

A detailed 3D rendering of a blood smear. The background is filled with numerous red blood cells, which are depicted as biconcave discs with a reddish-orange hue. In the center, a white blood cell is visible, characterized by its larger size and a multi-lobed, purple nucleus. The lighting creates a sense of depth, with some cells in sharp focus and others blurred in the background.

La Trasfusione di Sangue : Terapia Ancora Attuale ?

Modena 25 novembre 2015

Dott. Giuliano Montagnani

La Trasfusione di Sangue nella Storia

Con ogni probabilità i riferimenti alla trasfusione di sangue prima del 1628 (data della scoperta della circolazione del sangue da parte di Harvey) sono da considerare discutibili.

Pressochè tutti i riferimenti delle epoche greca, romana e medievale rimandano alla ingestione piuttosto che alla infusione di sangue.

La Circolazione

Andrea Cisalpino (1519-1603) usò il termine 'circolazione' e credeva che le vene e le arterie fossero unite da una fine rete vascolare.

William Harvey è generalmente accreditato della scoperta nel 1616 (pubblicata nel 1628) della circolazione del sangue così come noi la conosciamo oggi.

Marcello Malpighi (1628-1694) scoprì il sistema capillare di connessione arterie-vene (circolo capillare) completando il lavoro di Harvey.

William Harvey (1578-1657)



Questo libro di cento pagine, pubblicato nel 1628 e considerato ancor oggi un caposaldo della medicina, lentamente si diffuse a tutto il mondo medico influenzandolo profondamente.

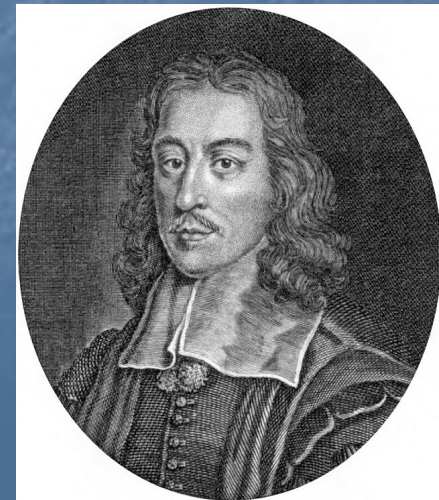
Esperimenti di Infusione



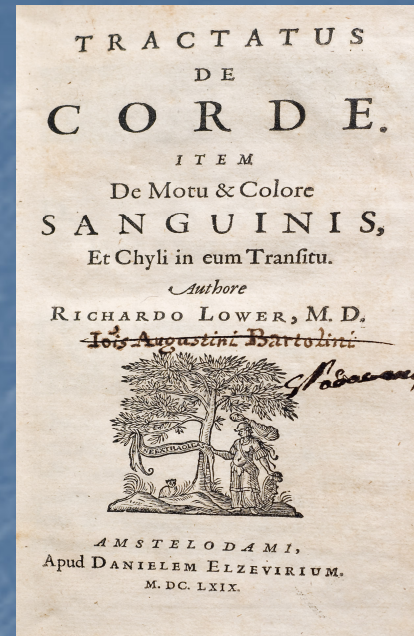
Nel 1658, **Christopher Wren** e **William Boyle** eseguirono una serie di esperimenti iniettando vari medicamenti nelle vene di cani, utilizzando una vescica alla quale era attaccato un pennino e osservandone poi gli effetti.

Le soluzioni di infusione comprendevano: vino, birra, oppio, emetici, acqua, acido nitrico e acido solforico.

Thomas Willis iniettò dei coloranti nei vasi sanguigni tributari del cervello allo scopo di tracciarne la vascolatura.
(da qui il Circolo di Willis).



Richard Lower (1631-1691)



Richard Lower è ritenuto il primo ad aver effettuato, nel 1665, la prima vera trasfusione di sangue (da animale ad animale).

Rianimò un cane dissanguato connetendo l'arteria carotide del cane donatore con la vena giugulare del cane ricevente mediante un pennino d'oca.

Jean Baptiste Denys (1640-1704)



La prima trasfusione di sangue da animale ad uomo viene accreditata a **Jean-Baptiste Denys**, giovane medico francese alla corte di Luigi XIV

Denys e il collega Emmerez eseguirono nel 1667, la trasfusione di sangue d'agnello in un giovane di 15 anni, che per mesi aveva presentato febbre elevata per la quale era stato salassato più volte dal proprio medico e che si presentava debole, intorpidito, con capacità mentali decadute e senza memoria. Denys riportò che, subito dopo la trasfusione, il ragazzo mostrò un miglioramento impressionante e "...un fortissimo calore lungo il braccio, profonda sudorazione, dolore ai reni...", dati questi indicativi di reazione emolitica trasfusionale; tuttavia sopravvisse.

Proibizioni della Trasfusione

Il quarto paziente trasfuso da Denys, soffriva di delirio da neuro-lue. Dopo due trasfusioni di sangue di vitello la sua "pazzia" sembrò migliorare così fu sottoposto ad un'altra trasfusione che sfortunatamente si dimostrò fatale.

La moglie di quest'uomo accusò Denys di aver avvelenato suo marito.

Denys fu sospeso (e la moglie dell'uomo accusata di aver tentato di avvelenare il marito !) ma questo incidente portò, alla emanazione nel 1678 da parte del Parlamento francese (Stati Generali), di un editto che proibiva la trasfusione in quanto atto criminale.

La British Royal Society a Londra nello stesso anno e il Papa a Roma nell'anno successivo, disposero il divieto per questa procedura.

A seguito dei decreti che, nella seconda metà del 17° secolo, vietavano la trasfusione di sangue in quasi tutta l'Europa, questa pratica cadde nel discredito generale per più di 150 anni.

Il 18° Secolo

Trasfusioni vennero eseguite solo sporadicamente e, in genere, da animale a uomo.

La trasfusione di sangue era ritenuta una cura per malattie mentali o per trasferire personalità, vigore, giovinezza e non un trattamento delle emorragie.

Trasfusioni reciproche venivano suggerite addirittura come cura delle discordie fra coniugi.



James Blundell



THE LANCET.

Vol. II.]

LONDON, SATURDAY, JUNE 13.

[1828-9.

OBSERVATIONS ON TRANSFUSION OF BLOOD.

By DR. BLUNDELL.

*With a Description of his Gravitator.**

STATES of the body really requiring the infusion of blood into the veins are probably rare; yet we sometimes meet with cases in which the patient must die unless such operation can be performed; and still more frequently with cases which seem to require a supply of blood, in order to prevent the ill health which usually arises from large losses of the vital fluid, even when they do not prove fatal.

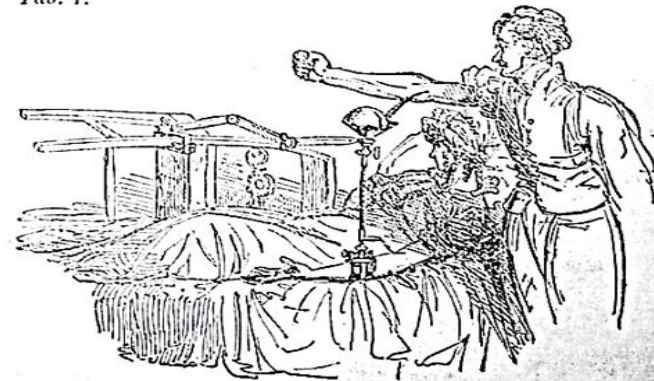
* The instrument is manufactured by Messrs. Maw, 53, Aldermanbury.

In the present state of our knowledge respecting the operation, although it has not been clearly shown to have proved fatal in any one instance, yet not to mention possible, though unknown risks, inflammation of the arm has certainly been produced by it on one or two occasions; and therefore it seems right, as the operation now stands, to confine transfusion to the first class of cases only, namely, those in which there seems to be no hope for the patient, unless blood can be thrown into the veins.

The object of the Gravitator is, to give help in this last extremity, by transmitting the blood in a regulated stream from one individual to another, with as little exposure as may be to air, cold, and inanimate surface; ordinary venesection being the only operation performed on the person who emits the blood; and the insertion of a small tube into the vein usually laid open in bleeding, being all the operation which it is necessary to execute on the person who receives it.

The following plate represents the whole apparatus connected for use and in action:—

Tab. 1.



No. 302.

Y

Nel 1818, **James Blundell** eseguì con successo la prima trasfusione di sangue umano ad una paziente con emorragia postpartum.

Il 19° Secolo

Le trasfusioni nel 1800 erano “flagellate” dalle complicazioni delle reazioni trasfusionali.

Il latte è stato proposto come eccellente sostituto, perchè si pensava che “ i bianchi corpuscoli del latte venissero trasformati in rossi corpuscoli del sangue .”

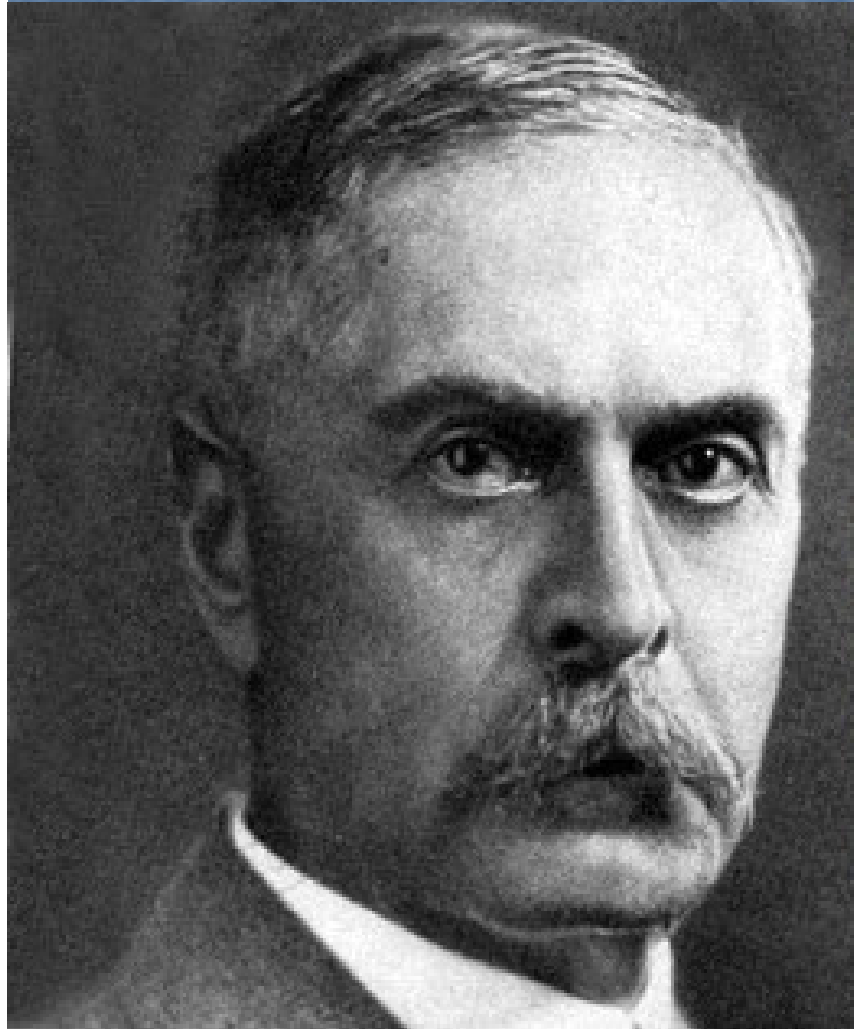
Due casi di trasfusione di latte, eseguite con successo in due interventi di amputazione d'arto, sono documentati nella Guerra Civile Americana.

Si osservò che l'infusione di soluzione salina era più sicura e spesso altrettanto efficace, della trasfusione di sangue.

Il 20° Secolo

Karl Landsteiner

Premio Nobel 1930



"I have recently observed and stated that the serum of normal people is capable of clumping the red cells of other healthy individuals... As commonly expressed, it can be said that in these cases at least two different kinds of agglutinins exist, one kind in A, the other in B, both together in C. The cells are naturally insensitive to the agglutinins in their own serum."

Karl Landsteiner

Tipizzazione del sangue

Il triestino Adriano Sturli e il viennese Alfred De Castello descrivono il quarto gruppo, AB, nel 1902.

Philip Levine e Rufus Stetson, nel 1939, descrivono la grave reazione in una donna di gruppo O trasyusa dopo il parto, con il sangue del marito, anch'egli di gruppo O.

Il suo siero agglutinava l'80% dei campioni di sangue di gruppo O

Karl Landsteiner e Alexander Wiener, nel 1940, descrivono il gruppo Rh. Questo porta ad una drammatica riduzione dell'incidenza della Malattia Emolitica Neonatale.

Sono ormai noti circa 400 antigeni diversi, suddivisi in 29 sistemi principali.

Maggiori Innovazioni nel 20° Secolo

Prove di Compatibilità

Soluzioni Anticoagulanti

Soluzioni Conservanti

Refrigerazione

Blood Banks

Sacche in Plastica

Emocomponenti

Esami Infettivologici

Screening Donatori ad Alto Rischio

Prove di Compatibilità

Landsteiner sottolineò l'importanza di questi test nel suo lavoro originale. (1901)

Reuben Ottenberg e Kertoen Schultz furono i primi ad applicare questa informazione nella pratica trasfusionale. (1907)

Nel 1911, Ludvig Hektoen suggerisce che il gruppo sanguigno sia alla base della selezione dei donatori di sangue.

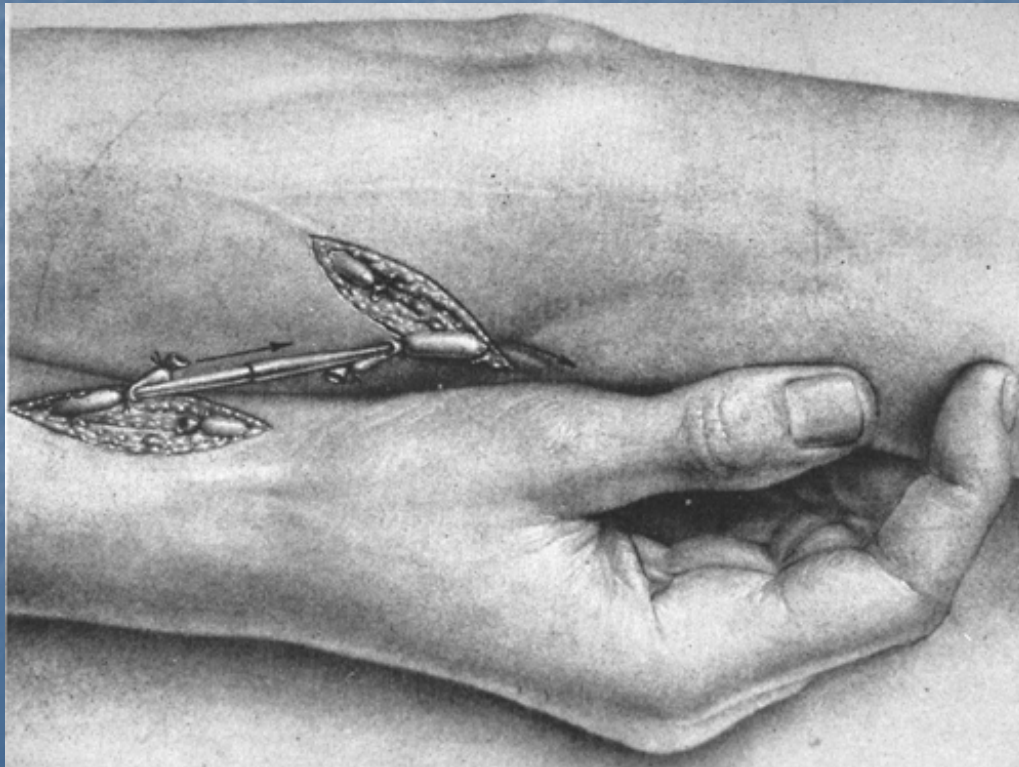
Le esperienze durante la 1° Guerra Mondiale portano alla adozione universale della tipizzazione del gruppo sanguigno per la selezione dei donatori.

Robert Royston Amos ("Robin") Coombs descrive il test all'antiglobulina nel 1945.

Anti-coagulazione

Blundell osservò la necessità di trasfondere rapidamente per evitare la coagulazione.

Fu pertanto sostenuta la Trasfusione Diretta (da arteria - a vena, per la velocità).



Anti-coagulazione

Nel 1835, Bischoff propose la defibrinazione.

Anche Brown-Sequard sperimentò la defibrinazione intorno al 1850. Questa era ottenuta sbattendo o agitando il sangue con una bacchetta, rimuovendo poi il coagulo e trasfondendo il restante fluido.

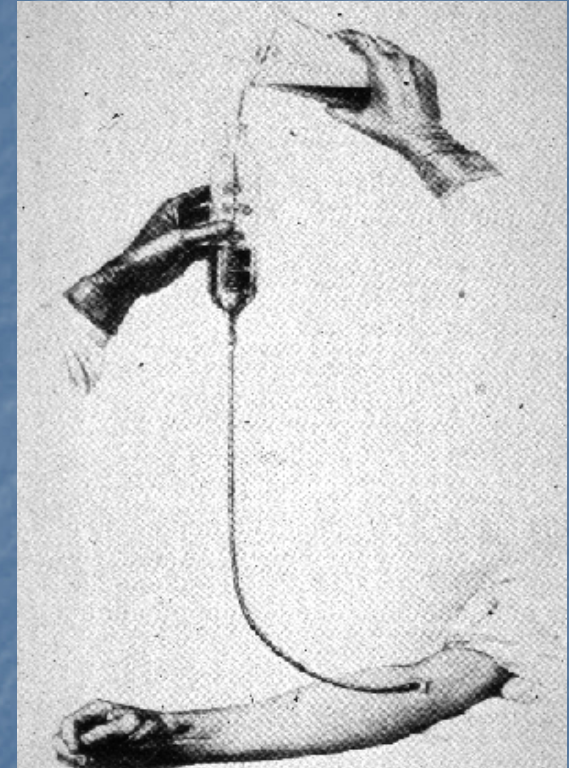
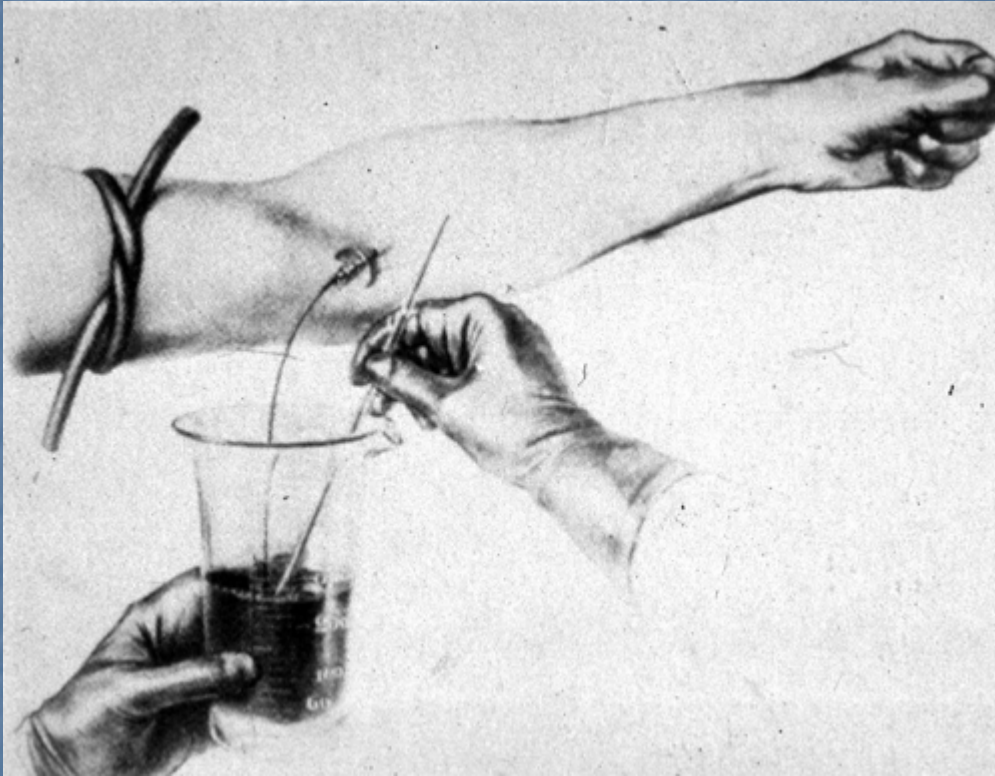
Neudorfer, nel 1860, propose il bicarbonato di sodio.

L'ostetrico Braxton Hicks utilizzò nel 1868, senza successo, il fosfato di sodio per la trasfusione di quattro sue pazienti.

Nel 1914 Lewisohn usò il citrato di sodio.

Richard Weil notò che il sangue citratato poteva essere conservato in frigorifero per qualche giorno.

Trasfusione secondo il Metodo di Lewisohn



Il sangue è raccolto in un recipiente con citrato.....e immediatamente trasfuso.

Conservazione

Proseguendo il lavoro di Lewisohn e Weil, Francis Rous e J. R. Turner introdussero una soluzione di sale- citrato-destrosio che permetteva la conservazione del sangue coagulato per alcuni giorni dopo la raccolta.

Questa miscela però diluiva parecchio il sangue, andava pertanto rimossa prima della trasfusione. (1:1 rapporto soluzione/sangue)

John F.Loutit e Patrick L. Mollison introdussero nel 1943 la soluzione ACD (acido citrico-citrato-destrosio) che permetteva di ridurre il volume della miscela anticoagulante consentendo così la trasfusione di volumi maggiori di sangue e una più lunga conservazione. (1:4 rapporto soluzione:sangue)

Il sistema fu adottato dall'Esercito nel 1945.

Nel 1940 Edwin Cohn sviluppa il frazionamento del plasma con etanolo a freddo: albumina, gamma globuline, fibrinogeno. (I feriti di Pearl Harbour sono trattati con albumina contro lo shock).



Figure 13.—Continued. C. Plasma being packed for issue.

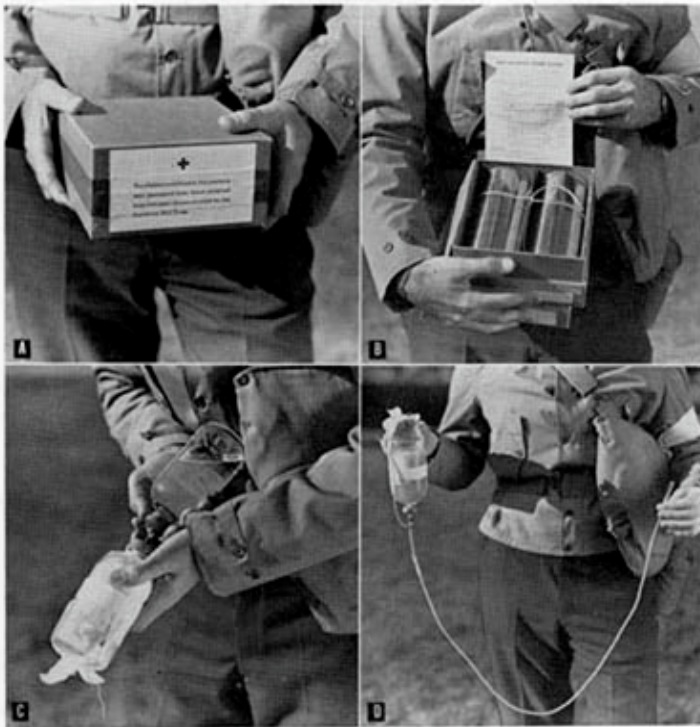


FIGURE 24.—Preparation for plasma transfusion. A. Army-Navy plasma package (250 cc.). B. Contents of package (dried plasma and sterile diluent). C. Reconstitution of plasma. D. Reconstituted plasma ready for injection.



Conservazione

L'ACD (ac. Citrico-sodio citrato-destrosio) fu soppiantato dal (CPD) citrato-fosfato-destrosio nel 1957, il CPD da CPD-A1 (citrato-fosfato-destrosio e adenina) intorno agli anni 80.

La refrigerazione ed una efficace conservazione resero possibile l'allestimento delle "banche del sangue".

Agenti crioprotettori, come il glicerolo, hanno permesso, dagli anni 60, il congelamento dei globuli rossi per una conservazione a lungo termine.

“ Banche del Sangue”

Negli anni 20-30 comparvero in Europa i primi Centri Trasfusionali e le prime associazioni di donatori.

In Italia, a Milano nel 1927 fu fondata l'AVIS, dal dott. Formentano.

Nel 1937 Bernard Fantus al Cook County Hospital di Chicago, fondò la prima Blood Bank degli Stati Uniti.

In Italia, i Centri Trasfusionali si svilupparono, per quanto in modo non coordinato, negli anni 50-60.

La prima legge organica sul Servizio Trasfusionale in Italia fu la n°592 del 1967 e i successivi regolamenti applicativi, del 1971 (attuale n°219 del 2005)

Sacche di Plastica

Per tutta la prima metà del 20° secolo il sangue veniva raccolto in flaconi di vetro, riutilizzabili. Si trasfondeva Sangue Intero. Non rare erano le reazioni da pirogeni per contaminazione dovuta a non completo lavaggio; così pure le embolie dovute al sistema sottovuoto usato per i flaconi.

Negli anni 70 sono state introdotte, per la raccolta di sangue, le sacche di plastica, anche se le prime prove sono state effettuate dalla Croce Rossa Americana nel 1949.

Le sacche di plastica, monouso, grazie alla loro flessibilità hanno facilitato la separazione dei componenti del sangue, portando alla terapia con emocomponenti.

Principali Emocomponenti

Plasma

Eritrociti

Piastrine



Con ogni unità di sangue si possono trattare più persone

Cambiamenti nel tempo

Obbligatorietà dei test di screening sulle unità donate

- Hep B + VDRL 1972
- HIV 1985
- Hep C 1990
- HIV1+HIV2 1993
- HIV p24 Ag 2001
- NAT 2002
- WNV 2009

All'introduzione di ciascun test ha corrisposto la riduzione del Rischio Totale

Problemi legati al sangue umano

- Incompatibilità immunologica
- Trasmissione malattie (virus, protozoi ecc)
- Contaminazione batterica
- Limiti di conservazione
- Limiti di approvvigionamento

Requisiti per un sostituto dei globuli rossi

- Efficiente scambio gassoso
- Non necessita di compatibilità immunologica
- Preparazioni sterili (“farmaci”)
- Minimi effetti collaterali
- Semplice e durevole conservabilità
- Facile trasporto
- Disponibilità “illimitata”

Candidati sostituti dei globuli rossi ("sangue artificiale")

- Perfluorocarbonati (PFC)
- Emoglobina (animale o umana ; libera o coniugata)
- Conversione Enzimatica
- Cellule Staminali (cell factory-blood pharming)

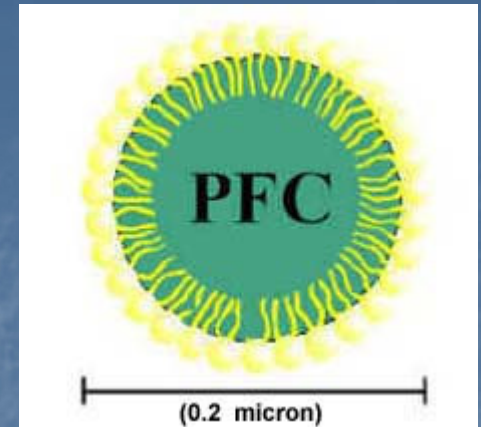
- Nanotecnologie

PERFLUOROCARBONATI

I PFC sono una classe di piccole molecole totalmente sintetiche derivate dagli idrocarburi, dove gli atomi di idrogeno sono sostituiti da atomi di fluoro

PRO

- Totalmente sintetici: si possono produrre in larga scala e a bassi prezzi
- Privi di rischi infettivi
- Lunga conservazione (+ di 2 anni)
- Non richiedono cross-matching
- Immediata disponibilità al trasporto di ossigeno
- Teorica maggiore capacità di cedere ossigeno ai tessuti, per le minori dimensioni delle particelle che consentono loro di attraversare più agevolmente il microcircolo e i tratti arteriosi stenotici



PERFLUOROCARBONATI

CONTRO

- I PFC richiedono un'un'alta Frazione inspiratoria di ossigeno (FiO_2) per trasportare O_2 adeguatamente ai tessuti; sono pertanto utilizzabili solo per brevi periodi di tempo ed in aree dove il supporto supplementare di O_2 è disponibile.
- Possono essere inefficaci in presenza di ARDS
- Hanno una breve emivita plasmatica (<4 ore)
- Tendono ad "intasare" il sistema reticolo-endoteliale

Perfluorocarbonati



Fluosol-DA™



Oxygen™



Perftoran™

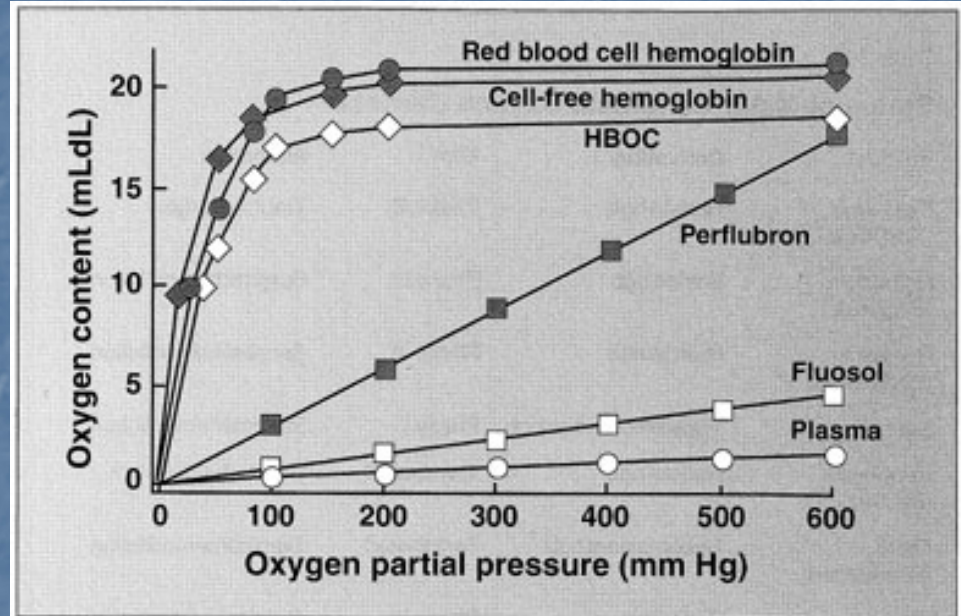
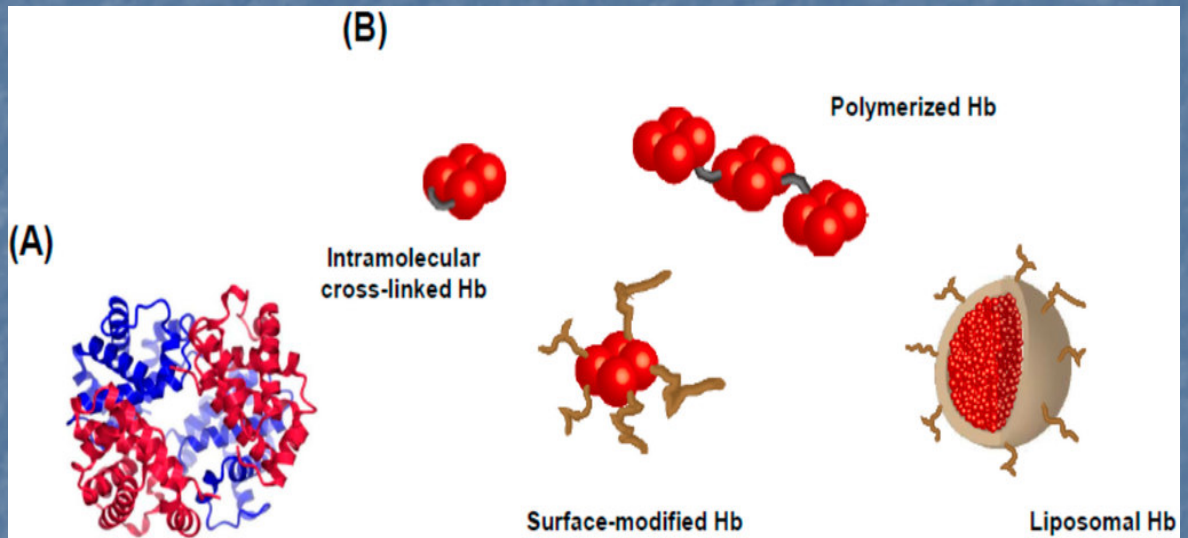
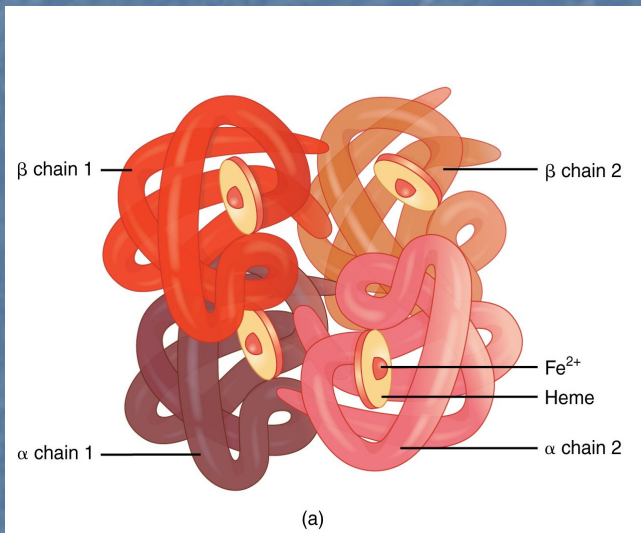


Figure 1: Oxygen Solubility/Dissociation Curves for Oxygen Carrier Classes—The schema represents blood (red blood cell hemoglobin), free hemoglobin, engineered hemoglobin-based oxygen (O_2) carrier, and two perfluorochemical emulsions (Perflubron, Fluosol). Small changes in oxygen (partial pressure in the ranges of low tissue pO_2 , mixed venous pO_2 (40 mm Hg) and arterial pO_2 (100 mm Hg) result in large changes in the amount of O_2 bound or released. In contrast, perfluorochemicals dissolve O_2 in a linear fashion and require high pO_2 (supplemental O_2) to carry clinically relevant amounts of O_2 . HBOC = hemoglobin-based oxygen carrier.

Sviluppo dei Perfluorocarbonati (PFC)

- Tra i PFC di prima generazione il Fluosol-DA™ nel 1989 e fu approvato dalla FDA Americana per l'utilizzo nell'uomo ma poco dopo ritirato per gli scarsi benefici e lo sviluppo di sintomi simil-influenzali.
- Della seconda generazione fanno parte l'Oxyfluor™ e l'Oxygent™ entrambi con maggiore affinità lipidica. L'Oxyfluor™ è stato abbandonato dopo i primi trials clinici per gravi effetti secondari e l'Oxygent™ per l'incremento dell'incidenza di incidenti vascolari.
- Il Perftoran™ e il PHER-O2™ sono PFC di terza generazione. Sono state riportate complicanze polmonari con l'uso del Perftoran™ mentre il PHER-O2™ è ancora in fase di studio. (Modery et al., 2013)

Hemoglobin Based Oxygen Carriers



Alla ricerca di un'alternativa ai PFC sono stati fatti notevoli sforzi nello sviluppo di un meccanismo in grado di imitare il ruolo dell'emoglobina nel trasporto di ossigeno nel corpo (HBOCs- Hemoglobin Based Oxygen Carriers).

HBOCs

- Il primo studio clinico con emoglobina libera mostrò elevata nefrotossicità. L'emoglobina utilizzata conteneva lipidi della membrana stromale degli eritrociti ed anche endotossine batteriche.
- Per superare questi problemi fu sviluppato un prodotto a base di emoglobina libera priva di stromi; sorsero però ulteriori problemi:
 - Brevissima emivita intravascolare
 - Elevatissima affinità per l'Ossigeno
- Grazie allo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante sono state prodotte emoglobine umane ricombinanti, nell'E.Coli. Questi prodotti sono stati sviluppati fino ad arrivare ai trials clinici che però sono stati interrotti per la comparsa di vasocostrizione marcata oltre ad altri gravi effetti collaterali.

Table 5. Current developmental status of HBOCs

Product type	Product name	Developer	Source and /or technology	Status
Cross-linked Hb	HemAssist™	Baxter (USA)	$\alpha\alpha$ cross-linked human Hb	Discontinued
	Optro (rHb)™	Somatogen (USA)	Recombinant Hb	Discontinued
Polymerized Hb	PolyHeme™	Northfield Lab (USA)	Glutaraldehyde, pyridoxal human Hb	Discontinued
	Hemopure™	Biopure (USA)	Glutaraldehyde bovine Hb	Approved *
Conjugated Hb	Hemospan™	Sangart (USA)	Maleimide PEG-human Hb	Discontinued
	PEG-Hb™	Enzon (USA)	PEG conjugated bovine Hb	Discontinued
	PHP™	Apex (USA)	Polyoxyethylene-conjugated human Hb	Discontinued

* Approved in South Africa for perioperative anemia; approved in USA and Europe for veterinary use under the name 'Oxyglobin'.

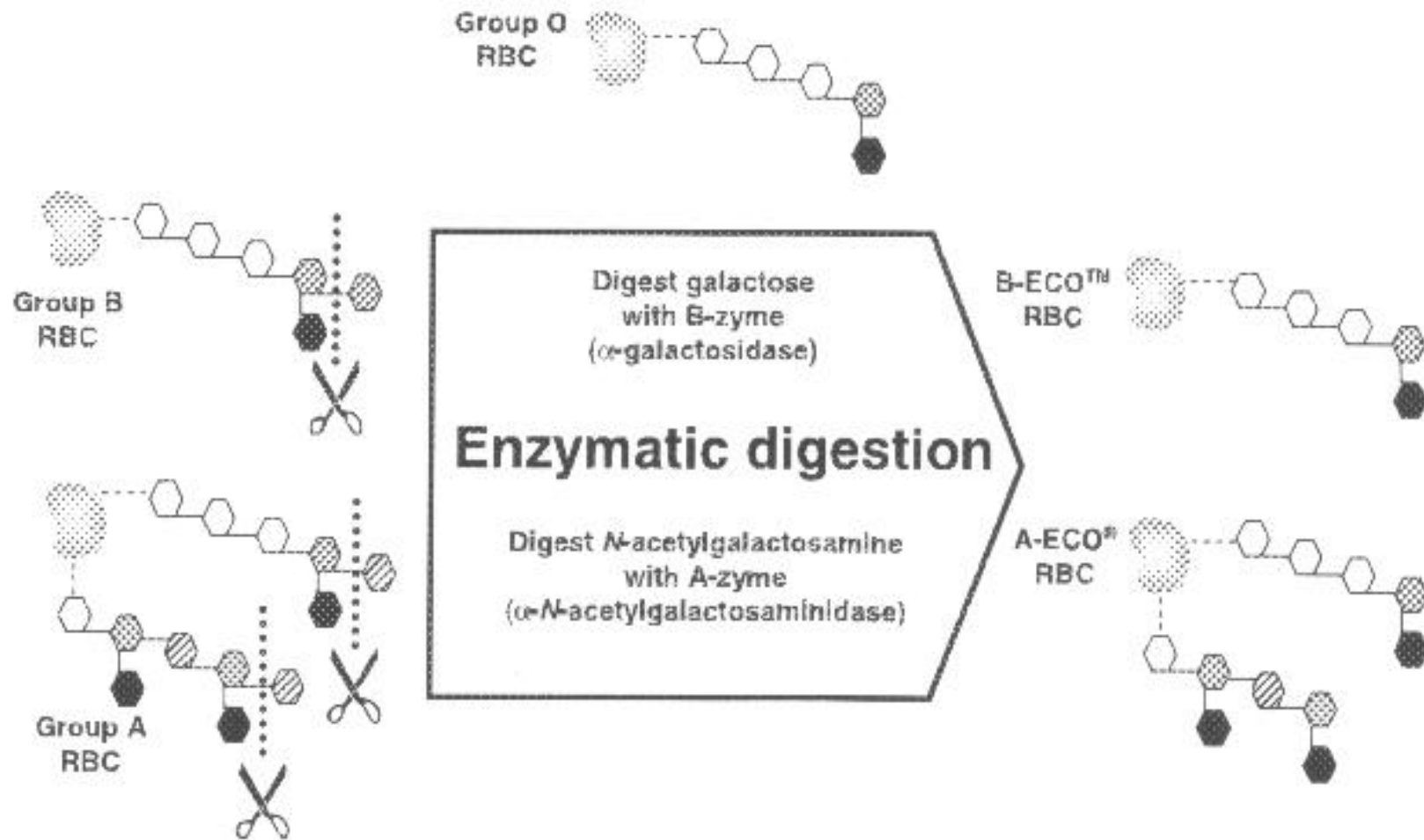
(Tao and Ghoroghchian, 2014)

Conversione Enzimatica

La rimozione enzimatica

Gli studi per ottenere emazie di gruppo O, mediante rimozione enzimatica degli antigeni A e B, sono in corso da circa 25 anni. La strategia consiste nel convertire emazie A e B in emazie O (*Erythrocyte Conversion in O*, ECO) rimuovendo i rispettivi monosaccaridi terminali immunodominanti (A Acetil galattosammina e Galattosio) mediante appropriate esoglicosidasi di origine non batterica.

La rimozione enzimatica



Cellule Staminali - Medicina Rigenerativa

Diversi filoni di ricerca:

- Riprogrammazione di fibroblasti della pelle umana facendoli diventare progenitori di cellule del sangue (*Nature* 468, 521-526, 25 Novembre 2010)
- Realizzazione di campioni di sangue partendo da cellule staminali provenienti da cordone ombelicale (progetto Bond Pharming finanziato dal Pentagono) ma per ottenere ogni unità di sangue serve un metro cubo di cultura cellulare!
- Studio dell'Istituto Superiore di Sanità in collaborazione con il Tisch Cancer Institute, Mount Sinai School of Medicine New York e il Centro Nazionale Sangue 'La fattibilità per la produzione industriale di eritroblasti umani per trasfusione'
- Progetto di ricerca diretto dal prof. Marc Turner dello Scottish National Blood Transfusion Service, UK; Roslin Cells Ltd., UK. con fondi della Wellcome-trust.

Marc Turner dello Scottish National Blood Transfusion Service di Edimburgo dichiara:

"Il problema con le cellule staminali adulte è che la loro capacità replicativa è limitato quindi è molto difficile immaginare come si possa arrivare fino a produzione su larga scala."

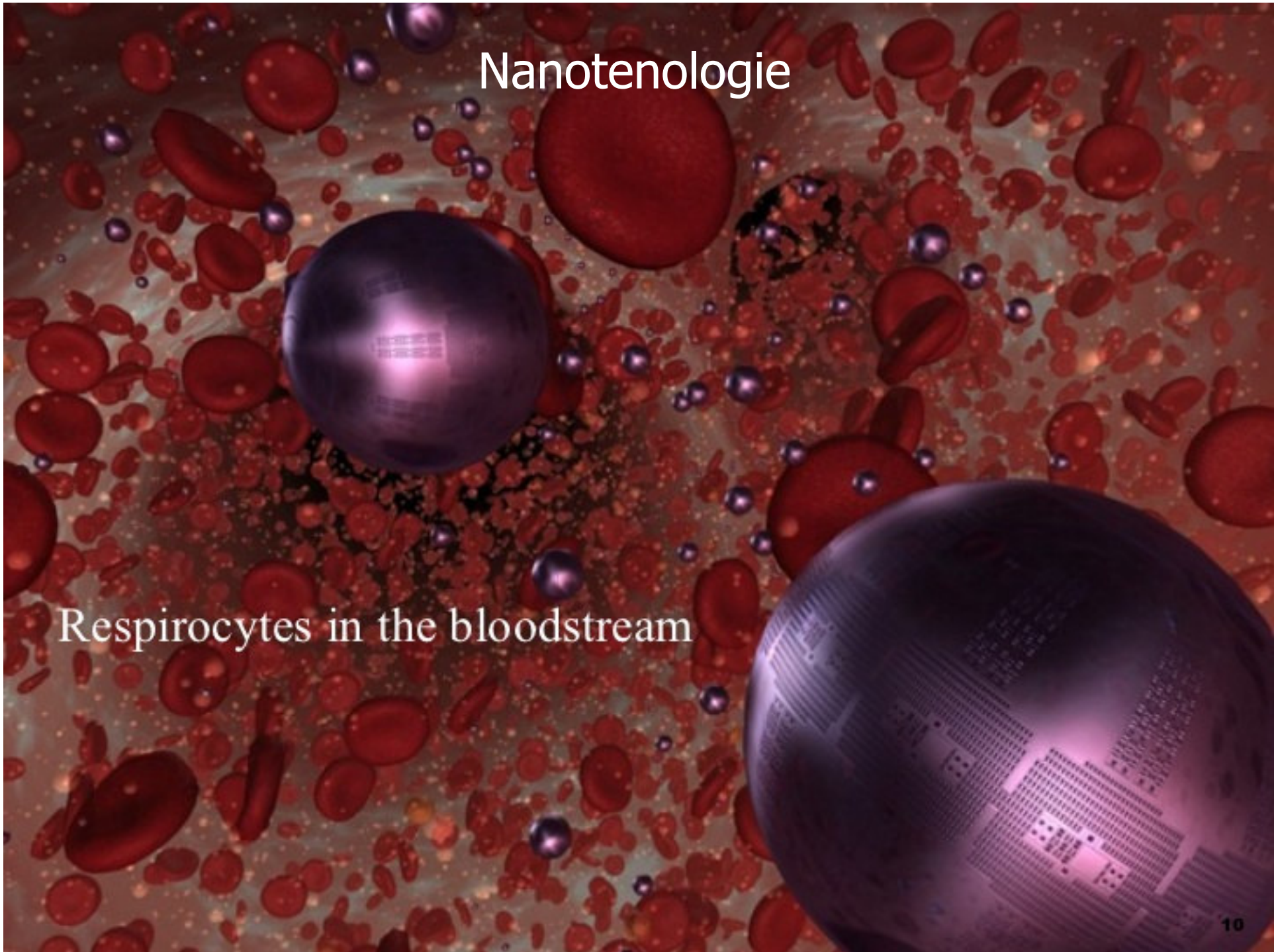
"Stiamo lavorando anche con cellule staminali embrionali pluripotenti che sono in grado, in cultura, di produrre cellule che sono simili, ma non ancora identiche, alle cellule del sangue umano."

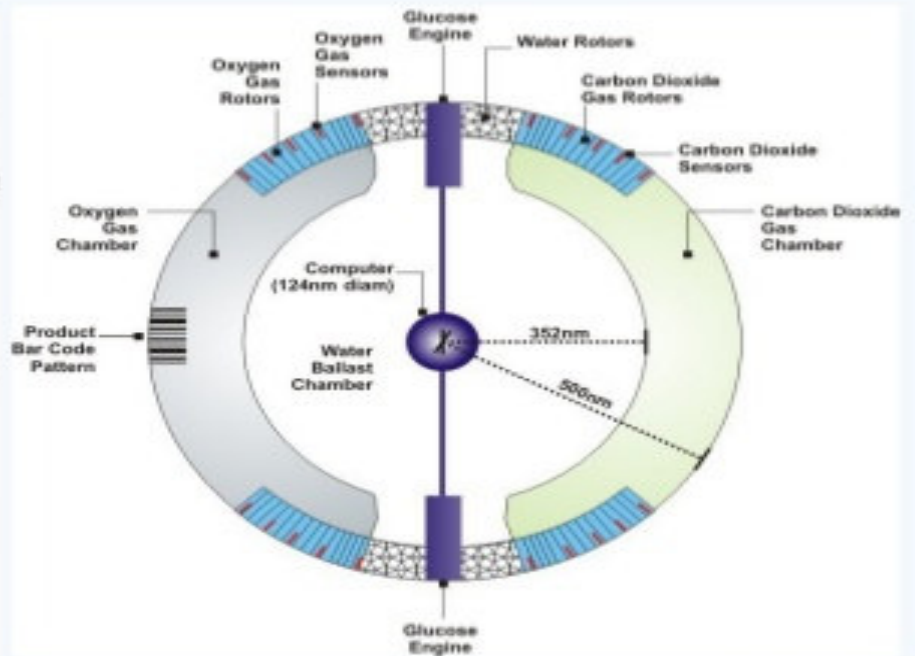
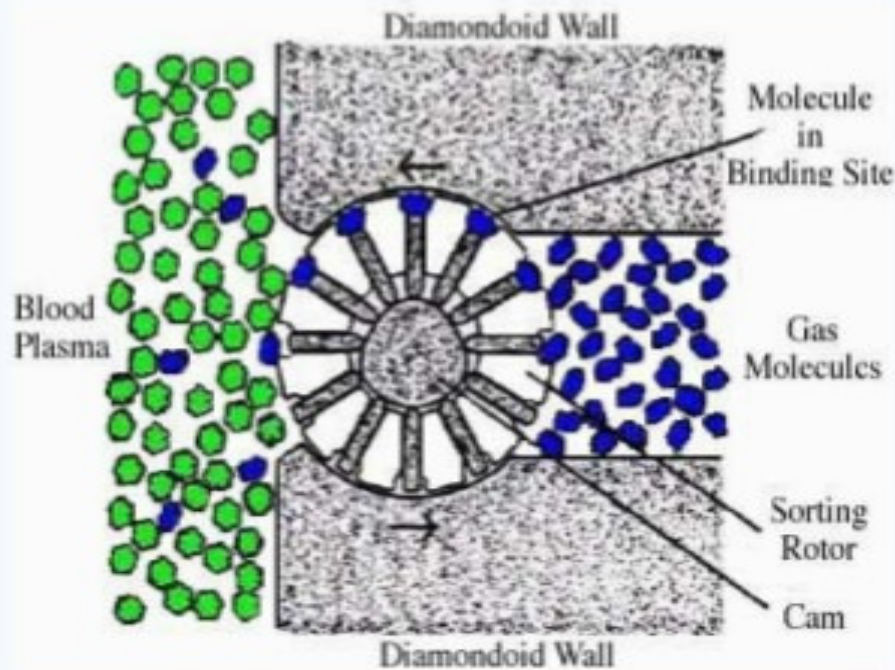
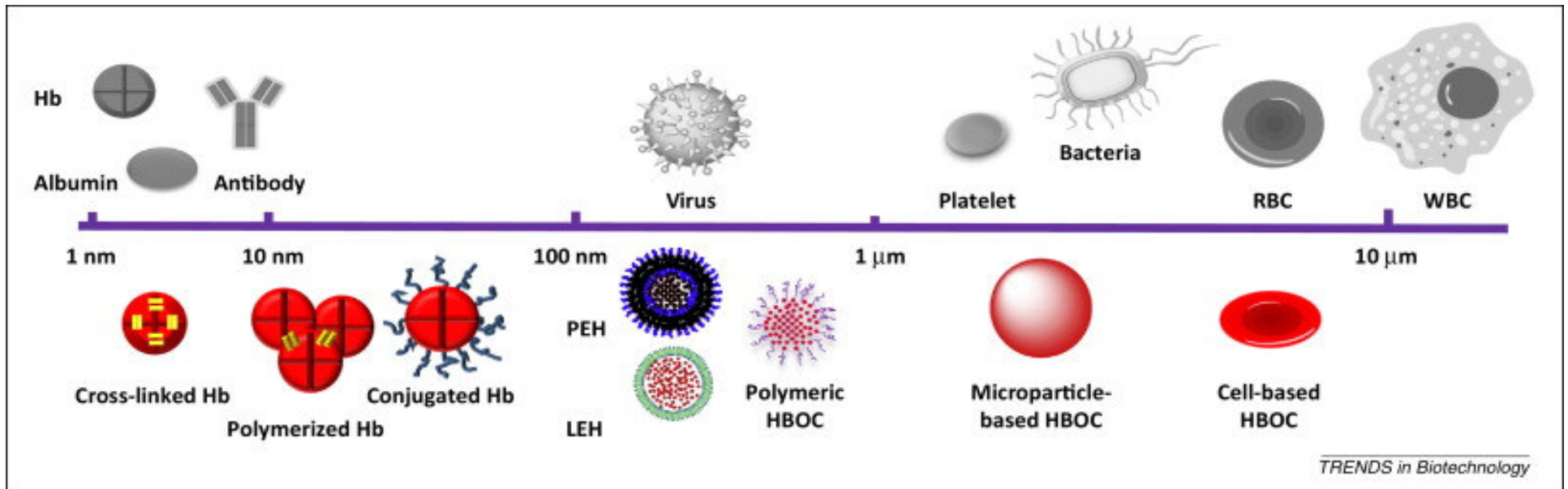
"Siamo a circa due anni nel programma di lavoro e ci sono ancora una serie di sfide tecniche che dobbiamo affrontare e superare."

"...la creazione di globuli rossi per i mercati della trasfusione del sangue rappresenta un'applicazione altamente innovativa della medicina rigenerativa con una prospettiva a medio termine per i primi studi clinici di 5-10 anni..." M.L.Turner N.Biotec. 32(1) 25 gennaio 2015 180-190

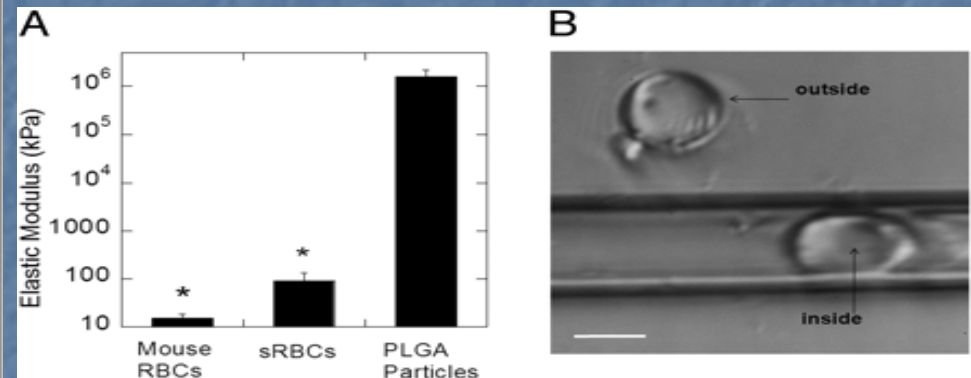
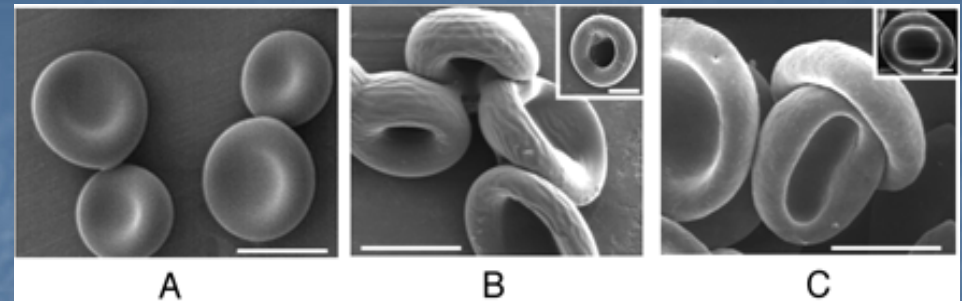
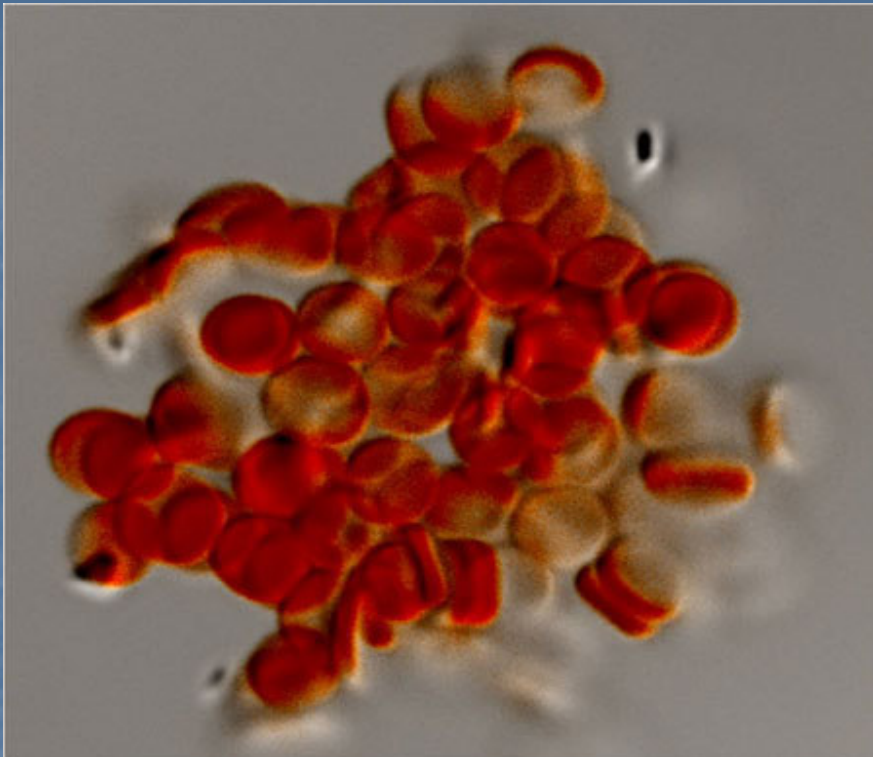
Nanotenologie

Respirocytes in the bloodstream





Nanotecnologie in Medicina



Particelle di idrogel estremamente flessibili che rassomigliano ai globuli rossi per dimensioni e forma. Ad oggi, i tentativi di creare copie dei globuli rossi efficienti sono stati limitati dal fatto che le particelle sintetiche tendono ad essere rapidamente eliminate dal circolo per la loro rigidità.

Nei test queste particelle flessibili rimanevano in circolo trenta volte più a lungo di quelle rigide.

(Image courtesy Timothy J. Merkel and Joseph M. DeSimone, University of North Carolina at Chapel Hill)

Sostituti delle piastrine

Sviluppati in epoca più recente rispetto ai sostituti dei globuli rossi e la loro sperimentazione è assai più limitata.

La sperimentazione clinica di questi prodotti nell'uomo non è ancora cominciata, mentre sono stati eseguiti studi preclinici in alcuni modelli animali.

I prodotti finora sviluppati sono:

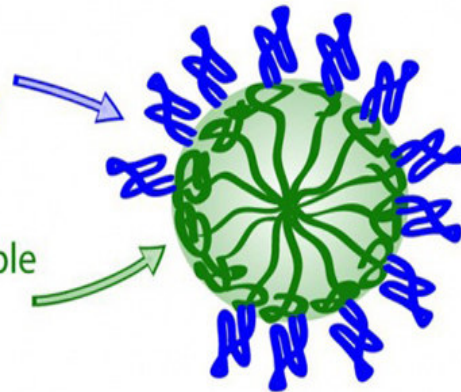
- ❖ membrane piastriniche con parziale funzionalità del complesso recettoriale delle glicoproteine Ib/IX/V
- ❖ Sintociti : microcapsule ricoperte (con legami chimici) di fibrinogeno.

Un gruppo di ricerca della Case Western Reserve University, in collaborazione con la Cleveland Clinic Foundation, diretto da A.S. Gupta, ha ricevuto un fondo di 1,9 ML \$ dal NIH per sviluppare piastrine artificiali iniettabili, in grado di bloccare il sanguinamento inserendosi nei punti di lesione endoteliale e di segnalare alle piastrine naturali di aderire ad essi.

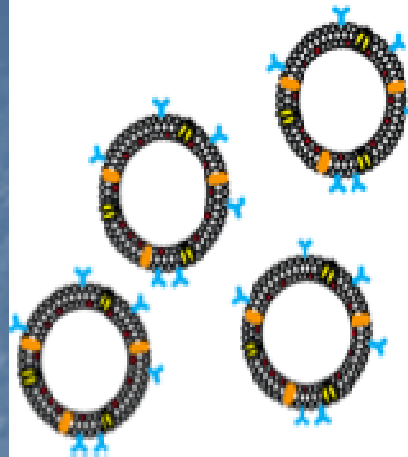
Anatomy of a platelet-like particle

Fibrin protofibril binding nanobody

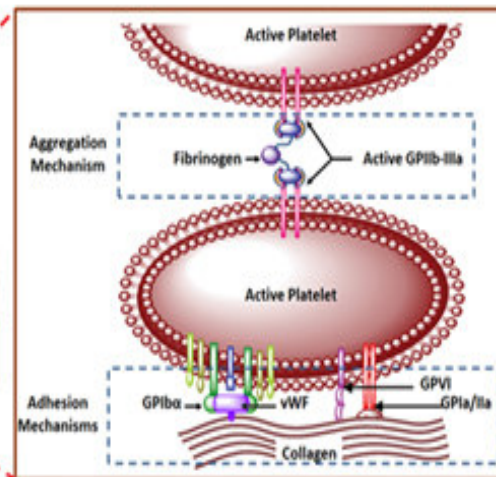
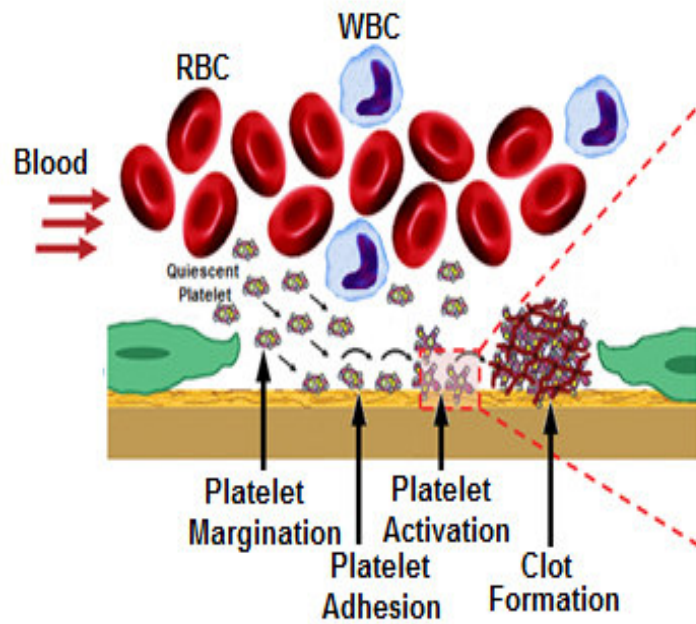
Uniquely deformable μ -gel



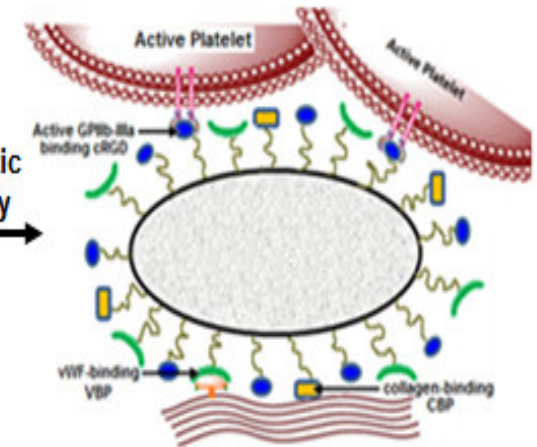
Artificial platelets



Natural platelets



Synthetic Mimicry



Artificial Platelet mimicking the adhesive and aggregatory mechanisms of natural platelets

Conclusioni (I)

Il sangue, in quanto prodotto biologico,
non potrà mai essere
assolutamente privo di rischi.

Poichè però, al momento, sono disponibili
poche forme di terapie alternative all'utilizzo
di sangue e derivati omologhi, non rimane che
fare di questi un utilizzo oculato e imparare a
conoscere e curare le numerose complicanze,
soprattutto quelle potenzialmente mortali.

CONCLUSIONI (II)

Queste considerazioni sottolineano quindi l'estrema importanza di non rallentare l'impegno a sostenere e sviluppare i programmi di donazione del sangue, che rappresentano e rappresenteranno ancora per molti anni, un cardine insostituibile per il trattamento di molte malattie. Contemporaneamente, è necessario informare adeguatamente i pazienti sull'eccellente livello di sicurezza degli emocomponenti attualmente utilizzati per la terapia trasfusionale, dato che la mancata percezione di tale sicurezza per molti rappresenta tuttora un elemento di grave e non giustificata preoccupazione. (P.Rebulla)