



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
“ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ”**

Διπλωματική Εργασία με Θέμα:

**«Μετα-μεταγγισιακές συνέπειες της αποθηκευτικής βλάβης του
ερυθροκυττάρου»**



Αναστασιάδη Αλκμήνη, Βιολόγος

ΑΜ: 41604

Επιβλέπουσα Διπλωματικής Εργασίας: Μαριάννα Χ. Αντωνέλου, Επίκουρη Καθηγήτρια,
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Αθήνα, 2019



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
**Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών**
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
“ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ”**

Διπλωματική Εργασία με Θέμα:

**«Μετα-μεταγγισιακές συνέπειες της αποθηκευτικής βλάβης του
ερυθροκυττάρου»**

Αναστασιάδη Αλκμήνη, Βιολόγος

ΑΜ: 41604

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή (Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ):

Μαριάννα Χ. Αντωνέλου, Επίκουρη Καθηγήτρια (επιβλέπουσα)

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη, Καθηγήτρια

Παναγούλα Δ. Κόλλια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Τόπος Διεξαγωγής της Έρευνας:

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών,
ΕΚΠΑ

Αθήνα, 2019

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας κ. Μαρίας Χ. Αντωνέλου στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική».

Θα ήθελα πρώτα απ' όλα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου, Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μαρίας Χ. Αντωνέλου, για την ευκαιρία που μου έχει δώσει τα τελευταία τέσσερα χρόνια να είμαι ενεργό μέλος της εργαστηριακής της ομάδας και να εργάζομαι πάνω σε αυτό που αγαπώ. Ευχαριστώ για όλα όσα έμαθα δίπλα της, για την εμπιστοσύνη και ενθάρρυνση που μου δείχνει καθημερινά και για τις συμβουλές που μου έχει δώσει μέσα σ' αυτά τα χρόνια. Χάρη στις διαλέξεις της αγάπησα προπτυχιακά το κομμάτι της βιολογίας του ερυθροκυττάρου και είμαι ευγνώμων που μου επέτρεψε να προχωρήσω στη μελέτη του συγκεκριμένου ερευνητικού αντικειμένου.

Ευχαριστώ πολύ την Καθηγήτρια και Πρόεδρο του Τμήματος κ. Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη που ήταν επίσης όλα αυτά τα χρόνια διαθέσιμη να με συμβουλέψει και να με ενθαρρύνει. Την ευχαριστώ, επίσης, όπως και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Παναγούλα Δ. Κόλλια, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της παρούσας εργασίας.

Θέλω επιπλέον να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και Διευθυντή του Τομέα μας, κ. Ιωάννη Π. Τρουγκάκο για τη φιλοξενία στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στον κ. Αναστάσιο Γ. Κριεμπάρδη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, που μας φιλοξένησε στο εργαστήριό του όπου και διεξήχθησαν ορισμένες πειραματικές διαδικασίες και παρείχε τα δείγματα χωρίς τα οποία θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Θα ήταν τεράστια παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον μεταδιδάκτορα ερευνητή του εργαστηρίου μας, Δρ. Βασίλη Τζούνακα. Είναι ο άνθρωπος που με υπομονή και εμπιστοσύνη με δίδαξε ό,τι γνωρίζω στον «πάγκο» και δίπλα του έχει αναπτυχθεί η επιστημονική μου κρίση και σκέψη. Υπήρξε πάντα πρόθυμος να απαντήσει στις απορίες μου, να κατευθύνει το άγχος μου και να λάβει υπόψη κάθε ιδέα μου σχετική με την έρευνά μας. Τον ευχαριστώ, όπως και τον υποψήφιο διδάκτορα και φίλο μου Δημήτρη Καραδήμα, για το όμορφο κλίμα που επικρατεί στο εργαστήριό μας και που μαζί τους η καθημερινή εργαστηριακή «ρουτίνα» είναι ιδιαίτερα ευχάριστη. Δε θα μπορούσα να φανταστώ καλύτερους lab partners.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές με τους οποίους συνεργάστηκα στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου διπλωματικής, όπως και όλο το προσωπικό του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής για το συνολικό θετικό κλίμα που επικρατεί.

Δε θα μπορούσα να φτάσω ως εδώ χωρίς τη στήριξη και την αγάπη της οικογένειάς μου, και κυρίως των γονιών μου Τιμόθεου και Μυρτώ. Είμαι απίστευτα ευγνώμων σε αυτούς για την ενθάρρυνσή τους στο να προχωρήσω τις σπουδές μου και για την πίστη τους στις δυνατότητές μου.

Τέλος, ευχαριστώ τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ) και το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ), καθώς μέρος της διπλωματικής μου εργασίας χρηματοδοτήθηκε από το ερευνητικό πρόγραμμα «Αποθηκευτική ικανότητα και μεταγγισιακή επάρκεια ερυθροκυττάρων από ετερόζυγους φορείς β-μεσογειακής αναιμίας», με κωδικό έργου #2032.

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	3
A. Εισαγωγή	6
A1. Αίμα	6
A1.1 Γενικά Στοιχεία.....	6
A1.2 Πλάσμα	7
A1.3 Έμμορφα Συστατικά	7
A2. Ερυθροποίηση	9
A2.1 Πρώιμη Ερυθροποίηση	9
A2.2 Τελική Ερυθροειδική Διαφοροποίηση	10
A2.3 Ωρίμανση Δικτυοερυθροκυττάρου.....	10
A3. Ερυθροκυτταρική Μεμβράνη και Κυτταροσκελετός	11
A3.1 Λιπιδική Διπλοστιβάδα	11
A3.2 Πρωτεΐνες Ερυθροκυτταρικής Μεμβράνης	12
A3.3 Λιπιδικές Σχεδίες	15
A3.4 Κυτταροσκελετός	15
A3.5 Σύμπλοκα Ερυθροκυτταρικής Μεμβράνης	16
A4. Μεταβολισμός Ερυθροκυττάρου.....	18
A4.1 Μεταβολισμός Γλυκόζης	18
A4.2 Ρύθμιση Μεταβολισμού Γλυκόζης.....	18
A4.3 Μεταβολισμός Ελεύθερων Δραστικών Ριζών	19
A5. Ερυθροκυτταρική Γήρανση	20
A5.1 Μικροκυστιδιοποίηση.....	21
A5.2 Οξειδωτικό στρες.....	21
A5.3 Μονοπάτι Συσχετιζόμενο με τη Ζώνη 3.....	21
A5.4 Εξωτερική Φωσφατιδυλοσερίνης	23
A5.5 Μονοπάτι Συσχετιζόμενο με το CD47	23
A6. Ερυθρόπτωση.....	23
A7. Αποθήκευση και Αποθηκευτική Βλάβη Ερυθροκυττάρων.....	24
A7.1 Συνθήκες Αποθήκευσης	25
A7.2 Αποθηκευτική Βλάβη	25
A7.3 Δείκτες Γήρανσης Αποθηκευμένων Ερυθροκυττάρων	26
A8. Παράγοντες που Επηρεάζουν την Ποιότητα και Αποδοτικότητα των Αποθηκευμένων Ερυθροκυττάρων.....	27
A8.1 Επίδραση Εγγενών Χαρακτηριστικών του Δότη.....	27
A8.2 Ποικιλομορφία των Χαρακτηριστικών του Δέκτη	30
Σκοπός	30
B. Υλικά και Μέθοδοι.....	31

B1. Όργανα και Αντιδραστήρια	31
B1.1 Συσκευές και Όργανα	31
B1.2 Χημικά Αντιδραστήρια	31
B1.3 Kit Εμπορίου	31
B1.4 Αναλώσιμα	31
B2. Εργαστηριακές Μέθοδοι.....	32
B2.1 Μέτρηση Ελεύθερης Αιμοσφαιρίνης.....	32
B2.2 Οσμωτική Ευθραυστότητα Ερυθροκυττάρων.....	32
B2.3 Μηχανική Ευθραυστότητα Ερυθροκυττάρων	32
B2.4 Μέτρηση Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας Πλάσματος	33
B2.5 Επίπεδα Δραστικών Ριζών Οξυγόνου.....	33
B2.6 Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης	34
B2.7 Επίπεδα Μονοξειδίου του Αζώτου	34
B2.8 Ποσοτικοποίηση Κλαστερίνης.....	34
B2.9 Έλεγχος Επιπέδων Καρβονυλιωμένων Πρωτεϊνών	35
B2.10 Πειράματα Ανασύστασης.....	35
B3. Στατιστική Ανάλυση – Ανάλυση Δικτύων	35
Γ. Αποτελέσματα.....	37
Γ1. Επίδραση Θερμοκρασίας και Πλάσματος στις Ιδιότητες Ερυθροκυττάρων Διαφορετικής Ηλικίας Αποθήκευσης 24 Ώρες μετά την Ανασύσταση με Φυσιολογικό Πλάσμα σε <i>in vitro</i> Μοντέλο Μετάγγισης	37
Γ1.1 Επίδραση Προσομοίωσης Συνθηκών Μετάγγισης (θερμοκρασία και πλάσμα).....	37
Γ1.2 Επίδραση Παραγόντων Πλάσματος	40
Γ2. Επίδραση Θερμοκρασίας και Πλάσματος στις Ιδιότητες Ερυθροκυττάρων Διαφορετικής Ηλικίας Αποθήκευσης μετά από Αυξανόμενη Διάρκεια Ανασύστασης με Φυσιολογικό Πλάσμα σε <i>in vitro</i> Μοντέλο Μετάγγισης	43
Γ3. Συγκριτική Μελέτη Αιματολογικών και Βιοχημικών Χαρακτηριστικών Τακτικών Αιμοδοτών με ή χωρίς Ετερόζυγη β-Μεσογειακή Αναιμία.....	50
Δ. Συζήτηση.....	54
Δ1. Πειράματα Ανασύστασης με Χρήση <i>in vitro</i> Μοντέλου Μετάγγισης.....	54
Δ1.1 Παράμετροι που Σχετίζονται με την Αιμόλυση	54
Δ1.2 Οξειδωτικές Παράμετροι	56
Δ1.3 Σύνοψη Παρατηρήσεων.....	57
Δ2. Αιματολογικά και Βιοχημικά Χαρακτηριστικά σε Αιμοδοτές με ή Χωρίς Ετεροζυγωτία σε β-MA58	
Βιβλιογραφία.....	59
Περίληψη	72
Abstract	74

A1.2 Πλάσμα

Όπως τα υπόλοιπα βιολογικά υγρά, έτσι και το πλάσμα αποτελείται κυρίως από νερό. Συγκεκριμένα, περίπου το 92% του πλάσματος είναι νερό. Ένα σύνολο ουσιών είναι διαλυμένες σε αυτό, η πλειοψηφία των οποίων είναι πρωτεΐνες. Στο πλάσμα υπάρχουν επίσης διάφοροι ηλεκτρολύτες (ιόντα ασβεστίου, νατρίου και καλίου), διαλυμένα αέρια (οξυγόνο, άζωτο και διοξείδιο του άνθρακα), οργανικά θρεπτικά συστατικά (βιταμίνες, γλυκόζη, λιπίδια) και μεταβολικά απόβλητα (Betts 2013).

Οι πρωτεΐνες του πλάσματος μπορεί να ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες. Υπάρχουν οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από άλλους ιστούς και δρουν στο πλάσμα (αλβουμίνη), οι ανοσοσφαιρίνες, διάφοροι προσδότες υποδοχέων (ορμόνες, κυτταροκίνες), πρωτεΐνες που διέρχονται από το πλάσμα αλλά δρουν αλλού (λυσοσωμικές πρωτεΐνες), προϊόντα διαρροής ιστών (μυοσφαιρίνη), μη φυσιολογικά εκκρινόμενες πρωτεΐνες (καρκινικοί δείκτες) και ξένες πρωτεΐνες (από παθογόνους μικροοργανισμούς) (Anderson and Anderson 2002). Η πρωτεΐνη με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο πλάσμα είναι η αλβουμίνη, η οποία παράγεται στο ήπαρ και μπορεί να δεσμεύσει διάφορα ιόντα, ορμόνες και λιπαρά οξέα. Η βασική της λειτουργία είναι η ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης του αίματος (Rozga et al. 2013). Άλλες σημαντικές πρωτεΐνες του πλάσματος είναι οι σφαιρίνες, με γνωστότερες τις γ-σφαιρίνες που παράγονται από τα πλασματοκύτταρα και συμβάλλουν στην άμυνα του οργανισμού, αλλά και το ινωδογόνο, το οποίο παράγεται από το ήπαρ και συμμετέχει στην πήξη του αίματος (Vander 2001).

Το ανθρώπινο πλάσμα εμφανίζει αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς περιέχει ένα δίκτυο υδατοδιαλυτών και λιποδιαλυτών μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών ουσιών. Κάποια από τα κύρια υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά του πλάσματος είναι το ουρικό και το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) ενώ τα καρτενοειδή και η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) αποτελούν χαρακτηριστικούς εκπροσώπους της δεύτερης κατηγορίας αντιοξειδωτικών (Yeum et al. 2004). Το ουρικό οξύ, το τελικό παράγωγο της αποικοδόμησης των πουρινών στους ανθρώπους, είναι κατά μέσο όρο υπεύθυνο για το 60% της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Becker 1993). Αυτό το καταφέρνει όντας σημαντικός αρωγός στην εκκαθάριση μοριακού οξυγόνου (O_2), υπεροξυλικών ριζών ($RO\cdot_2$) και υδροξυλικών ριζών ($\cdot OH$) (Sautin and Johnson 2008). Το ασκορβικό οξύ προσλαμβάνεται αποκλειστικά μέσω της τροφής, τόσο αυτούσιο, όσο και ως αφυδροασκορβικό οξύ, εισέρχεται στο ερυθροκύτταρο μέσω του μεταφορέα γλυκόζης Glut-1 (Sage and Carruthers 2014) και συμμετέχει στην εκκαθάριση δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) (Padayatty and Levine 2016). Η α-τοκοφερόλη είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη που προστατεύει τα λιπίδια από οξείδωση μέσω της απομάκρυνσης των ROS (Liebler et al. 1996). Μια άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος που χαρακτηρίζεται ως εξωκυττάριο αντιοξειδωτικό είναι η αλβουμίνη, η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύει διάφορους τύπους μορίων (Peters 1995). Η σύνδεση ιόντων Cu και Fe σε αυτή, αποτρέπει τη συμμετοχή των συγκεκριμένων ιόντων στην αντίδραση Fenton και επομένως μειώνει την παραγωγή δραστικών υδροξυλικών ριζών (Roche et al. 2008).

A1.3 Έμμορφα Συστατικά

A1.3.1 Λευκά Αιμοσφαίρια

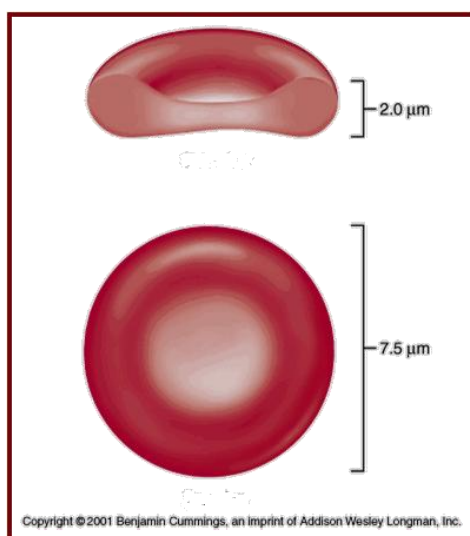
Τα λευκά αιμοσφαίρια παίζουν ρόλο στην άμυνα του οργανισμού έναντι παθογόνων μικροοργανισμών αλλά και καρκινικών κυττάρων. Είναι τα μόνα από τα έμμορφα συστατικά που είναι κλασσικά κύτταρα (με πυρήνα και οργανίδια). Βάσει της μορφολογίας τους μπορούν να ταξινομηθούν σε κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα) και ακοκκιοκύτταρα (μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα). Τα μονοκύτταρα ωριμάζουν σε μακροφάγα τα οποία έχουν την ιδιότητα της φαγοκυττάρωσης, ενώ στα λεμφοκύτταρα ανήκουν τα T και B λεμφοκύτταρα και τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK cells). Ο χρόνος ζωής τους είναι πολύ μικρός, καθώς πέραν των κυττάρων μνήμης που παράγονται από τα B και T λεμφοκύτταρα και διατηρούνται για χρόνια, τα υπόλοιπα ζουν για κάποιες ώρες ή μέρες.

A1.3.2 Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια δεν είναι τυπικά κύτταρα, αλλά θραύσματα των μεγακαρυοκυττάρων, τα οποία προέρχονται από την μυελοειδή σειρά αρχέγονων πολυδύναμων κυττάρων. Είναι πολύ μικρά σε μέγεθος αλλά υπάρχουν σε αφθονία στο αίμα. Ένα μεγάλο ποσοστό των αιμοπεταλίων αποθηκεύονται για μελλοντική χρήση στο σπλήνα μετά την είσοδό τους στην κυκλοφορία. Είναι πολύ σημαντικός ο ρόλος τους στην αιμόσταση και επιπλέον εκκρίνουν αρκετούς παράγοντες ανάπτυξης που σχετίζονται με την επιδιόρθωση κατεστραμμένου ιστού. Ζουν για λίγο χρόνο στο αίμα (10 ημέρες) και στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα (Betts 2013).

A1.3.3 Ερυθροκύτταρα

Τα ερυθροκύτταρα (γνωστά και ως ερυθρά αιμοσφαίρια) αποτελούν με διαφορά το πιο άφθονο έμμορφο συστατικό του αίματος. Όλα τα υγιή ερυθροκύτταρα των θηλαστικών είναι απύρρηνα και παρουσιάζουν χαρακτηριστικό σχήμα αμφίκοιλου δίσκου όταν δεν υπόκεινται σε στρες. Τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα επιβιώνουν στον οργανισμό για περίπου 120 ημέρες. Η διάμετρός τους κυμαίνεται μεταξύ 7,5-8,7μm και το πάχος τους μεταξύ 1,7-2,2μm. Το ιδιαίτερο αυτό σχήμα προσδίδει υψηλή αναλογία επιφανείας προς όγκο, κάτι που διευκολύνει την ελαστική παραμόρφωση που υφίστανται όταν διέρχονται από τα μικρής διαμέτρου τριχοειδή αγγεία, καθώς και την άμεση επαναφορά στο αρχικό τους σχήμα (Diez-Silva et al. 2010). Η ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης και η αντοχή του ερυθροκυττάρου σε μηχανικό στρες εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και τη σύνδεσή της με τον κυτταροσκελετό (Pretorius 2013). Στην **Εικόνα 2** παρουσιάζεται σχηματικά η χαρακτηριστική μορφή του ερυθροκυττάρου.

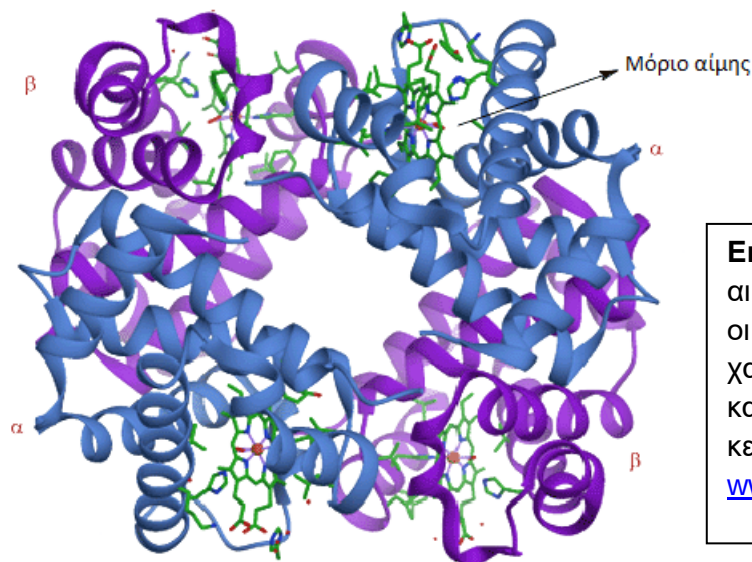


Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του χαρακτηριστικού σχήματος αμφίκοιλου δίσκου του ερυθροκυττάρου. Σημειώνονται επιπλέον το μέσο πάχος και η μέση διάμετρός του (Ανατύπωση από Marieb and Hoehn, 2001).

Ο βασικός ρόλος του ερυθροκυττάρου είναι η μεταφορά οξυγόνου στους μεταβολικά ενεργούς ιστούς και η απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα από αυτούς. Αυτό το καταφέρει όντας πλούσιο σε αιμοσφαιρίνη, η οποία μπορεί να δεσμεύει οξυγόνο και με μικρότερη συγγένεια διοξείδιο του άνθρακα (Hamasaki and Yamamoto 2000). Η απουσία πυρήνα και κυτταρικών οργανιδίων καθιστά το ερυθροκύτταρο κατάλληλο μεταφορέα τεράστιου αριθμού μορίων αιμοσφαιρίνης (200-300 εκατομμύρια μόρια αιμοσφαιρίνης ανά ερυθροκύτταρο) (Benedik and Hamlin 2014). Επιπλέον, το χαρακτηριστικό σχήμα αμφίκοιλου δίσκου που διαθέτει, αυξάνει στον ανώτατο βαθμό την επιφάνεια του ερυθροκυττάρου και επομένως μειώνει την απόσταση διάχυσης για το οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα. Τέλος, η ιδιαίτερα παραμορφώσιμη μεμβράνη του επιτρέπει την κίνησή του σε τριχοειδή αγγεία, μικρότερης διαμέτρου από το ίδιο (Benedik and Hamlin 2014).

Η ερυθροκυτταρική αιμοσφαιρίνη (HbA) είναι ένα τετραμερές δύο α και δύο β αλυσίδων (Perutz et al. 1960). Κάθε πολυπεπτιδίο σφαιρίνης δεσμεύει ένα μόριο αίμης το οποίο περιέχει ένα κεντρικό άτομο σιδήρου στο μέσο ενός δακτυλίου προφυρίνης. Το άτομο του σιδήρου της αίμης μπορεί να σχηματίσει δεσμό με διατομικούς αέριους προσδότες (O_2 , CO , NO), ενώ η αναδίπλωση σφαιρίνης

παρέχει το απαραίτητο περιβάλλον για την επίτευξη της αντιστρεπτής και εκλεκτικής δέσμευσης (Smith et al. 2010). Η δομή της αιμοσφαιρίνης των θηλαστικών φαίνεται στην **Εικόνα 3**. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν κατηγορίες ατόμων με γενετικές διαταραχές (αιμοσφαιρινοπάθειες) που οδηγούν σε εμφάνιση μη φυσιολογικών παραλλαγών αιμοσφαιρίνης ή/και σε αλλαγή των ποσοστών παρουσίας των διαφόρων τύπων αιμοσφαιρίνης. Ένα παράδειγμα είναι τα άτομα με β-μεσογειακή αναιμία τα οποία παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα HbA₂ (2 α και 2 δ αλυσίδες σφαιρίνης) (Barrett et al. 2017).



Εικόνα 3: Δομή της ερυθροκυτταρικής αιμοσφαιρίνης. Παρουσιάζονται σχηματικά οι α και β αλυσίδες σφαιρίνης με το χαρακτηριστικό τους δίπλωμα στον χώρο, καθώς και οι τέσσερις ομάδες αίμης με το κεντρικό άτομο σιδήρου (Ανατύπωση από www.adichemistry.com)

Η αιμοσφαιρίνη εναλλάσσεται μεταξύ μιας οξυγονωμένης και μιας μη οξυγονωμένης μορφής, ως απόκριση στη διαθεσιμότητα του οξυγόνου. Κάποια μόρια της βρίσκονται μάλιστα δεσμευμένα στη μεμβράνη και λειτουργούν ως αισθητήρες οξυγόνου. Υψηλά επίπεδα διαθέσιμου οξυγόνου, υψηλό pH και χαμηλά επίπεδα διαθέσιμου διοξειδίου του άνθρακα ευνοούν τη δέσμευση οξυγόνου στην αιμοσφαιρίνη, ενώ οι αντίθετες συνθήκες ευνοούν την απόθεση αυτού στους ιστούς (Pittman 2011).

Πέραν της μεταφοράς οξυγόνου, τα ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολικές λειτουργίες. Υποστηρίζεται πως «αντιλαμβάνονται» την υποξία στους ιστούς και εν συνεχεία αποκρίνονται σε αυτή απελευθερώνοντας αγγειοδιασταλτικούς παράγοντες (ATP, NO) οι οποίοι δρουν στον τοπικό λείο μυϊκό ιστό με σκοπό την αύξηση της ροής αίματος στην υποξική περιοχή (Jensen 2009).

A2. Ερυθροποίηση

Η ερυθροποίηση είναι η διαδικασία με την οποία ένας πληθυσμός αρχέγονων πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων τροφοδοτεί συνεχώς τον οργανισμό με ερυθροκύτταρα, μέσω της παραγωγής διαδοχικών, ενδιάμεσων σειρών προγονικών κυττάρων, που παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης (Manwani and Bieker 2008). Η ερυθροποίηση, στους ενήλικους, πραγματοποιείται στον μυελό των οστών, που αποτελεί ένα μικροπεριβάλλον αποτελούμενο από ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού συστήματος, οστεοβλάστες, κύτταρα στρώματος, αιμοποιητικά κύτταρα και εξωκυττάρια μήτρα. Όλα αυτά ευνοούν την άμεση επαφή και επικοινωνία μεταξύ κυττάρων και αναπτυξιακών παραγόντων, κυταροκινών και μορίων προσκόλλησης αλλά και τη διακυτταρική αλληλεπίδραση (Dzierzak and Philipsen 2013). Η διαδικασία της ερυθροποίησης μπορεί να διακριθεί σε τρία επιμέρους στάδια: την πρώιμη ερυθροποίηση, την τελική ερυθροειδική διαφοροποίηση και την ωρίμανση του δικτυοερυθροκυττάρου.

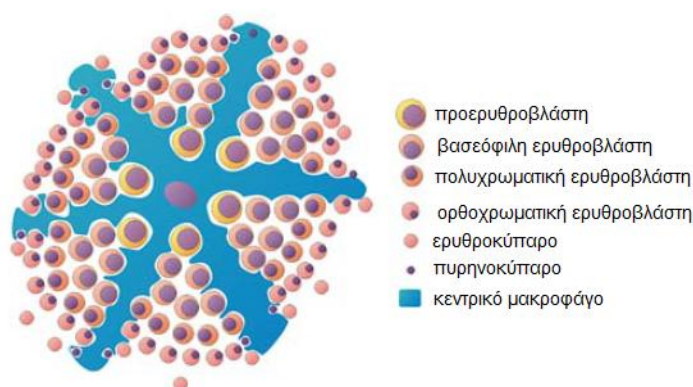
A2.1 Πρώιμη Ερυθροποίηση

Στο πρώτο στάδιο τα αρχέγονα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε σειρές προγονικών κυττάρων που είναι αόρατες μικροσκοπικά. Η πιο πρώιμη

αναγνωρίσιμη από αυτές είναι η BFU-E (μονάδες εκρηκτικής αύξησης ερυθροειδών κυττάρων / burst forming units – E) και στη συνέχεια ακολουθεί η CFU-E (μονάδες αποικιακής αύξησης ερυθροειδών κυττάρων / colony forming units – E). Τα κύτταρα της δεύτερης εκφράζουν τον υποδοχέα ερυθροποιητίνης και διαφοροποιούνται σε προερυθροβλάστες (Manwani and Bieker 2008). Στο στάδιο αυτό είναι απαραίτητη η δράση της ερυθροποιητίνης, μιας πρωτεΐνης που παράγεται στους νεφρούς και δρα ως κυτταροκίνη, αυξητικός παράγοντας και κυρίως ορμόνη. Η δέσμευσή της στον υποδοχέα της στην επιφάνεια των προγονικών ερυθροειδικών κυττάρων οδηγεί σε καταρροϊκή σηματοδότηση που καταλήγει στον έλεγχο της απόπτωσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Η παραγωγή της είναι αυξημένη σε καταστάσεις υποξίας (Chateaubieux et al. 2011).

A2.2 Τελική Ερυθροειδική Διαφοροποίηση

Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την πορεία διαφοροποίησης από προερυθροβλάστη σε βασεόφιλη, στη συνέχεια σε πολυχρωματική και τέλος σε ορθοχρωματική ερυθροβλάστη, η οποία εν συνεχεία θα διαφοροποιηθεί σε δικτυοερυθροκύτταρο (Korolnek and Hamza 2015). Λαμβάνει χώρα σε ένα εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον στον μυελό των οστών που ονομάζεται ερυθροβλαστική νησίδα. Σε αυτήν κυριαρχεί ένα κεντρικό μακροφάγο το οποίο εκτείνει κυτταροπλασματικές προεκβολές σε έναν δακτύλιο από περιβάλλοντες ερυθροβλάστες (Palis 2017) διαφορετικών σταδίων διαφοροποίησης (Jacobsen et al. 2015) όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4**. Οι προτεινόμενοι ρόλοι του κεντρικού μακροφάγου είναι η έκκριση κυτταροκινών απαραίτητων για την επιβίωση και διατήρηση της ερυθροβλάστης (Manwani and Bieker 2008), η μεταφορά σιδήρου στις ερυθροβλάστες (Leimberg et al. 2008), η στήριξη της σύνθεσης μεγάλων ποσοτήτων αιμοσφαιρίνης και η φαγοκυττάρωση και αποδόμηση των ερυθροβλαστικών πυρήνων κατά την αποπυρήνωση (Soni et al. 2006).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της ερυθροβλαστικής νησίδας στον μυελό των οστών (Ανατύπωση από Dzierzak and Philipsen, 2013).

Η ονοματολογία των κυττάρων της ερυθροειδικής σειράς αντιστοιχεί στο χρωστικό χαρακτήρα του κυτταροπλάσματός τους, ο οποίος ξεκινά από βασεόφιλο και σταδιακά μετατρέπεται σε οξύφιλο λόγω της συσσώρευσης αιμοσφαιρίνης. Προοδευτικά στα στάδια των ερυθροβλαστών μειώνεται το μέγεθος του κυττάρου και συμπυκνώνεται ο πυρήνας μέχρι να απομακρυνθεί (Manwani and Bieker 2008). Για να απομακρυνθεί ο πυρήνας, η ορθοχρωματική ερυθροβλάστη πρέπει να υποστεί τη διαδικασία της αποπυρήνωσης κατά την οποία παράγεται ένα απύρρηνο δικτυοερυθροκύτταρο και ένα πυρηνοκύτταρο. Η διαδικασία αυτή έχει ομοιότητες με την κυτταροκίνηση και απαιτεί την κυτταρική πολικότητα μέσω της λειτουργίας των μικροσωληνίσκων, τον σχηματισμό ενός συσταλτού δακτυλίου ακτινομοσίνης και την παρουσία λιπιδικών σχεδίων. Το πυρηνοκύτταρο παρουσιάζει μόρια φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνειά του, τα οποία αναγνωρίζονται ως σήματα φαγοκυττάρωσης από το κεντρικό μακροφάγο, ενώ το δικτυοερυθροκύτταρο είναι έτοιμο να ελευθερωθεί στην κυκλοφορία του αίματος (Konstantinidis et al. 2012).

A2.3 Ωρίμανση Δικτυοερυθροκυττάρου

Στο τελευταίο στάδιο της ερυθροποίησης, το δικτυοερυθροκύτταρο αποχωρίζεται τα ριβοσώματα και τα κυτταρικά οργανίδια, αλλάζει τη σύσταση της μεμβράνης του και αποκτά σχήμα αμφίκοιλου

δίσκου, οπότε και διαφοροποιείται σε ώριμο ερυθροκύτταρο (Manwani and Bieker 2008). Τα μιτοχόνδρια και τα ριβοσώματα που υπήρχαν στην ερυθροβλάστη, μέσω μονοπατιών αυτοφαγίας, έχουν καταλήξει να περικλείονται από μεμβράνη αυτοφαγοσωμάτων (Moras et al. 2017). Υπάρχουν *in vitro* μελέτες που δείχνουν πως τα αυτοφαγοσώματα αυτά συντήκονται με κυστίδια που σχηματίζονται στην κυτταροπλασματική μεριά της πλασματικής μεμβράνης και στη συνέχεια τα υβρίδια αποβάλλονται με εξωκυττάρωση. Φαίνεται λοιπόν να υπάρχει μια συνεργασία της αυτοφαγίας και της εξωκυττάρωσης, σημαντική για την απομάκρυνση των οργανιδίων του δικτυοερυθροκυττάρου (Griffiths et al. 2012).

Τα εξωσώματα είναι μικρά κυστίδια που εκκρίνονται από διάφορους τύπους κυττάρων στο εξωκυττάριο μέσο μετά από σύντηξη ενός πολυκυστιδιακού ενδοσώματος (MVE), με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Έχειδειχθεί ότι τα εξωσώματα συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της μεμβράνης και του κυτταρικού όγκου κατά την μετατροπή των δικτυοερυθροκυττάρων σε ώριμα ερυθροκύτταρα. Μέσω των εξωσωμάτων απομακρύνονται επιλεκτικά πρωτεΐνες που δεν είναι πλέον απαραίτητες για το σχηματιζόμενο ερυθροκύτταρο. Αυτή η εκλεκτική μεταφορά πρωτεϊνών σε εξωσώματα γίνεται είτε κυτταροπλασματικά, με τη βοήθεια του συμπλόκου ενδοσωμικής διαλογής (ESCRT), είτε μεμβρανικά μέσω λιπιδικών σχεδίων, είτε εντός του ενδοσώματος (Vidal 2010). Έτσι τελικά απομακρύνονται πρωτεΐνες που είναι περιττές ή και επικίνδυνες για το ερυθροκύτταρο, όπως υπολειπόμενες πρωτεΐνες της λυσοσωμικής μεμβράνης καθώς και πρωτεΐνες προσκόλλησης, αναδιαμορφώνεται η μεμβράνη κι ο κυτταροσκελετός και το ερυθροκύτταρο αποκτά το τελικό δισκοειδές του σχήμα (Blanc and Vidal 2010).

A3. Ερυθροκυτταρική Μεμβράνη και Κυτταροσκελετός

Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη αποτελεί την πλασματική μεμβράνη του ερυθροκυττάρου, τη μόνη μεμβράνη που παραμένει στο κυκλοφορούν ερυθροκύτταρο. Απαρτίζεται από μία λιπιδική διπλοστιβάδα στην οποία βρίσκονται ενσωματωμένες διάφορες πρωτεΐνες. Χρησιμοποιώντας έναν ευρύτερο ορισμό, θα μπορούσε να συμπεριληφθεί στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη ένα επιπλέον δισδιάστατο πρωτεϊνικό δίκτυο που παρέχει στο ερυθροκύτταρο τις μηχανικές του ιδιότητες που αφορούν στην αντοχή και την ελαστικότητά του. Αυτό το δίκτυο είναι ο υπομεμβρανικός κυτταροσκελετός σπεκτρίνης-ακτίνης του ερυθροκυττάρου (Beaumont et al. 2009).

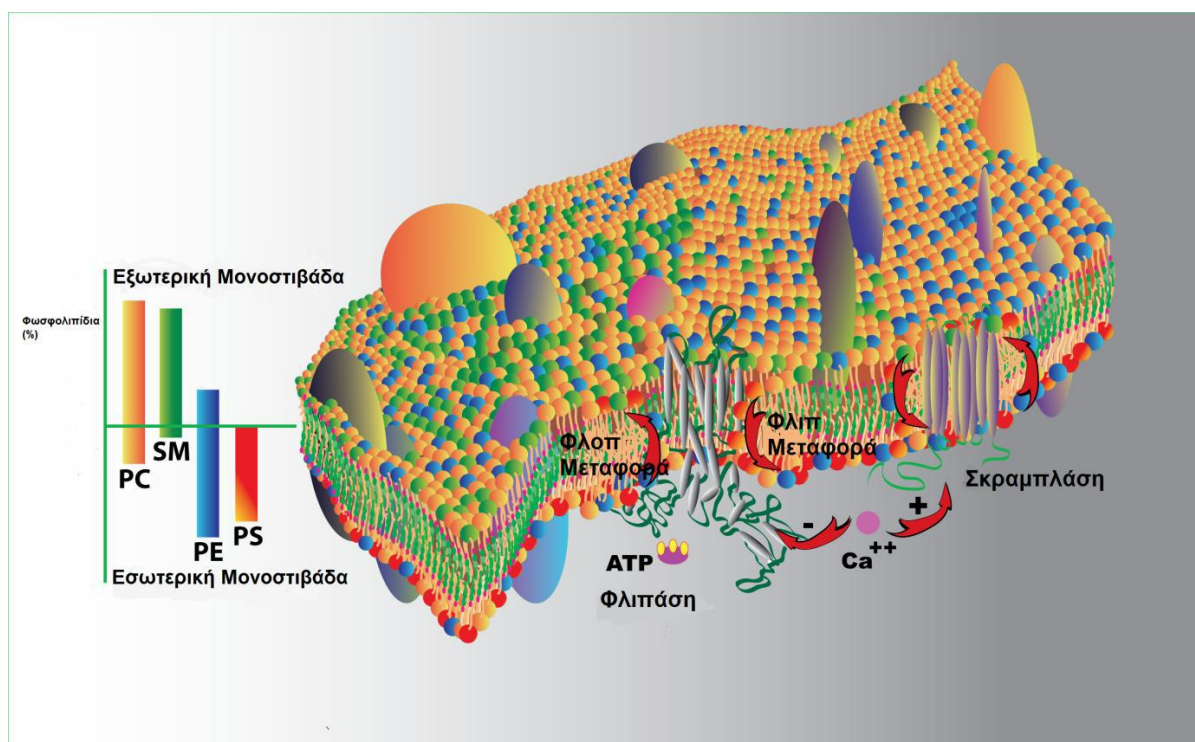
A3.1 Λιπιδική Διπλοστιβάδα

Η λιπιδική διπλοστιβάδα αποτελείται από χοληστερόλη και φωσφολιπίδια σε ίδια αναλογία ως προς το βάρος τους. Η χοληστερόλη είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη μεταξύ των δύο στιβάδων αλλά τα τέσσερα βασικά φωσφολιπίδια κατανέμονται ασύμμετρα. Η φωσφατιδυλοχολίνη και η σφιγγομυελίνη εντοπίζονται κυρίως στην εξωτερική μονοστιβάδα, ενώ η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και όλα τα μόρια φωσφατιδυλοσερίνης στην εσωτερική, μαζί με τα φωσφοϊνοσιτίδια (Mohandas and Gallagher 2008) (**Εικόνα 5**).

Η άνιση κατανομή των φωσφολιπιδίων, και συγκεκριμένα η αποκλειστική παρουσία της φωσφατιδυλοσερίνης στο εσωτερικό, είναι ιδιαίτερα σημαντική. Τα μακροφάγα αναγνωρίζουν και φαγοκυττάρωνουν κύτταρα που εκφράζουν φωσφατιδυλοσερίνη στην επιφάνειά τους κι έτσι ο εσωτερικός εντοπισμός της είναι σημαντικός για την επιβίωση του ερυθροκυττάρου (Yasin et al. 2003). Επιπλέον, αποφεύγεται η προσκόλληση φυσιολογικών ερυθροκυττάρων στο ενδοθήλιο των αγγείων, εξασφαλίζοντας την ομαλή κυκλοφορία τους (Yamaja Setty et al. 2002). Η φωσφατιδυλοσερίνη φαίνεται, επίσης, να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, κάτι που υπονοεί τη συμμετοχή της στην μεμβρανική μηχανική σταθερότητα (Manno et al. 2002).

Υπάρχουν διάφορες πρωτεΐνες μεταφοράς φωσφολιπιδίων που συμβάλλουν στη διατήρηση της ανισοκατανομής. Οι φλιπάσες μεταφέρουν λιπίδια από την εξωτερική προς την εσωτερική μονοστιβάδα, ενώ οι φλοπάσες επιτελούν την αντίθετη μεταφορά. Τα δύο αυτά είδη πρωτεϊνών-μεταφορέων απαιτούν ενέργεια για τη δράση τους, καθώς μεταφέρουν φωσφολιπίδια αντίθετα προς

τη διαβάθμιση συγκέντρωσης. Αντίθετα, οι σκραμπλάσες μεταφέρουν φωσφολιπίδια από και προς τις δύο κατευθύνσεις, σύμφωνα με τη διαβάθμιση συγκέντρωσης, χωρίς να απαιτούν κατανάλωση ενέργειας (Pomorski and Menon 2016).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της λιπιδικής διπλοστιβάδας του ερυθροκυττάρου και της δράσης των υπεύθυνων για την ανισοκατανομή πρωτεϊνών (Ανατύπωση από Frans Kuypers 2011).

A3.2 Πρωτεΐνες Ερυθροκυτταρικής Μεμβράνης

A3.2.1 Διαμεμβρανικές Πρωτεΐνες

Έχουν βρεθεί μέχρι τώρα πολλές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στη μεμβράνη του ερυθροκυττάρου με ποικίλες λειτουργίες. Μπορεί να σχετίζονται με κατάλυση αντιδράσεων, να λειτουργούν ως μεταφορείς, να συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος ή στην αλληλεπίδραση με άλλα κύτταρα και να συμβάλλουν στη δομική σταθερότητα του ερυθροκυττάρου (Pasini et al. 2006). Ορισμένες από αυτές τις πρωτεΐνες φέρουν στο εξωκυττάριο τμήμα τους κάποια από τα αντιγόνα που χαρακτηρίζουν τις διάφορες ομάδες αίματος (Beaumont et al. 2009)

Ζώνη 3

Η ζώνη 3, γνωστή και ως ανιοντοανταλλάκτης 1 (AE1), είναι η επικρατέστερη γλυκοπρωτεΐνη της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Αποτελείται από 911 αμινοξικά κατάλοιπα που διευθετούνται σε τρεις επιμέρους περιοχές: μια αμινοτελική κυτταροπλασματική περιοχή, μια κεντρική διαμεμβρανική περιοχή και ένα μικρό καρβοξυτελικό κυτταροπλασματικό τμήμα. Το διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης διαπερνά τη μεμβράνη 12-14 φορές και είναι υπεύθυνο για τη βασική λειτουργία του μορίου, που είναι η ανιοντοανταλλαγή (van den Akker et al. 2010). Στα ερυθροκύτταρα η ζώνη 3 σχηματίζει κυρίως διμερή και τετραμερή, τα επιμέρους μόρια των οποίων όμως λειτουργούν ανεξάρτητα (Reithmeier et al. 2016).

Στο καρβοξυτελικό τμήμα της ζώνης 3 δεσμεύεται η καρβονική ανυδράση II (Vince and Reithmeier 1998), ένα μεταλλοένζυμο ψευδαργύρου που καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή των μορίων διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) σε διττανθρακικά ιόντα (HCO_3^-) και πρωτόνια (H^+) (West et al. 2014). Το διττανθρακικό ιόν, μέσω της διαμεμβρανικής περιοχής του ανιοντοανταλλάκτη, ανταλλάσσεται με

Diagram illustrating the C₄ pathway in a leaf. The process involves the following steps:

- CO₂ Entry:** CO₂ enters the cell from the atmosphere.
- Fixation:** CO₂ is fixed by PEP carboxylase (C₄ pathway) to form oxaloacetate (C₄ compound).
- Decarboxylation:** Oxaloacetate moves to the bundle sheath (ζώνη 3) where it is decarboxylated by PEP carboxylase (C₃ pathway) to release CO₂ for the C₃ cycle and produce H⁺ and HCO₃⁻.
- Electron Transport:** H⁺ is used by NADP⁺ reductase to reduce NADP⁺ to NADPH, which is then used by ATP synthase to produce ATP from ADP and P_i.

Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της βασικής λειτουργίας της ζώνης 3 του ερυθροκυττάρου (Ανατύπωση από Badior and Casey, 2018).

Οι υδατοπορίνες είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, υπεύθυνες για τη μετακίνηση νερού μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Η υδατοπορίνη-1 υπάρχει άφθονη στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη. (Nielsen et al. 1993). Το μοριακό της βάρος βρίσκεται μεταξύ 26-30kDa ή 35-50kDa αναλόγως εάν βρίσκεται σε φυσιολογική ή γλυκοζυλιωμένη μορφή αντίστοιχα (Zhang et al. 1993). Αποτελείται από 269 αμινοξικά κατάλοιπα που προσδίδουν μια τρισδιάστατη δομή 6 ιδιαίτερα υδρόφοβων διαμεμβρανικών περιοχών δομής α-έλικας στην πρωτεΐνη. Οι διαμεμβρανικές περιοχές συνδέονται μεταξύ τους με πέντε θηλιές. Το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό της άκρο είναι υδρόφιλα και εντοπίζονται στο κυτοσόλιο (Schenk et al. 2010), ενώ υπάρχουν στις συνδετικές θηλιές δύο ιδιαίτερα συντηρημένες περιοχές, γνωστές ως μοτίβα NPA, με την αλληλουχία ασπαραγίνη-προλίνη-αλανίνη, που αποκαλούνται «υπογραφή» των υδατοπορινών (Benga 2012).

Μεταφορέας Γλυκόζης (Glut-1)

13

ο μεταφορέας γλυκόζης συμμετέχει και αυτός με τη σειρά του στη διατήρηση της ακεραιότητας της μεμβράνης, μέσω της συμμετοχής του σε μεμβρανικό σύμπλοκο (Mankelov et al. 2012).

Γλυκοφορίνες

Οι γλυκοφορίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε σε σιαλικά οξέα, οι οποίες διαπερνούν μία φορά τη μεμβράνη και φέρουν αντιγόνα της ομάδας αίματος. Στα ερυθροκύτταρα υπάρχουν οι γλυκοφορίνες GPA, GPB, GPC, GPD και GPE. Οι δύο πρώτες, καθώς και η GPE φέρουν τα αντιγόνα MNS, ενώ οι άλλες δύο τα αντιγόνα Gerbich (Cartron and Rahuel 1992).

Η γλυκοφορίνη A σχηματίζει ομοδιμερή στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και αποτελεί τη βασική γλυκοφορίνη του ερυθροκυττάρου, ενώ τα σιαλικά της κατάλοιπα είναι τα κύρια υπεύθυνα για την αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια του κυττάρου. Υπάρχουν επίσης αρκετές ενδείξεις πως η γλυκοφορίνη αυτή παίζει ρόλο στην βιοσύνθεση και μεταφορά της ζώνης 3 στη μεμβράνη (Aoki 2017). Οι GPC και GPD συμβάλλουν στην σύνδεση της μεμβράνης με τον κυτταροσκελετό και έτσι παίζουν ρόλο στη μηχανική σταθερότητα και την ρύθμιση της παραμόρφωσης της μεμβράνης (Vincent 2016).

A3.2.2 Περιφερειακές Μεμβρανικές Πρωτεΐνες

Στοματίνη

Η στοματίνη (ζώνη 7.2) είναι μια πρωτεΐνη 287 αμινοξικών καταλοίπων με μια υδρόφοβη περιοχή, που βυθίζεται στη μεμβράνη χωρίς να τη διαπερνά, και δύο κυτταροπλασματικά άκρα. Αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες μεταφοράς (μεταφορέας γλυκόζης, ζώνη 3, υδατοπορίνη-1) και φαίνεται πως έχει ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας τους (Genetet et al. 2017). Αποτελεί βασικό συστατικό των λιπιδικών σχεδίων (Lee et al. 2017).

CD47

Η πρωτεΐνη CD47 ή αλλιώς πρωτεΐνη σχετιζόμενη με ιντεγκρίνη (IAP), ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών κι αποτελεί δείκτη-εαυτού για τα ερυθροκύτταρα. Όταν η πρωτεΐνη αυτή εκτίθεται σε κάποιο κύτταρο, συνδέεται με την πρωτεΐνη SIRPα του μακροφάγου, οδηγώντας στην παρεμπόδιση της ενεργοποίησης του και της επακόλουθης φαγοκυττάρωσης (Sosale et al. 2015). Όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, αυτή η προστασία που παρέχει το CD47 στα ερυθροκύτταρα δεν υφίσταται όταν αυτά γηράσκουν (Oldenborg et al. 2000).

A3.2.3 Μεμβρανοσυνδεδεμένες Πρωτεΐνες

Prx2

Η ομάδα των υπεροξειρεδοξινών (Prx) απαρτίζεται από ένζυμα που εξαλείφουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη θειορεδοξίνη. Η Prx2 είναι άφθονη στο κυτταρόπλασμα των ερυθροκυττάρων και συνδέεται στη μεμβράνη σε καταστάσεις οξειδωτικής καταπόνησης για να την προστατεύσει από οξειδωτικές βλάβες ανάγοντας τα υπεροξειδία. Για τον λόγο αυτό, η πρόσδεσή της στη μεμβράνη μπορεί να αποτελέσει δείκτη της οξειδωτικής κατάστασης του ερυθροκυττάρου (Ishida et al. 2014).

Καλπαΐνη-1

Η καλπαΐνη-1, μια ασβεστιοεξαρτώμενη πρωτεάση κυστεΐνης, μετά από ενδοκυττάρια αύξηση ασβεστίου καταλύει την περιορισμένη πέψη (limited digestion), κι όχι τόσο αποικοδόμηση, συγκεκριμένων πρωτεϊνών οδηγώντας σε μεταβολή των φυσιολογικών λειτουργιών τους (Storr et al. 2011). Παραδείγματα της δράσης της αποτελούν η διάσπαση της μεμβρανοσυνδεδεμένης Ca^{2+} -ΑΤΡάσης, η οποία ρυθμίζει τη μεταφορά ασβεστίου στα ερυθροκύτταρα, καθώς και η πρωτεόλυση

της αιμοσφαιρίνης με την επακόλουθη δημιουργία των σωματιδίων Heinz (Wieschhaus et al. 2012). Πέραν της συγκέντρωσης ασβεστίου, η καλπαΐνη-1 ρυθμίζεται από την καλπαστατίνη (Dantas De Medeiros et al. 2002).

HSP

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsp) λειτουργούν ως μοριακοί-συνοδοί, καθώς βοηθούν σε διάφορες διαδικασίες αναδίπλωσης πρωτεϊνών (Mayer and Bukau 2005). Η οικογένεια Hsp70 εντοπίζεται και στο κυτοσόλιο των ερυθροκυττάρων και σε συνθήκες γήρανσης (φυσιολογικής ή αποθηκευτικής), καθώς και καταπόνησης, μετατοπίζεται στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη με σκοπό την προστασία της (Antonellou et al. 2010). Ένας ακόμη ρόλος τους, είναι η ρύθμιση της βιωσιμότητας των ερυθροβλαστών κατά την ερυθροποίηση (Weiss and Santos 2009).

A3.3 Λιπιδικές Σχεδίες

Η λιπιδική κατανομή δεν είναι ομοιόμορφη σε ολόκληρη την επιφάνεια της μεμβράνης του κυττάρου. Υπάρχουν διακριτές, ετερογενείς περιοχές, πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια, οι οποίες ονομάζονται λιπιδικές σχεδίες. Οι κύριες μεμβρανικές πρωτεΐνες που βρίσκονται στις λιπιδικές σχεδίες των ερυθροκυττάρων είναι η στοματίνη, η φλοτιλλίνη 1 και 2 και οι GPI-αγκυροβολημένες πρωτεΐνες. Επίσης, σε αυτές συμμετέχουν και κυτοσολικές πρωτεΐνες, όπως η συνεχίνη και η σορκίνη (Mikhalyon and Samsonov 2011). Οι λιπιδικές σχεδίες αποτελούν ανεξάρτητες λειτουργικά περιοχές της μεμβράνης. Σε αυτές βρίσκονται αρκετές πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεταγωγή σήματος (Kamata et al. 2008) και επιπροσθέτως οι περιοχές αυτές είναι υπεύθυνες για την μικροκυστιδιοποίηση (Salzer et al. 2002).

A3.4 Κυτταροσκελετός

Ο κυτταροσκελετός του ερυθροκυττάρου αποτελείται από σπεκτρίνη, ακτίνη και σχετιζόμενες με την ακτίνη πρωτεΐνες (τροπομυοσίνη, τροπομοντουλίνη, αδουσίνη, δεματίνη), πρωτεΐνη 4.1R και αγκυρίνη. Είναι ένα δισδιάστατο υπομεμβρανικό δίκτυο, το οποίο βρίσκεται σε στενή σύνδεση με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη (Peng et al. 2013).

A3.4.1 Πρωτεΐνες Κυτταροσκελετού

Σπεκτρίνη

Η σπεκτρίνη του ερυθροκυττάρου είναι μια μακριά, ελαστική πρωτεΐνη, αποτελούμενη από 2 παράλληλες αλυσίδες (α- και β-σπεκτρίνη). Αρχικά, μεμονωμένες, αντιπαράλληλες α- και β-αλυσίδες σχηματίζουν μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ετεροδιμερή, τα οποία τελικά οδηγούν σε σχηματισμό ενός ετεροτετραμερούς. Στο μόριο της σπεκτρίνης υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης για ποικιλία πρωτεϊνών, όπως η αγκυρίνη, η πρωτεΐνη 4.1R, η πρωτεΐνη 4.2 και τα νημάτια ακτίνης (McGough and Josephs 2006).

Ακτίνη

Τα ερυθροκύτταρα περιέχουν κοντά νημάτια F-ακτίνης τα οποία αποτελούνται από 14-16 μονομερή β-ακτίνης. Το μήκος των νηματίων ρυθμίζεται αυστηρά από την τροπομυοσίνη και τα άκρα τους καλύπτονται από τις πρωτεΐνες τροπομοντουλίνη και αδουσίνη (Picart et al. 2000).

Τροπομυοσίνη – Τροπομοντουλίνη – Αδουσίνη - Δεματίνη

Η τροπομυοσίνη είναι ένα διμερές α- και γ- ισομορφών τροπομυοσίνης. Κάθε μόριο δεσμεύει με μαγνήσιο-εξαρτώμενο τρόπο νημάτια ακτίνης και τα σταθεροποιεί (An et al. 2007). Η τροπομοντουλίνη αναστέλλει τη σύνδεση της τροπομυοσίνης στην ακτίνη κι έτσι ρυθμίζει το μήκος και την οργάνωση των νηματίων ακτίνης (Fowler 1990). Η αδουσίνη, όπως και η δεματίνη αλληλεπιδρούν με τα νημάτια F-ακτίνης σταθεροποιώντας τα και επάγοντας τη σύνδεσή τους με τη

σπεκτρίνη. Επίσης δεσμεύονται σε μεμβρανικές πρωτεΐνες, συμμετέχοντας έτσι στις κάθετες συνδέσεις μεταξύ μεμβράνης και κυτταροσκελετού (Lux 2016).

Πρωτεΐνη 4.1R

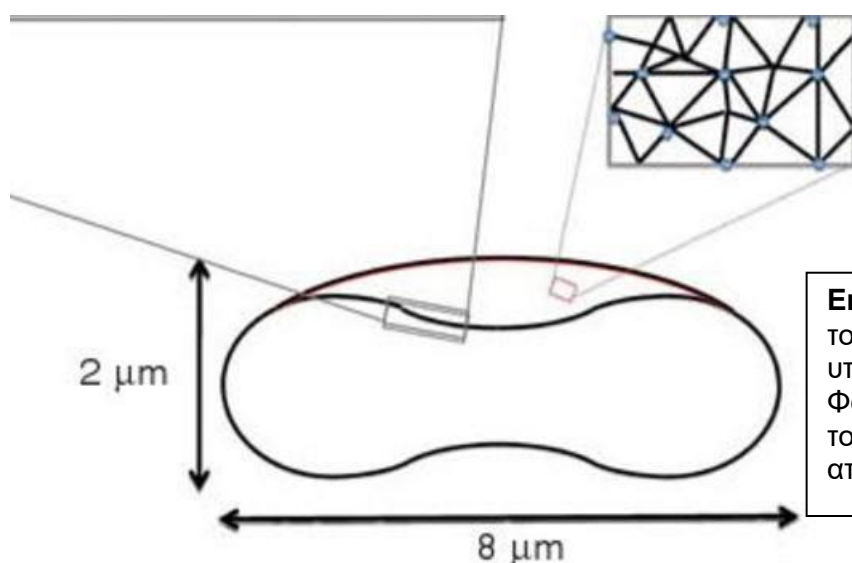
Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ερυθροκυτταρική σπεκτρίνη δεν έχει μεγάλη συγγένεια σύνδεσης με τα νημάτια F-ακτίνης. Η πρωτεΐνη 4.1R δεσμεύει και την σπεκτρίνη και την ακτίνη και δημιουργεί ένα σύμπλοκο ισχυρής συγγένειας. Το αμινοτελικό της άκρο έχει διακριτές θέσεις δέσμευσης για τη γλυκοφορίνη C και τη ζώνη 3 της μεμβράνης, καθώς και την καλμοδουλίνη. Μέσω όλων αυτών των συνδέσεων, η πρωτεΐνη 4.1R συμμετέχει στην οργάνωση του υπομεμβρανικού κυτταροσκελετού, καθώς και στην ικανότητα παραμόρφωσης του ερυθροκυττάρου (Han et al. 2000).

Αγκυρίνη

Η αγκυρίνη διαθέτει τρεις λειτουργικές περιοχές: η αμινοτελική της περιοχή συνδέεται με τετραμερή ζώνης 3, η κεντρική της περιοχή δεσμεύει τη σπεκτρίνη, ενώ η καρβοξυτελική της περιοχή έχει ρυθμιστικό ρόλο. Η σύνδεσή της με τη ζώνη 3 προάγει αλληλεπιδράσεις με το σύμπλεγμα Rh-RhAG (Lux 2016).

A3.4.2 Δομή Κυτταροσκελετού

Ο κυτταροσκελετός του ερυθροκυττάρου είναι ένα δισδιάστατο, ψευδο-εξαγωνικό δίκτυο. Οι πλευρές και οι ακτίνες αυτών των σχημάτων αντιπροσωπεύουν τετραμερή σπεκτρίνης, ενώ το κέντρο και οι γωνίες του πολυγώνου αντιστοιχούν στα σύμπλοκα ζεύξης ακτίνης, δηλαδή οριζόντιες αλληλεπιδράσεις στο επίπεδο του κυτταροσκελετού (Liu et al. 1987). Η δομή του κυτταροσκελετού φαίνεται στην **Εικόνα 7**.



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση του ερυθροκυττάρου και του υπομεμβρανικού κυτταροσκελετού. Φαίνεται η μορφή εξαγωνικού δικτύου του κυτταροσκελετού (Ανατύπωση από Diez-Silva et al, 2010)

A3.5 Σύμπλοκα Ερυθροκυτταρικής Μεμβράνης

Οι πρωτεΐνες του υποκείμενου κυτταροσκελετού του ερυθροκυττάρου συνδέονται με τη μεμβράνη μέσω κάθετων αλληλεπιδράσεων με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες με τη σειρά τους σχηματίζουν πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα μέσω οριζόντιων αλληλεπιδράσεων εντός της μεμβράνης. Πλήθος πρωτεϊνών συμμετέχει στη δημιουργία και διατήρηση αυτών των συνδέσεων, ενώ η διαταραχή τους οδηγεί σε προβληματικά ερυθροκύτταρα (σφαιροκύτταρα, ελλειπτοκύτταρα), τονίζοντας τη σημασία τους (Mankelov et al. 2012). Τα βασικά σύμπλοκα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης είναι το σύμπλοκο ζώνης-3/αγκυρίνης, το σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης και το σύμπλοκο Rhesus, τα οποία φαίνονται σχηματικά στην **Εικόνα 8**.

Σύμπλοκο Ζώνης-3/Αγκυρίνης

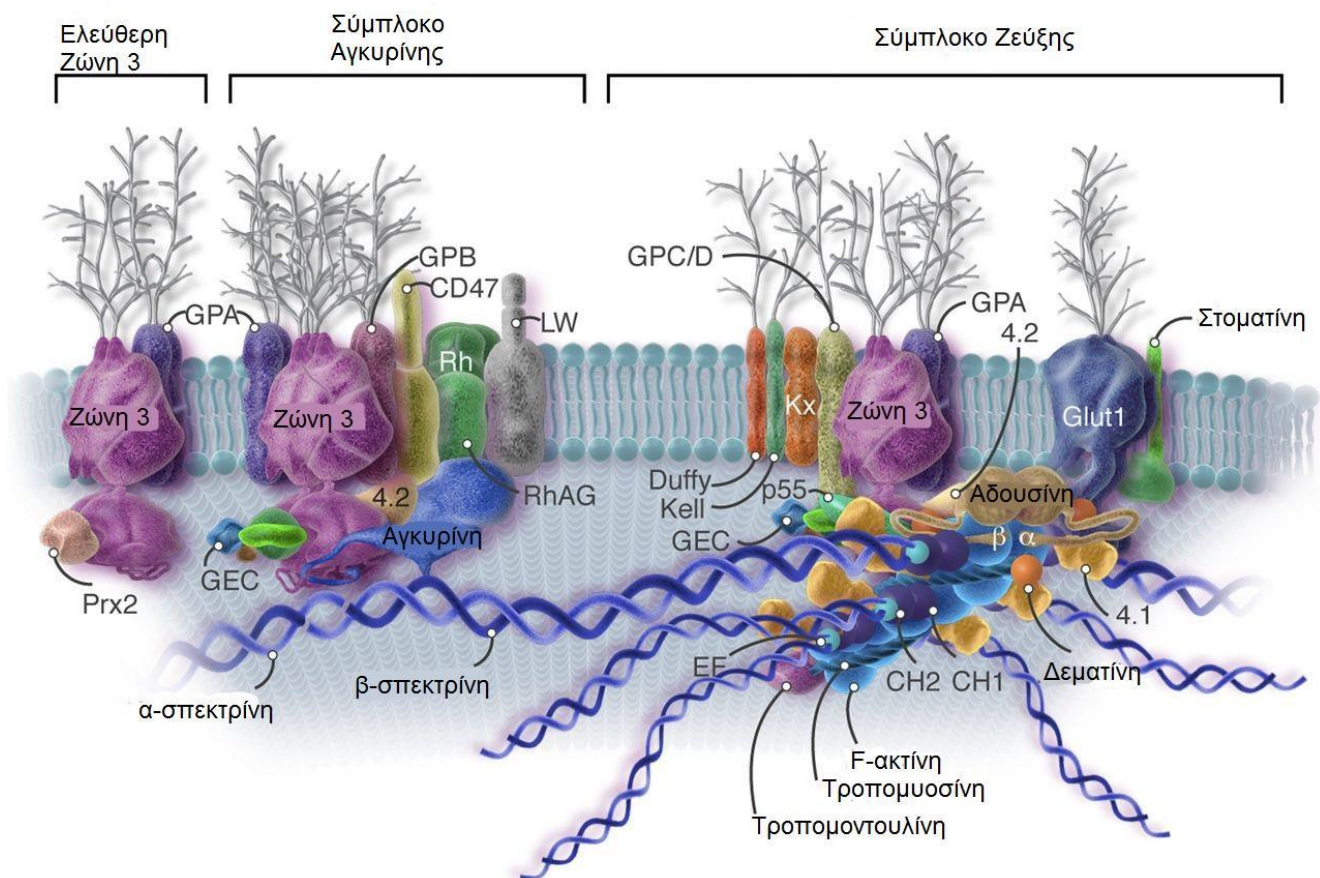
Το συγκεκριμένο σύμπλοκο αποτελείται από τετραμερή της ζώνης 3 τα οποία μέσω της αμινοτελικής τους άκρης συνδέονται με την αγκυρίνη και την πρωτεΐνη 4.2. Η αγκυρίνη, με τη σειρά της, συνδέεται με τη σπεκτρίνη του κυτταροσκελετού. Επίσης στο σύμπλοκο αυτό συμμετέχουν διμερή γλυκοφορίνης A (Mankelow et al. 2012).

Σύμπλοκο Rhesus

Στο σύμπλοκο αυτό συμπεριλαμβάνονται τα Rh πολυπεπτίδια και η RhAG γλυκοπρωτεΐνη, συνήθως ως ετεροτριμερές (RhAG₂Rh), το οποίο συνδέεται με την CD47, τη γλυκοπρωτεΐνη Landsteiner-Wiener και τη γλυκοφορίνη B. Η CD47 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη 4.2 κι έτσι το σύμπλοκο αυτό δημιουργεί ένα **μακροσύμπλοκο της ζώνης 3**, αλληλεπιδρώντας με το σύμπλοκο που προαναφέρθηκε. Το ετεροτριμερές αλληλεπιδρά επίσης με το μόριο της αγκυρίνης κι έτσι συνδέεται η μεμβράνη με τον κυτταροσκελετό (Van Kim et al. 2006).

Σύμπλοκο Ζεύξης Ακτίνης

Το σύμπλοκο ζεύξης εστιάζει σε έναν πυρήνα ζεύξης που προκύπτει από πλευρικές συνδέσεις μεταξύ της πρωτεΐνης 4.1, της ακτίνης και της β-σπεκτρίνης (BECKER et al. 1990). Αρκετές επιπλέον πρωτεΐνες-προσδέτες αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο αυτό, όπως η δεματίνη κι η αδουσίνη. Μέσω αλληλεπίδρασης με τις γλυκοφορίνες C και D και διμερή της ζώνης 3, αποκτάται μια ακόμη διασύνδεση της μεμβράνης με τον κυτταροσκελετό (Hemming et al. 1995). Πρόσφατα βρέθηκε πως η αδουσίνη κι η δεματίνη μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν με τον μεταφορέα γλυκόζης Glut1, δημιουργώντας το λεγόμενο **σύμπλοκο του μεταφορέα γλυκόζης** (Mohandas and Gallagher 2008).



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση των συμπλόκων της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Ανατύπωση από Samuel E. Lux IV, 2016).

A4. Μεταβολισμός Ερυθροκυττάρου

A4.1 Μεταβολισμός Γλυκόζης

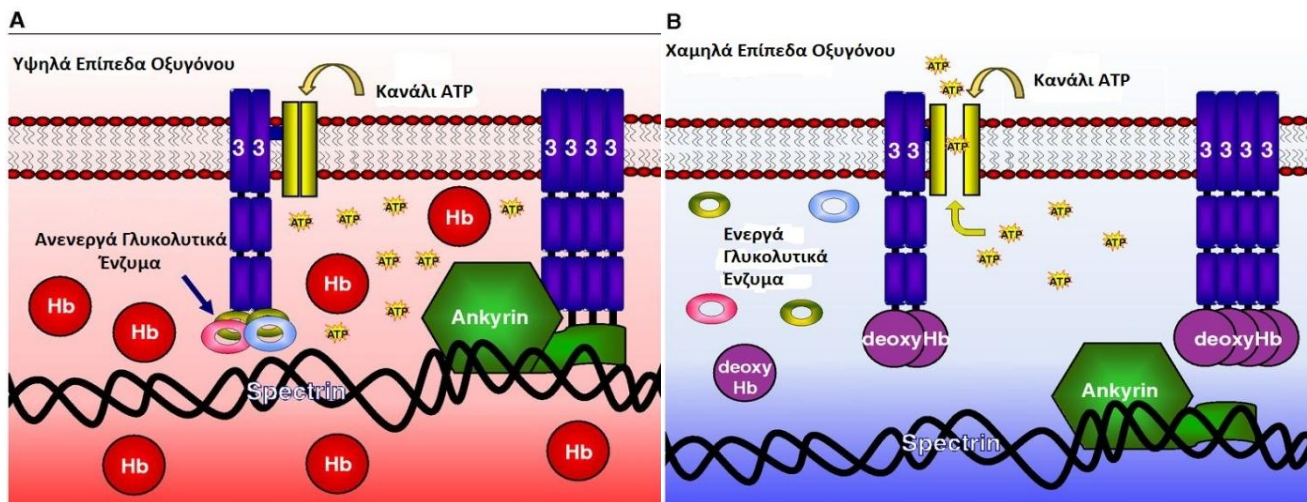
Κατά τη διάρκεια της ζωής τους στην αγγειακή κυκλοφορία, τα ερυθροκύτταρα απαιτούν ενέργεια για να διατηρήσουν ένα σύνολο ζωτικών κυτταρικών λειτουργιών. Αυτές περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, την συντήρηση της γλυκόλυσης, τη σύνθεση της γλουταθειόνης και άλλων μεταβολιτών, τη διατήρηση του σιδήρου της αίμης στη λειτουργική, ανηγμένη του κατάσταση και τη διαφύλαξη της ασυμμετρίας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Van Wijk and Van Solinge 2005).

Τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα στερούνται μιτοχονδρίων, επομένως εξαρτώνται απόλυτα από την αναερόβια γλυκόλυση για την παραγωγή ATP. Ο μεταφορέας γλυκόζης GLUT-1, που εκφράζεται σε αυτά, παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για την εξωκυττάρια γλυκόζη και παραμένει κορεσμένος υπό φυσιολογικές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Η εξοκινάση, υπεύθυνη για το αρχικό βήμα της πορείας της γλυκόλυσης στα ερυθροκύτταρα, παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για την ενδοκυττάρια γλυκόζη. Με τον τρόπο αυτό, ο ρυθμός έναρξης της πορείας της γλυκόλυσης εξασφαλίζεται ακόμα κι όταν το πλάσμα είναι φτωχό σε γλυκόζη. Περίπου το 90% της γλυκόζης που εισέρχεται στο ερυθροκύτταρο μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ μέσω της πορείας της γλυκόλυσης και το υπόλοιπο εισέρχεται στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών. Μέσω της γλυκόλυσης το ερυθροκύτταρο παράγει δύο μόρια ATP από κάθε μόριο γλυκόζης, ενώ ο κύκλος των φωσφορικών πεντοζών του παρέχει αναγωγική δύναμη (NADPH), που είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, κυρίως μέσω της αναγωγής της γλουταθειόνης, που αποτελεί σημαντικό αντιοξειδωτικό (Yachie-Kinoshita et al. 2010).

Στο ερυθροκύτταρο το 2,3 διφωσφογλυκερινικό οξύ (2,3-DPG) συντίθεται και αποφωσφορυλιώνεται στον κύκλο Rapoport-Lubering, ο οποίος υπάρχει αποκλειστικά στα ερυθροκύτταρα των θηλαστικών. Ο κύκλος αυτός παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συγγένειας της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο. Το 2,3-DPG δεσμεύεται εκλεκτικά στην δεοξυαιμοσφαιρίνη, επομένως όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του, τόσο μειώνεται η συγγένεια της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο, το οποίο και απελευθερώνεται ευκολότερα στους ιστούς (Cho et al. 2008).

A4.2 Ρύθμιση Μεταβολισμού Γλυκόζης

Ένας από τους βασικούς ρυθμιστές του μεταβολισμού του ερυθροκυττάρου είναι το οξυγόνο. Όταν αλλάζουν τα επίπεδα του οξυγόνου αλλάζει η αλληλεπίδραση γλυκολυτικών ενζύμων με το αμινοτελικό άκρο της ζώνης 3, οδηγώντας σε μια αλλαγή μεταβολικής ροής από το γλυκολυτικό μονοπάτι, σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου, στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών, σε υψηλότερα επίπεδα (Lewis et al. 2009). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως το GAPDH, η αλδολάση, η φωσφοφρουκτοκινάση και άλλα ένζυμα μπορούν να δεσμευτούν στο κυτοσολικό άκρο της ζώνης 3. Η οργάνωση αυτών των ενζύμων σε ένα σύμπλοκο του οποίου η δημιουργία εξαρτάται από μία θέση πρόσδεσης (αμινοτελικό άκρο ζώνης 3) επιτρέπει την βέλτιστη ρύθμιση του μονοπατιού (Campanella et al. 2005).



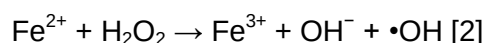
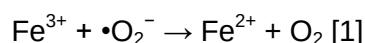
Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της οξυγονοεξαρτώμενης ρύθμισης του μονοπατιού της γλυκόλυσης μέσω της ζώνης 3 (Gibson, 2016).

Αρκετές είναι οι μελέτες που δείχνουν πως η αλληλεπίδραση των ενζύμων αυτών με τη ζώνη 3 είναι οξυγονοεξαρτώμενη. Παρά το γεγονός πως η οξυαιμοσφαιρίνη δεν έχει συγγένεια πρόσδεσης με τη ζώνη 3, η δεοξυαιμοσφαιρίνη παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για το αμινοτελικό άκρο της μεμβρανικής αυτής πρωτεΐνης. Υπάρχει, επομένως, ένας άμεσος ανταγωνισμός μεταξύ των γλυκολυτικών ενζύμων και της δεοξυαιμοσφαιρίνης για τη θέση αυτή, και τα ένζυμα απελευθερώνονται όταν είναι χαμηλά τα επίπεδα οξυγόνου, γεγονός που προάγει το μονοπάτι της γλυκόλυσης. Αντιθέτως, όταν υπάρχει αρκετό οξυγόνο, τα γλυκολυτικά ένζυμα δεσμεύονται στη ζώνη 3, απενεργοποιούνται και υπερισχύει το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Με τον τρόπο αυτό, ο ρυθμός της γλυκόλυσης ρυθμίζεται βάσει της οξυγόνωσης του κυττάρου (Stefanovic et al. 2012), όπως φαίνεται σχηματικά και στην **Εικόνα 9**.

A4.3 Μεταβολισμός Ελεύθερων Δραστικών Ριζών

Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελεύθερων δραστικών ριζών και της εξάλειψής τους από αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και οδηγεί σε ρήξη της σηματοδότησης και του ελέγχου της οξειδοαναγωγής και δυνητικά σε μοριακές βλάβες (οξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών) (Sies and Jones 2007).

Η κύρια πηγή οξειδωτικού στρες για το ερυθροκύτταρο είναι η παραγωγή ριζών υπεροξειδικών ανιόντων ($O_2^{\cdot-}$) μετά από αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης. Εκτός από $O_2^{\cdot-}$, από την αντίδραση αυτή προκύπτει και μεθαιμοσφαιρίνη (Kuhn et al. 2017), από την οποία μπορεί να απομακρυνθεί ο τρισθενής σίδηρος (Fe^{3+}) και, ελεύθερος πλέον, να δράσει ως οξειδωτικός παράγοντας. Μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss [1] ο τρισθενής σίδηρος ανάγεται σε δισθενή (Fe^{2+}), ο οποίος με την αντίδραση Fenton [2] οδηγεί στην παραγωγή δραστικών ριζών υδροξυλίου (Bunn and Jandl 1968).

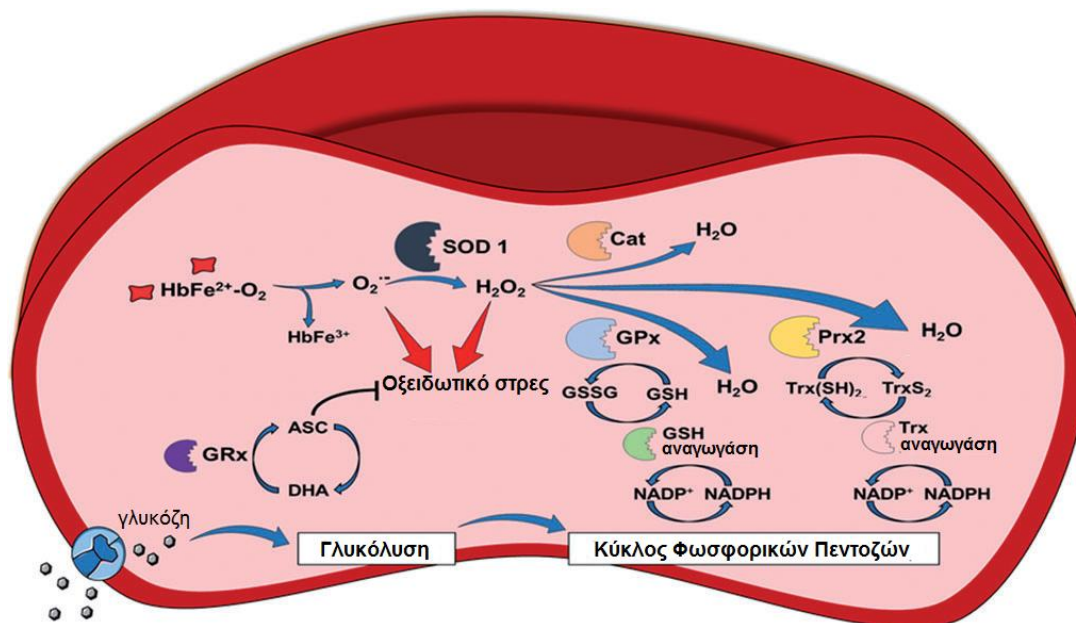


Η μεθαιμοσφαιρίνη μπορεί να ανακυκλωθεί σε λειτουργική αιμοσφαιρίνη μετά από μια αντίδραση που απαιτεί ως ηλεκτρονιοδότη το NADH. Επίσης, ο ελεύθερος σίδηρος μπορεί να εκκαθαριστεί από την φερριτίνη που υπάρχει στα ερυθροκύτταρα και επομένως να μειωθούν οι πιθανότητες πραγματοποίησης των παραπάνω αντιδράσεων (Kuhn et al. 2017).

Τα αντιοξειδωτικά συστήματα του ερυθροκυττάρου βασίζονται εξίσου σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς μηχανισμούς όπως φαίνεται στην **Εικόνα 10**. Τα ερυθροκύτταρα φέρουν υψηλές

συγκεντρώσεις μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μορίων όπως είναι η γλουταθειόνη και το ασκορβικό οξύ. Συγκεκριμένα η γλουταθειόνη, ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από κυστεΐνη, γλουταμικό οξύ και γλυκίνη, αποτελεί τον σημαντικότερο μη ενζυμικό ρυθμιστή της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης του ερυθροκυττάρου. Η ελεύθερη γλουταθειόνη υπάρχει κυρίως στην ανηγμένη της μορφή, η οποία μπορεί να μετατραπεί στην οξειδωμένη μορφή όταν υπάρχει οξειδωτικό στρες και να επιστρέψει στην ανηγμένη μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (Chai et al. 1994). Η γλουταθειόνη μπορεί να δεσμεύεται και σε πρωτεΐνες, οδηγώντας στην δημιουργία γλουταθειονυλιωμένων πρωτεϊνών (Pastore et al. 2003). Το τριπεπτίδιο αυτό μπορεί λοιπόν να συνδράμει στην εκκαθάριση ελεύθερων ριζών και άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου άμεσα, αλλά και έμμεσα, μέσω ενζυματικών αντιδράσεων (Fang et al. 2002). Πέραν των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών, τα ερυθροκύτταρα έχουν πηγές αναγωγικής δύναμης (NADH, NADPH), σημαντικές για το οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο του κυττάρου (Kuhn et al. 2017).

Τα ερυθροκύτταρα περιέχουν αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η υπεροξειδοξίνη (prx2) (Mohanty et al. 2014). Η υπεροξειδική δισμουτάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του ανιόντος του υπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (McCord and Fridovich 1969), το οποίο εν συνεχεία αναλαμβάνει να απομακρύνει η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Όταν η συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι υψηλή, η καταλάση βοηθά επίσης στην απομάκρυνσή του μετατρέποντάς το σε οξυγόνο και νερό (Cohen and Hochstein 1963). Η υπεροξειδοξίνη, με τη σειρά της, συμμετέχει στην αναγωγή οργανικών υπεροξειδίων και προστατεύει τα λιπίδια της μεμβράνης από οξειδωτικές βλάβες. Τα ηλεκτρόνια που της είναι απαραίτητα για την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου τα ανακτά από το αναγωγικό ανάλογο, την θειορεδοξίνη (Trx) (Matte et al. 2013).



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του ερυθροκυττάρου. Παρουσιάζονται οι κυριότεροι μη ενζυμικοί και ενζυμικοί μηχανισμοί του ερυθροκυττάρου για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. (Ανατύπωση από Kuhn et al., 2017)

A5. Ερυθροκυτταρική Γήρανση

Κατά την διάρκεια της ζωής τους στην κυκλοφορία τα ερυθροκύτταρα υπόκεινται σε έντονο φυσικό και χημικό στρες καθώς επιτελούν τη λειτουργία τους στην ανταλλαγή αερίων. Αυτό το στρες μπορεί

να σχετίζεται με την παραμόρφωση και το μηχανικό μεμβρανικό στρες καθώς τα κύτταρα διέρχονται από τα τριχοειδή αγγεία, ή την χημική καταπόνηση λόγω της συσσώρευσης οξειδωτικών ουσιών και δραστικών ριζών. Όσο αυξάνονται οι βλάβες στα ερυθροκύτταρα, είναι σημαντική η αποτελεσματική και ελεγχόμενη απομάκρυνση των υπολειμματικών, γηρασμένων ερυθροκυττάρων για να διατηρηθεί η λειτουργικότητα του κυκλοφορικού συστήματος (Badior and Casey 2018). Μάλιστα, τα ερυθροκύτταρα έχουν συγκεκριμένη διάρκεια ζωής, κάτι που δηλώνει πως η ζωή και ο θάνατός τους είναι καλώς ρυθμισμένα, παρ' ότι στερούνται της ικανότητας παραγωγής πρωτεϊνών (Bosman et al. 2005). Τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξημένη εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης στη μεμβράνη (Mandal et al. 2002), μείωση σιαλικού οξέος, χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων (Winterbourn and Batt 1970), αλλαγές στην ενζυμική δραστηριότητα (Kadlubowski and Agutter 1977) και χαρακτηριστική μεταβολή στον πρωτεϊνικό λόγο 4.1a/4.1b (Inaba and Maede 1988). Η γήρανση συνοδεύεται από μικροκυστιδιοποίηση και συρρίκνωση του κυττάρου. Η απώλεια αιμοσφαιρίνης και μεμβρανικού υλικού είναι μεγάλη και η μεταφορά ιόντων προβληματική, γεγονότα που οδηγούν σε αυξημένη πυκνότητα στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα (Antonelou et al. 2010).

A5.1 Μικροκυστιδιοποίηση

Τα εξωκυττάρια κυστίδια κινούν όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, λόγω του ρόλου που φαίνεται να διαδραματίζουν στη διακυτταρική επικοινωνία. Είναι γνωστό εδώ και χρόνια, πως τα κύτταρα απελευθερώνουν περίπλοκες κυστιδιακές δομές (εξωσώματα, μικροκυστίδια) στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Αυτά τα εξωκυττάρια κυστίδια δεν είναι άχρηστο υλικό, αλλά αποτελούν εξατομικευμένους μικροσκοπικούς χάρτες του κυττάρου από το οποίο προέρχονται (O'Neill et al. 2016). Τα μικροκυστίδια προέρχονται άμεσα από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη μετά από εκβλάση και έκκρισή τους (Inal et al. 2013). Η μικροκυστιδιοποίηση έχει σκοπό την απομάκρυνση προβληματικών μορίων από τα ερυθροκύτταρα και τελικά την σηματοδότηση για απομάκρυνση του γηρασμένου πληθυσμού από την κυκλοφορία. Όμως, η αυξημένη απομάκρυνση κυστιδίων οδηγεί στη μη αντιστρεπτή απώλεια μεμβρανικού υλικού και αιμοσφαιρίνης (Willekens et al. 2008). Τα ερυθροκύτταρα τελικά καθίστανται πυκνότερα, λιγότερο παραμορφώσιμα και με λιγότερο ελαστική μεμβράνη, γεγονότα που δυσχεραίνουν τη λειτουργία τους (Antonelou et al. 2010). Τα περισσότερα από τα κυστίδια που προέρχονται από ερυθροκύτταρα εξωτερικεύουν φωσφατιδυλοσερίνη και περιέχουν συσσωματώματα ζώνης 3 με δεσμευμένα αντισώματα IgG (Lutz and Bogdanova 2013).

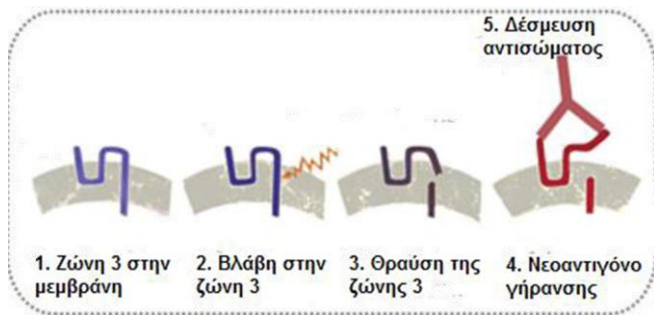
A5.2 Οξειδωτικό στρες

Η αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, οδηγεί στη δημιουργία της ανενεργής μεθαιμοσφαιρίνης, η οποία μπορεί να ανακυκλωθεί στην ενεργή της μορφή στα υγιή ερυθροκύτταρα. Όταν η ισοροπία αυτή διαταραχθεί, τα επίπεδα μεθαιμοσφαιρίνης αυξάνονται και μπορούν να σχηματίσουν αιμοχρώματα, παράγωγα αιμοσφαιρίνης που δεν μπορούν να δεσμεύουν οξυγόνο (Arese et al. 2005). Η συσσώρευση αιμοχρωμάτων είναι επιζήμια για την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου από τα ερυθροκύτταρα και οδηγεί σε προβληματική αναπνευστική λειτουργία (Peisach et al. 1975). Η αιμοσφαιρίνη δεσμεύεται στην αμινοτελική ουρά της ζώνης 3, επομένως, η συσσωματωμένη αιμοσφαιρίνη οδηγεί στην συσσωμάτωση της ζώνης 3 και την πιο επιτυχή πρόσδεση αυτοαντισωμάτων IgG σε αυτήν (Shaklai et al. 1977).

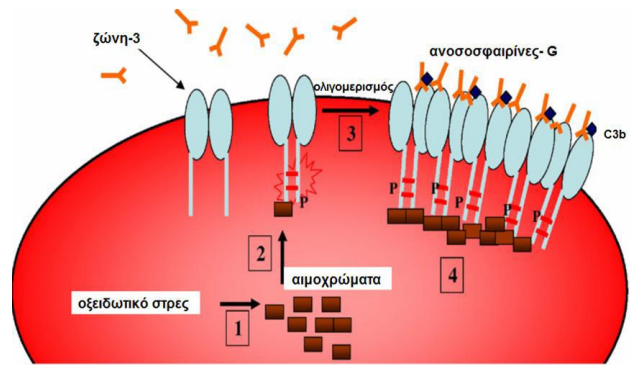
A5.3 Μονοπάτι Συσχετιζόμενο με τη Ζώνη 3

Το μονοπάτι που σχετίζεται με την ζώνη 3 αποτελεί ένα από τα κυριότερα μονοπάτια που σχετίζονται με τη γήρανση των ερυθροκυττάρων, καθώς καταλήγει στον σχηματισμό ενός ισχυρού σήματος γήρανσης, του λεγόμενου νέο-αντιγόνου γήρανσης (Antonelou et al. 2010). Οι προτεινόμενες αλλαγές στη ζώνη 3 που οδηγούν στον οψωνισμό της περιλαμβάνουν την αποδόμηση ή πρωτεόλυση (Kay et al. 1983), την τοπολογική/μορφολογική αναδιάταξη (Lutz et al. 1987; Hornig and Lutz 2000), την οξείδωση (Berpu et al. 1990), την κυτταροπλασματική διασύνδεση της αιμοσφαιρίνης (Sayare et al. 1982) και την πλευρική ανακατανομή πρωτεϊνών (Turrini et al. 1991). Κάποιες αρχικές έρευνες έχουν δείξει ότι στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα η ζώνη 3 πρωτεολύεται και απελευθερώνονται ή αποκαλύπτονται προηγουμένως μη προσβάσιμες αντιγονικές περιοχές στην πρωτεΐνη (Kay et al.

1989). Όσον αφορά στη θεωρία της συσσωμάτωσης της ζώνης 3 στη μεμβράνη, ο ρόλος των αιμοχρωμάτων είναι κεντρικός. Τα οξειδωμένα αιμοχρώματα δεσμεύονται κυτταροπλασματικά στη ζώνη 3 με υψηλότερη συγγένεια απ' ό,τι η αιμοσφαιρίνη και οδηγούν στον ολιγομερισμό της. Η παραγωγή αιμοχρωμάτων, που είναι ανίκανα να μεταφέρουν οξυγόνο, και η σύνδεση αυτών στη ζώνη 3 θα μπορούσε να αποτελεί έναν μηχανισμό μετάδοσης του εσωτερικού χημικού στρες του ερυθροκυττάρου στην επιφάνειά του και εν συνεχεία στα μακροφάγα, με σκοπό την απομάκρυνση των δυσλειτουργικών κυττάρων (Kannan et al. 1991). Τα δύο αυτά μοντέλα φαίνονται στις **Εικόνες 11, 12**. Και στις δύο περιπτώσεις, δεσμεύονται στη ζώνη 3 αυτόλογα IgGs, τα οποία αναγνωρίζονται από φαγοκύτταρα. Στους ανθρώπους, τα υπεύθυνα φαγοκύτταρα είναι κυρίως τα κύτταρα Kupffer στο ήπαρ (Beutler 2010).

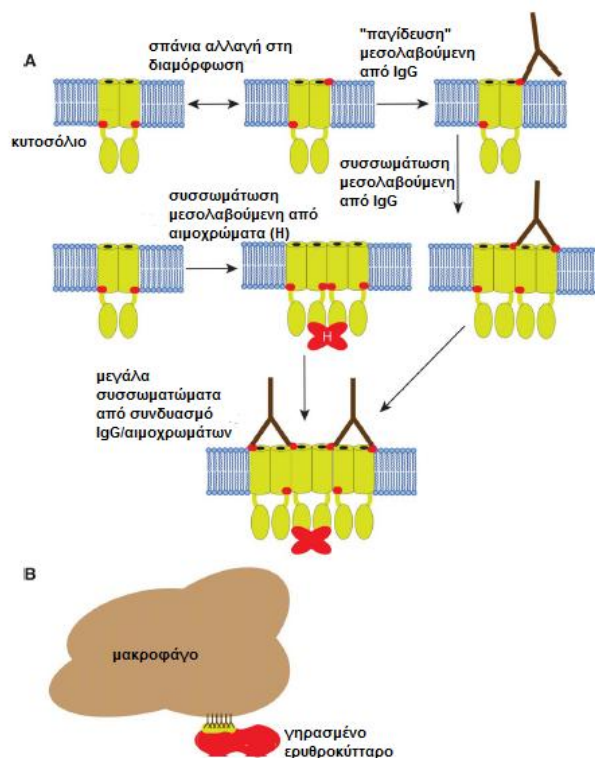


Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση δημιουργίας νέο-αντιγόνου γήρανσης μέσω θραύσης. (Ανατύπωση από Lars Kaestner and Anna Bogdanova 2014)



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση δημιουργίας νέο-αντιγόνου γήρανσης μέσω ολιγομερισμού. (Ανατύπωση από Pantaleo et al., 2008)

Ένα πρόσφατο μοντέλο συνδυάζει τις μελέτες σηματοδότησης της γήρανσης και την κρυσταλλική δομή της ζώνης 3. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η ζώνη 3, κατά την λειτουργία της ως αντιγοντοανταλλάκτης, υφίσταται ταχείες αλλαγές στη διαμόρφωσή της στη λιπιδική διπλοστιβάδα. Συγκεκριμένα, μια περιοχή της ζώνης 3 μπορεί να βρεθεί και κυτταροπλασματικά και εξωκυττάρια (σπανιότερα). Όταν βρεθούν τα αμινοξέα αυτά εξωκυττάρια και δεν επιστρέφουν στην κυτταροπλασματική πλευρά, δημιουργούν μια αντιγονική θέση προσβάσιμη στα αυτο-αντισώματα. Μόλις δεσμευτεί ένα αντίσωμα, η ζώνη 3 θα «παγιδευτεί» στη συγκεκριμένη δομή. Τα αντισώματα μπορούν να φέρουν κοντά μόρια ζώνης 3 κι έτσι να υπάρξει ολιγομερισμός της πρωτεΐνης αυτής στη μεμβράνη. Στην κυτταροπλασματική πλευρά, τα αιμοχρώματα θα ενισχύσουν τη συσσωμάτωση μορίων ζώνης 3 στη μεμβράνη και τελικά τα συσσωματώματα ζώνης 3 θα ξεπεράσουν ένα όριο μεγέθους και βαθμού οψωνισμού και τα ερυθροκύτταρα θα αναγνωριστούν από μακροφάγα ως γηρασμένα (Badior and Casey 2018) (**Εικόνα 13**).



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου γήρανσης λόγω αλλαγής της διαμόρφωσης της ζώνης 3 (Ανατύπωση από Badior and Casey, 2018)

A5.4 Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης

Η διατήρηση της ασυμμετρίας της λιπιδικής διπλοστιβάδας και ιδιαίτερα της παρουσίας της φωσφατιδυλοσερίνης στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης είναι πολλή σημαντική για την επιβίωση του ερυθροκυττάρου. Έχει παρατηρηθεί σε *in vitro* πειράματα πως η ερυθροκυτταρική προκασπάση 3 σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες ενεργοποιείται και οδηγεί σε τροποποίηση της ζώνης 3 και σε εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (Mandal et al. 2002). Πιθανώς, ένας παρόμοιος μηχανισμός λειτουργεί και *in vivo* στα γηρασμένα κύτταρα, καθώς έχουν ανιχνευθεί μόρια ενεργής κασπάσης 3 και 8 και σχηματισμός συμπλέγματος Fas σε λιπιδικές σχεδίες (Mandal et al. 2005). Η πλειονότητα των εξωκυττάρων κυστιδίων που προέρχονται από ερυθροκύτταρα φέρει εξωτερικευμένη φωσφατιδυλοσερίνη (Willekens et al. 2008). Επίσης, αρκετές είναι οι αιματολογικές ασθένειες που οδηγούν στην έκθεσή της. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και την ισχυρή θρομβογενετική επίδραση της εξωτερικευμένης φωσφατιδυλοσερίνης, είναι πιθανή η συμμετοχή της στη γήρανση και την απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων σε συνθήκες στρες, όχι όμως σαν βασικός μηχανισμός ερυθροκυτταρικής γήρανσης (Antonellou et al. 2010).

A5.5 Μονοπάτι Συσχετιζόμενο με το CD47

Η CD47, η οποία προστατεύει το ερυθροκύτταρο από φαγοκυττάρωση, φαίνεται να υπολειπεται ή/και να δίνει αντίθετη σηματοδότηση στα γηρασμένα κύτταρα. Η παρουσία της στα συγκεκριμένα ερυθροκύτταρα είναι μειωμένη και μάλιστα η στερεοδιαμόρφωσή της τροποποιημένη. Στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα η θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1) δεσμεύεται στην τροποποιημένη CD47 και δημιουργείται μια νέα θέση πρόσδεσης για τον υποδοχέα SIRPα, η οποία πλέον δίνει σήμα εκκαθάρισης από τα φαγοκύτταρα (Burger et al. 2012).

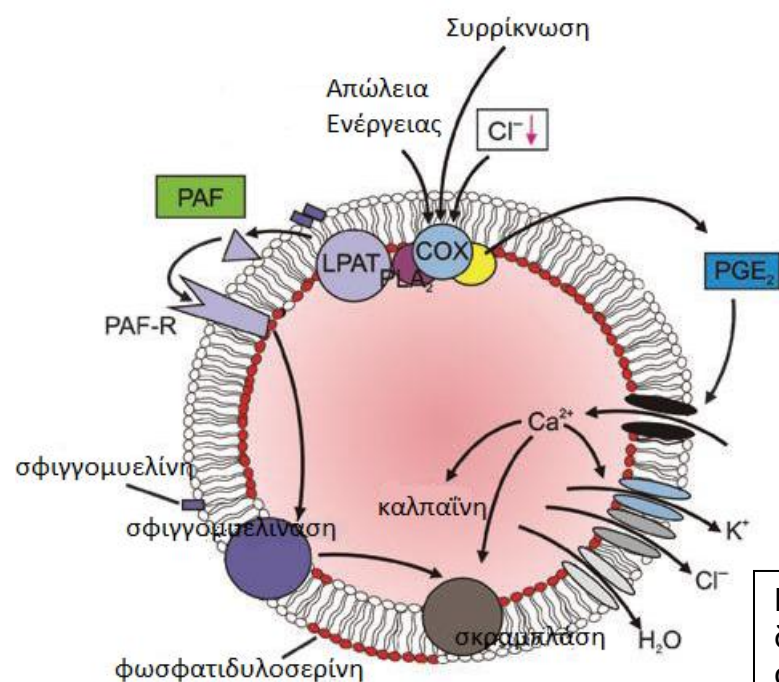
A6. Ερυθρόπτωση

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα ερυθροκύτταρα κυκλοφορούν στον οργανισμό για περίπου 120 ημέρες και στη συνέχεια απομακρύνονται μέσω της διαδικασίας της γήρανσης. Υπάρχουν όμως καταστάσεις που οδηγούν στην πρόωρη απομάκρυνσή τους από την κυκλοφορία μέσω μιας μορφής κυτταρικού θανάτου που ονομάζεται ερυθρόπτωση. Αυτός ο τύπος κυτταρικού θανάτου μπορεί να επέλθει λόγω βλάβης στο ερυθροκύτταρο, οξειδωτικού στρες, εξάντλησης ενεργειακού αποθέματος

κ.α. Η συρρίκνωση του κυττάρου, η φυσαλιδοποίηση της μεμβράνης και η έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης αποτελούν τα βασικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που υφίστανται ερυθρόπτωση (Lang et al. 2005).

Η βασική αιτία της ερυθρόπτωσης είναι η αύξηση του κυτοσολικού ασβεστίου. Τα ιόντα ασβεστίου εισέρχονται στο ερυθροκύτταρο μέσω μη επιλεκτικών (nonselective) καναλιών κατιόντων που ενεργοποιούνται από την προσταγλανδίνη E_2 (PGE_2). Η ενδοκυττάρια αύξηση ασβεστίου οδηγεί στην ενεργοποίηση ασβεστιοεξαρτώμενων καναλιών K^+ , σε υπερπόλωση της μεμβράνης και τελική απομάκρυνση χλωριούχου καλίου από το ερυθροκύτταρο. Το γεγονός αυτό, οδηγεί σε συρρίκνωση το κύτταρο (Lang et al. 2012). Επίσης ενεργοποιείται η ασβεστιοεξαρτώμενη καλπαΐνη και πρωτεολύει τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, οδηγώντας στην φυσαλιδοποίηση της μεμβράνης (Lang et al. 2007). Λόγω της σμίκρυνσης του κυττάρου απελευθερώνεται ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί μια ερυθροκυτταρική σφιγγομυελινάση οδηγώντας στην παραγωγή κεραμιδίου. Το κεραμίδιο στη συνέχεια ενεργοποιεί μια σκραμπλάση που τελικά οδηγεί στην εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης. Η εξωτεριευμένη φωσφατιδυλοσερίνη αναγνωρίζεται από υποδοχείς στην επιφάνεια φαγοκυττάρων και τελικά το ερυθροκύτταρο φαγοκυτταρώνεται (Lang et al. 2005) (**Εικόνα 14**).

Η διαδικασία της ερυθρόπτωσης μπορεί να επαχθεί από διάφορα εξωγενή ή ενδογενή μόρια, όπως είναι ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, η προσταγλανδίνη E_2 και η βιταμίνη K, αλλά και από το οσμωτικό και οξειδωτικό στρες, την εξάντληση των αποθεμάτων ενέργειας και την αύξηση της θερμοκρασίας. Όσο πιο γηρασμένο είναι το ερυθροκύτταρο, τόσο πιο πιθανή είναι η επαγωγή της ερυθρόπτωσης. Κάποιοι ανασταλτικοί παράγοντες για την ερυθρόπτωση είναι η αδενοσίνη, η καφεΐνη και η ουρία, καθώς και η ερυθροποιητίνη (Repsold and Joubert 2018).



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της ερυθρόπτωσης (Ανατύπωση από Lang et al., 2006)

A7. Αποθήκευση και Αποθηκευτική Βλάβη Ερυθροκυττάρων

Τα ερυθροκύτταρα αποτελούν το πιο συχνά μεταγγιζόμενο συστατικό αίματος παγκοσμίως, επομένως η βέλτιστη συλλογή και διατήρησή τους μετά την αιμοληψία είναι ιδιαίτερα σημαντική. Τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα φαίνεται να επηρεάζονται από τα χαρακτηριστικά του δότη, το χρόνο και τις συνθήκες της αποθήκευσης.

A7.1 Συνθήκες Αποθήκευσης

Οι μονάδες συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων παράγονται μετά από φυγοκέντρηση ολικού αίματος και απομάκρυνση του πλάσματος, ενώ συνήθως είναι λευκαφαιρεμένες. Στη συνέχεια προστίθενται συντηρητικά διαλύματα (CPD) με σκοπό την βελτίωση και επιμήκυνση της *ex vivo* ζωής των ερυθροκυττάρων. Το διάλυμα CPD περιέχει κιτρικά, φωσφορικά και δεξτρόζη. Το πιο συχνό προσθετικό διάλυμα στα συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα είναι το SAGM, στο οποίο εμπεριέχονται αλατούχο διάλυμα, αδενίνη, γλυκόζη και μαννιτόλη (D'Alessandro et al. 2010). Στην Ελλάδα, εκτός από την περίπτωση πολυμεταγγιζόμενων και άλλων ευπαθών ατόμων, δε χρησιμοποιείται το διάλυμα CPD/SAGM, αλλά το CPDA που περιέχει κιτρικά, φωσφορικά, δεξτρόζη και αδενίνη. Τα ερυθροκύτταρα σε CPDA αποθηκεύονται μέχρι και 35 μέρες, ενώ σε CPD/SAGM μέχρι και 42, κυρίως χάρη στη δράση της μαννιτόλης (D'Amici et al. 2012).

Τα κιτρικά λειτουργούν ως αντιπηκτικός παράγοντας, καθώς συμπλοκοποιούν τα ιόντα ασβεστίου στο πλάσμα σχηματίζοντας άλας κιτρικού οξέος. Έτσι αποτρέπεται η δράση του μηχανισμού πήξης του αίματος (Knight 2012). Τα φωσφορικά μειώνονται γρήγορα κατά την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων, επομένως η παροχή τους είναι σημαντική για τη διατήρηση της παραγωγής ATP. Για τον ίδιο λόγο προστίθεται και αδενίνη (Hess 2006). Η δεξτρόζη, το D-ισομερές της γλυκόζης, όπως και η ίδια η γλυκόζη, αποτελούν θρεπτικό για τον μεταβολισμό των ερυθροκυττάρων (Knight 2012). Το αλατούχο διάλυμα είναι σημαντικό για τη ρύθμιση του pH, το οποίο μεταβάλλεται κατά την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων λόγω της συσσώρευσης των παραγώγων του μεταβολισμού του ερυθροκυττάρου (Hess and Greenwalt 2002). Τέλος, η μαννιτόλη είναι ένα σάκχαρο με αντιοξειδωτική δράση, καθώς καταπολεμά τις δραστικές ρίζες και σταθεροποιεί τη μεμβράνη (Hess 2006).

A7.2 Αποθηκευτική Βλάβη

Τα ερυθροκύτταρα είναι κατασκευασμένα από τη φύση τους με τέτοιο τρόπο ώστε να επιβιώνουν στους 37°C παρουσία πλάσματος και απουσία οποιουδήποτε αντιπηκτικού. Είναι, επομένως, αναμενόμενο η αποθήκευσή τους στους 4°C, όντας πλάσμαφαιρεμένα και λευκαφαιρεμένα να παρουσιάζει κάποια προβλήματα. Αρκετά είναι τα φυσιολογικά και βιοχημικά μονοπάτια που επηρεάζονται από την αποθήκευση και ως εκ τούτου τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα διαφέρουν αρκετά όταν συγκρίνονται με τα κυκλοφορούντα (Tissot et al. 2017). Το σύνολο των βιοχημικών, μηχανικών και μεμβρανικών μεταβολών στις οποίες υπόκεινται τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα και επηρεάζουν την επιβίωση και λειτουργία τους μετά την μετάγγιση ονομάζεται αποθηκευτική βλάβη και βασικό αποτέλεσμά της είναι η αιμόλυση εντός του ασκού (Obrador et al. 2015).

A7.2.1 Βιοχημικές Αλλαγές

Η φωσφοφρουκτοκινάση, βασικό ένζυμο του μονοπατιού Embden-Meyerhoff, κατά την αποθήκευση αναστέλλεται από τα ιόντα υδρογόνου, των οποίων η συγκέντρωση αυξάνεται όσο συνεχίζει η συσσώρευση γαλακτικού οξέος. Η προοδευτική αναστολή του ενζύμου αυτού και κατ'επέκταση της γλυκόλυσης οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή ATP. Το ATP είναι απαραίτητο για τη λειτουργία καναλιών της μεμβράνης, τη μεμβρανική σταθερότητα, την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες και τη διατήρηση της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας. Επομένως κατά την αποθήκευση τα σχετιζόμενα με το ATP μονοπάτια επηρεάζονται (Tavazzi et al. 2000). Το ATP μετά τη μετάγγιση επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα και οι μορφολογικές μεταβολές που προκαλούνται εξαιτίας της έλλειψής του στα ερυθροκύτταρα είναι ως επί το πλείστον αναστρέψιμες (Kor et al. 2009).

Το 2,3-DPG ελαττώνεται τόσο γρήγορα κατά την αποθήκευση, που εντός δύο εβδομάδων δεν είναι πλέον ανιχνεύσιμο (Bennett-Guerrero et al. 2007). Η έλλειψή του αυξάνει τη συγγένεια δέσμευσης του οξυγόνου στην αιμοσφαιρίνη και θεωρητικά προκαλεί πρόβλημα στην παροχή οξυγόνου στους ιστούς από τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα. Όμως, η *de novo* σύνθεσή του ξεκινά λίγες ώρες μετά τη μετάγγιση και ανακτά τα φυσιολογικά του επίπεδα εντός τριών ημερών (Heaton et al. 1989).

Το μονοξειδίο του αζώτου παράγεται από το ενδοθήλιο και έχει αγγειοδιασταλτική δράση, επομένως παίζει σημαντικό ρόλο στη μικροκυκλοφορία. Επιπλέον, μπορεί να δεσμευτεί σε κάποια μόρια αιμοσφαιρίνης, και έτσι τα ερυθροκύτταρα να ρυθμίσουν τα ίδια την ροή του αίματος μέσω ρύθμισης των επιπέδων μονοξειδίου του αζώτου σε καταστάσεις υποξίας. Κατά την αποθήκευση, η βιοδιαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου μειώνεται. Επίσης, η εξωκυτταρική, ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και τα μικροκυστίδια που περιέχουν αιμοσφαιρίνη δεσμεύουν πολύ ταχύτερα NO σε σχέση με την αιμοσφαιρίνη του ερυθροκυττάρου. Όπως θα αναλυθεί παρακάτω, κατά την αποθήκευση αυξάνονται τα επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης καθώς και η κυστιδιοποίηση. Ως αποτέλεσμα στη μονάδα μετάγγισης υπάρχει ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και μικροκυστίδια με αιμοσφαιρίνη, τα οποία δεσμεύουν NO. Αυτές οι αλλαγές εμποδίζουν τη φυσιολογική παροχή οξυγόνου από τα ερυθροκύτταρα στην μικροκυκλοφορία και μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στο δέκτη, για παράδειγμα θρομβωτικά επεισόδια (Rinalducci and Zolla 2015).

Η πτώση του pH, λόγω της συσσώρευσης γαλακτικού οξέος μέσω του μονοπατιού γλυκόλυσης, είναι εμφανής στις αποθηκευμένες μονάδες ερυθροκυττάρων. Είναι μάλιστα υπεύθυνη για τη μείωση του ATP και του 2,3-DPG που προαναφέρθηκαν (Adams et al. 2015).

A7.2.2 Μηχανικές Αλλαγές

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης τα ερυθροκύτταρα υπόκεινται σε προοδευτική αλλαγή του σχήματός τους από δισκοειδές σε εχينوκυτταρικό και τελικά σφαιροεχينوκυτταρικό. Η τελευταία αλλαγή σχήματος είναι μη αναστρέψιμη, καθώς οφείλεται σε μεγάλη απώλεια μεμβρανικού υλικού και καθιστά τα κύτταρα υποψήφια για απομάκρυνση μετά τη μετάγγιση στον δέκτη. Οι αλλαγές αυτές στο σχήμα επηρεάζουν τη ροή των ερυθροκυττάρων στα τριχοειδή αγγεία και οδηγούν σε μείωση της οξυγόνωσης των ιστών (Berezina et al. 2002).

A7.2.3 Μεμβρανικές Αλλαγές

Λόγω της οξειδωτικής καταπόνησης κατά την αποθήκευση, η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών της μεμβράνης αποτελεί μια από τις βασικές μεμβρανικές μεταβολές. Η καρβονυλίωση μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια λειτουργίας, θραύση ή συσσωμάτωση των πρωτεϊνών και τελικά να διαταραχθεί η ακεραιότητα της μεμβράνης (Kriebardis et al. 2006). Ένα παράδειγμα είναι η ζώνη 3, που -όπως συμβαίνει και στην *in vivo* γήρανση των ερυθροκυττάρων- μέσω θραύσης ή συσσωμάτωσης τροποποιείται και αναγνωρίζεται από τις ανοσοσφαιρίνες G (Kriebardis et al. 2007a).

Τα λιπίδια υπόκεινται σε προοδευτική υπεροξειδωση κατά την αποθήκευση, γεγονός που αλλοιώνει τα συστατικά της μεμβράνης, ελαττώνει τη σταθερότητά της και μεταβάλλει το σχήμα του ερυθροκυττάρου (Chaudhary and Katharia 2012). Επιπλέον, στη μεμβράνη των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων, εξωτερικεύεται φωσφατιδυλοσερίνη, και μάλιστα το ποσοστό της φαίνεται να σχετίζεται με την αιμόλυση και την κυστιδιοποίηση εντός της μονάδας μετάγγισης (Dinkla et al. 2014).

Η παραγωγή μικροκυστιδίων, πλούσιων σε αιμοσφαιρίνη και πρωτεΐνες που έχουν υποστεί βλάβη, λειτουργεί ως ένας μηχανισμός απομάκρυνσης τοξικών συστατικών από τα ερυθροκύτταρα, με σκοπό την επιμήκυνση της ζωής τους. Παρ' όλα αυτά, ο προστατευτικός αυτός μηχανισμός οδηγεί σε απώλεια μεμβράνης από το κύτταρο και τελικά σε μεταβολή του σχήματος και της ικανότητας παραμόρφωσής του (Kriebardis et al. 2008).

A7.3 Δείκτες Γήρανσης Αποθηκευμένων Ερυθροκυττάρων

Εντός της μονάδας μετάγγισης τα μονοπάτια γήρανσης των ερυθροκυττάρων τροποποιούνται. Η ομοιόσταση διαταράσσεται από την έκθεση σε μειωμένη θερμοκρασία και την απουσία μηχανισμών εκκαθάρισης που απαιτούν τη συνύπαρξη των ερυθροκυττάρων με άλλα κύτταρα. Η παρουσία κυτταρικών αποβλήτων δυσχεραίνει επιπλέον την κατάσταση των κυττάρων. Όλα τα παραπάνω επιταχύνουν τη διαδικασία της γήρανσης (Antonellou and Seghatchian 2016).

Τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν προοδευτικά ορισμένα από τα τυπικά σήματα γήρανσης και ερυθροφαγοκυττάρωσης (Bosman et al. 2010). Σημαντικό παράδειγμα αποτελεί η ζώνη 3, όλες οι σχετιζόμενες με τη γήρανση μεταβολές της οποίας έχουν παρατηρηθεί στα αποθηκευμένα κύτταρα (Kriebardis et al. 2007a, b).

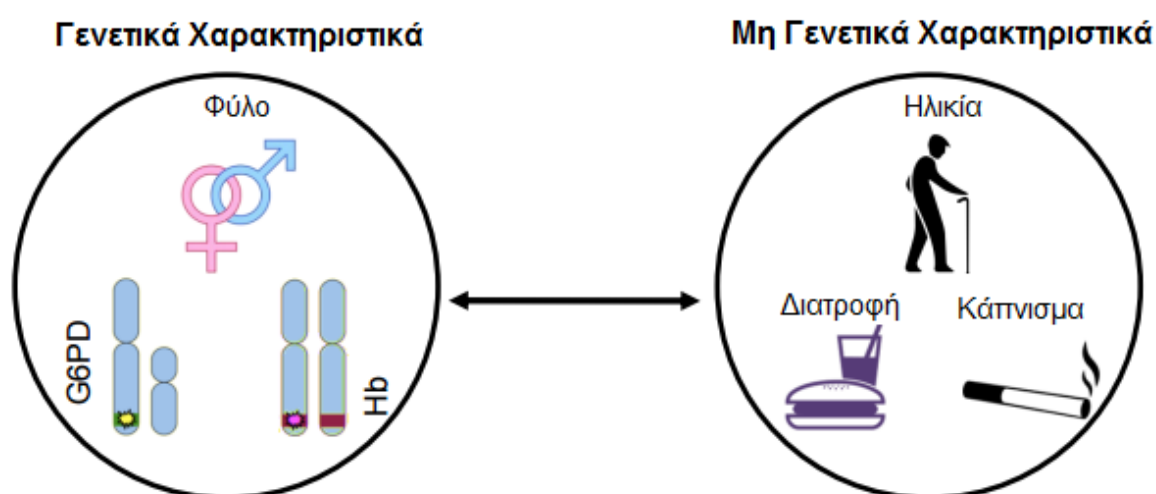
Τα γηραιότερα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν απώλεια του δείκτη CD47, αλλαγή που τα καθιστά, πιθανώς, πιο επιρρεπή σε εκκαθάριση μετά τη μετάγγιση (Geldwerth et al. 1993). Ο συγκεκριμένος δείκτης εαυτού έχει επιπλέον ανιχνευθεί σε ελεύθερα κυστίδια (Bosman et al. 2008a). Πέραν της απώλειας, έχει παρατηρηθεί και τροποποίηση της πρωτεΐνης αυτής, καθιστώντας την ικανή να προσδένει θρομβοσπονδίνη-1 και μετατρέποντάς τη σε σήμα για φαγοκυττάρωση (Burger et al. 2012).

A8. Παράγοντες που Επηρεάζουν την Ποιότητα και Αποδοτικότητα των Αποθηκευμένων Ερυθροκυττάρων

Η βελτιστοποίηση των μεταγγίσεων απαιτεί τον προσδιορισμό των παραγόντων εκείνων που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την αποθηκευτική βλάβη του ερυθροκυττάρου. Μέχρι τώρα έχει αποσαφηνιστεί η συμμετοχή της διάρκειας της αποθήκευσης (García-Roa et al. 2017), του πλαστικοποιητή που χρησιμοποιείται στη μονάδα μετάγγισης (Simmchen et al. 2012), της σύστασης και ποσότητας του πρόσθετου συντηρητικού διαλύματος (Tissot et al. 2017), της λευκαφαίρεσης (Zimmermann et al. 2009), καθώς και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του αιμοδότη (Tzounakas et al. 2016a). Επιπλέον, είναι σήμερα γνωστή κι η συμμετοχή χαρακτηριστικών του δέκτη στην αποδοτικότητα της μετάγγισης (Roubinian et al. 2019).

A8.1 Επίδραση Εγγενών Χαρακτηριστικών του Δότη

Η επίδραση των εγγενών χαρακτηριστικών του δότη αναφέρεται σε όλες τις ουσιαστικές διαφορές μεταξύ αιμοδοτών όσον αφορά στην αποθηκευτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων τους και την ανάκτηση αυτών μετά τη μετάγγιση. Μάλιστα, φαίνεται πως ο παράγοντας αυτός ευθύνεται περισσότερο απ' όλους τους προαναφερθέντες όσον αφορά στην αιμόλυση εντός του ασκού (Hess et al. 2009). Επιπλέον, τα χαρακτηριστικά του δότη σχετίζονται με την αποδοτικότητα μεταφοράς οξυγόνου, τα επίπεδα ATP, την μεμβρανική ευθραυστότητα και την συσσώρευση βιοδεικτών οξειδωτικού στρες (Tzounakas et al. 2016c). Οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στο γενετικό υπόβαθρο ή στον τρόπο ζωής των ατόμων, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15**.



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση των εγγενών (γενετικών και μη) χαρακτηριστικών του αιμοδότη που μπορεί να επηρεάσουν την αποθηκευτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων (Ανατύπωση από Tzounakas et al, 2015)

A8.1.1 Γενετικοί Παράγοντες

Γενετικοί παράγοντες που καθορίζουν τη διάρκεια ζωής, τη γεωμετρία, τη δομική σταθερότητα, το μεταβολισμό και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ερυθροκυττάρου, οι οποίοι ποικίλουν μεταξύ των αιμοδοτών, μπορεί να έχουν σημαντικό ρόλο στην αποθηκευτική ικανότητα του ερυθροκυττάρου, λόγω των επιπλέον στρεσογόνων ερεθισμάτων που δέχεται *ex vivo*.

Το φύλο και οι φύλο-εξαρτώμενες διαφορές αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα εγγενών χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την αντοχή του ερυθροκυττάρου στη μονάδα μετάγγισης. Όσον αφορά στην ανθεκτικότητα των ερυθροκυττάρων, έχειδειχθεί πως εντός της μονάδας, τα ερυθροκύτταρα των γυναικών είναι πιο ανθεκτικά σε οσμωτικό (Kanias et al. 2011), μηχανικό (Raval et al. 2010) και οξειδωτικό στρες (Kanias et al. 2016), καθώς αιμολύονται λιγότερο και τα λιπίδια της μεμβράνης τους υφίστανται σε μικρότερο βαθμό οξείδωση σε σχέση με αυτά των ανδρών. Πιθανώς για τα παραπάνω ευθύνονται οι ορμόνες του φύλου, που φαίνεται να παίζουν προστατευτικό ρόλο (DeVenuto and Wilson 1976). Έχει μάλισταδειχθεί πως ο δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας είναι υψηλότερος σε μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σχέση με προ-εμμηνοπαυσιακές, εύρημα που ενισχύει την αντίληψη για την προστατευτική δράση των ορμονών του φύλου (Raval et al. 2011). Επιπλέον, είναι γνωστό πως υπάρχουν λειτουργικοί υποδοχείς οιστρογόνων στα ερυθροκύτταρα (Vona et al. 2019). Αρκετές διαφορές στις αιματολογικές και βιοχημικές παραμέτρους μεταξύ ανδρών και γυναικών *in vivo*, θα μπορούσαν να έχουν αντίκτυπο στην αποθηκευτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων. Ο αιματοκρίτης και ο αριθμός των ερυθροκυττάρων είναι υψηλότερος στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες, ομοίως και η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης (Murphy et al. 2010). Επιπλέον, ο σίδηρος και οι δείκτες ομοιόστασής του (φερριτίνη, τρανσφερίνη), έχουν χαμηλότερες τιμές στις γυναίκες (Ueno et al. 1991). Ένας ακόμη παράγοντας του οποίου η συγκέντρωση διαφέρει μεταξύ των δύο φύλων είναι το ουρικό οξύ, το οποίο επίσης είναι χαμηλότερο στις γυναίκες (Mateos Antón et al. 1986) και θεωρείται δείκτης της αποθηκευτικής ικανότητας του ερυθροκυττάρου (Tzounakas et al. 2018).

Μεταλλαγές σε ένζυμα που σχετίζονται με το μεταβολισμό του ερυθροκυττάρου έχουν βρεθεί επίσης να επηρεάζουν την αποθηκευτική ικανότητά του. Τα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (λόγω της έμμεσης συμμετοχής του ενζύμου στην παραγωγή της) και επομένως ανεπαρκείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Arese and De Flora 1990). Έχειδειχθεί πως τα ερυθροκύτταρα των συγκεκριμένων αιμοδοτών είναι πιο επιδεκτικά σε αιμόλυση και οξειδωτική καταπόνηση μετά τη μετάγγιση, αλλά τα άτομα που φέρουν την εν λόγω μεταλλαγή αποτελούν καλούς δέκτες, καθώς η έκθεσή τους σε χρόνιο οξειδωτικό στρες καθιστά τα ερυθροκύτταρά τους ικανά να διαχειριστούν αποτελεσματικότερα την επαφή με μακράς αποθηκευτικής περιόδου υγιή ερυθροκύτταρα που έχουν υποστεί οξειδωτικές βλάβες (Tzounakas et al. 2016b).

Οι ετερόζυγοι φορείς μεταλλαγών β-μεσογειακής αναιμίας με φυσιολογικά επίπεδα αιμοσφαιρίνης αποτελούν σημαντικό ποσοστό των τακτικών αιμοδοτών στις Μεσογειακές και άλλες χώρες. Τα ερυθροκύτταρά τους παρουσιάζουν ουσιαστικές διαφορές σε σχέση με αυτά του γενικού πληθυσμού, οι οποίες θα μπορούσαν να βελτιώσουν ή επιδεινώσουν την αποθηκευτική τους ικανότητα. Οι χαμηλότεροι δείκτες MCV, MCH, MCHC και PCV, τα υψηλότερα επίπεδα HbA₂, HbF (Sanghani and Haldankar 2006) και διαλυτών αλυσίδων α-αιμοσφαιρίνης (Rouyer-Fessard et al. 1990), το αυξημένο οξειδωτικό στρες, η ελαττωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (Adhiyanto et al. 2014), η ατελής ικανότητα παραμόρφωσης (Vayá et al. 2003), η διαφοροποιημένη έκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών (Rouyer-Fessard et al. 1990) και η δομή της διπλοστιβάδας (HILLIER et al. 1956) είναι ορισμένα από τα χαρακτηριστικά που διαφοροποιούνται στο συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο. Ορισμένα από αυτά, όπως η προβληματική ικανότητα παραμόρφωσης και το οξειδωτικό στρες μπορεί να επιδεινωθούν κατά την αποθήκευση και να οδηγήσουν σε μη αποδοτική μετάγγιση. Επιπροσθέτως, τα ερυθροκύτταρα των φορέων β-μεσογειακής αναιμίας χαρακτηρίζονται από δημιουργία συμπλόκων αιμοσφαιρίνης με σκελετικές πρωτεΐνες λόγω οξείδωσης (Fortier et al. 1988),

καθώς και αυξημένη συγκέντρωση ενεργής κασπάσης-3 (Ficarra et al. 2009) κι επομένως εντονότερης πρωτεόλυσης της ζώνης 3 (Mandal et al. 2003), δύο συνθήκες που σχετίζονται με τη γήρανση των ερυθροκυττάρων (Kay et al. 1989; Berpu et al. 1990). Τέλος, έχειδειχθεί πως η φωσφορυλίωση της ζώνης 3 είναι αυξημένη στη συγκεκριμένη ομάδα αιμοδοτών (Pantaleo et al. 2010). Η μετα-μεταφραστική αυτή τροποποίηση του ανιοντοανταλλάκτη είναι ικανή να οδηγήσει σε μη αντιστρεπτές μεταβολές στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα, όπως διατάραξη της συνδεσιμότητας της ζώνης 3 με τα υπόλοιπα συστατικά της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού, καθώς και κυστιδιοποίηση (Azouzi et al. 2018). Από την άλλη μεριά, τα συγκεκριμένα ερυθροκύτταρα διαθέτουν κάποιες ιδιομορφίες που μπορεί να ευνοήσουν την αποθηκευτική τους ικανότητα. Η ιδιαίτερη γεωμετρία τους, με υψηλότερο του συνηθισμένου λόγο επιφάνειας προς όγκο (Schrier et al. 1989), καθώς και η διαπερατότητα της μεμβράνης τους σε κατίοντα, τα καθιστά ανθεκτικότερα στην οσμωτική καταπόνηση. Τα ερυθροκύτταρα των συγκεκριμένων αιμοδοτών είναι λιγότερο επιρρεπή στη συσσωμάτωση (Falcó et al. 2003), επομένως ίσως είναι ικανά να αποφύγουν τη συσσωμάτωση που επάγεται από την αποθήκευση (Hovav et al. 1999). Τέλος, η συνεχής, ήπια οξειδωτική καταπόνηση τους, μπορεί να τα εξοπλίσει με υψηλότερη αντοχή στο συγκεκριμένο είδος στρες.

A8.1.2 Μη Γενετικοί Παράγοντες

Η οργανισμική γήρανση αποτελεί έναν παράγοντα που μπορεί να επηρεάσει την αποθηκευτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων. Η ερυθροκυτταρική γήρανση επιταχύνεται στα γηρασμένα άτομα (Bosman et al. 2008b), καθώς παρατηρείται αυξημένη δέσμευση ανοσοσφαιρινών G στη ζώνη 3 (Kay 2005), πρωτεόλυση αυτής και μετακίνηση της καλπαΐνης στη μεμβράνη (Glaser et al. 1994). Τα γηρασμένα άτομα με επαρκή συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, που είναι δηλαδή ικανά να συμμετέχουν στη διαδικασία της αιμοδοσίας, συνήθως παρουσιάζουν υψηλό αριθμό δικτυοερυθροκυττάρων, τα οποία είναι επιρρεπή σε λύση (Glass et al. 1985). Τα μειωμένα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (Gil et al. 2006), αντιοξειδωτικών ενζύμων (Ceballos-Picot et al. 1992) και κλαστερίνης (Antonellou et al. 2011), καθώς και τα παθολογικά αυξημένα επίπεδα οξειδωτικών βλαβών στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη των ερυθροκυττάρων των γηρασμένων ατόμων (Ando et al. 1999) οδηγούν σε ελλιπή αντιοξειδωτική ικανότητα. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η κυστιδιοποίηση στα κυκλοφορούντα ερυθροκύτταρα (Gustafson et al. 2015), καθώς και η αιμόλυση εντός της μονάδας μετάγγισης (A. et al. 2014) αυξάνονται συναρτήσει της ηλικίας του δότη.

Τα ερυθροκύτταρα των καπνιστών εκτίθενται σε πολύ υψηλά επίπεδα οξειδωτικών παραγόντων και τοξινών, που μπορεί να τους προκαλέσουν βλάβες. Τα κύτταρά τους χαρακτηρίζονται από μειωμένη ικανότητα παραμόρφωσης (Norton and Rand 1981), αυξημένη οσμωτική ευθραυστότητα (Li and Chen 2014), επιδεκτικότητα σε οξειδωτική λύση (Asgary et al. 2005), καθώς και μειωμένη ενζυμική αντιοξειδωτική ικανότητα (Codandabany 2000). Στο πλάσμα τους είναι έντονη η ύπαρξη δραστικών ριζών οξυγόνου και αζώτου (Li and Chen 2014) καθώς και καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών (Colombo et al. 2012), ενώ είναι μειωμένη η συγκέντρωση ασκορβικού οξέος (Brown et al. 1997). Όλα τα παραπάνω προδιαθέτουν για ανεπαρκή αντιοξειδωτική ικανότητα των κυττάρων αυτών. Παρ' όλα αυτά, είναι πιθανό να έχουν ευνοηθεί από τη συνεχή τους έκθεση σε οξειδωτικό στρες (όπως αναφέρθηκε και για τα κύτταρα των ετερόζυγων για β-μεσογειακή αναιμία) και να μπορούν να ανταποκριθούν επαρκώς σε αυτό (Pannuru et al. 2011). Προκαταρκτική έρευνα που μελέτησε τη μετάγγιση ερυθροκυττάρων καπνιστών σε ασθενείς έδειξε μικρότερη διόρθωση αιματοκρίτη και αιμοσφαιρίνης συγκριτικά με ασθενείς που έλαβαν ερυθροκύτταρα μη-καπνιστών, επομένως η αποδοτικότητα της μετάγγισης ενδέχεται να επηρεάζεται από το κάπνισμα (DeSimone et al. 2019).

Οι διατροφικές συνήθειες εντός της πληθώρας των αιμοδοτών διαφέρουν και αποτελούν έναν ακόμη παράγοντα που σχετίζεται με το αποθηκευτικό προφίλ των ερυθροκυττάρων. Η διατροφή με κυρίαρχα τα λιπαρά γεύματα έχειδειχθεί πως επηρεάζει τα αντιοξειδωτικά του πλάσματος (Prior et al. 2007), την κατανομή των ορμονών του φύλου μεταξύ του πλάσματος (del Mar Romero et al. 2012) και των ερυθροκυττάρων, καθώς και την ίδια την ερυθροκυτταρική μεμβράνη (Vidgren et al. 1997).

Όλα αυτά ενισχύουν το συμπέρασμα πως τα ερυθροκύτταρα από παχύσαρκους αιμοδότες πιθανώς να μην ανταποκρίνονται επαρκώς στην καταπόνηση της αποθήκευσης.

A8.2 Ποικιλομορφία των Χαρακτηριστικών του Δέκτη

Η ποικιλομορφία που επικρατεί στα χαρακτηριστικά των αιμοδοτών, μπορεί να φανεί εντονότερα μετά τη μετάγγιση, όταν δηλαδή συνδυαστεί με την αντίστοιχη ποικιλομορφία στα χαρακτηριστικά των δεκτών (Tzounakas et al. 2016c). Ποικίλες μελέτες στηρίζουν την ανάγκη για εξατομίκευση της μετάγγισης, καθώς τα παράγωγα αίματος από διαφορετικούς δότες ενδέχεται να έχουν ξεχωριστή μετα-μεταγγισιακή απόκριση ανάλογα με τον υποψήφιο δέκτη.

Μια μετα-μεταγγισιακή ανάλυση σε μεγάλο δείγμα ανθρώπων (N=3806) κατέληξε στο συμπέρασμα πως το φύλο του δότη και του δέκτη σχετίζεται με τη θνησιμότητα μετά τη μετάγγιση. Όταν ο δότης είναι γυναίκα και ο δέκτης άντρας η συσχέτιση με τη θνησιμότητα είναι θετική, ενώ όταν και οι δύο πλευρές είναι γυναίκες είναι αρνητική (Middelburg et al. 2011). Μια ακόμη μετα-μεταγγισιακή ανάλυση σε ανθρώπους, ενίσχυσε το συμπέρασμα των Middelburg et al, πως όταν και ο δότης και ο μεταγγιζόμενος είναι γένους θυλικού η θνησιμότητα είναι μειωμένη, και επιπλέον έδειξε πως όταν ο δότης είναι άνδρας και ο δέκτης γυναίκα, όταν δηλαδή υπάρχει αναντιστοιχία στο φύλο δότη/δέκτη, η πιθανότητα θνησιμότητας είναι για ακόμη μια φορά αυξημένη (Heddle et al. 2019). Το συμπέρασμα αυτό είναι αντίθετο με το αποτέλεσμα άλλης μεγάλης μελέτης, που έδειξε πως η επιβίωση μετά τη μετάγγιση δε σχετίζεται με το φύλο του δότη και του δέκτη (Desmarets et al. 2016).

Επιπλέον, τα άτομα με β-μεσογειακή αναιμία που δέχονται μονάδες μετάγγισης με ερυθροκύτταρα με καλή ικανότητα παραμόρφωσης, χρειάζονται σπανιότερα μεταγγίσεις σε σχέση με εκείνα που δέχονται ερυθροκύτταρα μειωμένης ικανότητας παραμόρφωσης, καθώς έχει βρεθεί πως υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της παραμορφωσιμότητας των ερυθροκυττάρων του δότη με τη διόρθωση της αιμοσφαιρίνης (ΔHb) μετά τη μετάγγιση (Barshtein et al. 2017). Η ίδια ομάδα έδειξε επίσης πως η βελτίωση της κυκλοφορίας του αίματος και των επιπέδων αιματοκρίτη στους ασθενείς με β-μεσογειακή αναιμία είναι ανάλογη της διαφοράς της ικανότητας παραμόρφωσης μεταξύ των ερυθροκυττάρων του δέκτη και της μονάδας μετάγγισης (Barshtein et al. 2016).

Συμπερασματικά, μπορεί το σύνολο των διαφορετικών συνδυασμών χαρακτηριστικών του δέκτη και του δότη να είναι ιδιαίτερα μεγάλο, εντούτοις η επίδραση και των δύο στην έκβαση της μετάγγισης αναδεικνύεται ιδιαίτερα σημαντική.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν:

(α) Η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας του σώματος καθώς και του πλάσματος του δέκτη στην οξειδωτική και αιμολυτική κατάσταση ερυθροκυττάρων πρώιμης (ημέρας 2), μέσης (ημέρας 21) και προχωρημένης (ημέρας 42) αποθήκευσης, τις πρώτες ώρες μετά τη μετάγγιση σε *in vitro* μοντέλο.

(β) Η καταμέτρηση αιμοδοτών με μεταλλαγές στο γονίδιο της β-σφαιρίνης σε ετεροζυγωτία και ο συγκριτικός έλεγχος αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων δειγμάτων αίματός τους πριν την επεξεργασία και αποθήκευσή τους, σε σχέση με άτομα-μάρτυρες.

B. Υλικά και Μέθοδοι

B1. Όργανα και Αντιδραστήρια

B1.1 Συσκευές και Όργανα

- Φωτόμετρο (ZEISS)
- Φθορισμόμετρο (BIO-RAD)
- Κλίβανος
- Ψυχόμενη Επιτραπέζια Φυγόκεντρος Heraeus, κεφαλή #3344
- Ηλεκτρονικός Ζυγός (KERN PRS 320-3)
- Ηλεκτρονικό Πεχάμετρο
- Επιτραπέζια Φυγόκεντρος Eppendorf, 5410
- Πιπέτες Τύπου Gilson
- Κυτταρόμετρο (BD FACsCan)
- Φωτόμετρο ELISA (ASYS Jupiter)
- Αιματολογικός αναλυτής, Sysmex K-4500 (ROCHE)
- Βιοχημικός αναλυτής ηλεκτρολυτών, Elecsys Systems Analyzer (ROCHE)
- Βιοχημικός αναλυτής, (HITACHI 902)

B1.2 Χημικά Αντιδραστήρια

- Οξικό οξύ
- Οξικό νάτριο
- Ασκορβικό οξύ
- 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), SIGMA
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Ουρικήση, SIGMA
- Αντιδραστήριο Bradford, BIO-RAD
- Annexin-V Fluos, ROCHE
- CM- H_2DCFDA , INVITROGEN
- Φθορίζοντα σφαιρίδια, Megamix – Biocytex
- Δοκιμαστικοί σωλήνες με σφαιρίδια TruCount™, BD Biosciences
- tert-Butyl hydroperoxide (tBHP), SIGMA
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Γλυκόζη
- Υδροχλωρικό οξύ
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl)
- Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2)
- Hepes
- Πυροσταφυλικό νάτριο
- Phosphate Buffer Saline tablets (PBS)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS)

B1.3 Κιτ Εμπορίου

- Nitric oxide detection kit (ELISA), Cusabio
- Human clusterin detection kit (ELISA), BioVendor
- Plasma protein carbonylation kit (ELISA), BioCell Corp

B1.4 Αναλώσιμα

- Eppendorfs διαφόρων όγκων

- Κυβέτες φασματοφωτομέτρου (SIGMA)
- Κυβέτες φθορισμόμετρου
- Αλουμινόχαρτο
- Σύριγγες
- Βελόνες αιμοληψίας (19G)
- Μεταλλικά σφαιρίδια
- Ακροφύσια για πιπέτες τύπου Gilson

B2. Εργαστηριακές Μέθοδοι

B2.1 Μέτρηση Ελεύθερης Αιμοσφαιρίνης

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μέγιστη απορρόφηση της αιμοσφαιρίνης στα 415nm και γίνεται στο πλάσμα. Ταυτόχρονα, μέτρηση επιτελείται στα 380nm και στα 450nm για να πραγματοποιηθεί διόρθωση της τελικής απορρόφησης, καθώς στα 415nm απορροφούν κι άλλες ουσίες του υπερκειμένου (αλβουμίνη, χολερυθρίνη κ.α.). Τα επιλεγμένα μήκη κύματος αντιστοιχούν στα μέγιστα απορρόφησης των προαναφερθέντων συστατικών. Έτσι τελικά με τον μαθηματικό τύπο **Hb (mg/100ml) = [(167,2xA₄₁₅) – (83,6xA₃₈₀) – (83,6xA₄₅₀)] x 1/1000 x αρραίωση (σε dH₂O) x 100** μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης.

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

1. Φυγοκέντρηση ολικού αίματος στα 1000xg για 10 λεπτά
2. Συλλογή πλάσματος/υπερκειμένου και μεταφορά σε νέο σωλήνα
3. Φυγοκέντρηση πλάσματος/υπερκειμένου στα 1000xg για 10 λεπτά
4. Συλλογή υπερκειμένου
5. Αραίωση υπερκειμένου 1:10 σε απεσταγμένο νερό (dH₂O)
6. Επώαση δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά
7. Φωτομέτρηση δείγματος στα μήκη κύματος: 380nm, 415nm και 450nm
8. Υπολογισμός ελεύθερης αιμοσφαιρίνης

B2.2 Οσμωτική Ευθραυστότητα Ερυθροκυττάρων

Η μέθοδος βασίζεται στο φαινόμενο της όσμωσης. Το ισότονο περιβάλλον για ένα ερυθροκύτταρο αντιστοιχεί στα 310mOsm (0,9% διάλυμα NaCl) και όσο πιο υπότονο είναι το περιβάλλον, τόσο το κύτταρο διογκώνεται λόγω εισόδου νερού. Κάθε ερυθροκύτταρο παρουσιάζει το δικό του όριο αντοχής στην αύξηση του όγκου του και επομένως διαρρηγνύεται η μεμβράνη του σε διάλυμα διαφορετικής οσμωμοριακότητας. Με τη λύση του κυττάρου μεταφέρονται τα συστατικά του, εκ των οποίων το κύριο είναι η αιμοσφαιρίνη, στο διάλυμα. Στη διαδικασία αυτή, γίνεται μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης σε ερυθροκύτταρα που δέχονται πίεση διαφορετικής οσμωτικής έντασης.

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

1. Αραίωση αίματος 1:100 με NaCl
2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά
3. Φυγοκέντρηση στα 500xg για 5 λεπτά
4. Φωτομέτρηση υπερκειμένου σε μήκος κύματος 540nm
5. Υπολογισμός δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας (MCF) (όπου MCF = η συγκέντρωση NaCl που αντιστοιχεί σε αιμόλυση του 50% των κυττάρων)

B2.3 Μηχανική Ευθραυστότητα Ερυθροκυττάρων

Η συγκεκριμένη μέθοδος ελέγχει την αντοχή των ερυθροκυττάρων στη μηχανική καταπόνηση. Τα ερυθροκύτταρα υπόκεινται σε μηχανικό στρες όταν διέρχονται από τα τριχοειδή αγγεία. Με τη μέθοδο αυτή, μετράται η αιμοσφαιρίνη που απελευθερώνεται μετά τη λύση των ερυθροκυττάρων λόγω

μηχανικού στρες. Φυσικά, λαμβάνεται υπόψη και η συνολική ενδοκυττάρια αιμοσφαιρίνη του δείγματος, ώστε να υπολογιστεί το ποσοστό των ερυθροκυττάρων που λύνονται.

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

1. Φυγοκέντρηση δείγματος στα 1000xg
2. Αραίωση πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων σε αιματοκρίτη 20%
3. Μέτρηση της ενδοκυττάριας αιμοσφαιρίνης με τη μέθοδο μέτρησης ελεύθερης αιμοσφαιρίνης (Harboe)
4. Διαχωρισμός του υπόλοιπου δείγματος σε 2 σωλήνες εκ των οποίων ο ένας περιέχει μεταλλικά σφαιρίδια
5. Τοποθέτηση στους 4°C για 1 ώρα υπό ανάδευση σε ειδική συσκευή.
6. Φυγοκέντρηση στα 2750xg για 15 λεπτά, στους 4°C
7. Συλλογή υπερκείμενου
8. Φυγοκέντρηση υπερκείμενου στα 20.800xg για 20 λεπτά, στους 4°C
9. Μέτρηση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης (Harboe) στα υπερκείμενα κάθε δείγματος
10. Υπολογισμός δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας (MFI) μέσω του τύπου:
$$\frac{[(PF \text{ Hb}_{\text{rocked}} - PF \text{ Hb}_{\text{control}})]}{(Hb_{\text{aliquot}} - PF \text{ Hb}_{\text{control}})} \times 100$$
, όπου $PF \text{ Hb}_{\text{rocked}}$ η μέση τιμή ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο των δειγμάτων που αναδεύθηκαν με τα σφαιρίδια (rocked-R), $PF \text{ Hb}_{\text{control}}$ η μέση τιμή της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο των δειγμάτων που δεν αναδεύθηκαν (non rocked-NR) και Hb_{aliquot} η μέση τιμή της ενδοκυττάριας αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων σε αιματοκρίτη 20%.

B2.4 Μέτρηση Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας Πλάσματος

Η μέθοδος μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος, βασίζεται στην αναγωγή τρισθενούς σιδήρου προς δισθενή από τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά του πλάσματος, όπως είναι το ουρικό και το ασκορβικό οξύ. Ο τριχλωριούχος σίδηρος (FeCl_3) σχηματίζει σύμπλοκο με το χρωμογόνο τριπυριδυλοτριαζίνη (TPTZ) και μόλις αναχθεί, γίνεται αποσυμπλοκοποίηση, απελευθερώνεται το χρωμογόνο και προκύπτει έγχρωμο προϊόν το οποίο ανιχνεύεται φωτομετρικά. Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ουρικού οξέος στο πλάσμα, απαιτείται η χρήση ουρικής η οποία οξειδώνει το ουρικό, κι έτσι η δράση αυτού δεν προσμετράται.

Η πειραματική διαδικασία είναι η εξής:

1. 40μL πλάσματος επωάζονται με ουρική
2. Σε 1,2ml αντιδραστήριου FRAP (ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος- FeCl_3 -TPTZ) προστίθενται 40μL πλάσμα (με και χωρίς ουρική) και γίνεται ανάδευση
3. Ακολουθεί επώαση σε κλίβανο στους 37°C για 4 λεπτά
4. Το έγχρωμο προϊόν φωτομετρείται σε μήκος κύματος 593nm

B2.5 Επίπεδα Δραστικών Ριζών Οξυγόνου

Η μέθοδος της μέτρησης επιπέδων ενδοκυττάριας δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) πραγματοποιείται με την προσθήκη του παράγοντα CMH_2DCFDA . Πρόκειται για λιπόφιλο εστέρα που εισέρχεται εντός του κυττάρου, κόβεται από εστεράσες, οξειδώνεται από τα ενδοκυττάρια ROS και φθορίζει. Έτσι, τα επίπεδα φθορισμού που τελικά μετράμε είναι ανάλογα της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των ROS.

Η πειραματική διαδικασία είναι η εξής:

1. Προσθήκη 5-10μM αντιδραστήριου CMH_2DCFDA στα ερυθροκύτταρα
2. Επώαση των δειγμάτων σε σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ανάδευση για 30 λεπτά.
3. Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη PBS

4. Επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ανάδευση για 12 λεπτά.
5. Λύση κυττάρων με προσθήκη 1mL ddH₂O
6. Τα επίπεδα φθορισμού των δειγμάτων μετρώνται στο φθορισμόμετρο (μήκος κύματος διέγερσης:490nm, μήκος κύματος εκπομπής:520nm)

Ο επιπλέον έλεγχος της επιδεκτικότητας των ερυθροκυττάρων σε εξωγενή οξειδωτικά ερεθίσματα, είναι δυνατός μετά από επώαση των ερυθροκυττάρων με οξειδωτικούς παράγοντες. Στη συγκεκριμένη εργασία ελέγχθηκε η απόκριση των ερυθροκυττάρων στην οξειδωτική καταπόνηση που προκαλείται από τους παράγοντες tert-Butyl hydroperoxide (tBHP) και διαμίδιο.

B2.6 Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης

Η ανίχνευση της εξωτερικευμένης φωσφατιδυλοσερίνης πραγματοποιείται με κυτταρομετρία ροής και η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

1. Επώαση αραιωμένου δείγματος ερυθροκυττάρων με αννεξίνη V και με αντίσωμα έναντι γλυκοφορίνης A (CD235) επισημασμένων με διαφορετικά φθορισμοχρώματα
2. Έλεγχος για παρουσία διπλά θετικών κυττάρων (αννεξίνη V⁺/CD235⁺)
3. Ποσοτικοποίηση κυττάρων που εξωτερικεύουν PS με χρήση δοκιμαστικών σωλήνων γνωστής συγκέντρωσης φθορίζοντων σφαιριδίων (TruCount™)

B2.7 Επίπεδα Μονοξειδίου του Αζώτου

Η μέτρηση μονοξειδίου του αζώτου έγινε με κατάλληλο kit ELISA, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (Cusabio). Στην μέθοδο ELISA εκμεταλλευόμαστε την πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος ώστε να ανιχνευθεί συγκεκριμένο αντιγόνο ή αντίσωμα στο δείγμα. Μπορεί να γίνει ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, μετά από σήμανση του μορίου που μελετάμε (με φθορίζουσες ουσίες, ένζυμα, ραδιενέργεια). Στη συγκεκριμένη εργασία η ανίχνευση έγινε φωτομετρικά μετά από αντίδραση με χρωμογόνο.

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

1. Προσθήκη δειγμάτων και πρότυπων διαλυμάτων σε μικροπλάκα 96 θέσεων επικαλυμμένη με ειδικό αντίσωμα έναντι μονοξειδίου του αζώτου (NO)
2. Προσθήκη πολυκλωνικού αντισώματος έναντι NO, σημασμένου με βιοτίνη
3. Προσθήκη αβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση (HRP)
4. Εισαγωγή υποστρώματος TMB (3,3',5,5' tetramethyl-benzidine) για την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης
5. Προσθήκη θειικού οξέος
6. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 450nm.
7. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης και χρήση της για εύρεση συγκέντρωσης NO στα δείγματα

B2.8 Ποσοτικοποίηση Κλαστερίνης

Η ανίχνευση κλαστερίνης έγινε φωτομετρικά με χρήση κατάλληλου kit ELISA, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (Bio Vendor).

Η πειραματική διαδικασία είναι η εξής:

1. Προσθήκη δειγμάτων και πρότυπων διαλυμάτων σε μικροπλάκα 96 θέσεων επικαλυμμένη με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι κλαστερίνης
2. Προσθήκη δευτερογενούς μονοκλωνικού αντισώματος σημασμένου με βιοτίνη
3. Προσθήκη στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση (HRP)
4. Εισαγωγή υποστρώματος TMB (3,3',5,5' tetramethyl-benzidine) για την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης

5. Προσθήκη οξικού οξέος
6. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 450nm
7. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης και χρήση της για εύρεση συγκέντρωσης κλαστερίνης στα δείγματα

B2.9 Έλεγχος Επιπέδων Καρβονυλιωμένων Πρωτεϊνών

Η μέτρηση των επιπέδων καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών έγινε φωτομετρικά με χρήση κατάλληλου κιτ ELISA, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (BioCell Corp).

Η πειραματική διαδικασία είναι η εξής:

1. Προσθήκη δειγμάτων και πρότυπων διαλυμάτων σε μικροπλάκα 96 θέσεων μετά από αντίδρασή τους με δινιτροφαινυλϋδραζίνη (DNP)
2. Αφαίρεση της περίσσειας DNP
3. Προσθήκη βιοτινυλιωμένου αντισώματος έναντι της DNP
4. Προσθήκη στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση (HRP)
5. Εισαγωγή υποστρώματος TMB (3,3',5,5' tetramethyl-benzidine) για την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης
6. Προσθήκη τριχλωροξικού οξέος
7. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 450nm
8. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης και χρήση της για εύρεση των επιπέδων των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών στα δείγματα

B2.10 Πειράματα Ανασύστασης

Μέσω των συγκεκριμένων πειραμάτων είναι δυνατή η μελέτη της επίδρασης (α) παραγόντων του πλάσματος του δέκτη και (β) της μετάβασης σε φυσιολογική θερμοκρασία σώματος (37°C) σε αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα τα οποία προορίζονται για μετάγγιση. Δείγματα απομονωμένων αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων αναμιγνύονται με πλάσμα δέκτη το οποίο έχει εμπλουτιστεί με υπερκείμενο της μονάδας σε αναλογία που αντιστοιχεί στη χορήγηση 2 μονάδων μετάγγισης. Ο τελικός αιματοκρίτης του δείγματος που έχει ανασυσταθεί κυμαίνεται μεταξύ 35-40% και οι συνθήκες επώασης αντιστοιχούν σε 37°C για ποικίλα χρονικά διαστήματα με μέγιστο τις 24 ώρες μετά την ανάμιξη. Η ανάμιξη πραγματοποιείται αφού το αποθηκευμένο δείγμα παραμείνει για 30 με 50 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, όπως ακριβώς συμβαίνει στις περιπτώσεις μετάγγισης.

B3. Στατιστική Ανάλυση – Ανάλυση Δικτύων

Για τη στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences, έκδοση 22.0 για Windows). Οι διαφορές ανάμεσα σε επιμέρους ομάδες δειγμάτων ελέγχθηκαν μέσω t-test για ανεξάρτητα δείγματα και ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one way analysis of variance, ANOVA). Για τον εντοπισμό πιθανών συσχετίσεων ανάμεσα σε διαφορετικές παραμέτρους πραγματοποιήθηκαν οι έλεγχοι Pearson and Spearman ανάλογα με την κανονική ή μη κανονική κατανομή των εξεταζόμενων παραμέτρων. Σε κάθε ανάλυση που αναφέρθηκε πραγματοποιήθηκαν όλοι οι απαραίτητοι έλεγχοι όσον αφορά στις προϋποθέσεις χρήσης του επιλεγμένου μοντέλου. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά για $p < 0,05$ ή $p < 0,01$.

Η ανάλυση δικτύων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Cytoscape (έκδοση 3.2.0) το οποίο ενδείκνυται για την οπτικοποίηση και την ανάλυση βιολογικών δικτύων συσχετίσεων και αλληλεπιδράσεων (Assenov et al. 2008). Ως δεδομένα εισόδου χρησιμοποιήθηκαν αιματολογικές, βιοχημικές και βιολογικές παράμετροι ανάμεσα στις οποίες ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις. Οι τιμές του δείκτη συσχέτισης R καθόρισαν το μήκος των συνδέσεων μεταξύ των παραμέτρων (μεγαλύτερη τιμή R – μικρότερη απόσταση παραμέτρων). Για να ελαχιστοποιηθεί η

πιθανότητα ενσωμάτωσης ψευδώς θετικών (πλην στατιστικά σημαντικών) συσχετίσεων στα δίκτυα, απορρίφθηκαν περιπτώσεις συνδέσεων με συντελεστή συσχέτισης μικρότερο του 0,25 ($R < 0,25$).

Γ. Αποτελέσματα

Γ1. Επίδραση Θερμοκρασίας και Πλάσματος στις Ιδιότητες Ερυθροκυττάρων Διαφορετικής Ηλικίας Αποθήκευσης 24 Ώρες μετά την Ανασύσταση με Φυσιολογικό Πλάσμα σε *in vitro* Μοντέλο Μετάγγισης

Χρησιμοποιήθηκε δείγμα από 5 μονάδες μετάγγισης ερυθροκυττάρων με διάλυμα CPD-SAGM και πλάσμα από 22 υγιείς αιμοδότες. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν ακολουθώντας τον σχεδιασμό ανασύστασης που αναλύθηκε στην προηγούμενη παράγραφο και επωάστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε τις ημέρες 7, 21 και 42 της αποθηκευτικής περιόδου και εν συνεχεία μετρήθηκαν τα επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, οσμωτικής και μηχανικής ευθραυστότητας, καθώς και τα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS. Με τον τρόπο αυτό μελετήθηκε η επίδραση της προσομοίωσης των συνθηκών της μετάγγισης στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα. Για να μπορέσουμε να μελετήσουμε αποκλειστικά την επίδραση των παραγόντων του πλάσματος, σε κάθε ομάδα δειγμάτων τοποθετήθηκε και δείγμα από την εκάστοτε μονάδα μετάγγισης χωρίς ανασύσταση. Το δείγμα αυτό αποτελεί τον εσωτερικό μάρτυρα του πειράματος.

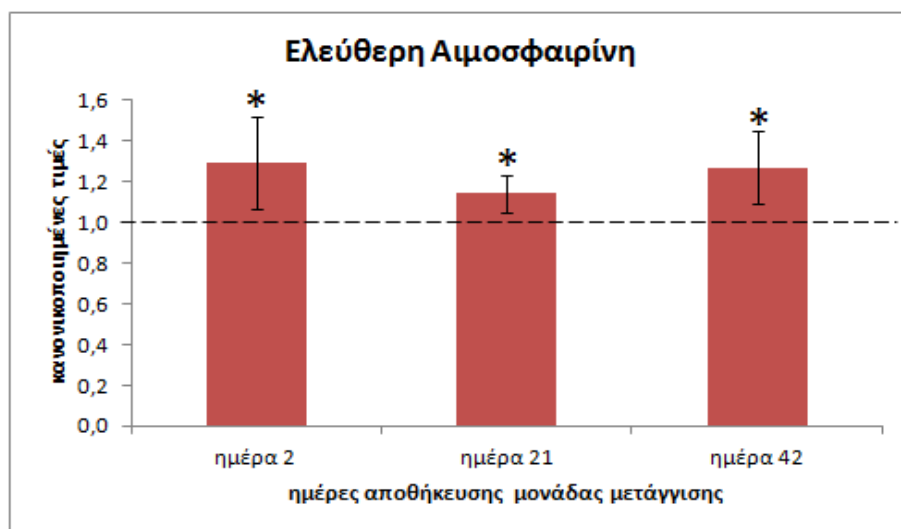
Γ1.1 Επίδραση Προσομοίωσης Συνθηκών Μετάγγισης (θερμοκρασία και πλάσμα)

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των συνθηκών της *in vitro* μετάγγισης, τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τις αντίστοιχες μετρήσεις σε δείγματα προερχόμενα από τη μονάδα μετάγγισης χωρίς επιπλέον επεξεργασία. Οι τιμές που ακολουθούν αντιστοιχούν στους μέσους όρους των δειγμάτων για κάθε μέτρηση μετά από την προαναφερθείσα κανονικοποίηση. Επιπλέον έχει υπολογιστεί η τυπική απόκλιση και σε όλα τα γραφήματα που ακολουθούν σημειώνεται μια διακεκομμένη γραμμή που συμβολίζει 7 τίπεδα της εκάστοτε παραμέτρου εντός της μονάδας μετάγγισης.

(α) Μέτρηση Ελεύθερης Αιμοσφαιρίνης

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις που προέκυψαν από τη μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο των δειγμάτων στο πέρας 24 ωρών μετά την διαδικασία της *in vitro* μετάγγισης. Είναι κανονικοποιημένες ως προς την τιμή εντός της μονάδας αποθήκευσης (4°C) την ίδια αποθηκευτική χρονική στιγμή. Ακολουθεί και το αντίστοιχο γράφημα.

Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη	ημέρα 2	ημέρα 21	ημέρα 42
	1,293±0,227	1,142±0,091	1,268±0,179



Διάγραμμα 1: Απεικόνιση των τιμών της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στα ανασυσταμένα δείγματα κατά τις διάφορες ημέρες της αποθηκευτικής περιόδου.

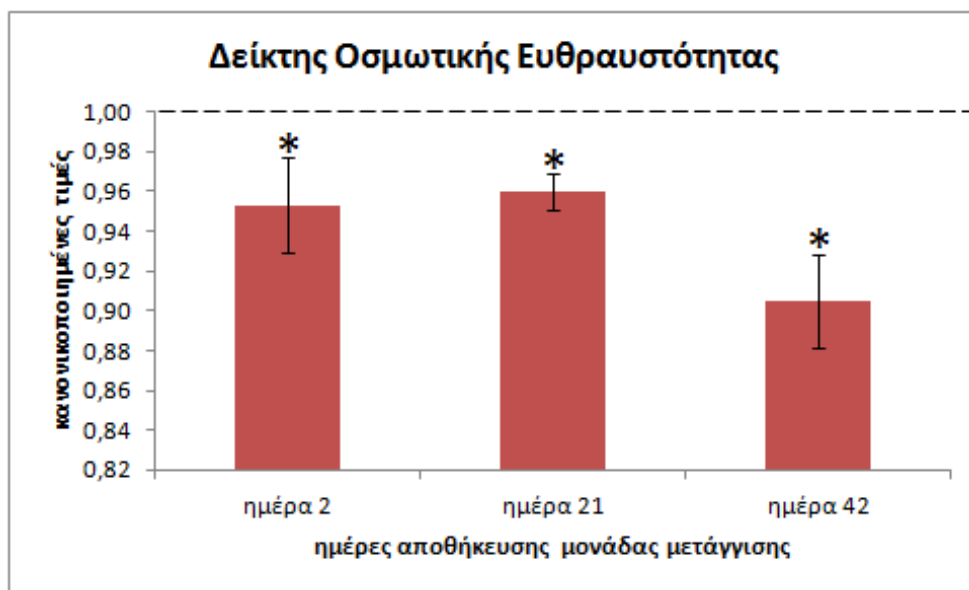
- ➔ Τιμή στη μονάδα μετάγγισης (4°C)
* ➔ Στατιστικά σημαντικές διαφορές

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική, πλην μικρή, αύξηση των επιπέδων της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης για όλες τις ημέρες αποθήκευσης στα δείγματα που έχουν υποστεί την *in vitro* διαδικασία μετάγγισης. Οι τιμές τυπικής αποκλίσης είναι σχετικά μεγαλύτερες στις ημέρες 7 και 42.

(β) Μέτρηση Οσμωτικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις που προέκυψαν από τη μέτρηση της οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων στο πέρας 24 ωρών μετά την διαδικασία της *in vitro* μετάγγισης. Είναι κανονικοποιημένες ως προς την τιμή εντός της μονάδος αποθήκευσης (4°C) την ίδια αποθηκευτική χρονική στιγμή. Ακολουθεί το αντίστοιχο γράφημα.

Δείκτης Οσμωτικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων (MCF)	ημέρα 2	ημέρα 21	ημέρα 42
	0,953±0,024	0,96±0,009	0,905±0,023



Διάγραμμα 2: Απεικόνιση των τιμών του δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας (MCF) στα ανασυσταμένα δείγματα κατά τις διάφορες ημέρες της αποθηκευτικής περιόδου. Παρουσιάζονται και οι τυπικές αποκλίσεις.

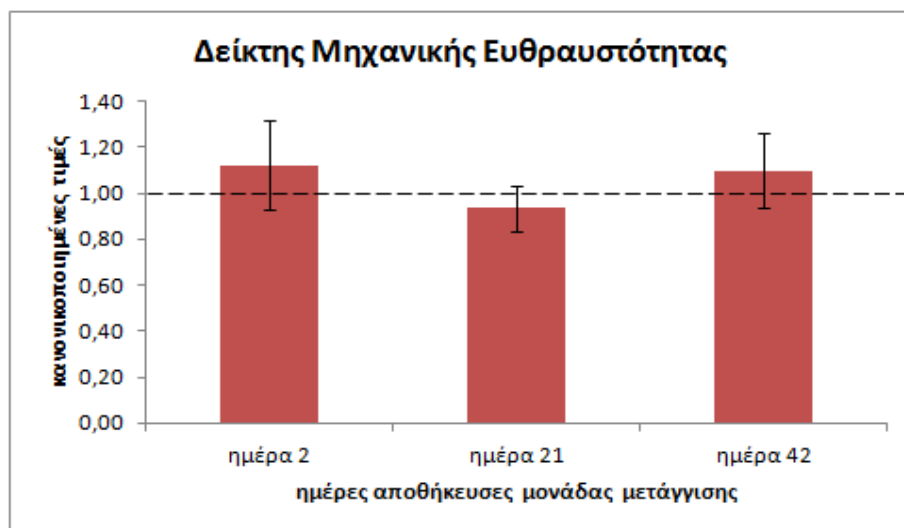
- ➔ Τιμή στη μονάδα μετάγγισης (4°C)
 * ➔ Στατιστικά σημαντικές διαφορές

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική ελάττωση του δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας (MCF) μετά τη διαδικασία της *in vitro* μετάγγισης σε όλες τις ημέρες αποθήκευσης της μονάδας μετάγγισης που μελετήθηκαν. Προς το τέλος της αποθηκευτικής περιόδου (ημέρα 42) εντοπίζεται η μέγιστη μείωση.

(γ) Μέτρηση Μηχανικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων

Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις που προέκυψαν από τη μέτρηση της μηχανικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων 24 ώρες μετά την διαδικασία της *in vitro* μετάγγισης. Είναι κανονικοποιημένες ως προς την τιμή εντός της μονάδος αποθήκευσης (4°C) την ίδια αποθηκευτική χρονική στιγμή.

Δείκτης Μηχανικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων (MFI)	ημέρα 2	ημέρα 21	ημέρα 42
	1,123±0,195	0,934±0,101	1,097±0,163



Διάγραμμα 3: Απεικόνιση των τιμών του δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων (MFI) στα δείγματα 24 ώρες μετά τη διαδικασία της *in vitro* μετάγγισης για τις ημέρες της αποθηκευτικής περιόδου που μελετήθηκαν.

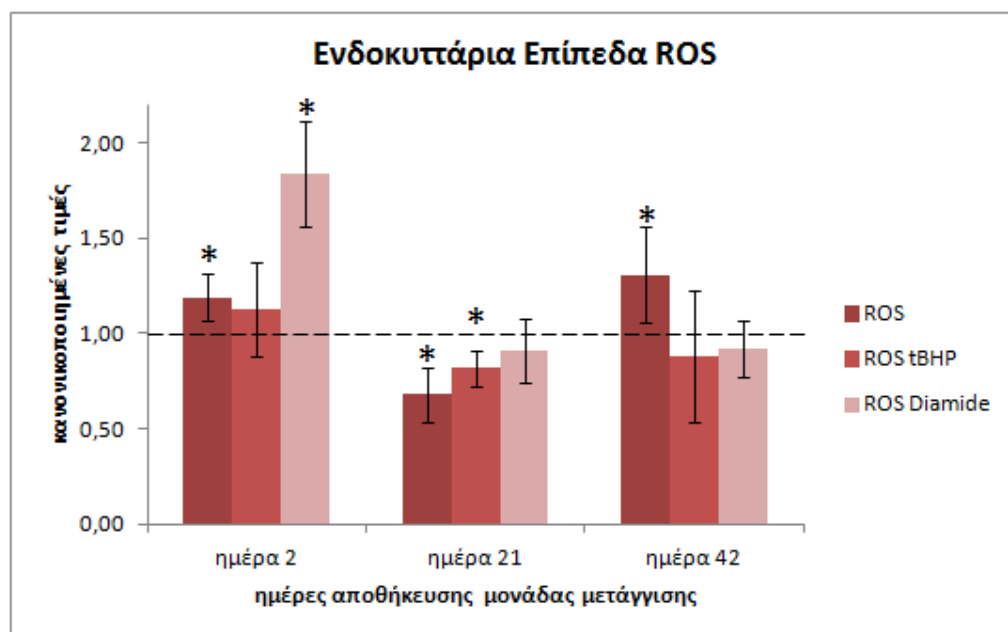
----- → Τιμή στη μονάδα μετάγγισης (4°C)

Όσον αφορά στο δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας, παρατηρείται μια τάση για αύξησή του στα δείγματα 24 ώρες μετά την ανασύσταση για τις ημέρες 2 και 42 της αποθηκευτικής περιόδου και μια οριακή ελάττωσή του για την ημέρα 21.

(δ) Μέτρηση Ενδοκυττάριων Επιπέδων ROS

Τα επίπεδα των ενδοκυττάριων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) μετρήθηκαν με και χωρίς την επίδραση των οξειδωτικών παραγόντων tBHP και διαμίδιο. Οι μέσοι όροι από τα κανονικοποιημένα αποτελέσματα, καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και στο γράφημα που ακολουθεί.

	ημέρα 2	ημέρα 21	ημέρα 42
ROS	1,189±0,125	0,681±,143	1,306±0,251
ROS tBHP	1,126±0,250	0,819±0,093	0,876±0,345
ROS Diamide	1,838±0,274	0,91±0,166	0,917±0,148



Διάγραμμα 4: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων των ενδοκυττάριων ROS με ή χωρίς την επίδραση εξωγενών οξειδωτικών παραγόντων στα ανασυσταμένα δείγματα.

----- → Τιμή στη μονάδα μετάγγισης (4°C)

* → Στατιστικά σημαντικές διαφορές

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως για τις ημέρες 2 και 42, τα δείγματα που έχουν ανασυσταθεί έχουν αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάρων ROS σε σχέση με την κατάσταση εντός της μονάδας μετάγγισης. Το αντίθετο συμβαίνει για τα δείγματα της ημέρας 21 όπου φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων των δραστικών ριζών. Μετά από επίδραση με τον οξειδωτικό παράγοντα tBHP στα δείγματα της ημέρας 2 παρουσιάζεται τάση για αύξηση των ROS, ενώ στα δείγματα της ημέρας 21 και 42 μια σχετική μείωση που την ημέρα 21 είναι και στατιστικά σημαντική. Όλες οι συγκρίσεις γίνονται πάντα μεταξύ των δειγμάτων που έχουν υποστεί τη διαδικασία *in vitro* μετάγγισης και της αντίστοιχης κατάστασης εντός της μονάδας μετάγγισης στους 4°C. Όσον αφορά στην επίδραση με το διαμίδιο, η αύξηση των ενδοκυττάρων ROS στα δείγματα της ημέρας 2 φαίνεται έντονα στο διάγραμμα και είναι στατιστικά σημαντική, ενώ στα δείγματα των δύο άλλων ημερών παρατηρείται μια τάση για μείωση των επιπέδων ROS στα ανασυσταμένα δείγματα σε σχέση με την αρχική κατάσταση.

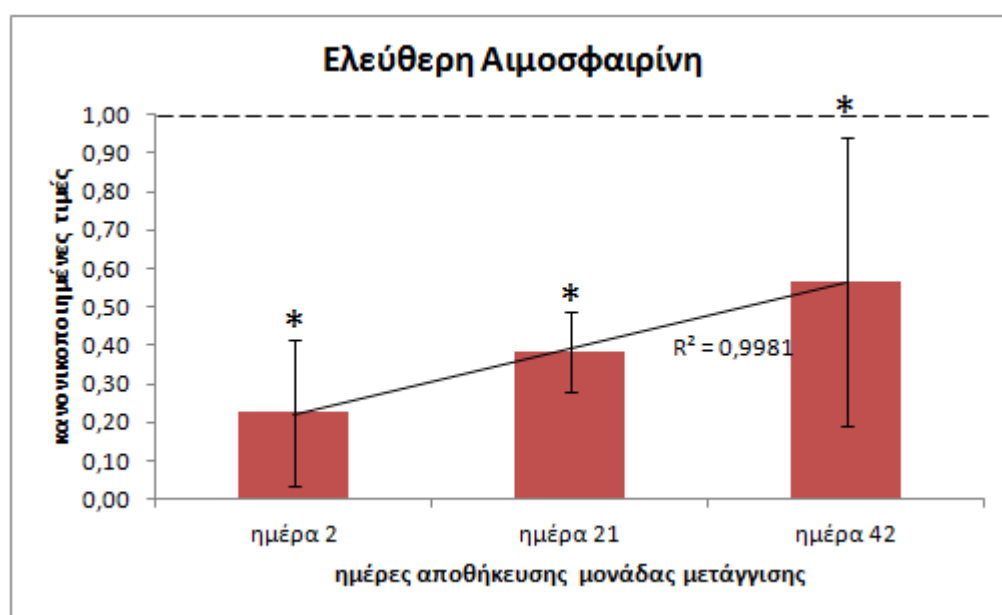
Γ1.2 Επίδραση Παραγόντων Πλάσματος

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κανονικοποιήθηκαν ως προς την τιμή της αντίστοιχης μονάδας μετάγγισης (χωρίς ανασύσταση), η οποία επωάστηκε ταυτόχρονα με τα ανασυσταμένα δείγματα ερυθροκυττάρων στους 37°C. Αυτή η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε για να υπολογιστεί η επίδραση του πλάσματος. Οι τιμές που ακολουθούν αντιστοιχούν στους μέσους όρους των δειγμάτων μετά από την προαναφερθείσα κανονικοποίηση. Επιπλέον έχει υπολογιστεί η τυπική απόκλιση και σε όλα τα γραφήματα που ακολουθούν υπάρχει μια διακεκομμένη γραμμή που συμβολίζει τα επίπεδα της εκάστοτε παραμέτρου στον εσωτερικό μάρτυρα.

(α) Μέτρηση Ελεύθερης Αιμοσφαιρίνης

Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη που μετρήθηκε στο υπερκείμενο των δειγμάτων που ανασυστάθηκαν, κανονικοποιήθηκε ως προς την αντίστοιχη τιμή του εσωτερικού μάρτυρα και οι μέσοι όροι των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και στο ακόλουθο διάγραμμα, μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις.

Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη	ημέρα 2	ημέρα 21	ημέρα 42
	0,226±0,190	0,383±0,105	0,566±0,376



Διάγραμμα 5: Απεικόνιση των επιπέδων της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο των δειγμάτων μετά την *in vitro* μετάγγιση σε σχέση με τα επίπεδα στον εσωτερικό μάρτυρα του πειράματος κατά τις διάφορες ημέρες της αποθηκευτικής περιόδου. Παρουσιάζονται και οι τυπικές αποκλίσεις, καθώς και η γραμμή τάσης.

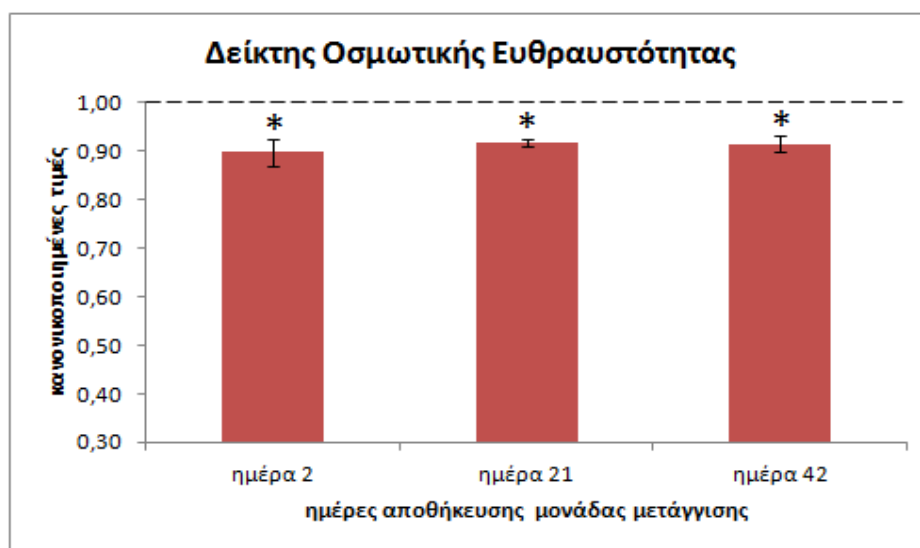
- ➔ Τιμή εσωτερικού μάρτυρα πειράματος (μονάδα ερυθροκυττάρων 37°C)
- * ➔ Στατιστικά σημαντικές διαφορές

Η προσθήκη πλάσματος οδηγεί σε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στα δείγματα που προέρχονται και από τις 3 διαφορετικές ημέρες της αποθηκευτικής περιόδου των μονάδων μετάγγισης. Τα ελάχιστα επίπεδα παρατηρούνται στα ανασυσταμένα δείγματα της ημέρας 2 και ακολουθούν κατά σειρά αυτά των ημερών 21 και 42. Οι τιμές τυπικής απόκλισης είναι ιδιαίτερα υψηλές. Επίσης, διακρίνεται μια χρονοεξαρτώμενη γραμμική τάση για αύξηση των επιπέδων ελεύθερης αιμοσφαιρίνης ανάλογη της ηλικίας αποθήκευσης των κυττάρων.

(β) Δείκτης Οσμωτικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων

Στον πίνακα και το γράφημα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μέσοι όροι από τις κανονικοποιημένες τιμές της οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων που έχουν επωαστεί με πλάσμα στους 37°C για 24 ώρες. Επιπλέον, φαίνονται και οι τιμές τυπικής απόκλισης.

Δείκτης Οσμωτικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων (MCF)	ημέρα 2	ημέρα 21	ημέρα 42
	0,897±0,027	0,917±0,008	0,915±0,016



Διάγραμμα 6: Απεικόνιση των τιμών του δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων μετά την *in vitro* μετάγγιση σε σχέση με τα επίπεδα στον εσωτερικό μάρτυρα του πειράματος κατά τις διάφορες ημέρες της αποθηκευτικής περιόδου. Παρουσιάζονται επιπλέον οι τυπικές αποκλίσεις.

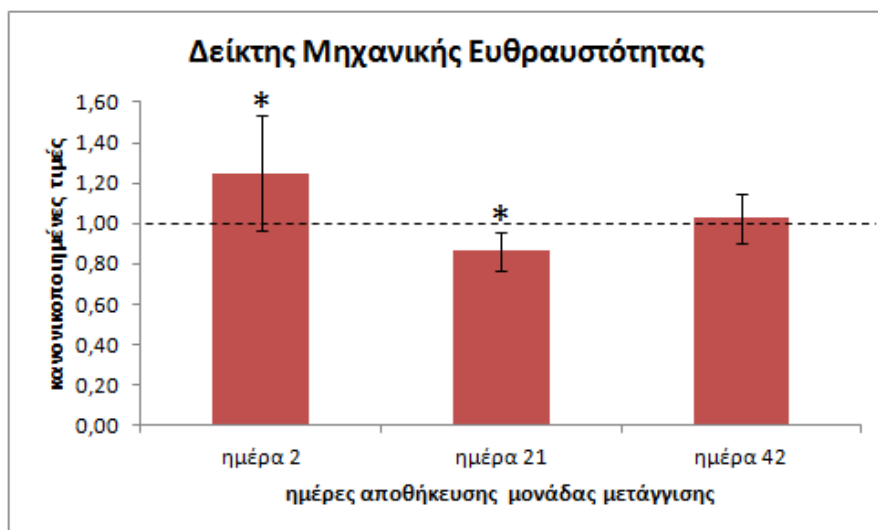
- ➔ Τιμή εσωτερικού μάρτυρα πειράματος (μονάδα ερυθροκυττάρων 37°C)
* ➔ Στατιστικά σημαντικές διαφορές

Σε όλες τις ημέρες της αποθηκευτικής περιόδου που μελετήθηκαν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων μετά την ανάμιξη τους με πλάσμα.

(γ) Δείκτης Μηχανικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων

Στον παρακάτω πίνακα υπάρχουν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των δεικτών μηχανικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων που έχουν υποστεί τη διαδικασία της ανασύστασης, κανονικοποιημένων προς την τιμή του αντίστοιχου εσωτερικού μάρτυρα. Οι ίδιες πληροφορίες παρουσιάζονται και διαγραμματικά στο ακόλουθο γράφημα.

Δείκτης Μηχανικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων (MFI)	ημέρα 2	ημέρα 21	ημέρα 42
	1,249±0,287	0,863±0,097	1,029±0,122



Διάγραμμα 7: Απεικόνιση των τιμών του δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας στα ανασυσταμένα δείγματα κατά τις διάφορες ημέρες της αποθηκευτικής περιόδου.

----- → Τιμή εσωτερικού μάρτυρα πειράματος (μονάδα ερυθροκυττάρων 37°C)

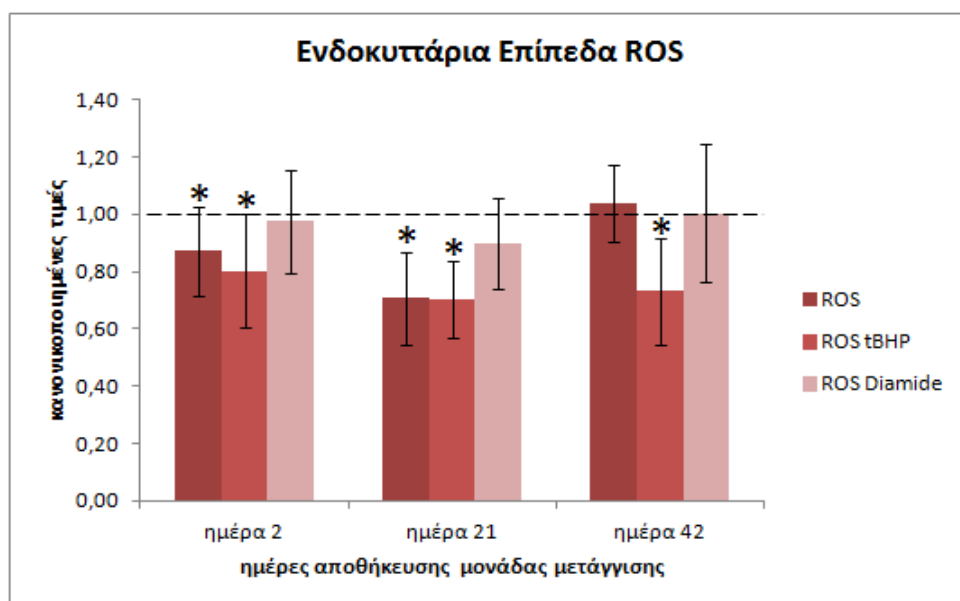
* → Στατιστικά σημαντικές διαφορές

Στα δείγματα της ημέρας 2 παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική αύξηση του δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας μετά την ανασύστασή τους, σε αντίθεση με αυτά της ημέρας 21 στα οποία αυτός μειώνεται στατιστικά σημαντικά. Όσον αφορά στα δείγματα της ημέρας 42, φαίνεται τα επίπεδα μηχανικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων να διατηρούνται σταθερά χωρίς και με την ανάμιξή τους με πλάσμα.

(δ) Μέτρηση Ενδοκυττάρων Επιπέδων ROS

Τα επίπεδα ROS εντός των ερυθροκυττάρων μετρήθηκαν με και χωρίς την επίδραση εξωγενών οξειδωτικών παραγόντων (tBHP και διαμίδιο). Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των κανονικοποιημένων τιμών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και το ακόλουθο διάγραμμα.

	ημέρα 2	ημέρα 21	ημέρα 42
ROS	0,871±0,153	0,706±0,164	1,037±0,133
ROS tBHP	0,802±0,198	0,700±0,134	0,731±0,188
ROS Diamide	0,974±0,177	0,898±0,157	1,003±0,241



Διάγραμμα 8: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων των ενδοκυττάρων ROS με ή χωρίς την επίδραση εξωγενών οξειδωτικών παραγόντων στα δείγματα που έχουν ανασυσταθεί.

----- → Τιμή εσωτερικού μάρτυρα πειράματος (μονάδα ερυθροκυττάρων 37°C)

* → Στατιστικά σημαντικές διαφορές

Τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα που έχουν αναμιχθεί με πλάσμα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μείωση στα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS τις ημέρες 2 και 21, ενώ τα ερυθροκύτταρα της ημέρας 42 χαρακτηρίζονται από παρόμοια επίπεδα ενδοκυττάρων ROS με και χωρίς την ανασύσταση. Μετά την επίδραση με tBHP τα επίπεδα των ROS μειώνονται με στατιστική σημαντικότητα στα δείγματα όλων των ημερών που μελετήθηκαν. Τα αναμιγμένα με πλάσμα ερυθροκύτταρα της ημέρας 21 μετά την επώαση με διαμίδιο εμφανίζουν μια τάση για χαμηλότερα επίπεδα ROS, ενώ οι δραστικές ρίζες στα κύτταρα των άλλων δύο ημερών βρίσκονται σε παρόμοια επίπεδα με αυτά στον εσωτερικό μάρτυρα του πειράματος.

Γ2. Επίδραση Θερμοκρασίας και Πλάσματος στις Ιδιότητες Ερυθροκυττάρων Διαφορετικής Ηλικίας Αποθήκευσης μετά από Αυξανόμενης Διάρκειας Ανασύσταση με Φυσιολογικό Πλάσμα σε *in vitro* Μοντέλο Μετάγγισης

Δείγμα από 2 μονάδες μετάγγισης συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων με διάλυμα CPD-SAGM αναμίχθηκε με πλάσμα που απομονώθηκε από φλεβικό αίμα 5 υγιών αιμοδοτών. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν ακολουθώντας τα πειράματα ανασύστασης που αναλύθηκαν προηγουμένως και επωάστηκαν σε κλίβανο στους 37°C. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε τις ημέρες 2, 21 και 42 της αποθηκευτικής περιόδου και μετρήθηκαν τα επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, οσμωτικής και μηχανικής ευθραυστότητας, καθώς και τα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS στις 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 και 24 ώρες μετά την επώαση. Με τον τρόπο αυτό μελετήθηκε η χρονοεξαρτώμενη επίδραση της προσομοίωσης των συνθηκών της μετάγγισης στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα. Για να μπορέσουμε να μελετήσουμε αποκλειστικά την επίδραση των παραγόντων του πλάσματος, σε κάθε ομάδα δειγμάτων τοποθετήθηκε και ένας εσωτερικός μάρτυρας, δηλαδή δείγμα από μη-ανασυσταμένη μονάδα μετάγγισης που επωάστηκε ταυτόχρονα με τα ανασυσταμένα δείγματα ερυθροκυττάρων.

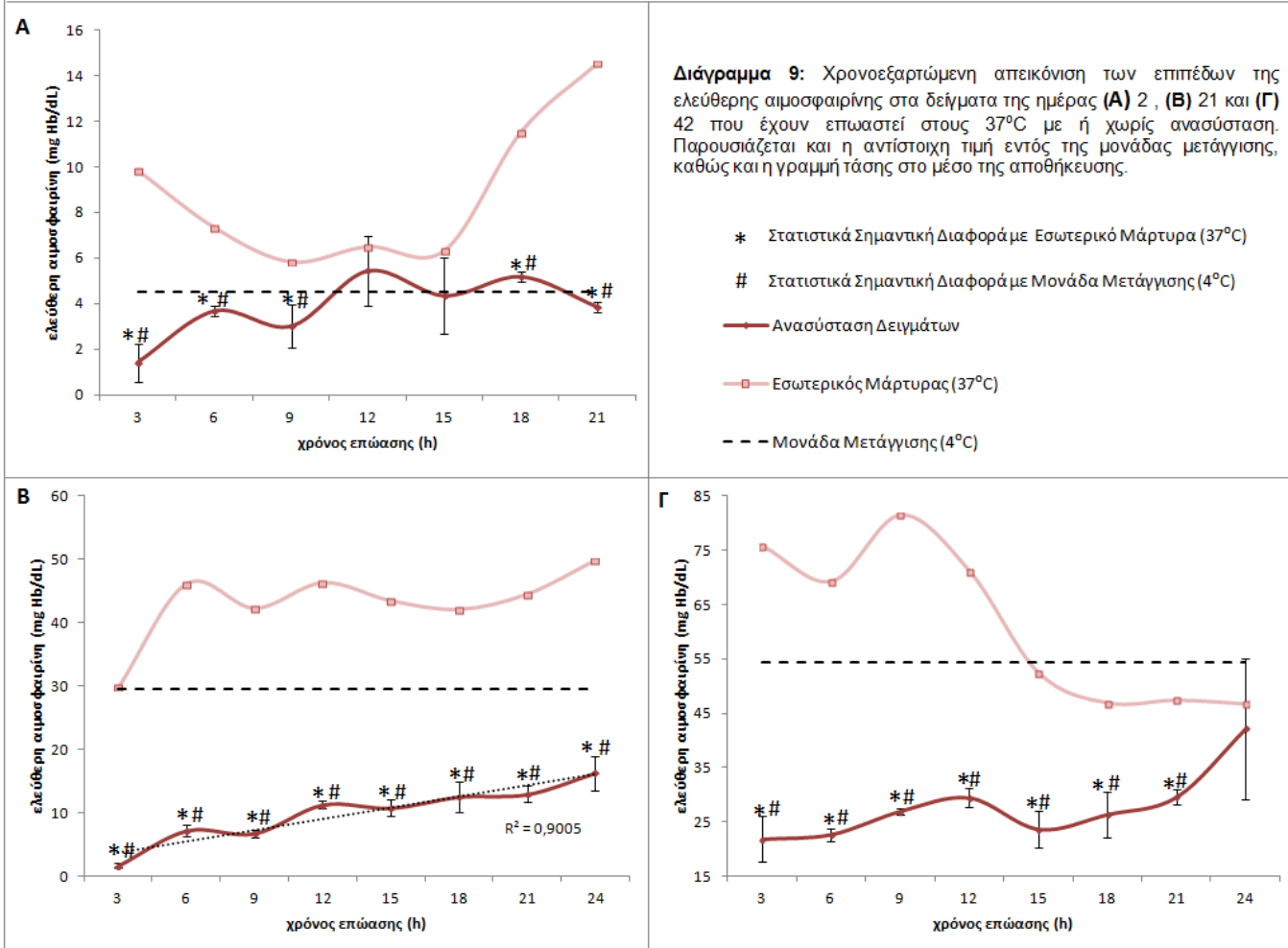
Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από κάθε πειραματική μέθοδο, υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και σχεδιάστηκαν 3 γραφήματα (ένα για καθεμία από τις υπό μελέτη ημέρες αποθήκευσης) για κάθε διαφορετική μέτρηση. Σε κάθε γράφημα υπάρχουν τρεις καμπύλες που αντιστοιχούν στα δείγματα που έχουν ανασυσταθεί, τον εσωτερικό μάρτυρα του πειράματος (μονάδα μετάγγισης στους 37°C) και τη μονάδα μετάγγισης στους 4°C. Επιπλέον έχει υπολογιστεί η τυπική απόκλιση και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές.

(α) Μέτρηση Ελεύθερης Αιμοσφαιρίνης

Στον πίνακα και το γράφημα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα των δειγμάτων ανασύστασης και των δειγμάτων-μαρτύρων για την αρχή, το μέσο και το τέλος της αποθηκευτικής περιόδου. Οι τυπικές αποκλίσεις φαίνονται στον πίνακα ως $\pm sd$ και στο διάγραμμα ως γραμμές σφάλματος. Οι τιμές της αποθηκευμένης στους 4°C μονάδας μετάγγισης ανέρχονται σε 4,52 mg Hb/dL, 29,53mg Hb/dL και 54,34mg Hb/dL για τις ημέρες 2, 21 και 42 αντίστοιχα.

	Χρόνος Επώασης (h)	3	6	9	12	15	18	21	24
Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη (mg Hb/dL) - Ημέρα 2	Ανασύσταση Δειγμάτων	1,42 $\pm$ 0,83	3,68 $\pm$ 0,24	3,01 $\pm$ 0,95	5,43 $\pm$ 1,54	4,35 $\pm$ 1,66	5,18 $\pm$ 0,24	3,85 $\pm$ 0,24	
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	9,86	7,36	5,85	6,52	6,35	11,54	14,55	
Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη (mg Hb/dL) - Ημέρα 21	Δείγματα με Ανασύσταση	1,67 $\pm$ 0,47	7,19 $\pm$ 0,95	6,77 $\pm$ 0,59	11,29 $\pm$ 0,59	10,78 $\pm$ 1,3	12,54 $\pm$ 2,37	12,94 $\pm$ 1,3	16,3 $\pm$ 2,72
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	29,93	46,15	42,30	46,31	43,47	42,13	44,52	49,83
Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη (mg Hb/dL) - Ημέρα 42	Δείγματα με Ανασύσταση	21,79 $\pm$ 4,2	22,68 $\pm$ 1,17	26,98 $\pm$ 0,63	29,43 $\pm$ 1,77	23,63 $\pm$ 3,29	26,36 $\pm$ 4,28	29,59 $\pm$ 1,43	42,19 $\pm$ 12,95
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	75,74	69,22	81,43	71,06	52,33	46,82	47,32	46,65

Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη



Παρατηρείται ότι τα επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στη μονάδα μετάγγισης αυξάνονται παράλληλα με τον χρόνο αποθήκευσης. Τα δείγματα της ημέρας 2 που έχουν υποστεί τη διαδικασία της *in vitro* μετάγγισης εμφανίζουν επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης συγκρίσιμα με αυτά της μονάδας μετάγγισης στους 4°C και ελαφρώς χαμηλότερα σε αρκετές χρονικές στιγμές με στατιστικά σημαντική διαφορά. Τις άλλες δύο μέρες τα επίπεδα είναι στατιστικώς σημαντικά μειωμένα σε σχέση με αυτά στην αποθηκευμένη μονάδα και παρουσιάζουν μια μικρή σταδιακή χρονοεξαρτώμενη αύξηση εντός του 24ώρου. Αξιοσημείωτη είναι η γραμμικότητα με την οποία αυξάνεται η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη στο πλάσμα των ανασυσταμένων δειγμάτων στο μέσο της αποθήκευσης. Όσον αφορά στην επίδραση του πλάσματος, η σύγκριση της καμπύλης των δειγμάτων ανασύστασης με τον εσωτερικό μάρτυρα του πειράματος, αναδεικνύει στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα αιμόλυσης παρουσία πλάσματος, για το σύνολο της αποθηκευτικής περιόδου. Την ίδια στιγμή, η απουσία πλάσματος οδηγεί σε σαφή επιδείνωση της αιμολυτικής τάσης των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων, καθώς η μετάβαση σε θερμοκρασία σώματος αυξάνει τα επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στη συντριπτική πλειονότητα των χρονικών μετα-μεταγγισιακών περιόδων που ελέγχθηκαν.

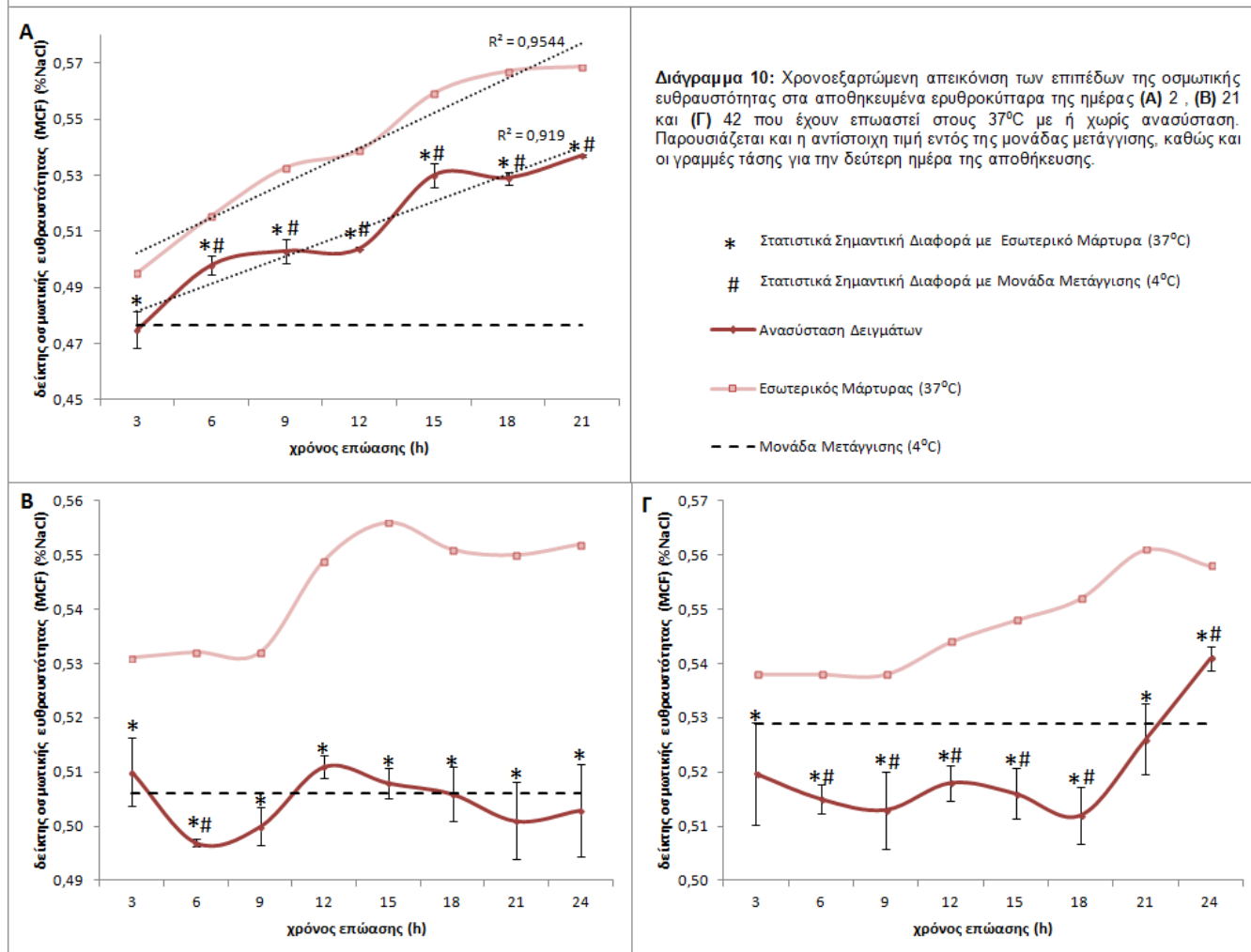
(β) Δείκτης Οσμωτικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων

Ακολουθούν πίνακας και διάγραμμα όπου παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις του δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας (MCF) ο οποίος υπολογίστηκε ανά τρίωρο κατά την 24ωρη

επώαση των δειγμάτων. Στη μονάδα μετάγγισης μετρήθηκε δείκτης MCF ίσος με 0,477% [NaCl] στην αρχή, 0,501% [NaCl] στο μέσο και 0,529% [NaCl] στο τέλος της αποθήκευσης.

	Χρόνος Επώασης (h)	3	6	9	12	15	18	21	24
Δείκτης Οσμωτικής Ευθραυστότητας (%NaCl) - Ημέρα 2	Ανασύσταση Δειγμάτων	0,475±0,007	0,498±0,003	0,503±0,004	0,504±0,001	0,530±0,004	0,529±0,002	0,537±0,001	
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	0,495	0,516	0,533	0,539	0,559	0,567	0,569	
Δείκτης Οσμωτικής Ευθραυστότητας (%NaCl) - Ημέρα 21	Δείγματα με Ανασύσταση	0,505±0,006	0,492±0,001	0,495±0,004	0,506±0,002	0,503±0,003	0,501±0,005	0,496±0,007	0,498±0,008
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	0,526	0,527	0,527	0,544	0,551	0,546	0,545	0,547
Δείκτης Οσμωτικής Ευθραυστότητας (%NaCl) - Ημέρα 42	Δείγματα με Ανασύσταση	0,520±0,009	0,515±0,003	0,513±0,007	0,518±0,003	0,516±0,005	0,512±0,005	0,526±0,007	0,541±0,002
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	0,538	0,538	0,538	0,544	0,548	0,552	0,561	0,558

Δείκτης Οσμωτικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων (MCF)



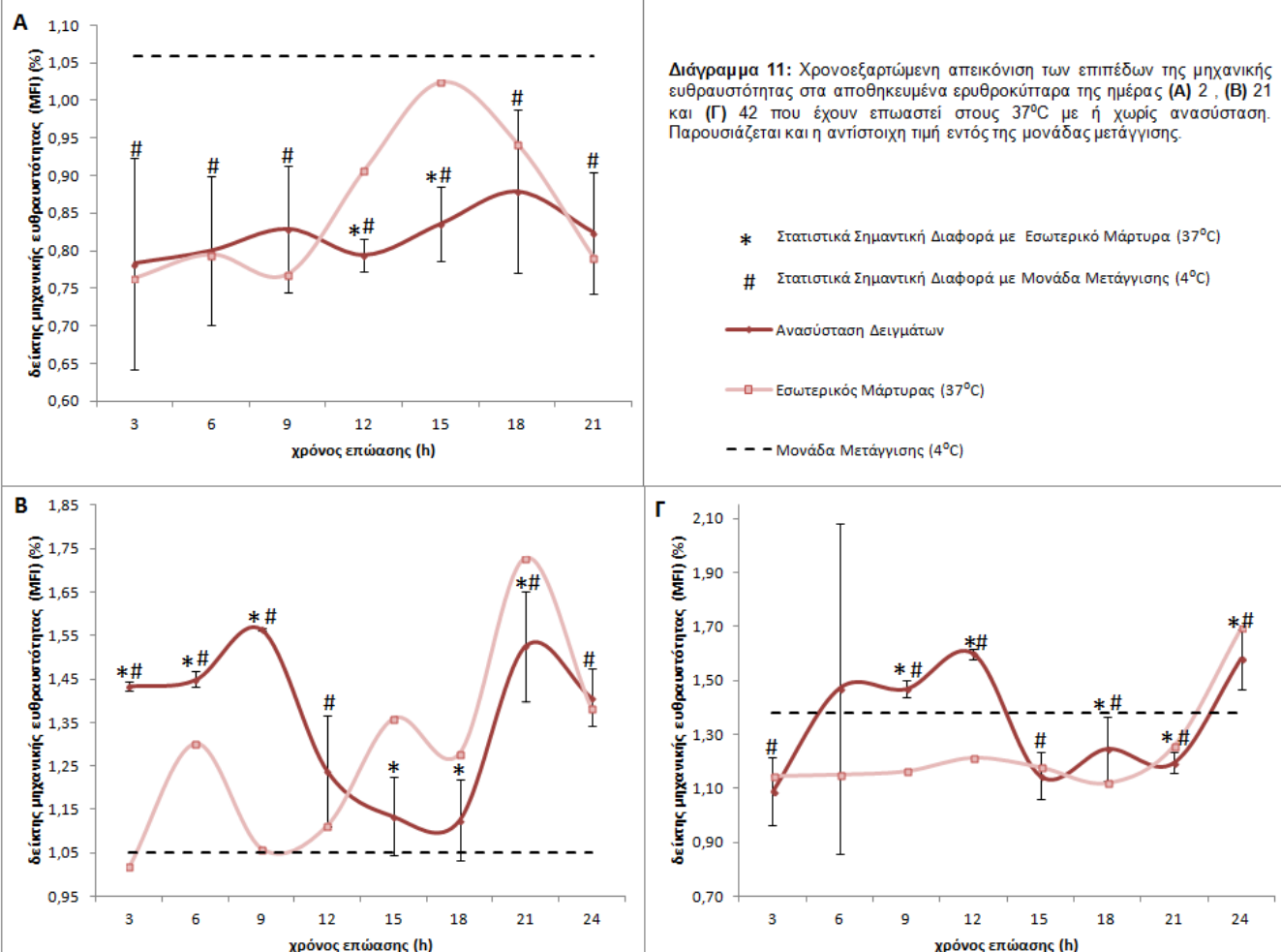
Ο δείκτης οσμωτικής ευθραυστότητας στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα αυξάνεται προοδευτικά κατά την αποθήκευση. Στα ανασυσταμένα δείγματα της ημέρας 2, τα ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν μια γραμμική τάση για στατιστικώς σημαντικά αυξημένη οσμωτική ευθραυστότητα κατά τη διάρκεια του 24ώρου σε σχέση με την αρχική τιμή της μονάδας, σταδιακά όμως τα επίπεδα φθίνουν στο μέσο και το τέλος της αποθηκευτικής περιόδου, με αποτέλεσμα την 42^η ημέρα η μετάβαση σε συνθήκες μετάγγισης να βελτιώνει το οσμωτικό προφίλ των αποθηκευμένων δειγμάτων. Η παρουσία πλάσματος εξομαλύνει την αύξηση που παρατηρείται στο δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων ως αποτέλεσμα της μετάβασης σε θερμοκρασία σώματος, ανεξαρτήτως ημέρας αποθήκευσης. Στα νεαρά αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα το πλάσμα είναι λιγότερο αποδοτικό στην απορρόφηση της αρνητικής επίδρασης της θερμοκρασίας στο δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας.

(γ) Δείκτης Μηχανικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων

Στον ακόλουθο πίνακα αναγράφονται οι μέσοι όροι των δεικτών μηχανικής ευθραυστότητας των δειγμάτων παρουσία και απουσία πλάσματος. Οι δείκτες μηχανικής ευθραυστότητας των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων βρέθηκαν 1,059%, 1,051% και 1,382% για την αρχή, το μέσο και το τέλος της αποθήκευσης αντίστοιχα.

	Χρόνος Επώασης (h)	3	6	9	12	15	18	21	24
Δείκτης Μηχανικής Ευθραυστότητας (%) - Ανασύσταση Δειγμάτων		0,783±0,140	0,8±0,099	0,829±0,084	0,794±0,022	0,836±0,05	0,879±0,108	0,824±0,08	
Ημέρα 2	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	0,764	0,795	0,769	0,907	1,025	0,943	0,791	
Δείκτης Μηχανικής Ευθραυστότητας (%) - Δείγματα με Ανασύσταση		1,434±0,009	1,449±0,018	1,565±0,002	1,238±0,128	1,134±0,09	1,125±0,093	1,526±0,126	1,408±0,066
Ημέρα 21	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	1,020	1,302	1,060	1,114	1,359	1,279	1,728	1,383
Δείκτης Μηχανικής Ευθραυστότητας (%) - Δείγματα με Ανασύσταση		1,089±0,126	1,471±0,612	1,468±0,032	1,598±0,019	1,147±0,088	1,247±0,119	1,196±0,039	1,58±0,111
Ημέρα 42	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	1,145	1,151	1,163	1,213	1,178	1,119	1,258	1,694

Δείκτης Μηχανικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων (MFI)



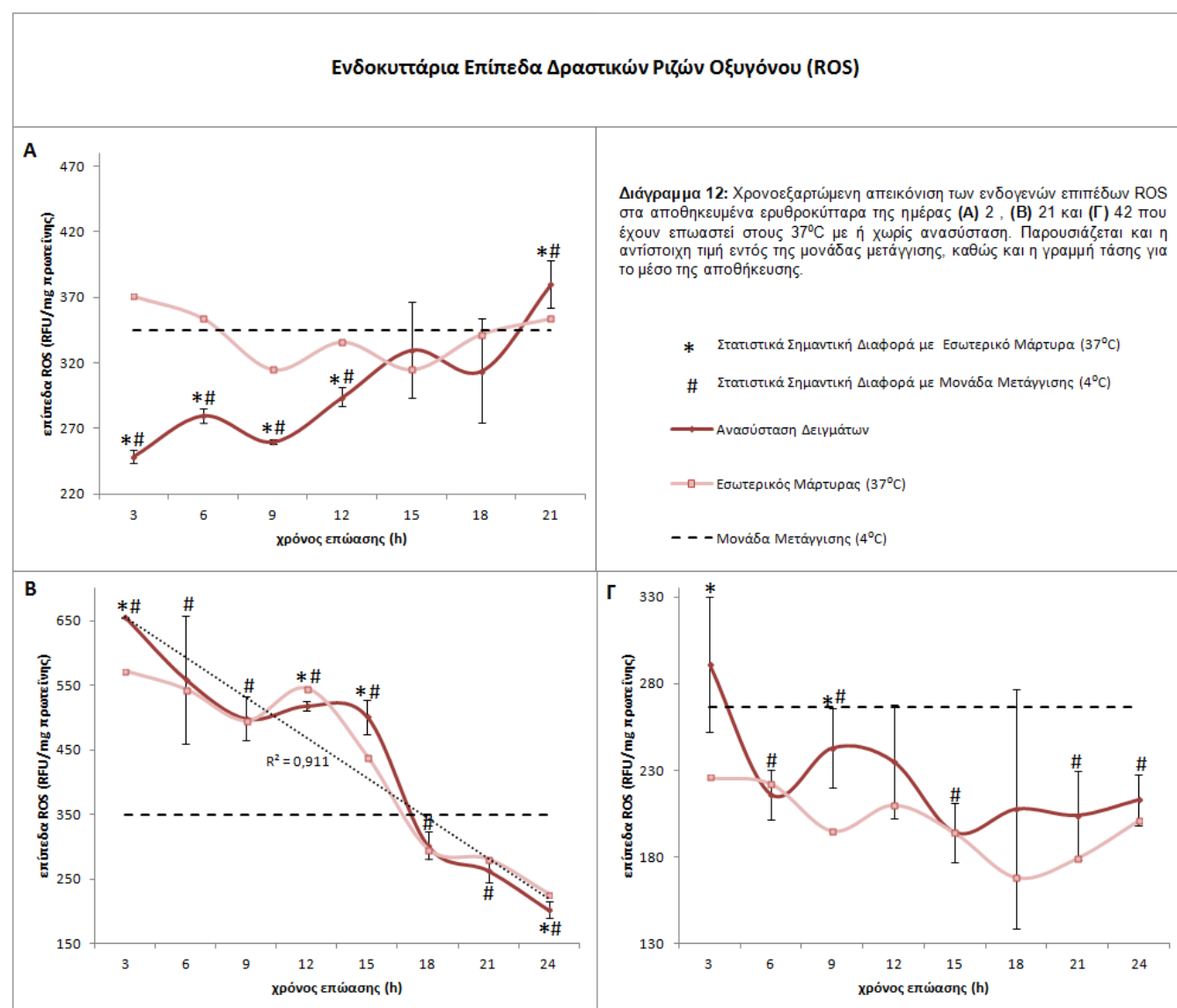
Από το διάγραμμα φαίνεται πως τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα διατηρούν σταθερά επίπεδα μηχανικής ευθραυστότητας από την αρχή μέχρι το μέσο της αποθηκευτικής περιόδου ενώ καταλήγουν πιο επιρρεπή στην μηχανική καταπόνηση προς το τέλος. Μετά την *in vitro* δοκιμασία μετάγγισης, τα ερυθροκύτταρα της ημέρας 2 είναι στατιστικώς σημαντικά ανθεκτικότερα σε μηχανική πίεση, ενώ για αυτά της ημέρας 21 ισχύει ακριβώς το αντίθετο με το πρότυπο επιδείνωσης να αντιστοιχεί σε ταχεία μετα-μεταγγισιακή εμφάνιση (3 ώρες επώασης). Στο τέλος της αποθήκευσης τα ανασυσταμένα ερυθροκύτταρα εμφανίζουν αυξομειώσεις εντός του 24ώρου. Η επίδραση του πλάσματος ποικίλει ανάλογα με την ημέρα αποθήκευσης. Ενώ στα νεαρά ερυθροκύτταρα παρατηρείται βελτίωση μετά τις 12 ώρες επώασης, στα γηρασμένα (ημέρας 42) το πρότυπο είναι

διαφορετικό, με επιδείνωση στο πρώτο μισό της επώασης. Τα κύτταρα της ημέρας 21 είναι ιδιαίτερα επιδεκτικά σε εξωαγγειακή αιμόλυση λόγω μηχανικής καταπόνησης από τις πρώτες ώρες της επαφής με το πλάσμα.

(δ) Μέτρηση Ενδοκυττάρων Επιπέδων ROS

Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των τιμών των ενδοκυττάρων επιπέδων δραστικών ριζών οξυγόνου στα δείγματα ανασύστασης και στον εσωτερικό μάρτυρα του πειράματος. Εντός της μονάδας μετάγγισης, τα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS ξεκίνησαν από 345 RFU/mg πρωτεΐνης την ημέρα 2, συνέχισαν με 350 RFU/mg πρωτεΐνης την ημέρα 21 και κατέληξαν με 267 RFU/mg πρωτεΐνης την τελευταία ημέρα της αποθηκευτικής περιόδου. Ακολουθεί και το αντίστοιχο γράφημα, όπου με γραμμές σφάλματος αναδεικνύονται οι τυπικές αποκλίσεις.

	Χρόνος Επώασης (h)	3	6	9	12	15	18	21	24
Ενδοκυττάρια ROS (RFU/mg πρωτεΐνης) - Ημέρα 2	Ανασύσταση Δειγμάτων	249±5	280±5	260±2	294±7	330±37	314±40	380±18	
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	371	354	315	336	315	342	354	
Ενδοκυττάρια ROS (RFU/mg πρωτεΐνης) - Ημέρα 21	Δείγματα με Ανασύσταση	655±1	559±100	498±34	518±8	501±26	302±21	263±18	202±13
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	572	544	495	545	440	296	280	226
Ενδοκυττάρια ROS (RFU/mg πρωτεΐνης) - Ημέρα 42	Δείγματα με Ανασύσταση	291±39	216±15	243±23	235±33	194±17	208±69	204±26	213±15
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	226	222	195	210	194	168	179	201



Τα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS εντός του ασκού βρίσκονται σε παραπλήσιες τιμές στην αρχή και το μέσο της αποθήκευσης, ενώ στη συνέχεια φθίνουν. Οι συνθήκες της δοκιμασίας *in vitro* μετάγγισης

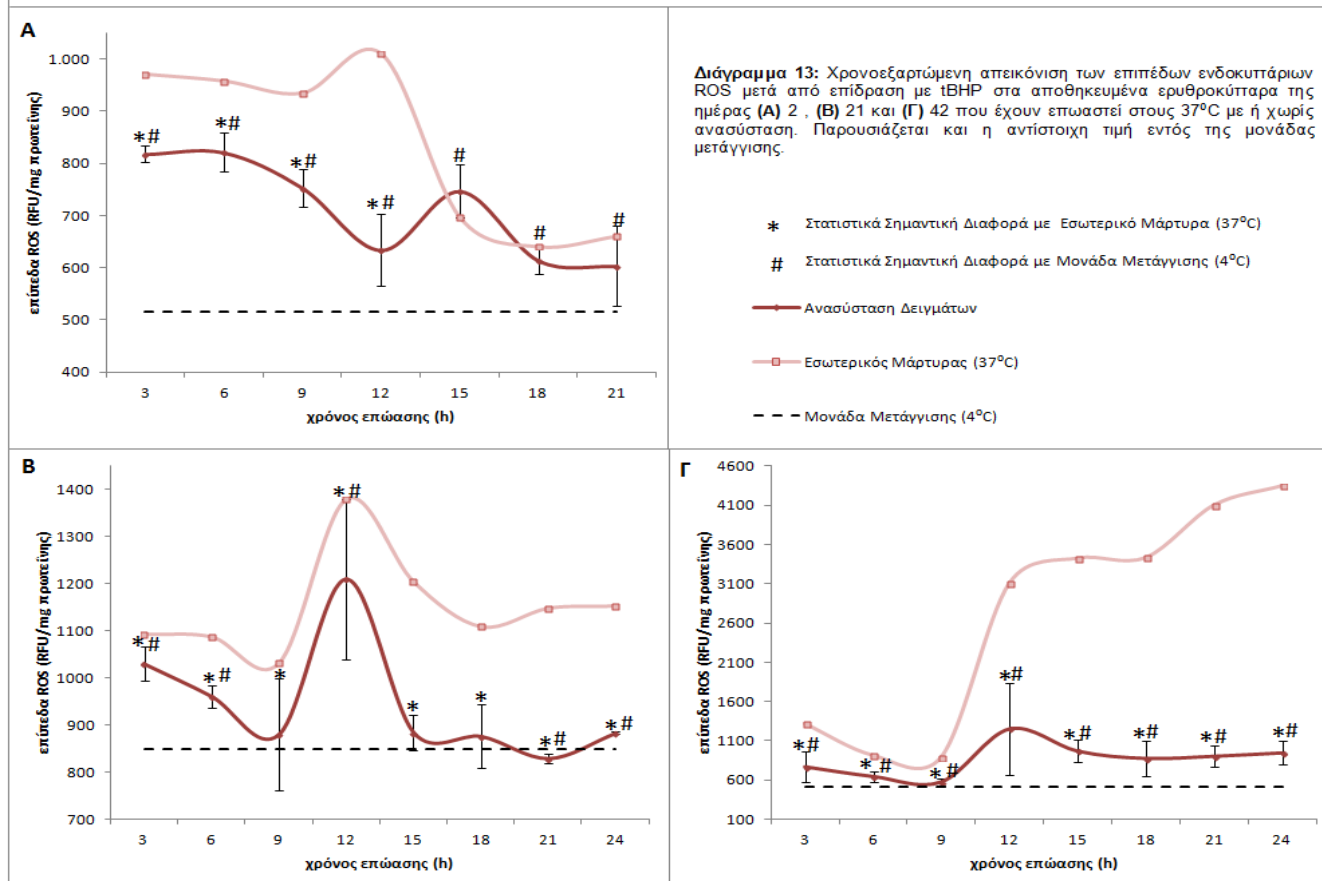
για τα δείγματα της ημέρας 2 οδηγούν σε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ROS τις πρώτες 12 ώρες, τα οποία όμως εν συνεχεία ανεβαίνουν, έτσι ώστε τελικά στις 21 ώρες να ξεπερνούν την τιμή εντός της μονάδας μετάγγισης. Το αντίθετο συμβαίνει στο μέσο της αποθήκευσης. Τα ανασυσταμένα δείγματα ξεκινούν πολύ άμεσα με στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ROS, τα οποία μειώνονται γραμμικά και καταλήγουν σε χαμηλότερες τιμές από αυτή του ασκού μετά τις 18 ώρες. Στο τέλος της αποθήκευσης, η δοκιμασία της *in vitro* μετάγγισης έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση των ενδοκυττάρων ROS από τα αρχικά επίπεδα εντός του ασκού. Η παρουσία πλάσματος, με εξαίρεση τις 12 πρώτες ώρες των δειγμάτων της ημέρας 2, όπου είναι ευνοϊκή, δε φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα την απόκριση των κυττάρων, επομένως το φαινόμενο μοιάζει να σχετίζεται κυρίως με τη θερμοκρασία.

(ε) Μέτρηση Εξωγενώς Επαγόμενων (tBHP) Ενδοκυττάρων Επιπέδων ROS

Τα επίπεδα ενδοκυττάρων ROS μετρήθηκαν μετά την επώαση των δειγμάτων με τον οξειδωτικό παράγοντα tBHP και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα και το διάγραμμα που ακολουθούν. Οι τιμές που καταγράφονται αντιστοιχούν στους μέσους όρους των μετρήσεων, καθώς και τις τυπικές τους αποκλίσεις. Οι αντίστοιχες τιμές των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων για τις 3 υπό μελέτη ημέρες είναι 515 RFU/mg πρωτεΐνης, 848 RFU/mg πρωτεΐνης και 516 RFU/mg πρωτεΐνης.

	Χρόνος Επώασης (h)	3	6	9	12	15	18	21	24
Ενδοκυττάρια ROS (RFU/mg πρωτεΐνης) /tBHP - Ημέρα 2	Ανασύσταση Δειγμάτων	818±16	821±37	753±36	634±69	747±50	614±27	603±77	
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	971	958	935	1010	697	641	661	
Ενδοκυττάρια ROS (RFU/mg πρωτεΐνης) /tBHP - Ημέρα 21	Δείγματα με Ανασύσταση	1030±36	961±24	880±120	1210±170	884±37	876±68	829±10	883±3
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	1093	1088	1033	1380	1205	1110	1149	1153
Ενδοκυττάρια ROS (RFU/mg πρωτεΐνης) /tBHP - Ημέρα 42	Δείγματα με Ανασύσταση	767±190	642±68	572±42	1253±589	968±142	874±222	902±133	945±153
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	1314	912	891	3108	3424	3433	4100	4347

Ενδοκυττάρια Επίπεδα Δραστικών Ριζών Οξυγόνου (ROS) μετά από Επίδραση με tBHP



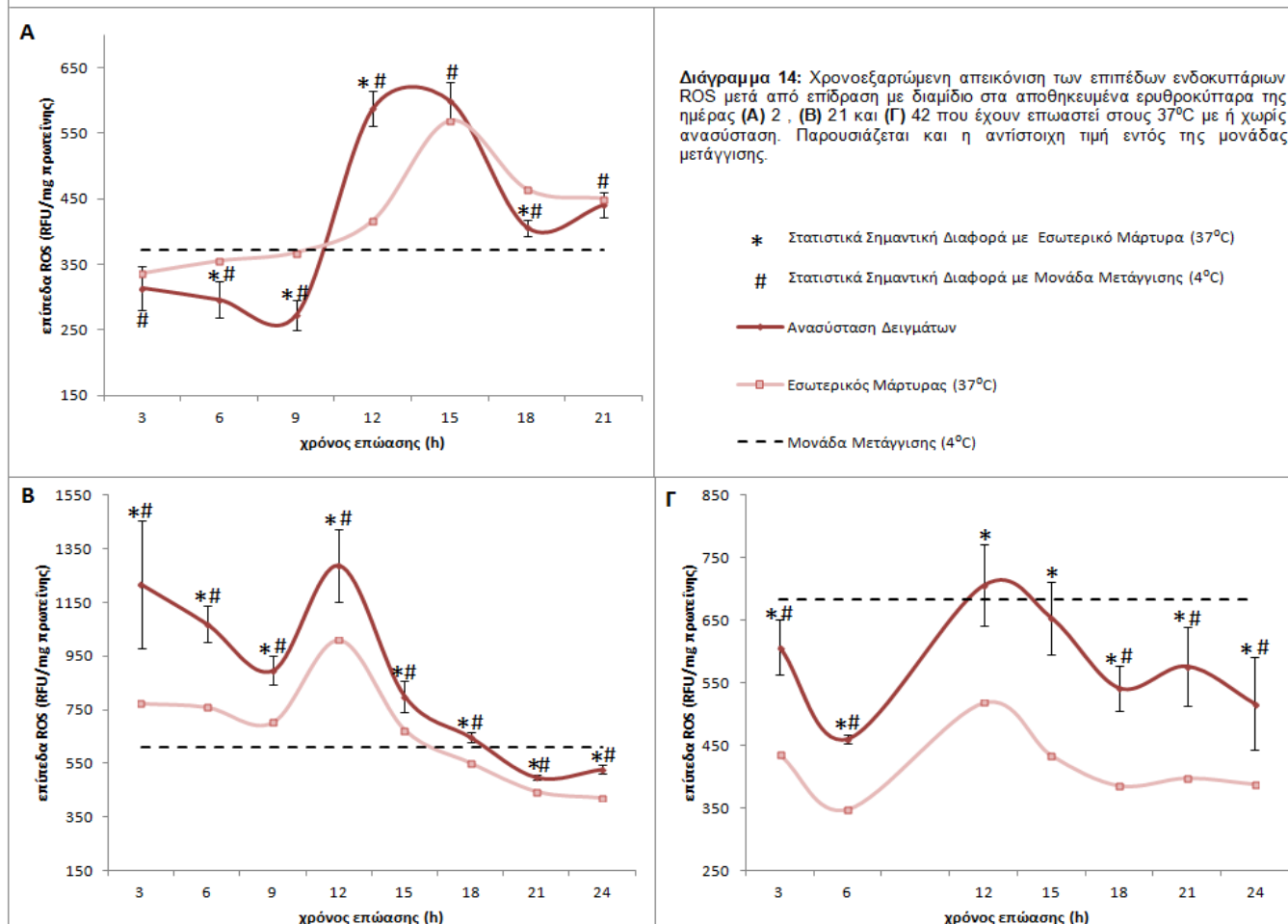
Τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα ξεκινούν (ημέρα 2) και καταλήγουν (ημέρα 42) στα ίδια επίπεδα ROS μετά την επίδραση με tBHP, εμφανίζοντας ένα μέγιστο στο μέσο της αποθήκευσης (ημέρα 21). Η μετάβαση σε μετα-μεταγγισιακές συνθήκες οδηγεί σε στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ROS σε σχέση με τα αρχικά σε όλες τις ημέρες της αποθηκευτικής περιόδου. Η αύξηση πιθανώς οφείλεται κυρίως στη θερμοκρασιακή αλλαγή, καθώς απουσία πλάσματος τα ερυθροκύτταρα χαρακτηρίζονται από ακόμα υψηλότερα επίπεδα ROS, όπως αναδεικνύει η σύγκριση της καμπύλης των δειγμάτων ανασύστασης με την αντίστοιχη του εσωτερικού μάρτυρα. Η παρατήρηση αυτή είναι εμφανής ιδιαίτερα στις πρώτες 12 ώρες της ημέρας 2, αλλά και στις 12 τελευταίες των άλλων δύο ημερών της αποθηκευτικής περιόδου.

(στ) Μέτρηση Εξωγενώς Επαγόμενων (διαμίδιο) Ενδοκυττάρων Επιπέδων ROS

Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων των ενδοκυττάρων επιπέδων ROS μετά από επίδραση με διαμίδιο παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και το ακόλουθο γράφημα. Η μονάδα μετάγγισης είχε 372 RFU/mg πρωτεΐνης στην αρχή, 609 RFU/mg πρωτεΐνης στο μέσο και 685 RFU/mg πρωτεΐνης στο τέλος της αποθήκευσης.

	Χρόνος Επώασης (h)	3	6	9	12	15	18	21	24
Ενδοκυττάρια ROS (RFU/mg πρωτεΐνης) /διαμίδιο - Ημέρα 2	Ανασύσταση Δειγμάτων	314±33	296±28	273±23	588±27	599±30	406±12	441±19	
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	336	355	368	417	569	464	450	
Ενδοκυττάρια ROS (RFU/mg πρωτεΐνης) /διαμίδιο - Ημέρα 21	Δείγματα με Ανασύσταση	1218±237	1070±67	897±52	1288±134	800±58	648±12	499±9	530±17
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	774	761	704	1012	675	552	446	422
Ενδοκυττάρια ROS (RFU/mg πρωτεΐνης) /διαμίδιο - Ημέρα 42	Δείγματα με Ανασύσταση	607±44	461±7		706±65	654±58	542±36	577±64	517±74
	Εσωτερικός Μάρτυρας (37°C)	435	347		519	434	385	398	388

Ενδοκυττάρια Επίπεδα Δραστικών Ριζών Οξυγόνου (ROS) μετά από Επίδραση με Διαμίδιο



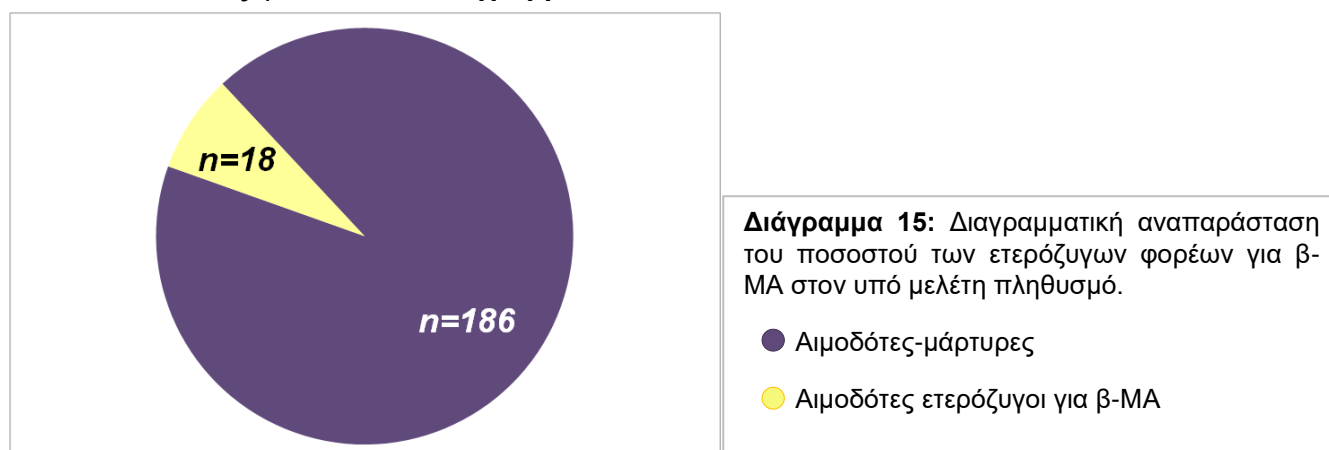
Όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 14**, η επίδραση με διαμίδιο στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα ROS στον πιο γηρασμένο πληθυσμό (ημέρας 42). Οι πειραματικές μετα-μεταγγισιακές συνθήκες στα κύτταρα της ημέρας 2, ενώ τις πρώτες 9 ώρες οδηγούν σε χαμηλότερα επίπεδα ROS στη συνέχεια αυξάνουν στατιστικώς σημαντικά τις δραστικές ρίζες οξυγόνου εντός των ερυθροκυττάρων. Το αντίστροφο συμβαίνει στο μέσο της αποθήκευσης, όπου τις 18 πρώτες ώρες τα επίπεδα ROS είναι υψηλότερα, αν και με φθίνουσα πορεία, στα δείγματα ανασύστασης και καταλήγουν να είναι χαμηλότερα στο τέλος του 24ώρου. Στα δείγματα της ημέρας 42, οι συνθήκες της διαδικασίας *in vitro* μετάγγισης είναι ευνοϊκές και διατηρούν τα ενδοκυττάρια ROS σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις απ τις αρχικές. Στο μέσο και τέλος της αποθηκευτικής περιόδου, η παρουσία του πλάσματος επιδεινώνει τα επίπεδα των ROS με στατιστικά σημαντική διαφορά. Δεν παρατηρείται το ίδιο για τα νεαρότερα ερυθροκύτταρα, στα οποία η επίδραση του πλάσματος είναι ευνοϊκή τις πρώτες 9 ώρες και στη συνέχεια συμβαδίζει με το πρότυπο δράσης του συνόλου των πειραματικών μετα-μεταγγισιακών συνθηκών.

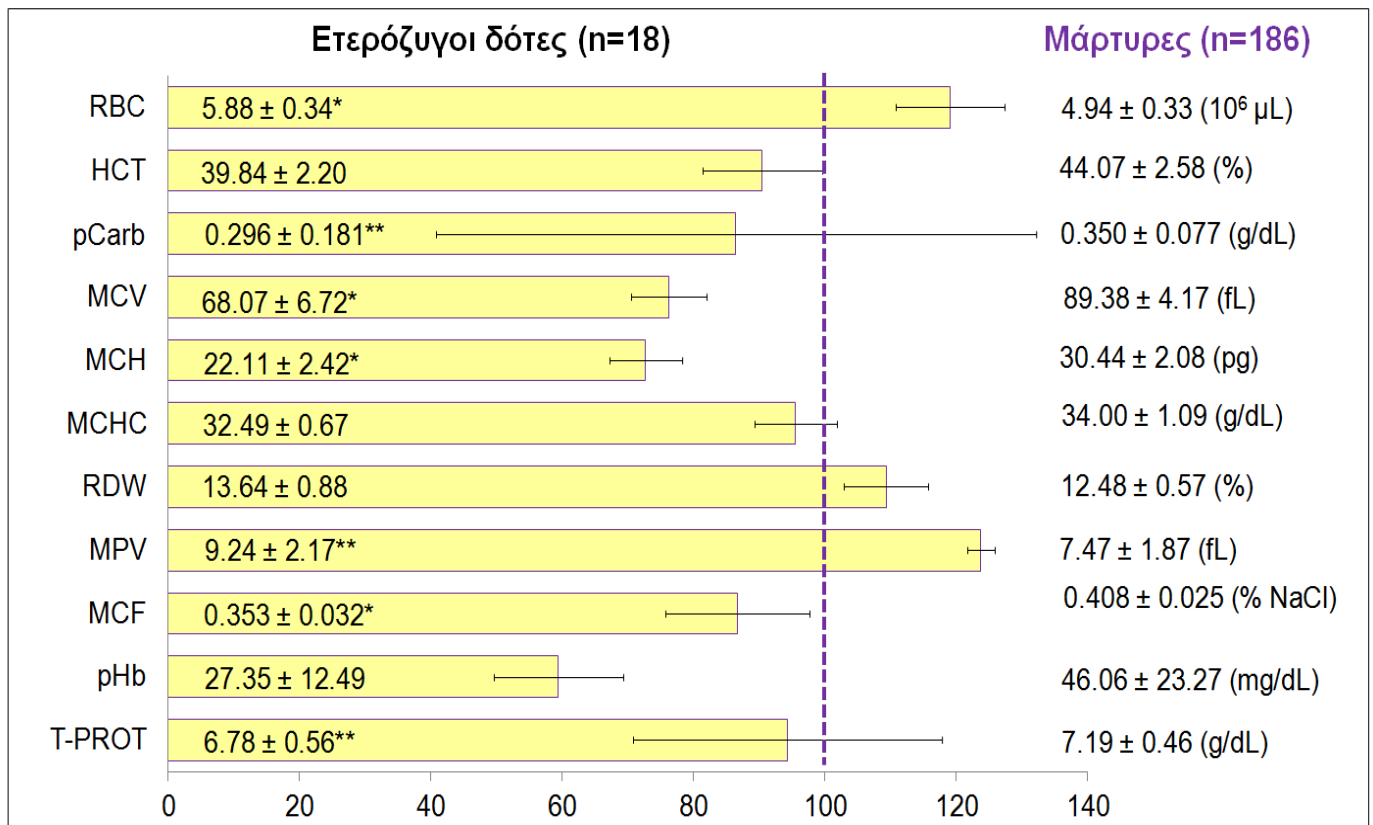
Γ3. Συγκριτική Μελέτη Αιματολογικών και Βιοχημικών Χαρακτηριστικών Τακτικών Αιμοδοτών με ή χωρίς Ετερόζυγη β-Μεσογειακή Αναιμία

Ένα μέρος της ετερογένειας που παρατηρήθηκε κατά τα πειράματα ανασύστασης πιθανώς να οφείλεται στην παρουσία ετερόζυγων για β-μεσογειακή αναιμία (β-MA) αιμοληπτών. Για τον λόγο αυτό, αποφασίσαμε να ελέγχουμε την παρουσία φορέων στον γενικό πληθυσμό, καθώς επίσης και των διαφορών τους σε αιματολογικό και βιοχημικό επίπεδο σε σχέση με μη-φορείς. Η προ-αποθηκευτική μελέτη αποτελεί το πρώτο βήμα στην αποσαφήνιση της ετερόζυγης β-MA τόσο στην αποθηκευτική επάρκεια, όσο και στην αποτελεσματικότητα μιας μετάγγισης που πραγματοποιείται σε δέκτες με συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο.

Συλλέχθηκε αίμα από 204 αιμοδότες (101 άνδρες και 103 γυναίκες) που πληρούσαν τα κριτήρια αιμοδοσίας και μετρήθηκαν διάφορες αιματολογικές (γενικοί δείκτες ερυθροκυττάρων κ.α.) και βιοχημικές (χοληστερόλη, ουρικό οξύ, ηλεκτρολύτες πλάσματος κ.α.) παράμετροι. Στα ερυθροκύτταρα ελέγχθηκε επιπρόσθετα η οσμωτική ευθραυστότητα, ενώ στο πλάσμα μετρήθηκαν τα επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών, κλαστερίνης και μονοξειδίου του αζώτου, καθώς και το αντιοξειδωτικό δυναμικό. Αρχικά με αιματολογικό έλεγχο, αλλά ύστερα με επιπλέον επιβεβαίωση με ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης ανιχνεύθηκαν ετεροζυγώτες β-μεσογειακής αναιμίας (β-MA). Ακολούθησε κατασκευή βιολογικών δικτύων των αποτελεσμάτων για τις δύο ομάδες αιμοδοτών (+/- βMA) με χρήση του προγράμματος Cytoscape.

Στο σύνολο του προς εξέταση πληθυσμού εντοπίστηκαν ετερόζυγοι για β-MA αιμοδότες σε ποσοστό 9%, όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 15**.



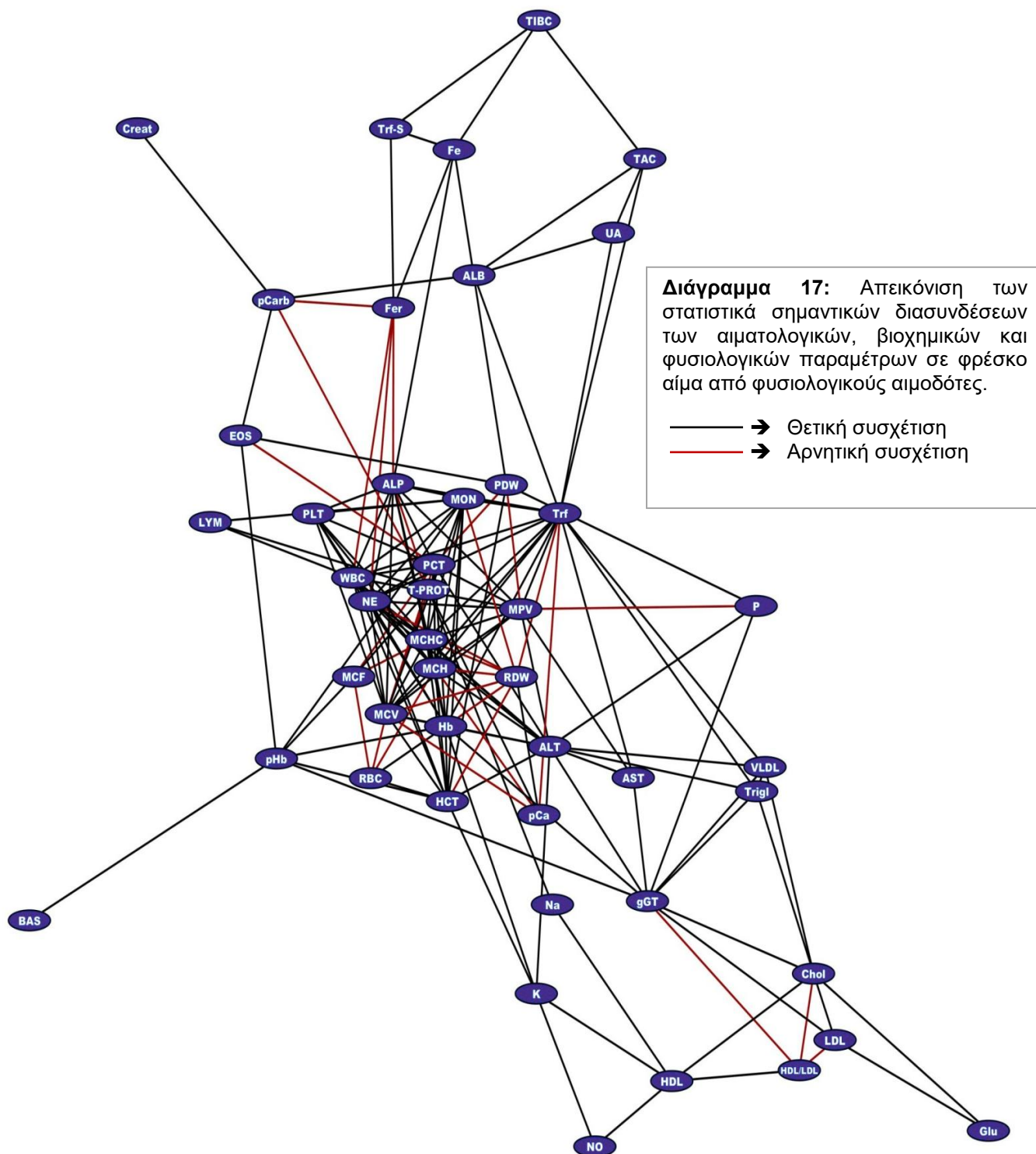


Διάγραμμα 16: Συγκριτική ανάλυση βασικών αιματολογικών, βιοχημικών και πειραματικών παραμέτρων μεταξύ των ετερόζυγων για β-MA και των φυσιολογικών αιμοδοτών. Παρουσιάζονται με γραμμές σφάλματος οι τυπικές αποκλίσεις.

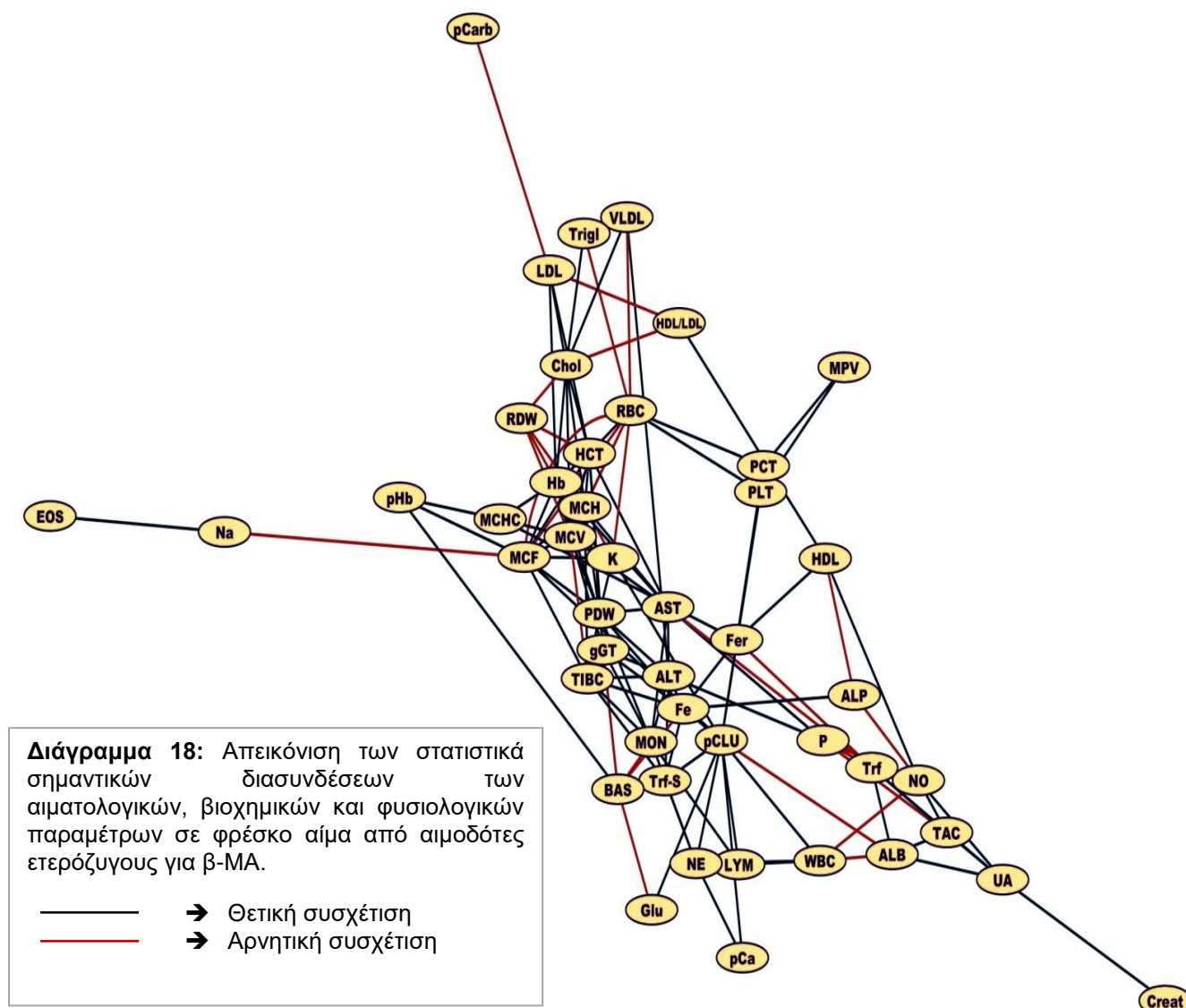
- ➔ Επίπεδο τιμών αιμοδοτών – μαρτύρων.
- * ➔ Στατιστικά σημαντικές διαφορές
- ** ➔ Οριακές διαφορές

Όσον αφορά στον τρόπο ζωής των ατόμων (κάπνισμα, σωματική άσκηση, κατανάλωση αλκοόλ), δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Η ομάδα των ετερόζυγων παρουσίασε στατιστικά σημαντική, ανεξάρτητη του φύλου μείωση στον αιματοκρίτη (HCT), τον μέσο ερυθροκυτταρικό όγκο (MCV) και την μέση αιμοσφαιρίνη ερυθροκυττάρου (MCH) και αύξηση στον συνολικό αριθμό των ερυθροκυττάρων. Αναδείχθηκε, επιπλέον, οριακά υψηλότερη τιμή του μέσου αιμοπεταλιακού όγκου (MPV), χαμηλότερη ολική πρωτεϊνική συγκέντρωση (T-PROT) και πρωτεϊνική καρβονυλίωση (pCarb) στην ίδια ομάδα αιμοδοτών. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος των ετερόζυγων ατόμων βρέθηκε οριακά υψηλότερη, ενώ τα επίπεδα οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων και ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα (**Διάγραμμα 16**).

Ακολούθησε η κατασκευή βιολογικών δικτύων (**Διάγραμμα 17** και **Διάγραμμα 18**) με σκοπό την αποτύπωση των διασυνδέσεων των στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων μεταξύ των μετρήσιμων παραμέτρων στις δύο ομάδες αιμοδοτών. Στα συγκεκριμένα δίκτυα το μήκος κάθε σύνδεσης είναι αντιστρόφως ανάλογο του συντελεστή συσχέτισης R που προέκυψε μετά από ανάλυση κατά Pearson ή Spearman, όπου κρίθηκε απαραίτητο.



Στην ομάδα των αιμοδοτών χωρίς ετεροζυγωτία β-MA εντοπίστηκε πυρήνωση των κλασσικών αιματολογικών (MCV, MCH, MCHC κ.α.), και των λευκοκυτταρικών παραμέτρων στο κέντρο του δικτύου. Επιπλέον, στην περιφέρεια του δικτύου τοποθετούνται: (α) η ομάδα των λιπιδίων/λιποπρωτεϊνών του ορού και (β) αντιοξειδωτικοί παράμετροι του πλάσματος σε άμεση συσχέτιση με παράγοντες της ομοιόστασης σιδήρου. Τέλος οι εργαστηριακές παράμετροι που μετρήθηκαν τοποθετούνται σε σημαντικές τοπολογικά θέσεις του αλληλεπιδροσώματος καταδεικνύοντας τη στενή διασύνδεσή τους με τη φυσιολογία και την αιματολογική εικόνα του δότη.



Στην ομάδα των αιμοδοτών ετερόζυγων φορέων για β-MA παρατηρήθηκε μια περιοχή στο κέντρο του δικτύου με αυξημένες διασυνδέσεις μεταξύ των κλασσικών αιματολογικών παραμέτρων και μία δεύτερη στην οποία τοποθετούνται παράμετροι ομοιόστασης σιδήρου και ηπατικής λειτουργίας. Ιδιαίτερο εύρημα αποτελεί η κεντρική θέση και ο υψηλός βαθμός συνδεσιμότητας της κλαστερίνης πλάσματος. Στην περιφέρεια εντοπίστηκε μια περιοχή με λιπίδια/λιποπρωτεΐνες του ορού, καθώς επίσης και δείκτες οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου.

Η πυρήνωση των κλασσικών αιματολογικών παραμέτρων, μαζί με τον δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας (MCF) εντοπίζεται και στις δύο ομάδες αιμοδοτών, ομοίως και η ομαδοποίηση της συστάδας των λιπιδίων. Όσον αφορά στο πλήθος των συνδέσεων, δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων, ενώ παρατηρείται παραπλήσια δικτύωση των επιπέδων εγγενούς αιμόλυσης. Στους ετερόζυγους για β-MA εμφανίζεται επιπλέον διασύνδεση του δείκτη MCF με τους ηλεκτρολύτες Na^+ και K^+ και ισχυρή δικτύωση της κλαστερίνης του πλάσματος. Διαφέρει, επίσης, ο αριθμός των διασυνδέσεων των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών του πλάσματος, καθώς βρέθηκε αισθητά μικρότερος. Τέλος, η τοπολογία ορισμένων βιολογικών παραμέτρων (μονοξειδίο του αζώτου, σίδηρος κ.α.) είναι ανόμοια μεταξύ των δύο κατηγοριών αιμοδοτών.

Δ. Συζήτηση

Δ1. Πειράματα Ανασύστασης με Χρήση *in vitro* Μοντέλου Μετάγγισης

Δ1.1 Παράμετροι που Σχετίζονται με την Αιμόλυση

(α) Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη

Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη της αποθηκευμένης μονάδας μετάγγισης αυξάνεται με την πάροδο των ημερών αποθήκευσης. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, στα ερυθροκύτταρα που αποθηκεύονται και γηράσκουν *ex vivo* συσσωρεύεται σύνολο αποθηκευτικών βλαβών που έχουν ως κύριο αποτέλεσμα την αιμόλυση. Η δυναμική αυτών ποικίλει, καθώς ορισμένες συμβαίνουν λίγες ώρες μετά την αιμοδοσία ενώ άλλες αποτελούν τη συσσώρευση αλλαγών και εκδηλώνονται μετά από ημέρες ή/και εβδομάδες (Flegel et al. 2014). Βάσει αυτών των βλαβών τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα κατηγοριοποιούνται σε νεαρά (<21 ημέρες αποθήκευσης) και γηρασμένα (>21 ημέρες αποθήκευσης), εκ των οποίων τα δεύτερα έχουν υποστεί τον μεγαλύτερο βαθμό αποθηκευτικών αλλοιώσεων (García-Roa et al. 2017). Είναι, επομένως, αναμενόμενο τα πιο γηρασμένα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα να έχουν αυξημένη απελευθέρωση αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο. Η *ex vivo* γήρανση των ερυθροκυττάρων οδηγεί επίσης στην παραγωγή μικροκυστιδίων πλούσιων σε αιμοσφαιρίνη. Έχειδειχθεί ότι η μικροκυστιδιακή αιμοσφαιρίνη δεν είναι αποτελεσματικά εγκλεισμένη και μπορεί να απελευθερωθεί από τα κυστίδια με αποτέλεσμα την αύξηση της αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο (Kriebardis et al. 2008).

Η επιπλέον αιμοσφαιρίνη που απελευθερώνεται μετά την *in vitro* διαδικασία της μετάγγισης βρίσκεται σε πολύ χαμηλότερη τάξη μεγέθους από την ήδη υπάρχουσα στη μονάδα, ανεξάρτητα με την ημέρα αποθήκευσης. Αυτό συνάδει με τα αποτελέσματα της ομάδας των *Rapido et al.* οι οποίοι μέτρησαν την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη στο πλάσμα δεκτών σε τακτά χρονικά διαστήματα μετά την λήψη διαφορετικής περιόδου αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων και δε βρήκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ενδοαγγειακής αιμόλυσης (Rapido et al. 2017). Εντός του 24ώρου της προσομοίωσης των μετα-μεταγγισιακών συνθηκών, παρατηρείται μια μικρή αυξητική τάση των επιπέδων της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης προοδευτικά με τον χρόνο. Τα ερυθροκύτταρα βρίσκονται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ένα *in vitro* σύστημα και τα ενεργειακά τους αποθέματα μειώνονται, γεγονός που τα οδηγεί σε κατάσταση ενεργειακού στρες. Βρίσκονται επιπλέον σε κατάσταση θερμοκρασιακού στρες, καθώς στους 37°C η μεταβολική τους δραστηριότητα επανέρχεται, χωρίς όμως να διαθέτουν τα απαραίτητα ενεργειακά και θρεπτικά αποθέματα για να τη στηρίξουν. Οι τιμές τυπικής απόκλισης, και ιδιαίτερα στα πειράματα ανασύστασης 24ωρης επώασης που είναι μεγαλύτερος ο αριθμός δοτών και δεκτών που μελετήθηκε, είναι αρκετά υψηλές. Η εντός του ασκού αιμόλυση, καθώς και η μετα-μεταγγισιακή αιμόλυση έχειδειχθεί πως είναι πολυπαραγοντικά φαινόμενα (Reisz et al. 2018). Τα εγγενή και μη εγγενή χαρακτηριστικά του δότη (Tzounakas et al. 2016c), αλλά και του δέκτη (Flegel et al. 2014) φαίνεται να αποτελούν δύο από τους κύριους παράγοντες που σχετίζονται με την αιμόλυση (εντός της μονάδας μετάγγισης και μετα-μεταγγισιακά), γεγονός που δικαιολογεί τις υψηλές τιμές τυπικής απόκλισης.

Παρατηρήθηκε ότι το πλάσμα «απορροφά» την αρνητική επίδραση της θερμοκρασίας όσον αφορά τις σχετικές με την αιμόλυση παραμέτρους των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων. Στο υπερκείμενο των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων απελευθερώνονται μόρια αιμοσφαιρίνης και αίμης, ιόντα σιδήρου, καθώς και δραστικές ρίζες οξυγόνου από ερυθροκύτταρα που λύνονται. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες επιτείνουν την οξειδωτική καταπόνηση στα ερυθροκύτταρα και είναι ικανοί να επιφέρουν τη λύση τους. Ουσίες του πλάσματος, όπως το ουρικό και το ασκορβικό οξύ, μπορούν να δεσμεύσουν οξειδωτικούς παράγοντες, μη επιτρέποντάς τους να βλάψουν περαιτέρω τα ερυθροκύτταρα και προστατεύοντάς τα με αυτόν τον τρόπο από λύση (Stocker 2016). Η αλβουμίνη είναι ένα ακόμα συστατικό του πλάσματος που μπορεί να αποτρέψει τη λύση των ερυθροκυττάρων. Μπορεί να δρα

εμμέσως ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, καθώς προσδένει ποικίλους τύπους μορίων (όπως είναι τα ελεύθερα ιόντα σιδήρου) (Roche et al. 2008) και έχειδειχθεί πως διαθέτει την ικανότητα να επαναφέρει στο φυσιολογικό τους σχήμα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα που έχουν μετατραπεί σε εχινόκυτταρα (Reinhart et al. 2015). Με αυτόν τον τρόπο τα καθιστά ανθεκτικότερα στις διάφορες μετα-μεταγγισιακές καταπονήσεις.

(β) Οσμωτική Ευθραυστότητα Ερυθροκυττάρων

Με την πάροδο των ημερών αποθήκευσης τα ερυθροκύτταρα αντιμετωπίζουν λιγότερο αποτελεσματικά την οσμωτική καταπόνηση, αποτέλεσμα που συνάδει με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία (Almizraq et al. 2013; Tzounakas et al. 2016a; Alshalani and Acker 2017). Τα αποθηκευμένα στους 4°C ερυθροκύτταρα συνεχίζουν να είναι μεταβολικά ενεργά (με χαμηλότερο μεταβολικό ρυθμό), επομένως με την πάροδο του χρόνου τα θρεπτικά αποθέματα εξαντλούνται και η παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP μειώνεται. ATP-εξαρτώμενοι μεταφορείς και δίαυλοι, όπως η μεμβρανική $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPάση}$ δυσλειτουργούν, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η συγκέντρωση ιόντων εντός κι εκτός της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και τελικά να μεταβάλλεται το ίδιο το σχήμα του κυττάρου (Minetti et al. 2001). Το σχήμα επηρεάζεται επιπλέον από την απώλεια μεμβρανικού υλικού λόγω κυστιδιοποίησης (Card et al. 1983). Εξαιτίας των παραπάνω αποθηκευτικών αλλοιώσεων, τα γηραιότερα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα καθίστανται πιο επιδεκτικά στην οσμωτική αιμόλυση.

Οι πειραματικές μετα-μεταγγισιακές συνθήκες, ενώ στα ερυθροκύτταρα της ημέρας 2 επιδεινώνουν την οσμωτική ανθεκτικότητα, τις υπόλοιπες ημέρες τη διατηρούν σταθερή ή τη βελτιώνουν. Στα 24ωρα πειράματα ανασύστασης παρατηρήθηκε βελτίωση στο οσμωτικό προφίλ των ερυθροκυττάρων όλων των ημερών (7, 21, 42), ενώ στην χρονοεξαρτώμενη μελέτη, στο μέσο της αποθήκευσης η οσμωτική ανθεκτικότητα σταθεροποιείται κοντά στα αρχικά επίπεδα της μονάδας μετάγγισης και στο τέλος βελτιώνεται με εξαίρεση την τιμή στις 24 ώρες. Τα ερυθροκύτταρα της ημέρας 2 δεν έχουν προλάβει να προσαρμοστούν ομοιοστατικά στο περιβάλλον της αποθήκευσης και μεταφέροντάς τα τόσο άμεσα σε ένα νέο περιβάλλον (φυσιολογικά και θερμοκρασιακά), τα επιβαρύνουμε με επιπλέον καταπόνηση, η οποία πιθανώς τα καθιστά πιο επιρρεπή σε οσμωτική λύση. Στους 37°C ο μεταβολικός ρυθμός του ερυθροκυττάρου επανέρχεται, επομένως και τα επίπεδα ATP (Kor et al. 2009) και έτσι επαναλειτουργούν οι αντλίες και οι μεταφορείς της μεμβράνης του. Το συνολικό περιβάλλον που παρέχει το μοντέλο της *in vitro* μετάγγισης πλησιάζει ως ένα βαθμό το φυσιολογικό περιβάλλον του ερυθροκυττάρου και επομένως η λειτουργία του είναι πιο φυσιολογική. Με αυτόν τον τρόπο, στο νέο περιβάλλον μπορεί να αντιμετωπίζει με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα το οσμωτικό στρες. Οι μεγάλες τιμές τυπικής απόκλισης αναδεικνύουν για ακόμη μία φορά την επίδραση του δότη και του δέκτη στο αιμολυτικό προφίλ των ερυθροκυττάρων (Tzounakas et al. 2016a).

Σε όλες τις ημέρες αποθήκευσης που μελετήθηκαν η παρουσία του πλάσματος αναδείχθηκε ευνοϊκή. Δράσεις παραγόντων του πλάσματος που προαναφέρθηκαν, όπως της αλβουμίνης, μπορεί να σταθεροποιούν την ερυθροκυτταρική μεμβράνη και να ενισχύουν την ανθεκτικότητά της στην οσμωτική καταπόνηση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ερυθροκύτταρα στο κυτταρόσολό τους έχουν συγκεντρώσεις K^+ και Na^+ περίπου 90mM και 5mM, ενώ στο εξωτερικό τους περιβάλλον 5mM και 140mM αντίστοιχα. Προς το τέλος της αποθήκευσης, λόγω δυσλειτουργίας της αντλίας $\text{Na}^+\text{-K}^+$ το ενδοκυττάριο κάλιο μειώνεται και αυξάνεται στο υπερκείμενο, ενώ το ενδοκυττάριο νάτριο αυξάνεται (Flatt F. et al. 2014). Στο πλάσμα βρίσκονται διαλυμένοι ηλεκτρολύτες (Na^+ , K^+ κ.α.) (Vander 2001) σε φυσιολογική αναλογία, γεγονός που μαζί με την επαναλειτουργία των αντλιών της μεμβράνης μπορεί να οδηγήσει στην αποκατάσταση της ιοντικής ισορροπίας εντός κι εκτός του ερυθροκυττάρου. Η αποκατάσταση αυτή μπορεί να βοηθήσει το ερυθροκύτταρο να αντιμετωπίσει αποτελεσματικότερα την οσμωτική πίεση.

(γ) Μηχανική Ευθραυστότητα Ερυθροκυττάρων

Ο δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας παραμένει σταθερός μέχρι το μέσο της αποθήκευσης και αυξάνεται προς το τέλος. Η σταδιακή αύξηση του δείκτη MFI είναι αναμενόμενη (Raval et al. 2011; Tzounakas et al. 2016a) και σχετίζεται με αποθηκευτικές βλάβες στη μορφολογία, κυρίως, του αποθηκευμένου ερυθροκυττάρου. Η μηχανική συμπεριφορά του καθορίζεται ως επί το πλείστον από το σχήμα, τον λόγο επιφάνειας προς όγκο και την κατάσταση του κυτταροσκελετού και της μεμβράνης του (Mohandas and Chasis 1993), ιδιότητες που αλλοιώνονται κατά την *ex vivo* αποθήκευση του ερυθροκυττάρου (Hess 2010; Barshtein et al. 2011).

Οι τιμές τυπικής απόκλισης είναι ιδιαίτερα υψηλές και στα 24ωρα και στα 3ωρα πειράματα ανασύστασης. Το αποτέλεσμα αυτό έχει δείχθει και σε παλαιότερες ερευνητικές εργασίες της ομάδας μας (Tzounakas et al. 2016a) και πιθανώς υπονοεί τη συμμετοχή αρκετών παραγόντων ή/και μοριακών μονοπατιών στην αντιμετώπιση της μηχανικής καταπόνησης. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του δότη συμμετέχουν επιπλέον στην παρατηρούμενη διακύμανση των τιμών, καθώς έχει δείχθει να επηρεάζουν την μηχανική ανθεκτικότητα των ερυθροκυττάρων (Raval et al. 2010, 2011). Η επίδραση αυτή, σε συνδυασμό με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του δέκτη μπορεί να εξηγήσει τις παρατηρούμενες διαφορές αντιμετώπισης του μηχανικού στρες μεταξύ των αποθηκευμένων ανασυσταμένων ερυθροκυττάρων της πρώτης και της δεύτερης ομάδας αποθήκευσης. Τα νεαρότερα (ημέρας 2) ανασυσταμένα ερυθροκύτταρα βρέθηκαν ανθεκτικότερα στο μηχανικό στρες από τα αντίστοιχα αποθηκευμένα, ενώ των υπόλοιπων ημερών ποικίλουν ως προς τη μηχανική ευθραυστότητα. Η δομή της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού των νεαρών ερυθροκυττάρων δεν έχει επηρεαστεί ακόμα από την διαδικασία και τις συνθήκες της αποθήκευσης κι επομένως μπορούν, πιθανώς, να αντιμετωπίσουν αποτελεσματικότερα τη μηχανική καταπόνηση. Την ημέρα 21 η μηχανική αιμόλυση αυξάνεται άμεσα, μόλις 3 ώρες μετά την ανάμιξη, υποδηλώνοντας μια πρώιμη αντίδραση των κυττάρων στο μηχανικό στρες μετά την *in vitro* μετάγγιση, καταγραφή που «χάνεται» στις κλασικές μετρήσεις εικοσιτετραώρου. Με δεδομένο ότι οι αλλοιώσεις στις μηχανικές ιδιότητες των κυττάρων είναι ενδεικτικές υποθανάτιων βλαβών αποθήκευσης, το εύρημα αυτό δείχνει μια τάση για ταχύτατη απομάκρυνση των εν λόγω κυττάρων μέσω εξωαγγειακής αιμόλυσης μεταμεταγγισιακά.

Το πλάσμα επιδεινώνει τη μηχανική καταπόνηση των ερυθροκυττάρων μέσης και προχωρημένης αποθήκευσης τις πρώτες 12 ώρες μετά τη μετάγγιση, κάτι το οποίο ενισχύει τις ενδείξεις για σχετικά άμεση αντίδραση των κυττάρων στις συνθήκες της μετάγγισης. Παρά τον αντιαιμολυτικό και αντιοξειδωτικό χαρακτήρα του πλάσματος φαίνεται πως οι διαλυτοί παράγοντές του δεν μπορούν να επιδράσουν άμεσα στη διαμορφωμένη από την αποθήκευση κατάσταση της μεμβράνης και του υπομεμβρανικού σκελετού.

Δ1.2 Οξειδωτικές Παράμετροι

(α) Επίπεδα Ενδοκυττάρων ROS

Τα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS εντός της μονάδας μετάγγισης μένουν σταθερά από την ημέρα 2 μέχρι την ημέρα 21 και μειώνονται την ημέρα 42, μοτίβο που δεν ταιριάζει με τη συνηθέστερη σταδιακή αύξηση με μέγιστη τιμή στο μέσο της αποθήκευσης (D'Alessandro et al. 2012).

Τα ανασυσταμένα δείγματα της ημέρας 2 παρουσιάζουν μια ανοδική πορεία στα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS, ξεκινώντας με τιμές αρκετά χαμηλότερες των αντίστοιχων της μονάδας μετάγγισης και πλησιάζοντάς τις προς το τέλος της επώασης. Αντίστροφη είναι η κατάσταση για τις άλλες δύο ημέρες αποθήκευσης, με εντυπωσιακότερη την ημέρα 21 όπου οι ROS ξεκινούν από επίπεδα σχεδόν διπλάσια της μονάδας μετάγγισης και μειώνονται γραμμικά ($R^2=0,911$) καταλήγοντας σε χαμηλότερες τιμές μετά τις 18 ώρες. Η παραγωγή ROS πιθανώς αποτελεί πρώιμη αντίδραση των ερυθροκυττάρων μικρής και μέσης ηλικίας αποθήκευσης στις συνθήκες προσωμοίωσης της μετάγγισης.

Το πλάσμα κατευνάζει την παραγωγή ROS για τις πρώτες 12 ώρες στα νεαρά ερυθροκύτταρα, ενώ δεν έχει ιδιαίτερη επίδραση στα κύτταρα των ημερών 21 και 42. Η αντιοξειδωτική δράση του πλάσματος είναι γνωστή, όμως τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι μπορεί να εξαρτάται από τον χρόνο αποθήκευσης των ερυθροκυττάρων τα οποία καλείται να προστατεύσει από το οξειδωτικό στρες.

(β) Επίπεδα Εξωγενώς Επαγόμενων ROS μετά από Επώαση με tBHP και διαμίδιο

Τα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS μετά την επίδραση με tBHP είναι μέγιστα στο μέσο της αποθήκευσης, ενώ μετά την επίδραση με διαμίδιο συνεχώς αυξάνονται έχοντας μέγιστη τιμή την ημέρα 42.

Η επίδραση με tBHP είναι εντονότερη στα ανασύσταμένα δείγματα σε σχέση με τα αντίστοιχα στους 4°C, με εμφανή την πρώιμη αύξηση των ROS στα νεαρά και μέσης ηλικίας ερυθροκύτταρα. Το tBHP είναι ένα αλκυλο-υδροϋπεροξείδιο που χρησιμοποιείται ευρέως στη μελέτη της επίδρασης του οξειδωτικού στρες. Έχει δειχθεί ότι επιδρά στη μεμβράνη και τον κυτταροσκελτό του ερυθροκυττάρου (Koster and Slee 1983), αλλά και σε φυσικοχημικές ιδιότητές του (Corry et al. 1980). Επομένως, εφόσον στη θερμοκρασία σώματος επανέρχεται η μεταβολική λειτουργία του ερυθροκυττάρου, είναι λογική η αύξηση των ROS στα ανασυσταμένα κύτταρα. Όσον αφορά στην επίδραση του διαμιδίου, τα κύτταρα μέσης ηλικίας εμφανίζουν πάλι μια πρώιμη αύξηση των ROS μετά την διαδικασία της προσομοίωσης της μετάγγισης. Το διαμίδιο οξειδώνει στοιχειομετρικά τη γλουταθειόνη σε δισουλφίδιο (Kosower et al. 1969), επομένως επιδρά άμεσα στον μεταβολισμό του ερυθροκυττάρου, γεγονός που εξηγεί την άνοδο των ROS στα ανασυσταμένα κύτταρα.

Το πλάσμα έχει διττό ρόλο στη συγκεκριμένη περίπτωση. Στα ερυθροκύτταρα που έχει χορηγηθεί tBHP το πλάσμα εμφανίζει ξεκάθαρη αντιοξειδωτική δράση, κάτι που δε συμβαίνει όμως στην περίπτωση του διαμιδίου, όπου το πλάσμα είναι προ-οξειδωτικό. Φαίνεται πως παρά τον γνωστό αντιοξειδωτικό ρόλο του πλάσματος, η δράση του εξαρτάται από το μοριακό στόχο του οξειδωτικού παράγοντα που χορηγείται και την αποθηκευτική ηλικία των ερυθροκυττάρων που προαναφέρθηκε, παρατηρήσεις που χρήζουν περαιτέρω μελέτης.

Δ1.3 Σύνοψη Παρατηρήσεων

Συνολικά, η αιμόλυση και η επιδεκτικότητα των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων σε εξωγενείς αιμολυτικές καταπονήσεις παρουσιάζονται χαμηλότερες παρουσία πλάσματος, με εξαίρεση τη μηχανική αιμόλυση. Στην περίπτωση της μηχανικής αιμόλυσης παρατηρήθηκε πρώιμη αύξηση του δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας, ιδιαίτερα στα κύτταρα μέσης ηλικίας, και το πλάσμα επιδείνωνε τη μηχανική κατάσταση των κυττάρων. Όσον αφορά στο οξειδωτικό προφίλ, τα επίπεδα ROS αυξάνονται αρκετά άμεσα μετά την ανάμιξη των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων με το υγιές πλάσμα, το οποίο ανάλογα με τον χρόνο αποθήκευσης και το μοριακό στόχο του οξειδωτικού που χρησιμοποιείται μπορεί να έχει είτε προστατευτικό, είτε προ-οξειδωτικό ρόλο. Συμπερασματικά, δεν είναι λίγες οι παράμετροι που διαφέρουν σημαντικά μετά την προσομοίωση της μετάγγισης, τόσο σε σχέση με την κατάσταση στη μονάδα μετάγγισης, όσο και σε σχέση με την κλασσική μέτρηση στο πέρας του πρώτου εικοσιτετραώρου μετά τη μετάγγιση. Με δεδομένη την επίδραση της θερμοκρασίας σε ποικίλα μεταβολικά και φυσιολογικά μονοπάτια των ερυθροκυττάρων, είναι σημαντικό να τονιστεί πως το αποθηκευτικό πρότυπο ενδέχεται να παρεκκλίνει ουσιαστικά σε σχέση με τη μετα-μεταγγισιακή εικόνα των μεταγγιζόμενων ερυθροκυττάρων, τουλάχιστον όσον αφορά στις προαναφερθείσες παραμέτρους. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας ανέδειξαν πως ακόμα και η εικοσιτετράωρη μέτρηση μετά τη μετάγγιση δεν παρέχει πλήρη συμπεράσματα όσον αφορά σε παραμέτρους που φτάνουν τα μέγιστα επίπεδα πολύ πρώιμα.

Δ2. Αιματολογικά και Βιοχημικά Χαρακτηριστικά σε Αιμοδότες με ή Χωρίς Ετεροζυγωτία σε β-MA

Οι ετερόζυγοι φορείς β-μεσογειακής αναιμίας αποτελούν μη αμελητέο ποσοστό του συνόλου των αιμοδοτών στη χώρα μας, επομένως η μελέτη της αποθηκευτικής ικανότητας των ερυθροκυττάρων τους και της απόδοσης της μετάγγισης είναι ιδιαίτερα σημαντική. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν ορισμένα ήδη γνωστά χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων των συγκεκριμένων αιμοδοτών, όπως τις χαμηλότερες τιμές αιματοκρίτη, μέσου ερυθροκυτταρικού όγκου και μέσης αιμοσφαιρίνης ερυθροκυττάρου (Sanghani and Haldankar 2006), γεγονός το οποίο καθιστά ιδιαίτερα αξιόπιστη την ομάδα μελέτης που έχει συσταθεί. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε το εύρος της οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων των ετερόζυγων φορέων β-μεσογειακής αναιμίας, καθώς ενώ η μέση τιμή του δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας ήταν χαμηλότερη σε αυτή την ομάδα, η τυπική απόκλιση ήταν σημαντική. Φαίνεται, λοιπόν, πως υπάρχει ένα ποσοστό ετερόζυγων με τιμές οσμωτικής ευθραυστότητας παραπλήσιες του γενικού πληθυσμού, κάτι που έχει δειχθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες (El-Beshlawy et al. 2007).

Πέραν των παραπάνω, αναμενόμενων ευρημάτων, τα επίπεδα της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης και των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών στο πλάσμα των φορέων βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερα, σε αντίθεση με την υψηλότερη εξωκυττάρια αντιοξειδωτική ικανότητα. Η ιδιαίτερη γεωμετρία που χαρακτηρίζει τα ερυθροκύτταρα της συγκεκριμένης ομάδας, καθώς και το μέγεθός τους μπορεί να δικαιολογήσει τα χαμηλότερα επίπεδα αιμόλυσης, τα οποία συνάδουν και με τον χαμηλότερο δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας. Η υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματός τους, ίσως έχει προστατευτικό ρόλο και ευθύνεται μερικώς για τη μειωμένη καρβονυλίωση των πρωτεϊνών, όπως επίσης και για τα χαμηλότερα επίπεδα αιμόλυσης, καθώς μπορεί να προστατεύει τα ερυθροκύτταρα από δυνητικά αιμολυτικές οξειδωτικές καταπονήσεις.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η επιπλέον διασύνδεση του δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας με τους ηλεκτρολύτες Na^+ και K^+ , αποκλειστικά στην ομάδα των ετερόζυγων. Τα ερυθροκύτταρα τους χαρακτηρίζονται από τροποποιημένη ανταλλαγή ανιόντων (Ficarra et al. 2009), η οποία συνδέεται με την αντίστοιχη διαπερατότητα σε κατιόντα. Η εξωκυττάρια συγκέντρωση των εν λόγω ηλεκτρολυτών, φαίνεται να συσχετίζεται με την οσμωτική ευθραυστότητα στα συγκεκριμένα κύτταρα που παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο ιοντικής ανταλλαγής. Η αντίστροφη συσχέτιση Na^+ και K^+ με τον δείκτη MCF συνάδει με την αντίστοιχη διαφορά στην εξωκυττάρια συγκέντρωση των δύο ηλεκτρολυτών.

Ο αριθμός διασυνδέσεων των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών του πλάσματος βρέθηκε αισθητά μικρότερος στην ομάδα των ετερόζυγων. Για το συγκεκριμένο αποτέλεσμα ίσως είναι υπεύθυνα τα χαμηλά επίπεδα καρβονυλίωσης που προαναφέρθηκαν, καθώς μπορεί να μην επιτρέπουν την ανίχνευση ορισμένων συσχετίσεων ή/και να υπονοούν την ανυπαρξία αυτών σε αντίθεση με την ομάδα αναφοράς. Στην τελευταία περίπτωση, είναι συχνό το φαινόμενο εμφάνισης ή απουσίας συγκεκριμένων συσχετίσεων ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι ουδών στις απόλυτες τιμές διασυνδεόμενων παραμέτρων.

Τέλος, η δικτύωση της κλαστερίνης είναι ισχυρότερη στους φορείς και η τοπολογία παραμέτρων όπως του σιδήρου και του μονοξειδίου του αζώτου διαφέρει. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν μια ιδιαιτερότητα στο μεταβολισμό και τη ρύθμιση αυτού στα συγκεκριμένα άτομα που χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Βιβλιογραφία

- A. J, D. C, D. D (2014) Using blood bank quality control data to analyze manufacturing and donor variability. *Transfusion*
- Adams F, Bellairs G, Bird AR, Oguntibeju OO (2015) Biochemical storage lesions occurring in nonirradiated and irradiated red blood cells: A brief review. *Biomed Res. Int.*
- Adhiyanto C, Hattori Y, Yamashiro Y, et al (2014) Oxidation status of β -thalassemia minor and Hb H disease, and its association with glycerol lysis time (GLT50). *Hemoglobin*. doi: 10.3109/03630269.2014.892884
- Almizraq R, Tchir JDR, Holovati JL, Acker JP (2013) Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and in vitro quality. *Transfusion* 53:2258–2267. doi: 10.1111/trf.12080
- Alshalani A, Acker JP (2017) Red blood cell membrane water permeability increases with length of ex vivo storage. *Cryobiology* 76:51–58. doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.009
- An X, Salomao M, Guo X, et al (2007) Tropomyosin modulates erythrocyte membrane stability. *Blood*. doi: 10.1182/blood-2006-07-036954
- Anderson NL, Anderson NG (2002) The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects. *Mol Cell Proteomics* 1:845–867. doi: 10.1074/mcp.R200007-MCP200
- Ando K, Beppu M, Kikugawa K, et al (1999) Membrane proteins of human erythrocytes are modified by advanced glycation end products during aging in the circulation. *Biochem Biophys Res Commun*. doi: 10.1006/bbrc.1999.0606
- Antonelou MH, Kriebardis AG, Papassideri IS (2010) Aging and death signalling in mature red cells: From basic science to transfusion practice. *Blood Transfus.* 8
- Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, et al (2011) Apolipoprotein J/Clusterin is a novel structural component of human erythrocytes and a biomarker of cellular stress and senescence. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0026032
- Antonelou MH, Seghatchian J (2016) Insights into red blood cell storage lesion: Toward a new appreciation. *Transfus. Apher. Sci.*
- Aoki T (2017) A comprehensive review of our current understanding of red blood cell (RBC) glycoproteins. *Membranes* (Basel). doi: 10.3390/membranes7040056
- Arese P, De Flora A (1990) Pathophysiology of hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Semin Hematol*
- Arese P, Turrini F, Schwarzer E (2005) Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 16:133–146
- Asgary S, Naderi GH, Ghannady A (2005) Effects of cigarette smoke, nicotine and cotinine on red blood cell hemolysis and their -SH capacity. *Exp Clin Cardiol*
- Assenov Y, Ramírez F, Schelhorn SESE, et al (2008) Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics* 24:282–284. doi: 10.1093/bioinformatics/btm554
- Azouzi S, Romana M, Arashiki N, et al (2018) Band 3 phosphorylation induces irreversible alterations of stored red blood cells. *Am. J. Hematol.*
- Badior KE, Casey JR (2018) Molecular mechanism for the red blood cell senescence clock. *IUBMB Life* 70:32–40
- Bain B (2004) *A Beginner's Guide to Blood Cells*
- Barrett AN, Saminathan R, Choolani M (2017) Thalassaemia screening and confirmation of carriers in

parents. Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.

- Barshtein G, Goldschmidt N, Pries AR, et al (2017) Deformability of transfused red blood cells is a potent effector of transfusion-induced hemoglobin increment: A study with β -thalassemia major patients. *Am. J. Hematol.*
- Barshtein G, Manny N, Yedgar S (2011) Circulatory Risk in the Transfusion of Red Blood Cells With Impaired Flow Properties Induced by Storage. *Transfus Med Rev* 25:24–35. doi: 10.1016/j.tmr.2010.08.004
- Barshtein G, Pries AR, Goldschmidt N, et al (2016) Deformability of transfused red blood cells is a potent determinant of transfusion-induced change in recipient's blood flow. *Microcirculation*. doi: 10.1111/micc.12296
- Beaumont C, B  ris P, Beuzard Y, Brugnara C (2009) ESH Handbook on Disorders of Erythropoiesis, Erythrocytes and Iron Metabolism
- Becker BF (1993) Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* 14:615–631. doi: 10.1016/0891-5849(93)90143-I
- BECKER PS, SCHWARTZ MA, MORROW JS, LUX SE (1990) Radiolabel- transfer cross- linking demonstrates that protein 4.1 binds to the N- terminal region of β spectrin and to actin in binary interactions. *Eur J Biochem*. doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb19406.x
- Benedik PS, Hamlin SK (2014) The Physiologic Role of Erythrocytes in Oxygen Delivery and Implications for Blood Storage. *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.* 26:325–335
- Benga G (2012) The first discovered water channel protein, later called aquaporin 1: Molecular characteristics, functions and medical implications. *Mol. Aspects Med.* 33:518–534
- Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A, et al (2007) Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc Natl Acad Sci*. doi: 10.1073/pnas.0708160104
- Beppu M, Mizukami A, Nagoya M, Kikugawa K (1990) Binding of anti-band 3 autoantibody to oxidatively damaged erythrocytes. Formation of senescent antigen on erythrocyte surface by an oxidative mechanism. *J Biol Chem* 265:3226–3233
- Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, et al (2002) Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J Surg Res*. doi: 10.1006/jsre.2001.6306
- Betts JG (2013) Anatomy & physiology. OpenStax Coll 1355
- Beutler E (2010) Chapter 32. Destruction of Erythrocytes. In: Williams Hematology, 8e
- Blanc L, Vidal M (2010) Reticulocyte membrane remodeling: Contribution of the exosome pathway. *Curr. Opin. Hematol.* 17:177–183
- Bosman GJCGM, Lasonder E, Groenen-D  pp YAM, et al (2010) Comparative proteomics of erythrocyte aging in vivo and in vitro. *J. Proteomics*
- Bosman GJCGM, Lasonder E, Luten M, et al (2008a) The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions. *Transfusion*. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01630.x
- Bosman GJCGM, Werre JM, Willekens FLA, Novotn   VMJ (2008b) Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: Structural aspects and implications for transfusion. *Transfus. Med.*
- Bosman GJCGM, Willekens FLA, Werre JM (2005) Erythrocyte aging: A more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell. Physiol. Biochem.* 16:1–8
- Brown KM, Morrice PC, Duthie GG (1997) Erythrocyte vitamin E and plasma ascorbate concentrations in relation to erythrocyte peroxidation in smokers and nonsmokers: Dose

- response to vitamin E supplementation. *Am J Clin Nutr.* doi: 10.1093/ajcn/65.2.496
- Bunn HF, Jandl JH (1968) Exchange of heme among hemoglobins and between hemoglobin and albumin. *J Biol Chem* 243:465–475. doi: 10.1007/s00213-017-4630-9
- Burger P, Hilarius-Stokman P, De Korte D, et al (2012) CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood.* doi: 10.1182/blood-2011-10-386805
- Campanella ME, Chu H, Low PS (2005) Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci.* doi: 10.1073/pnas.0409741102
- Card RT, Mohandas N, Mollison PL (1983) Relationship of post- transfusion viability to deformability of stored red cells. *Br J Haematol* 53:237–240. doi: 10.1111/j.1365-2141.1983.tb02016.x
- Carruthers A, DeZutter J, Ganguly A, Devaskar SU (2009) Will the original glucose transporter isoform please stand up! *Am J Physiol Metab.* doi: 10.1152/ajpendo.00496.2009
- Cartron JP, Rahuel C (1992) Human Erythrocyte Glycophorins: Protein and Gene Structure Analyses. *Transfus Med Rev.* doi: 10.1016/S0887-7963(92)70158-8
- Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A, et al (1992) Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem*
- Chai YC, Ashraf SS, Rokutan K, et al (1994) S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: Evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys* 310:273–281. doi: 10.1006/abbi.1994.1167
- Chateauvieux S, Grigorakaki C, Morceau F, et al (2011) Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. In: *Biochemical Pharmacology.* pp 1291–1303
- Chaudhary R, Katharia R (2012) Oxidative injury as contributory factor for red cells storage lesion during twenty eight days of storage. *Blood Transfus.* doi: 10.2450/2011.0107-10
- Cho J, King JS, Qian X, et al (2008) Dephosphorylation of 2,3-bisphosphoglycerate by MIPP expands the regulatory capacity of the Rapoport-Luebering glycolytic shunt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5998–6003. doi: 10.1073/pnas.0710980105
- Codandabany U (2000) Erythrocyte lipid peroxidation and antioxidants in cigarette smokers. *Cell Biochem Funct.* doi: 10.1002/(SICI)1099-0844(200006)18:2<99::AID-CBF855>3.0.CO;2-F
- Cohen G, Hochstein P (1963) Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes. *Biochemistry* 2:1420–1428. doi: 10.1021/bi00906a038
- Colombo G, Rossi R, Gagliano N, et al (2012) Red blood cells protect albumin from cigarette smoke-induced oxidation. *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0029930
- Corry WD, Meiselman HJ, Hochstein P (1980) t-Butyl hydroperoxide-induced changes in the physicochemical properties of human erythrocytes. *BBA - Biomembr.* doi: 10.1016/0005-2736(80)90101-7
- D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L (2012) Time-course investigation of sagm-stored leukocyte-filtered red blood cell concentrates: From metabolism to proteomics. *Haematologica* 97:107–115. doi: 10.3324/haematol.2011.051789
- D'Alessandro A, Liunbruno G, Grazzini G, Zolla L (2010) Red blood cell storage: The story so far. *Blood Transfus.*
- D'Amici GM, Mirasole C, D'Alessandro A, et al (2012) Red blood cell storage in SAGM and AS3: A comparison through the membrane two-dimensional electrophoresis proteome. *Blood Transfus.* doi: 10.2450/2012.008S

- Dantas De Medeiros TM, Ortega KC, Mion D, et al (2002) Normal erythrocyte calpain I activity on membrane proteins under near-physiological conditions in patients with essential hypertension. *Sao Paulo Med J*
- del Mar Romero M, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M (2012) Effect of sex and prior exposure to a cafeteria diet on the distribution of sex hormones between plasma and blood cells. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0034381
- DeSimone RA, Hayden JA, Mazur CA, et al (2019) Red blood cells donated by smokers: A pilot investigation of recipient transfusion outcomes. *Transfusion*. doi: 10.1111/trf.15339
- Desmarests M, Bardiaux L, Benzenine E, et al (2016) Effect of storage time and donor sex of transfused red blood cells on 1-year survival in patients undergoing cardiac surgery: An observational study. *Transfusion*. doi: 10.1111/trf.13537
- DeVenuto F, Wilson SM (1976) Distribution of Progesterone and Its Effect on Human Blood During Storage. *Transfusion*. doi: 10.1046/j.1537-2995.1976.16276155103.x
- Diez-Silva M, Dao M, Han J, et al (2010) Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bull* 35:382–388. doi: 10.1557/mrs2010.571
- Dinkla S, Peppelman M, Der Raadt J, et al (2014) Phosphatidylserine exposure on stored red blood cells as a parameter for donor-dependent variation in product quality. *Blood Transfus*. doi: 10.2450/2013.0106-13
- Dzierzak E, Philipsen S (2013) Erythropoiesis: Development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:. doi: 10.1101/cshperspect.a011601
- Echevarría M, Muñoz-Cabello AM, Sánchez-Silva R, et al (2007) Development of cytosolic hypoxia and hypoxia-inducible factor stabilization are facilitated by aquaporin-1 expression. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M702639200
- El-Beshlawy A, Kaddah N, Moustafa A, et al (2007) Screening for B-thalassaemia carriers in Egypt: significance of the osmotic fragility test. *East Mediterr Heal J*
- Falcó C, Vayá A, Iborra J, et al (2003) Erythrocyte aggregability and disaggregability in thalassemia trait carriers analyzed by a laser backscattering technique. *Clin Hemorheol Microcirc*
- Fang YZ, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18:872–879
- Ficarra S, Tellone E, Giardina B, et al (2009) Derangement of erythrocytic AE1 in beta-thalassemia by caspase 3: Pathogenic mechanisms and implications in red blood cell senescence. *J Membr Biol*. doi: 10.1007/s00232-009-9157-5
- Flatt F. JF, Bawazir M. WM, Bruce LJ (2014) The involvement of cation leaks in the storage lesion of red blood cells. *Front. Physiol*. 5 JUN
- Flegel WA, Natanson C, Klein HG (2014) Does prolonged storage of red blood cells cause harm? *Br. J. Haematol*. 165:3–16
- Fortier N, Snyder LM, Garver F, et al (1988) The relationship between in vivo generated hemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane rigidity. *Blood*
- Fowler VM (1990) Tropomodulin: A cytoskeletal protein that binds to the end of erythrocyte tropomyosin and inhibits tropomyosin binding to actin. *J Cell Biol*. doi: 10.1083/jcb.111.2.471
- Frame T, Carroll T, Korchagina E, et al (2007) Synthetic glycolipid modification of red blood cell membranes. *Transfusion* 47:876–882. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01204.x
- García-Roa M, Del Carmen Vicente-Ayuso M, Bobes AM, et al (2017) Red blood cell storage time & transfusion: Current practice, concerns & future perspectives. *Blood Transfus*. 15:222–231

- Geldwerth D, Kuypers FA, Butikofer P, et al (1993) Transbilayer mobility and distribution of red cell phospholipids during storage. *J Clin Invest*. doi: 10.1172/JCI116568
- Genetet S, Desrames A, Chouali Y, et al (2017) Stomatin modulates the activity of the Anion Exchanger 1 (AE1, SLC4A1). *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep46170
- Gil L, Siems W, Mazurek B, et al (2006) Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic Res*. doi: 10.1080/10715760600592962
- Glaser T, Schwarz-Benmeir N, Barnoy S, et al (1994) Calpain (Ca²⁺-dependent thiol protease) in erythrocytes of young and old individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi: 10.1073/pnas.91.17.7879
- Glass GA, Gershon D, Gershon H (1985) Some characteristics of the human erythrocyte as a function of donor and cell age. *Exp Hematol*
- Griffiths RE, Kupzig S, Cogan N, et al (2012) Maturing reticulocytes internalize plasma membrane in glycophorin A-containing vesicles that fuse with autophagosomes before exocytosis. *Blood* 119:6296–6306. doi: 10.1182/blood-2011-09-376475
- Gustafson CM, Shepherd AJ, Miller VM, Jayachandran M (2015) Age- and sex-specific differences in blood-borne microvesicles from apparently healthy humans. *Biol Sex Differ*. doi: 10.1186/s13293-015-0028-8
- Hamasaki N, Yamamoto M (2000) Red blood cell function and blood storage. *Vox Sang* 79:191–197. doi: 10.1046/j.1423-0410.2000.7940191.x
- Han BG, Nunomura W, Takakuwa Y, et al (2000) Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization. *Nat Struct Biol*. doi: 10.1038/82819
- Heaton A, Keegan T, Holme S (1989) In vivo regeneration of red cell 2,3-diphosphoglycerate following transfusion of DPG-depleted AS-1, AS-3 and CPDA-1 red cells. *Br J Haematol*. doi: 10.1111/j.1365-2141.1989.tb06286.x
- Heddle NM, Cook RJ, Liu Y, et al (2019) The association between blood donor sex and age and transfusion recipient mortality: an exploratory analysis. *Transfusion*. doi: 10.1111/trf.15011
- Hemming NJ, Anstee DJ, Staricoff MA, et al (1995) Identification of the membrane attachment sites for protein 4.1 in the human erythrocyte. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.270.10.5360
- Herrera M, Hong NJ, Garvin JL (2006) Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.0000223652.29338.77
- Hess JR (2006) An update on solutions for red cell storage. *Vox Sang*.
- Hess JR (2010) Red cell storage. *J. Proteomics* 73:368–373
- Hess JR, Greenwalt TG (2002) Storage of red blood cells: New approaches. *Transfus Med Rev*. doi: 10.1053/tmrv.2002.35212
- Hess JR, Sparrow RL, Van Der Meer PF, et al (2009) Red blood cell hemolysis during blood bank storage: Using national quality management data to answer basic scientific questions. *Transfusion*. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02275.x
- HILLIER J, HOFFMAN JF, PARPART AK, WOLMAN IJ (1956) Ultrastructure of erythrocyte membranes in thalassemia major and minor. *Blood*
- Hornig R, Lutz HU (2000) Band 3 protein clustering on human erythrocytes promotes binding of naturally occurring anti-band 3 and anti-spectrin antibodies. *Exp Gerontol* 35:1025–1044. doi: 10.1016/S0531-5565(00)00126-1
- Hovav T, Yedgar S, Manny N, Barshtein G (1999) Alteration of red cell aggregability and shape during

- blood storage. *Transfusion*. doi: 10.1046/j.1537-2995.1999.39399219284.x
- Hsu K (2018) Exploring the potential roles of band 3 and aquaporin-1 in blood CO₂ transport-inspired by comparative studies of glycophorin B-A-B hybrid protein GP. *Mur. Front. Physiol*.
- Inaba M, Maede Y (1988) Correlation between protein 4.1a/4.2b ratio and erythrocyte life span. *BBA - Biomembr* 944:256–264. doi: 10.1016/0005-2736(88)90439-7
- Inal JM, Kosgodage U, Azam S, et al (2013) Blood/plasma secretome and microvesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1834:2317–2325
- Ishida YI, Takikawa M, Suzuki T, et al (2014) Irreversible hyperoxidation of peroxiredoxin 2 is caused by tert-butyl hydroperoxide in human red blood cells. *FEBS Open Bio*. doi: 10.1016/j.fob.2014.10.003
- Jacobsen RN, Perkins AC, Levesque JP (2015) Macrophages and regulation of erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol*. 22:212–219
- Jensen FB (2009) The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: oxygen carriers and regulators of local blood flow. *J Exp Biol*. doi: 10.1242/jeb.023697
- Kadlubowski M, Agutter PS (1977) Changes in the Activities of some Membrane-associated Enzymes during in Vivo Ageing of the Normal Human Erythrocyte. *Br J Haematol* 37:111–125. doi: 10.1111/j.1365-2141.1977.tb08816.x
- Kamata K, Manno S, Ozaki M, Takakuwa Y (2008) Functional evidence for presence of lipid rafts in erythrocyte membranes: Gsα in rafts is essential for signal transduction. *Am J Hematol*. doi: 10.1002/ajh.21126
- Kanias T, Lee J, Yazer MH, et al (2011) Correlation between female gender and the red blood cell propensity to hemolyze under various stresses. *Blood*
- Kanias T, Sinchar D, Osei-Hwedie D, et al (2016) Testosterone-dependent sex differences in red blood cell hemolysis in storage, stress, and disease. *Transfusion*. doi: 10.1111/trf.13745
- Kannan R, Yuan J, Low PS (1991) Isolation and partial characterization of antibody- and globin-enriched complexes from membranes of dense human erythrocytes. *Biochem J* 278 (Pt 1:57–62. doi: 10.1042/bj2780057
- Kay M (2005) Immunoregulation of cellular life span. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*
- Kay MM (1975) Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3521–3525. doi: 10.1073/pnas.72.9.3521
- Kay MM, Goodman SR, Sorensen K, et al (1983) Senescent cell antigen is immunologically related to band 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1631–5. doi: 10.1016/j.jen.2004.01.005
- Kay MMB, Flowers N, Goodman J, Bosman G (1989) Alteration in membrane protein band 3 associated with accelerated erythrocyte aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5834–5838. doi: 10.1073/pnas.86.15.5834
- Knight R (2012) *Transfusion and Transplantation Science*. Oxford University Press
- Konstantinidis DG, Pushkaran S, Johnson JF, et al (2012) Signaling and cytoskeletal requirements in erythroblast enucleation. *Blood* 119:6118–6127. doi: 10.1182/blood-2011-09-379263
- Kor DJ, Van Buskirk CM, Gajic O (2009) Red blood cell storage lesion. *J Vet Emerg Crit Care* 9:187–199. doi: 10.1111/vec.12252
- Korolnek T, Hamza I (2015) Macrophages and iron trafficking at the birth and death of red cells. *Blood* 125:2893–2897. doi: 10.1182/blood-2014-12-567776

- Kosower NS, Kosower EM, Wertheim B, Correa WS (1969) Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem Biophys Res Commun.* doi: 10.1016/0006-291X(69)90850-X
- Koster JF, Slee RG (1983) Lipid peroxidation of human erythrocyte ghosts induced by organic hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* doi: 10.1016/0005-2760(83)90117-0
- Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, et al (2006) Membrane protein carbonylation in non-leukodepleted CPDA-preserved red blood cells. *Blood Cells, Mol Dis.* doi: 10.1016/j.bcmd.2006.01.003
- Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, et al (2007a) Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulin G binding, lipid raft rearrangement, and caspase activation. *Transfusion.* doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01254.x
- Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, et al (2008) RBC-derived vesicles during storage: Ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. *Transfusion* 48:1943–1953. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01794.x
- Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, et al (2007b) Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *J Cell Mol Med.* doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00008.x
- Kuhn V, Diederich L, Keller TCS, et al (2017) Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxid Redox Signal* 26:718–742. doi: 10.1089/ars.2016.6954
- Lang E, Qadri SM, Lang F (2012) Killing me softly - Suicidal erythrocyte death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*
- Lang F, Huber SM, Szabo I, Gulbins E (2007) Plasma membrane ion channels in suicidal cell death. *Arch. Biochem. Biophys.*
- Lang KS, Lang PA, Bauer C, et al (2005) Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell. Physiol. Biochem.*
- Lee JH, Hsieh CF, Liu HW, et al (2017) Lipid raft-associated stomatin enhances cell fusion. *FASEB J.* doi: 10.1096/fj.201600643R
- Leimberg MJ, Prus E, Konijn AM, Fibach E (2008) Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors. *J Cell Biochem* 103:1211–1218. doi: 10.1002/jcb.21499
- Lewis IA, Campanella ME, Markley JL, Low PS (2009) Role of band 3 in regulating metabolic flux of red blood cells. *Proc Natl Acad Sci.* doi: 10.1073/pnas.0905999106
- Li R, Chen X (2014) Erythrocyte osmotic fragility increases with serum advanced glycated end products in cigarette smokers. *Clin Hemorheol Microcirc.* doi: 10.3233/CH-131801
- Liebler DC, Burr JA, Philips L, Ham AJL (1996) Gas chromatography-mass spectrometry analysis of vitamin E and its oxidation products. *Anal Biochem* 236:27–34. doi: 10.1006/abio.1996.0127
- Liu SC, Derick LH, Palek J (1987) Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *J Cell Biol.* doi: 10.1083/jcb.104.3.527
- Lutz HU, Bogdanova A (2013) Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. *Front. Physiol.* 4 DEC
- Lutz HU, Bussolino F, Flepp R, et al (1987) Naturally Occurring Anti-Band-3 Antibodies and Complement Together Mediate Phagocytosis of Oxidatively Stressed Human Erythrocytes. *PNAS* 84:7368–7372. doi: 10.1073/pnas.84.21.7368

- Lux SE (2016) Anatomy of the red cell membrane skeleton: Unanswered questions. *Blood*
- Mandal D, Baudin-Creuzat V, Bhattacharyya A, et al (2003) Caspase 3-mediated Proteolysis of the N-terminal Cytoplasmic Domain of the Human Erythroid Anion Exchanger 1 (Band 3). *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M306914200
- Mandal D, Mazumder A, Das P, et al (2005) Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M506928200
- Mandal D, Moitra PK, Saha S, Basu J (2002) Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett* 513:184–188. doi: 10.1016/S0014-5793(02)02294-9
- Mankelw TJ, Satchwell TJ, Burton NM (2012) Refined views of multi-protein complexes in the erythrocyte membrane. *Blood Cells, Mol Dis*. doi: 10.1016/j.bcmd.2012.03.001
- Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N (2002) Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci* 99:1943–1948. doi: 10.1073/pnas.042688399
- Manwani D, Bieker JJ (2008) The Erythroblastic Island. *Curr. Top. Dev. Biol.* 82:23–53
- Mateos Antón F, García Puig J, Ramos T, et al (1986) Sex differences in uric acid metabolism in adults: Evidence for a lack of influence of estradiol-17 β (E2) on the renal handling of urate. *Metabolism*. doi: 10.1016/0026-0495(86)90152-6
- Matte A, Bertoldi M, Mohandas N, et al (2013) Membrane association of peroxiredoxin-2 in red cells is mediated by the N-terminal cytoplasmic domain of band 3. *Free Radic Biol Med* 55:27–35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.543
- Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci*.
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049–6055. doi: 10.1016/0003-2697(69)90079-7
- McGough AM, Josephs R (2006) On the structure of erythrocyte spectrin in partially expanded membrane skeletons. *Proc Natl Acad Sci*. doi: 10.1073/pnas.87.13.5208
- Middelburg RA, Briët E, Van der Bom JG (2011) Mortality after transfusions, relation to donor sex. *Vox Sang*. doi: 10.1111/j.1423-0410.2011.01487.x
- Mikhalyov I, Samsonov A (2011) Lipid raft detecting in membranes of live erythrocytes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.04.002
- Minetti G, Ciana A, Profumo A, et al (2001) Cell age-related monovalent cations content and density changes in stored human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1527:149–155. doi: 10.1016/S0304-4165(01)00159-3
- Mohandas N, Chasis JA (1993) Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol* 30:171–92
- Mohandas N, Gallagher PG (2008) Red cell membrane: Past, present, and future. *Blood* 112:3939–3948. doi: 10.1182/blood-2008-07-161166
- Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM (2014) Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front. Physiol.* 5 FEB
- Montel-Hagen A, Sitbon M, Taylor N (2009) Erythroid glucose transporters. *Curr. Opin. Hematol.*

- Moras M, Lefevre SD, Ostuni MA (2017) From erythroblasts to mature red blood cells: Organelle clearance in mammals. *Front. Physiol.* 8
- Murphy WG, Tong E, Murphy C (2010) Why do women have similar erythropoietin levels to men but lower hemoglobin levels? *Blood*
- Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, et al (1993) CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol* 120:371–383. doi: 10.1083/jcb.120.2.371
- Norton JM, Rand PW (1981) Decreased deformability of erythrocytes from smokers. *Blood*
- O'Neill S, Bohl M, Gregersen S, et al (2016) Blood-Based Biomarkers for Metabolic Syndrome. *Trends Endocrinol. Metab.* 27:363–374
- Obrador R, Musulin S, Hansen B (2015) Red blood cell storage lesion. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*
- Oldenburg PA, Zheleznyak A, Fang YF, et al (2000) Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* (80-). doi: 10.1126/science.288.5473.2051
- Padayatty SJ, Levine M (2016) Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis.* 22:463–493
- Palis J (2017) Interaction of the macrophage and primitive erythroid lineages in the mammalian embryo. *Front. Immunol.* 7
- Pannuru P, Vaddi DR, Kindinti RR, Varadacharyulu N (2011) Increased erythrocyte antioxidant status protects against smoking induced hemolysis in moderate smokers. *Hum Exp Toxicol.* doi: 10.1177/09603271110396527
- Pantaleo A, De Franceschi L, Ferru E, et al (2010) Current knowledge about the functional roles of phosphorylative changes of membrane proteins in normal and diseased red cells. *J. Proteomics*
- Pasini EM, Kirkegaard M, Mortensen P, et al (2006) In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood* 108:791–801. doi: 10.1182/blood-2005-11-007799
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F (2003) Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* 333:19–39
- Peisach J, Blumberg WE, Rachmilewitz EA (1975) The demonstration of ferrihemochrome intermediates in heinz body formation following the reduction of oxyhemoglobin A by acetylphenylhydrazine. *BBA - Protein Struct* 393:404–418. doi: 10.1016/0005-2795(75)90069-0
- Peng Z, Li X, Pivkin I V., et al (2013) Lipid bilayer and cytoskeletal interactions in a red blood cell. *Proc Natl Acad Sci.* doi: 10.1073/pnas.1311827110
- Perutz MF, Rossmann MG, Cullis AF, et al (1960) Structure of Hæmoglobin: A three-dimensional fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*
- Peters TJ (1995) All About Albumin. *Acad Press Elsevier* 1–318. doi: 10.1016/B978-012552110-9/50005-2
- Picart C, Dalhaimer P, Discher DE (2000) Actin protofilament orientation in deformation of the erythrocyte membrane skeleton. *Biophys J.* doi: 10.1016/S0006-3495(00)76535-0
- Pittman RN (2011) Oxygen gradients in the microcirculation. *Acta Physiol. (Oxf).*
- Pomorski TG, Menon AK (2016) Lipid somersaults: Uncovering the mechanisms of protein-mediated lipid flipping. *Prog. Lipid Res.* 64:69–84
- Pretorius E (2013) The adaptability of red blood cells. *Cardiovasc Diabetol* 12:. doi: 10.1186/1475-2840-12-63

- Prior RL, Gu L, Wu X, et al (2007) Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. *J Am Coll Nutr.* doi: 10.1080/07315724.2007.10719599
- Puchulu-Campanella E, Chu H, Anstee DJ, et al (2013) Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane. *J Biol Chem.* doi: 10.1074/jbc.M112.428573
- Rapido F, Brittenham GM, Bandyopadhyay S, et al (2017) Prolonged red cell storage before transfusion increases extravascular hemolysis. *J Clin Invest* 127:375–382. doi: 10.1172/JCI90837
- Raval JS, Waters JH, Seltsam A, et al (2010) The use of the mechanical fragility test in evaluating sublethal RBC injury during storage. *Vox Sang* 99:325–331. doi: 10.1111/j.1423-0410.2010.01365.x
- Raval JS, Waters JH, Seltsam A, et al (2011) Menopausal status affects the susceptibility of stored RBCs to mechanical stress. *Vox Sang* 100:418–421. doi: 10.1111/j.1423-0410.2010.01439.x
- Reinhart SA, Schulzki T, Reinhart WH (2015) Albumin reverses the echinocytic shape transformation of stored erythrocytes. *Clin Hemorheol Microcirc* 60:437–449. doi: 10.3233/CH-141899
- Reisz JA, Tzounakas VL, Nemkov T, et al (2018) Metabolic Linkage and Correlations to Storage Capacity in Erythrocytes from Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase-Deficient Donors. *Front Med* 4:1–16. doi: 10.3389/fmed.2017.00248
- Reithmeier RAF, Casey JR, Kalli AC, et al (2016) Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858:1507–1532
- Repsold L, Joubert AM (2018) Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death. *Biomed Res Int.* doi: 10.1155/2018/9405617
- Rinalducci S, Zolla L (2015) Biochemistry of storage lesions of red cell and platelet concentrates: A continuous fight implying oxidative/nitrosative/phosphorylative stress and signaling. *Transfus. Apher. Sci.*
- Roche M, Rondeau P, Singh NR, et al (2008) The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 582:1783–1787
- Roubinian N, Plimier C, Woo J, et al (2019) Effect of donor, component and recipient characteristics on hemoglobin increments following red blood cell transfusion. *Blood.* doi: 10.1182/blood.2019000773
- Rouyer-Fessard P, Leroy-Viard K, Domenget C, et al (1990) Mouse β thalassemia, a model for the membrane defects of erythrocytes in the human disease. *J Biol Chem*
- Rozga J, Piątek T, Małkowski P (2013) Human albumin: old, new, and emerging applications. *Ann Transplant* 18:205–17. doi: 10.12659/AOT.889188
- Sage JM, Carruthers A (2014) Human erythrocytes transport dehydroascorbic acid and sugars using the same transporter complex. *Am J Physiol Physiol* 306:C910–C917. doi: 10.1152/ajpcell.00044.2014
- Salzer U, Hinterdorfer P, Hunger U, et al (2002) Ca^{++} -dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood.* doi: 10.1182/blood.V99.7.2569
- Sanghani SP, Haldankar VA (2006) Comparative analysis of RBC membrane fatty acids, proteins and glycophorin in patients with heterozygous beta thalassemia and iron deficiency anemia. *Indian J Clin Biochem.* doi: 10.1007/BF02912907

- Sautin YY, Johnson RJ (2008) Uric acid: The oxidant-antioxidant paradox. In: Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. pp 608–619
- Sayare M, Fikiet M, Paulus J (1982) EFFECT OF VITAMIN E ON THE BINDING OF HEMOGLOBIN TO THE RED CELL MEMBRANE. *Ann N Y Acad Sci* 393:251–262. doi: 10.1111/j.1749-6632.1982.tb31266.x
- Schenk AD, Hite RK, Engel A, et al (2010) Electron Crystallography and Aquaporins. *Methods Enzymol* 483:91–119. doi: 10.1016/S0076-6879(10)83005-8
- Schrier SL, Rachmilewitz E, Mohandas N (1989) Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemic erythrocytes are different: Implication for differences in clinical manifestations. *Blood*
- Shaklai N, Ranney HM, Yguerabide J (1977) Classification and Localization of Hemoglobin Binding Sites on the Red Cell Membrane. *Biochemistry* 16:5593–5597. doi: 10.1021/bi00644a032
- Sies H, Jones D (2007) Oxidative Stress*. In: *Encyclopedia of Stress*. pp 45–48
- Simmchen J, Ventura R, Segura J (2012) Progress in the Removal of Di-[2-Ethylhexyl]-Phthalate as Plasticizer in Blood Bags. *Transfus Med Rev*. doi: 10.1016/j.tmr.2011.06.001
- Sloand EM, Maciejewski JP, Dunn D, et al (1998) Correction of the PNH defect by GPI-anchored protein transfer. *Blood* 92:4439–4445. doi: 10.17221/115/2013-CJAS.60.010
- Smith LJ, Kahraman A, Thornton JM (2010) Heme proteins-diversity in structural characteristics, function, and folding. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. doi: 10.1002/prot.22747
- Soni S, Bala S, Gwynn B, et al (2006) Absence of erythroblast macrophage protein (Emp) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. *J Biol Chem* 281:20181–20189. doi: 10.1074/jbc.M603226200
- Sosale NG, Rouhiparkouhi T, Bradshaw AM, et al (2015) Cell rigidity and shape override CD47's "self"-signaling in phagocytosis by hyperactivating myosin-II. *Blood*. doi: 10.1182/blood-2014-06-585299
- Stefanovic M, Puchulu-Campanella E, Kodippili G, Low PS (2012) Oxygen regulates the band 3–ankyrin bridge in the human erythrocyte membrane. *Biochem J*. doi: 10.1042/bj20120869
- Stocker R (2016) Antioxidant defenses in human blood plasma and extra-cellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 595:136–139. doi: 10.1016/j.abb.2015.11.021
- Storr SJ, Carragher NO, Frame MC, et al (2011) The calpain system and cancer. *Nat. Rev. Cancer*
- Tavazzi B, Di Pierro D, Amorini AM, et al (2000) Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *Eur J Biochem*. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01042.x
- Tissot JD, Baryn M, Sonogo G, et al (2017) The storage lesions: From past to future. *Transfus. Clin. Biol.*
- Turrini F, Arese P, Yuan J, Low PS (1991) Clustering of integral membrane proteins of the human erythrocyte membrane stimulates autologous IgG binding, complement deposition, and phagocytosis. *J Biol Chem* 266:23611–23617. doi: 10.1016/j.addbeh.2009.06.012
- Tzounakas VL, Georgatzakou HT, Kriebardis AG, et al (2016a) Donor variation effect on red blood cell storage lesion: A multivariable, yet consistent, story. *Transfusion* 56:1274–1286. doi: 10.1111/trf.13582
- Tzounakas VL, Karadimas DG, Anastasiadi AT, et al (2018) Donor-specific individuality of red blood cell performance during storage is partly a function of serum uric acid levels. *Transfusion* 58:. doi: 10.1111/trf.14379

- Tzounakas VL, Kriebardis AG, Georgatzakou HT, et al (2016b) Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient subjects may be better “storers” than donors of red blood cells. *Free Radic Biol Med*. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.005
- Tzounakas VL, Kriebardis AG, Papassideri IS, Antonelou MH (2016c) Donor-variation effect on red blood cell storage lesion: A close relationship emerges. *PROTEOMICS - Clin Appl* 10:791–804. doi: 10.1002/prca.201500128
- Ueno Y, Fujita K, Takashina N, et al (1991) Studies on the change in the levels of serum ferritin, serum iron and total iron binding capacity caused by aging and sex difference. *Rinsho Byori*
- van den Akker E, Satchwell TJ, Williamson RC, Toye AM (2010) Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. *Blood Cells, Mol Dis* 45:1–8. doi: 10.1016/j.bcmd.2010.02.019
- Van Kim C Le, Colin Y, Cartron JP (2006) Rh proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev*. doi: 10.1016/j.blre.2005.04.002
- Van Wijk R, Van Solinge WW (2005) The energy-less red blood cell is lost: Erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood* 106:4034–4042
- Vander (2001) *Human Physiology: The Mechanism of Body Function*
- Vayá A, Iborra J, Falcó C, et al (2003) Rheological behaviour of red blood cells in β and $\delta\beta$ thalassemia trait. *Clin Hemorheol Microcirc*
- Verkman AS, Mitra AK (2017) Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Physiol*. doi: 10.1152/ajprenal.2000.278.1.f13
- Vidal M (2010) Exosomes in erythropoiesis. *Transfus Clin Biol* 17:131–137. doi: 10.1016/j.traccli.2010.05.004
- Vidgren HM, Ågren JJ, Schwab U, et al (1997) Incorporation of n-3 fatty acids into plasma lipid fractions, and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil, and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young men. *Lipids*. doi: 10.1007/s11745-997-0089-x
- Vince JW, Reithmeier R a (1998) Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte C1-/HCO₃⁻ exchanger. *J Biol Chem* 273:28430–7. doi: 10.1074/jbc.273.43.28430
- Vincent PC (2016) *Blood — Principles and Practice of Hematology. Pathology*. doi: 10.1016/s0031-3025(16)39713-6
- Vona R, Gambardella L, Ortona E, et al (2019) Functional Estrogen Receptors of Red Blood Cells. Do They Influence Intracellular Signaling? *Cell Physiol Biochem* 186–199
- Weiss MJ, Santos COD (2009) Chaperoning erythropoiesis. *Blood*
- West D, Pinard MA, Tu C, et al (2014) Human carbonic anhydrase II-cyanate inhibitor complex: Putting the debate to rest. *Acta Crystallogr Sect FStructural Biol Commun* 70:1324–1327. doi: 10.1107/S2053230X14018135
- Wieschhaus A, Khan A, Zaidi A, et al (2012) Calpain-1 knockout reveals broad effects on erythrocyte deformability and physiology. *Biochem J*. doi: 10.1042/bj20121008
- Willekens FLA, Werre JM, Groenen-Döpp YAM, et al (2008) Erythrocyte vesiculation: A self-protective mechanism? *Br J Haematol* 141:549–556. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07055.x
- Winterbourn CC, Batt RD (1970) Lipid composition of human red cells of different ages. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab* 202:1–8. doi: 10.1016/0005-2760(70)90212-2

- Yachie-Kinoshita A, Nishino T, Shimo H, et al (2010) A metabolic model of human erythrocytes: Practical application of the E-Cell Simulation Environment. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010
- Yamaja Setty BN, Kulkarni S, Stuart MJ (2002) Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion. *Blood* 99:1564–1571. doi: 10.1182/blood.V99.5.1564
- Yasin Z, Witting S, Palascak MB, et al (2003) Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: Associations with cell age, density, and hemoglobin F. *Blood* 102:365–370. doi: 10.1182/blood-2002-11-3416
- Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G (2004) Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* 430:97–103
- Yool AJ, Campbell EM (2012) Structure, function and translational relevance of aquaporin dual water and ion channels. *Mol. Aspects Med.* 33:553–561
- Zhang R, van Hoek AN, Biwersi J, Verkman AS (1993) A Point Mutation at Cysteine 189 Blocks the Water Permeability of Rat Kidney Water Channel CHIP28k. *Biochemistry* 32:2938–2941. doi: 10.1021/bi00063a002
- Zimmermann R, Wintzheimer S, Weisbach V, et al (2009) Influence of prestorage leukoreduction and subsequent irradiation on in vitro red blood cell (RBC) storage variables of RBCs in additive solution saline-adenine-glucose-mannitol. *Transfusion*. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01920.x

Περίληψη

Τα ερυθροκύτταρα, όπως και τα αιμοπετάλια, υπόκεινται σε ένα σύνολο αλλοιώσεων και βλαβών κατά την αποθήκευσή τους εκτός σώματος. Το σύνολο αυτό ονομάζεται αποθηκευτική βλάβη και επηρεάζει τη μορφολογία αλλά και τη λειτουργία του ερυθροκυττάρου, μέσω μεμβρανικών (καρβονυλίωση πρωτεϊνών), μηχανικών (αλλαγή σχήματος σε σφαιροεχينوκυτταρικό) και βιοχημικών (μείωση ATP και πτώση pH) αλλοιώσεων. Τα ερυθροκύτταρα που αποθηκεύονται με σκοπό τη μετάγγισή τους, παρουσιάζουν συχνά έναν πρώιμο φαινότυπο γήρανσης που μπορεί να τα καταστήσει επιδεκτικότερα σε εκκαθάριση στο σώμα του δέκτη. Η αποδοτικότητα της μετάγγισης συνηθίζεται να υπολογίζεται βάσει της αιμόλυσης εντός του ασκού και της ανάκτησης των ερυθροκυττάρων 24 ώρες μετά τη μετάγγιση.

Η αποθηκευτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων σχετίζεται με τη διάρκεια και το συντηρητικό διάλυμα (όγκος και σύνθεση) της αποθήκευσης, τη λευκαφαίρεση, το είδος του πλαστικοποιητή που χρησιμοποιείται στον ασκό και τη διακύμανση των χαρακτηριστικών διαφορετικών αιμοδοτών σε γενετικό και μη επίπεδο. Το φύλο, οι μεταλλαγές στην αιμοσφαιρίνη (στίγμα β-Μεσογειακής αναιμίας) και σε μεταβολικά ένζυμα (G6PD), το κάπνισμα και η ηλικία αποτελούν ένα μικρό μέρος του συνόλου των χαρακτηριστικών του αιμοδότη που φαίνεται να επηρεάζουν την απόκριση των ερυθροκυττάρων στο αποθηκευτικό στρες και την αποτελεσματικότητα της μετάγγισης. Επίσης, δεν είναι αμελητέα και η συνεισφορά των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του δέκτη στην έκβαση της μετάγγισης, κάτι που καθιστά μη ευνοϊκούς κάποιους συνδυασμούς δότη-δέκτη.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας και η μεθοδολογία που ακολουθήσαμε ήταν:

(α) Η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας του σώματος αλλά και του πλάσματος του δέκτη σε αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα πρώιμης (ημέρας 2), μέσης (ημέρας 21) και προχωρημένης (ημέρας 42) αποθήκευσης κατά τις πρώτες ώρες μετά την ανάμιξη μέσω ενός *in vitro* μοντέλου προσωμοίωσης της μετάγγισης. Χρησιμοποιήθηκε δείγμα από 7 μονάδες μετάγγισης συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων σε διάλυμα CPD-SAGM το οποίο αναμίχθηκε με πλάσμα 27 υγιών αιμοδοτών και επωάστηκε στους 37°C. Τα ανασυσταμένα δείγματα 2 μονάδων με 5 αιμοδότες μελετήθηκαν ανά τρίωρα διαστήματα εντός του εικοσιτετράωρου ενώ στα υπόλοιπα οι πειραματικές διαδικασίες διεξήχθησαν μόνο στο πέρας του 24-ώρου. Μετρήθηκαν η αιμόλυση με και χωρίς εξωγενείς (οσμωτική και μηχανική) καταπονήσεις καθώς και η παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) με και χωρίς την επίδραση οξειδωτικών παραγόντων.

(β) Ο συγκριτικός έλεγχος των αιματολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών φρέσκου (μη-αποθηκευμένου) αίματος ετερόζυγων για β-Μεσογειακή αναιμία και αιμοδοτών-μαρτύρων. Συλλέχθηκε αίμα από 204 υγιείς, τακτικούς αιμοδότες και μετρήθηκαν διάφορες αιματολογικές (γενικοί δείκτες ερυθροκυττάρων κ.α.), φυσιολογικές (π.χ. οσμωτική ευθραυστότητα ερυθροκυττάρων) και βιοχημικές (χοληστερόλη, ουρικό οξύ, ηλεκτρολύτες κ.α.) παράμετροι.

Όσον αφορά στο πρώτο σκέλος της εργασίας, η αιμόλυση και η επιδεκτικότητα των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων σε εξωγενείς αιμολυτικές καταπονήσεις παρουσιάστηκαν χαμηλότερες παρουσία πλάσματος, με εξαίρεση τη μηχανική αιμόλυση. Στην περίπτωση της τελευταίας παρατηρήθηκε πρώιμη αύξηση του δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας, ιδιαίτερα στα κύτταρα μέσης ηλικίας, και το πλάσμα επιδείνωνε τη μηχανική κατάσταση των κυττάρων. Όσον αφορά στο οξειδωτικό πρότυπο, οι ROS βρέθηκε να αυξάνονται αρκετά άμεσα μετά την ανάμιξη των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων με το υγιές πλάσμα, το οποίο ανάλογα με τον χρόνο αποθήκευσης και το μοριακό στόχο του οξειδωτικού που χρησιμοποιείται μπορεί να έχει είτε προστατευτικό, είτε προ-οξειδωτικό ρόλο. Συμπερασματικά, δεν είναι λίγες οι παράμετροι που διέφεραν σημαντικά μετά την προσομοίωση της μετάγγισης, τόσο σε σχέση με την κατάσταση στη μονάδα μετάγγισης, όσο και σε σχέση με την κλασσική μέτρηση στο πέρας του πρώτου εικοσιτετράωρου μετά τη μετάγγιση.

Όσον αφορά στο δεύτερο κομμάτι της εργασίας, οι ετερόζυγοι φορείς β-μεσογειακής αναιμίας που πληρούν τα κριτήρια αιμοδοσίας φάνηκε να αποτελούν μη αμελητέο ποσοστό επί του συνόλου των εθελοντών. Εμφάνισαν αρκετές ομοιότητες με το γενικό πληθυσμό, διέφεραν όμως σε ορισμένα χαρακτηριστικά της ερυθροκυτταρικής φυσιολογίας, όπως είναι η ανθεκτικότητα στην αιμόλυση. Η διαφορετική δικτύωση αιμολυτικών και οξειδοαναγωγικών παραμέτρων που αναδείχθηκε, ενδέχεται να είναι σημαντική όσον αφορά στην ακόλουθη αποθήκευση του προς μετάγγιση αίματος και να σχετίζεται με την επιδεκτικότητά τους στο στρες της αποθήκευσης.

Abstract

All cells, including red blood cells (RBCs) undergo a series of alterations and lesions during their *ex vivo* storage. Concerning RBCs, these changes are collectively referred to as RBC storage lesion. Storage lesions can be categorized into membrane (protein carbonylation), mechanical (transformation into spherocytes) and biochemical (ATP depletion and drop of pH) changes that affect the morphology and function of RBCs. Stored RBCs usually present a premature senescent phenotype, which can be responsible for their early clearance post transfusion. Blood banking's gold standards, that indicate the effectiveness of the transfusion, are the end of storage hemolysis of RBCs and their 24h recovery *in vivo*.

RBC storage capability is related to the duration and the preservative solution (volume and composition) of storage, performance or not of leukoreduction, the type of the plasticizer used in the blood bag and donor variation in both genetical and not background. Sex, hemoglobin mutations (b-thalassaemia heterozygotes), deficiencies in enzymatic activities (G6PD), smoking and age are just some of the many donor characteristics that affect RBC storage capacity and post-transfusion recovery. Moreover, recipient characteristics cannot be overlooked since they too play a role in transfusion outcome. It seems that not all donor/recipient combinations are ideal.

The aim of this thesis was:

- (a)** The study of the effect of body temperature as well as of recipient plasma upon RBCs of early (day 2), middle (day 21) and late (day 42) storage in several time intervals during the first 24 hours (24h) post mixing, using an *in vitro* model of transfusion. Packed RBCs of 7 CPD-SAGM blood bags were reconstituted with healthy plasma collected by 27 volunteers and incubated at 37°C. Reconstituted samples of 2 blood bags' RBCs and 5 donors' plasma were studied for several time intervals during 24 hours post-mixing, whereas the rest only at the end of the 24h incubation. Hemolysis with and without exogenous (osmotic and mechanical) stimuli, as well as ROS levels with or without stimulation by oxidants were measured.
- (b)** The comparative examination of the hematological and biochemical features of fresh (non-stored) blood from regular blood donors with or without beta-thalassaemia traits before blood processing for transfusion purposes. 204 healthy blood donors were recruited and several hematological (RBC general indices), physiological (eg osmotic fragility test) and biochemical (measurement of cholesterol, uric acid, electrolytes etc) assays were performed.

Concerning the first part of the study, hemolysis and susceptibility of stored RBCs to exogenous hemolysis stresses were in general lower in the presence of plasma compared to the preservation medium, with the exception of mechanical hemolysis. In the latter case, an early increase in the mechanical fragility index was observed, especially in middle-aged RBCs, and plasma deteriorated the mechanical state of the cells. ROS generation seemed to be an early stress response of young and middle-aged RBC to transfusion mimicking conditions, with plasma being either an antioxidant or a prooxidant factor depending on the storage age and the molecular targeting of the exogenous oxidant used. Overall, some parameters vary substantially 24h post-mixing, reaching in the meanwhile levels that differ from the 24h traditional interval measurements and the state inside the blood bag.

As for the second part of the study, it was clear that β -thalassaemia heterozygotes comprise a non negligible proportion of the total donor population in Greece. They present many similarities to the general cohort, but differ in some fine characteristics of their RBC physiology, one of them being their resistance to hemolysis. The differential networking of hematological and redox parameters that has emerged might play a critical role in respect to blood processing and storage of these RBCs for transfusion purposes.