loro azione essendo ristretti a singoli e specifici recettori piastrinici o vie metaboliche.

5. Conteggio delle Piastrine

Le piastrine sono di dimensioni ridotte, difficilmente riconoscibili e facilmente confuse con frammenti cellulari. Esse tendono inoltre ad aggregarsi in ammassi e ad aderire alle pareti in vetro delle pipette e della camera ottiche utilizzate nelle tecniche manuali. L'uso di materiali monouso in plastica ha significativamente migliorato ma non risolto il problema che solo con il passaggio dai sistemi manuali di conteggio a quelli automatizzati ha raggiunto un accettabile livello di precisione e accuratezza. I valori di riferimento sono 150 000-450 000/ μ L, numerosi fattori possono contribuire al rilievo di valori anomali sia in aumento come l'altitudine, le temperature fredde, l'esercizio strenuo che in diminuzione come il periodo mestruale; il volume medio delle piastrine è 25 μ m (3).

Molto importante insieme alla valutazione del numero delle piastrine circolanti che si ottiene con i comuni sistemi di conta delle cellule del sangue può essere una valutazione della morfologia piastrinica nello striscio. Le piastrine sono generalmente più piccole del globulo rosso (2-3 μ) e si presentano come strutture ovoidale con lo sfondo chiaro, e dei granuli rosso-viola centralmente. Le piastrine non sono cellule ma porzioni di citoplasma separate dai megacariociti midollari. Dimensioni e morfologia sono molto variabili; le dimensioni aumentano nelle piastrine giovani e quando c'è un elevato tasso di produzione del sangue. In alcune patologie quali ad esempio la mielofibrosi e la policitemia o a seguito di splenectomia, possono essere presenti piastrine molto atipiche per morfologia e dimensioni. È importante una valutazione del numero delle piastrine e delle loro dimensioni, espresse dal volume piastrinico medio (MPV), rilevato nei moderni conta globuli (3).

6. Alterazioni del numero delle piastrine: trombocitopenie

Le trombocitopenie sono caratterizzate da una riduzione del numero delle piastrine circolanti, verificatasi in modo acuto o cronico, per insufficiente produzione midollare (MPV diminuito) o per aumentata distruzione periferica (con MPV elevato, da presenza di anticorpi antiplastrine o da sequestro splenico). Le trombocitopenie si possono classificare in forme acute e in forme croniche. Le forme acute della durata di 1-2 mesi, non oltre i 6 mesi, sono dovute alla somministrazione di farmaci (specialmente anti-infiammatori, antibiotici, anticonvulsivanti, benzodiazepine etc) o all'azione di agenti infettivi, ad es., durante e dopo mononucleosi infettiva, malaria, AIDS, sepsi, etc (3).

Le forme croniche possono essere dovute a aumentata distruzione delle piastrine, a un aumentato sequestro splenico come in corso di cirrosi epatica o a una diminuita produzione delle piastrine come in corso di leucemia acuta e aplasia midollare. L'aumentata distruzione delle piastrine di solito si manifesta per presenza di autoanticorpi antiplastrine (trombocitopenia cronica autoimmune) o di alloanticorpi antiplastrine (per allo immunizzazione materno-fetale o post-trasfusionale) o di immunocomplessi circolanti (come in corso di lupus eritomatoso sistemico o di altre patologie autoimmuni); in altri casi l'aumentata distruzione è dovuta allo sviluppo di una coagulazione intravascolare disseminata (3).

7. Indicazioni cliniche per la trasfusione delle piastrine

La trasfusione delle piastrine è indicata per la profilassi e il trattamento delle emorragie in pazienti con trombocitopenia o con disordini funzionali primari o secondari delle piastrine (48).

La decisione di trasfondere componenti piastrinici dovrebbe essere basata sulla conta piastrinica e sulle condizioni cliniche del paziente.

La causa di trombocitopenia è di solito stabilita prima di decidere se è necessario trasfondere piastrine. La trasfusione di piastrine non è indicata in tutte le cause di trombocitopenia e può essere controindicata in certe condizioni (49).

In condizioni di trombocitopenia causata da deficienza midollare la trasfusione terapeutica di piastrine è indicata per pazienti con attiva emorragia.

Le trasfusioni di piastrine per profilassi sono usate quando la conta piastrina è minore di $5-10 \times 10^9/L$ in assenza di emorragia o altri fattori che determinano un consumo di piastrine e in presenza di febbre, di lesioni locali, di disordini coagulativi e/o di sintomi avversi per mantenere la conta piastrinica $>15-20 \times 10^9/L$ (49).

In condizioni di riduzione cronica della produzione di piastrine come nell'anemia aplastica o nella mielodisplasia, è preferibile evitare la trasfusione profilattica a lungo termine per l'aumentato

rischio di allo-immunizzazione HLA/HPA e refrettarità alle piastrine. Molti pazienti non hanno emorragie severe nonostante la conta piastrinica sia di $5-10 \times 10^9/L$. Se è necessaria la trasfusione piastrinica, l'intervallo tra le trasfusioni deve essere saggiato individualmente (49).

I pazienti sottoposti a procedure particolarmente invasive possono richiedere trasfusioni piastriniche per mantenere la conta piastrinica al di sopra di $50 \times 10^9/L$, ancora certe procedure chirurgiche (neurologiche e intraoculari) possono richiedere una conta piastrinica $>100 \times 10^9/L$ (49).

I pazienti con disordini funzionali di piastrine raramente hanno bisogno di trasfusioni piastriniche.

In questi pazienti la causa di alterata funzione dovrebbe essere identificata e corretta, se possibile prima di un intervento chirurgico o di una procedura invasiva. In questo contesto la trasfusione piastrinica viene considerata solo se il paziente sarà sottoposto ad una procedura particolarmente invasiva o con un elevato rischio di emorragia (49).

In condizioni di trasfusioni massive, bypass cardio-polmonare e coagulazione intravascolare disseminata (CID), la conta piastrinica e gli studi di coagulazione dovrebbero essere fatti prima della trasfusione per guidare la successiva terapia. In caso di CID è preferibile trattare tale condizione prima della somministrazione di piastrine (49).

Ci sono inoltre altre trombocitopenie che richiedono interventi diversi per esempio in caso di trombocitopenia auto-immune la trasfusione di piastrine è indicata solo per il trattamento dell'emorragia mentre nella porpora trombotica trombocitopenica la trasfusione dovrebbe essere evitata.

La trombocitopenia allo-immune neonatale è una condizione in cui è richiesta un'urgente trasfusione di piastrine. In Europa, la trombocitopenia allo-immune è comunemente dovuta alla presenza di anticorpi anti-HPA-1a o 5b. Quindi neonati con trombocitopenia allo-immune dovrebbero ricevere piastrine da aferesi che sono antigene-negative per i corrispondenti anticorpi. Quando questi però non sono disponibili dal donatore, possono ricevere le piastrine materne che sono state lavate per rimuovere gli anticorpi e risospese in plasma di gruppo AB o soluzione additiva e successivamente irradiate prima della trasfusione (49).

I concentrati piastrinici (CP) trasfusi devono essere identici o al massimo compatibili per il gruppo sanguigno AB0 in modo da ottenere un buon risultato con la trasfusione (50-53). È stato osservato che concentrati piastrinici incompatibili per il gruppo AB0 non vengono usati preferibilmente perché riducono l'efficacia della trasfusione (50,52-55).

I pazienti Rh-negativi, in particolare donne in età fertile, devono ricevere se possibile PC RhD-negativi (50,52,56).

8. Reazioni avverse associate alla trasfusione di piastrine

La trasfusione delle piastrine è associata a reazioni avverse simili a quelle osservate per la trasfusione degli altri componenti del sangue, come reazioni allergiche, reazione febbrile non emolitica, reazione emolitica, reazione anafilattica, e danno polmonare acuto legato alla trasfusione. Le reazioni trasfusionali febbrili non emolitiche (FNHTR) rappresentano la complicanza immediata di tipo immunologico più frequente dopo terapia sostitutiva con concentrati eritrocitari e piastrinici in pazienti politrasfusi con stime, riportate in letteratura per i due emocomponenti, tra lo 0,2-6,8% e lo 0-37,5% rispettivamente (57-59).

Le FNHTR sono caratterizzate, per definizione, dall'incremento di almeno 1 °C della temperatura corporea accompagnato o meno a brividi, nausea, malessere generale, tachicardia, ipotensione, *rash* cutanei, artralgie o dolori lombari e la loro manifestazione clinica può comparire nel corso della trasfusione, al termine o dopo qualche tempo (minuti o ore) dalla stessa (58).

Oltre all'alloimmunizzazione anti-HLA e/o anti-HPA, recenti studi hanno attribuito un ruolo fondamentale, nell'eziopatogenesi delle FNHTR, alle citochine denominate *biologic response modifiers* (BRM) (60,61), che vengono sintetizzate e liberate dai leucociti (linfociti, *natural killer*, monociti, granulociti) durante la conservazione degli emocomponenti (62). Le citochine sono un gruppo eterogeneo di glicoproteine che nel loro ampio repertorio di attività possono svolgere quella di modulazione del sistema immunitario attraverso un complesso linguaggio intercellulare (63,64); in particolare, le azioni proinfiammatoria e pirogenica sono caratteristiche delle interleuchine 1b (IL-1b), IL-6, IL-8 e del *Tumor Necrosis Factor-alfa* (TNF- α) implicate nelle suddette complicanze febbrili post-trasfusionali (65,66). Le quantità maggiori di citochine sono usualmente presenti nei concentrati piastrinici non leucodepleti e conservati per 5 giorni a 22 °C. Le citochine coinvolte in problematiche trasfusionali possono non solo essere presenti negli emocomponenti (consigliato l'impiego di procedure di "filtrazione in linea") (67,68), ma essere prodotte dal ricevente stesso nelle interazioni con cellule o altre sostanze solubili provenienti dal donatore o, viceversa, essere prodotte dai leucociti del donatore a contatto con antigeni o citochine del ricevente (64,70).

La complicazione a lungo-termine più importante che si verifica in seguito a trasfusione piastrinica è definita refrattarietà piastrinica che si presenta come ripetuti fallimenti in pazienti che hanno fatto frequenti trasfusioni piastriniche per ripristinare la normale conta piastrinica.

Il CCI (corrected platelet count) è una misura empirica quantitativa della risposta del paziente alla trasfusione piastrinica. Questa misura rappresenta la differenza tra la conta piastrinica in un microlitro di sangue dopo la trasfusione e prima della trasfusione, fatta 1 ora dopo la trasfusione di 1×10^{11} piastrine. L'aumento del CCI può essere determinato anche dopo 10 minuti dall'avvenuta

trasfusione piastrinica. Un paziente è considerato “refrattario” quando l’aumento del CCI ottenuto su due consecutive trasfusioni è meno di $7,5 \times 10^9/L$ (70).

Un basso CCI già dopo un’ora (<7500) è di solito associato con alloimmunizzazione agli antigeni piastrinici e leucocitari. Questo tipo di refrattarietà può essere causata da anticorpi contro antigeni HLA di classe I o contro antigeni piastrino-specifici HPA(71). Un normale CCI a 12h e un valore basso (<4.500) a 20-24 h è di solito correlato a una ridotta sopravvivenza delle piastrine come risultato di cause non immunologiche come: febbre, sepsi, splenomegalia, somministrazione di amfotericina B, emorragia e CID (72). Pazienti con un basso CCI in due o più occasioni corrisponde ai criteri di refrattarietà da trasfusione di piastrine. In questi pazienti dovrà essere valutato se la causa di refrattarietà è immunologica o non-immunologica. Usare PC freschi e compatibili per AB0 è importante per determinare se la causa di refrattarietà è mediata da anticorpi; infatti piastrine raccolte 48h prima della trasfusione danno un resa ridotta della trasfusione e hanno una ridotta sopravvivenza in pazienti con condizioni cliniche che sono tra le cause di refrattarietà non-immunologica (73).

9. Concentrati Piastrinici disponibili

Un concentrato piastrinico può essere ottenuto da una donazione di sangue intero e successiva separazione in emocomponenti mediante centrifugazione o da una donazione in aferesi (74).

9.1 Piastrine ottenute da singola unità di sangue

Le piastrine ottenute da singola unità di sangue sono un prodotto che contiene 60×10^9 piastrine, la maggior parte del contenuto di piastrine presenti nel sangue intero, risospese nel plasma. Questo emocomponente contiene $0,2 \times 10^9$ leucociti se preparato con il metodo del plasma ricco di piastrine (PRP) e $0,05 \times 10^9$ leucociti se preparato con metodo del buffy coat.

Il concentrato piastrinico da PRP si ottiene da una unità di sangue intero, conservato in condizioni tali da mantenere la temperatura tra 20-24°C, successivamente centrifugato così che un buon numero di piastrine rimane nel plasma. Le piastrine da PRP sono sedimentate mediante centrifugazione ad alta velocità; il plasma povero di piastrine soprannatante, è rimosso. Le piastrine sono poi risospese nel plasma rimanente.

Il concentrato piastrinico da buffy coat si ottiene invece da una unità di sangue intero, conservato nelle stesse condizioni descritte precedentemente, poi centrifugato così che le piastrine sono primariamente sedimentate nello strato del buffy coat che contiene anche i leucociti. Il buffy coat è separato e processato per ottenere il concentrato piastrinico. I singoli buffy coat diluiti con plasma sono centrifugati così che le piastrine rimangono nel soprannatante, mentre i globuli rossi residui e i leucociti si sedimentano sul fondo della sacca (75).

9.2. Piastrine ottenute da pool

Le piastrine ottenute da un pool sono un emocomponente derivato da 4 a 6 donazioni di sangue intero, risospese in plasma. Questo concentrato contiene un minimo di 2×10^{11} piastrine e un massimo di 1×10^9 leucociti.

Il concentrato piastrinico da pool si può ottenere sia da pool di buffy coat o sia da PRP.

Una volta preparato il buffy coat come descritto precedentemente (paragrafo 9.1), da 4 a 6 buffy coat compatibili per gruppo sanguigno vengono assemblati in maniera sterile e risospesi con plasma. Dopo delicato mescolamento, il pool di buffy coat è centrifugato lentamente così che le piastrine rimangono nel sopranatante, mentre i globuli rossi residui e i leucociti si sedimentano sul fondo della sacca. Il sopranatante contenente le piastrine è immediatamente trasferito nella sacca sterile di conservazione delle piastrine (75).

Il concentrato piastrinico da pool si può inoltre ottenere miscelando da 4 a 6 unità di PRP (75).

I pool dai quali si ricavano i concentrati piastrinici possono subire dei trattamenti aggiuntivi in particolare si possono avere:

a. Concentrati piastrinici da pool leuco-depleti (LD)

Questo concentrato piastrinico leuco-depleto deriva da 4 a 6 donazioni di sangue intero fresco che contiene un minimo di 2×10^{11} piastrine e un massimo di 1×10^6 leucociti. La deplezione dei leucociti avviene mediante filtrazione (75).

b. Concentrati piastrinici da pool in soluzione additiva

Questo concentrato piastrinico deriva da 4 a 6 donazioni di sangue intero fresco che contiene la maggior parte del contenuto piastrinico originale sospeso in una miscela di plasma (30-40%) e in una soluzione additiva (60-70%). Contiene minimo 2×10^{11} piastrine e un massimo di $0,3 \times 10^9$ leucociti (75).

c. Concentrati piastrinici da pool leuco-depleti e in soluzione additiva

Preparati come descritto nei punti a e b. Contiene minimo 2×10^{11} piastrine e un massimo di 1×10^6 leucociti (75).

9.3. Piastrine da aferesi

Questo emocomponente è ottenuto mediante aferesi da un singolo donatore usando strumenti automatici di separazione delle cellule, contiene una dose di piastrine terapeuticamente efficace sospesa in plasma. Contiene un minimo di 2×10^{11} piastrine e un massimo di $0,3 \times 10^9$ leucociti.

Per la preparazione delle piastrine mediante aferesi, il sangue intero prelevato dal donatore mediante un separatore cellulare, viene anticoagulato con una soluzione a base di citrato, separato per centrifugazione con raccolta delle piastrine e reinfusione al donatore degli altri componenti..

Anche i concentrati piastrinici ottenuti da aferesi possono subire dei trattamenti aggiuntivi in particolare si possono avere:

a. Piastrine da aferesi leucodeplete

Contiene un minimo di 2×10^{11} piastrine e un massimo di 1×10^6 leucociti. La deplezione dei leucociti avviene mediante filtrazione (75).

b. Piastrine da aferesi in soluzione additiva

Questo concentrato piastrinico contiene piastrine sospese in una miscela di plasma (30-40%) e una soluzione additiva (60-70%). Contiene un minimo di 2×10^{11} piastrine e un massimo di $0,3 \times 10^9$ leucociti (75).

c. Piastrine da aferesi leucodeplete in soluzione additiva

Come descritto nei punti a e b. Contiene un minimo di 2×10^{11} piastrine e un massimo di 1×10^6 leucociti (75).

9.4 Piastrine crioconservate

Questo emocomponente è preparato mediante congelamento delle piastrine raccolte mediante aferesi, leucodeplete e congelate entro 24h dalla raccolta, usando un crioconservante. Questo prodotto crioconservato contiene più del 40% del contenuto piastrinico originale. Con questo metodo è possibile conservare più a lungo le piastrine di donatori selezionati o autologhe.

Le piastrine raccolte mediante aferesi e leucodeplete vengono crioconservate entro 24h dalla raccolta usando un crioprotettore il DMSO (6% w/v) o il glicerolo (5% w/v). Prima dell'uso le piastrine sono scongelate, lavate e risospese in plasma (autologo) e in soluzione additiva (75).

10. Requisiti richiesti e controllo di qualità dei concentrati piastrinici

La qualità di ogni metodo di preparazione di concentrati piastrinici deve essere valutata periodicamente, andando a valutare alcuni parametri come il volume, la conta piastrinica, i leucociti residui, lo swirling, la morfologia delle piastrine, il pH e la temperatura di conservazione. Il Decreto ministeriale del 2015 "Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti" definisce i requisiti di qualità dei concentrati piastrinici a seconda del metodo di preparazione come riportato di seguito (74).

Concentrato piastrinico da pool di buffy-coat leucodepleto

Parametro	Requisito
Volume	>40 mL per 60×10^9 piastrine per singola unità che costituisce il pool
Piastrine nel prodotto leucodepleto	Minimo 2×10^{11} per singolo pool
Leucociti residui	$< 1 \times 10^6$ per singolo pool
PH misurato a 22°C alla fine del periodo di conservazione	>6,4
Conservazione	22 °C+/- 2

Concentrato piastrinico da aferesi leucodepleto

Parametro	Requisito
Volume	>40 mL per 60×10^9 piastrine per unità
Piastrine nel prodotto leucodepleto	3×10^{11} (minimo 2×10^{11} se ottenuto da aferesi multicomponent)
Leucociti residui	$< 1 \times 10^6$ per singolo pool
PH misurato a 22°C alla fine del periodo di conservazione	>6,4
Conservazione	22 °C+/- 2

La conservazione deve essere effettuata con modalità che garantiscono la vitalità e il mantenimento dell'attività omeostatica delle piastrine contenute. Il volume di plasma o di soluzione additiva deve essere in quantità tale da garantire, durante tutto il periodo di conservazione, il mantenimento del pH>6,4 misurato a 22°C alla fine del periodo di conservazione. La temperatura di conservazione deve essere di 22°C±2 e il periodo massimo di conservazione è di 5 giorni. (74).

Per quanto riguarda le piastrine crioconservate i parametri che devono essere controllati sono: il volume compreso tra 50-200mL; il contenuto di piastrine >40% del contenuto delle piastrine prima del congelamento. Le piastrine congelate vengono costantemente mantenute a: – 80 °C se conservate in un congelatore, – 150 °C in azoto liquido. Se la conservazione supera un anno è preferibile mantenerle a – 150 °C. Le piastrine scongelate devono essere usate il prima possibile

dopo lo scongelamento. È richiesto un piccolo periodo di conservazione mantenuto tra i + 20 °C e i + 24 °C (75).

11. Differenza di qualità tra i concentrati piastrinici da buffy coat e da aferesi

I concentrati piastrinici da buffy coat ottenuti mediante l'utilizzo di sacche Top e Bottom hanno permesso una riduzione della contaminazione leucocitaria, riducendo così l'incidenza di reazione trasfusionale febbrile non emolitica (FNHTR). L'introduzione della piastrinoaferesi ha dato un'enorme impatto sul supporto delle piastrine. La contaminazione da leucociti nei concentrati piastrinici da aferesi è molto bassa quanto quella raggiunta mediante leucofiltrazione.

La trasfusione di concentrati piastrinici ottenuti da aferesi oltre a ridurre il rischio di FNHTR ha anche ridotto la trasmissione di citomegalovirus e lo sviluppo di alloimmunizzazione HLA. Comunque questo metodo ha un costo elevato.

Il metodo di preparazione dei concentrati piastrinici mediante buffy coat è stato paragonato in molti aspetti a quelli ottenuti da aferesi (76).

Un recente studio ha messo a confronto la qualità dei concentrati piastrinici preparati da buffy coat e da aferesi basandosi sulle raccomandazioni date dal DGHS technical Manual (volume, swirling, pH, conta piastrinica e contaminazione leucocitaria) (77,78).

In questo studio i concentrati piastrinici da buffy coat hanno dimostrato di aderire meno ai parametri di controllo di qualità per quanto riguarda lo swirling, il volume e il pH, ma i risultati non si distanziavano molto da quelli ottenuti dai concentrati piastrinici da aferesi.

I concentrati piastrinici da buffy coat sono più facilmente disponibili, possono così essere usati nella maggior parte dei pazienti trombocitopenici dove è indicata la trasfusione delle piastrine. Dall'altro lato quelli ottenuti da aferesi che sono invece scarsamente disponibili dovrebbero essere riservati ai pazienti immunocompromessi che hanno subito trasfusioni multiple e quando sono indicate trasfusioni di piastrine compatibili per HLA e HPA .

Questo studio rinforza ulteriormente il fatto che in laboratori dove le impostazioni organizzative e finanziarie creano dei vincoli nella preparazione di concentrati piastrinici da aferesi, quelli ottenuti da buffy coat rappresentano un'ottima alternativa (78).

12. Conservazione dei concentrati piastrinici

Durante la conservazione le piastrine richiedono un'agitazione delicata e continua, in quanto le piastrine immobili evidenziano un'aumentata produzione di lattato ed una riduzione del pH (79).

Dato che le temperature dell'ambiente oscillano, sono state costruite camere "ambientali" o "camere per piastrine", allo scopo di fornire temperature costanti e controllate. Queste camere sono fornite di ventilatori, registratori delle temperature e sistemi di allarme.

Le piastrine conservate allo stato liquido, fra 20 e 24 °C, sono sospese nel loro stesso plasma (in USA e in Europa) o in soluzioni additive per piastrine (in Europa). In tali condizioni, la durata di vita delle piastrine è, nella maggior parte dei Paesi, di 5 giorni.

Questa limitazione temporale è legata in parte alla perdita di efficacia del prodotto (80) e, in parte, alla possibilità, in questo intervallo di temperatura, di rapida proliferazione batterica (81, 82).

Per quanto riguarda l'efficacia, le piastrine conservate allo stato liquido subiscono modificazioni in vitro, correlate alla durata della conservazione e note, nell'insieme, come lesioni piastriniche da conservazione (83, 84). Esse sono caratterizzate da modificazioni morfologiche (passaggio da forma discoide a forma sferica); dalla produzione di acido lattico da parte della glicolisi, con conseguente diminuzione del pH; dal rilascio del contenuto del citoplasma e dei granuli; dalla diminuzione di molte funzioni piastriniche misurabili in vitro, particolarmente della pressione osmotica; da alterazioni di forma indotte dall'adenosin-difosfato e da una diminuita sopravvivenza in vivo.

Ad oggi i tentativi di definire la natura biochimica delle lesioni piastriniche da conservazione non hanno portato a risultati conclusivi. Le modificazioni osservate possono rappresentare un normale processo di invecchiamento, attenuato dalla temperatura di conservazione inferiore (20-24 °C) rispetto a quella in vivo di 37 °C. È, tuttavia, plausibile un ruolo giocato da danni mitocondriali, come causa corresponsabile di questi cambiamenti. Le piastrine a riposo traggono una quota rilevante di energia dalla β -ossidazione degli acidi grassi (85). Alterazioni dell'integrità dei mitocondri potrebbero determinare una riduzione del flusso di carbonio all'interno del ciclo dell'acido tricarbossilico e richiedere uno spostamento del metabolismo energetico verso la glicolisi, con conseguente aumentata produzione di lattato (85).

La riduzione di attività del ciclo dell'acido tricarbossilico potrebbe compromettere la produzione di ATP efficiente, provocare una diminuzione del pool metabolico di ATP e, quindi, del carico energetico della piastrina (86). Il ridotto carico energetico potrebbe compromettere l'integrità della membrana, determinando una perdita del contenuto citoplasmatico, una diminuita risposta agli stimoli fisiologici e un'incapacità a riparare i lipidi di membrana ossidati, con conseguente deformazione della morfologia piastrinica (87).

13. Conservazione dei Buffy coat per la preparazione dei concentrati piastrinici

Il buffy coat deriva da donazioni di sangue intero e rappresenta lo strato intermedio che si forma dopo centrifugazione tra il plasma libero di cellule e i globuli rossi. Esso può contenere circa l'80% di globuli bianchi (principalmente neutrofili) e il 90% delle piastrine del donatore. Per ragioni logistiche, potrebbe essere di aiuto conservare i buffy coat per un periodo più lungo prima della preparazione dei concentrati piastrinici.

La conservazione di buffy coat ha però diverse controversie (88, 89). L'alta concentrazione di globuli bianchi nei buffy coat potrebbe rappresentare uno svantaggio per l'elevato turnover metabolico di questi ultimi (90).

Ci sono evidenze che suggeriscono che la contaminazione da leucociti nei concentrati piastrinici sono responsabili dell'accumulo di citochine infiammatorie che sono coinvolte nello sviluppo degli effetti sfavorevoli che si possono presentare dopo trasfusione di concentrati piastrinici (vedi paragrafo 8) (91-93). Perciò, la prolungata conservazione dei buffy coat potrebbe essere svantaggiosa, perchè i numerosi globuli bianchi potrebbero rilasciare citochine infiammatorie.

Le condizioni di conservazione dei buffy coat sono inoltre deleterie per le piastrine. Durante la preparazione e la conservazione le piastrine possono attivarsi dando inizio al successivo deterioramento delle piastrine nei successivi preparati piastrinici (94, 95).

Un lavoro del 1997 aveva valutato l'impatto che ha il tempo (più di 24h) sulla conservazione dei buffy coat, andando a valutare la produzione di citochine infiammatorie (IL-8, IL-1beta, IL-6, TNF-alfa) e di marcatori superficiali, solubili e metabolici di attivazione piastrinica (96).

I risultati ottenuti avevano dimostrato che dopo 24h aumentavano i livelli di IL-8 nel 25% dei buffy coat, mentre i livelli delle altre citochine erano rimasti bassi. Questo aumento dell'IL-8 però non correlava con la concentrazione di globuli bianchi nelle sacche.

I globuli bianchi possono influenzare anche la funzione piastrinica (97). Dopo 12h di conservazione è stato osservato inoltre un aumento del rilascio di PF4, dovuto alla fusione degli alfa-granuli alla superficie delle piastrine attivate (98, 99), che correlava con la diminuzione del pH. Perciò l'attivazione delle piastrine e il rilascio di PF4 potevano essere presumibilmente conseguenza dell'abbassamento del pH che segue il deterioramento dei globuli bianchi.

Infine fu osservato un aumento dell'espressione di CD41a (come marcatore superficiale di attivazione piastrinica) sulla superficie delle piastrine immediatamente dopo lavorazione dell'unità di sangue intero che diminuiva con la conservazione. È ormai conosciuto che le piastrine sono attivate durante la lavorazione di sangue intero (94) e che l'attivazione piastrinica è reversibile in certa misura (95).

Questo lavoro concludeva che la conservazione di buffy coat per più di 12h a temperatura ambiente senza agitazione permetteva una buona conservazione delle piastrine. L'attivazione piastrinica era minore dopo 3 e 6 ore di conservazione. Invece la conservazione per più di 24h risultava in un aumento di attivazione piastrinica (aumento PF4) e di rilascio di citochine infiammatorie (IL-8), indicando quindi che la conservazione dei buffy-coat non dovrebbe superare le 12h (96).

SCOPO DELLA TESI

La trasfusione di piastrine (PLT) è indicata per il trattamento e la profilassi delle emorragie, nei pazienti affetti da piastrinopenia o da deficit funzionali, primitivi o secondari, delle piastrine. A partire dagli anni ottanta ad oggi l'uso dei concentrati piastrinici è aumentato del 400% (100), di pari passo i metodi per la raccolta, la lavorazione e la conservazione dei concentrati piastrinici si sono rapidamente evoluti.

Inizialmente i concentrati piastrinici per uso terapeutico erano allestiti come pool di plasma ricco di piastrine (PRP) ottenuto da una singola donazione di sangue intero. Sono poi state introdotte nuove metodologie produttive, ad esempio l'allestimento di concentrati piastrinici random a partire da pool di buffy-coat.

Secondo la normativa vigente e le attuali raccomandazioni, i concentrati piastrinici possono essere conservati a 20-24 °C per cinque giorni, utilizzando modelli diversi sia di contenitore in plastica che di agitatore (101, 102).

Il breve periodo di conservazione è causa dell'eliminazione di un elevato numero di concentrati piastrinici che raggiungono la scadenza prima dell'utilizzo, pertanto per evitare sprechi di risorse è utile preparare il concentrato piastrinico in numero congruo con le richieste. Fermo restando che sarebbe opportuno assemblare i buffy-coat per la produzione del concentrato piastrinico subito dopo la loro validazione, quanto sopra comporta la necessità di poter conservare i buffy-coat prima dell'assemblaggio per un tempo adeguato a mantenerne intatte le proprietà.

A tale scopo si rende necessario definire per quanto tempo è possibile conservare i buffy-coat da utilizzare per la produzione di concentrati piastrinici. Presso il Centro Trasfusionale dell'ospedale San Luca di Lucca vengono conservati fino a un massimo di 3 giorni in agitazione continua a 20-24 °C.

La conservazione di buffy-coat ha però diverse controversie (88, 89). L'alta concentrazione di globuli bianchi nei buffy-coat potrebbe rappresentare uno svantaggio per l'elevato turnover metabolico di questi ultimi (90). La prolungata conservazione dei buffy-coat potrebbe essere svantaggiosa, perchè i numerosi globuli bianchi potrebbero rilasciare citochine infiammatorie responsabili dello sviluppo di reazioni trasfusionali febbrili non emolitiche (FNHTR). Inoltre le condizioni di conservazione dei buffy-coat possono essere deleterie per le piastrine (94, 95).

Per queste ragioni in questo lavoro è stato valutato come variano i parametri biochimici (glucosio, lattato, LDH, pH), di funzionalità piastrinica (espressione di P-selectina sulla superficie piastrinica, rilascio di serotonina) e di morfologia piastrinica (MPV, PDW) nel concentrato piastrinico ottenuto da un pool di buffy coat conservato per 5 giorni a 20-24°C in agitazione.

MATERIALI E METODI

1.Preparazione del concentrato piastrinico e conservazione dei buffy-coat

È stato studiato il concentrato piastrinico ottenuto da 15 buffy coat omogruppo (nel nostro caso di gruppo A) per 5 giorni, a partire dal giorno della raccolta dei buffy coat (T1), dopo due giorni (T3) fino a 5 giorni (T5).

Il primo giorno ogni sacca è stata pesata per poter prelevare la terza parte del volume e formare il primo pool di buffy coat.

Con il saldatore sterile sono state connesse le sacche dei buffy coat uno alla volta ai tubi corrispettivi presenti nel kit, e mediante l'uso della bilancia è stata trasferita la terza parte del volume di ciascun buffy coat nella sacca del kit.

La sacca contenente il pool di buffy coat è stata nuovamente pesata e con il saldatore sterile è stata connessa alla soluzione additiva Composol (citrate 11mM; acetate 27mM; sodio 173mM; potassio 5mM; magnesio 1,5mM; cloro 98mM; gluconato 23mM; acqua 300ml; pH 7,2-7,4). A questo punto è stata aperta la clamp della soluzione additiva, per far sì che questa passasse nella sacca in modo da lavarla bene e recuperare tutto il buffy coat presente. Al termine tutto è stato trasferito in una sacca di raccolta. La sacca così preparata è stata poi centrifugata a 230 g 10 minuti. A fine centrifugazione la sacca è stata posizionata su un frazionatore automatico (Compomat G4, Fresenius HemoCare) ed è stato raccolto il concentrato piastrinico dopo passaggio attraverso un filtro di globuli bianchi posizionato tra la sacca di raccolta e quella dove è stato trasferito il concentrato piastrinico T1.

Le 15 sacche con i buffy coat rimanenti sono state conservate a 20-24°C in agitazione, il terzo giorno (T3) e il quinto giorno (T5) dopo la raccolta sono state ripetute le procedure descritte precedentemente per ottenere rispettivamente i concentrati piastrinici T3 e T5.

2. Analisi emocromocitometrica e analisi biochimica di glucosio, lattato, LDH e pH

Nei giorni 1, 3 e 5 sono state prelevate aliquote del pool di buffy coat prima dell'aggiunta della soluzione conservante e della leucodeplezione (pool PRE) e del concentrato piastrinico leucodepleto (pool POST) e sono stati sottoposti alle seguenti analisi: analisi emocromocitometrica, valutazione della concentrazione di glucosio e lattato, valutazione dell'attività catalitica della lattato deidrogenasi (LDH) e del pH.

L'emocromo è stato analizzato con sistema automatizzato (Sysmex XN-9000, Dasit) in particolare sono stati presi in considerazione i seguenti parametri: conta globuli bianchi WBC, conta piastrinica, PLT; volume piastrinico medio, MPV; piastrinocrito, PCT e ampiezza di distribuzione dei volumi piastrinici, PDW.

La concentrazione di glucosio è stata misurata con metodo enzimatico con esochinasi. In breve l'esochinasi, utilizzando ATP, catalizza la fosforilazione del glucosio a glucosio-6-fosfato. La glucosio-6-fosfato deidrogenasi, in presenza di NADP, provoca l'ossidazione del glucosio-6-fosfato a gluconato-6-fosfato. Gli altri carboidrati non vengono ossidati. La velocità della formazione di NADPH durante la reazione è direttamente proporzionale alla concentrazione di glucosio e viene misurata fotometricamente (GLUC3, Cobas 8000 Roche Diagnostics).

La concentrazione dell'L-Lattato è stata misurata mediante test colorimetrico. L'enzima specifico lattato ossidasi (LOD) provoca l'ossidazione dell'L-lattato a piruvato. La perossidasi (POD) viene impiegata per generare un colorante utilizzando il perossido d'idrogeno generato nella prima reazione. L'intensità del colore formatosi è direttamente proporzionale alla concentrazione di L-lattato. Viene determinata misurando l'aumento dell'assorbanza (LACT2, Cobas 8000 Roche Diagnostics).

L'attività catalitica dell'LDH è stata misurata mediante test UV. In breve la lattato deidrogenasi catalizza la conversione dell'L-lattato in piruvato, riducendo così l'NAD ad NADH. L'iniziale velocità di formazione dell'NADH è direttamente proporzionale all'attività catalitica dell'LDH. Viene determinata misurando fotometricamente l'aumento dell'assorbanza (LDHI2, Cobas 8000 Roche Diagnostics).

Il pH è stato misurato solo sulle aliquote del concentrato piastrinico (Pool POST) con un pHmetro (PCE instruments).

3. Preparazione del plasma ricco di piastrine (PRP) e del plasma povero di piastrine (PPP)

Aliquote di concentrati piastrinici (T1, T3, T5) sono state inizialmente centrifugate a 265g per 10 minuti a 4°C, per recuperare il plasma ricco di piastrine (PRP). Il PRP è stato nuovamente centrifugato a 2684g per 10 minuti a 4°C per ottenere il plasma povero di piastrine (PPP).

4. Analisi citofluorimetrica dell'espressione di P-selectina sulla superficie piastrinica

Per l'analisi citofluorimetrica sono stati preparati due aliquote un controllo e un test per ogni campione T1, T3 e T5.

Il controllo è stato preparato aggiungendo a 5µl di campione (T1, T3 e T5) 20µl di PBS/Hepes (10mM pH=7,4), 3µl di anticorpo monoclonale anti-CD41a (2,5µg/ml) coniugato con Fluoresceina isotiocianato (FITC) (BD Pharmigen), 2µl di anticorpo monoclonale isotopo-specifico IgG1k (50µg/ml) coniugato con ficoeritrina (PE) (BD Pharmigen). Il test invece è stato preparato aggiungendo a 5µl di campione (T1, T3 e T5), 17 µl di PBS/Hepes (10mM pH=7,4), 3µl di anticorpo monoclonale anti-CD41a coniugato con FITC e 5µl di anticorpo monoclonale anti-

CD62P (6,25µg/ml) coniugato con PE (BD Pharmigen). Dopo 15 minuti di incubazione al buio a T ambiente è stato aggiunto a ciascun preparato 700µl di PBS-formaldeide all' 1% fredda e le provette sono state mantenute in ghiaccio fino alla lettura al citofluorimetro.

Per l'analisi è stato usato il citofluorimetro FACScan (BD Pharmigen). I campioni sono stati analizzati a una velocità di flusso di 1000 particelle per secondo, per una analisi di 20000 particelle per campione.

La popolazione di piastrine è stata selezionata in una mappa elettronica usando il forward scatter verso il side scatter log per escludere microparticelle, detriti e globuli rossi. Le curve ottenute dai controlli (CD41a vs isotipo specifico IgG1K) e dai test (CD41a vs CD62P) ai tempi T1, T3 e T5 sono state sovrapposte per poter calcolare la differenza percentuale, corrispondente alla percentuale di piastrine esprimenti la P-selectina.

5. Test di aggregazione piastrinica

L'aggregazione piastrinica è stata misurata in risposta all'ADP 5µM e al collagene 100µg/ml.

A 450µl di PRP (T1, T3, T5) è stato aggiunto prima 50µl di ADP 5µM ed è stato poi analizzato mediante l'aggregometro AggRAM (Helena Bioscience Europe) per valutare l'aggregazione piastrinica, il PPP è stato utilizzato come bianco. La stessa procedura è stata ripetuta aggiungendo a nuove aliquote di PRP (450µl) 50µl di collagene 100µg/ml.

6. Preparazione del campione per la valutazione dei livelli di serotonina

Circa 10 ml di PRP sono state aliquotate in eppendorf da 1,5ml e centrifugate a 800g per 20 min. Successivamente è stato recuperato il sopranatante e congelato a -80°C per la successiva valutazione delle citochine infiammatorie. I pellet ottenuti sono stati prima lavati con PBS, successivamente risospesi con 0,5ml di acido perclorico (0,4M) e infine sono stati centrifugati a 1500g per 10 minuti. I pellet e sopranatanti così ottenuti sono stati conservati a -80°C per la successiva analisi dei livelli di serotonina.

Prima dell'analisi dei livelli di serotonina i campioni sono stati neutralizzati con l'aggiunta di 100µl di NaOH 1N per portare il pH tra 6 e 7.

7. Valutazione dei livelli di serotonina

Per la valutazione dei livelli di serotonina, i sopranatanti ottenuti come descritto nel par.5 sono stati prima purificati con colonnine Clean up (serotonin (5-hydroxytryptamine) in urine by fluorimetry – fast -code Z15610, EUREKA LAB DIVISION) e successivamente 50µl dell'eluato ottenuto dalla purificazione sono iniettate in un sistema HPLC.

Brevemente inizialmente 5 colonnine sono state condizionate, 3 sono state caricate con 1ml di campione (T1, T3, T5) (200µl campione con 750µl di soluzione diluente e 50µl di soluzione standard interna), una con 1ml di controllo (200µl controllo con 750µl di soluzione diluente e 50µl di soluzione standard interna) e un'altra con 1ml di calibratore (200µl calibratore con 750µl di soluzione diluente e 50µl di soluzione standard interna). Dopo aver scartato l'eluato, le colonnine sono state lavate con due soluzioni di lavaggio e infine è stato aggiunto a ciascuna colonnina 1ml di soluzione eluente e l'eluato è stato recuperato e conservato a 4°C per un giorno.

L'eluato così ottenuto (50µl) è stato iniettato in HPLC.

8. Analisi statistica

Per la correlazione tra la concentrazione di glucosio e di lattato, tra la concentrazione di glucosio e LDH rilasciato, tra la percentuale di P-selectina con MPV, PDW e i livelli di serotonina è stato applicato il coefficiente di correlazione di Pearson (r). La correlazione è risultata significativamente significativa con un valore di $p < 0,05$. Tutte le analisi sono state fatte usando il programma Prism Graph Pad.

RISULTATI

1. Variazione dei parametri emocromocitometrici (WBC, PLT, MPV, PDW) durante i cinque giorni di conservazione

Nella tabella 1 sono presentati i volumi dei pool di buffy coat (Pool PRE) e i valori dei parametri emocromocitometrici (WBC, PLT, MPV, PDW) ai tempi T1, T3 e T5. I valori dei globuli bianchi e delle piastrine sono presentati come numero rispettivamente di globuli bianchi e di piastrine su unità di volume. Entrambi i parametri si riducono da T3 a T5. L'MPV e il PDW invece aumentano progressivamente da T1 a T5.

Nella tabella 2 sono invece riportati i volumi e i valori dei parametri emocromocitometrici (WBC, PLT, MPV, PDW) dei concentrati piastrinici ottenuti dai pool di buffy-coat dopo l'aggiunta della soluzione conservante (300 ml, Composol) della successiva centrifugazione e leucodeplezione (Pool POST) ai tempi T1, T3 e T5. Il valore dei globuli bianchi è al disotto dei limiti rilevabili per la leucodeplezione, in questa condizione si riduce il numero di piastrine da T1 a T3 e i valori di MPV e PDW aumentano progressivamente da T1 a T5.

Confrontando le due tabelle si nota una riduzione dei valori di MPV e PDW nei concentrati piastrinici, Pool POST (tab. 1 e 2) al tempo T5.

Tabella 1. Variazione dei parametri emocromocitometrici (WBC, PLT, PCT, MPV, PDW) del pool di buffy-coat prima della leucodeplezione (Pool PRE) durante i tempi di conservazione da T1, T3 e T5.

	Volume Pool (mL)	WBC (WBC/Unità)	PLT (PLT/Unità)	MPV (fL)	PDW (%)
T1 (giorno 1)	308	$1,1 \times 10^{10}$	$4,5 \times 10^{11}$	10,3	12,6
T3 (giorno 3)	331	$1,08 \times 10^{10}$	$5,75 \times 10^{11}$	11,4	14,5
T5 (giorno 5)	193	$0,616 \times 10^{10}$	$2,74 \times 10^{11}$	14,5	20,8

Tabella 2. Variazione dei parametri emocromocitometrici (WBC, PLT, PCT, MPV, PDW) del concentrato piastrinico dopo leucodeplezione (Pool POST) durante i tempi di conservazione T1, T3 e T5.

	Volume Pool+soluzione conservante	WBC (WBC/Unità)	PLT (PLT/Unità)	MPV (fL)	PDW (%)
T1 (giorno 1)	608	<0,01x10 ³	5,01x10 ¹¹	10,4	10,2
T3 (giorno 3)	631	<0,01x10 ³	3,88x10 ¹¹	11,5	11,8
T5 (giorno 5)	493	<0,01x10 ³	3,64x10 ¹¹	12,5	15,6

2. Variazioni di parametri biochimici: glucosio, lattato, LDH, pH

Nelle tabelle 3 e 4 sono rappresentati i valori della concentrazione di glucosio (mg/dl), del lattato (mg/dl), dell'attività della lattato deidrogenasi LDH (U/L) e del pH sia dei pool di buffy coat (pool PRE) che dei concentrati piastrinici ottenuti da essi dopo l'aggiunta della soluzione conservante e della leucodeplezione (pool POST) ai tempi T1, T3 e T5. Tutti questi parametri si modificano da T1 a T5, sia nel Pool PRE che nel POST. I valori ottenuti dal Pool POST (tab. 4) sono minori rispetto a quelli ottenuti dal Pool PRE (Tab.3) per l'effetto della diluizione dovuta all'aggiunta della soluzione conservante.

La concentrazione di glucosio diminuisce di 3 volte da T1 a T3 invece da T3 a T5 diminuisce di 20 volte (Tab. 3 e). Sia il lattato (Tab. 3 e 4) che l'attività di LDH aumentano in maniera lineare da T1 a T5 (Tab. 3 e 4). Il valore del pH passa da 6,5 a 6,2 il giorno 5 (Tab. 4).

Come atteso si osserva una correlazione negativa significativa tra la concentrazione di glucosio e di lattato ($r = -0,9893$ pool PRE e $r = -0,989$ pool POST; $p < 0,05$) (Fig.1 A e B), inoltre la concentrazione di glucosio è correlata negativamente anche con l'attività catalitica di LDH presente in soluzione ($r = -0,9915$ pool PRE e $r = -0,8341$ pool POST; $p < 0,05$) (Fig. 1 C e D).

Tabella 3. Variazione dei parametri biochimici (glucosio, lattato, LDH) del pool di buffy-coat prima della leucodeplezione (Pool PRE) ai tempi di conservazione T1, T3 e T5.

	Glucosio (mg/dL)	Lattato (mg/dL)	LDH(U/L)
T1 (giorno 1)	253,5	123,3	212,8
T3 (giorno 3)	83,6	282,4	724,0
T5 (giorno 5)	4,8	410,5	1113,5

Tabella 4. Variazione dei parametri biochimici (glucosio, lattato, LDH, pH) del concentrato piastrinico dopo leuco-deplezione (Pool POST) ai tempi di conservazione T1, T3 e T5.

	Glucosio (mg/dL)	Lattato (mg/dL)	LDH(U/L)	pH
T1 (giorno 1)	117,6	56,2	73,5	6,5
T3 (giorno 3)	31,3	113,4	157,4	6,3
T5 (giorno 5)	0	151,5	468,5	6,2

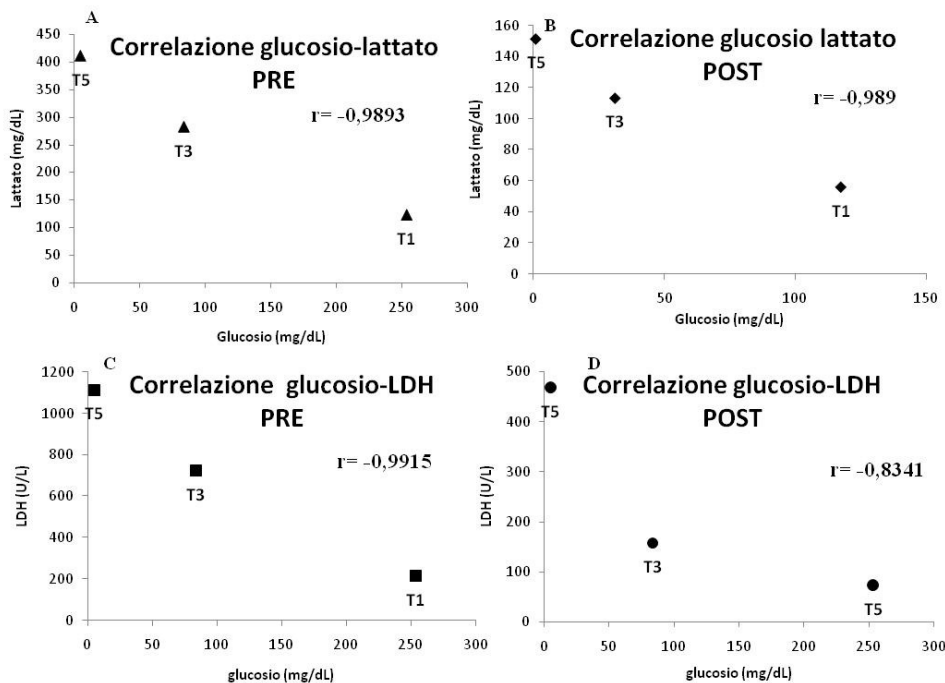


Figura 1. Analisi di correlazione tra i valori di concentrazione di glucosio (mg/dL) e di lattato (mg/dL) del pool di buffy-coat (pool PRE) ($r = -0,9893$; $p < 0,05$) (A) e del concentrato piastrinico ottenuto da esso dopo leuco-deplezione (pool POST) ($r = -0,989$; $p < 0,05$) (B) ai tempi T1, T3 e T5. Analisi di correlazione tra i valori di concentrazione di glucosio (mg/dL) e l'attività catalitica di LDH (U/L) del pool di buffy-coat (pool PRE) ($r = -0,9915$; $p < 0,05$) (C) e del concentrato piastrinico ottenuto da esso dopo leuco-deplezione (pool POST) ($r = -0,8341$; $p < 0,05$) (D) ai tempi T1, T3 e T5.

3. Valutazione della funzionalità piastrinica durante il periodo di conservazione mediante test di aggregazione piastrinico

Mediante test di aggregazione piastrinico è stata valutata la funzionalità piastrinica usando l'ADP e il collagene come agonisti. I risultati ottenuti (dati non riportati) hanno dimostrato che le piastrine non hanno risposto agli agonisti e non si è osservata alcuna aggregazione piastrinica.

4. Valutazione dell'espressione di P-selectina sulla superficie piastrinica mediante analisi citofluorimetrica

Mediante analisi citofluorimetrica con anticorpi monoclonali diretti verso il complesso GPIIb-IIIa (CD41a) e verso la p-selectina (CD62P) è stato esaminato come la conservazione del pool di buffy-coat dal primo giorno T1 al quinto giorno T5 influenza l'attivazione delle piastrine.

Le piastrine sono state prima selezionate nel grafico side scatter (SSC) vs forward scatter (FSC) sia nel controllo (identificato con anti-CD41a-FITC e con l'anticorpo monoclonale isotipo-specifico IgG1k-PE) che nel test (identificato con anti-CD41a-FITC e con anti-CD62P-PE) (Fig. 2 A e B). Da questa popolazione sono state successivamente identificate le piastrine CD41a positive (FL1) e CD62P positive (FL2) sulla base dell'intensità della loro fluorescenza dove si è osservato un graduale allungamento della nuvola di piastrine da T1 a T5 (Fig. 2 C) dato confermato anche dall'aumento dei parametri MPV e PDW osservato nell'analisi emocromocitometrica.

Dalla differenza degli istogrammi sovrapposti rispettivamente del test e del controllo è stato possibile quantificare la percentuale di piastrine CD41a e CD62P positive (M1) corrispondenti al 10,3% il primo giorno (T1) (Fig. 2), il 29,4% il terzo giorno (T3) (Fig. 2) e il 44,1% il quinto giorno (T5) (Fig. 2). Questo risultato ha dimostrato un progressivo aumento dell'espressione di p-selectina sulla superficie piastrinica dal primo giorno (T1) al quinto giorno (T5) (Fig. 9). Non è significativa la correlazione tra l'espressione di CD62P e il valore di MPV ($r=0,9613$; $p=0,088$) e PDW ($r=0,9557$; $p=0,0951$).

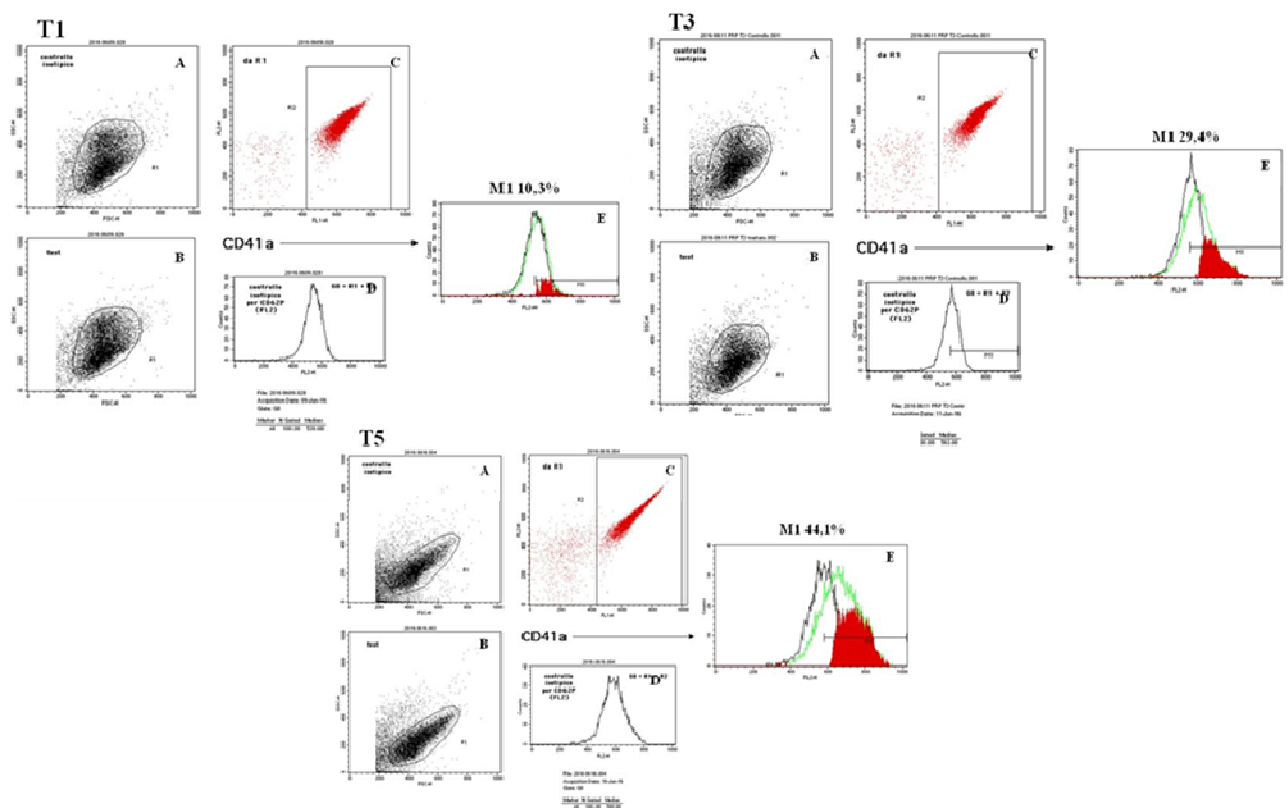


Figura 2. Espressione di p-selectina sulla superficie piastrinica ai tempi T1, T3 e T5. Le piastrine sono state prima selezionate nel grafico side scatter (SSC) vs forward scatter (FSC) sia nel controllo (A) (identificato con anti-CD41a-FITC e con l'anticorpo monoclonale isotipo-specifico IgG1k-PE) che nel test (B) (identificato con anti-CD41a-FITC e con anti-CD62P-PE). Da questa popolazione sono state successivamente identificate le piastrine CD41a positive (FL1) e CD62P positive (FL2) sulla base dell'intensità della loro fluorescenza (C). La differenza degli istogrammi sovrapposti (istogramma test-istogramma controllo (D)) è stata usata per quantificare la percentuale di piastrine CD41a e CD62P positive M1 10,3% (T1, E); M1 29,4% (T3, E); M1 44,1% (T5, E).

5. Valutazione dei livelli di serotonina e correlazione con l'espressione della p-selectina

Nella tabella 5 sono riportati i livelli di serotonina durante il periodo di conservazione del pool di buffy coat espressi come ng/10⁶ piastrine. Da questi dati si osserva che i livelli di serotonina aumentano progressivamente da T1 a T5 (Tab.5).

È stata inoltre osservata una correlazione positiva significativa ($r=0,9973$; $p<0,05$) tra la percentuale di espressione di P-selectina sulla superficie piastrinica e i livelli di serotonina presenti nelle

piastrine (Fig. 3). All'aumentare dell'espressione della P-selectina aumentano anche i livelli di serotonina dal giorno 1 (T1) al giorno 5 (T5) (Fig.3).

Tabella 5. Variazione dei livelli di serotonina durante il periodo di conservazione da T1 a T5.

	T1	T3	T5
SEROTONINA ng/10⁶ PLT	1,454	4,846	6,912

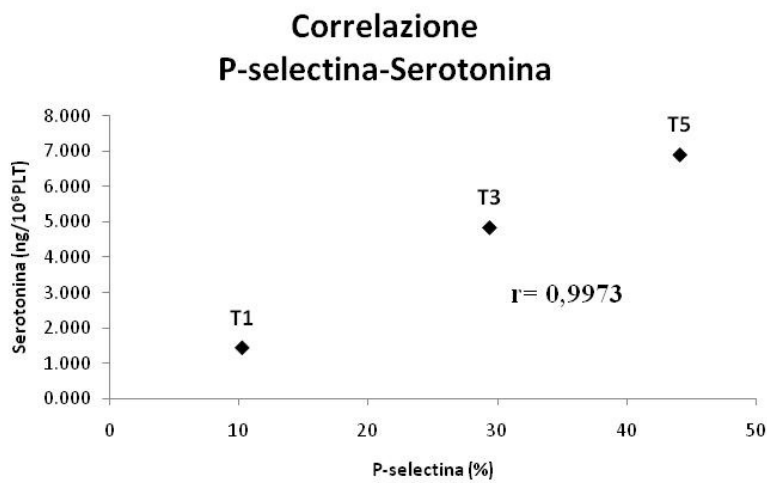


Figura 3. Analisi di correlazione tra i livelli di espressione della p-selectina (%) e i livelli di serotonina (ng/10⁶ PLT) ($r=0,9973$; $p<0,05$) ai tempi T1, T3 e T5.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il tempo di conservazione dei concentrati piastrinici da pool di BC, come definito dal DM 02.11.2015 non deve essere superiore a 5 giorni dal prelievo, in agitazione continua e a temperatura compresa tra 20-24 °C (74,101, 102). La legislazione vigente e le linee guida europee non definiscono invece il tempo di conservazione dei buffy-coat prima dell'assemblaggio. Presso la S.C. Medicina Trasfusionale e di Immunoematologia dell'ospedale San Luca di Lucca i BC vengono conservati fino ad un massimo di tre giorni ed assemblati a seguito di richiesta. A causa dell'aumentata richiesta di concentrati piastrinici sviluppatasi negli ultimi dieci anni soprattutto per pazienti neoplastici trombocitopenici e per ottimizzare l'utilizzo delle risorse sarebbe di aiuto poter conservare i buffy coat per un periodo superiore ai tre giorni. Pertanto scopo di questo lavoro è definire l'impatto dell'estensione del periodo di conservazione sulla funzionalità delle piastrine e sulla possibilità di effetti collaterali legati alla liberazione di citochine.

In questo studio preliminare sono stati valutati gli effetti della conservazione fino a cinque giorni in un pool di buffy-coat ai tempi T1 (giorno 1 dopo la raccolta), T3 (giorno 3 dopo la raccolta) e T5 (giorno 5 dopo la raccolta) andando a valutare la morfologia e la funzionalità delle piastrine e i parametri biochimici del mezzo del concentrato piastrinico ottenuto da esso.

È stato osservato che nei pool di buffy-coat (pool PRE) il numero di piastrine e di globuli bianchi rimane costante da T1 a T3 mentre si riduce da T3 a T5 (tab 1 e 2), diminuzione che può essere dovuta alla morte cellulare durante il periodo di conservazione, dato quest'ultimo ulteriormente confermato dall'aumentato rilascio dell'LDH da T3 a T5 (tab.3).

I valori di MPV e di PDW aumentano progressivamente da T1 a T5 (tab. 1 e 2) sia nel pool PRE che nel pool POST. L'MPV e il PDW sono indici piastrinici che aumentano durante l'attivazione piastrinica. Le piastrine per ottenere una superficie maggiore cambiano di forma quando si attivano da discoidale a sferica con formazione di pseudopodi (103) quindi sia nel pool di buffy-coat (pool PRE) che nel concentrato piastrinico derivante da esso (pool POST) a T5 aumentano sia le piastrine di maggiori dimensione che la variabilità tra queste ultime indicata dall'aumentata anisocitosi.

Nel pool POST inoltre si osserva una riduzione del numero delle piastrine da T1 a T3 presumibilmente perché una parte di esse viene persa durante il processo di preparazione ad esempio per il sequestro da parte del filtro delle piastrine attivate di maggiori dimensioni, che spiegherebbe la riduzione del PDW a T3 rispetto al pool PRE.

Anche i parametri biochimici subiscono variazioni da T1 a T5: i valori relativi al pool PRE e il pool POST presentati nelle tabelle 3 e 4 differiscono per l'effetto della diluizione della soluzione conservante presente nel pool POST ma seguono lo stesso andamento.

Si osserva una diminuzione della concentrazione di glucosio da T1 a T3 che diminuisce del 67%, mentre da T3 a T5 del 95% (tab. 3 e 4). Questo aumentato consumo di glucosio correla positivamente con l'aumentata produzione di lattato da T1 a T5, quest'ultima associata alla riduzione del pH da 6,5 a 6,2. Normalmente le piastrine ricavano l'85% della loro energia dalla beta-ossidazione degli acidi grassi mediante il ciclo degli acidi tricarbossilici (104,105) tuttavia durante la conservazione a temperatura ambiente la beta-ossidazione si sposta verso la glicolisi, il glucosio è convertito in piruvato e ridotto a lattato dalla lattico deidrogenasi (106) il quale si accumula riducendo il pH. Secondo le condizioni stabilite dal Decreto legislativo 2 novembre 2015 riguardo alle "Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti" (75, 107-109) il pH ottimale dovrebbe essere tra 6,4 e 7,4 durante tutto il periodo di conservazione per rispettare gli standard di qualità richiesti per i concentrati piastrinici (75, 110). È stato inoltre dimostrato che se il pH scende tra 6,0-6,2 diminuisce la funzionalità piastrinica, si modifica la normale morfologia e si riduce significativamente la sopravvivenza *in vivo* delle piastrine (106, 108). Anche la sopravvivenza cellulare si riduce da T1 a T5, come dimostrato dall'aumentato rilascio di LDH, indicatore di necrosi cellulare (111), che raddoppia da T1 a T3 ma aumenta di sei volte da T3 a T5 (tab. 3 e 4).

Quindi l'abbassamento del pH a 6,2 al tempo T5, dovuto all'accumulo di lattato prodotto mediante glicolisi anaerobia, è una condizione che da un lato riduce la sopravvivenza cellulare come dimostrato dall'aumento dell'LDH e dalla riduzione del numero di piastrine e dei globuli bianchi da T3 a T5 (tab. 1), e dall'altro rende attive le piastrine che perdono la loro forma discoidale e assumono forma sferica con pseudopodi (112). Quindi il controllo del pH durante il periodo di conservazione è importante sia per il mantenimento della vitalità delle piastrine dopo la trasfusione che per mantenere la loro funzione durante la conservazione (113). Per queste ragioni vengono utilizzate le soluzioni conservanti per i concentrati piastrinici che contengono acetato utilizzato dalle piastrine come fonte di energia alternativa al glucosio che entra direttamente nel ciclo degli acidi tricarbossilici; l'acetato viene trasformato in acido acetico per entrare nel ciclo, rimuovendo ioni idrogeno prodotti dal metabolismo anaerobio del glucosio, contribuendo così al controllo del pH della soluzione (114).

Il grado di attivazione piastrinica è stato studiato valutando la capacità di aggregazione delle piastrine, l'espressione superficiale della P-selectina e il contenuto di serotonina.

Il test di aggregazione su aliquote di concentrato piastrinico ha dimostrato che le piastrine non rispondono agli agonisti ADP e collagene per la presenza nella soluzione conservante (Composol vedi materiali e metodi) di noti inibitori dell'attivazione piastrinica come il citrato, il potassio e il magnesio (115-117). Il citrato riduce l'attività piastrinica perché chela il calcio extracellulare, il

quale ha un ruolo chiave nell'aggregazione piastrinica (118). Ravn e collaboratori hanno dimostrato che il magnesio inibisce in maniera dose-dipendente l'aggregazione piastrinica, la sintesi di trombossano A₂ e il rilascio di beta-tromboglobulina. È stata dimostrata un'inibizione statisticamente significativa dell'aggregazione piastrinica alla concentrazione di 1mM di magnesio (117) corrispondente a quella del magnesio nella soluzione conservante. Hsiao e collaboratori hanno inoltre dimostrato che l'azione antiaggregante del magnesio può seguire due vie principali: 1) il magnesio inibisce l'attivazione della proteina kinasi C, impedendo il catabolismo del fosfatidil inositolo difosfato; 2) il magnesio inibisce lo scambio Na⁺/H⁺, portando alla ridotta mobilitazione del calcio intracellulare così inibendo l'aggregazione piastrinica e la reazione di rilascio dell'ATP (119).

L'espressione della P-selectina sulla superficie piastrinica aumenta progressivamente da 10,3% il primo giorno (T1) (Fig. 2), al 29,4% il terzo giorno (T3) (Fig. 2) fino al 44,1% il quinto giorno (T5) (Fig. 2). La P-selectina, membro della famiglia dei recettori di superficie cellulare (9), è localizzata nella membrana dei granuli secretori (α -granuli) (10,11) e si ridistribuisce dalla membrana dei granuli alla membrana plasmatica quando le piastrine si attivano e vanno incontro a degranulazione (12). L'aumento dell'espressione della P-selectina sulla membrana plasmatica sono indicativi di attivazione piastrinica (14, 15). Dati di letteratura confermano l'aumento di questo marcatore durante la conservazione (109, 114, 120). Anche se non è stata trovata una correlazione significativa tra l'espressione della P-selectina e i valori di MPV e PDW è noto che piastrine più grandi sono più reattive e possono esprimere più recettori di superficie (121, 122).

Infine sono stati valutati i livelli di serotonina che è sintetizzata e secreta nel sangue dalle cellule enterocromaffini dell'intestino ma la cui concentrazione plasmatica è primariamente regolata dalle piastrine circolanti (123). Specificatamente, le piastrine esprimono il trasportatore della serotonina (SERT) sulla membrana plasmatica e provvedono ad internalizzarla mediante un meccanismo di uptake saturabile che regola a sua volta la concentrazione di serotonina nel plasma. Una volta nel citoplasma è sequestrata mediante vescicole (VMAT2 monoamine transporter type 2 vescicole) nei granuli densi intracellulari (124), ma prima del sequestro, le molecole di serotonina attivano la via del segnale intracellulare che porta all'attivazione e all'aggregazione delle piastrine (125). Nella tabella 5 è stato osservato che i livelli di serotonina aumentano progressivamente da T1 a T5 e correlano positivamente (fig 3) con l'espressione di P-selectina. Frankhauser e collaboratori hanno dimostrato che esiste una correlazione tra la densità dei trasportatori di serotonina e l'espressione superficiale di P-selectina (126). Per cui in base ai dati raccolti è possibile ipotizzare che la serotonina venga internalizzata progressivamente da T1 a T5 dalle piastrine ma che da queste non sia rilasciata poiché l'aggregazione piastrinica è inibita sia dal citrato che dal magnesio contenuti

nella soluzione conservante. In particolare l'attivazione della PKC e la mobilitazione del calcio intracellulare, prerequisiti fondamentali per il rilascio della serotonina, sono inibiti dalla concentrazione del Magnesio a 1,5mM (119, 127).

In conclusione i dati confermano che da T3 a T5 c'è una forte riduzione di glucosio, che da un lato è compensato dall'aggiunta di acetato, ma che determina comunque l'abbassamento del pH al di sotto della soglia richiesta dagli standard di qualità per i concentrati piastrinici. Questa riduzione del pH da un lato riduce la sopravvivenza cellulare e dall'altro attiva le piastrine che perdono la loro forma discoidale ed esprimono maggiore P-selectina, ma non vanno incontro ad aggregazione e a rilascio di serotonina per l'effetto inibente del citrato e del magnesio della soluzione conservante.

Alla luce dei dati preliminare risulta evidente l'importanza di estendere lo studio ad un maggiore numero di campioni per stabilire quale sia il tempo massimo di conservazione dei BC, prima dell'assemblaggio per la produzione di concentrati piastrinici, in particolare quando i cambiamenti funzionali, morfologici e biochimici che si instaurano nei concentrati piastrinici, ottenuti da essi, sono tali da ridurre l'efficacia terapeutica del prodotto.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Avraham H, Regulation of megakaryocytopoiesis. *Stem Cells* 1993; 11: 499–500.
2. Kaushansky K. Thrombopoietin and hematopoietic stem cell development. *Ann NY Acad Sci* 1999; 872: 314–19.
3. *Ematologia*. Mandelli. 2013;815-818.
4. Vizcaino-Salazar G. Platelet physiology. *Advances in platelet reactivity. Rev Invest Clin* 1994; 35: 41–62.
5. McEver RP. The clinical significance of platelet membrane glycoproteins. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4:87–105.
6. Okumura T, Jamieson GA. Platelet glycoprotein. Orientation of glycoproteins of the human platelet surface. *J Biol Chem* 1976; 251: 5944–9.
7. Krejsek J, Loudova M, Kopecky O. Blood platelet adhesion molecules. *Cas Lek Cesk* 1997; 136: 624–6.
8. Packham MA. Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72: 278–84.
9. Johnston GI, Bliss GA, Newman PJ, McEver RP. Structure of the human gene encoding granule membrane protein-140, a member of the selectin family of adhesion receptors for leukocytes. *J Biol Chem* 1990; 265: 21381–5.
10. McEver RP. Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. *Blood Cells* 1990; 16: 73–80.
11. Larsen E, Celi A, Gilbert GE. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 1989; 59: 305–12.
12. Johnston GI, Kurosky A, McEver RP. Structural and biosynthetic studies of the granule membrane protein, GMP-140, from human platelets and endothelial cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 1816–23.
13. Crovello CS, Furie BC, Furie B. Rapid phosphorylation and selective dephosphorylation of P-selectin accompanies platelet activation. *J Biol Chem* 1993; 268: 14590–3.
14. Hsu-Lin SC, Berman CL, Furie BC, August D, Furie B. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem* 1984; 259: 9121–6.
15. Blann AD, Lip GYH. Hypothesis: is soluble P-selectin a new marker of platelet activation? *Atherosclerosis* 1997; 128:135–8.
16. Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 1990; 75: 550–4.

17. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990; 343: 757–60.
18. Fukami MH, Salganicoff L. Human platelet storage organelles. A review. *Thromb Haemost* 1977; 38: 963–70.
19. McLaren KM, Pepper DS. Immunological localisation of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in human megakaryocytes and platelets. *J Clin Pathol* 1982; 35: 1227–31.
20. Beggs GS, Pepper DS, Chesterman CN. Complete covalent structure of human beta thromboglobulin. *Biochemistry* 1978; 17: 1739–44.
21. Morgan FJ, Begg GS, Chesterman CN. Complete covalent structure of human platelet factor 4. *Thromb Haemost* 1980;42: 1652–60.
22. Cella G, Scattolo N, Girolami A, Sasahara AA. Are platelet factor 4 and beta-thromboglobulin markers of cardiovascular disorders? *Ric Clin Lab* 1984; 14: 9–18.
23. Capitano AM, Niewiarowski S, Rucinski B et al. Interaction of platelet factor 4 with human platelets. *Biochem Biophys Acta* 1985; 839: 161–73.
24. Walz DA. Thrombospondin as a mediator of cancer cell adhesion in metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11:313–24.
25. Agam G, Shohat O, Livne A. Thrombospondin plays role in platelet-platelet recognition during release-related aggregation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 177: 482–6.
26. White JG, Clawson CC. Biostructures of blood platelets. *Ultrastruct Pathol* 1980; 1: 533–58.
27. Seiss W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 1989; 69: 58–178.
28. Sixma JJ, Hindriks G, Van Breugel H et al. Vessel wall proteins adhesive for platelets. *J Biomater Sci Polym Ed* 1991; 3: 17–26.
29. Nurden AT, Bihour C, Macchi L et al. Platelet activation in thrombotic disorders. *Nouv Rev Fr Hematol* 1993; 35: 67–71.
30. Kawai Y, Handa M, Nagai H et al. Role of membrane glycoproteins in the interaction of blood platelets with the vessel wall—the study on platelet adhesion to in vitro cultured subendothelial matrix. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* 1989; 52: 1312–21.
31. Packham MA, Mustard JF. Platelet adhesion. *Prog Hemost Thromb* 1984; 7: 211–88.
32. White JG. Shape change. *Thromb Diath Haemorrh* 1974;60:159–71.
33. Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF, Packham MA et al. Properties of washed human platelets. *Thromb Haemost* 1977; 37: 291–308.
34. McManama G, Lindon JN, Kloczewiak M et al. Platelet aggregation by fibrinogen polymers crosslinked across the E domain. *Blood* 1986; 68: 363–71.

35. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72: 2994–8.
36. Hamberg M, Svensson J, Wakabayashi T, Samuelsson B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 345–9.
37. Holmsen H, Day HJ, Stormorken H. The blood platelet release reaction. *Scand J Haematol Suppl* 1969; 8: 1–26.
38. Holt JC, Niewiarowski S. Biochemistry of granule proteins. *Semin Hematol* 1985; 22: 151–63.
39. Kaplan KL, Broekman MJ, Chernoff A, Lesznik GR, Drillings M. Platelet alpha granule proteins: studies on release and subcellular localization. *Blood* 1979; 53: 604–18.
40. Smith JB, Ingerman C, Kocsis JJ, Silver MJ. Formation of prostaglandins during the aggregation of human blood platelets. *J Clin Invest* 1973; 52: 965–9.
41. Smith WL, Marnett LJ, De Witt DL. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther* 1991; 49:153–79.
42. Hemker HC, van Rijn JL, Rosing J et al. Platelet membrane involvement in blood coagulation. *Blood Cells* 1983; 9:303–17.
43. Walsh PN, Biggs R. The role of platelets in intrinsic factor-Xa formation. *Br J Haematol* 1972; 22: 743–60.
44. White AM, Heptinstall S. Contribution of platelets to thrombus formation. *Br Med Bull* 1978; 34: 123–8.
45. Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterisation of alphagranule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen and convulxin. *Blood* 2000; 95:1694–702.
46. Ellis EF, Eright KF, Jones PS, Richardson DW, Ellis CK. Effect of oral aspirin dose on platelet aggregation and vascular prostacyclin synthesis in human and rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 1980; 2: 387–97.
47. Schafer AI. Antiplatelet Therapy. *Am J Med* 1996; 101:199–209.
48. Council of Europe. Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components. Recommendation No R (95) 15 on the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components, 14th ed, Strasbourg, Council of Europe Press; 2008.

49. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components Recommendation No. R (95) 15 ,EDMQ 18th Edition 2015.chapter 11:Principles for clinical use of blood:173-175.
50. Standards for Blood Banks and Transfusion Services, 24th ed, Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2006.
51. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the use of platelet transfusions. Br J Haematol 2003; 122: 10-23.
52. Superior Health Council. Guidelines for the transfusion of platelets (SCH 8068); 2005.
53. Practice Guidelines for Blood Transfusion: A Compilation from Recent Peer-Reviewed Literature. American Red Cross 2002.
54. Slichter SJ, Davis K, Enright H. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. Blood 2005; 105: 4106-14.
55. Lozano M, Cid J. The clinical implication of platelet transfusions associated with ABO or Rh(D) incompatibility. Transfus Med Rev 2003; 17: 57-68.
56. Prinoth O. Servizio Aziendale di Immunoematologia e Trasfusione - Comprensorio Sanitario di Bolzano. Terapia con emocomponenti e plasmaderivati. Linee guida ed aspetti medico-legali. January 2007.
57. Litty C: A review: transfusion reactions. Immunohematology, 1996;12, 72,.
58. Muylle L: The role of cytokines in blood transfusion medicine. Blood Rev.1995; 9, 77,.
59. Heddle NM, Klama LN, Griffith L et al.: A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions. Transfusion. 1993;33, 794.
60. Bordin JO, Heddle NM, Blajchman MA: Biologic effects of leukocytes present in transfused cellular blood products. Blood.1994; 84, 6, 1703,.
61. Molaro GL: La leucodeplezione totale-I. Il Servizio Trasfusionale.2000;2.
62. Blajchman MA: Cytokines in transfusion medicine. Transfusion.1993;33, 1.
63. Heddle NM: Pathophysiology of febrile non hemolytic transfusion reactions. Curr Opin Hematology.1999; 6, 420.
64. Borzini P: Le citochine in Medicina Trasfusionale. La Trasf del Sangue. 1998;43, 131.
65. Davenport RD, Kunkel SL: Cytokines roles in hemolytic and nonhemolytic transfusion reactions. Transfus Med Rev.1994; 8, 157.
66. Snyder EL: The role of cytokines and adhesive molecules in febrile non-hemolytic transfusion reactions. Immunol Invest.1995; 24, 333.

67. Reali G: La leucodeplezione totale-II. Il Servizio Trasfusionale.2000; 3.
68. Federowicz I, Barrett BB, Andersen JW et al.: Characterization of reactions after transfusion of cellular blood components that are white cell reduced before storage. *Transfusion*.1996;36, 21.
69. Illeni MT, Molaro GL, Reali G: Gli effetti Immunomodulanti della Trasfusione. Edizioni SIMTI, Milano,1999.
70. Comenzo RL, Malachowski MD, Berkman EM. Determining the dose of platelets for transfusion. In: Kurtz SR, Brubaker DB, eds. *Clinical Decisions in Platelet Therapy*. Bethesda, Md: American Association of Blood Banks; 1992.
71. Tinmouth AT, Semple E, Shehata N, Branch DR. Platelet immunopathology and therapy: a Canadian Blood Services research and development symposium. *Transfus Med Rev* 2006; 20: 294-314.
72. Slichter SJ, Davis K, Enright H, et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood* 2005; 105: 4106-14.
73. Liunbruno G1, Bennardello F, Lattanzio A, Piccoli P, Rossetti G; Recommendations for the transfusion of plasma and platelets. Italian Society of Transfusion Medicine and Immunohaematology (SIMTI) Work Group.*Blood Transfus*. 2009 Apr;7(2):132-50.
74. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana- Serie Generale N.69 del 28/12/2015*. Decreto legislativo 2 novembre 2015. Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti.
75. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components Recommendation No. R (95) 15, EDMQ 18th Edition 2015.chapter 5:266-317.
76. Singh RP, Marwaha N, Malhotra P et al. Quality assessment of platelet concentrates prepared by platelet rich plasmaplatelet concentrate, buffy coat poor-platelet concentrate (BCPC) and apheresis-PC methods. *Asian J Transfus Sci*.2009; 3:86–94
77. Saran RK (2003) Quality assurance in blood transfusion. In: Saran RK (ed) *Transfusion medicine technical manual*, 2nd edn. Directorate General of Health Services Ministry of Health and Family Welfare, India, pp 353–354.
78. Mallhi RS1, Kumar S1, Philip J1.A Comparative Assessment of Quality of Platelet Concentrates Prepared by Buffy Coat Poor Platelet Concentrate Method and Apheresis Derived Platelet Concentrate Method. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2015 Dec;31(4):453-9.

79. Moroff G, Holme S. Concepts about current conditions for the preparation and storage of platelets. *TransfusMed Rev* 1991;5:48-59.
80. Sweeney JD, Holme S, Heaton WAL. Quality of platelet concentrates. In: Van Oss CJ, ed. *Transfusion immunology and medicine*. New York:Marcel Dekker, 1995:353-70.
81. Heal JM, Singl S, Sardisco E, et al. Bacterial proliferation in platelet concentrates. *Transfusion* 1996;26:388-9.
82. Punsalang A, Heal JM, Murphy PJ. Growth of gram-positive and gram-negative bacteria in platelet concentrates. *Transfusion* 1989;29:596-9.
83. Murphy S. Platelet storage for transfusion. *Semin Hematol* 1985;22:165-77.
84. Murphy S, Rebullia P, Bertolini F, et al. In vitro assessment of the quality of stored platelet concentrates. The BEST (Biomedical Excellence of Safer Transfusion) Task Force of the International Society of Blood Transfusion. *TransfusMed Rev* 1994;8:29-36.
85. Murphy S. The oxidation of exogenously added organic anions by platelets facilitates maintenance of pH during their storage for transfusion at 22 C. *Blood* 1995;85:1929-35.
86. Holme S, Heaton WA, Courtright M. Platelet storage lesion in second-generation containers:196 correlation with platelet ATP levels. *Vox Sang* 1987;53:214-20.
87. Holme S, Sawyer S, Heaton A, Sweeney JD. Studies on platelets exposed or stored at temperatures below 20 C or above 24 C. *Transfusion* 1997;37:5-11.
88. Pietersz RN, Loos JA, Reesink HW. SuMvd in vivo of platelets stored for 48 hours in the buffycoat at 4 degrees C compared to platelet rich plasmastored at 22 degrees C. *Blut* 1987;54:201-6.
89. RAcz Z, Bardti C. Storage of platelet concentrates from overnight- stored blood and overnight-stored buffy coat: in vitro studies. *VoxSang* 1995;68:160-3.
90. Jaremo P, Shaba A, Kutti J. Some storage characteristics of buffy coats used for preparation of platelet concentrates. *Ann Hematol*.1992;65:269-73.
91. Ferrara JL. The febrile platelet transfusion reaction: a cytokine shower (editorial). *Transfusion* 1995;35:89-90.
92. Muylle L, Joos M, Wouters E, et al. Increased tumor necrosis factor a (TNFa), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNFa and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion* 1993;33:195-9.
93. Heddle NM, Klama LN, Griffith L, et al. A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions. *Transfusion* 1993;33:794-7.

94. Solberg C, Hansen JB, Little C. Centrifugation of very freshly donated blood may yield platelets unstable to storage in the new generation of containers. *Vox Sang* 1989;56:25-31.
95. Fijnheer R, Pietersz RN, de Korte D, et al. Platelet activation during preparation of platelet concentrates: a comparison of the platelet-rich plasma and the buffy coat methods. *Transfusion* 1990;30:634-8.
96. Klüter H1, Schlenke P, Müller-Steinhardt M, Paulsen M, Kirchner H. Impact of buffy coat storage on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation. *Transfusion*. 1997 Apr;37(4):362-7.
97. Sloan EM, Klein HG. Effect of white cells on platelets during storage. *Transfusion* 1990;30:333-8.
98. Rinder HM, Snyder EL, Bonan JL, et al. Activation in stored platelet concentrates: correlation between membrane expression of P-selectin, glycoprotein IIb/IIIa, and P-thromboglobulin release. *Transfusion* 1993;33:25-9.
99. Divers SG, Kannan K, Stewart RM, et al. Quantitation of CD62, soluble CD62, and lysosome-associated membrane proteins 1 and 2 for evaluation of the quality of stored platelet concentrates. *Transfusion* 1995;35:292-7.
100. Slichter SJ: Platelet transfusion therapy. *Hematol Oncol Clin North Am*, 4, 291, 1990.
101. Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components, 4th Edition, Council of Europe Publishing, Strasbourg, 1998.
102. American Association of Blood Banks: Technical Manual, 13th Edition, AABB Publisher. Bethesda, 1999.
103. Vagdatli E1, Gounari E, Lazaridou E, Katsibourlia E, Tsikopoulou F, Labrianou I. Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation. *Hippokratia*. 2010 Jan;14(1):28-32.
104. Sweeney JD, Arduini A. L-carnitine and its possible role in red cell and platelet storage. *TransfusMed Rev* 2004;18:58-65.
105. Murphy S. The oxidation of exogenously added organic anions by platelets facilitates maintenance of pH during their storage for transfusion at 22 degrees C. *Blood* 1995;85:1929-35.
106. Holme S. Storage and quality assessment of platelets. *Vox Sang* 1998;74 Suppl 2:207-16.
107. Rivera J, Lozano ML, Vicente V. In vitro changes of platelet parameters: lessons from blood banking. *Methods Mol Biol* 2004; 273: 57-72.
108. Bertolini F, Porretti L, Lauri E, et al. Role of lactate in platelet storage lesion. *Vox Sang* 1993; 65: 194-8.

109. Hornsey VS, McColl K, Drummond O, et al. Extended storage of platelets in SSP platelet additive solution. *Vox Sang* 2006; 91: 41-6.
110. Council of Europe. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Strasbourg: Council of Europe Pub; 2011.
111. Burd JF, Usategui-Gomez M. A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase. *Clin Chim Acta*. 1973; 46:223–7.
112. Mittal K1, Kaur R1. Platelet storage lesion: An update. *Asian J Transfus Sci*. 2015 Jan-Jun;9(1):1-3.
113. Modern Blood Banking and Transfusion Practices By Denise M Harmening chapter 1 pag.17.
114. Preparation, preservation, and storage of platelet concentrates Toby L. Simon MD2, Jeffrey McCullough MD3, Edward L. Snyder MD FACP4, Bjarte G. Solheim MD, PhD MHA5 and Ronald G.S trauss MD6 Ralph R. Vassallo Jr. 2016.
115. Gawaz M, Ott I, Reiniger AJ, et al: Effects of magnesium on platelet aggregation and adhesion. Magnesium modulates surface expression of glycoproteins on platelets in vitro and ex vivo. *Thromb Haemost* 72:912 - 918, 1994
116. Weis-Fogh US: The effect of citrate, calcium, and magnesium ions on the potassium movement across the human platelet membrane. *Transfusion* 25:339 - 342, 1985
117. Ravn HB, Vissing H, Kristensen SD, et al: Magnesium inhibits platelet activity: an in vitro study. *Thromb Haemost* 76:88 - 93, 1996.
118. Patel P, Gonzalez R, Dokainish H, Lakkis N. Impact of adenosine diphosphate and calcium chelation on platelet aggregation testing in patients receiving clopidogrel therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Jan 17;47(2):464-5.
119. Hsiao G1, Shen MY, Chou DS, Lin CH, Chen TF, Sheu JR. Involvement of the antiplatelet activity of magnesium sulfate in suppression of protein kinase C and the Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biomed Sci*. 2004 Jan-Feb;11(1):19-26.
120. Kaufman RM1. Platelets: testing, dosing and the storage lesion--recent advances. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:492-6.
121. D. Tschoepe, "The activated megakaryocyte—platelet-system in vascular disease: focus on diabetes," *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol. 21, no. 2, pp. 152–160, 1995.
122. M. Tavassoli, "Megakaryocyte–platelet axis and the process of platelet formation and release," *Blood*, vol. 55, no. 4, pp. 537–545, 1980.

123. Barter R, Pearse AG. Mammalian enterochromaffin cells as the source of serotonin (5-hydroxytryptamine). *J Pathol Bacteriol.* 1955; 69:25–31.
124. Brunk I, Blex C, Rachakonda S, et al. The first luminal domain of vesicular monoamine transporters mediates G-protein-dependent regulation of transmitter uptake. *J Biol Chem.* 2006; 281:33373–85.
125. Ziu E1, Mercado CP, Li Y, Singh P, Ahmed BA, Freyaldenhoven S, Lensing S, Ware J, Kilic F. Down-regulation of the serotonin transporter in hyperreactive platelets counteracts the pro-thrombotic effect of serotonin. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 May;52(5):1112-21.
126. Frankhauser P, Baranyai R, Ahrens T, Schloss P, Deuschle M, Lederbogen F. Platelet surface P-selectin expression is highly correlated with serotonin transporter density in human subjects. *Thromb Haemost.* 2008 Dec;100(6):1201-3.
127. Yamanishi J, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Castagna M, Nishizuka Y. Synergistic functions of phorbol ester and calcium in serotonin release from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983 Apr 29;112(2):778-86.