

Προϊόντα πλάσματος

Τρόπος παρασκευής,
Ενδείξεις χορήγησης.

Εισαγωγή

Μετάγγιση

- Χορήγηση του σωστού προϊόντος αίματος στο σωστό ασθενή κατά την σωστή-ενδεδειγμένη χρονική στιγμή.
- Η μετάγγιση χρησιμοποιείται:
 1. Διατήρηση της δυνατότητας μεταφοράς οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα
 2. Αποκατάσταση των αιμορροραγικών διαταραχών και των διαταραχών της πήξης

Μετάγγιση

- Η μετάγγιση αίματος ή παραγώγων του είναι βασικό όπλο της σύγχρονης θεραπευτικής
- Είναι σωτήρια αλλά δεν είναι απαλλαγμένη κινδύνων
- Η πιστή εφαρμογή των νομοθετικών κανόνων της Αιμοδοσίας και συστημάτων ποιότητας περιορίζει σημαντικά:
 - ✓ σφάλματα
 - ✓ παρενέργειες
 - ✓ ανεπιθύμητες αντιδράσεις .

Παράγωγα και προϊόντα αίματος

➤ **Παράγωγο αίματος (blood product):**

- Οποιοδήποτε παράγωγο αίματος ή πλάσματος του ανθρώπου που προορίζεται για θεραπευτική χρήση

➤ **Προϊόν αίματος (blood component):**

- Συστατικό του αίματος που παρασκευάζεται με χρήση συμβατικής μεθοδολογίας(φυγοκέντρωση, διήθηση, κατάψυξη) των Υπηρεσιών Αιμοδοσίας.

Συστατικά αίματος

- Το αίμα είναι ζωντανός ιστός που τα κύτταρά του ανανεώνονται συνεχώς από μητρικά κύτταρα του μυελού των οστών ή των λεμφαδένων.
- Το αίμα περιλαμβάνει κύτταρα όπως:
 - ερυθρά αιμοσφαίρια,
 - λευκά αιμοσφαίρια
 - αιμοπετάλια, που «κολλυμπούν» μέσα στο πλάσμα.

Ερυθρά αιμοσφαίρια

- Τα ερυθρά αιμοσφαίρια περιέχουν την αιμοσφαιρίνη στην οποία οφείλεται και το κόκκινο χρώμα του αίματος.
- Η μέση διάρκεια ζωής τους είναι 120 μέρες
- ο αριθμός τους κυμαίνεται στα 4.500.000 - 5.000.000 κατά κυβικό χιλιοστό
- αποτελούν το 45% περίπου του όγκου του αίματος
- (Φυσιολογικές τιμές Αιματοκρίτη για άνδρες 42-47%, για γυναίκες 39- 44%).

Ερυθρά αιμοσφαίρια-λειτουργίες

- Τα ερυθρά αιμοσφαίρια κάνουν την ανταλλαγή του οξυγόνου
- προσλαμβάνουν το οξυγόνο από τους πνεύμονες και το μεταφέρουν στους ιστούς και τα κύτταρα.
- Από κει παραλαμβάνουν το διοξείδιο του άνθρακος, που το αποβάλλουν κατά την επιστροφή τους στους πνεύμονες κ.ο.κ., εξασφαλίζοντας έτσι τη ζωή.

Λευκά αιμοσφαίρια

- Τα **λευκά αιμοσφαίρια** είναι μεγαλύτερα από τα ερυθρά, ο αριθμός τους είναι περίπου 7.000 κατά κυβικό χιλιοστό αίματος.
- Η διάρκεια ζωής τους 2-10 μέρες.

Λευκά αιμοσφαίρια-λειτουργίες

- Τα λευκά αιμοσφαίρια συμμετέχουν αποτελεσματικά στην άμυνα του οργανισμού μας κατά των μικροβίων, με φαγοκυττάρωση, ή άλλων ξένων βλαπτικών παραγόντων.

Αιμοπετάλια

- Τα **αιμοπετάλια** είναι πολύ μικροσκοπικά κύτταρα, σε αριθμό 200.000 περίπου κατά κυβικό χιλιοστό.

Αιμοπετάλια-λειτουργίες

- Είναι εκείνα που πρώτα φράζουν το σημείο τραυματισμού ενός αγγείου, σχηματίζοντας ένα αιμοστατικό αιμοπεταλιακό θρόμβο, ώστε να σταματήσει η αιμορραγία.

Πλάσμα

- Το **πλάσμα** αποτελεί το 55% του όγκου του αίματος, είναι ένα διαφανές κιτρινωπό υγρό που περιέχει άλατα, λιποειδή, σάκχαρο και κυρίως πρωτεΐνες.

Πλάσμα-λειτουργίες

- Το πλάσμα μεταφέρει με την κυκλοφορία τις θρεπτικές ουσίες στα κύτταρα και παίρνει από αυτά τα προϊόντα που πρέπει να αποβληθούν, που τα μεταφέρει στα όργανα απέκκρισης (συκώτι, νεφροί, πνεύμονες).
- Η ισορροπία αυτή είναι απαραίτητη για την υγεία.
- Κάθε διαταραχή συνεπάγεται βαριά νόσηση.

Ασταθή

✓ Ασταθή (labile) προϊόντα ανθρώπινου αίματος

- Ολικό αίμα
- Συμπυκνωμένα Ερυθρά
- Συμπυκνωμένα αιμοπετάλια
- Πρόσφατα κατεψυγμένο πλάσμα
- Νωπό πλάσμα
- Προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα

Ευρωπαϊκή Επιτροπή Αιμοδοσίας

Σταθερά

✓ Βιομηχανοποιημένα προϊόντα/παράγωγα ανθρώπινου αίματος

- Λευκωματίνη
- Συμπυκνωμένοι παράγοντες πήξεως και αντιπρωτεάσες
- Ανοσοσφαιρίνες(ενδομυϊκές και ενδοφλέβιες)
- Προθρομβινικό σύμπλεγμα
- Συμπύκνωμα αντιθρομβίνης III
- Αντιαναστολείς πήξεως
- Συμπύκνωμα ινωδογόνου

Ευρωπαϊκή Επιτροπή Αιμοδοσίας

Πλάσμα

□ Πλάσμα:

- Θεραπευτικό προϊόν (φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα)
- Μέσο για την παραγωγή φαρμακευτικών κλασματοποιημένων προϊόντων (προϊόντα πλάσματος)

Πλάσμα

- Στις μέρες μας υπάρχουν 20 διαφορετικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται σε παθήσεις που σχετίζονται με:
 - Αιμορραγικές και θρομβωτικές καταστάσεις
 - Ανοσολογικές παθήσεις
 - Φλεγμονές

Προϊόντα πλάσματος

- Οι **πρωτεΐνες**: είναι τα απαραίτητα συστατικά για πολλές λειτουργίες του οργανισμού
- Η **λευκωματίνη**: διατηρεί τον όγκο του αίματος μέσα στη κυκλοφορία.
- Οι **ανοσοσφαιρίνες**: είναι τα αντισώματα που εξασφαλίζουν την ανοσία και προφυλάσσουν τον οργανισμό από μικρόβια και ιούς.
- Το **ινωδογόνο** και οι **παράγοντες πήξης**: εξασφαλίζουν την πήξη του αίματος, όταν τραυματισθεί ένα αγγείο, με αποτέλεσμα σχηματισμό θρόμβου που σταματάει οριστικά την αιμορραγία.

Κλασματοποίηση-ορισμός

- Η βιομηχανοποιημένη διαδικασία κατά την οποία απομονώνονται προϊόντα πλάσματος λέγεται **κλασματοποίηση**
- Πάνω από 23-28 εκατομμύρια λίτρα πλάσματος κλασματοποιείται παγκοσμίως κάθε χρόνο σε 70 εργοστάσια.

Κλασματοποίηση

- **Η κλασματοποίηση του αίματος και η παρασκευή παραγώνων**
- εξασφαλίζει ορθολογιστική αξιοποίηση του προσφερόμενου από τους αιμοδότες αίμα και ορθή από ιατρική άποψη αντιμετώπιση των αρρώστων.
- Το αίμα είναι ζωντανός ιστός, που δεν μπορεί ακόμη να υποκατασταθεί με κανένα φάρμακο ή χημική ουσία.
- **Δεν το παρασκευάζουμε, το παίρνουμε από υγιείς δότες.**

Πλάσμα- κλασματοποίηση

- Η κλασματοποίηση του πλάσματος και η παρασκευή σε ξηρή μορφή των διαφόρων συστατικών του αποτελεί τη μεγάλη πρόοδο στο τομέα της Αιμοδοσίας.
- Με την απομόνωση και την προσφορά σε σχεδόν καθαρή μορφή των διαφόρων πρωτεϊνών του, δίνεται η δυνατότητα αντιμετώπισης των αρρώστων με τη χορήγηση του συγκεκριμένου παράγοντα που τους λείπει σε πολύ μικρό όγκο.

Προϊόντα κλασματοποίησης

Αντ αιμορροφιλικοί παράγοντες

- **Παράγοντας VIII** της πήξης για αντιμετώπιση των Αιμορροφιλικών τύπου A που φέρεται ή σαν κρυοκαθίζημα ή σαν συμπυκνωμένος καθαρός παράγοντας.
- **Προθρομβινικό σύμπλεγμα**, που περιέχει κυρίως τον παράγοντα IX της πήξης για την αντιμετώπιση των Αιμορροφιλικών τύπου B αλλά και τους παράγοντες II, VII, X για την αντιμετώπιση ασθενών με κληρονομική έλλειψη αυτών των παραγόντων ή αρρώστων με κίρρωση ήπατος, όπου υπάρχει διαταραχή αυτών των παραγόντων.
- **Παράγοντας IX** της πήξης για αντιμετώπιση της Αιμορροφιλίας B.

Προϊόντα κλασματοποίησης

Γ-σφαιρίνες, ειδικές ανοσοσφαιρίνες

- Οι **γ-σφαιρίνες** χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις αγαμασφαιριναιμίας, για προφύλαξη από τις λοιμώξεις, σε θεραπεία για όλη την ζωή.
- Οι ειδικές γ-σφαιρίνες, **ανοσοσφαιρίνες**, χρησιμοποιούνται ανάλογα για τον τέτανο, τον κοκίτη, την ερυθρά, την ηπατίτιδα, τον έρπητα ζωστήρα, την λύσσα, τις επιπλοκές της ευλογιάς, και η ανοσοσφαιρίνη αντι-D για την προφύλαξη των αρνητικών γυναικών από ευαισθητοποίηση στον παράγοντα Rhesus.

Προϊόντα και ενδείξεις χορήγησης

Products	Main Indications
Albumin	
Human Serum Albumin	Volume replacement
Blood Coagulation factors	
Factor VIII	Haemophilia A
Prothrombin complex (PCC/PPSB)	Complex liver diseases; warfarin or coumarin derivatives reversal
Factor IX	Haemophilia B
Factor VII	Factor VII deficiency
Von Willebrand Factor	von Willebrand factor deficiency (Type 3 and severe forms of Type 2)
Factor XI	Haemophilia C (FXI deficiency)
Fibrinogen	Fibrinogen deficiency
Factor XIII	Factor XIII deficiency
Activated PCC	Haemophilia with anti-FVIII (or FIX) inhibitors

Προϊόντα και ενδείξεις χορήγησης

Intramuscular Immunoglobulins (IMIG)	
Normal (polyvalent)	Prevention of hepatitis A (also rubella, and other specific infections)
hepatitis B	Prevention of hepatitis B
tetanus	treatment or prevention of tetanus infection
anti-Rho(D)	Prevention of the haemolytic disease of the new-born
Rabies	Prevention of rabies infection
Varicella/zoster	Prevention of chicken-pox infection

Προϊόντα και ενδείξεις χορήγησης

Intravenous Immunoglobulins (IVIG)	
normal (polyvalent)	Replacement therapy in immune deficiency states immune modulation in immune disorders
Cytomegalovirus (CMV)	Prevention of CMV infection (e.g.after Bone Marrow Transplantation)
Hepatitis B	Prevention of HBV infection (e.g.liver transplant)
Rho (D)	Prevention of the haemolytic disease of the new-born.
Intravenous Immunoglobulins M	septic shock; binding of endotoxins

Προϊόντα και ενδείξεις χορήγησης

Protease inhibitors	
Antithrombin	Antithrombin III deficiency
Alpha 1 antitrypsin	Congenital deficiency of alpha 1 antitrypsin with clinically demonstrable panacinar emphysema
C1-inhibitor	Hereditary angioedema
Anticoagulants	
Protein C	Protein C deficiency / (thrombosis)
Fibrin sealant (fibrin glue)	Topical haemostatic / healing / sealing agent (surgical adjunct)

Πλάσμα-έλεγχος

- Η καταλληλότητα των προϊόντων πλάσματος όσο αφορά τη λειτουργικότητα, δραστηκότητα και ασφάλεια στη χορήγηση τους, είναι βασικό μέλημα των Υπηρεσιών Αιμοδοσίας, ειδικά μετά την εμφάνιση του AIDS, και της μόλυνσης μεγάλου αριθμού Αιμορροφιλικών και άλλων πολυμεταγγιζόμενων ατόμων.

Πλάσμα-έλεγχος

- Ο πλήρης και αποτελεσματικός έλεγχος των προϊόντων του πλάσματος επιτυγχάνεται με διεθνώς καθιερωμένες εργαστηριακές, βιοχημικές, βιολογικές και ορο/διαγνωστικές εξετάσεις.
- Οι εξετάσεις αυτές εκτελούνται τόσο στη χρησιμοποιούμενη πρώτη ύλη, (μεμονωμένες μονάδες και δεξαμενές πλάσματος), όσο και στο τελικό προϊόν.

Πλάσμα-έλεγχος

- Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει :
 1. τον καθορισμό της προέλευσης του πλάσματος
 2. την καταγραφή των στοιχείων των αιμοδοτών
 3. την διενέργεια των βασικών εργαστηριακών εξετάσεων στις επιμέρους μονάδες αίματος, όπως έλεγχος ηπατίτιδας Β και C, AIDS και σύφιλης.

Έλεγχος δοτών

- Είτε το πλάσμα προέρχεται από ολικό αίμα με την διαδικασία της αιμοδοσίας
- Είτε προέρχεται ως προϊόν αφαίρεσης

Έλεγχος δοτών

- Στους αιμοδότες πλάσματος με την διαδικασία της αφαίρεσης, καθορίζονται και τα επίπεδα πρωτεΐνης ορού καθώς και τα επίπεδα ανοσοσφαιρινών πέρα από των καθιερωμένο έλεγχο όλων των αιμοδοτών.

Πλάσμα-έλεγχος

- Επιπλέον στην πρώτη ύλη, δηλαδή, το πλάσμα, αλλά και στο τελικό προϊόν, γίνονται και άλλες εξετάσεις για έλεγχο της:
 1. Στειρότητας
 2. Τοξικότητας
 3. Ύπαρξης πυρετογόνων
 4. Καθαρότητας των προϊόντων αυτών
- Ακολουθεί επεξεργασία για την αδρανοποίηση λοιμογόνων παραγόντων με εξειδικευμένες μεθόδους.

Επιπλέον έλεγχοι

- Parvovirus B19 και hepatitis A virus (HAV) ελέγχονται με NAT

Κλασματοποίηση

- Η διαδικασία συλλογής για κλασματοποίηση πλάσματος διαφέρει από την συλλογή του κοινού πλάσματος.
- Σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον, το πλάσμα προς κλασματοποίηση συλλέγεται σε εξουσιοδοτημένα κέντρα που υπόκεινται σε ελέγχους (National Regulatory Authorities-NRA).
- Η διαδικασία ακολουθεί συγκεκριμένα πρωτόκολλα ποιότητας και ασφάλειας.

Κλασματοποίηση

- Περιλαμβάνει διαδικασίες που σχετίζονται με:
 1. Έλεγχο των δοτών
 2. Πιστοποίηση και ανιχνευσιμότητα των δοτών
 3. Χειρισμό και επεξεργασία πλάσματος
- Όλα τα παραπάνω συνθέτουν ‘Plasma Master File’

Προϋποθέσεις για κλασματοποίηση πλάσματος

○ Μέθοδοι συλλογής

- Το 35% του πλάσματος που κλασματοποιείται παγκοσμίως προέρχεται από φυγοκέντρηση ολικού αίματος
- Το 65% προέρχεται από διαδικασίες αφαίρεσης
- Η συλλογή πλάσματος, η διαδικασία χειρισμού και η φύλαξη επηρεάζουν την ποιότητα του.

Προϋποθέσεις για κλασματοποίηση πλάσματος

- Κίνδυνοι ενεργοποίησης :
 1. της πήξης
 2. του συμπληρώματος
 3. του συστήματος ινωδογονόλυσης
- ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΑΠΟΦΕΥΓΟΝΤΑΙ

Προϋποθέσεις για κλασματοποίηση πλάσματος

- Προϋποθέσεις για το βέλτιστο αποτέλεσμα είναι:
 - i. Η καλή ανάμιξη με το αντιπηκτικό διάλυμα (με βάση το κιτρικό) καθόλη την διάρκεια
 - ii. Η διάρκεια συλλογής δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 15 λεπτά
 - iii. Οι διαφορές θερμοκρασίας πρέπει να αποφεύγονται.

Προϋποθέσεις για κλασματοποίηση πλάσματος

- Λίγες ώρες μετά την αιμοδοσία ,το ολικό αίμα φυγοκεντρήται για να διαχωριστούν τα συστατικά του
- Ο Μ.Ο όγκου πλάσματος από αιμοδοσία ολικού αίματος είναι 220ml (ποικίλει με βάση τον όγκο της μονάδας και τον αιματοκρίτη)
- Πλάσμα αφαίρεσης είναι αυτό που λαμβάνεται από δότες μέσω μιας διαδικασίας όπου το αίμα που δίνει ο αιμοδότης αναμιγνύεται με αντιπηκτικό και διαχωρίζεται.
- Τα ερυθρά επιστρέφουν στον αιμοδότη και το πλάσμα συλλέγεται(450- 880ml)

Προϋποθέσεις για κλασματοποίηση πλάσματος

❖ Έλεγχος δοτών

- Οι δότες είναι άτομα που πληρούν τα κριτήρια εθελοντισμού (π.χ. ηλικία και συχνότητα αιμοδοσίας)
- Έχουν μικρή πιθανότητα προσβολής από αιματογενώς μεταδιδόμενες λοιμώξεις
- Πληρούν τις προϋποθέσεις από τις εκάστοτε NRA

Table 1. Most Relevant Measures Taken to Prevent the Transmission of Plasma-Borne Infectious Agents by Fractionated Plasma Products

Infectious agent	Blood establishment		Plasma fractionator				
	Donor screening (exclusion criteria)	Individual serologic testing	Mini-pool NAT*	Manufacturing pool testing†	Viral inactivation treatments	Removal by purification steps‡	Removal by nanofiltration§
-HIV I and II	Questionnaire	Anti-HIV 1 and 2	Yes	Anti-HIV 1 and 2; HIV NAT	+	(+)	+
-HBV	Questionnaire	HBsAg	Yes	HBsAg; HBV NAT	+	(+)	+
-HCV	Questionnaire	Anti-HCV	Yes	Anti-HCV; HCV NAT	+	(+)	+
-hepatitis delta virus	(questionnaire)	ND	ND	ND	+	(+)	+
-HAV	ND	ND	Yes	HAV NAT	±	(+)	+
-hepatitis E virus	ND	ND	ND	ND	+	(+)	+
-hepatitis G virus	ND	ND	ND	ND	+	(+)	+
TT virus	ND	ND	ND	ND	+	(+)	+
B19	ND	ND	Yes	B19 NAT	±	(+)	+
WNV	ND	ND	ND	ND	+	(+)	+
vCJD	Questionnaire	ND	Not relevant	ND	Not relevant	(+)	(+)

+ Indicates major contribution to safety; ±, contribution depends on type of treatment; ND, not done (or test not available).

*Performed by most fractionators.

†Mandatory in Europe for HCV.

‡May contribute to viral clearance but does not necessarily result in robust and consistent removal.

§For small viruses, robust removal is achieved by narrow pore size membranes (≤ 20 nm).

||Expected contribution based on experimental studies using spiked TSE agents, in the absence of information of the biological nature

† the TSE-human plasma associated agent.

Προϋποθέσεις για κλασματοποίηση πλάσματος

○ Έλεγχος για παθογόνα

- Έχουν βρεθεί παθογόνοι μικροοργανισμοί που μπορούν να μολύνουν το αίμα
- Βακτήρια, παράσιτα και ενδοκυττάρια ιοί δεν μπορούν να μολύνουν τα προϊόντα πλάσματος διότι έχουν καταστραφεί από την ψύξη ή το φιλτράρισμα κατά την επεξεργασία.

Προϋποθέσεις για κλασματοποίηση πλάσματος

- Ιοί όπως:
 - ✓ HIV, HCV, HBV
 - ✓ West Nile virus (WNV)
 - ✓ hepatitis A virus (HAV)
 - ✓ parvovirus B19 (B19)
- μπορούν να προσβάλουν το πλάσμα .

Method	Description	Separation principle	Application
Cryoprecipitation	Thawing of whole plasma; at +1°C to +4°C	Differential solubility at cold positive temperature	Precipitation of FVIII, VWF, and fibrinogen
Ethanol precipitation	Successive precipitation steps of cryo-poor plasma by Ethanol (10%-40%), under precise conditions of pH (ca 7.4-4.5), temperature (-3 to -6°C), protein concentration, and ionic strength Removal of precipitates by centrifugation or depth-filtration	Differential solubility in ethanol at cold negative temperature	Precipitation of fibrinogen, IgG, albumin, AAT, etc
Ion exchange chromatography	Binding of proteins on a solid support usually packed in a column. Can also be done as a batch process, eg, DEAE, QAE, CM...	Electric charge binding. Elution by increasing salt content or changing pH	Most coagulation factors, protease inhibitors, and anticoagulants
Affinity chromatography	Binding of proteins on a solid support most usually packed in a column; ligands include heparin, metals, and gelatin	Specific affinity ligand proteins. Elution usually by increasing salt content	AT, VWF, FIX, etc
Immunoaffinity	Binding of proteins on a solid support packed in a column. Ligands include murine monoclonal antibodies	Specific affinity antibodies-proteins. Elution usually by increasing salt content	FVIII, FIX, protein C
Size-exclusion chromatography	Injection of proteins on a solid support packed in a column	Separation based on differential molecular mass	AAT, FVIII
Ultrafiltration	Selective fractionation process on membranes of defined pore size that concentrates protein and removes low-molecular-weight solutes and salts	Separation based on differential molecular mass	All products
Microfiltration	Low-pressure cross-flow membrane process for separating colloidal and suspended particles in the range of 0.2 to 10 μm		All products

Table 3. Viral Reduction Treatments of Licensed Plasma Products

Treatment	Products	Target viruses in-process treatment	Comments
<i>In-process treatment</i>			
Solvent-detergent	Coagulation factors (eg, FVIII, prothrombin complex, FIX, VWF, fibrinogen) AT IgG Fibrin sealants	E	No, or limited, protein denaturation The SD agents are removed by subsequent protein purification steps
Pasteurization	Coagulation factors (eg, FVIII, fibrinogen) IgG AAT AT	E Most NE	Protein stabilizers may limit viral inactivation B19 is heat resistant 10% to 30% loss of functional activity of coagulation factors
Vapor heat	Coagulation factors (eg, FVIII) C1-inh Fibrin sealants	E Most NE	As pasteurization
Low pH (pH 4) treatment	IgG	E	Most other plasma proteins lose functional activity at low pH
Caprylic acid treatment (<pH 5.5)	IgG and IgM	pH 4 sensitive NE	Most other plasma proteins lose functional activity at low pH
Nanofiltration	Coagulation factors (eg, FIX, FXI, FVIII, VWF) IgG AAT AT Fibrin sealants	E E NE	Viral removal by size-exclusion mechanism depends upon virus size and shape, and nanofilter porosity
<i>Terminal treatment</i>			
Pasteurization	Albumin	E NE	Only for a product withstanding liquid heat-treatment in the presence of small amount of stabilizers
Dry heat	Coagulation factors (eg, FVIII, FIX, prothrombin complex, FXI)	Some E Some NE	Inactivation of heat-resistant viruses depends on temperature and duration Hardly inactivates B19 10% to 20% loss of functional activity of coagulation factors

E indicates enveloped; NE, nonenveloped.

Προϋποθέσεις για κλασματοποίηση πλάσματος

- Διαχείριση, ψύξη, φύλαξη και μεταφορά πλάσματος
- Το πλάσμα αφάιρεσης μπορεί να ψυχθεί γρήγορα διασφαλίζοντας ιδανικά το παράγοντα FVIII
- Αντίθετα το ολικό αίμα πρέπει να φυγοκεντρηθεί για να διαχωριστεί
- Όταν το αίμα ψυχθεί στους 4C μετά την συλλογή το πλάσμα πρέπει να διαχωριστεί και να ψυχθεί μέσα σε 6-8 ώρες για να διατηρηθεί ο FVIII.

Προϋποθέσεις για κλασματοποίηση πλάσματος

- Μετά τον διαχωρισμό το πλάσμα προς κλασματοποίηση πρέπει να ψυχθεί γρήγορα στους -20C, -25C, ή -30C με βάση τις εκάστοτε οδηγίες.
- Πλάσμα που χρησιμοποιείται για να παραχθεί μόνο αλβουμίνη και IgG μπορεί να ψυχθεί στους -20 C μέσα σε 72 ώρες από την συλλογή.

Προϊόντα κλασματοποίησης

- Αρχικά όλα τα προϊόντα κλασματοποίησης του πλάσματος προέρχονταν από συγκεντώσεις πλάσματος.
- Τα τελευταία 20 χρόνια λόγω της εξέλιξης στην μοριακή τεχνολογία είναι δυνατόν να παρασκευαστούν πιο σύνθετες πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας την ανασυνδυασμένη τεχνολογία.

Ανασυνδυασμένα προϊόντα

- Η κατασκευή ανασυνδιασμένων πρωτεΐνων πλάσματος προέρχεται από καλλιέργειες κυττάρων στις οποίες έχουν «διαμολυνθεί» με νουκλεϊκό οξύ που μεταφέρει το γονίδιο επιλογής.
- Τα «επιμολυσμένα» κύτταρα δημιουργούν την πρωτεΐνη και την εκκρίνουν στο μέσο καλλιέργειας, η οποία συλλέγεται και οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε καθαρισμό με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικά μέσα
- Τα ανασυνδυασμένα προϊόντα πρώτης γενιάς περιέχουν μικρές ποσότητες πρωτεΐνης πλάσματος, κυρίως αλβουμίνη, με στοχο την σταθερότητα του προϊόντος

Ανασυνδυασμένα προϊόντα

- Η εξέλιξη έχει προχωρήσει σε τέτοιο βαθμό ώστε σχεδόν όλα τα ανασυνδυασμένα προϊόντα δεν περιέχουν ανθρώπινες πρωτεΐνες.
- Παράγοντες VIII, IX, VIIa και η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, υπάρχουν ως ανασυνδυασμένα προϊόντα.

Προϊόντα πλάσματος-παρασκευή

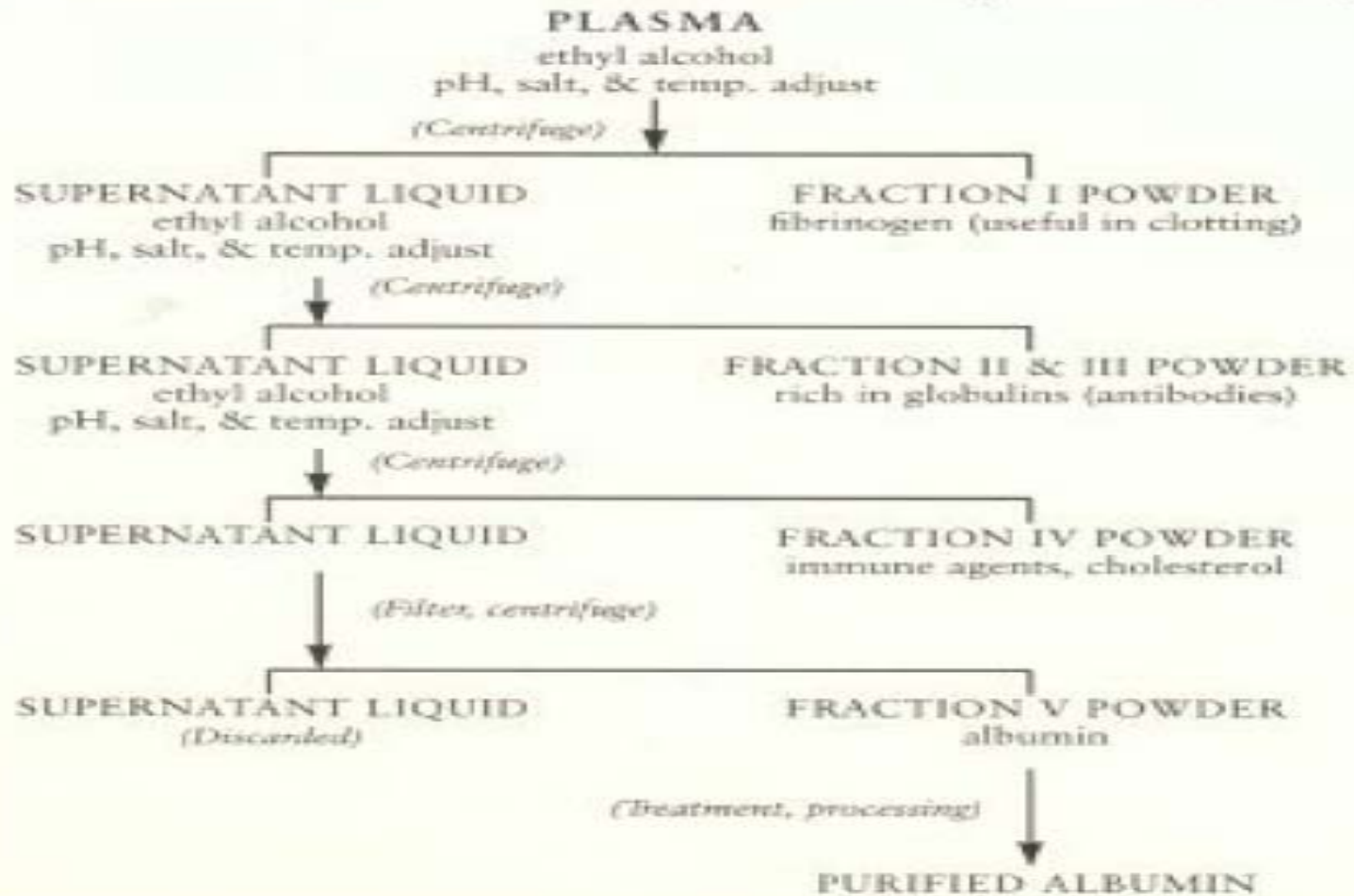
- Προέρχονται από δεξαμενές πολλών ασθενών (>10,000) και διαχωρίζονται με κλασματοποίηση.
- Η μέθοδος Cohn, αναπτύχθηκε κατά τον Β.Π.Πόλεμο, ποικίλλει :
 1. θερμοκρασία
 2. το pH
 3. συγκέντρωση αιθανόλης
- με αποτέλεσμα να καθιζάνουν κλάσματα πλάσματος στα διάφορα στάδια.

Μέθοδος Cohn

- Το υπερκείμενο από το ένα στάδιο γίνεται η πρώτη ύλη για το επόμενο.
- Το κάθε κλάσμα επεξεργάζεται χωριστά για να απομακρυνθούν τα περιττά στοιχεία, να σταθεροποιηθεί το προϊόν και καταστραφούν τα παθογόνα
- Η βασική μέθοδος Cohn είναι αποτελεσματική και με παραλλαγές χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα.
- Βελτιώσεις και προσθήκες στην βασική μέθοδο όπως η υγρή χρωματογραφία και nano-filtration έχουν αυξήσει την καθαρότητα του τελικού προϊόντος.

Μέθοδος Cohn

PLASMA FRACTIONATION (Cohn Method)



Μέθοδος Cohn

- Τα καθιζήματα διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση ή φιλτράρισμα.
- Τα τελευταία χρόνια η περιπλοκότητα της κλασματοποίησης έχει αυξηθεί με την:
 - a. είσοδο της χρωματογραφίας που διαχωρίζει νέες πρωτεΐνες από τα ήδη υπάρχοντα κλάσματα όπως κρυο-φτωχό πλάσμα (cryo-poor plasma)
 - b. ολοκλήρωση της χρωματογραφίας στην διαδικασία κλασματοποίησης με αιθανόλη με στόχο την αύξηση της αποκατάστασης της IgG
 - c. εγκατάσταση απενεργοποίησης ιών.

Χρωματογραφία

- Η χρωματογραφία εισήλθε το 1969 αλλά η εφαρμογή της αναπτύχθηκε περισσότερο στα μέσα του 1980.
- Η στόχοι της χρωματογραφίας είναι οι εξής:
 - (a) βελτίωση της καθαρότητας των προϊόντων
 - (b) εξαγωγή ασταθών πρωτεϊνών
 - (c) βελτιστοποίηση των πρωτεϊνών
 - (d) απομάκρυνση των παραγόντων ενεργοποίησης ιών.

Χρωματογραφία

- Οι σάκοι πλάσματος ανοίγονται σε άσηπτες συνθήκες και το πλάσμα ξεπαγώνει στους 18C με 48C.
- Κρυοκαθιζήματα απομονώνονται χρησιμοποιώντας φυγοκεντρήσεις με συνεχή ψύξη και ψύχονται στους -30 C.
- Το κρύο-φτωχό πλάσμα (cryo-poor plasma) άμεσα προωθείται στην αρχική χρωματογραφική λήψη των παραγόντων πήξης όπως ο παράγοντας IX [FIX] και αναστολείς πρωτεασών όπως AT και C1 αναστολέας εστεράσης[C1-inh])

- Οι αντιπηκτικοί παράγοντες / το πλάσμα χωρίς αντιπηκτικό υπόκεινται σε συνεχή στάδια με κατακράτηση αιθανόλης.
- Κατά αυτό τον τρόπο δημιουργούνται καθιζήματα ινωδογόνου, ανοσοσφαιρίνης IgG, αλβουμίνη και ενδιάμεσα προϊόντα για την δημιουργία άλλων θεραπευτικών σκευασμάτων όπως IgM (fraction III).

Διαδικασίες παρασκευής προϊόντων πλάσματος

❖ Παράγοντες πήξης:

Factor VIII

- Διάφορες τεχνικές παραγωγής FVIII έχουν αναπτυχθεί από τα μέσα του 1980
- Όλες παρέχουν :
 - Ασφάλεια κατά του HIV και HCV
 - Βελτιωμένη καθαρότητα
 - Ασφάλεια έναντι του HAV and B19

Παράγοντες πήξης

- Όλοι οι εγκεκριμένοι παράγοντες VIII προέρχονται από κρυοκαθιζήματα
- Συγκεκριμένα το κρυοκαθίζημα υποβάλλεται σε ένα συνδιασμό απορρόφησης υπεροξειδίου του αλλουμινίου με καθίζηση με σκοπό να ελλατωθούν τα ίχνη των βιταμινο- K εξαρτώμενων παραγόντων πήξης
- Το καθαρό αυτό κρυοκαθίζημα περνά από την διαδικασία απενεργοποίησης ιών.

Παράγοντες πήξης

- Μερικά προϊόντα FVIII νανοφιλτράρονται με μεμβράνες με πορους διαμέτρου 35, 20, 15 nm.
- Μερικά σκευάσματα υποβάλλονται σε διαδικασίες θερμότητας στους 80C ή 100 C με σκοπό να απενεργοποιηθούν ιοι όπως αυτός της HAV.

Παράγοντες πήξης

- **Ινωδογόνο**
- Υπάρχουν 5 σκευασματα που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία της ανινωδογοναιμίας ή υποϊνωδογοναιμίας
- Με διαδοχικά βήματα καθίζησης του πλάσματος ή του κρυοκαθιζήματος με την χρήση αιθανόλης και γλυκίνης παράγονται τα σκευάσματα ινωδογώνου
- Τα τελευταία χρόνια η χρωματογραφία αρχίζει να κερδίζει έδαφος

Παράγοντες πήξης

Von Willebrand factor

- Τα προϊόντα FVIII που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της νόσου Von Willebrand (VWD) είναι συνήθως χαμηλής καθαρότητας προϊόντα που προέρχονται από κρυοκαθιζήματα.

Prothrombin complex.

- Αποτελεί μείγμα βιταμινο-εξαρτώμενων Κ παραγόντων πήξης όπου οι παράγοντες ΙΧ,ΙΙ, και παράγοντας Χ και πρωτεΐνες C και S
- Λίγα προϊόντα περιέχουν και παράγοντα VII (FVII)

FIX

- Υψηλής καθαρότητας ΙΧ προϊόντα αναπτύχθηκαν κατά τα τέλη του 1989 οδηγώντας σε χαμηλό κίνδυνο θρομβοεμβολισμού σε σχέση με το PCC στους ασθενείς με αιμορροφιλία Β
- FIX απομονώνεται με χρωματογραφία του PCC με την ανταλλαγή ανιόντων είτε με την χρήση ηπαρίνης και μονοκλωνικών αντισωμάτων

ITI, Inter-(a) trypsin αναστολέας

- Inter-a trypsin αναστολέας (ITI) είναι ένας αναστολέας της πρωτεΐνάσης
- Μπορεί να συμβάλλει στον έλεγχο της φλεγμονής
- Χορήγηση στα αρχικά στάδια της σήψης, μπορεί να εξασφαλίσει καρδιοαγγειακή σταθερότητα

Αποπρωτεΐνη Α

- Η αποπρωτεΐνη Α προφυλάσσει από την συγκέντρωση μακροφάγων/πλούσιων σε χοληστερόλη
- Μπορεί να απομονωθεί με την μέθοδο Cohn.
- Η θεραπεία της υπερχοληστεριναιμίας μπορεί να είναι μια από τις πιθανές κλινικές εφαρμογές της

Συμπερασματικά

- Από τα πιο πάνω φαίνεται πόσο πολύπλοκη είναι η σύνθεση του αίματος και πόσο πολλές οι λειτουργίες που επιτελεί.
- Απ' αυτό προκύπτει ακόμα, ότι σ' ένα οργανισμό που πάσχει, συνήθως δεν πρέπει να δίνουμε ολικό αίμα, αλλά το στοιχείο εκείνο που του λείπει ή που έχει ανάγκη.

ΚΛΑΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ – Πρωτείνες πλάσματος & νόσοι που θεραπεύουν



Plasma Proteins and the Diseases They Treat

■ Albumin (25 grams^{*})

Shock, Burns, Adult Respiratory Distress Syndrome, Cardiopulmonary Bypass Surgery

■ IVIG (Intravenous Immunoglobulin) (4 grams^{*})

Primary Immunodeficiency Diseases, Autoimmune Diseases, Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy, Idiopathic Thrombocytopenic Purpura

■ Alpha-1 Antitrypsin (.15 to .30 grams^{*})

Alpha-1 Antitrypsin Deficiency (Genetic COPD)

■ Coagulation Factors

(Factor VIII: 300 to 450 IU, Factor IX: 180 to 200 IU^{*})

Hemophilia A & B, von Willebrand Disease, Bleeding Disorders

* Plasma Protein Yields Per Liter of Plasma

Συμπερασματικά

- Η μέθοδος κλασματοποίησης Cohn είχε αρχικά σχεδιαστεί για την παραγωγή αλβουμίνης
- Με την πάροδο των ετών εξελίχθηκε σε μια επιτυχημένη βιομηχανοποιημένη μέθοδο απομόνωσης κλινικά χρήσιμων προϊόντων
- Σήμερα παράγονται πάνω από 20 διαφορετικά πρωτεϊνικά σκευάσματα
- Η πολυπλοκότητα έχει αυξηθεί με την είσοδο τεχνικών όπως η χρωματογραφία και άλλες (nanofiltration)

Συμπερασματικά

- Είναι σημαντικό να δημιουργηθούν οικονομικά συμφέρουσες τεχνικές επενεργοποίησης ιών και τεχνολογίες γενικότερα που να βοηθούν τις αναπτυσσόμενες χώρες να χρησιμοποιούν το ντόπιο πλάσμα με ασφάλεια