



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή με Τίτλο:

«Φυσιολογικά χαρακτηριστικά και επιδράσεις των μεταγγιζόμενων
ερυθροκυττάρων ως συνάρτηση της βιολογικής ποικιλομορφίας αιμοδοτών και
δεκτών»

Αλκμήνη Αναστασιάδη, Βιολόγος

ΑΜ: 202907

Αθήνα, 2022

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν. 5343/1932, άρθρο 202). Το κείμενο της Διδακτορικής Διατριβής δεν αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Επιβλέπουσα: Μαριάννα Χ. Αντωνέλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Μέλη: Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη, Ομότιμη Καθηγήτρια

Ιωάννης Π. Τρουγκάκος, Καθηγητής

Πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση του Μέλους της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής κ. Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη λόγω αφυπηρέτησης.

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα: Μαριάννα Χ. Αντωνέλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Μέλη: Παναγούλα Κόλλια, Καθηγήτρια

Αναστάσιος Γ. Κριεμπάρδης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Βασιλική Οικονομίδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Διαμάντης Σίδερης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ιωάννης Π. Τρουγκάκος, Καθηγητής

Ουρανία Ε. Τσιτσιλώνη, Καθηγήτρια

Περίληψη

Τα ερυθροκύτταρα συνιστούν το συχνότερα μεταγγιζόμενο παράγωγο αίματος. Ωστόσο, κατά την αποθήκευσή τους σε συνθήκες τράπεζας αίματος υφίστανται μια σειρά χρονο-εξαρτώμενων και μη, αντιστρεπτών και μόνιμων φυσιολογικών, δομικών και βιοχημικών αλλαγών, οι οποίες αποδίδονται με τον όρο «Αποθηκευτική βλάβη ερυθροκυττάρου». Οι βλάβες κατά την αποθήκευση *ex vivo* μπορούν να διακριθούν σε: α) Βιοχημικές αλλαγές (μείωση ATP, επιδεκτικότητα σε οξειδωτικό στρες κ.α.), β) Μηχανικές αλλαγές (ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης, αλλαγή σχήματος κ.α.) και γ) Μembrανικές αλλαγές (εξωτερίκευση δεικτών απομάκρυνσης, αλλαγές στο πρωτέωμα της μεμβράνης κ.α.). Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μια τεράστια μεταβλητότητα στην αποθηκευτική ικανότητα και την μετα-μεταγγισιακή ανάκτηση, μετά την αποθήκευση αίματος από διαφορετικούς δότες. Για άγνωστους λόγους τα ερυθροκύτταρα συγκεκριμένων δοτών, κατηγοριοποιημένων βάσει γενετικά καθορισμένων χαρακτηριστικών (π.χ. φύλο) ή περιβαλλοντικών παραγόντων (π.χ. κάπνισμα), εμφανίζουν αποκλίνουσα αποθηκευτική ικανότητα. Πράγματι, πλέον πολλές φυσιολογικές ιδιότητες των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων μπορούν να θεωρηθούν «κληρονομήσιμοι χαρακτήρες» ή εξαρτώμενοι από εγγενή χαρακτηριστικά του αιμοδότη. Ανάμεσα σε αυτές συγκαταλέγονται: η εντός του ασκού αιμόλυση, η 24ωρη ανάκτηση *in vivo*, τα επίπεδα ATP, η αποδοτικότητα μεταφοράς οξυγόνου, η συσσώρευση δεικτών οξειδωτικού στρες κ.α.

Στην παρούσα Διατριβή μελετήθηκαν αιμοδότες με ετεροζυγωτία στη β-μεσογειακή αναιμία (βΜΑ), ένα συχνό γενετικό χαρακτηριστικό στη χώρα μας. Είναι γνωστό πως οι ετερόζυγοι για βΜΑ που εμφανίζουν ενδοκυττάρια αιμοσφαιρίνη άνω των ορίων της αιμοδοσίας, δεν αποκλείονται από αυτήν. Παράλληλα, τα ερυθροκύτταρά τους παρουσιάζουν κάποιες διαφορές σε σύγκριση με τον μέσο αιμοδότη, όσον αφορά για παράδειγμα κλασικές αιματολογικές παραμέτρους, το οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο και την ιοντοανταλλαγή. Ωστόσο, ούτε το πρότυπο της αποθηκευτικής βλάβης, ούτε η ανάκτηση και άλλα χαρακτηριστικά της μετα-μεταγγισιακής κατάστασης των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων είναι γνωστά για αυτούς τους αιμοδότες. Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας Διατριβής ήταν ο εκτενής και εμπεριστατωμένος έλεγχος του αίματος, και κυρίως των ερυθροκυττάρων ετερόζυγων για βΜΑ αιμοδοτών, στους τρεις κρίκους της αλυσίδας της μετάγγισης: *in vivo* πριν την αποθήκευση, στο παράγωγο κατά την αποθήκευση συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων και *in vitro/in vivo* μετά τη μετάγγιση με τη χρήση *in vitro*/ζωικών μοντέλων. Στο φρέσκο αίμα και τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα αιμοδοτών με ή χωρίς στίγμα βΜΑ μελετήθηκαν παράμετροι φυσιολογίας (αιμόλυση, οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο, μορφολογία, πρωτεόσταση), καθώς και μεταβολωμική ανάλυση των ερυθροκυττάρων. Επιπλέον, κατά την αποθήκευση πραγματοποιήθηκε πρωτεωμική ανάλυση των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών και των κυστιδίων που συσσωρεύονται στη μονάδα μετάγγισης. Για το *in vitro* μοντέλο μετάγγισης, αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα των δύο κατηγοριών αιμοδοτών επώαστηκαν σε πλάσμα από πιθανούς δέκτες (ομόζυγους για βΜΑ ή υγιείς) για 24 ώρες σε θερμοκρασία σώματος, προτού αναλυθούν διάφορες παράμετροι της φυσιολογίας τους. Τέλος, στο ζωικό μοντέλο μετάγγισης, ερυθροκύτταρα περιφερικού αίματος και από μονάδες μετάγγισης των δύο

κατηγοριών αιμοδοτών σημάνθηκαν με φθορίζουσες χρωστικές και χορηγήθηκαν σε ανοσοεπαρκείς και ανοσοανεπαρκείς μύες για να υπολογιστεί συγκριτικά η 24ωρη ανάκτησή τους.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι αιμοδότες με ετεροζυγωτία σε μεταλλαγές της βΜΑ αποτελούν μη αμελητέο ποσοστό του αιμοδοτικού πληθυσμού της χώρας μας και τα ερυθροκύτταρά τους αντιμετωπίζουν εντυπωσιακά το αποθηκευτικό στρες, καθώς βρέθηκαν ανθεκτικά σε λύση ανεξαρτήτως ερεθίσματος και διέθεταν βελτιωμένο οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο σε σύγκριση με εκείνα του μέσου αιμοδότη. Μάλιστα, η αντίσταση σε κυτταρική λύση φάνηκε να είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ιδιαίτερη γεωμετρία των κυττάρων των ετερόζυγων και τη σταθερότητα δομικών πρωτεϊνών κατά την πρόοδο του χρόνου αποθήκευσης. Επιπλέον, το σύνολο των αποτελεσμάτων, είτε αφορούν στη φυσιολογία και το μεταβολισμό είτε στην πρωτεϊνική σύσταση και την πρωτεόσταση, σχηματίζει την εικόνα ενός κυττάρου καλά προσαρμοσμένου σε σταθερά πλην ήπια επίπεδα οξειδωτικού στρες, έτοιμου να αντιμετωπίσει περαιτέρω οξειδωτικές προκλήσεις. Για παράδειγμα, τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών και πρωτεοστατικών ενζύμων βρέθηκαν πλεονεκτικότερα στα κύτταρα των ετερόζυγων, τα οποία παράλληλα έφεραν μειωμένες οξειδωτικές βλάβες και χαμηλότερο οξειδωτικό φορτίο, κυρίως προς το τέλος της αποθηκευτικής περιόδου. Με δεδομένο το βασικό ρόλο του οξειδωτικού στρες στην πρόοδο της αποθηκευτικής βλάβης, φαίνεται πως τα ερυθροκύτταρα με στίγμα βΜΑ μπορούν, χάρη στην «εκπαίδευσή» τους σε ελαφρώς αυξημένο οξειδωτικό φορτίο, να την αντιμετωπίζουν πλεονεκτικότερα.

Η «υπεροχή» σε επίπεδο αποθήκευσης, που αντικατοπτρίζεται έντονα στα μειωμένα επίπεδα αιμόλυσης (μοναδικό ποιοτικό χαρακτηριστικό της αποθήκευσης αίματος σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας), συνοδεύεται και από βελτιωμένο πρότυπο απόκρισης σε μετα-μεταγγισιακό στρες. Τα αποτελέσματα από τα *in vitro* και ζωικά μοντέλα μετάγγισης συγκλίνουν και (α) αναδεικνύουν τη διατήρηση πλεονεκτικότερης κυτταρικής φυσιολογίας μετά τη μετάγγιση, και (β) υπαινίσσονται αυξημένη 24ωρη *in vivo* ανάκτηση των μεταγγισμένων ερυθροκυττάρων (μοναδική μετα-μεταγγισιακή μέτρηση επιτυχούς μετάγγισης σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας) στην περίπτωση των ετερόζυγων για βΜΑ. Μέσω στατιστικής ανάλυσης για εύρεση συσχετίσεων αναδείχθηκαν χαρακτηριστικά όπως οι χαμηλοί δείκτες ευθραυστότητας, το μέγεθος των κυττάρων καθώς και η ισχυρή εξωκυττάρια αντιοξειδωτική ικανότητα των μονάδων ετερόζυγων φορέων να σχετίζονται με χαμηλή μετα-μεταγγισιακή αιμόλυση και επιβίωση των ερυθροκυττάρων τους στην κυκλοφορία του δέκτη. Φαίνεται λοιπόν πως ορισμένες παράμετροι που διακρίνουν τους ετερόζυγους *in vivo* ή/και κατά την αποθήκευση δεν είναι ουδέτερες ως προς τη μετα-μεταγγισιακή φυσιολογία/επάρκεια των ερυθροκυττάρων τους.

Abstract

Erythrocytes are the most frequently transfused blood product. However, during their storage in blood bank conditions, a series of time dependent or independent, reversible, or irreversible, physiological, structural and biochemical changes occur, which are attributed to the term "Erythrocyte Storage Lesion". Defects during *ex vivo* storage can be distinguished into: a) Biochemical changes (ATP depletion, susceptibility to oxidative stress, etc.), b) Mechanical defects (deformability, morphology changes, etc.) and c) Membrane lesions (externalization of removal markers, changes in the membrane proteome, etc.). In the last years, a huge variability in storage capacity and post-transfusion recovery has been observed after storing blood from different donors. For unknown reasons the erythrocytes of distinct donors, categorized by genetically determined characteristics (e.g., sex) or environmental factors (e.g., smoking), show divergent storage capacity. Indeed, many physiological properties of stored erythrocytes can now be considered "heritable characters" or dependent on intrinsic characteristics of the blood donor. Among them are in-bag hemolysis, 24-hour *in vivo* recovery, ATP levels, oxygen transport efficiency, accumulation of oxidative stress markers, etc.

In the current thesis, the distinct blood donor group that was studied were eligible donors with heterozygosity for beta-thalassemia (bThal), a frequent genetic trait in our country. It is known that bThal heterozygotes who show intracellular hemoglobin above the threshold for blood donation are considered eligible. At the same time, their red blood cells (RBCs) differ compared to the average blood donor in classic hematological parameters, redox balance, and ion exchange, among other. However, neither the storability profile nor recovery and other characteristics of the post-transfusion state are known for stored erythrocytes from these blood donors. Based on the above, the aim of this thesis was the extensive and thorough examination of blood, and mainly of RBCs, from heterozygous bThal blood donors, in the three links of the transfusion chain: *in vivo* (namely, before storage), in the blood unit during the storage period, and post-storage or after transfusion by using *in vitro* or *in vivo* (animal) models of transfusion, respectively. Physiological parameters (hemolysis, redox balance, morphology, proteostasis) as well as metabolomic analysis of RBCs were performed in fresh blood and stored erythrocytes of blood donors with or without bThal trait. In addition, proteomic analysis of erythrocyte membranes and extracellular vesicles (which accumulate in the supernatant of the transfusion unit) was performed during storage. For the *in vitro* transfusion model, stored RBCs of the two cohorts of blood donors were incubated in plasma from potential recipients (with bThal major or healthy) for 24 h at body temperature, prior the analyses. Finally, in the animal model, erythrocytes from peripheral blood and from the blood units of the two categories were labeled with fluorescent dyes and administered to immunocompetent and immunodeficient mice to comparatively calculate their 24-hour recovery.

According to the results, blood donors with heterozygosity for bThal mutations constitute a non-negligible percentage of the blood donation population of our country. Their erythrocytes cope with storage stress, as they were found resistant to lysis regardless of the stimulus and exhibited an improved redox balance compared to

those of the average blood donor. In fact, resistance to cell lysis appeared to be inextricably linked to the distinct geometry of the heterozygotes' cells and the stability of structural proteins during the progression of storage time. Furthermore, the results in total, whether they concern physiology and metabolism or protein composition and proteostasis, point to a cell well-adapted to steady but mild levels of oxidative stress, ready to face further oxidative challenges. For example, the levels of antioxidant and proteostatic enzymes were found to be more advantageous in RBCs from bThal heterozygotes, while the same cells also showed reduced oxidative damage and lower oxidative load, especially towards the end of the storage period. Given the key role of oxidative stress in the progression of storage damage, it seems that bThal-trait erythrocytes are able, thanks to their "training" to a slightly increased oxidative load, to deal with it more effectively.

The "superior" storability of bThal units (strongly reflected in the reduced levels of storage hemolysis, namely, the gold quality parameter of blood storage according to the World Health Organization) was also accompanied by an improved pattern of post-transfusion stress response. Results from both *in vitro* and animal models of transfusion converge and (a) highlight the maintenance of the more advantageous cellular physiology post transfusion, and (b) imply an increased 24-hour *in vivo* recovery of transfused RBCs (the gold quality measure of successful transfusion according to World Health Organization) in the case of bThal heterozygotes. Through correlation analysis, distinguishing characteristics of heterozygotes, such as low RBC fragility indices and cell size, as well as strong extracellular antioxidant capacity were shown to be associated with low post-transfusion hemolysis and better survival of their erythrocytes in the recipient's circulation. It therefore appears that some parameters that differentiate heterozygotes *in vivo* and/or during storage are not neutral with respect to the post-transfusion physiology/adequacy of their erythrocytes.

Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Μαριάννας Χ. Αντωνέλου. Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διδακτορικής μου διατριβής για την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει τα τελευταία επτά χρόνια κατά τα οποία μου έχει κάνει την τιμή να αποτελώ ενεργό μέλος της ερευνητικής της ομάδας. Την ευχαριστώ, επίσης, για τις συμβουλές και την ενθάρρυνση που έλαβα όλο αυτό τον καιρό, και τη δυνατότητα που μου έδωσε να μελετήσω ένα βιολογικό αντικείμενο που αγαπώ. Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων που με προέτρεψε να συμμετέχω σε όλα τα στάδια της ερευνητικής διαδικασίας, από τον πειραματισμό, μέχρι την ανάλυση και αξιολόγηση των δεδομένων και τη δημοσιοποίησή τους, στάδια στα οποία ήταν σημαντική η συμβολή και η καθοδήγησή της.

Ευχαριστίες οφείλω και στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, την Ομότιμη Καθηγήτρια κ. Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη και τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Π. Τρουγκάκο, γιατί ήταν πάντα διαθέσιμοι να με συμβουλέψουν και να με καθοδηγήσουν όποτε το χρειαζόμουν. Αντίστοιχα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ. Παναγούλα Κόλλια, τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής κ. Αναστάσιο Γ. Κριεμπάρδη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Βασιλική Οικονομίδου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Διαμάντη Σίδηρη, και την Καθηγήτρια κ. Ουρανία Ε. Τσιτσιλώνη, για την τιμή που μου έκαναν με τη συμμετοχή τους στην επταμελή εξεταστική επιτροπή της παρούσας διατριβής.

Θέλω να ευχαριστήσω πιο προσωπικά την Ομότιμη Καθηγήτρια κ. Ισιδώρα Παπασιδέρη, καθώς βρισκόταν κι εκείνη δίπλα μου από τα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο και η πόρτα της ήταν πάντοτε ανοιχτή για συμβουλές και συζητήσεις. Την ευχαριστώ γιατί υπήρξε βασικό μέλος της ερευνητικής ομάδας του παρόντος πρότζεκτ. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θέλω να πω στον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη, καθώς αποτέλεσε πολύτιμο συνεργάτη της συγκεκριμένης έρευνας, βοηθώντας σε κάθε στάδιο, από τη συλλογή των δειγμάτων έως και την πραγματοποίηση πειραματικών πρωτοκόλλων στο εργαστήριό του. Τον ευχαριστώ για τη θετικότητά του, την ενθάρρυνσή του και τη στήριξή του τα τελευταία χρόνια που έχω την τιμή να συνεργάζομαι μαζί του. Οφείλω, επίσης, να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ. Ουρανία Τσιτσιλώνη και το εργαστήριό της για την αγαστή συνεργασία σε συγκεκριμένα πειράματα της παρούσας Διατριβής. Θα ήθελα να εκφράσω ειλικρινείς ευχαριστίες στον Επιστημονικό Διευθυντή του Εθνικού Κέντρου Αιμοδοσίας, Δρ. Κωνσταντίνο Σταμούλη, καθώς και στους συνεργάτες από το Κρατικό Νοσοκομείο Νίκαιας και από το Ιπποκράτειο Νοσοκομείο, και συγκεκριμένα τον Δρ. Βασίλειο Σουλάκη, τον Δρ. Παναγιώτη Σιουρούνη, την Δρ. Αθηνά Βεργάκη και την κ. Έφη Παύλου για την συνεισφορά τους στη συλλογή των βιολογικών δειγμάτων. Ευχαριστώ πολύ τον Dr. Angelo D'Alessandro, τον Dr. Kirk Hansen και την Dr. Monika Dzieciatkowska από το Πανεπιστήμιο του Colorado, και κατ' επέκταση τους φοιτητές από τις εργαστηριακές τους ομάδες Davide Stefanoni, Francesca Cendali, Lorenzo Bertolone και Fabia Gamboni, για την πραγματοποίηση της μεταβολωμικής και της πρωτεωμικής ανάλυσης. Πάρα πολλά ευχαριστώ ανήκουν στο συνεργαζόμενο εργαστήριο

του Κέντρου Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) με διευθυντή τον Δρ. Νικόλαο Κωστομητσόπουλο για την άψογη συνεργασία όσον αφορά στα ζωικά μοντέλα μετάγγισης. Θα εστιάσω στον Δρ. Ευθύμη Παρώνη και τον κ. Βαγγέλη Μπαλάφα που με χαρά ανέλαβαν τον χειρισμό και τη φροντίδα των πειραματοζώων, μέσα στη δύσκολη και πιεστική περίοδο της πανδημίας, καθώς και στην Δρ. Αναστασία Αποστολίδου για την εξαιρετική ανάλυση των αποτελεσμάτων μετα-μεταγγισιακής ανάκτησης.

Θέλω να ευχαριστήσω όσους διετέλεσαν Διευθυντές του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής τα τελευταία χρόνια, και συγκεκριμένα την Ομότιμη Καθηγήτρια κ. Ισιδώρα Παपाσιδέρη, τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκο και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Βασιλική Οικονομίδου, για τη φιλοξενία στον Τομέα. Ξεχωριστές ευχαριστίες οφείλω στον Δρ. Θανάση Βελέντζα για τη βοήθεια και τις συμβουλές του που πάντα παρείχε με χαμόγελο. Είμαι ευγνώμων απέναντι σε όλα τα μέλη και το διοικητικό προσωπικό του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής για το όμορφο κλίμα που επικρατούσε κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Θα ήταν τεράστια παράλειψη να λείπει από τις ευχαριστίες ο μεταδιδάκτορας ερευνητής Δρ. Βασίλης Τζούνακας. Ο Βασίλης είναι εκείνος που με πήρε από το χέρι πριν επτά χρόνια και μου έδειξε πώς να εκτελώ τα πειραματικά πρωτόκολλα του εργαστηρίου, να στήνω νέα πρωτόκολλα, να αξιολογώ τα αποτελέσματα και να συμμετέχω στη συγγραφή επιστημονικών άρθρων. Όλα αυτά τα έκανε με περισσή υπομονή και εμπιστοσύνη στο πρόσωπό και τις δυνατότητές μου. Τον ευχαριστώ για τη μεταλαμπάδευση των γνώσεών του, για τον κατευνασμό του άγχους μου και για την καθημερινή του στήριξη. Υπήρξε υπομονετικός μεταδιδάκτορας, μεταδοτικότατος δάσκαλος, ακριβοδίκαιος επιστημονικός υπεύθυνος στο πρόγραμμα που είχα τη χαρά να συμμετέχω ενεργά, ιδανικός συνεργάτης και πολύτιμος φίλος. Στο πλαίσιο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φοιτητές με τους οποίους συνεργαστήκαμε στα πλαίσια του διδακτορικού μου, και συγκεκριμένα τον Δημήτρη Καραδήμα (MSc), το Χρήστο Χριστογιώργο (BSc), τη Βασιλική Κουρκουβά (BSc) και τη Βάσω Αρβανίτη (BSc), στην οποία και θα εστιάσω. Η βοήθειά της σε ερευνητικά (και μη) ζητήματα ήταν σημαντικότερη, τόσο στα πλαίσια της διπλωματικής της, όσο και πέρα από αυτή. Την ευχαριστώ για την όρεξή της, την εργατικότητά της και τη φιλία της, που οδήγησε στη δημιουργία μίας όμορφης και λειτουργικής τριάδας μαζί με τον Βασίλη. Καλύτερους lab partners και book buddies (μαζί με την Μαριάνθη Πεντογέννη) δε θα έβρισκα.

Ευχαριστώ πολύ όλους τους φίλους μου για την αμέριστη στήριξή τους, καθώς και τον Παύλο που ήταν δίπλα μου σε κάθε βήμα δείχνοντάς μου έμπρακτα πόσο πιστεύει στις δυνατότητές μου. Τέλος (but not least), δε θα έφτανα ως εδώ αν δεν είχα τη στήριξη της οικογένειάς μου, και κυρίως των γονιών μου, Τιμόθεου και Μυρτώς. Ήταν δίπλα μου με κάθε τρόπο αυτά τα τρία χρόνια, χαίρονταν περισσότερο από μένα με τις επιτυχίες μου και λυπόντουσαν/εκνευρίζονταν περισσότερο από μένα με τις α(πο)τυχίες μου. Τους ευχαριστώ που με προέτρεψαν να κυνηγήσω τα όνειρά μου και να προσπαθήσω να εργαστώ σε κάτι που με γεμίζει.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	4
Abstract	6
Πρόλογος.....	8
Κατάλογος Συντομογραφιών.....	14
A. Εισαγωγή	17
A.1 Αίμα	17
A.1.1 Γενικά Στοιχεία	17
A.1.2 Πλάσμα.....	17
A.1.3 Έμμορφα Συστατικά	19
A.2 Ερυθροκυτταρική Μεμβράνη	20
A.2.1 Λιπιδική Διπλοστιβάδα	20
A.2.2 Πρωτέωμα Μεμβράνης.....	21
A.2.3 Κυτταροσκελετός – Σύνδεση με τη Μεμβράνη.....	25
A.3 Πρωτεϊνικός Έλεγχος – Ομοιόσταση Ερυθροκυττάρου	28
A.3.1 Μοριακές Συνοδοί.....	28
A.3.2 Πρωτεολυτικά Συστήματα	29
A.3.3 Κυστιδιοποίηση	30
A.4 Μεταβολισμός του Ερυθροκυττάρου	31
A.4.1 Μεταβολισμός Γλυκόζης	31
A.4.2 Μεταβολισμός Οξειδωτικών Ριζών	34
A.5 Ερυθροκυτταρική Γήρανση	36
A.5.1 Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης	37
A.5.2 Σηματοδότηση μέσω της πρωτεΐνης CD47	38
A.5.3 Το μονοπάτι της Ζώνης 3	38
A.6 Ερυθρόπτωση.....	40
A.7 Αποθήκευση και Αποθηκευτική Βλάβη Ερυθροκυττάρων	42
A.7.1 Συνθήκες Αποθήκευσης	42
A.7.2 Αποθηκευτική Βλάβη	43

A.8 Τα Χαρακτηριστικά του Αιμοδότη και ο Ρόλος τους στην Αποθηκευτική Ικανότητα και τη Μετα-μεταγγισιακή Απόκριση των Ερυθροκυττάρων	46
A.8.1 Γενετικά Καθορισμένοι Παράγοντες	46
A.8.2 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες	47
A.9 Η Φυσιολογία του Αίματος των Ετερόζυγων για β-Μεσογειακή Αναιμία	48
B. Σκοπός	49
Γ. Υλικά και Μέθοδοι.....	50
Γ.1 Υλικά.....	50
Γ.1.1 Βιολογικό Υλικό.....	50
Γ.1.2 Ζωικά Μοντέλα	50
Γ.1.3 Χημικά Αντιδραστήρια.....	50
Γ.1.4 Κιτ Εμπορίου	52
Γ.1.5 Χρωστικές.....	52
Γ.1.6 Αντισώματα.....	52
Γ.1.7. Φωτογραφικά Υλικά	53
Γ.1.8 Αναλώσιμα.....	53
Γ.1.9 Όργανα – Συσκευές.....	53
Γ.2 Μέθοδοι.....	54
Γ.2.1 Απομόνωση – Ποσοτικός Προσδιορισμός Ερυθροκυτταρικών Μembranών/Εξωκυττάρων Κυστιδίων ...	54
Γ.2.2 Ηλεκτροφόρηση και Ανοσοεντόπιση τύπου Western.....	55
Γ.2.3 Παράμετροι Αιμόλυσης	57
Γ.2.4 Παράμετροι Οξειδοαναγωγικού Ισοζυγίου	59
Γ.2.5 Παράμετροι Πρωτεόστασης	60
Γ.2.6 Παράμετροι Ομοιόστασης Ασβεστίου κι Εξωτερίκευσης Φωσφατιδυλοσερίνης	61
Γ.2.7 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης	62
Γ.2.8 Μεταβολωμική και Πρωτεωμική Ανάλυση	62
Γ.2.9 <i>In vitro</i> Μοντέλο Μετάγγισης	63
Γ.2.10 Ζωικό Μοντέλο Μετάγγισης.....	64
Γ.2.11 Στατιστική Ανάλυση και Κατασκευή Βιολογικών Δικτύων	64

Δ. Αποτελέσματα.....	66
Δ.1 Μελέτη Φρέσκου Αίματος	66
Δ.2 Αποθηκευτική Ικανότητα Ερυθροκυττάρων	68
Δ.2.1 Δημογραφικά - Αιματολογικά Στοιχεία.....	68
Δ.2.2 Παράμετροι Αιμόλυσης.....	69
Δ.2.3 Οξειδοαναγωγικό Ισοζύγιο – Ομοιόσταση Ασβεστίου	70
Δ.2.4 Πρωτεασωμική Ενεργότητα	72
Δ.2.5 Μεταβολισμός.....	73
Δ.2.6 Πρωτεϊνική Σύσταση και Δέσμευση Πρωτεϊνών στη Μembrάνη	76
Δ.2.7 Δικτύωση πρωτεομικών και φυσιολογικών παραμέτρων με πυρήνα το 20S πρωτεάσωμα	80
Δ.2.8 Παράμετροι Μορφολογίας – Κυστιδιοποίησης.....	82
Δ.2.9 Διακύμανση αποθηκευτικών παραμέτρων εντός της ομάδας των ετερόζυγων αιμοδοτών	84
Δ.3 Μετα-μεταγγισιακή Μελέτη <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i>	89
Δ.3.1 <i>In vitro</i> Μοντέλο Μετάγγισης	89
Δ.3.2 Ζωικό Μοντέλο Μετάγγισης	91
Δ.4 Διασύνδεση Αιμοδότη – Μετα-μεταγγισιακών Φαινοτύπων.....	95
Δ.4.1 Συσχετίσεις Αποθηκευτικών – Μετα-μεταγγισιακών Παραμέτρων <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i>	96
Δ.4.2 Άμεση και Έμμεση Σύνδεση Αιμοδότη – Μετα-μεταγγισιακών Φαινοτύπων.....	101
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	106
Ε.1 Προ-αποθηκευτική Μελέτη (<i>in vivo</i>)	106
Ε.2 Αποθηκευτική Ικανότητα – <i>In vitro</i> Μοντέλο Μετάγγισης	107
Ε.2.1 Προφίλ Αιμόλυσης.....	107
Ε.2.2 Μεταβολισμός και Οξειδοαναγωγικό Ισοζύγιο	109
Ε.2.3. Πρωτεόσταση	114
Ε.2.4 Ερυθροκυτταρική Μορφολογία – Κυστιδιοποίηση	116
Ε.3 Ζωικό Μοντέλο Μετάγγισης.....	117
Ε.4 Συγκεντρωτικά Συμπεράσματα	118
Βιβλιογραφία.....	120
Παράρτημα.....	140

Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα	150
Δημοσιεύσεις που αφορούν στα αποτελέσματα της διατριβής	153

Κατάλογος Συντομογραφιών

βΜΑ: β-μεσογειακή αναιμία

APS: υπερθεϊκό αμμώνιο

ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη

BMI: δείκτης μάζας σώματος

BSA: αλβουμίνη ορού βοοειδών

Ca²⁺: κατιόντα ασβεστίου

CaCl₂: χλωριούχο ασβέστιο

CAT: καταλάση

Cl⁻: ανιόντα χλωρίου

CO₂: διοξείδιο του άνθρακα

CPD/SAGM: συντηρητικό διάλυμα με κιτρικά, φωσφορικά και δεξτρόζη και πρόσθετο αλατούχο διάλυμα με αδενίνη, γλυκόζη και μαννιτόλη

CPDA: συντηρητικό διάλυμα με κιτρικά, φωσφορικά, δεξτρόζη και αδενίνη

DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο

DNP: δινιτροφαινύλιο

DNPH: δινιτροφαινυλδραζίνη

EDTA: αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

G6PD: αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης

GAPDH: αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης

GPx: υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

HCl: υδροχλώριο

HRP: υπεροξειδάση

HSP: πρωτεΐνη θερμικού σοκ

K⁺: κατιόντα καλίου

KCl: χλωριούχο κάλιο

MCH: μέση ερυθροκυτταρική αιμοσφαιρίνη

MCV: μέσος ερυθροκυτταρικός όγκος

MDA: μαλονδιαλδεΐδη

Na⁺: κατιόντα νατρίου

NaCl: χλωριούχο νάτριο

NaOH: υδροξείδιο του νατρίου

NO: μονοξείδιο του αζώτου

OsO₄: τετροξείδιο του οσμίου

PBS: διάλυμα φωσφορικού άλατος

PE: φυκοερυθρίνη

PKC: πρωτεϊνική κινάση C

PMSF: φαινυλομεθυλσουλφονυλοφθορίδιο

Prdx: υπεροξειδοσίνη

PS: φωσφατιδυλοσερίνη

RDW: δείκτης κατανομής μεγέθους ερυθροκυττάρων

ROS: δραστικές ρίζες οξυγόνου

SOD: υπεροξειδική δισμουτάση

SDS: δωδεκακυλοθειικό νάτριο

TBA: θειοβαρβιτουρικό οξύ

tBHP: τερτ-βούτυλ-υδρουπεροξείδιο

TCA: τριχλωροξικό οξύ

TEMED: τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη

TMB: τετραμεθυλ-βενζιδίνη

TPTZ: τριπυριδυλοτριαζίνη

UHPLC-MS: υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης – φασματομετρία μάζας

A. Εισαγωγή

A.1 Αίμα

A.1.1 Γενικά Στοιχεία

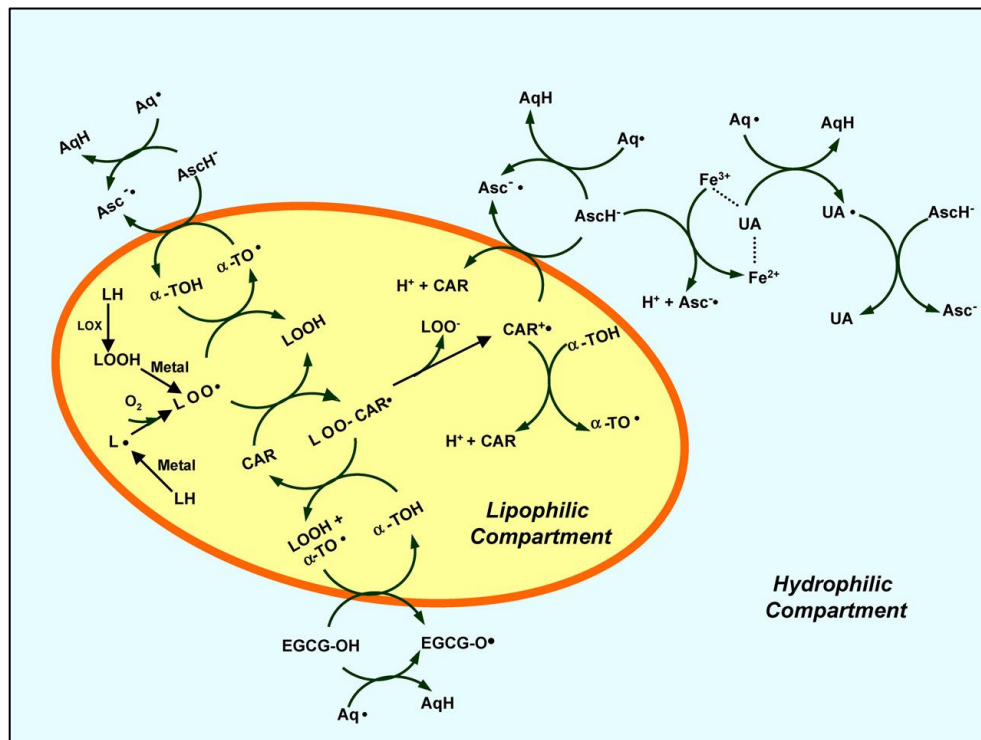
Το αίμα αποτελεί εναιώρημα έμμορφων στοιχείων (ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων) σε ένα υγρό διάλυμα οργανικών μορίων, πρωτεϊνών και αλάτων που ονομάζεται πλάσμα (Baskurt and Meiselman 2003). Συμμετέχει σε ένα σύνολο φυσιολογικών λειτουργιών, εκ των οποίων η βασικότερη είναι η μεταφορά οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα από και προς τα διάφορα όργανα του σώματος. Άλλοι ρόλοι του αφορούν στην άμυνα έναντι παθογόνων, τη μεταφορά ποικιλίας ουσιών και τη διατήρηση της ομοιόστασης του σώματος (θερμοκρασία, pH) (Farley et al. 2012). Οι περισσότεροι ενήλικες έχουν 4-6 λίτρα αίματος (~7-9% του βάρους του σώματός τους), ενώ η θερμοκρασία και το pH του είναι περίπου 38°C και 7,35-7,45, αντίστοιχα. Το κόκκινο χρώμα του αίματος οφείλεται στην αιμοσφαιρίνη, και ανάλογα με την κατάσταση οξυγόνωσης διαθέτει από ανοιχτόχρωμες έως σκουρόχρωμες αποχρώσεις (Hand 2001). Για να διαχωριστεί στα επιμέρους συστατικά του, το αίμα μετά την αιμοληψία μπορεί να φυγοκεντρηθεί: στο χαμηλότερο στρώμα που προκύπτει βρίσκονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια, στο υψηλότερο εντοπίζεται το πλάσμα και ενδιάμεσα βρίσκεται η στιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων (Bain 2004). Ο όρος αιματοκρίτης, αναφέρεται στο ποσοστό του όγκου του αίματος που καταλαμβάνουν τα ερυθροκύτταρα, και φυσιολογικά οι άντρες έχουν τιμές κοντά στο 45%, ενώ οι γυναίκες στο 42% (Hand 2001).

A.1.2 Πλάσμα

Το πλάσμα, όπως όλα τα υγρά του ανθρώπινου σώματος, αποτελείται ως επί το πλείστον (92%) από νερό. Σε αυτό βρίσκονται διαλυμένες ή ως εναιωρήματα πολλές ουσίες, με βασικές εκπροσώπους τις πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες του πλάσματος ανήκουν στις εξής κατηγορίες: (α) πρωτεΐνες που εκκρίνονται από ιστούς και δρουν στο πλάσμα (με βασικότερη την αλβουμίνη), (β) ανοσοσφαιρίνες, (γ) προσδέτες για υποδοχείς σε μακρινές αποστάσεις (ορμόνες), (δ) προσδέτες για τοπικούς υποδοχείς (κυτταροκίνες), (ε) παροδικοί «περαστικοί» που δεν έχουν δράση ορμόνης και διέρχονται από το πλάσμα για να φτάσουν στην τοποθεσία όπου θα δράσουν (λυσοσωμικές πρωτεΐνες), (στ) προϊόντα διαρροής ιστών λόγω θανάτου ή βλάβης (π.χ. καρδιακές τροπονίνες), (ζ) εκκρίσεις από παθολογικούς ιστούς (καρκινικοί δείκτες) και (η) ξένες πρωτεΐνες (π.χ. πρωτεΐνες παρασίτων) (N.L. Anderson and Anderson 2002). Πέραν των πρωτεϊνών, το πλάσμα είναι πλούσιο σε ηλεκτρολύτες, διαλυμένα αέρια, θρεπτικά συστατικά (βιταμίνες, λιπίδια κ.α.) και μεταβολικά απόβλητα. Στο πλάσμα βρίσκονται, επίσης, εξωκυττάρια κυστίδια, τα οποία απαρτίζουν ένα ετερογενές σύνολο από μεμβρανικές δομές κυτταρικής προέλευσης, με κύριους εκπροσώπους τα εξωσώματα και τα μικροκυστίδια. Τα πρώτα προέρχονται από το ενδοσωμικό σύστημα, ενώ τα δεύτερα αποκόπτονται από την πλασματική μεμβράνη (Raposo and Stoorvogel 2013). Η εξωκυττάρια κυστιδιοποίηση αποτελεί μηχανισμό κυτταρικής ομοιόστασης και διακυτταρικής επικοινωνίας ο οποίος επιτρέπει στα κύτταρα να ανταλλάζουν πρωτεΐνες, λιπίδια και γενετικό υλικό (van Niel et

al. 2018). Μάλιστα, η σύσταση των εξωκυττάρων κυστιδίων και το φορτίο τους τα καθιστούν ιδανικούς βιοδείκτες σε διάφορες ασθένειες (Joncas et al. 2019, Chung et al. 2021, Pasetto et al. 2021)

Ένα πολύ σημαντικό και βασικό χαρακτηριστικό του πλάσματος είναι η αντιοξειδωτική του ικανότητα, καθώς διαθέτει τόσο υδατοδιαλυτά, όσο και λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά μόρια. Τα μόρια αυτά δρουν συνεργιστικά με σκοπό την καταπολέμηση των οξειδωτικών ριζών. Στο υδρόφιλο διαμέρισμα εντοπίζονται κυρίως πρωτεΐνες, ουρικό και ασκορβικό οξύ, ενώ στο λιπόφιλο καρτενοειδή και α-τοκοφερόλη. Αυτά σχηματίζουν ένα αντιοξειδωτικό δίκτυο, ενισχύουν το ένα το άλλο και αντιμετωπίζουν τις οξειδωτικές βλάβες (Yeum et al. 2004). Ένα παράδειγμα της συνεργιστικής τους δράσης είναι η οξειδωτική δράση της α-τοκοφερόλης έναντι λιπιδίων *in vitro*, η οποία όμως μπορεί να αποτραπεί μετά την αναγωγή της ρίζας α-τοκοφερόλης σε α-τοκοφερόλη από το ασκορβικό οξύ (Hirano et al. 1997). Επίσης, το ουρικό οξύ έχει δείχθει πως σταθεροποιεί το ασκορβικό, μέσω αναχαίτισης μίας εξαρτώμενης από τον σίδηρο οξείδωσής του (Sevanian et al. 1991). Συνολικά, η συνεργιστική δράση των βασικών αντιοξειδωτικών του πλάσματος φαίνεται στην **Εικόνα Α1**.



Εικόνα Α1: Το συνεργιστικό δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ αντιοξειδωτικών μορίων του πλάσματος (Ανατύπωση από Yeum et al, 2004). AscH^- : ασκορβικό, $\text{Asc}\cdot^-$: ασκορβυλική ρίζα, CAR : καρτενοειδές, $\text{CAR}\cdot^+$: κατιόν καρτενοειδικής ρίζας, $\alpha\text{-TOH}$: α-τοκοφερόλη, $\alpha\text{-TO}\cdot$: α-τοκοφεροξυλική ρίζα, UA : ουρικό οξύ, $\text{UA}\cdot$: ρίζα ουρικού οξέος.

Πέραν των παραπάνω μορίων, η αλβουμίνη, η πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος, εκτός από τη βασική της συμμετοχή στη ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης του αίματος (Rozga et al. 2013), δρα και στην αντιοξειδωτική άμυνα του σώματος. Πρώτον, λόγω των βιοφυσικών της χαρακτηριστικών μπορεί να δεσμεύσει ιόντα μετάλλων (Halliwell 1988) και να παγιδεύσει δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) (Iwao et al. 2012). Δεύτερον, έχει δείχθει πως διαθέτει δράση θειοεστεράσης και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της κυστεΐνης (Cha and Kim 1996).

Τέλος, μπορεί να ενισχύσει και έμμεσα την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, μέσω της δέσμευσης της στη χολερυθρίνη, καθώς με αυτόν τον τρόπο αναχαιτίζει την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Belinskaia et al. 2020).

A.1.3 Έμμορφα Συστατικά

A.1.3.1 Λευκά Αιμοσφαίρια και Αιμοπετάλια

Τα λευκά αιμοσφαίρια συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού και είναι τα μόνα έμμορφα συστατικά του αίματος που αποτελούν «κλασικά» κύτταρα, καθώς περιέχουν πυρήνα και οργανίδια. Παράγονται στο μυελό των οστών και διακρίνονται σε αυτά που συνδράμουν στη φυσική και εκείνα που παίζουν ρόλο στην επίκτητη ανοσία. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα κοκκιοκύτταρα (βασεόφιλα, ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα), τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα κύτταρα φυσικοί φονείς, τα δενδριτικά και τα μαστοκύτταρα. Στη δεύτερη κατηγορία συμμετέχουν τα T- και B-λεμφοκύτταρα. Συνολικά τα λευκά αιμοσφαίρια έχουν την ικανότητα να προσφέρουν γρήγορη, αποτελεσματική, ειδική και μακράς διαρκείας απόκριση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (Leichner and Kambayashi 2014). Τα αιμοπετάλια αποτελούν θραύσματα μεγακαρυοκυττάρων και συμμετέχουν στην πήξη του αίματος και την αιμόσταση, ενώ εκκρίνουν πλήθος αναπτυξιακών παραγόντων που σχετίζονται με την επιδιόρθωση ιστών. Ο χρόνος ζωής τους στην κυκλοφορία αντιστοιχεί σε 10 ημέρες, στο πέρας των οποίων φαγοκυτταρώνονται (Holinstat 2017).

A.1.3.2 Ερυθρά Αιμοσφαίρια

Τα ερυθροκύτταρα αποτελούν το πιο άφθονο έμμορφο συστατικό του αίματος, είναι απύρρηνα και έχουν χαρακτηριστικό σχήμα αμφίκουλου δίσκου (διάμετρος 7,5-8,7μm και πάχος 1,7-2,2μm). Παράγονται μέσω της διαδικασίας της ερυθροποίησης στον μυελό των οστών, κατά την οποία ο πυρήνας του προγονικού κυττάρου απομακρύνεται και φαγοκυτταρώνεται (Konstantinidis et al. 2012), τα οργανίδια εγκαταλείπουν το κύτταρο και αυτό αποκτά το χαρακτηριστικό του σχήμα (Manwani and Bieker 2008). Ο χρόνος ζωής των ώριμων ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία είναι περίπου 120 ημέρες. Το σχήμα τους τους προσδίδει την ικανότητα να παραμορφώνονται αντιστρεπτά κατά την διόδό τους από τα τριχοειδή αγγεία για να επιτελέσουν τη βασική τους λειτουργία που είναι η ανταλλαγή αερίων (Namvar et al. 2021). Η αιμοσφαιρίνη, η κύρια κυτοσολική πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου, είναι το μέσο για την επίτευξη της συγκεκριμένης λειτουργίας, καθώς μπορεί να δεσμεύει οξυγόνο και με μικρότερη συγγένεια διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) (Hamasaki and Yamamoto 2000). Στους ενήλικες το μόριο της αιμοσφαιρίνης αποτελείται από δύο α-σφαιρίνες και δύο β-σφαιρίνες, κάθε μία από τις οποίες φέρει ένα μόριο αίμης. Οι ομάδες της αίμης διαθέτουν σίδηρο, ο οποίος μπορεί να δεσμεύει διατομικούς αέριους προσδέτες (L.J. Smith et al. 2010).

Παρά το γεγονός ότι τα ερυθροκύτταρα είναι γνωστά για τον ρόλο τους στη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς και την απομάκρυνση διοξειδίου του άνθρακα από αυτούς, αυτή δεν είναι η αποκλειστική τους λειτουργία. Τα ερυθροκύτταρα παίζουν ρόλο στο αντιοξειδωτικό δυναμικό του οργανισμού. Είναι εξοπλισμένα με ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά μόρια που διατηρούν την αιμοσφαιρίνη σε μη οξειδωμένη μορφή για να αποφευχθούν βλάβες στη μεμβράνη που μπορεί να οδηγήσουν σε λύση του κυττάρου (Kuhn et al. 2017). Έτσι

προστατεύονται οι ιστοί κι ο οργανισμός, καθώς η απελευθέρωση συστατικών του ερυθροκυττάρου μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (Grubina et al. 2007), λιπιδική υπεροξειδωση (Alayash et al. 2001), και φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Ghosh et al. 2013). Επιπλέον, τα ερυθροκυτταρικά αντιοξειδωτικά μονοπάτια και η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τα εξωκυττάρια αντιοξειδωτικά μέσω της διαμεμβρανικής μεταφοράς ηλεκτρονίων, σε συνδυασμό με την κινητικότητα των ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία, καθιστούν τα συγκεκριμένα κύτταρα ως ιδανικούς ρυθμιστές των ROS που μπορούν να συμβάλλουν στη συνολική συστημική ομοιόσταση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (Kuhn et al. 2017). Επίσης, τα ερυθροκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του συστημικού μεταβολισμού μονοξειδίου του αζώτου (NO), στη μεταφορά και στην απελευθέρωση αγγειο-ενεργών ουσιών, συμμετέχοντας έτσι στον έλεγχο της καρδιαγγειακής λειτουργίας (Straub et al. 2014). Αξίζει, τέλος, να αναφερθεί πως τα ερυθροκύτταρα αλληλεπιδρούν τόσο με τον μεταβολισμό του σώματος όσο και με το ανοσοποιητικό σύστημα (Paradopoulos et al. 2021) και μπορούν να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες προσβολής του οργανισμού από ιούς ή βακτήρια (Johansson and Falk 2021).

A.2 Ερυθροκυτταρική Μembrάνη

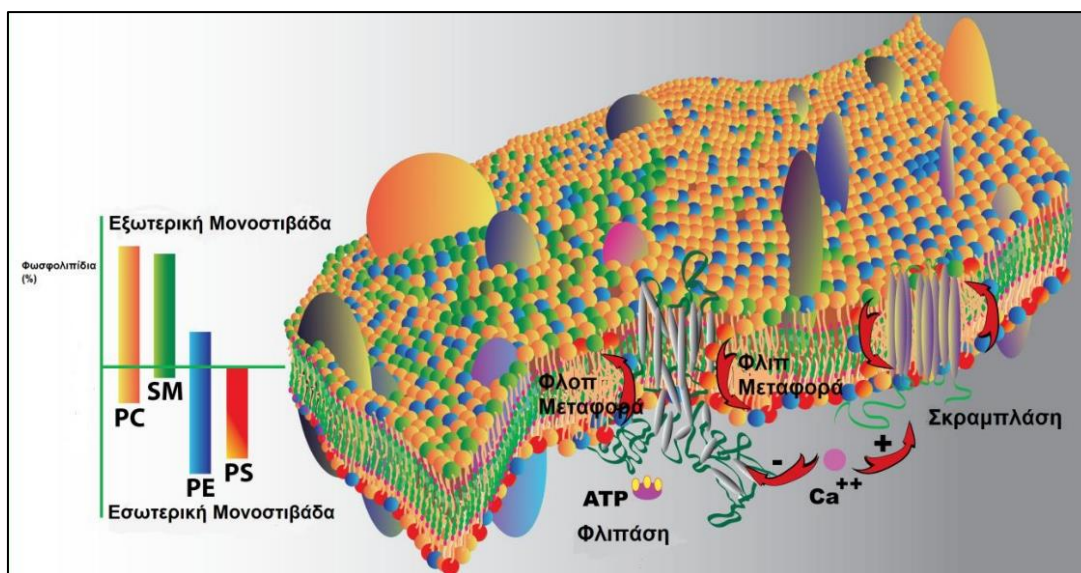
Το ερυθροκύτταρο, έχοντας χάσει τον πυρήνα και τα οργανίδια του, στηρίζεται κυρίως στη μεμβράνη του για την ομαλή του λειτουργία και τη ρύθμιση του μεταβολισμού και του σχήματός του. Όπως όλες οι βιολογικές μεμβράνες, έτσι και η ερυθροκυτταρική απαρτίζεται από λιπίδια που σχηματίζουν μία διπλοστιβάδα εκλεκτικά διαπερατή σε πολικά μόρια. Αυτή η δομή «φιλοξενεί» διάφορες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που καθορίζουν τη λειτουργικότητα της μεμβράνης (Trejo-Soto et al. 2022). Υπομεμβρανικά στα ερυθροκύτταρα βρίσκεται ο κυτταροσκελετός, με βασική του πρωτεΐνη τη σπεκτρίνη (Goodman et al. 1988).

A.2.1 Λιπιδική Διπλοστιβάδα

Η λιπιδική διπλοστιβάδα του ερυθροκυττάρου απαρτίζεται από χοληστερόλη και φωσφολιπίδια σε ίση μεταξύ τους αναλογία. Η χοληστερόλη ισομοιράζεται μεταξύ των δύο στιβάδων, αλλά στα φωσφολιπίδια υπάρχει ασύμμετρη κατανομή: η φωσφατιδυλοχολίνη και η σφινγγομυελίνη βρίσκονται κυρίως στην εξωτερική στιβάδα, ενώ η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) στην εσωτερική (Mohandas and Gallagher 2008) (**Εικόνα A2**). Η ασυμμετρία, και κυρίως η παραμονή της PS στην εσωτερική μονοστιβάδα, είναι κρίσιμη για το ερυθροκύτταρο. Η επιφανειακή PS είναι σήμα φαγοκυττάρωσης από μακροφάγα (Wood et al. 1996), ενώ μπορεί επίσης να οδηγήσει στην προσκόλληση των ερυθροκυττάρων σε κύτταρα του ενδοθηλίου, αποτρέποντας τη φυσιολογική κυκλοφορία τους (Setty et al. 2002), καθώς και στην ενεργοποίηση της προθρομβίνης δρώντας σε συνέργεια με τον παράγοντα πήξης Va (Weinreb et al. 2003).

Για τη διατήρηση της ασυμμετρίας είναι απαραίτητη η λειτουργία συγκεκριμένων πρωτεϊνών που μετατοπίζουν φωσφολιπίδια από τη μία στιβάδα στην άλλη. Οι φλιπάσες μπορούν να μεταφέρουν λιπίδια από την εξωτερική στην εσωτερική μονοστιβάδα, ενώ οι φλοπάσες διεκπεραιώνουν την αντίστροφη διαδικασία. Για τη λειτουργία τους είναι απαραίτητη η κατανάλωση ενέργειας. Αντιθέτως, οι σκραμπλάσες εκτελούν τόσο «φλιπ»

όσο και «φλοπ» μεταφορές σύμφωνα με τη διαβάθμιση συγκέντρωσης, επομένως δεν απαιτούν κατανάλωση ενέργειας (Pomorski and Menon 2016) (**Εικόνα A2**).



Εικόνα A2: Η λιπιδική διπλοστιβάδα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και η διατήρηση της φωσfolιπιδικής ασυμμετρίας. (Ανατύπωση από Kuypers 2011).

A.2.2 Πρωτέωμα Μεμβράνης

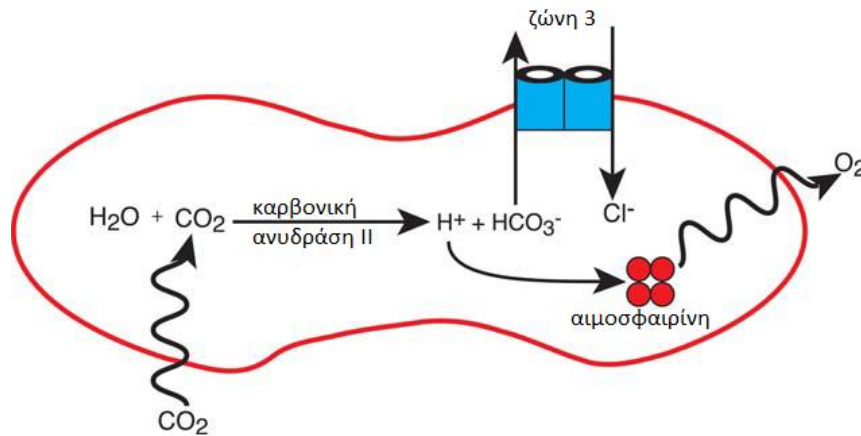
Η πρωτεϊνική σύσταση της μεμβράνης είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ομαλή ζωή του ερυθροκυττάρου στην κυκλοφορία. Η σταθερότητα του ερυθροκυττάρου και η ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης όταν αυτό διέρχεται από τα μικρή διαμέτρου τριχοειδή οφείλονται στο πρωτέωμα της μεμβράνης και του υποκείμενου κυτταροσκελετού (Asaro and Zhu 2020). Η ρύθμιση του ερυθροκυτταρικού όγκου εξαρτάται αποκλειστικά από τη συνδυαστική λειτουργία ενός συνόλου μεμβρανικών μεταφορέων (von Lindern et al. 2022), κάποιοι εκ των οποίων θα αναλυθούν στη συνέχεια. Οι μεταφορείς αυτοί προσδίδουν στο ερυθροκύτταρο τη δυνατότητα να είναι ιδιαίτερα μη-διαπερατό σε κατιόντα, αλλά πολύ διαπερατό σε ουδέτερες διαλυτές ουσίες, όπως είναι η γλυκόζη και η ουρία. Μάλιστα, η ελάχιστη διαπερατότητα σε κατιόντα επιτρέπει τη ρύθμιση του όγκου με αμελητέα κατανάλωση ερυθροκυτταρικής ενέργειας (Lew and Tiffert 2017).

Ζώνη 3

Η Ζώνη 3, γνωστή και ως ανιοντοανταλλάκτης 1 (AE1), βρίσκεται σε μεγάλη αφθονία στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Μεταγράφεται από το γονίδιο *SLC4A1*, αποτελείται από 911 αμινοξικά κατάλοιπα και παρουσιάζει 3 κύριες περιοχές: μία αμινοτελική κυτοσολική περιοχή, μία καρβοξυτελική κυτοσολική περιοχή και τη διαμεμβρανική περιοχή που διαπερνά 12-14 φορές τη μεμβράνη. Συνήθως σχηματίζει διμερή και τετραμερή στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, όμως κάθε μονομερές είναι λειτουργικά ανεξάρτητο (Reithmeier et al. 2016).

Η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει άμεσα στην ανταλλαγή αερίων μέσω της ανταλλαγής ιόντων χλωρίου με τα διττανθρακικά ιόντα που παράγονται από το μεταβολισμό του διοξειδίου του άνθρακα (**Εικόνα A3**). Τα

διττανθρακικά ιόντα προκύπτουν μαζί με πρωτόνια από τη δράση της καρβονικής ανυδράσης II στα μόρια του διοξειδίου του άνθρακα (West et al. 2014). Η Ζώνη 3 είναι επίσης ιδιαίτερα σημαντική για την ακεραιότητα του ερυθροκυττάρου, καθώς μέσω της αμινοτελικής της περιοχής συνδέεται με τον κυτταροσκελετό δημιουργώντας σταθερά σύμπλοκα με τη συμμετοχή διαφόρων πρωτεϊνών (van den Akker et al. 2010). Η συνεισφορά της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στη ρύθμιση του μεταβολισμού αλλά και τον θάνατο του κυττάρου θα αναλυθούν παρακάτω.



Εικόνα A3: Η βασική λειτουργία της Ζώνης 3 του ερυθροκυττάρου. (Ανατύπωση από Bador and Casey, 2018).

Υδατοπορίνη-1

Η υδατοπορίνη-1 είναι το πρώτο πρωτεϊνικό υδατικό κανάλι που χαρακτηρίστηκε δομικά και λειτουργικά. Το μονομερές της υδατοπορίνης-1 αποτελείται από 269 αμινοξικά κατάλοιπα. Τόσο το καρβοξυτελικό, όσο και το αμινοτελικό της άκρο είναι υδρόφιλα και βρίσκονται στην κυτοσολική πλευρά της μεμβράνης. Όσον αφορά στο υδρόφοβο διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης, διαπερνά 6 φορές τη διπλοστιβάδα (Benga 2012).

Στη μεμβράνη η υδατοπορίνη βρίσκεται ως τετραμερές, όμως κάθε μονομερές είναι ανεξάρτητο λειτουργικά. Η βασική της λειτουργία είναι η οσμωτική ή διαχυτική μεταφορά μορίων νερού εγκαρσίως της μεμβράνης, επομένως η πρωτεΐνη αυτή χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλή υδατική διαπερατότητα (Benga 2012). Πέραν της μεταφοράς μορίων νερού, έχει δειχθεί πως μέσω του πόρου της υδατοπορίνης διέρχονται επίσης αέρια, όπως το CO₂ (Endeward et al. 2006, Hsu 2018) και το NO (Herrera et al. 2006), αλλά όχι το H₂O₂ (Orrico et al. 2022).

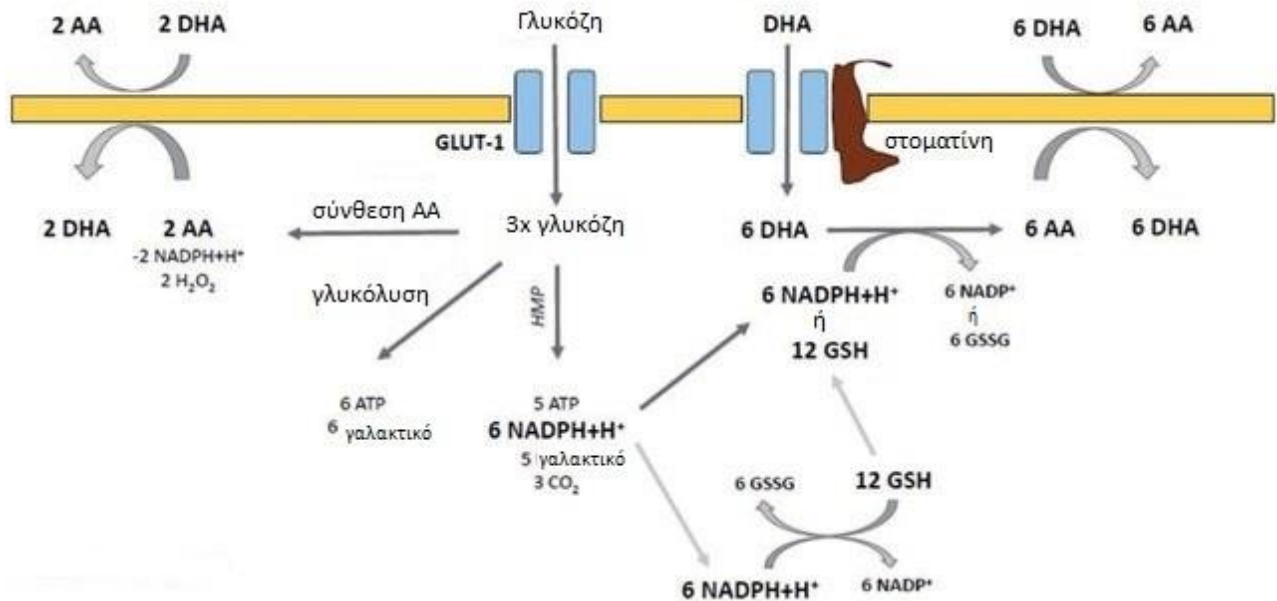
Γλυκοφορίνες

Οι γλυκοφορίνες είναι μία κατηγορία διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που φέρουν στην επιφάνειά τους άφθονα σιαλικά οξέα. Η γλυκοφορίνη A είναι η κύρια γλυκοφορίνη του ερυθροκυττάρου, και τα σιαλικά της κατάλοιπα είναι οι κύριοι ιθύνοντες της δημιουργίας αρνητικού φορτίου στην ερυθροκυτταρική επιφάνεια (Aoki 2017). Η απόκτηση αρνητικά φορτισμένης επιφάνειας είναι μείζονος σημασίας καθώς αποτρέπει τις αλληλεπιδράσεις ερυθροκυττάρου-ερυθροκυττάρου και ερυθροκυττάρου-ενδοθηλίου στην κυκλοφορία (Eylar et

al. 1962). Ένας ακόμη ρόλος που έχει προταθεί για τη γλυκοφορίνη A είναι η λειτουργία της ως μοριακή συνοδός για τη μεταφορά της ζώνης 3 στη μεμβράνη (Aoki 2017).

Μεταφορέας Γλυκόζης Glut-1

Ο μεταφορέας γλυκόζης Glut-1 είναι μία υδρόφοβη πρωτεΐνη που αποτελείται από 492 αμινοξέα που σχηματίζουν 12 μεμβρανικές α-έλικες με το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο να προεκβάλουν στο κυτοσόλιο (Carruthers et al. 2009). Ο Glut-1 είναι υπεύθυνος για την παθητική διάχυση μορίων γλυκόζης, αλλά και αφυδροασκορβικού οξέος, μέσω ενός «διακόπτη» που καθορίζει τι θα μεταφερθεί, τη στοματίνη (Εικόνα A4). Η είσοδος του αφυδροασκορβικού στο ερυθροκύτταρο και η μετατροπή του σε ασκορβικό οξύ (βιταμίνη που δε μπορεί να βιοσυνθέσει ο άνθρωπος) επιτρέπει την αποθήκευση ασκορβικού στο ερυθροκύτταρο και την ανακύκλωσή του στο πλάσμα για να ενισχυθεί το αντιοξειδωτικό δυναμικό (Hornung and Biesalski 2019). Ο μεταφορέας αυτός συμμετέχει επίσης στη σύνδεση του κυτταροσκελετού με τη μεμβράνη, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια.



Εικόνα A4: Η διπλή λειτουργία του Glut-1 του ερυθροκυττάρου στη μεταφορά γλυκόζης και αφυδροασκορβικού οξέος (DHA). (Ανατύπωση από Hornung and Biesalski, 2019). AA: ασκορβικό οξύ, HMP: μονοπάτι μονοφωσφορικών εξοζών, GSH: γλουταθειόνη, GSSG: δισουλφιδική γλουταθειόνη.

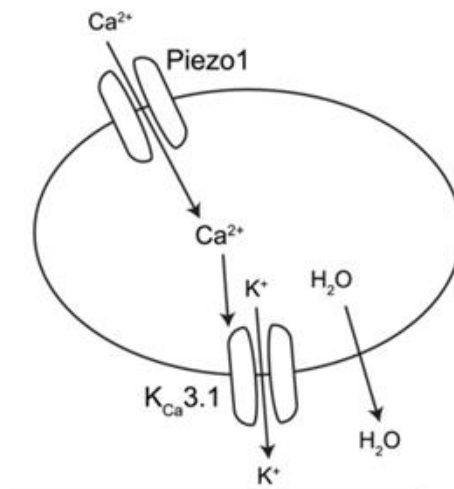
Αντλία Na^+/K^+

Η ΑΤΡάση Na^+/K^+ είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη υπεύθυνη για τη διατήρηση της ηλεκτροχημικής διαβάθμισης ιόντων καλίου (K^+) και νατρίου (Na^+) εντός κι εκτός της μεμβράνης. Η καταλυτική υπομονάδα της αντλίας κωδικοποιείται από διάφορα γονίδια. Για την απομάκρυνση Na^+ από το κυτοσόλιο και την είσοδο K^+ σε αυτό υδrolύεται τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) (Dunham and Gunn 1972). Η διαφορική συγκέντρωση ιόντων εντός κι εκτός του ερυθροκυττάρου είναι πολύ σημαντική για τη διατήρηση του ιδιαίτερου σχήματος αμφίκιουλου

δίσκου των ερυθροκυττάρων, το οποίο επιτρέπει με τη σειρά του τη βέλτιστη επιτέλεση της ανταλλαγής αερίων στην κυκλοφορία (Lew and Tiffert 2017).

Piezo-1 και Κανάλια Gardos

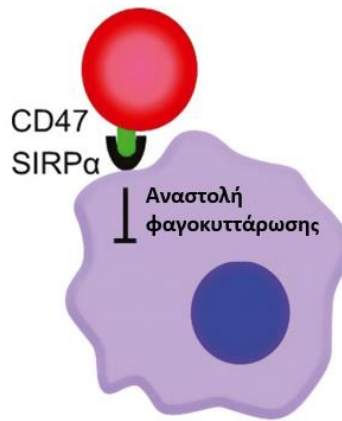
Η πρωτεΐνη Piezo-1 είναι ένα κανάλι ιόντων ευαίσθητο σε μηχανικό στρες που κωδικοποιείται από το γονίδιο *PIEZO1*. Αποτελεί έναν ακόμη μεταφορέα που σχετίζεται με τη ρύθμιση του κυτταρικού όγκου, καθώς αποκρίνεται σε διάφορα μηχανικά ερεθίσματα «μεταφράζοντάς» τα σε ροή ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}). Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου ενεργοποιεί τα κανάλια Gardos, τα οποία μπορούν να επάγουν την απομάκρυνση K^+ και μορίων νερού (**Εικόνα A5**). Έτσι τα ερυθροκύτταρα μπορούν ταχύτατα να μειώσουν τον όγκο τους ως απόκριση σε μηχανική καταπόνηση κατά την κυκλοφορία τους στον οργανισμό (Cahalan et al. 2015). Μάλιστα, υπάρχουν ενδείξεις πως αυτή η ελαχιστοποίηση του κυτταρικού όγκου ευνοεί την ανταλλαγή οξυγόνου/διοξειδίου του άνθρακα (Rao et al. 2009).



Εικόνα A5: Ο ρόλος της Piezo-1 και των καναλιών Gardos στη ρύθμιση του κυτταρικού όγκου μετά από μηχανική καταπόνηση. (Ανατύπωση από Cahalan et al, 2015).

CD47

Η CD47 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που διαπερνά 5 φορές την ερυθροκυτταρική μεμβράνη και φέρει το αμινοτελικό της άκρο στον εξωκυττάριο χώρο και το καρβοξυτελικό στο κυτοσόλιο (Lindberg et al. 1993). Ο βασικός της ρόλος είναι να λειτουργεί ως σήμα αναγνώρισης εαυτού στα ερυθροκύτταρα (**Εικόνα A6**). Πιο συγκεκριμένα, όταν ο υποδοχέας SiRPa που βρίσκεται στην επιφάνεια των μακροφάγων αλληλεπιδράσει με τη CD47 των ερυθροκυττάρων αποτρέπεται η φαγοκυττάρωσή τους (Oldenberg et al. 2000). Όμως, όταν προκύψουν αλλαγές στη δομή της πρωτεΐνης ή μειωθεί η παρουσία της στη μεμβράνη, μπορεί τελικά το κύτταρο να οδηγηθεί σε απομάκρυνση, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια.

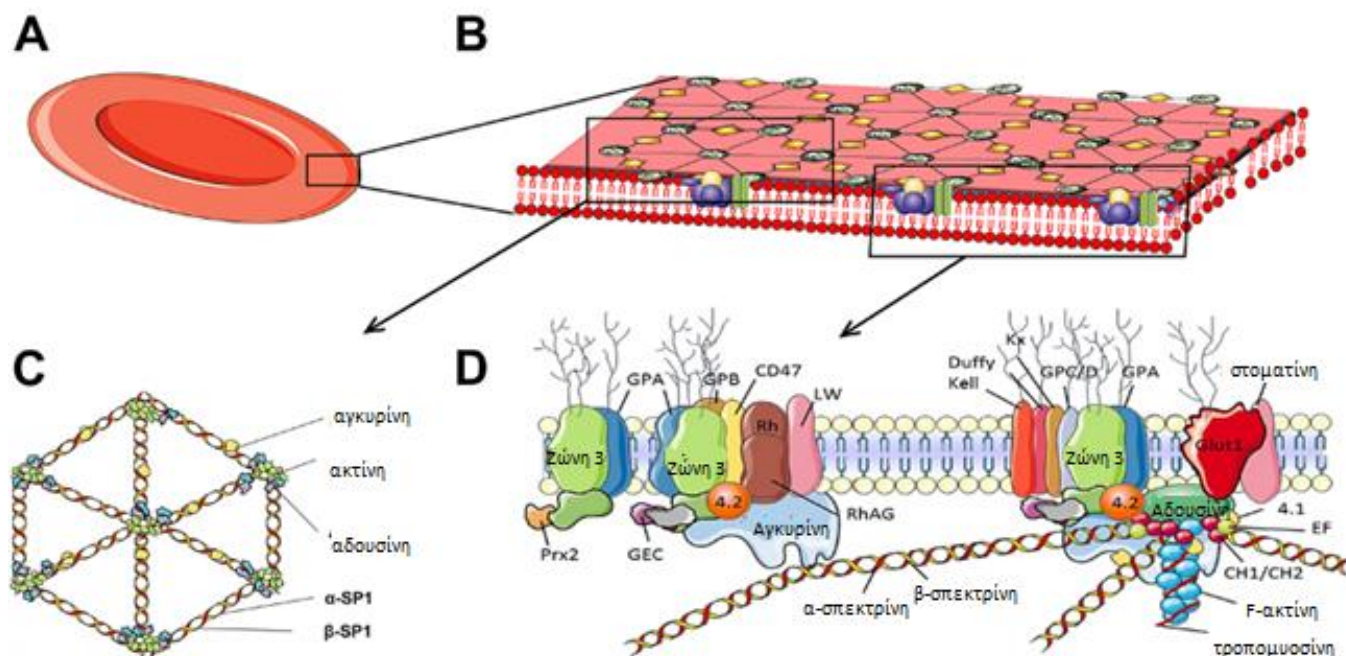


Εικόνα Α6: Ο ρόλος της CD47 ως δείκτης εαυτού του ερυθροκυττάρου. (Ανατύπωση από van Bruggen, 2013).

A.2.3 Κυτταροσκελετός – Σύνδεση με τη Μembrάνη

Ο υπομεμβρανικός σκελετός των ερυθροκυττάρων είναι ένα ψευδοεξαγωγικό δισδιάστατο δίκτυο (**Εικόνα Α7**), που απαρτίζεται κατά κύριο λόγο από σπεκτρίνη. Βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης και συνδέεται με αυτή μέσω πρωτεϊνικών συμπλόκων. Τα σύμπλοκα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την ακεραιότητα του ερυθροκυττάρου κατά τη δίοδό του από τα μικρής διαμέτρου αγγεία της κυκλοφορίας. Ο ερυθροκυτταρικός σκελετός επιτρέπει, μάλιστα, την επαναφορά της πρότερης μορφής του ερυθροκυττάρου όταν αυτό δέχεται μηχανικές πιέσεις.

Οι πλευρές και οι ακτίνες των εξαγώνων αντιπροσωπεύουν τετραμερή σπεκτρίνης. Η ερυθροκυτταρική σπεκτρίνη είναι μία ελαστική πρωτεΐνη που απαρτίζεται από 2 παράλληλες αλυσίδες (α- και β-σπεκτρίνη). Μεμονωμένες αντιπαράλληλες α- και β-αλυσίδες δημιουργούν, αρχικά, ετεροδιμερή, τα οποία εν συνεχεία οργανώνονται σε ετεροτετραμερή. Στο ένα άκρο της πρωτεΐνης υπάρχουν θέσεις για αλληλεπίδραση διμερών-τετραμερών σπεκτρίνης, αλλά και για αλληλεπίδραση με την αγκυρίνη. Από την άλλη πλευρά μπορούν να προσδεθούν διάφορες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των 4.1R, 4.2R και ακτίνης (Lux 2016). Το κέντρο κι οι γωνίες του πολυγώνου του δικτύου του κυτταροσκελετού, επομένως, αντιστοιχούν στα σύμπλοκα ζεύξης ακτίνης, δηλαδή τις οριζόντιες αλληλεπιδράσεις του κυτταροσκελετού, όπως φαίνεται στην **Εικόνα Α7** (Barbarino et al. 2021). Τα νημάτια ακτίνης στα ερυθροκύτταρα είναι κοντά και αποτελούνται από 14-16 μονομερή β-ακτίνης. Το μήκος τους υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο από την τροπομοσίνη και τα άκρα τους καλύπτονται από την τροπομοντουλίνη και την αδουσίνη (Picart et al. 2000). Η εγγενής ελαστικότητα της σπεκτρίνης εξασφαλίζει σε μεγάλο βαθμό την παραμορφωσιμότητα των ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία. Μεταλλαγές στο μόριο της συγκεκριμένης πρωτεΐνης έχει δειχθεί πως οδηγούν σε πιο εύθραυστα κύτταρα, με μειωμένη ελαστικότητα και αυξημένη επιρρέπεια σε λύση (Zhang et al. 2013).

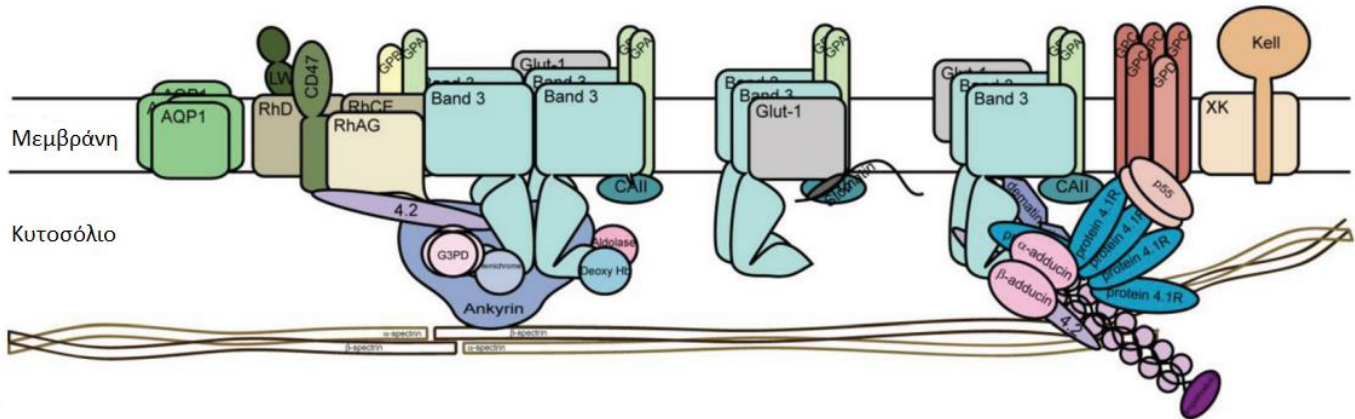


Εικόνα A7: Σχηματική αναπαράσταση του ερυθροκυτταρικού κυτταροσκελετού (B) και των οριζόντιων και κάθετων αλληλεπιδράσεων με τη μεμβράνη (C,D). (Ανατύπωση από Barbarino et al., 2021). α-SP1: α-σπεκτρίνη, β-SP1: β-σπεκτρίνη, GP: γλυκοφορίνη, Prx2: υπεροξειδοσίνη 2, GEC: γλυκολυτικά ένζυμα.

Όσον αφορά στο προαναφερθέν **σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης**, βασίζεται σε έναν πυρήνα που σχηματίζεται λόγω πλευρικών συνδέσεων της πρωτεΐνης 4.1R, της ακτίνης και της β-σπεκτρίνης (Becker et al. 1990). Υπό φυσιολογικές συνθήκες η σπεκτρίνη δεν παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με τα νημάτια ακτίνης. Αυτό το κενό συμπληρώνει η πρωτεΐνη 4.1R καθώς μπορεί να δεσμεύσει τις δύο σκελετικές πρωτεΐνες και να δημιουργηθεί ένα σύμπλοκο υψηλής συγγένειας. Το αμινοτελικό άκρο της 4.1R διαθέτει διακριτές θέσεις αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες της μεμβράνης, όπως τη γλυκοφορίνη C και τα διμερή της ζώνης 3, επιτρέποντας έτσι την κάθετη σύνδεση του κυτταροσκελετού με τη μεμβράνη (B.G. Han et al. 2000). Στο σύμπλοκο ζεύξης συμμετέχουν επιπλέον η πρωτεΐνη p55, η δεματίνη και η αδουσίνη (Mankelow et al. 2012, Lux 2016). Οι δύο τελευταίες διαθέτουν, επιπλέον, την δυνατότητα να αλληλεπιδρούν και με τον μεταφορέα γλυκόζης Glut-1 σχηματίζοντας το **σύμπλοκο του μεταφορέα γλυκόζης** (Mohandas and Gallagher 2008).

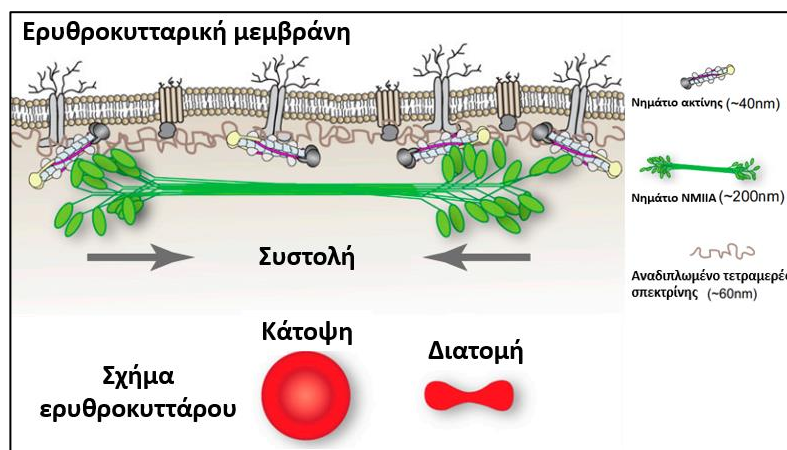
Στις κάθετες αλληλεπιδράσεις του κυτταροσκελετού με τη μεμβράνη συμβάλλει και το **σύμπλοκο ζώνης 3/αγκυρίνης**. Ο πυρήνας του συγκεκριμένου συμπλόκου αφορά σε τετραμερή της ζώνης 3, τα οποία μέσω της αμινοτελικής τους πλευράς συνδέονται με την αγκυρίνη και την πρωτεΐνη 4.2R (Mankelow et al. 2012). Η αγκυρίνη παρουσιάζει τρεις λειτουργικές περιοχές: αμινοτελικά συνδέεται με τετραμερή ζώνης 3, κεντρικά με τη σπεκτρίνη, ενώ η καρβοξυτελική της πλευρά έχει ρυθμιστικό ρόλο (Lux 2016). Αντίστοιχα, η πρωτεΐνη 4.2R φέρει θέσεις δέσμησης τόσο για την αγκυρίνη όσο και για τη σπεκτρίνη (Salomao et al. 2008). Στο σύμπλοκο αυτό επίσης συμμετέχουν διμερή γλυκοφορίνης A. Το σύμπλοκο ζώνης 3/αγκυρίνης μπορεί να επεκταθεί και να σχηματίσει το **μακροσύμπλοκο της ζώνης 3** μέσω της αλληλεπίδρασής του με το **σύμπλοκο Rhesus**. Το τελευταίο, αποτελείται από τα Rh πολυπεπίδια και τη RhAG γλυκοπρωτεΐνη (ετεροτριμερές RhAG₂Rh) που αλληλεπιδρούν

με τη CD47 και τη γλυκοφορίνη B. Η πρωτεΐνη 4.2R λειτουργεί ως συνδέτης των δύο συμπλόκων μιας και μπορεί να δεσμευτεί στη CD47. Επιπλέον, το ετεροτριμερές του συμπλόκου Rhesus έχει την ικανότητα να συνδέεται με την αγκυρίνη και εμμέσως με αυτόν τον τρόπο με τη σπεκτρίνη του κυτταροσκελετού (Van Kim et al. 2006). Όλα τα σύμπλοκα που υποβοηθούν στη διασύνδεση του κυτταροσκελετού με τη μεμβράνη παρουσιάζονται στην **Εικόνα A8**.



Εικόνα A8: Σχηματική αναπαράσταση των συμπλόκων της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Παρουσιάζονται το σύμπλοκο Rhesus, το σύμπλοκο ζώνης 3/αγκυρίνης, το μακροσύμπλοκο της ζώνης 3 και το σύμπλοκο ζεύξης (Ανατύπωση από Bruce and Gyorffy, 2019).

Όπως αναφέρθηκε, η ιδιαίτερη ελαστικότητα της σπεκτρίνης σε συνδυασμό με τις οριζόντιες και κάθετες αλληλεπιδράσεις του κυτταροσκελετού και της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου υποστηρίζουν την ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσής του. Όμως, στην ικανότητα αυτή είναι αρωγός και η μη μυϊκή μυοσίνη IIA. Τα νημάτια της συγκεκριμένης πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν με τον κυτταροσκελετό και συγκεκριμένα με τα νημάτια ακτίνης (**Εικόνα A9**). Με τη σύνδεση αυτή διατηρείται το χαρακτηριστικό σχήμα του ερυθροκυττάρου, αλλά ρυθμίζεται επιπλέον και η παραμορφωσιμότητά του (A.S. Smith et al. 2018).



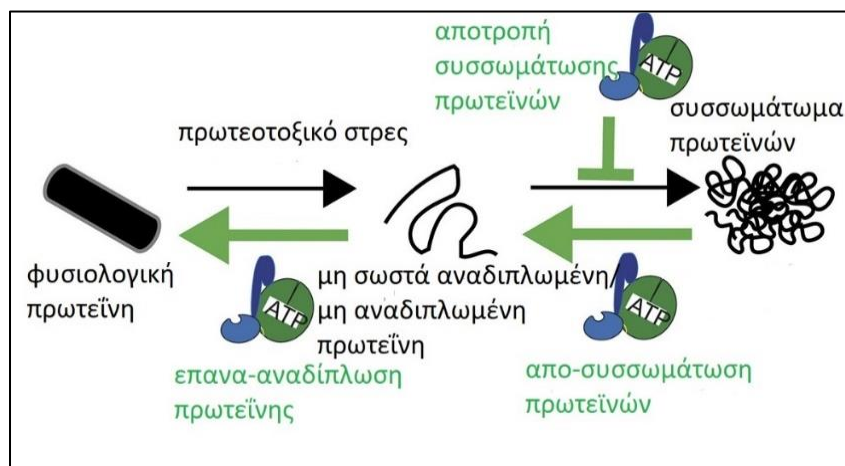
Εικόνα A9: Σχηματική αναπαράσταση της συμμετοχής των νημάτων μη μυϊκής μυοσίνης IIA στη διατήρηση του σχήματος και της ικανότητας ελαστικής παραμόρφωσης του ερυθροκυττάρου. (Ανατύπωση από Smith et al, 2018).

A.3 Πρωτεϊνικός Έλεγχος – Ομοιόσταση Ερυθροκυττάρου

Το ερυθροκύτταρο στερείται πρωτεϊνσύνθεσης, επομένως διατηρεί τη λειτουργικότητά του στην πάροδο των 120 ημερών ζωής του στην κυκλοφορία μέσω της προστασίας του πρωτεώματός του από εκτεταμένες βλάβες και της απομάκρυνσης οξειδωμένων πρωτεϊνών. Πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην πρωτεόσταση έχουν αναδειχθεί ως κύριος πυρήνας του ερυθροκυτταρικού αλληλεπιδροσώματος (interactome) αναδεικνύοντας τη ζωτική σημασία της αναδίπλωσης μη σωστά δομημένων πρωτεϊνών, της διάσπασης συσσωματωμάτων και της πρωτεόλυσης πρωτεϊνών που έχουν υποστεί εκτεταμένες βλάβες (Sae-Lee et al. 2022). Ένας ακόμη βασικός παράγοντας της ερυθροκυτταρικής ομοιόστασης είναι η απομάκρυνση μη επιδιορθώσιμων πρωτεϊνών μέσω κυστιδιοποίησης της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Leal et al. 2018).

A.3.1 Μοριακές Συνοδοί

Τα ώριμα ερυθροκύτταρα έρχονται αντιμέτωπα με διαφόρων ειδών στρες κατά την κυκλοφορία τους στον οργανισμό. Η έκθεσή τους σε υποξικές συνθήκες, συνθήκες ενεργειακής εξάντλησης, υψηλά επίπεδα οξειδωτικού φορτίου και αυξημένο ενδοκυττάριο ασβέστιο είναι ικανή να οδηγήσει σε λανθασμένη αναδίπλωση, βλάβη ή/και συσσωμάτωση πρωτεϊνών (Mathangasinghe et al. 2021). Για το λόγο αυτό διατηρούν πλήθος μοριακών συνοδών στο κυτοσόλιό τους.



Εικόνα A10: Σχηματική αναπαράσταση της δράσης του συστήματος της HSP70 στην επιδιόρθωση των πρωτεϊνών των ερυθροκυττάρων. (Ανατύπωση από Mathangasinghe et al, 2021).

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP) είναι μία σημαντική κατηγορία που κυριαρχεί στο συνοδόσωμα (chaperome) των ώριμων ερυθροκυττάρων, με το σύστημα της HSP70 να αντιστοιχεί στο 1/3 του συνόλου των μοριακών συνοδών (Mathangasinghe et al. 2021). Το σύστημα αυτό απαρτίζεται από την HSPA8, δύο JDP συνοδούς (DNAJA και DNAJB) που αναγνωρίζουν μη σωστά αναδιπλωμένες/συσσωματωμένες πρωτεΐνες, και παράγοντες τύπου Hsp110 που στηρίζουν την πρωτεϊνική αποδόμηση/επανα-αναδίπλωση των πρωτεϊνών στα ανθρώπινα κύτταρα (Rampelt et al. 2012, Mattoo et al. 2013, Nillegoda et al. 2015, Nillegoda et al. 2018). Η λειτουργία του συστήματος στα ώριμα ερυθροκύτταρα φαίνεται στην **Εικόνα A10**. Όσον αφορά στη δομή της HSP70, αποτελείται από μία υπομονάδα υπεύθυνη για τη δέσμευση του υποστρώματος και μία υπομονάδα που

δεσμεύει ATP ή ADP με σκοπό τη ρύθμιση της δράσης της (Mayer 2010). Τοπολογικά εντοπίζεται στο κυτοσόλιο, όμως σε συνθήκες έντονου στρες μεταναστεύει στη μεμβράνη όπου αλληλεπιδρά με δομικές πρωτεΐνες με σκοπό τη σταθεροποίησή τους (Gudi and Gupta 1993).

Ένα ακόμη πρωτεοστατικό σύστημα που έχει βρεθεί να κυριαρχεί στο πρωτεϊνικό δίκτυο των ερυθροκυττάρων είναι το σύμπλοκο T. Αποτελείται από 8 διακριτές υπομονάδες που σχηματίζουν έναν βαρελοειδή σχηματισμό και συμμετέχει στη σωστή αναδίπλωση (Melville et al. 2003) και την αποτροπή της συσσωμάτωσης πρωτεϊνών (Tam et al. 2006), καθώς και στη ρύθμιση της απόκρισης στο πρωτεοτοξικό στρες (Neef et al. 2010, Neef et al. 2014). Παρότι οι υπομονάδες έχουν βρεθεί στο κυτοσόλιο των ώριμων ερυθροκυττάρων και μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους, δεν είναι ακόμη αποσαφηνισμένο εάν το σύμπλοκο T είναι λειτουργικό όσον αφορά στον πρωτεϊνικό έλεγχο των συγκεκριμένων κυττάρων (Spillman et al. 2017).

Η κλαστερίνη αποτελεί είδος μοριακής συνοδού που λειτουργεί με τρόπο ανεξάρτητο του ATP. Είναι πιθανό να αλληλεπιδρά με την υδρόφοβη περιοχή μερικώς αποδιεταγμένων πρωτεϊνών και να παρεμποδίζει τη συσσωμάτωσή τους (Roos et al. 2000). Επιπλέον, έχει προταθεί πως κατά τη γήρανση του ερυθροκυττάρου η κλαστερίνη, πιθανώς μέσω της αλληλεπίδρασής της με τη ζώνη 3, τη CD59, την αιμοσφαιρίνη και καρβονυλιωμένα μεμβρανικά μόρια, συμμετέχει ενεργά στην απομάκρυνση οξειδωμένων ουσιών μέσω κυστιδιοποίησης (Antonellou et al. 2011).

A.3.2 Πρωτεολυτικά Συστήματα

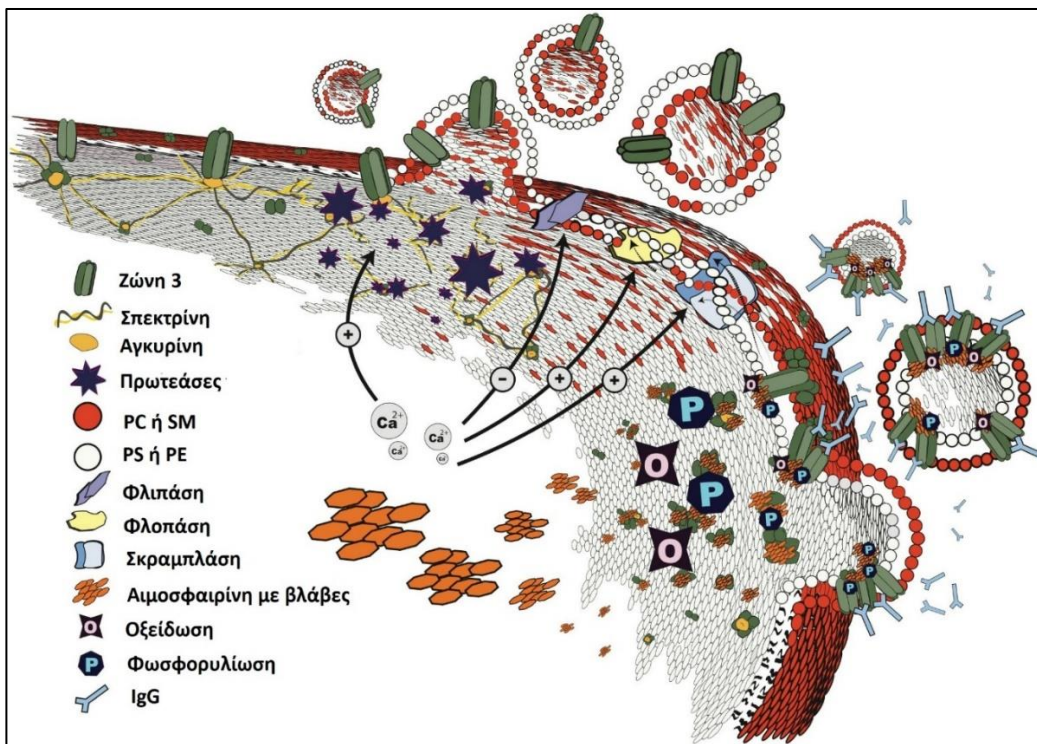
Το πρωτεάσωμα αποτελεί ένα υπερμοριακό σύμπλοκο που συμμετέχει στην αποδόμηση πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη. Τυπικά απαρτίζεται από έναν κεντρικό πυρήνα (20S) και ένα ή δύο ρυθμιστικά στοιχεία (19S) που όλα μαζί σχηματίζουν το 26S πρωτεάσωμα. Οι μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες ουβικουιτινυλιώνονται και αναγνωρίζονται από τις 19S ρυθμιστικές υπομονάδες, οι οποίες τις μεταφέρουν στο 20S πρωτεάσωμα. Το 26S πρωτεάσωμα απαιτεί τόσο ουβικουιτίνη όσο και ATP για τη λειτουργία του, τίποτα όμως από τα δύο δεν είναι προαπαιτούμενο για τη λειτουργία του 20S (Raynes et al. 2016). Στα ερυθροκύτταρα κυριαρχεί ο 20S πρωτεασωμικός πυρήνας (Neelam et al. 2011, Sae-Lee et al. 2022), του οποίου οι υπομονάδες β1, β2 και β5 επιδεικνύουν ενεργότητα τύπου κασπάσης, θρυψίνης και χυμοθρυψίνης, υδρολύοντας πεπτιδικούς δεσμούς στο καρβοξυτελικό άκρο όξινων, βασικών και υδρόφοβων καταλοίπων, αντίστοιχα (Rousseau and Bertolotti 2018). Αν ληφθεί υπόψη το υψηλό οξειδωτικό φορτίο που αντιμετωπίζουν τα ερυθροκύτταρα, η κυριαρχία του 20S είναι αναμενόμενη προσαρμογή μιας και ο πυρήνας 20S είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός στην αντιμετώπιση οξειδωμένων πρωτεϊνών (Davies and Goldberg 1987, Salo et al. 1990, Davies 2001), αλλά και ανθεκτικός σε οξειδωτικές βλάβες (Reinheckel et al. 1998, Reinheckel et al. 2000). Έχει μάλιστα δειχθεί πως σε συνθήκες οξειδωτικού στρες σε αιμοποιητικά κύτταρα η HSP70 μεσολαβεί για τον αποχωρισμό των 19S από το 26S, έτσι ώστε το 20S πρωτεάσωμα να αντιμετωπίσει τις οξειδωμένες πρωτεΐνες (Grune et al. 2011). Παρότι η

ανεξάρτητη λειτουργία του 20S βρίσκεται ακόμη υπό διερεύνηση, υπάρχουν αρκετές ενδείξεις υπέρ της (Sahu and Glickman 2021, Sahu et al. 2021).

Ένα επιπλέον πρωτεολυτικό σύστημα του ερυθροκυττάρου αποτελείται από μία οικογένεια πρωτεασών, τις καλπαΐνες, μαζί με τους αναστολείς αυτών, τις καλπαστατίνες. Το σύστημα αυτό λειτουργεί με ασβέστιο-εξαρτώμενο τρόπο (De Tullio et al. 2018). Βασική αντιπρόσωπος της ομάδας είναι η καλπαΐνη 1, ετεροδιμερές μίας υπομονάδας 28kDa και μίας 80kDa (Goll et al. 2003). Η πρώτη υπομονάδα αφορά στην καταλυτική περιοχή της καλπαΐνης-1 ενώ η δεύτερη φέρει θέση δέσμευσης ασβεστίου και είναι ρυθμιστική (Sorimachi and Suzuki 2001). Χάρη στη δράση της καλπαστατίνης διατηρείται σε ανενεργή μορφή (Dantas de Medeiros et al. 2002), όμως η αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{2+} οδηγεί στην ενεργοποίησή της (Goll et al. 2003). Ως πρωτεάση κυστεΐνης, η καλπαΐνη-1 στη συνέχεια πρωτεολύει διάφορα μόρια, όπως η Ca^{2+} -ΑΤΡάση της μεμβράνης, η αιμοσφαιρίνη αλλά και η πρωτεϊνική κινάση C. Με τον τρόπο αυτό συμμετέχει εμμέσως στη ρύθμιση της εισροής Ca^{2+} , το σχηματισμό σωματίων Heinz και τη ρύθμιση της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών, αντίστοιχα (Wieschhaus et al. 2012).

A.3.3 Κυστιδιοποίηση

Η παραγωγή εξωκυττάρων κυστιδίων (extracellular vesicles, EVs) με απευθείας αποκοπή τους από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη (**Εικόνα A11**) αποτελεί κύριο ομοιοστατικό μηχανισμό, που είναι ταυτόχρονα υπεύθυνος για την απώλεια του 20% της αιμοσφαιρίνης και της μεμβράνης κατά τη φυσιολογική *in vivo* γήρανση των ερυθροκυττάρων (Willekens et al. 2003, Willekens et al. 2008). Εντός των κυστιδίων αυτών εμπεριέχονται κατά κύριο λόγο μη αναστρέψιμα αλλοιωμένες μορφές αιμοσφαιρίνης, όπως η γλυκοζυλιωμένη (HbA_{1c} και HbA_{1e2}), αλλά και ένζυμα που συμμετέχουν στην ομοιόσταση του οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου (Willekens et al. 1997). Στη μεμβράνη των κυστιδίων βρίσκονται κυρίως η ζώνη 3 (Bosman et al. 2012) και σήματα απομάκρυνσης από την κυκλοφορία, όπως φωσφατιδυλοσερίνη και επίτοποι τροποποιημένης ζώνης 3 (Willekens et al. 2008). Η παρουσία της ζώνης 3 και η ταυτόχρονη απουσία σπεκτρίνης και αγκυρίνης υπονοούν τη θραύση του συμπλόκου ζώνης 3/αγκυρίνης, που πιθανώς οδηγεί σε χαλάρωση του κυτταροσκελετού και κυστιδιοποίηση (Sens and Gou 2007, Leal et al. 2018). Υπάρχουν, επίσης, ενδείξεις πως οι βλάβες στην αιμοσφαιρίνη πιθανώς πυροδοτούν την κυστιδιοποίηση (Leal et al. 2018). Όσον αφορά στην εκτεταμένη ύπαρξη σημάτων απομάκρυνσης, οδηγεί στην ταχύτατη εξάλειψη των κυστιδίων από την κυκλοφορία, πιθανώς ακόμα κι εντός μερικών λεπτών (Willekens et al. 2005). Έτσι τελικά το -κατά τ' άλλα λειτουργικό- ερυθροκύτταρο απομακρύνει τοξικά μόρια από το εσωτερικό του και παρατείνει την κυκλοφορία του στον οργανισμό.



Εικόνα A11: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της κυστιδιοποίησης. (Ανατύπωση από Leal et al, 2018).

A.4 Μεταβολισμός του Ερυθροκυττάρου

Τα ερυθροκύτταρα διαθέτουν ενεργό μεταβολισμό που τους επιτρέπει να παραμένουν λειτουργικά. Δεν είναι λίγες οι διαδικασίες που είναι κρίσιμες για την επιβίωσή τους και απαιτούν ενέργεια, συμπεριλαμβανομένων της διατήρησης της ασυμμετρίας της μεμβράνης, της ομαλής λειτουργίας των ιοντικών διαύλων και ενός συνόλου πρωτεοστατικών και αντιοξειδωτικών ενζυμικών μηχανισμών. Για να αποκτήσουν ενέργεια με τη μορφή ATP τα ερυθροκύτταρα βασίζονται στην αναερόβια γλυκόλυση καθώς στερούνται μιτοχονδρίων. Επιπλέον, διαθέτουν ένα ισχυρό σύστημα αντιοξειδωτικών μηχανισμών για να παραμείνουν λειτουργικά παρουσία του υψηλού οξειδωτικού φορτίου που τα χαρακτηρίζει.

A.4.1 Μεταβολισμός Γλυκόζης

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η γλυκόζη εισέρχεται στα ερυθροκύτταρα μέσω του μεταφορέα γλυκόζης Glut-1. Τα μόρια γλυκόζης καταβολίζονται μέσω δύο σημαντικών μονοπατιών: του μονοπατιού της γλυκόλυσης, γνωστού και ως Embden-Meyerhof και του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών (Εικόνα A12) (Aziz and Mohiuddin 2022, Chaudhry and Varacallo 2022). Το μονοπάτι Embden-Meyerhof καταλήγει σε πυροσταφυλικό ή γαλακτικό, παράγοντας ATP ως πηγή ενέργειας για να επιτευχθούν οι διάφορες κυτταρικές διεργασίες (Asha 2018). Επιπλέον, διευκολύνει την παραγωγή του ανηγμένου συνενζύμου NADH και του 2,3-διφωσφογλυκερικού οξέος που είναι σημαντικό για τη ρύθμιση της οξυγόνωσης της αιμοσφαιρίνης. Όσον αφορά στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών, η γλυκόζη μέσω αυτού καταβολίζεται σε ενδιάμεσους μεταβολίτες που είναι απαραίτητοι για την προστασία του κυττάρου έναντι οξειδωτικών βλαβών. Η ροή της γλυκόζης στα μονοπάτια αυτά εξαρτάται από τα επίπεδα οξυγόνου στο κύτταρο. Όταν τα ερυθροκύτταρα είναι οξυγονωμένα

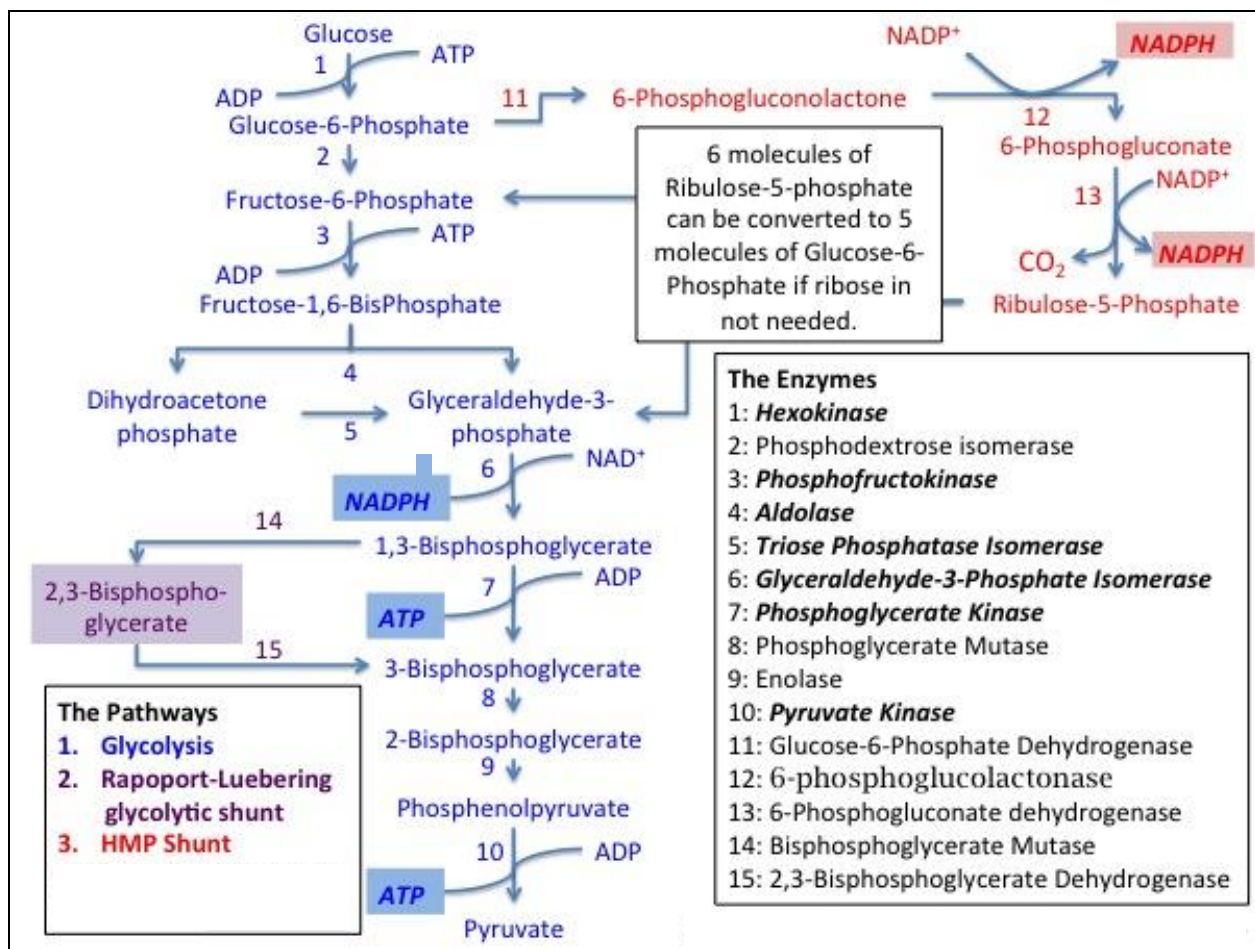
αναστέλλεται ο μεταβολισμός μέσω του Embden-Meyerhof, και επάγεται το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών για να ενισχυθεί η αντιοξειδωτική άμυνα. Αντιθέτως, όταν τα ερυθροκύτταρα δεν έχουν υψηλά επίπεδα οξυγόνου, επάγεται ο μεταβολισμός της γλυκόζης μέσω του Embden-Meyerhof για να αντισταθμιστεί η υποξία (Grace and Glader 2018, Aziz and Mohiuddin 2022).

A.4.1.1 Γλυκόλυση – Μονοπάτι Embden-Meyerhof

Το μονοπάτι της γλυκόλυσης καταβολίζει περίπου το 90% της γλυκόζης που εισέρχεται στο ερυθροκύτταρο και απαρτίζεται από δέκα ενζυμο-καταλυόμενες αντιδράσεις. Η εξοκινάση, που παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για την ενδοκυττάρια γλυκόζη, διενεργεί το αρχικό βήμα του μονοπατιού, πραγματοποιώντας μία αντίδραση φωσφορυλίωσης και οδηγώντας στη δημιουργία της 6-φωσφορικής γλυκόζης (**Εικόνα A12**). Η υψηλή συγγένεια του ενζύμου με το υπόστρωμά του εξασφαλίζει την πραγματοποίηση του μονοπατιού ακόμα κι όταν το κυτταρικό απόθεμα γλυκόζης είναι χαμηλό. Το 6^ο βήμα του μονοπατιού οδηγεί στην παραγωγή του 1,3-διφωσφογλυκερικού από τη δράση της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH). Το 1,3-διφωσφογλυκερικό μέσω των επόμενων σταδίων του μονοπατιού θα οδηγήσει στην παραγωγή 2 μορίων ATP (Yachie-Kinoshita et al. 2010, Chaudhry and Varacallo 2022). Όμως, αποκλειστικά στα ερυθροκύτταρα το 1,3-διφωσφογλυκερικό μπορεί να παρακάμψει το επόμενο βήμα της γλυκόλυσης και να εισέλθει σε μία διακλάδωση γνωστή ως μονοπάτι Rapoport-Luebering. Εκεί μετατρέπεται σε 2,3-διφωσφογλυκερικό (Rapoport and Luebering 1950). Αυτός ο μεταβολίτης μπορεί μέσω υδρόλυσης να επιστρέψει στο μονοπάτι Embden-Meyerhof. Το τελικό βήμα της γλυκόλυσης καταλύεται από την πυροσταφυλική κινάση και προκύπτει πυροσταφυλικό και ATP. Συνολικά παράγονται μέσω της γλυκόλυσης 2 μόρια ATP και 2 NADH για κάθε μόριο γλυκόζης (**Εικόνα A12**) (Chaudhry and Varacallo 2022).

A.4.1.2 Κύκλος Φωσφορικών Πεντοζών

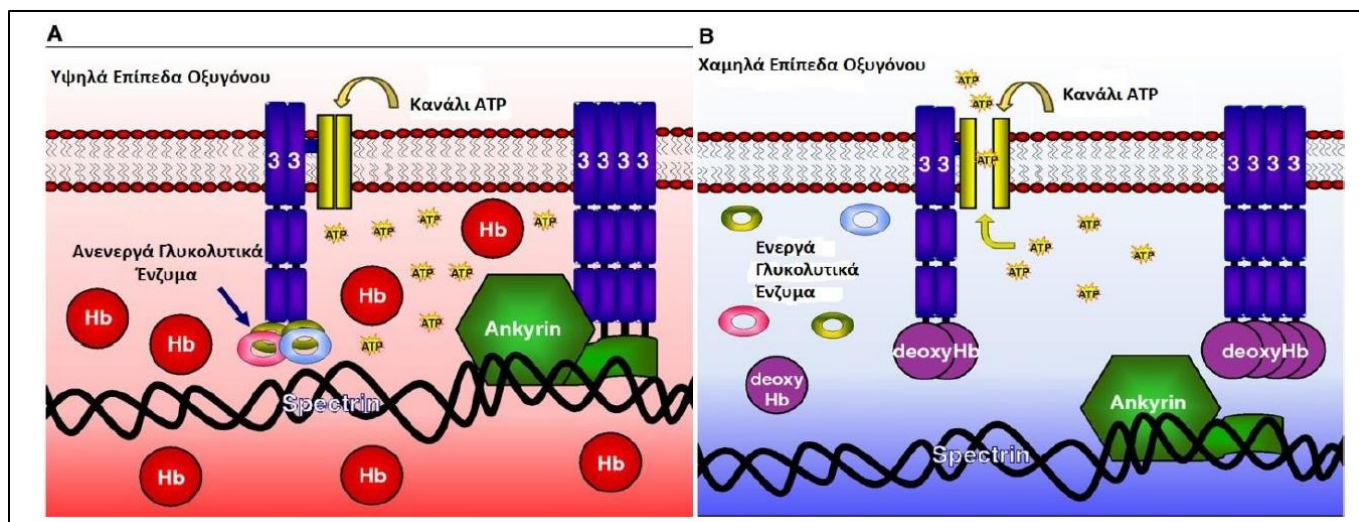
Το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών είναι παράλληλο του Embden-Meyerhof και μόνο το 10% της γλυκόζης μεταβολίζεται μέσω αυτού υπό φυσιολογικές συνθήκες (Aziz and Mohiuddin 2022). Το ερυθροκύτταρο βασίζεται στον συγκεκριμένο κύκλο για την παραγωγή του αναγωγικού NADPH (Alfarouk et al. 2020), επομένως είναι λογικό που η ροή στο συγκεκριμένο μονοπάτι αυξάνεται σε συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης. Απαρτίζεται από μία οξειδωτική φάση, κατά την οποία παράγονται 2 μόρια NADPH, και μία μη οξειδωτική φάση (**Εικόνα A12**). Το αρχικό μόριο που εισέρχεται στην οξειδωτική φάση είναι η 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία μέσω της δράσης της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) μεταβολίζεται και παράπλευρα υπάρχει αναγωγή NADP⁺ σε NADPH. Τελικά το οξειδωτικό τμήμα του μονοπατιού καταλήγει στην 5-φωσφορική ριβουλόζη και την παραγωγή ενός ακόμα μορίου NADPH (Kruger and von Schaewen 2003). Ακολουθεί η μη οξειδωτική φάση κατά την οποία μέσω μίας σειράς αντιδράσεων η 5-φωσφορική ριβουλόζη καταλήγει σε ενδιάμεσα της γλυκόλυσης και επανεισάγεται στο γλυκολυτικό μονοπάτι (**Εικόνα A12**) (Aziz and Mohiuddin 2022).



Εικόνα A12: Ο μεταβολισμός της γλυκόζης στα ερυθροκύτταρα. Παρουσιάζονται τα μονοπάτια της γλυκόλυσης, του Rapoport-Luebering και των φωσφορικών πεντοζών (Ανατύπωση από www.allaboutblood.com).

A.4.1.3 Ρύθμιση Μεταβολισμού Γλυκόζης

Η ισορροπία μεταξύ της λειτουργίας του μονοπατιού της γλυκόλυσης και του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών μπορεί να ρυθμιστεί από την κατάσταση οξυγόνωσης του κυττάρου (**Εικόνα A13**). Γλυκολυτικά ένζυμα όπως η GAPDH, η αλδολάση και η φωσφοφρουκτοκινάση μπορούν να συνδεθούν στο αμινοτελικό άκρο της Ζώνης 3 παρουσία οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης. Τα συνδεδεμένα ένζυμα είναι ανενεργά και έτσι η γλυκόζη καταβολίζεται μέσω του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών. Όταν υπάρχει μη-οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη, καθοδηγείται η ίδια στην κυτοσολική πλευρά της ζώνης 3 και ανταγωνίζεται τα γλυκολυτικά ένζυμα τα οποία και απελευθερώνονται, όντας πλέον ικανά να επιτελέσουν τις δράσεις τους (**Εικόνα A13**) (Campanella et al. 2005, Stefanovic et al. 2013). Αξίζει να αναφερθεί πως η συγγένεια της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο εξαρτάται και από την αλληλεπίδραση με το 2,3-διφωσφογλυκερικό οξύ που παράγεται από τον κύκλο Rapoport-Luebering. Το μόριο αυτό δεσμεύεται με υψηλότερη συγγένεια στην μη οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη σε σχέση με την οξυγονωμένη. Με την αλληλεπίδραση αυτή μειώνεται η συγγένεια της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο και επάγεται αλλοστερικά η απελευθέρωση του υπολειπόμενου οξυγόνου που είναι δεσμευμένο στην αιμοσφαιρίνη (Benesch and Benesch 1967).

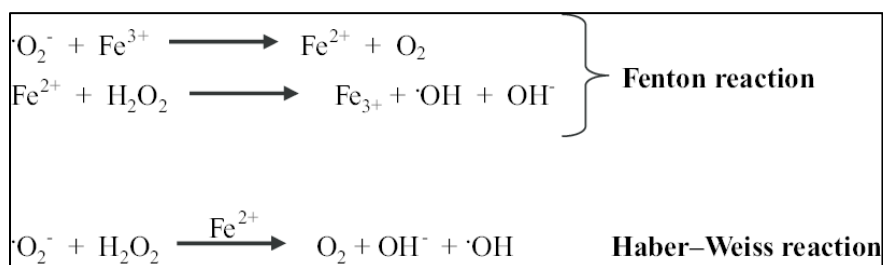


Εικόνα A13: Σχηματική αναπαράσταση της οξυγονοεξαρτώμενης ρύθμισης του καταβολισμού της γλυκόζης στα ερυθροκύτταρα (Ανατύπωση από Gibson, 2016).

A.4.2 Μεταβολισμός Οξειδωτικών Ριζών

A.4.2.1 Οξειδωτικό Στρες

Οι υψηλές συγκεντρώσεις μοριακού οξυγόνου, αίμης, αλλά και ατόμων σιδήρου στα ερυθροκύτταρα, τα καθιστούν ιδιαίτερα επιρρεπή σε διαταραχές του οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου (Kanias and Acker 2010). Συγκεκριμένα, η αυτό-οξείδωση της αιμοσφαιρίνης αποτελεί την κύρια πηγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε αυτά (Kuhn et al. 2017). Εκτός από ρίζες υπεροξειδικών ανιόντων ($O_2^{\cdot-}$), μετά την αυτό-οξείδωση της αιμοσφαιρίνης προκύπτει μεθαιμοσφαιρίνη, από το μόριο της οποίας μπορεί να απελευθερωθεί ο τρισθενής σίδηρος (Fe^{3+}) και να δράσει κι αυτός οξειδωτικά. Οι ρίζες υπεροξειδικών ανιόντων συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής από τις οποίες μπορεί να προκύψει υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Η παραγωγή του μορίου αυτού είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη καθώς μέσω των αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss (**Εικόνα A14**) οδηγεί στην παραγωγή δραστικών ριζών υδροξυλίου και οξειδωμένου σιδήρου (Bunn and Jandl 1968).



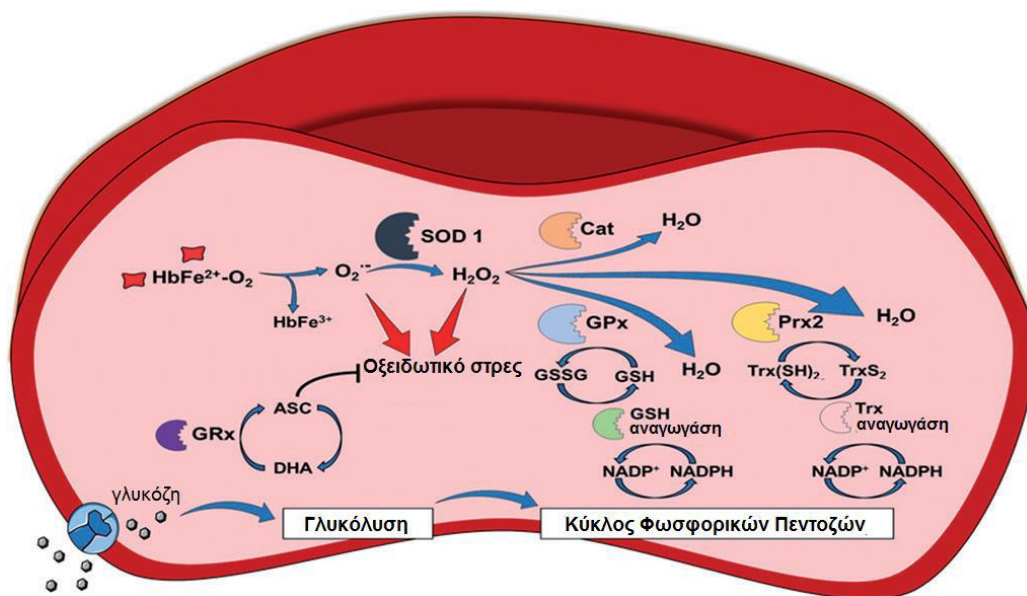
Εικόνα A14: Οι αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss (Ανατύπωση από Menkveld, 2010).

Η μεθαιμοσφαιρίνη, λόγω της οξειδωτικής της βλάβης, μπορεί να μετατραπεί σε ασταθείς δομές που ονομάζονται αιμοχρώματα. Τα αιμοχρώματα έχουν την ικανότητα να συγκεντρώνονται στην εσωτερική πλευρά της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης μέσω ομοιοπολικής δέσμησης σε δομικές πρωτεΐνες (κυρίως στη ζώνη-3), δυσχεραίνοντας την ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης του ερυθροκυττάρου. Επίσης, συμμετέχουν στην

προαγωγή της οξειδωσης συστατικών της μεμβράνης και στο σχηματισμό σημάτων εκκαθάρισης (Delobel et al. 2010, Kanias and Acker 2010). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η μεθαιμοσφαιρίνη μπορεί να ανακυκλωθεί στη λειτουργική της μορφή μέσω της αναγωγής της μεθαιμοσφαιρίνης, η οποία απαιτεί ως ηλεκτρονιοδότη το NADH. Επιπλέον, ο ελεύθερος σίδηρος μπορεί να εκκαθαριστεί από την ερυθροκυτταρική φερριτίνη, η οποία με τον τρόπο αυτό αποτρέπει την πραγματοποίηση των οξειδωτικών αντιδράσεων (Kuhn et al. 2017).

A.4.2.2 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Τα αντιοξειδωτικά συστήματα των ερυθροκυττάρων στηρίζονται τόσο σε ενζυμικά όσο και μη ενζυμικά μόρια (**Εικόνα A15**). Χαρακτηριστικές μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η γλουταθειόνη και το ασκορβικό οξύ, το οποίο προαναφέρθηκε. Η γλουταθειόνη είναι τριπεπτίδιο (κυστεΐνη – γλουταμικό οξύ – γλυκίνη) με κρίσιμη συμβολή στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση του κυττάρου. Παρουσία οξειδωτικού στρες η γλουταθειόνη οξειδώνεται και μπορεί να επαναφερθεί στην προηγούμενη κατάστασή της μέσω της δράσης της αναγωγής της γλουταθειόνης που χρησιμοποιεί ως συμπράγοντα το NADPH (Pastore et al. 2001). Η γλουταθειόνη χρησιμοποιείται από πληθώρα ενζύμων ως συμπράγοντας για να αποτρέψει την καταστροφή του κυττάρου από τη δράση των ROS. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση της γλουταθειόνης από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) για τη μετατροπή του H_2O_2 σε νερό (Pompella et al. 2003). Γενικά, το απόθεμα αναγωγικής δύναμης με τη μορφή NADH και NADPH είναι υψίστης σημασίας για την ομαλή λειτουργία πολλών αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Kuhn et al. 2017).



Εικόνα A15: Σχηματική αναπαράσταση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του ερυθροκυττάρου. Παρουσιάζονται οι κύριοι μη ενζυμικοί και ενζυμικοί μηχανισμοί που διαθέτει το ερυθροκύτταρο για να αντιμετωπίσει τις διαταραχές του οξειδοαναγωγικού του ισοζυγίου (Ανατύπωση από Kuhn et al, 2017).

Πέραν της GPx που αναφέρθηκε ήδη, τα ερυθροκύτταρα περιέχουν αρκετά αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT) και οι υπεροξειδοσίνες (Prdx) (Mohanty et al. 2014). Η SOD

βρίσκεται στην πρώτη γραμμή άμυνας έναντι του οξειδωτικού στρες, καθώς καταλύει τη μετατροπή $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 (McCord and Fridovich 1969). Από εκείνο το σημείο, παίρνει τον έλεγχο κυρίως η GPx, αλλά όταν τα επίπεδα H_2O_2 είναι υψηλά, συμμετέχει και η CAT στην εκκαθάρισή του, μετατρέποντάς το σε νερό και οξυγόνο (Cohen and Hochstein 1963). Η CAT απαρτίζεται από 4 υπομονάδες με ομάδες αίμης, καθεμία εκ των οποίων φέρει ένα μόριο NADPH (Antunes et al. 2002). Όσον αφορά στις Prdx, συνιστούν μία οικογένεια υπεροξειδασών, με κυρίαρχη στα ερυθροκύτταρα την Prdx2. Τοπολογικά απαντάται στο κυτοσόλιο και ανταγωνίζεται κι εκείνη την GPx και την CAT για την απομάκρυνση των μορίων H_2O_2 (F.M. Low et al. 2008). Σε συνθήκες ισχυρού οξειδωτικού στρες, όμως, μετατοπίζεται στη μεμβράνη (Cho et al. 2014) όπου μπορεί να προστατεύσει τα λιπίδια από οξειδωτικές βλάβες (Matte et al. 2013).

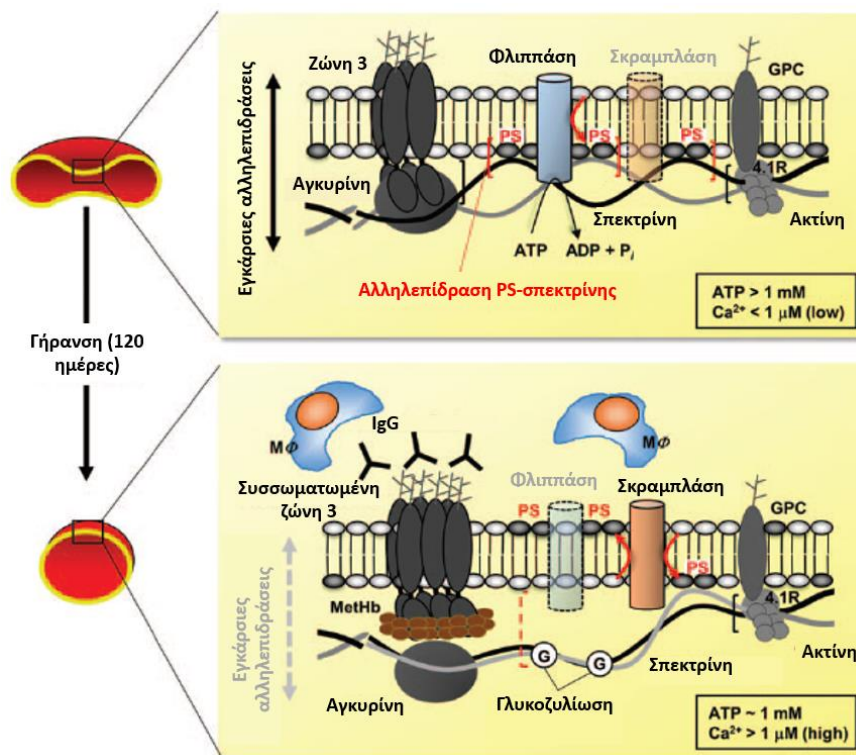
A.5 Ερυθροκυτταρική Γήρανση

Φυσιολογικά, τα ερυθροκύτταρα *in vivo* έχουν χρόνο ζωής περίπου 120 ημέρες, επομένως η ζωή και ο θάνατός τους φαίνεται πως υπόκεινται σε αυστηρή ρύθμιση. Στην πάροδο των 120 ημερών τα ερυθροκύτταρα έρχονται αντιμέτωπα με χημικό και μηχανικό στρες που προοδευτικά τους προκαλούν βλάβες. Τελικά τα πιο γηρασμένα ερυθροκύτταρα εξωτερικεύουν PS, παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα σιαλικού οξέος, χοληστερόλης και φωσfolιπιδίων (Antonelou et al. 2010a) και αλλαγές στην ενεργότητα των ενζύμων τους (D'Alessandro et al. 2013). Η γήρανση συνοδεύεται από κυστιδιοποίηση (Willekens et al. 2008), με αποτέλεσμα την απώλεια αιμοσφαιρίνης και μεμβρανικών συστατικών και τελικά τη συρρίκνωση του κυττάρου. Ακόμη κι αν οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν το χρόνο ζωής των ερυθροκυττάρων δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί, είναι ευρέως αποδεκτό πως το οξειδωτικό στρες (Lutz and Bogdanova 2013, Rifkind and Nagababu 2013) ή/και ένας καλά ρυθμισμένος μοριακός «αλγόριθμος» που ελέγχει την αλληλεπίδραση μεταξύ ερυθροκυττάρων και μακροφάγων (Arias and Arias 2017) καθοδηγούν τη διαδικασία της ερυθροκυτταρικής γήρανσης. Γενικά, τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται κατά τη διέλευσή τους από τον σπλήνα, αλλά και το ήπαρ. Ο ερυθρός πολφός του σπλήνα είναι πλούσιος σε μακροφάγα, επιτρέποντας τη στενή επαφή των τελευταίων με τα διερχόμενα ερυθροκύτταρα (Corrions et al. 2021). Μάλιστα, η ερυθροφαγοκυττάρωση των γηρασμένων ερυθροκυττάρων λαμβάνει χώρα *in vivo* αλλά όχι *in vitro* σε καλλιέργειες σπληνικών μακροφάγων, κάτι που υπονοεί πως η «αρχιτεκτονική» του σπλήνα είναι κρίσιμη για την απομάκρυνση των γηρασμένων ερυθροκυττάρων (Gottlieb et al. 2012). Στο σπλήνα αναγνωρίζονται ερυθροκύτταρα με μειωμένη ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης, καθώς και οψωνισμένα ερυθροκύτταρα (τα οποία αναγνωρίζονται και στο ήπαρ) (Eggleton et al. 2000). Το σταθερό τμήμα των IgGs αναγνωρίζεται από υποδοχείς στην επιφάνεια των μακροφάγων και τα ερυθροκύτταρα φαγοκυτταρώνονται (Mosser and Zhang 2011). Επίσης, από τα μακροφάγα αναγνωρίζονται τα διάφορα σήματα «eat-me» που εκτίθενται στην επιφάνεια των γηρασμένων ερυθροκυττάρων και θα αναφερθούν παρακάτω (de Back et al. 2014, T.R. Klei et al. 2017). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως η ασβεστιοεξαρτώμενη απομάκρυνση K^+ (Gardos effect) από τα ερυθροκύτταρα οδηγεί στη μείωση σιαλικών καταλοίπων στην επιφάνειά τους και επάγει την ενεργοποίηση μορίων προσκόλλησης (T.R.L. Klei et al. 2020b). Στον ερυθρό πολφό τα κύτταρα αυτά δεσμεύονται

στη λαμινίνη α5 μέσω των μορίων προσκόλλησης και λύνονται. Οι μεμβράνες (ghost) που προκύπτουν αναγνωρίζονται και αποδομούνται από τα μακροφάγα (T.R.L. Klei et al. 2020a).

A.5.1 Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης

Η PS, όπως προαναφέρθηκε, διατηρείται στο εσωτερικό φύλλο της λιπιδικής διπλοστιβάδας, όμως αυτή η ασυμμετρία προοδευτικά χάνεται στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα, γεγονός που αυξάνει την εξωτερίκευση PS και την αναγνώρισή της από υποδοχείς στην επιφάνεια των μακροφάγων ως σήμα προς απομάκρυνση (eat-me signal) (T.R. Klei et al. 2017). Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγηθεί αυτή η εξωτερίκευση. Η οξειδωση της PS (που αυξάνεται κατά τη γήρανση) μεταβάλλει την ικανότητά της να δρα ως υπόστρωμα για τη μεταφορά που είναι υπεύθυνη να τη μεταφέρει από το εξωτερικό στο εσωτερικό φύλλο της διπλοστιβάδας (Tyurina et al. 2000). Ταυτόχρονα, κατά τη γήρανση μειώνεται η ενεργότητα της φλιπάσης και αυξάνεται το ενδοκυττάριο ασβέστιο που ενεργοποιεί τη σκραμπλάση (Franco et al. 2013, Arashiki and Takakuwa 2017). Επιπλέον, η PS αλληλεπιδρά με τη σπεκτρίνη του κυτταροσκελετού (Kunzelmann-Marche et al. 2001), όμως λόγω της διαταραχής των συνδέσεων μεμβράνης-σκελετού κατά τη γήρανση (και συγκεκριμένα την εμφάνιση του νέο-αντιγόνου γήρανσης της ζώνης 3 που θα αναφερθεί στη συνέχεια), μπορεί να διαταραχθεί και η ασυμμετρία των φωσfolιπιδίων της μεμβράνης (Koshkaryev et al. 2020). Στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα εντοπίζεται, επίσης, ενεργή κασπάση-3, η οποία *in vitro* έχει δειχθεί να οδηγεί μέσω της δράσης της σε εξωτερίκευση PS. Οι παραπάνω μεταβολές παρουσιάζονται σχηματικά στην **Εικόνα A16**.

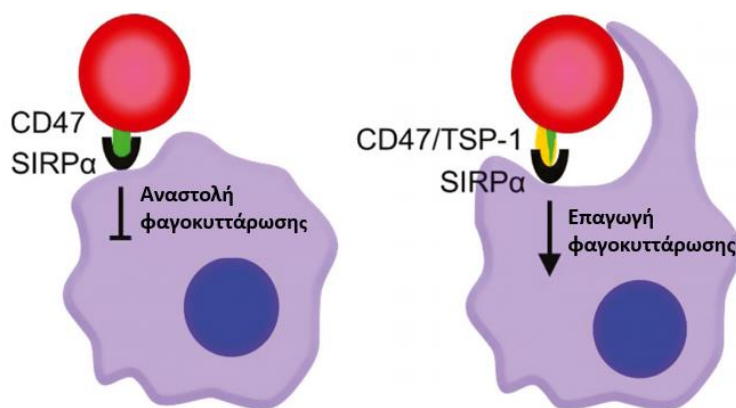


Εικόνα A16: Οι μεταβολές στις μεμβρανικές δομές, το ενεργειακό απόθεμα και την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου ερυθροκυττάρων κατά τη γήρανση που μπορεί να οδηγήσουν σε εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης (Ανατύπωση από Arashiki and Takakuwa, 2017).

Παρά τα παραπάνω δεδομένα, αξίζει να αναφερθεί πως επικρατεί μία ασυμφωνία όσον αφορά στην εξωτερίκευση ή όχι PS κατά την *in vivo* γήρανση. Η ασυμφωνία αυτή έγκειται στο γεγονός ότι η PS είναι ιδιαίτερα θρομβογόνος ώστε να εκτίθεται στα κυκλοφορούντα ερυθροκύτταρα (Antonelou et al. 2010a), και στο ότι ενώ ορισμένες ομάδες έχουν βρει αυξημένη προσκόλληση γηρασμένων ερυθροκυττάρων σε αννεξίνη V (Boas et al. 1998), άλλες δεν έχουν βρει διαφορά σε σύγκριση με τα νεαρά κύτταρα (Wesseling et al. 2016). Μία εξήγηση όσον αφορά στη συγκεκριμένη παρατήρηση είναι πως τα ερυθροκύτταρα που εκφράζουν επιφανειακή PS απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω των μακροφάγων σε ένα ρυθμό που καθιστά αδύνατη την ανίχνευσή τους (Dasgupta et al. 2008, Thiagarajan et al. 2021)

A.5.2 Σηματοδότηση μέσω της πρωτεΐνης CD47

Η αντι-φαγοκυτταρική δράση της CD47 (don't-eat-me signal) είναι υψηλότερη κατά την γέννηση των ερυθροκυττάρων. Η προοδευτική ελάττωση της παρουσίας της στη μεμβράνη (Oldenborg et al. 2000) ή μορφολογικές μεταβολές στη δομή της μειώνουν την αποτελεσματικότητά της ως αναστολέα της φαγοκυττάρωσης καθώς γερνάει το κύτταρο. Η CD47 ασκεί την ανασταλτική της δράση μέσω δέσμησης στον υποδοχέα SIRPα των μακροφάγων, επάγοντας ανασταλτική σηματοδότηση. Όμως, κατά τη γήρανση πραγματοποιούνται στερεοδομικές αλλοιώσεις στη CD47, πάνω στην οποία δεσμεύεται η θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1) δημιουργώντας μία καινούρια θέση αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα SIRPα. Η νέα αυτή δέσμευση, αντίθετα με την προηγούμενη, πυροδοτεί καταρροϊκή σηματοδότηση υπέρ της απομάκρυνσης του ερυθροκυττάρου, όπως παρουσιάζεται σχηματικά στην **Εικόνα A17** (Burger et al. 2012).

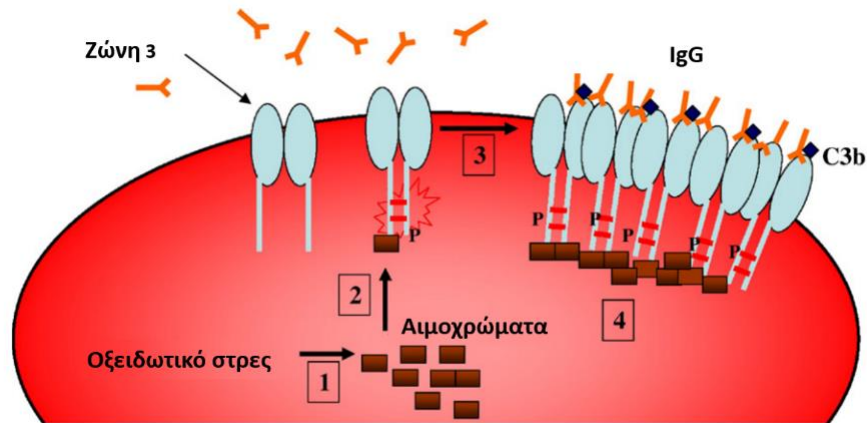


Εικόνα A17: Ο ρόλος της CD47 ως μοριακός διακόπτης της φαγοκυττάρωσης του ερυθροκυττάρου. (Ανατύπωση από van Bruggen, 2013).

A.5.3 Το μονοπάτι της Ζώνης 3

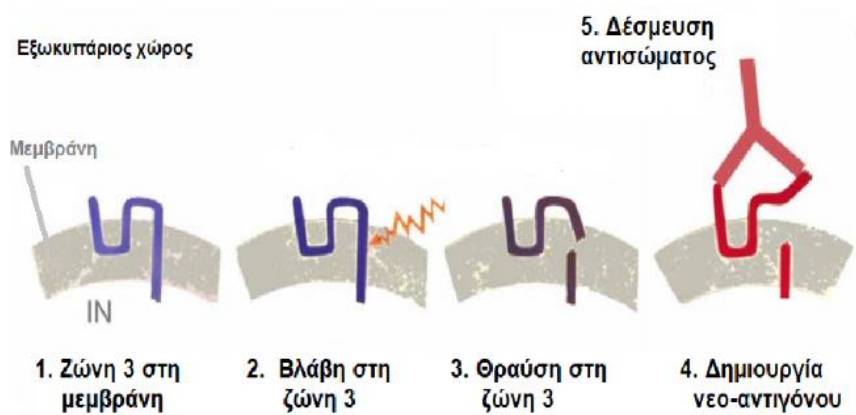
Ένα από τα συχνότερα ευρήματα που απαντώνται στις μεμβράνες των γηρασμένων ερυθροκυττάρων είναι οι τροποποιήσεις στη Ζώνη 3. Μάλιστα, έχουν βρεθεί φυσικά αυτό-αντισώματα που συμμετέχουν στη διαδικασία της αναγνώρισης των γηρασμένων ερυθροκυττάρων από μακροφάγα, τα οποία αναγνωρίζουν ολιγομερή της Ζώνης 3 (Lutz et al. 1984). Το πώς σχηματίζεται το νεοαντιγόνο γήρανσης της Ζώνης 3 και καθίσταται εφικτή αυτή η αλληλεπίδραση με τα IgG –πιθανώς και με παράγοντες του συμπληρώματος– δεν έχει

πλήρως διαλευκανθεί, αλλά υπάρχουν ορισμένες υποθέσεις. Η οξειδωτική αποδόμηση της αιμοσφαιρίνης κατά τη γήρανση οδηγεί στη δημιουργία αιμοχρωμάτων τα οποία συσσωρεύονται στο κυτοσόλιο, συν-πολυμερίζονται με την κυτταροπλασματική πλευρά της Ζώνης 3 και δημιουργούν ένα μη διαλυτό μακρομοριακό συσσωμάτωμα. Η συσσωμάτωση της Ζώνης 3 λόγω των αιμοχρωμάτων θεωρείται πως εκθέτει νέο-αντιγόνα γήρανσης που αναγνωρίζονται από αντισώματα και τελικά το κύτταρο απομακρύνεται από μακροφάγα (P.S. Low et al. 1985, Pantaleo et al. 2008). Αυτή η θεωρία παρουσιάζεται σχηματικά στην **Εικόνα A18**.



Εικόνα A18: Ο ρόλος των αιμοχρωμάτων στη δημιουργία του νέο-αντιγόνου γήρανσης της Ζώνης 3. (Ανατύπωση από Pantaleo et al, 2008).

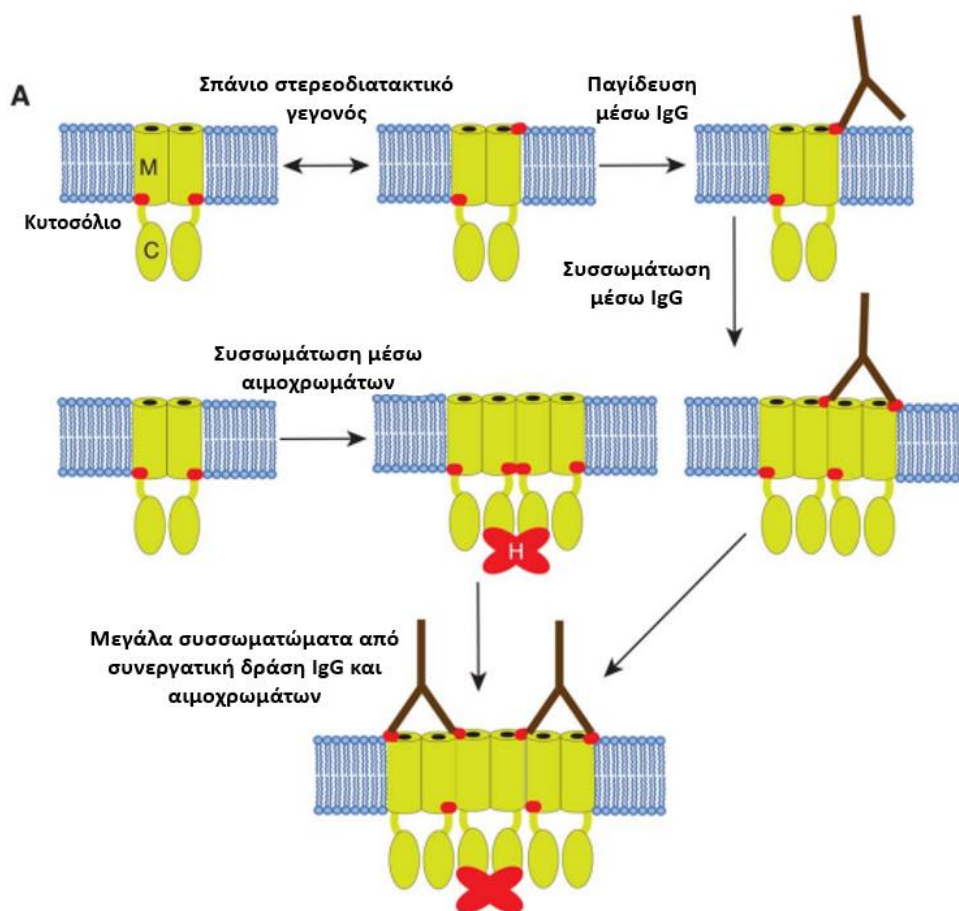
Μια άλλη θεωρία αφορά στη θραύση της Ζώνης 3, η οποία προκαλεί στερεοδιαταξικές αλλαγές που τελικά σχηματίζουν το νέο-αντιγόνο γήρανσης. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της πρωτεόλυσης λόγω κάποιου οξειδωτικού συμβάντος, έρχονται στην επιφάνεια «κρυμμένες» αντιγονικές περιοχές της Ζώνης 3, αναγνωρίσιμες από αντισώματα (Bosman 2013), όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα A19**.



Εικόνα A19: Η δημιουργία του νέο-αντιγόνου γήρανσης της Ζώνης 3 μέσω θραύσης της πρωτεΐνης. (Ανατύπωση από Bosman, 2013).

Πιο πρόσφατα, μετά την κρυσταλλογράφηση της Ζώνης 3 και την ανακάλυψη της δομής της (Hatae et al. 2018) προτάθηκε ένας συνδυασμός των δύο παραπάνω υποθέσεων (**Εικόνα A20**). Σύμφωνα με το συγκεκριμένο

μοντέλο, η Ζώνη 3 αποτελεί «μοριακό ρολόι» της ερυθροκυτταρικής γήρανσης. Κατά τη φυσιολογική της λειτουργία ως ανιοντοανταλλάκτης, η Ζώνη 3 υφίσταται ταχύτατες στερεοδιαμορφωτικές αλλαγές στη λιπιδική διπλοστιβάδα. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει μια περιοχή στην πρωτεΐνη που βρίσκεται κατά κύριο λόγο στο κυτοσόλιο, αλλά μπορεί σπανιότερα να βρεθεί και εξωκυττάρια. Αν δεν επιστρέψουν αυτά τα αμινοξέα στο κυτοσόλιο μετά την εξωτερίκευσή τους, δημιουργούν μία αντιγονική θέση που αναγνωρίζεται από αυτο-αντισώματα. Στον εξωκυττάριο χώρο, τα αντισώματα με τη δέσμευσή τους θα «παγιδεύσουν» τη Ζώνη 3 στη συγκεκριμένη στερεοδιαμόρφωση, και μπορούν να φέρουν εγγύτερα μεταξύ τους διαφορετικά μόρια της Ζώνης 3 ολιγομερίζοντάς τα. Από την άλλη, η διαδικασία ενισχύεται στο κυτοσόλιο με τη δέσμευση αιμοχρωμάτων στη Ζώνη 3 και την επικείμενη προαγωγή της συσσωμάτωσής της. Όταν τα συσσωματώματα Ζώνης 3 υπερβούν ένα όριο μεγέθους και μία ουδό οψωνισμού, μακροφάγα μπορούν να αναγνωρίσουν τα ερυθροκύτταρα και να τα απορρίψουν από την κυκλοφορία (Badior and Casey 2018).



Εικόνα A20: Η Ζώνη 3 ως το «μοριακό ρολόι» της ερυθροκυτταρικής γήρανσης. (Ανατύπωση από Badior & Casey, 2018).

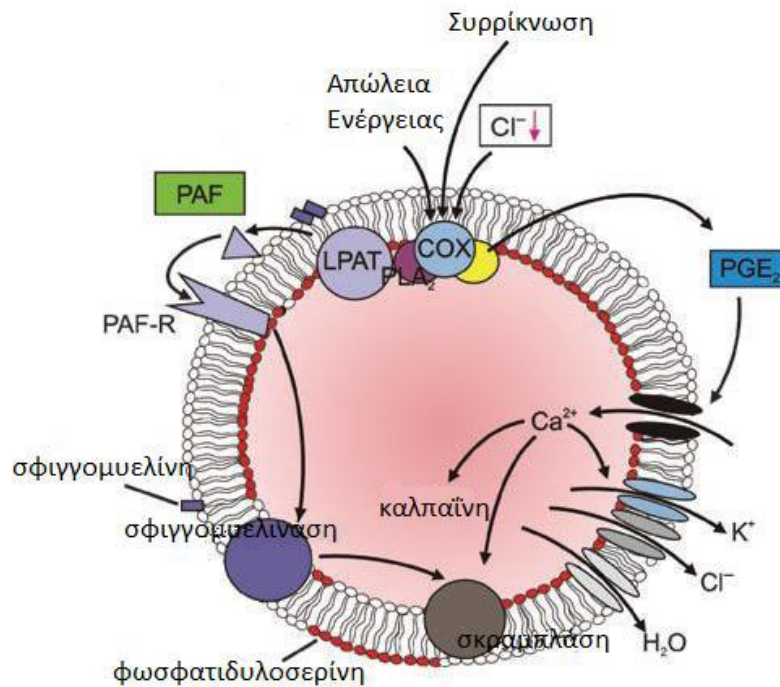
A.6 Ερυθρόπωση

Στην προηγούμενη ενότητα αναλύθηκε η απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων μέσω της διαδικασίας της γήρανσης. Όμως, υπάρχουν καταστάσεις που μπορούν να πυροδοτήσουν την πρόωρη απομάκρυνση ερυθροκυττάρων, μέσω ενός τύπου προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που απαντάται αποκλειστικά στα

ερυθροκύτταρα και καλείται ερυθρόπτωση. Η ερυθρόπτωση είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς οδηγεί στην αποφυγή της αιμόλυσης (K.S. Lang et al. 2005). Σε αντίθεση με την κλασική αιμόλυση, που οδηγεί στην καταστροφή της πλασματικής μεμβράνης και την επικείμενη απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης, στα ερυθροπρωτικά κύτταρα η μεμβράνη παραμένει άθικτη (Dreischer et al. 2022).

Βασικό ερέθισμα για την επαγωγή της ερυθρόπτωσης είναι η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου που πυροδοτεί τα ορόσημα της ερυθρόπτωσης, δηλαδή την εξωτερίκευση PS και τη συρρίκνωση του κυττάρου (Foller et al. 2009). Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι πολύ χαμηλότερη της αντίστοιχης του πλάσματος (Bogdanova et al. 2013). Η είσοδος Ca^{2+} στα ερυθροκύτταρα γίνεται μέσω καναλιών που ρυθμίζονται/ενεργοποιούνται από πλήθος παραγόντων, όπως τη συγκέντρωση ιόντων χλωρίου (Cl^-), το οξειδωτικό στρες (Duranton et al. 2002), το υπεροσμωτικό σοκ (K.S. Lang et al. 2003), την προσταγλανδίνη E_2 (P.A. Lang et al. 2005), και την πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Η ισοσμωτική αντικατάσταση των εξωκυττάριων Cl^- με γλυκονικό ή ανιόντα βρωμίου ή ιωδίου (Duranton et al. 2002), και το υπεροσμωτικό σοκ επάγουν τη σύνθεση της προσταγλανδίνης E_2 στα ερυθροκύτταρα, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την εισροή Ca^{2+} μέσω των καναλιών κατιόντων (P.A. Lang et al. 2005). Τα αυξανόμενα επίπεδα ενδοκυττάριου ασβεστίου επάγουν την απομάκρυνση K^+ από τα κανάλια Gardos και το κύτταρο αφυδατώνεται και συρρικνώνεται (Cahalan et al. 2015). Επιπλέον, επάγεται η λειτουργία της σκραμπλάσης και εξωτερικεύεται PS, καθώς και της καλπαΐνης που πρωτεολύει πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (P.A. Lang et al. 2005). Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες ενότητες, τα ερυθροκύτταρα υπόκεινται συνεχώς σε οξειδωτικό στρες. Παρά την ύπαρξη ισχυρών αντιοξειδωτικών μηχανισμών, οι ενδοκυττάρια ROS μπορούν να πυροδοτήσουν την ερυθρόπτωση *in vivo*, ειδικά σε ορισμένες κλινικές συνθήκες (F. Lang et al. 2014). Τα κανάλια που επιτρέπουν την είσοδο Ca^{2+} στα ερυθροκύτταρα, καθώς και τα κανάλια που μεταφέρουν ιόντα Cl^- και συμβάλλουν στη συρρίκνωση του κυττάρου (Huber et al. 2002), ενεργοποιούνται από τις ROS (Duranton et al. 2002). Επιπροσθέτως, η εξάντληση ενέργειας μπορεί να ενεργοποιήσει την PKC (Klarl et al. 2006), η οποία με τη σειρά της οδηγεί στο «άνοιγμα» των καναλιών Ca^{2+} , και εν συνεχεία στην αναδιάταξη των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης και τη συρρίκνωση του ερυθροκυττάρου (de Jong et al. 2002).

Το κεραμίδιο είναι επίσης κύριος κυτταρικός προωθητής της ερυθρόπτωσης (K.S. Lang et al. 2004). Αποτελεί προϊόν υδρόλυσης της σφίγγομυελίνης (Zeidan and Hannun 2010) και δίνει έναυσμα για ερυθρόπτωση ευαισθητοποιώντας το κύτταρο στα Ca^{2+} , χωρίς όμως να επάγει την εισροή τους. Επίσης, το υπεροσμωτικό σοκ επάγει τη δημιουργία κεραμιδίου μέσω δράσης της σφίγγομυελινάσης, γεγονός που εξηγεί πώς το συγκεκριμένο σοκ μπορεί να οδηγήσει σε ερυθρόπτωση ακόμα και απουσία εξωκυττάριου ασβεστίου (K.S. Lang et al. 2004). Επιπλέον, μελέτες έδειξαν πως η παραγωγή κεραμιδίου ρυθμίζεται από τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων PAF, ο οποίος μετά τη δέσμευσή του στον υποδοχέα του στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη ενεργοποιεί τη σφίγγομυελινάση, αυξάνοντας τελικά τα ενδοκυττάρια επίπεδα κεραμιδίου (P.A. Lang et al. 2005). Οι κύριοι μηχανισμοί της ερυθρόπτωσης παρουσιάζονται σχηματικά στην **Εικόνα A21**.



Εικόνα A21: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της ερυθρόπτωσης. (Ανατύπωση από Lang et al, 2006).

Τα ερυθροκύτταρα που υπόκεινται σε ερυθρόπτωση πιθανώς απομακρύνονται μέσω του σπλήνα, αλλά αντί να συμμετέχει ο ερυθρός πολφός που αναφέρθηκε προηγουμένως κύριο ρόλο έχουν τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα της οριακής ζώνης. Συγκεκριμένα, τα δενδριτικά που φέρουν CD207 και CD8 αναγνωρίζουν αποτελεσματικότερα τα ερυθροκύτταρα που αποπίπτουν και ταυτόχρονα δεν υπάρχει αναστολή μέσω του CD47 (Qadri et al. 2017).

A.7 Αποθήκευση και Αποθηκευτική Βλάβη Ερυθροκυττάρων

Τα ερυθροκύτταρα αποτελούν το πιο συχνά μεταγγιζόμενο παράγωγο αίματος, επομένως η βέλτιστη αποθήκευση μετά τη συλλογή τους είναι ιδιαίτερα κρίσιμη. Τόσο οι συνθήκες αποθήκευσης όσο και τα επιμέρους χαρακτηριστικά του αιμοδότη φαίνεται πως επιδρούν στην αποθηκευτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων.

A.7.1 Συνθήκες Αποθήκευσης

Για να παραχθούν οι μονάδες συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων, μετά την αιμοληψία ακολουθεί φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση του πλάσματος, ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις πραγματοποιείται και λευκαφαίρεση. Στην Ελλάδα η αποθήκευση γίνεται σε διαλύματα συντήρησης με κιτρικά, φωσφορικά, δεξτρόζη και αδενίνη (CPDA-1) για 35 ημέρες, διάρκεια η οποία επεκτείνεται κατά μία εβδομάδα με την προσθήκη του προσθετικού διαλύματος SAGM το οποίο περιέχει επιπλέον αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα, γλυκόζη και μαννιτόλη. Τα κιτρικά παίζουν αντιπηκτικό ρόλο, καθώς μετά τη συμπλοκοποίηση τους με ιόντα ασβεστίου προκύπτει άλας κιτρικού οξέος εμποδίζοντας τον καταρράκτη πήξης του αίματος. Οι υδατάνθρακες εμπεριέχονται στο διάλυμα για να μεταβολιστούν από τα κύτταρα (Knight 2013), ενώ η αδενίνη και τα φωσφορικά ως

ενεργειακά αποθέματα (Hess 2006). Τέλος, η μαννιτόλη, χάρη στην αντιοξειδωτική και σταθεροποιητική της δράση στην κυτταρική μεμβράνη, είναι το μόριο που ευθύνεται για την βέλτιστη αποθήκευση στο διάλυμα CPD/SAGM (D'Amici et al. 2012).

A.7.2 Αποθηκευτική Βλάβη

Όπως είναι λογικό, όταν τα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται από το φυσικό τους περιβάλλον και αποθηκεύονται *ex vivo* σε ένα κλειστό σύστημα, επηρεάζεται ο μεταβολισμός τους και η φυσιολογία τους (Tissot et al. 2017). Βρίσκονται σε θερμοκρασία πολύ χαμηλότερη αυτής του σώματος, εξαντλείται το απόθεμα ενέργειάς τους και «ζουν» στον ίδιο χώρο με τα απόβλητά τους, χωρίς να υπάρχουν οι προστατευτικοί μηχανισμοί που λειτουργούν στην κυκλοφορία. Επομένως, η καταπόνηση που βιώνουν είναι ιδιαίτερα έντονη. Η σταδιακή υποβάθμιση των διαφόρων λειτουργικών και δομικών παραμέτρων των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων ονομάζεται αποθηκευτική βλάβη (Yoshida et al. 2019).

Πλέον, στον επιστημονικό χώρο της μετάγγισης αίματος επικρατεί η άποψη πως η ανάπτυξη του φαινοτύπου της αποθηκευτικής βλάβης οφείλεται τόσο στην απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων από το φυσιολογικό τους περιβάλλον, η οποία προαναφέρθηκε, όσο και στην παρουσία οξυγόνου που οδηγεί σε εμφάνιση οξειδωτικού στρες, το οποίο εντείνεται με την ταυτόχρονη απώλεια των βιοχημικών αντιμέτρων που ήταν λειτουργικά *in vivo*. Βασική αντίδραση που οδηγεί στην εκδήλωση οξειδωτικού στρες αποτελεί η οξείδωση του σιδήρου της αίμης της αιμοσφαιρίνης. *In vivo* η μεθαιμοσφαιρίνη που προκύπτει ανάγεται σε αιμοσφαιρίνη, όμως τα ένζυμα που κατέχουν τον συγκεκριμένο ρόλο έχουν περιορισμένη δράση στους 4 °C. Τελικά συσσωρεύεται ελεύθερη αίμη στις μονάδες μετάγγισης, το άτομο σιδήρου της οποίας, μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss και Fenton, οδηγεί στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου. Εν συνεχεία, οι ιδιαίτερα δραστικές ρίζες οξυγόνου μπορούν να πυροδοτήσουν έναν καταρράκτη αντιστρεπτών και μη αντιστρεπτών οξειδώσεων σε δομικές (D'Alessandro et al. 2012) και λειτουργικές πρωτεΐνες (Wither et al. 2016), συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων, δυσχεραίνοντας τον ενεργειακό μεταβολισμό (Tavazzi et al. 2001).

A.7.2.1 Αλλοιώσεις στη Μεμβράνη

Η οξειδωμένη αιμοσφαιρίνη, μαζί με άλλες οξειδωμένες κυτοσολικές πρωτεΐνες, προσκολλώνται στον κυτταροσκελετό και τη μεμβράνη και δυσχεραίνουν την ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης του κυττάρου. Μία αισθητή επιδείνωση της παραμορφωσιμότητας των συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων ξεκινά περίπου στο τέλος της δεύτερης εβδομάδας αποθήκευσης (Barshtein et al. 2021). Η παρατηρούμενη αυξανόμενη δέσμευση της αιμοσφαιρίνης στη μεμβράνη, δεν διαταράσσει μόνο τις συνδέσεις μεμβράνης-κυτταροσκελετού (Rettig et al. 1999), αλλά επάγει τοπικές οξειδωτικές βλάβες στις δομικές πρωτεΐνες (Kriebardis et al. 2006, Kriebardis et al. 2007, Delobel et al. 2012). Η συσσώρευση οξειδωτικών ριζών εντός του ερυθροκυττάρου έχει, επίσης, ως αποτέλεσμα την προοδευτική εμφάνιση δεικτών οξειδωτικού στρες στο λιπιδίωμα της μεμβράνης, με τη μορφή κυρίως μαλονδιαλδεΐδης (MDA) (Dumaswala et al. 1999). Βασική και κρίσιμη μεταβολή στο ερυθροκυτταρικό

λιπιδίωμα κατά την αποθήκευση αποτελεί και η αναδιοργάνωση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, με αποτέλεσμα την εξωτερίκευση PS (Kiefer and Snyder 2000).

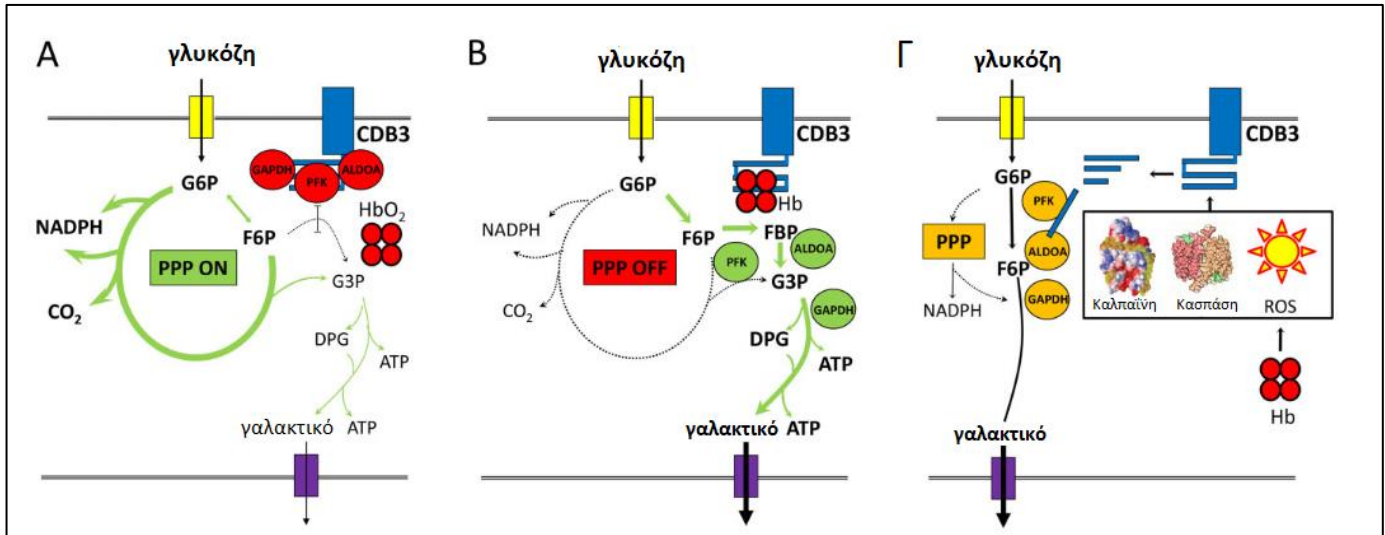
Κατά την αποθήκευση, το ερυθροκύτταρο για να ανταπεξέλθει στην αυξανόμενη συγκέντρωση οξειδωμένων πρωτεϊνών κυστιδιοποιείται (Bardyn et al. 2017) για να απομακρύνει επιβλαβή μόρια, θυσιάζοντας όμως έτσι μεγάλο τμήμα της μεμβράνης του (Antonelou and Seghatchian 2016). Αυτή η απώλεια μεμβράνης εντείνει επιπλέον τη διαταραχή της ικανότητας ελαστικής παραμόρφωσης του κυττάρου (McVey et al. 2020) και τη δημιουργία μορφών ερυθροκυττάρων επιρρεπέστερων σε λύση (Safeukui et al. 2012). Έχει δειχθεί πως στο μέσο της αποθηκευτικής περιόδου, το αρχικά δισκοειδές ερυθροκύτταρο μετατρέπεται σε πιο άκαμπτες μορφές, επιρρεπείς σε λύση (Melzak et al. 2021), ενώ περίπου το 1/3 του αρχικού ερυθροκυτταρικού πληθυσμού εμφανίζει ορατές σχηματικές ανωμαλίες μέχρι το τέλος της αποθήκευσης (Berezina et al. 2002, Blasi et al. 2012). Πρόσφατα παρουσιάστηκαν ενδείξεις πως η απομάκρυνση αιμοσφαιρίνης [κυρίως οξειδωμένης (Kriebardis et al. 2008)] εντός κυστιδίων βρίσκεται στην πρώτη γραμμή άμυνας των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων, όμως αναπόφευκτα δημιουργεί άκαμπτα κύτταρα που καταλήγουν σε λύση και ανεξέλεγκτη απελευθέρωση αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο (Tzounakas et al. 2022a).

A.7.2.2 Μεταβολικές Βλάβες

Η αποθήκευση των ερυθροκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτατη εξάντληση του ATP και του 2,3-διφωσφογλυκερικού οξέος, γεγονός το οποίο επηρεάζει την κινητική της δέσμευσης/απελευθέρωσης του οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη (Nemkov et al. 2016, Paglia et al. 2016). Εξαιτίας της αρνητικής επίδρασης της υποθερμίας στην ενεργότητα των ενζύμων, η απώλεια ATP είναι πολύ υψηλή προς το τέλος της αποθηκευτικής περιόδου, και θεωρείται πως όταν το συγκεκριμένο ενεργειακό μόριο εμφανίζει επίπεδα χαμηλότερα ενός κρίσιμου ορίου, τα ερυθροκύτταρα χάνουν τη δυνατότητα να μεταβολίζουν τη γλυκόζη (Zolla and D'Alessandro 2012), κάτι που επηρεάζει την ακεραιότητα και τη λειτουργικότητά τους. Όντως, η ικανότητα σύνθεσης ATP φθίνει, όσο φθίνει και το ενδοκυττάριο pH λόγω της προόδου της γλυκόλυσης σε ένα κλειστό σύστημα, και το φαινόμενο αυτό εντείνεται λόγω της εξάρτησης αντλιών ιόντων από το ATP (Sun et al. 2017).

Πιο συγκεκριμένα, κατά τις 2 πρώτες εβδομάδες της αποθήκευσης, έχει δειχθεί πως τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα μεταβολίζουν τη γλυκόζη μέσω του μονοπατιού της γλυκόλυσης, αυξάνοντας έτσι το γαλακτικό οξύ εντός της μονάδας μετάγγισης (Messana et al. 2000). Ταυτόχρονα, το 2,3-διφωσφογλυκερικό έχει επίπεδα που ευνοούν την απο-οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη, η οποία δεσμεύεται στη Ζώνη 3 ανταγωνιζόμενη τα γλυκολυτικά ένζυμα που είναι ελεύθερα να επιτελέσουν τη λειτουργία τους. Όσο συσσωρεύεται γαλακτικό οξύ, τόσο φθίνει το pH, γεγονός που αναστέλλει την πορεία της γλυκόλυσης (Zolla and D'Alessandro 2012), ενώ παράλληλα εξαντλείται και το 2,3-διφωσφογλυκερικό με αποτέλεσμα να προωθείται η δέσμευση των ενζύμων της γλυκόλυσης στη Ζώνη 3 (Issaian et al. 2021) και να μετατοπίζεται η ισορροπία προς τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών. Μέσω του κύκλου αυτού, παράγεται NADPH, που όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως αποτελεί σημαντικό απόθεμα αναγωγικής δύναμης για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. Ο

ολιγομερισμός του κυτοσολικού άκρου της Ζώνης 3 επηρεάζει τη λειτουργία του ως «ρυθμιστής» του μεταβολισμού, και αυτό το φαινόμενο εντείνεται στα υψηλά επίπεδα ROS που παράγονται κατά την αποθήκευση. Επιπλέον, η θραύση του ρυθμιστικού αυτού άκρου (είτε λόγω οξείδωσης, είτε μέσω ενζύμου) δυσχεραίνει περεταίρω τη μεταβολική ρύθμιση (Rinalducci et al. 2012, D'Alessandro et al. 2015). Ο ρυθμιστικός ρόλος της κυτταροπλασματικής πλευράς της Ζώνης 3 στο μεταβολισμό και η επίδραση της αποθήκευσης παρουσιάζονται στην **Εικόνα A22**.



Εικόνα A22: Σχηματική αναπαράσταση της κυτοσολικής πλευράς της Ζώνης 3 (CDB3) ως «διακόπτη» του μεταβολισμού της γλυκόζης μέσω της γλυκόλυσης και του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών (PPP). (Α) Οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη και δέσμευση γλυκολυτικών ενζύμων στη Ζώνη 3. (Β) Από-οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη δεσμεύεται στη Ζώνη 3 και απελευθερώνονται τα γλυκολυτικά ένζυμα. (Γ) Θραύση της CDB3 και απώλεια οξυγόνο-εξαρτώμενης ρύθμισης του μεταβολισμού. GAPDH: αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης, PFK: φωσφοφρουκτοκινάση, ALDOA: αλδολάση. (Ανατύπωση από D'Alessandro et al, 2015).

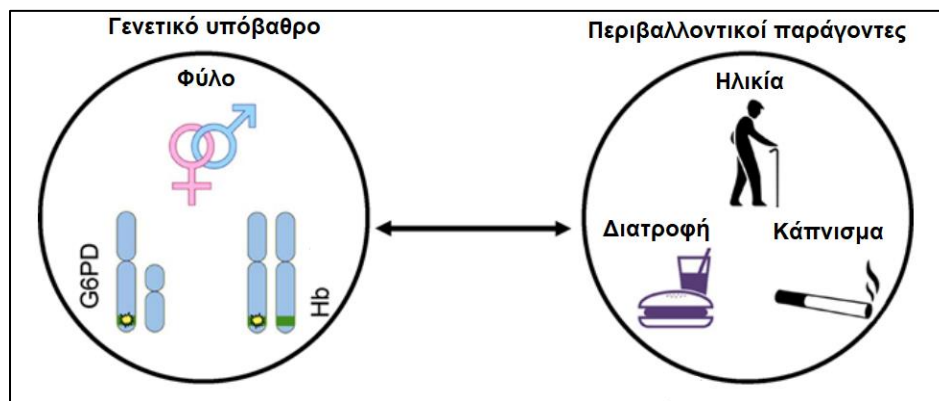
Συγκεκριμένα για τα ερυθροκύτταρα που αποθηκεύονται σε CPD-SAGM, όπως ισχύει στην παρούσα Διατριβή, έχει προταθεί ένας μεταβολικός επαναπρογραμματισμός τριών σταδίων (Bordbar et al. 2016). Μεταξύ των τριών σταδίων υπάρχει σταθερή πτώση στο μονοπάτι της γλυκόλυσης και το οξειδωτικό τμήμα του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών. Από την άλλη, το μη οξειδωτικό μέρος του κύκλου λειτουργεί φυσιολογικά στο πρώτο στάδιο, αντιστρέφεται στο δεύτερο προσδίδοντας γλυκολυτικά ενδιάμεσα στον μεταβολισμό του AMP, και επιστρέφει στην φυσιολογική του λειτουργία στο τρίτο στάδιο, προσδίδοντας φωσφορικές ριβόζες στη γλυκόλυση. Όσον αφορά στο μεταβολισμό της γλουταθειόνης, φαίνεται αυτό το πολύτιμο αντιοξειδωτικό να συντίθεται μόνο στο πρώτο στάδιο (Bordbar et al. 2016). Μάλιστα, έχουν προταθεί εξωκυττάριοι βιοδείκτες, όπως η γλυκόζη, η υποξανθίνη και το γαλακτικό οξύ, οι οποίοι μπορούν να διακρίνουν τις 3 αυτές μεταβολικές φάσεις (Paglia et al. 2016).

Αξίζει να αναφερθεί πως τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα δεν είναι ικανά να μεταβολίζουν μόνο γλυκόζη. Πειράματα σήμανσης του κιτρικού που συμπεριλαμβάνεται στο διάλυμα συντήρησης έδειξαν πως αυτό

μεταβολίζεται σε μηλικό και γαλακτικό μέσω κυτοσολικών ισομορφών ενζύμων του (μη-κανονικού) κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (Krebs). Τα ένζυμα αυτά καταλύουν αντιδράσεις που συμμετέχουν στην ανακύκλωση αναγωγικών μορίων (NADH, NADPH), επομένως μπορεί να υπάρχει ένας μη χαρακτηρισμένος ρόλος του μεταβολισμού των καρβοξυλικών οξέων στα ερυθροκύτταρα για τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (D'Alessandro et al. 2017).

A.8 Τα Χαρακτηριστικά του Αιμοδότη και ο Ρόλος τους στην Αποθηκευτική Ικανότητα και τη Μετα-μεταγγισιακή Απόκριση των Ερυθροκυττάρων

Η αποσαφήνιση των αιτιών που οδηγούν στο φαινόμενο της αποθηκευτικής βλάβης, αποτελεί βασικό ερώτημα της ερευνητικής κοινότητας της μετάγγισης. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει πως ο χρόνος αποθήκευσης (Kamel et al. 2010, Koch et al. 2013), η στρατηγική που χρησιμοποιείται, όπως το διάλυμα συντήρησης, η λευκαφαίρεση, η ακτινοβόληση κ.α. (Antonelou et al. 2010b, Antonelou et al. 2012, Hsieh et al. 2020, Eshghifar et al. 2021), καθώς και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του αιμοδότη (Tzounakas et al. 2016b, Hadjesfandiari et al. 2021) αποτελούν σημαντικούς συντελεστές της προόδου της αποθηκευτικής βλάβης.



Εικόνα A23: Γενετικά και μη-γενετικά καθορισμένα χαρακτηριστικά των αιμοδοτών που επιδρούν στην πρόοδο της αποθηκευτικής βλάβης. (Ανατύπωση από Tzounakas et al, 2016).

Παρά το γεγονός ότι για δεκαετίες ο χρόνος αποθήκευσης θεωρείτο η βασική παράμετρος που καθοδηγεί την αποθηκευτική βλάβη, τα τελευταία χρόνια έχουν έρθει στο προσκήνιο τα χαρακτηριστικά του αιμοδότη και έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σε διάφορες διακριτές ομάδες αιμοδοτών που καθορίζονται βάσει του γενετικού υποβάθρου ή του τρόπου ζωής τους (D'Alessandro et al. 2019) (**Εικόνα A23**).

A.8.1 Γενετικά Καθορισμένοι Παράγοντες

Το φύλο αποτελεί ένα γενετικό χαρακτηριστικό που έχει μελετηθεί εκτενώς στο χώρο της μετάγγισης. Είναι αρκετές οι διαφορές που παρουσιάζουν τα δύο φύλα μεταξύ τους σε αιματολογικούς δείκτες, συμπεριλαμβανομένης της χαμηλότερης ενδοκυττάριας αιμοσφαιρίνης (Rushton et al. 2001). Λαμβάνοντας υπόψη πως τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης προ-αποθηκευτικά συσχετίζονται θετικά με τα αντίστοιχα κατά την αποθήκευση (Agnihotri et al. 2014), η μελέτη αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων που προέρχονται από γυναίκες

καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική. Μελέτες σε μονάδες μετάγγισης από αιμοδότριες έδειξαν πως τα συγκεκριμένα ερυθροκύτταρα είναι λιγότερο επιρρεπή σε αυθόρμητη, οσμωτική, οξειδωτική (Kanias et al. 2017, D'Alessandro et al. 2021) και μηχανική αιμόλυση (Raval et al. 2010) σε σύγκριση με των ανδρών. Επιπλέον, παρότι στο υπερκείμενό τους η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι χαμηλότερη, εντός του ερυθροκυττάρου συσσωρεύονται λιγότερες ROS σε σύγκριση με αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα του άλλου φύλου (Tzounakas et al. 2021a). Πρόσφατα δείχθηκε, επίσης, πως οι μεμβράνες αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων γυναικών είναι πιο ανθεκτικές σε βλάβες σε σχέση με των ανδρών (Szczeny-Malysiak et al. 2021). Παρότι τα παραπάνω ευρήματα συνηγορούν υπέρ ενός καλύτερου αποθηκευτικού προφίλ, υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν τη χορήγηση αίματος από γυναίκες με αυξημένη θνησιμότητα (Edgren et al. 2017), ιδιαίτερα σε φύλο-ασύμβατες μεταγγίσεις (Zeller et al. 2019).

Η ανεπάρκεια του ενζύμου G6PD, μέσω της δράσης του οποίου παρέχεται στο κύτταρο NADPH, έχει μελετηθεί εκτενώς τόσο όσον αφορά στην αποθηκευτική ικανότητα, όσο και στη μετα-μεταγγισιακή επάρκεια των ερυθροκυττάρων. Συγκριτικά αποτελέσματα σε αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα G6PD-ανεπαρκών και υγιών δοτών έδειξαν πως τα πρώτα διατηρούν σε ικανοποιητικό βαθμό παραμέτρους μορφολογίας, πρωτεόστασης, ασβεστίου και ενέργειας (Tzounakas et al. 2016a, Tzounakas et al. 2022b), όμως –όπως ήταν αναμενόμενο– παρουσιάζουν προβλήματα σε παραμέτρους οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου (Francis et al. 2020). Επιπλέον, στις μονάδες μετάγγισης αιμοδοτών με ανεπάρκεια G6PD συσσωρεύονται περισσότερα εξωκυττάρια κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης (Noulsri et al. 2021). Η επαφή των ερυθροκυττάρων από αιμοδότες με ανεπάρκεια G6PD με πλάσμα υποψήφιου δέκτη σε θερμοκρασία σώματος φάνηκε να δρα επαγωγικά όσον αφορά στην αιμόλυση και τους δείκτες οξείδωσης (Tzounakas et al. 2016a). Αυτή η μειονεκτική μετα-μεταγγισιακή εικόνα που αναδείχθηκε μέσω *in vitro* μοντέλου προσομοίωσης της μετάγγισης, επαληθεύθηκε αργότερα από κλινικές μελέτες που έδειξαν μειωμένη 24ωρη ανάκτηση (Sagiv et al. 2018, Francis et al. 2020).

Άλλη μία κατηγορία που έχει μελετηθεί, αν και σε μικρό βαθμό, αφορά στους πολυμορφισμούς και τις μεταλλαγές στην αιμοσφαιρίνη. Πιο συγκεκριμένα, μία πρόσφατη αναδρομική μελέτη μεγάλης κλίμακας έδειξε πως πολυμορφισμοί στο γονίδιο *HbA2* συσχετίζονται με μειωμένη αύξηση της αιμοσφαιρίνης μετά τη μετάγγιση (Roubinian et al. 2022). Στο ίδιο πλαίσιο, τα ερυθροκύτταρα από ετερόζυγους για δρεπανοκυτταρική αναιμία παρουσιάζουν επιταχυνόμενη αποθηκευτική γήρανση σε σύγκριση με του μέσου αιμοδότη, αυξημένη αυθόρμητη αιμόλυση, περισσότερες εχينوκυτταρικές μορφές αλλά και μειωμένη 24ωρη ανάκτηση σε ζωικά μοντέλα μετάγγισης (Osei-Hwedieh et al. 2016).

A.8.2 Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

Η παχυσαρκία, με δείκτη μάζας σώματος (BMI) που υπερβαίνει τα 30kg/m², αποτελεί σχετικά συχνή κατάσταση σε πολλές χώρες του σύγχρονου κόσμου. Μελέτες μεγάλης κλίμακας έχουν δείξει πως τα ερυθροκύτταρα παχύσαρκων αιμοδοτών είναι επιρρεπή στην αποθηκευτική (Hazegh et al. 2021, Sparrow et al. 2021) και οσμωτική αιμόλυση. Μάλιστα, αυτή η επιρρέπεια στη λύση βρέθηκε να συσχετίζεται με μειωμένη

ανάκτηση σε ζωικά μοντέλα μετάγγισης, ενώ οι ερυθροκυτταρικές μεμβράνες των συγκεκριμένων ερυθροκυττάρων παρουσίαζαν μεταβολές στη λιπιδική τους σύσταση (Hazegh et al. 2021).

Άλλες πτυχές του τρόπου ζωής των αιμοδοτών που έχουν μελετηθεί στα πλαίσια της αποθηκευτικής βλάβης των ερυθροκυττάρων, αφορούν στην κατανάλωση/χρήση δυνητικά βλαπτικών ουσιών. Τα επίπεδα του αιθυλογλυκουρονιδίου, μεταβολικού δείκτη της κατανάλωσης αλκοόλ, έχουν βρεθεί να συσχετίζονται με δείκτες οξειδωτικού στρες, καθώς και με μειωμένους γλυκολυτικούς ρυθμούς στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα (D'Alessandro et al. 2020b). Από την άλλη, η κατανάλωση καφεΐνης και ενεργειακών ποτών φαίνεται να έχει θετικό αντίκτυπο στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα, ενισχύοντας το μεταβολικό αντιοξειδωτικό τους δυναμικό (Bertolone et al. 2020, D'Alessandro et al. 2020a). Η χρήση ενός συνόλου φαρμακευτικών παραγόντων (εγκεκριμένων από τον FDA) πρόσφατα δείχθηκε πως δεν είναι ουδέτερη ως προς την αποθήκευση και την μετα-μεταγγισιακή δραστηριότητα των ερυθροκυττάρων, με κάποιες ουσίες να τις ευνοούν και κάποιες να τις δυσχεραίνουν (Nemkov et al. 2021). Τέλος, το κάπνισμα οδηγεί σε συσσώρευση καρβοξυαιμοσφαιρίνης στις μονάδες μετάγγισης (DeSimone et al. 2019), κάτι που μπορεί να μειωθεί αν οι αιμοδότες απέχουν από τη συγκεκριμένη συνήθεια 12 ώρες πριν αιμοδοτήσουν (R.E. Boehm et al. 2018). Επιπλέον, στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα καπνιστών έχει παρατηρηθεί διαταραχή του οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου (R.E. Boehm et al. 2020, Stefanoni et al. 2020) και συσσώρευση τοξικών στοιχείων (π.χ., κάδμιο, μόλυβδος) που θα μπορούσαν να υπερφορτώσουν τον οργανισμό παιδιατρικών ασθενών-δεκτών των συγκεκριμένων μονάδων (R. Boehm et al. 2019).

A.9 Η Φυσιολογία του Αίματος των Ετερόζυγων για β-Μεσογειακή Αναιμία

Η β-μεσογειακή αναιμία (βΜΑ) αφορά σε ένα σύνολο κληρονομικών διαταραχών του αίματος, στις οποίες επηρεάζεται ποσοτικά η φυσιολογική αιμοσφαιρίνη λόγω μείωσης της σύνθεσης αλυσίδων β-σφαιρίνης. Οι μεταλλαγές της βΜΑ αφορούν συνήθως στο γενετικό τόπο των αλυσίδων β-σφαιρίνης, επηρεάζοντάς τις μεταγραφικά και μετα-μεταγραφικά. Ανάλογα με τη μεταλλαγή, μπορεί να υπάρξει μικρή μείωση των αλυσίδων β-σφαιρίνης (μεταλλαγές β^{++}), σημαντική μείωση (μεταλλαγές β^{+}) ή και πλήρης απουσία έκφρασής τους (μεταλλαγές β^0) (Thein 2013). Οι φορείς βΜΑ, υπό την προϋπόθεση πως φέρουν επίπεδα ενδοκυττάριας αιμοσφαιρίνης που υπερβαίνουν το όριο της αιμοδοσίας (12,5 g/dL για τις γυναίκες και 13,5 g/dL για τους άνδρες) δεν αποκλείονται από αυτήν. Όμως, ορισμένα χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος τους που οφείλονται σε αυτή την ετεροζυγωτία δημιουργούν το υπόβαθρο για τη διατύπωση κάποιων ευνοϊκών και κάποιων δυσοίωνων υποθέσεων όσον αφορά στην αποθηκευτική ικανότητα και τη μετα-μεταγγισιακή επάρκεια των ερυθροκυττάρων τους (Tzounakas et al. 2016b).

Πρώτα απ' όλα, η μειωμένη λειτουργική αιμοσφαιρίνη που χαρακτηρίζει τα συγκεκριμένα άτομα, δεν είναι γνωστό κατά πόσο θα ήταν ιδανική για την αύξηση της αιμοσφαιρίνης σε έναν μεταγγισιοεξαρτώμενο δέκτη. Επιπλέον, οι ελεύθερες αλυσίδες α-σφαιρίνης μπορούν να δράσουν προ-οξειδωτικά δεσμευόμενες στη μεμβράνη και τον κυτταροσκελετό, προκαλώντας έντονες οξειδωτικές βλάβες (Ficarra et al. 2009), ικανές να επηρεάσουν τη

μηχανική ακεραιότητα του κυττάρου (Schrier and Mohandas 1992). Λόγω των τοξικών αλυσίδων α-σφαιρίνης τελικά μπορεί να προκληθεί ένας καταρράκτης αλλοιώσεων που συμπεριλαμβάνουν την απώλεια μεμβράνης (van Zwieten et al. 2014), την αφυδάτωση του κυττάρου, τη μειωμένη ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης (Fortier et al. 1988, Vaya et al. 2003), την εκτενή φωσφορυλίωση της Ζώνης 3 (Pantaleo et al. 2010) και την αυξημένη ενεργότητα της κασπάσης-3 (Mandal et al. 2003, Ficarra et al. 2009). Τα ερυθροκύτταρα των ατόμων με στίγμα βΜΑ χαρακτηρίζονται επιπλέον από τροποποιημένη ιοντοανταλλαγή, με αυξημένη λειτουργία των αντλιών και μεταφορέων της μεμβράνης (O. Olivieri et al. 1994), η οποία μπορεί να οδηγήσει στην εξάντληση των αποθεμάτων ενέργειας και τη γήρανση του κυττάρου. Όλα αυτά προμηνύουν μία ελλιπή αντιμετώπιση του αποθηκευτικού στρες λόγω αυξημένου οξειδωτικού φορτίου και πιθανής επιρρέπειας σε λύση.

Στον αντίποδα, τα ερυθροκύτταρα ατόμων με βΜΑ παρουσιάζουν μειωμένη συσσωμάτωση (Falco et al. 2003), η οποία αποτελεί φαινότυπο που επιβαρύνεται κατά την αποθήκευση (Hovan et al. 1999). Παράλληλα, η τροποποιημένη ιοντοανταλλαγή τους (O. Olivieri et al. 1994) ευνοεί τη συγκέντρωση υψηλότερων επιπέδων K^+ ενδοκυττάρια και την απώλεια οσμωτικά ενεργών ουσιών (Gunn et al. 1972). Τελικά τα ερυθροκύτταρα αυτά αποκτούν υψηλότερο λόγο επιφάνειας προς όγκο (Schrier et al. 1989) και καθίστανται ανθεκτικά σε οσμωτικό στρες (Gunn et al. 1972, Almizraq et al. 2013). Μάλιστα, ο δείκτης οσμωτικής ευθραυστότητας έχει χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο της ετεροζυγωτίας για βΜΑ (Mamtani et al. 2006). Τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά συνηγορούν υπέρ μίας πλεονεκτικής αντιμετώπισης πτυχών της αποθηκευτικής βλάβης. Αξίζει να αναφερθεί πως το φαινομενικά αρνητικό αυξημένο οξειδωτικό στρες, θα μπορούσε να δρα ευνοϊκά στα συγκεκριμένα ερυθροκύτταρα, καθώς δύναται να έχουν αναπτύξει αντίμετρα «εκπαιδευόμενα» στα σταθερά ήπια επίπεδα οξειδωτικού φορτίου. Όντως, τα ερυθροκύτταρα από άτομα με στίγμα βΜΑ φαίνεται να διαθέτουν πλεονεκτική γενετική ρύθμιση ορισμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως είναι η Prdx2 και η SOD (Teran et al. 2020).

B. Σκοπός

Η παρούσα διατριβή έχει ως σκοπό τον πολυεπίπεδο έλεγχο της επίδρασης της ετεροζυγωτίας για β-μεσογειακή αναιμία στους τρεις κρίκους της αλυσίδας της μετάγγισης: (α) προ-αποθηκευτικά (*in vivo*) στη φυσιολογία και τη βιοχημεία των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος, αλλά και τον ερυθροκυτταρικό μεταβολισμό, β) στην αποθηκευτική ικανότητα (παράμετροι αιμόλυσης, ενέργειας, οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου, πρωτεϊνικής σύστασης) των ερυθροκυττάρων σε μονάδες μετάγγισης (*ex vivo*), και γ) στην επάρκεια της μεταγγισιοθεραπείας στο επίπεδο του δέκτη, με χρήση *in vitro* και ζωικών (*in vivo*) μοντέλων μετάγγισης. Επιπλέον, η παρούσα διατριβή αποσκοπεί στην εύρεση συσχετίσεων μεταξύ παραμέτρων των τριών κρίκων της μεταγγισιακής αλυσίδας με σκοπό την ανάδειξη πιθανών αιτιών (και δυνητικών βιοδεικτών) που βρίσκονται πίσω από πλεονεκτικούς ή μειονεκτικούς αποθηκευτικούς και μετα-μεταγγισιακούς φαινοτύπους.

Γ. Υλικά και Μέθοδοι

Γ.1 Υλικά

Γ.1.1 Βιολογικό Υλικό

Χρησιμοποιήθηκε και ελέγχθηκε φλεβικό αίμα από 204 υγιείς αιμοδότες και των δύο φύλων. Από αυτούς επιλέχθηκαν 18 ετερόζυγοι για β-μεσογειακή αναιμία (βΜΑ) και 20 αιμοδότες-μάρτυρες από τους οποίους παρήχθησαν λευκαφαιρεμένες μονάδες πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων με αντιπηκτικό διάλυμα CPD (κιτρικά-φωσφορικά-δεξτρόζη) και πρόσθετο διάλυμα συντήρησης SAGM (διάλυμα άλατος-αδενίνη-γλυκόζη-μαννιτόλη). Οι μονάδες μετάγγισης αποθηκεύτηκαν στους 4°C για μία περίοδο 42 ημερών και δείγμα από αυτές εξεταζόταν σε εβδομαδιαία βάση για ποικίλες παραμέτρους. Επιπλέον 16 λευκαφαιρεμένες μονάδες (8 ανά κατηγορία) σε συντηρητικό διάλυμα CPD-SAGM παρήχθησαν με σκοπό την πραγματοποίηση των πειραμάτων μετάγγισης σε ζωικά μοντέλα.

Γ.1.2 Ζωικά Μοντέλα

Πενήντα δύο ανοσοανεπαρκείς NOD.CB17-Prkdcscid/J και ανοσοεπαρκείς C57BL/6J αρρενες μύες, 8-12 εβδομάδων (26 ανά γενετικό υπόβαθρο) χρησιμοποιήθηκαν ως ξενοβιωτικό μοντέλο μετάγγισης. Οι μύες εκτράφηκαν και συντηρήθηκαν σε ειδικό άνευ παθογόνων χώρο, με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία και υγρασία ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$ και $55\pm 10\%$, αντίστοιχα), και με 12ωρο κύκλο εναλλαγής φωτός/σκοταδιού. Διέμεναν (4-5 ανά κλωβό) σε αεριζόμενους κλωβούς (Seal Safe 1284 L, H-Temp™, Techniplast, Varese, Italy) με 70 αλλαγές αέρα την ώρα. Τους παρέχόταν πρόσβαση σε φιλτραρισμένο νερό βρύσης και τροφή (18,5% πρωτεΐνη, 5,5% λίπος, 4,5% φυτικές ίνες και 6% τέφρα). Οι κλωβοί καθαρίζονταν και τοποθετούνταν σε αυτόκαυστο μία φορά την εβδομάδα. Όλα τα ζώα αξιολογούνταν κλινικά από έμπειρο κτηνιατρικό προσωπικό καθημερινά. Η κατανάλωση τροφής και νερού, το βάρος, η κινητικότητα και η κοινωνικότητα καταγράφονταν και αξιολογούνταν σε εβδομαδιαία βάση έως το πέρας του πειραματισμού. Όλα τα πειράματα με ζωικά μοντέλα έλαβαν χώρα στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ). Τηρήθηκαν όλες οι ισχύουσες Εθνικές οδηγίες για τη φροντίδα και τον χειρισμό των ζώων και το πρωτόκολλο μελέτης εγκρίθηκε από το Τμήμα Γεωπονίας και Κτηνιατρικής της Νομαρχίας Αθηνών.

Γ.1.3 Χημικά Αντιδραστήρια

- Χλωριούχο Νάτριο (NaCl)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- Φαινυλδραζίνη
- CM- H_2DCFDA , INVITROGEN
- tert-Butyl hydroperoxide (tBHP), SIGMA
- Διαμίδιο, SIGMA
- Φαινυλδραζίνη, SIGMA

- Τριχλωροξικό οξύ (TCA)
- Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA)
- Οξικό Οξύ
- Οξικό Νάτριο
- 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), SIGMA
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Ουρική, SIGMA
- Γλυκόζη
- Tris
- Υδροχλωρίδιο (HCl)
- LLVY-AMC (Enzo Life Sciences)
- LRR-AMC (Enzo Life Sciences)
- LLE-AMC (Enzo Life Sciences)
- Fluo-4 AM, (Invitrogen)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl)
- Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2)
- Υδροξείδιο νατρίου (NaOH)
- Hepes
- Πυροσταφυλικό νάτριο
- Γλουταρική αλδεΐδη
- Σουκρόζη
- Κακοδυλικό νάτριο
- Τετροξείδιο του οσμίου, OsO_4
- Απόλυτη αιθανόλη
- Ορθοβαναδικό νάτριο (sodium orthovanadate), Calbiochem
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), SERVA
- Γλυκερόλη
- β-μερκαπτοαιθανόλη
- Ethyleno-diamino-tetraacetic acid disodium salt (EDTA)
- Δωδεκακυλοθειικό νάτριο (SDS)
- Ακρυλαμίδα
- Υπερθειικό αμμώνιο (APS)
- Γλυκίνη
- Ισοπροπανόλη

- Μεθανόλη
- Γάλα σε σκόνη (άπαχο)
- N, N, N', N' – Tetramethylethylenediamin (TEMED), SERVA
- Phosphate Buffer Saline tablets (PBS)
- Tween-20
- BSA
- Φορμικό οξύ
- Ακετονιτρίλιο

Γ.1.4 Κιτ Εμπορίου

- Plasma protein carbonylation kit (ELISA), BioCell Corp
- Nitric oxide detection kit (ELISA), Cusabio
- Human clusterin detection kit (ELISA), BioVendor
- Zymuphen microparticles activity kit (ELISA), HYPHEN BioMed
- Oxyblot detection kit, Millipore
- ECL Western Blotting Detection Reagents, GE HEALTHCARE
- ECL Plus PERKIN ELMER

Γ.1.5 Χρωστικές

- Bradford dye reagent concentrate, (BIO-RAD)
- Μπλε της βρωμοφαινόλης, (SIGMA)
- Coomassie Brilliant Blue G-250, (SERVA)
- D-383 (1,1'-Didodecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate, INVITROGEN)
- D-307 (1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanine Perchlorate, INVITROGEN)

Γ.1.6 Αντισώματα

- anti-glycophorin A-PE (CD235) (rabbit), BD Pharmingen
- Annexin-V-FITC, BD Pharmingen
- anti-4.1R (rabbit)
- anti-stomatin (mouse)
- anti-Hsp70 (rabbit), Santa-Cruz Biotechnology
- anti-band 3 (mouse), Santa-Cruz Biotechnology
- anti-phosphorylated tyrosine (mouse), Millipore
- anti-DJ1 (rabbit), Cell Signaling Technology
- anti-caspase 3 (rabbit), Cell Signaling Technology
- anti-b5 proteasome subunit (rabbit), Enzo

- HRP-conjugated anti-mouse IgG, DakoCytomation
- HRP-conjugated anti-rabbit IgG, R&D Systems

Γ.1.7. Φωτογραφικά Υλικά

- Ακτινογραφικό φιλμ (X-ray film), (KODAC)
- Εμφανιστές ακτινογραφικού φιλμ (FUJIFILM)
- Στερεωτής (fixer) ακτινογραφικού φιλμ (KODAC)

Γ.1.8 Αναλώσιμα

- Σύριγγες
- Βελόνες αιμοληψίας (19G)
- Eppendorfs διαφόρων όγκων
- Ακροφύσια για πιπέτες τύπου Gilson
- Κυβέτες φασματοφωτομέτρου (SIGMA)
- Μεταλλικά σφαιρίδια
- Κυβέτες φθορισμομέτρου
- Αντικειμενοφόροι (stubs) για ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης
- Καλυπτρίδες
- Διηθητικό χαρτί Whatman 3MM, (SCHLEICHER & SCHUELL)
- Νιτροκυτταρίνη 0.45 μm (BIO-RAD)
- Kinetex XB-C18 στήλη υγρής χρωματογραφίας (150 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 1.7 μm —Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- S-Trap filter (Protifi, Huntington, NY)
- Evotips

Γ.1.9 Όργανα – Συσκευές

- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf, 5410
- Vortex
- Αιματολογικός αναλυτής, Sysmex K-4500 (ROCHE)
- Βιοχημικός αναλυτής ηλεκτρολυτών, Elecsys Systems Analyzer (ROCHE)
- Βιοχημικός αναλυτής, (HITACHI 902)
- Πιπέτες τύπου Gilson
- Φωτόμετρο (Jenway)
- Φωτόμετρο (ZEISS)
- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraeus, κεφαλή #3344
- Κλίβανος

- Ηλεκτρονικός ζυγός (KERN PRS 320-3)
- Ηλεκτρονικό πεχάμετρο
- Φθορισμόμετρο (BIO-RAD)
- Αναδευτήρας (Kisker Biotech)
- Επωαστήρας (heatblock)
- Φωτόμετρο ELISA (ASYS Jupiter)
- Κυτταρόμετρο (FACSCanto II, BD)
- Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM 515, PHILIPS)
- Συσκευή κάλυψης για Ηλεκτρονική Μικροσκοπία (Tousimis Samsputter-2a)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (BIO-RAD)
- Transblot – SDI Semidry Transfer Gel, (BIO-RAD)
- FACS Aria II/Div software (BD Pharmingen)
- UHPLC-MS (Ultimate 3000 RSLC-Q Exactive, Thermo Fisher)
- Q Exactive system (Thermo, Bremen, Germany)
- Evosep One
- Φασματόμετρο Μάζας timsTOF Pro

Γ.2 Μέθοδοι

Γ.2.1 Απομόνωση – Ποσοτικός Προσδιορισμός Ερυθροκυτταρικών Μεμβρανών/Εξωκυττάρων Κυστιδίων

Γ.2.1.1 Απομόνωση Ερυθροκυτταρικών Μεμβρανών

Η απομόνωση των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της υποτονικής αιμόλυσης (Dodge et al. 1963). Πιο συγκεκριμένα, συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα (μετά από φυγοκέντρηση ολικού αίματος 1000xg) εκτέθηκαν (1:20) σε υπότονο διάλυμα φωσφορικών ιόντων (5mM, pH 8.0) παρουσία αναστολέα πρωτεασών (PMSF) για την αναστολή της πρωτεόλυσης. Η ίδια διαδικασία, αλλά με αναλογία 1:10 πραγματοποιήθηκε για την απομόνωση κυτοσολίου. Το αιμόλυμα επώαστηκε στον πάγο (περεταίρω περιορισμός δράσης πρωτεολυτικών ενζύμων) για 45 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 4°C, στα 19.000xg για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο αναρροφήθηκε (ή στην περίπτωση της απομόνωσης κυτοσολίου αποθηκεύτηκε για μελλοντική χρήση) και ακολούθησαν πλύσεις του ιζήματος των μεμβρανών μέχρι να απομακρυνθεί η αιμοσφαιρίνη. Πριν τη διαδικασία της υποτονικής λύσης, επιλεγμένα δείγματα ερυθροκυττάρων (N=3 ανά ομάδα αιμοδοτών) επώαστηκαν για 1 ώρα με τον αναστολέα φωσφατασών τυροσίνης ορθοβαναδικό νάτριο (Huyer et al. 1997), με σκοπό τον έλεγχο των επιπέδων φωσφορυλίωσης στα κατάλοιπα τυροσίνης της ζώνης 3.

Γ.2.1.2 Απομόνωση Εξωκυττάρων Κυστιδίων

Η απομόνωση κυστιδίων (N=5 ανά ομάδα αιμοδοτών) από το υπερκείμενο των μονάδων μετάγγισης συντελέστηκε στο τέλος (ημέρα 42) της αποθηκευτικής περιόδου. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση

υπερκείμενου μετά από φυγοκέντρηση (2000xg) συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων. Το υπερκείμενο ακολούθως διήλθε μέσα από αποστειρωμένα φίλτρα νιτροκυτταρίνης (μέγεθος πόρων 0,8μm) και υπερφυγοκεντρήθηκε (37000xg) για 1 ώρα. Το ίζημα των κυστιδίων επαναδιαλυτοποιήθηκε σε PBS και ακολούθησαν δύο φυγοκεντρήσεις στις ίδιες συνθήκες.

Γ.2.1.3 Υπολογισμός Ολικής Πρωτεϊνικής Συγκέντρωσης Δείγματος

Μετά την απομόνωση των μεμβρανών και των κυστιδίων, αλλά και σε πλήθος πειραματικών διαδικασιών που θα αναλυθούν στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των δειγμάτων. Η μέτρηση αυτή γίνεται με τη μέθοδο Bradford (Bradford 1976). Συγκεκριμένα, δείγματα αραιωμένα στο διάλυμα της αντίδρασης/απομόνωσης παρουσία της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue φωτομετρούνται στα 595nm. Η χρωστική αυτή υπάρχει σε τρεις μορφές: ανιόν (μπλε), ουδέτερη (πράσινη) και κατιόν (κόκκινη). Η Coomassie Brilliant Blue δημιουργεί έναν ισχυρό μη ομοιοπολικό δεσμό με την πρωτεΐνη μέσω Van der Waals και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η δέσμευση αυτή μετατοπίζει το μέγιστο απορρόφησής της από τα 465nm στα 595nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα υπολογίζεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς που έχει κατασκευαστεί με πρωτεΐνη γνωστής συγκέντρωσης.

Γ.2.2 Ηλεκτροφόρηση και Ανοσοεντόπιση τύπου Western

Γ.2.2.1 Προετοιμασία Δειγμάτων για SDS Ηλεκτροφόρηση

Οι απομονωμένες μεμβράνες και τα κυστίδια προτού ηλεκτροφορηθούν (N=7 για τις μεμβράνες, N=5 για τα κυστίδια ανά κατηγορία αιμοδοτών) επεξεργάζονται με διάλυμα 20% SDS-10mM EDTA που περιέχει γλυκερόλη, β-μερκαπτοαιθανόλη και μπλε της βρωμοφαινόλης σε αναλογία 10:10:5:1, αντίστοιχα. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο έτσι ώστε να ηλεκτροφορηθούν μόνο βάσει της μάζας τους. Η μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και η αποδιάταξη των πρωτεϊνών ολοκληρώνεται μέσω της θέρμανσης. Η γλυκερόλη είναι απαραίτητη για την αύξηση του ιξώδους του δείγματος έτσι ώστε να γίνει σωστή τοποθέτηση στο πήκτωμα, ενώ το μπλε της βρωμοφαινόλης δίνει χρώμα στο διαλύτη έτσι ώστε να είναι δυνατή η παρακολούθηση της πορείας των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση.

Για την αξιολόγηση της καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών της μεμβράνης τα δείγματα (N=8 ανά ομάδα αιμοδοτών) πριν την ηλεκτροφόρησή τους, και αφού διαλυτοποιήθηκαν σε 12% SDS, επώαστηκαν με το αντιδραστήριο δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH). Το μόριο αυτό αντιδρά με τις καρβονυλικές ομάδες δημιουργώντας το σταθερό παράγωγο DNP (δινιτροφαινύλιο) και έτσι μπορούν να εντοπιστούν επιλεκτικά οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες. Μετά από δεκαπεντάλεπτη επώαση, η αντίδραση τερματίστηκε με διάλυμα ουδετεροποίησης και προστέθηκε στο μείγμα β-μερκαπτοαιθανόλη.

Γ.2.2.2 Επίπεδη SDS-PAGE Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών κατά Laemmli

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε επίπεδη SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα κλίσης πολυακρυλαμίδης κατά Laemmli (Laemmli 1970). Για τη διαδικασία παρασκευάζονται δύο πηκτώματα: πακεταρίσματος και διαχωρισμού. Και στα δύο πηκτώματα υπάρχει ακρυλαμίδα, SDS και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl, ενώ προστίθενται και οι παράγοντες APS και TEMED για τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης. Το πήκτωμα πακεταρίσματος είναι ιδιαίτερα αραιό σε σχέση με του διαχωρισμού και διαφέρει επιπλέον το pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων (6,8 στο πήκτωμα πακεταρίσματος και 8,8 στο πήκτωμα διαχωρισμού). Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης του διαχωρισμού μπορεί να παρασκευαστεί με ένα μεγάλο εύρος μεγέθους πόρων μεταβάλλοντας την αναλογία ακρυλαμίδης-δισακρυλαμίδης, αναλόγως με τις πρωτεΐνες που θέλουμε να μελετήσουμε. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται διάλυμα ηλεκτροδίων (Running Buffer) το οποίο περιέχει Tris, γλυκίνη και SDS (pH 8,3), ενώ παρέχεται σταθερό ρεύμα 20mA για κάθε πήκτωμα πακεταρίσματος και 35mA για κάθε πήκτωμα διαχωρισμού. Με την εφαρμογή ρεύματος, οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες μετακινούνται προς τον θετικό πόλο, με τις μικρότερες να κινούνται ευκολότερα από τις μεγαλύτερες. Το πήκτωμα πακεταρίσματος στοιβάζεται στη συσκευή πάνω από εκείνο του διαχωρισμού για να επιτρέψει την εκκίνηση των πρωτεϊνών από το ίδιο σημείο. Τα ιόντα χλωρίου και η αρνητικά φορτισμένη γλυκίνη κινούνται μαζί με τις πρωτεΐνες προς τον θετικό πόλο μέχρι να εισέλθουν στο πήκτωμα πακεταρίσματος. Εκεί, σε pH 6,8 η γλυκίνη είναι κυρίως ουδέτερη και κινείται πολύ πιο αργά, σε αντίθεση με τα ιόντα χλωρίου που κινούνται γρηγορότερα, πακετάροντας ανάμεσά τους τις πρωτεΐνες. Μόλις φτάσουν στο pH 8,8 του πηκτώματος διαχωρισμού, τα μόρια γλυκίνης είναι κυρίως αρνητικά και μπορούν να κινηθούν γρήγορα προς τον θετικό πόλο, «προσπερνώντας» τις πρωτεΐνες και επιτρέποντας τον διαχωρισμό τους βάσει του μεγέθους τους.

Γ.2.2.3 Τεχνική Ανοσοαποτυπώματος (Western Blotting)

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε νιτροκυτταρίνες με τη χρήση ειδικής συσκευής μεταφοράς. Πιο συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν φύλλα χαρτιών Whatmann εμποτισμένων σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Tris, γλυκίνη, SDS, μεθανόλη) εκατέρωθεν της νιτροκυτταρίνης και του πηκτώματος. Η συσκευή ενώνεται με τροφοδοτικό και παρέχεται ρεύμα με σταθερή τάση (20V) για να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες στη νιτροκυτταρίνη.

Στη νιτροκυτταρίνη μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν οι πρωτεΐνες με χρήση ειδικών αντισωμάτων. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι η κάλυψη των μη-ειδικών θέσεων με επώαση σε διάλυμα άπαχου γάλατος ή BSA για 1 ώρα. Ακολουθεί επώαση με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης στόχου (αραιωμένο στο διάλυμα κάλυψης) και πλύσεις με PBS-Tween για την απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος. Τέλος, η μεμβράνη επώαζεται με δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με υπεροξειδάση, έναντι των σταθερών περιοχών του πρωτογενούς αντισώματος. Η νιτροκυτταρίνη ξεπλένεται πάλι με PBS-Tween και επώαζεται με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (λουμινόλη) παρουσία ενισχυτών. Η λουμινόλη διεγείρεται και παράγονται φωτόνια που προσπίπτουν σε φωτοευαίσθητα φιλμ αυτοραδιογραφίας. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα σε σκοτεινό

θάλαμο. Τα φιλμ μετά την επαφή τους με την επωασμένη σε λουμινόλη μεμβράνη τοποθετούνται σε διάλυμα εμφάνισης (D19) και διάλυμα «στερέωσης» (Fixer).

Η νιτροκυτταρίνη μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για νέο κύκλο ανοσοεντόπισης. Αυτό είναι εφικτό μετά την απομάκρυνση των προηγούμενων αντισωμάτων από αυτή μέσω επώασής της στους 50-60°C σε ρυθμιστικό διάλυμα αποκόλλησης (Tris-HCl pH 7,6, 2% SDS) παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη 4.1R ως μάρτυρας ισοφόρτωσης για τα δείγματα μεμβρανών και η στοματίνη για τα δείγματα κυστιδίων.

Γ.2.2.4 Χρώση Ολικών Πρωτεϊνών σε Πήκτωμα

Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη, το πήκτωμα υπόκειται σε χρώση για να γίνουν ορατές οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες με τη μορφή ζωνών. Αρχικά τα πηκτώματα επάγονται σε διάλυμα 25% ισοπροπανόλη – 10% οξικό οξύ σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επώαση με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue-R250 σε διάλυμα 10% οξικού οξέος στους 60°C και επαναφορά του πηκτώματος στις προηγούμενες συνθήκες για 2 ώρες. Για δύο ακόμα ώρες το πήκτωμα επάγεται σε διάλυμα 5% ισοπροπανόλη – 10% οξικό οξύ και καταλήγει σε διάλυμα μόνο με οξικό οξύ 10%.

Γ.2.2.5 Ποσοτική Αξιολόγηση Πηκτωμάτων – Φιλμ

Μετά από σάρωση, τα πηκτώματα και τα φιλμ μπορούν να επεξεργαστούν πυκνομετρικά στον υπολογιστή με τη βοήθεια του προγράμματος Gel Analyser. Ορίζεται από τον χρήστη το υπόβαθρο, το οποίο και αφαιρείται αυτόματα από κάθε μέτρηση πρωτεϊνικής ζώνης. Οι τιμές που προκύπτουν (άθροισμα φωτεινότητας pixels) μπορούν να αναλυθούν στατιστικά.

Γ.2.3 Παράμετροι Αιμόλυσης

Γ.2.3.1 Αυθόρμητη Αιμόλυση

Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη (Hb) στο πλάσμα ή το υπερκείμενο των μονάδων μετάγγισης υπολογίστηκε φωτομετρικά με τη μέθοδο Harboe (Harboe 1959), αφού είχε γίνει διαχωρισμός από τα ερυθροκύτταρα με φυγοκέντρηση στα 1000xg. Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της οξυ-αιμοσφαιρίνης που έχει μέγιστο απορρόφησης τα 415nm. Όμως, στο ίδιο μήκος κύματος απορροφούν κι άλλες ουσίες, όπως η χολερυθρίνη και η αλβουμίνη. Για το λόγο αυτό πραγματοποιείται μέτρηση και στα μήκη κύματος 380 και 450nm. Μέσω του ακόλουθου τύπου (διόρθωση κατά Allen (V. Han et al. 2010)) μετατρέπεται η τιμή της απορρόφησης σε συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης:

$$\text{Hb (mg/100ml)} = [(167,2 \times A_{415}) - (83,6 \times A_{380}) - (83,6 \times A_{450})] \times 1/1000 \times \text{αραίωση (σε dH}_2\text{O)} \times 100$$

Όπου A_{415} , A_{380} και A_{450} οι απορροφήσεις στα αντίστοιχα μήκη κύματος.

Γ.2.3.2 Οσμωτικά Επαγόμενη Λύση

Για τον έλεγχο της οσμωτικής ανθεκτικότητας των ερυθροκυττάρων πραγματοποιήθηκε έκθεση ολικού αίματος σε κλίση συγκέντρωσης NaCl. Το ισότονο περιβάλλον των ανθρώπινων ερυθροκυττάρων είναι το 0,9% NaCl (310 mOsm), συνεπώς σε συγκεντρώσεις μικρότερες αυτού μόρια νερού εισέρχονται μέσω της μεμβράνης. Όταν ο όγκος των ερυθροκυττάρων αυξηθεί τόσο που υπερβεί το όριο αντοχής τους (οριακός όγκος), προκαλείται διάσπαση της μεμβράνης κι απελευθέρωση αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο. Επομένως, αφού παρασκευάστηκαν διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης NaCl (0% - 0,9%) ακολούθησε προσθήκη ολικού αίματος σε αναλογία 1/100 και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και φωτομετρήθηκε το υπερκείμενο στα 540 nm. Τέλος, κατασκευάστηκε καμπύλη οσμωτικής ευθραυστότητας, από την οποία υπολογίστηκε ο δείκτης οσμωτικής ευθραυστότητας, δηλαδή η συγκέντρωση NaCl που προκαλεί 50% λύση των ερυθροκυττάρων, θεωρώντας ότι το διάλυμα με μηδενική συγκέντρωση NaCl οδηγεί σε 100% λύση.

Γ.2.3.3 Μηχανικά Επαγόμενη Λύση

Κατά τη μέθοδο αυτή αξιολογείται η ικανότητα των ερυθροκυττάρων να αντιστέκονται στη μηχανική καταπόνηση. Με χρήση μεταλλικών σφαιριδίων, ανάμιξή τους με το δείγμα και ανάδευση, προσομοιάζονται τα φαινόμενα που καλείται να αντιμετωπίσει το ερυθροκύτταρο στην κυκλοφορία καθώς διέρχεται από τα τριχοειδή. Πιο συγκεκριμένα, μετά από φυγοκέντρωση στα 1000xg τα συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα αραιώνονται με ισότονο PBS σε αιματοκρίτη 20%. Ακολουθεί ανάδυσή τους παρουσία μεταλλικών σφαιριδίων για 1 ώρα στους 4°C, μαζί με μη-μηχανικά καταπονούμενα δείγματα-μάρτυρες. Με αυτό τον τρόπο λαμβάνεται υπόψη μόνο η αιμοσφαιρίνη που απελευθερώθηκε λόγω του μηχανικού στρες. Μετά τη 1 ώρα τα δείγματα φυγοκεντρώνονται (2750xg), το υπερκείμενο ξαναφυγοκεντρείται (20800xg) και υπολογίζεται η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη με τη μέθοδο Harboe. Με την ίδια μέθοδο υπολογίζεται και η ενδοκυττάρια αιμοσφαιρίνη στα δείγματα με 20% αιματοκρίτη και ο δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας προκύπτει από την επίλυση του ακόλουθου τύπου:

$$MFI(\%) = [(Ελεύθερη Hb_{(με\ σφαιρίδια)} - Ελεύθερη Hb_{(μάρτυρας)}) / (Hb_{(20\%)} - Ελεύθερη Hb_{(μάρτυρας)})] \times 100$$

Γ.2.3.4 Οξειδωτικά Επαγόμενη Λύση

Η οξειδωτική αιμόλυση υπολογίστηκε μετά την επώαση των ερυθροκυττάρων με φαινυλδραζίνη. Το συγκεκριμένο μόριο προκαλεί βλάβες στην αιμοσφαιρίνη, η οποία εν συνεχεία προσκολλάται στη μεμβράνη και τον κυτταροσκελετό καθιστώντας τις συγκεκριμένες δομές πιο άκαμπτες και λιγότερο σταθερές με συνέπεια την επιρρέπεια του κυττάρου σε λύση (Ramot et al. 2008). Κατά την πειραματική διαδικασία, μετά τη φυγοκέντρωση ολικού αίματος στα 1000xg, τα συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα αραιώθηκαν 1:10 με ισότονο PBS. Στα δείγματα προστέθηκε φαινυλδραζίνη (17mM) και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 ώρα. Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση (1000xg) και μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο κατά Harboe.

Γ.2.4 Παράμετροι Οξειδοαναγωγικού Ισοζυγίου

Γ.2.4.1 Ενδοκυττάρια Συγκέντρωση Δραστικών Ριζών Οξυγόνου (ROS)

Για τη μέτρηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ROS χρησιμοποιήθηκε ο εστέρας CMH₂DCFDA. Το συγκεκριμένο μόριο είναι λιπόφιλο κι έχει την ικανότητα να διαπερνά τη μεμβράνη και να εισέρχεται στο κύτταρο όπου και κόβεται από εστεράσες και δεν μπορεί πλέον να εξέλθει. Εντός του κυττάρου, ο εστέρας οξειδώνεται από τις ROS και δίνει φθορισμό, επομένως τα μετρούμενα επίπεδα φθορισμού είναι αναλογικά της συγκέντρωσης ROS. Αρχικά το ολικό αίμα φυγοκεντρήθηκε (1000xg) και τα συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα αραιώθηκαν 1:1 με ισότονο PBS. Ερυθροκυτταρικό δείγμα επώαστηκε σε PBS παρουσία του εστέρα (2μM) για 30 λεπτά στο σκοτάδι υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρωση (1000xg) για απομάκρυνση της περίσσειας εστέρα και επώαση για 12 λεπτά στις ίδιες συνθήκες με ισότονο PBS. Τέλος, τα κύτταρα λύθηκαν με προσθήκη απεσταγμένου νερού και μετρήθηκαν τα επίπεδα φθορισμού (μήκος κύματος διέγερσης: 490nm, μήκος κύματος εκπομπής: 520nm). Ακολούθησε υπολογισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης (μέθοδος Bradford) των δειγμάτων με σκοπό την κανονικοποίηση των επιπέδων φθορισμού (RFU) προς αυτήν. Τα επίπεδα ROS ελέγχθηκαν και μετά από πρόσθετο οξειδωτικό ερέθισμα. Συγκεκριμένα, πριν την προσθήκη του εστέρα έγινε επώαση των ερυθροκυττάρων με tert-Butyl hydroperoxide (tBHP, 100μM), διαμίδιο (2mM) και φαινυλδραζίνη (100μM) για 45 λεπτά στους 37°C.

Γ.2.4.2 Υπεροξείδωση Λιπιδίων Μεμβράνης

Η μελέτη της υπεροξείδωσης των λιπιδίων της μεμβράνης βασίστηκε στην ανίχνευση της μαλονδιαλδεϋδης (MDA), η οποία αποτελεί παράγωγο τελικού σταδίου οξείδωσης (υπεροξείδωσης) των λιπιδίων. Υπό όξινες συνθήκες και υψηλές θερμοκρασίες η MDA αντιδρά με δύο μόρια θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) και σχηματίζεται έγχρωμο προϊόν, το οποίο απορροφά στα 532nm. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Αρχικά προστέθηκε τριχλωροξικό οξύ (TCA) σε πακεταρισμένα ερυθροκύτταρα (αιματοκρίτης 40%) με σκοπό την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Μετά από φυγοκέντρωση (1400xg/15min) απομονώθηκε το υπερκείμενο στο οποίο προστέθηκε TBA (0,67% σε 10% οξικό οξύ) και ακολούθησε επώαση για 50 λεπτά στους 90°C. Τα δείγματα επώαστηκαν σε πάγο για 5 λεπτά με σκοπό την παύση της αντίδρασης και μετρήθηκαν φωτομετρικά τα επίπεδα MDA. Η τιμή της απορρόφησης μετατράπηκε σε μM TBA/mL ερυθροκυττάρων μέσω πρότυπης καμπύλης.

Γ.2.4.3 Εξωκυττάρια Αντιοξειδωτική Ικανότητα

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος/υπερκειμένου πραγματοποιήθηκε η μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power (Benzie and Strain 1996)). Το υπερκείμενο επώαστηκε υπό όξινες συνθήκες (ρυθμιστικό οξικού οξέος-οξικού νατρίου) με το σύμπλοκο τρισθενούς σιδήρου-τριπυριδυλοτριάζινης (Fe³⁺-TPTZ) για 4 λεπτά στους 37°C. Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά μόρια του πλάσματος (π.χ. ουρικό, ασκορβικό οξύ) έχουν την ικανότητα να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο (Fe³⁺) σε δισθενή (Fe²⁺) και το νέο σύμπλοκο που προκύπτει είναι έγχρωμο. Επομένως, ακολούθησε φωτομετρική μέτρηση στα 593nm και η

απορρόφηση αντιστοιχήθηκε σε $\mu\text{M Fe}^{2+}$ μέσω πρότυπης καμπύλης. Για να υπολογιστεί η συμμετοχή του ουρικού οξέος στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, πριν την πραγματοποίηση της μεθόδου FRAP το δείγμα επώαστηκε με ουρική, η οποία υδρολύει το ουρικό οξύ (Duplancic et al. 2011).

Γ.2.4.4 Καρβονυλίωση Πρωτεϊνών Πλάσματος

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών του πλάσματος υπολογίστηκε φωτομετρικά μέσω ELISA (ανοσοπροσρόφηση δεσμευμένου ενζύμου) κιτ, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (BioCell Corp). Σε μικροπλάκα 96 θέσεων τοποθετήθηκαν τα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα (πρότυπη καμπύλη) μετά από την αντίδρασή τους με DNPH. Το μόριο αυτό αντιδρά με τις καρβονυλικές ομάδες δημιουργώντας το σταθερό παράγωγο DNP. Αφού αφαιρέθηκε η περίσσεια DNP προστέθηκε βιοτινυλιωμένο αντίσωμα έναντι του DNP και στρεπταβιδίνη συζευγμένη με υπεροξειδάση, μαζί με το υπόστρωμα 3,3', 5,5' τετραμεθυλ-βενζιδίνη (TMB) για την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης. Για να σταματήσει η αντίδραση προστέθηκε τριχλωροξικό οξύ και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450nm. Μέσω αντιστοίχισης με την πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκε η ποσότητα καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών σε nmol/mg.

Γ.2.4.5 Επίπεδα Μονοξειδίου του Αζώτου

Η μέτρηση μονοξειδίου του αζώτου (NO) πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά με κατάλληλο κιτ ELISA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Cusabio). Σε μικροπλάκα 96 θέσεων που ήταν επικαλυμμένη με ειδικό αντίσωμα έναντι NO προστέθηκαν τα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα (πρότυπη καμπύλη). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι NO, το οποίο ήταν σημασμένο με βιοτίνη. Ακολούθησε προσθήκη αβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση, καθώς και το υπόστρωμα TMB. Τέλος, προστέθηκε θειικό οξύ, η αντίδραση ολοκληρώθηκε, και προσδιορίστηκε το έγχρωμο προϊόν φωτομετρικά στα 450nm. Μέσω αντιστοίχισης με την πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκε η συγκέντρωση NO σε ng/mL.

Γ.2.5 Παράμετροι Πρωτεόστασης

Γ.2.5.1 Πρωτεασωματική Ενεργότητα

Για τη μέτρηση της πρωτεασωματικής ενεργότητας στα διάφορα κυτταρικά κλάσματα (N=14 ανά ομάδα αιμοδοτών για κυτοσόλιο, μεμβράνη και υπερκείμενο, N=5 ανά ομάδα αιμοδοτών για τα κυστίδια) χρησιμοποιήθηκαν τα υποστρώματα LLVY-AMC, LRR-AMC και LLE-AMC, τα οποία εισέρχονται στο κύτταρο, κόβονται από τις ενεργότητες τύπου χυμοθρυψίνης, θρυψίνης και κασπάσης, αντίστοιχα, απελευθερώνεται το AMC και δίνει φθορισμό. Κατά την πειραματική διαδικασία, 120-200μg πρωτεϊνικού δείγματος επώαστηκαν με τα υποστρώματα, παρουσία Tris-HCl και σε ελαφρώς αλκαλικό pH για 1.30-3 ώρες στους 37°C. Για τον τερματισμό της αντίδρασης προστέθηκε παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα σε περίσσεια και μετρήθηκαν τα επίπεδα φθορισμού (μήκος κύματος διέγερσης: 360nm, μήκος κύματος εκπομπής: 460nm). Ακολούθησε αναγωγή των μονάδων φθορισμού (RFU) μέσω υπολογισμού της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης (Bradford).

Γ.2.5.2 Ποσοτικοποίηση Κλαστερίνης

Για τη μέτρηση της κλαστερίνης χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο kit ELISA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (BioVendor). Σε μικροπλάκα 96 θέσεων επικαλυμμένη με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι κλαστερίνης προστέθηκαν αρχικά τα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα (πρότυπη καμπύλη). Ακολούθησε προσθήκη δευτερογενούς μονοκλωνικού αντισώματος σημασμένου με βιοτίνη, και στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση (HRP). Τέλος προστέθηκε το κατάλληλο υπόστρωμα TMB και η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από προσθήκη οξικού οξέος. Η απορρόφηση προσδιορίστηκε στα 450nm. Μέσω αντιστοίχισης με την πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκε η συγκέντρωση κλαστερίνης σε ng/mL.

Γ.2.6 Παράμετροι Ομοιόστασης Ασβεστίου κι Εξωτερίκευσης Φωσφατιδυλοσερίνης

Γ.2.6.1 Ενδοκυττάρια Επίπεδα Ασβεστίου

Ο λιπόφιλος εστέρας Fluo 4-AM χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της ενδοκυττάριας συσσώρευσης ασβεστίου. Αφού διαπεράσει την ερυθροκυτταρική μεμβράνη, εντός του κυττάρου ο εστέρας κόβεται από εστεράσες, αντιδρά με ιόντα ασβεστίου και φθορίζει σε επίπεδα ανάλογα της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου. Κατά την πειραματική διαδικασία, το ολικό αίμα φυγοκεντρήθηκε (1000xg) και τα συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα αραιώθηκαν 1:1 με ισότονο PBS. Δείγμα ερυθροκυττάρων επώαστηκε με το αντιδραστήριο Fluo 4-AM παρουσία ισότονου ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου (NaCl 145mM – KCl 7,5mM – CaCl₂ 1,8 mM – Γλυκόζη 10mM – HEPES/NaOH 10mM – πυροσταφυλικό νάτριο 10mM) για 40 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για απομάκρυνση της περίσσειας εστέρα και εκ νέου επώαση για 30 λεπτά στις ίδιες συνθήκες. Τέλος, προστέθηκε απεσταγμένο νερό για τη λύση των κυττάρων και έγινε μέτρηση στο φθορισμόμετρο (μήκος κύματος διέγερσης: 485nm, μήκος κύματος εκπομπής: 520nm). Οι μονάδες φθορισμού (RFU) κανονικοποιήθηκαν ως προς την πρωτεϊνική συγκέντρωση κάθε δείγματος (Bradford).

Γ.2.6.2 Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης

Η εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην επιφάνεια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης ανιχνεύθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής. Πιο συγκεκριμένα, τα ερυθροκύτταρα επώαστηκαν με FITC (ισοθειοκυανική φθοροεσκειίνη)-σημασμένο αντίσωμα έναντι του μορίου CD235 (γλυκοφορίνη A), καθώς η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι χαρακτηριστική ερυθροκυτταρική πρωτεΐνη (ερυθροκυτταρικός δείκτης). Επίσης, έγινε επώαση με αννεξίνη V σημασμένη με φυκοερυθρίνη (PE) σε ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα ασβεστίου, με σκοπό τη δέσμευση των PS⁺-ερυθροκυττάρων. Τα δείγματα παρέμειναν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι κι η αντίδραση διακόπηκε με περίσσεια διαλύματος ασβεστίου. Το εναιώρημα των ερυθροκυττάρων διασταυρώθηκε με τη δέσμη Laser στο κυτταρόμετρο και οι δύο φθορίζουσες ουσίες μετρήθηκαν με πολυχρωματική ανάλυση (FITC: εκπομπή στα 520nm, PE: εκπομπή στα 580nm). Μέσω του προγράμματος CELL Quest Software υπολογίστηκε το ποσοστό των PS⁺-ερυθροκυττάρων.

Γ.2.6.3 Θρομβωτική Ικανότητα Κυστιδίων

Ο υπολογισμός της θρομβωτικής ικανότητας των κυστιδίων έγινε με τη χρήση ειδικού kit ELISA, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (HYPHEN BioMed). Σε μικροπλάκα 96 θέσεων, προ-επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με βιοτινυλιωμένη αννεξίνη V επώαστηκαν για 1 ώρα στους 37°C τα δείγματα πλάσματος/υπερκειμένου (N=8 ανά κατηγορία αιμοδοτών) και τα πρότυπα διαλύματα (πρότυπη καμπύλη). Όλα τα δείγματα είχαν αραιωθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία αναστολέων ασβεστίου, παράγοντα Χα και θρομβίνης. Τα κυστίδια που έφεραν στην επιφάνειά τους PS θα προσδένονταν υπό αυτές τις συνθήκες στην αννεξίνη V. Ακολούθησαν πλύσεις για απομάκρυνση των μη προσδεδεμένων κυστιδίων και προσθήκη μείγματος των παραγόντων Χα-Va (παρουσία ασβεστίου) και προθρομβίνης και επώαση στο σκοτάδι για 10 λεπτά. Παρουσία PS και ασβεστίου, οι παράγοντες Χα, Va ενεργοποιούν την προθρομβίνη σε θρομβίνη. Επομένως, με την προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος θρομβίνης και λήξη της αντίδρασης με κιτρικό οξύ, ανιχνεύεται φωτομετρικά στα 405nm η παραγωγή θρομβίνης η οποία είναι ανάλογη με την περιεκτικότητα PS. Μέσω αντιστοίχισης με την πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκε η συγκέντρωση των προθρομβωτικών κυστιδίων σε nM PS.

Γ.2.7 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης βασίζεται στην αρχή λειτουργίας ενός καθοδικού σωλήνα ο οποίος περιέχει πηνία που κατευθύνουν την ηλεκτρονιακή δέσμη ώστε να πραγματοποιηθεί «σάρωση» της επιφάνειας του δείγματος. Όταν τα ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν με το δείγμα, ανακλώνται και απομακρύνονται από την επιφάνεια του δείγματος. Για την παρατήρηση της επιφανειακής μορφολογίας των ερυθροκυττάρων, όπως έλαβε χώρα στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιούνται τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, δηλαδή αυτά που εξέρχονται από την επιφάνεια του δείγματος. Για να επιτευχθεί αυτό, τα μονιμοποιημένα ερυθροκύτταρα πρέπει να καλυφθούν με ένα στρώμα ηλεκτρονιόπυκνων υλικών (και συγκεκριμένα χρυσού-παλλαδίου) για να γίνει αγωγή η επιφάνειά τους. Για τη διαδικασία της μονιμοποίησης, δείγμα ερυθροκυττάρων (N=8 ανά κατηγορία αιμοδοτών) προστίθεται σε διάλυμα 2% γλουταρικής αλδεΐδης/0,1 mM κακοδυλικού νατρίου με pH 7,4 κι επώαζεται για 1 ώρα. Ακολουθούν πλύσεις με διάλυμα 4% σουκρόζης σε κακοδυλικό νάτριο pH 7,4 και δεύτερη μονιμοποίηση με 1% τετροξείδιο του οσμίου σε 0,1mM κακοδυλικό νάτριο pH 7,4. Για την απομάκρυνση του νερού, τα κύτταρα εκτίθενται σε ανιούσες συγκεντρώσεις αιθανόλης (30%-100%) και ακολουθεί η κάλυψη με το μείγμα χρυσού-παλλαδίου. Κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση λήφθηκαν ηλεκτρονιογραφίες σε μεγέθυνση x1000 και τα ερυθροκύτταρα χαρακτηρίστηκαν ως αναστρέψιμης ή όχι μορφολογίας. Τουλάχιστον 2000 κύτταρα αξιολογήθηκαν για κάθε δείγμα και υπολογίστηκε το ποσοστό των μη αναστρέψιμων παραμορφώσεων.

Γ.2.8 Μεταβολωμική και Πρωτεωμική Ανάλυση

Γ.2.8.1 Μεταβολωμική Ανάλυση

Για τη μεταβολωμική ανάλυση, 100μL αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων (N=15 ανά κατηγορία αιμοδοτών) συλλέχθηκαν σε εβδομαδιαία βάση, εκχυλίστηκαν σε αναλογία 1:6 σε διάλυμα μεθανόλης:ακετονιτριλίου:νερού (5:3:2) και αναλύθηκαν μέσω υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης –

φασματομετρίας μάζας (Ultra High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, UHPLC-MS) (Nemkov et al. 2019). Τα δείγματα προστέθηκαν σε στήλη με κλίση από 5 έως 95% (φάση A: νερό + 0,1% φορμικό οξύ, φάση B: ακετονιτρίλιο + 0,1% φορμικό οξύ). Τα μόρια με υψηλότερη συγγένεια προς τη στερεή φάση παραμένουν στη στήλη περισσότερη ώρα, ενώ άλλα μόρια κινούνται γρηγορότερα με τη βοήθεια της κινητής φάσης. Τα μόρια που εξέρχονται από τη στήλη εκλούνται με τη μορφή ατμού ιονισμένων μορίων σε φασματόμετρο, το οποίο σαρώνει σε πλήρη λειτουργία φασματομετρίας μάζας ή μέσω ανεξάρτητου κατακερματισμού (MS/MS ανάλυση) σε ανάλυση 70.000 [60–900 m/z εύρος, 4 kV τάση ψεκασμού, 15 αέριο θήκης (sheath gas), και 5 βοηθητικό αέριο (auxiliary gas)] με αρνητική κι έπειτα θετική λειτουργία ιόντων (σε ξεχωριστούς κύκλους ανάλυσης). Τα ιόντα ανιχνεύονται με την παραγωγή ενός φάσματος μάζας. Στην παρούσα έρευνα η κατανομή των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε έναντι εσωτερικής πρότυπης βιβλιοθήκης και δεν έλαβε χώρα προεπεξεργασία των δεδομένων (κανονικοποίηση ή λογαρίθμηση) (Nemkov et al. 2017).

Γ.2.8.2 Πρωτεωμική Ανάλυση

Για την διεκπεραίωση της πρωτεωμικής ανάλυσης (N=12 ανά κατηγορία αιμοδοτών) έλαβε χώρα υγρή χρωματογραφία νάνο-υπερυψηλής απόδοσης – φασματομετρία μάζας (nano-UHPLC-MS) (Reisz et al. 2017). Αρχικά, πρωτεϊνικά δείγματα μεμβρανών ή κυστιδίων υπέστησαν πέψη σε ένα φίλτρο S-Trap. Τα δείγματα φορτώθηκαν σε ξεχωριστά Enotips για αφαλάτωση και στη συνέχεια εκπλύθηκαν με 20μL 0,1% φορμικού οξέος. Το σύστημα Enosep One παραλαμβάνει αυτόματα τα Enotips και τα μεταφέρει σε ειδική θύρα όπου και εφαρμόζεται μερική κλίση σε υψηλή ροή και χαμηλή πίεση σε κάθε Enotip. Έτσι εκλούνται κάποια μόρια προς ανάλυση και παραμένουν τα υψηλού μοριακού βάρους και τα πολύ υδρόφοβα μόρια στο Enotip. Οι εκλουθείσες αναλυόμενες ουσίες μετατοπίζονται εντός της κλίσης με τη δράση επιπλέον αντλιών υψηλής ροής/χαμηλής πίεσης. Τα μόρια μεταφέρονται σε συζευγμένο φασματόμετρο μάζας timsTOF Pro μετά από ιονισμό και ατμοποίηση και γίνεται ανίχνευση με την παραγωγή ενός φάσματος μάζας. Στην παρούσα εργασία τα δεδομένα συλλέχθηκαν σε εύρος 100-1700 m/z για MS και MS/MS στο timsTOF Pro όργανο χρησιμοποιώντας χρόνο ανάλυσης 100 ms. Τα επίπεδα κάθε πρωτεΐνης κανονικοποιήθηκαν ως προς τη συνολική ποσότητα πρωτεΐνης.

Γ.2.9 In vitro Μοντέλο Μετάγγισης

Για τη μελέτη φυσιολογικών παραμέτρων των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων μετά την επαφή τους με πλάσμα σε θερμοκρασία σώματος χρησιμοποιήθηκε ένα *in vitro* μοντέλο της μετάγγισης. Πιο συγκεκριμένα, αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα (N=10 ανά κατηγορία αιμοδοτών) φυγοκεντρήθηκαν (1000xg) και το ίζημα αναμίχθηκε με υπερκείμενο (της ίδιας μονάδας μετάγγισης) και φρέσκο πλάσμα (υγιούς ή ασθενούς με β-μεσογειακή αναιμία, N=10 ανά κατηγορία δέκτη). Η αναλογία της ανάμιξης ήταν αντίστοιχη της χορήγησης 2 μονάδων μετάγγισης. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία σώματος για 24 ώρες και μελέτη πλήθους παραμέτρων αιμόλυσης και οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου.

Γ.2.10 Ζωικό Μοντέλο Μετάγγισης

Ερυθροκύτταρα από φρέσκο αίμα, καθώς και από αποθηκευμένο για μικρό (<4 ημερών) ή μεγάλο (>39 ημερών) χρονικό διάστημα (N=8 ανά κατηγορία αιμοδοτών) σημάνθηκαν με τις λιπόφιλες χρωστικές D-383 (1,1'-Didodecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate, για τους ετερόζυγους) και D-307 (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate, για τους μάρτυρες) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Ερυθροκύτταρα από τις δύο κατηγορίες αιμοδοτών αναμίχθηκαν σε αναλογία 1:1 σε 55% αιματοκρίτη και μεταγγίστηκαν σε 16 μύες-δέκτες (8 ανοσοεπαρκείς και 8 ανοσοανεπαρκείς) με ενδοφλέβια ένεση στην ουραία φλέβα. Ο μεταγγισμένος όγκος (~200μL) αντιστοιχεί στη χορήγηση δύο μονάδων μετάγγισης (1 από κάθε αιμοδότη). Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε 16 επιπλέον μύες με την αντίστροφη χρώση (D-307 για τους ετερόζυγους και D-383 για τους μάρτυρες) για να εξασφαλιστεί πως δεν σημαίνονται διαφορετικά τα κύτταρα των δύο ομάδων αιμοδοτών. Παραλήφθηκε αίμα από την φλέβα του προσώπου του ζωικού μοντέλο μία μέρα πριν, 20 λεπτά μετά (100% ανάκτηση) και 24 ώρες μετά (24ωρη ανάκτηση) τη μετάγγιση για να αξιολογηθεί (α) η μετα-μεταγγισιακή ανάκτηση μέσω κυτταρομετρίας ροής και (β) τα επίπεδα ενδοαγγειακής αιμόλυσης (Harboe). Επίσης, συλλέχθηκαν ούρα τις ίδιες χρονικές στιγμές για να μετρηθούν τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης σε αυτά (Harboe). Αίμα και ούρα παραλήφθηκαν και από 20 επιπλέον μύες (10 ανοσοεπαρκείς και 10 ανοσοανεπαρκείς) που είχαν δεχθεί μετάγγιση μόνο από ένα γενετικό υπόβαθρο αιμοδότη για να ανιχνευθεί τυχόν διαφορετική επίδραση σε άμεσα αιμολυτικά φαινόμενα.

Γ.2.11 Στατιστική Ανάλυση και Κατασκευή Βιολογικών 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 διαφορετικές ομάδες δειγμάτων ελέγχθηκαν μέσω t-test για ανεξάρτητα δείγματα και ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one way analysis of variance, ANOVA). Οι χρονο-εξαρτώμενες διαφορές εντοπίστηκαν με ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (repeated measures ANOVA). Όπου χρειάστηκε, όπως για την αξιολόγηση πολλαπλών συγκρίσεων κατά τη διάρκεια της αποθηκευτικής περιόδου, εφαρμόστηκε προσαρμογή τύπου Bonferroni. Για τον εντοπισμό πιθανών συσχετίσεων ανάμεσα σε διαφορετικές παραμέτρους ή ξεχωριστά επίπεδα της αλυσίδας της μετάγγισης (δότης – μονάδα μετάγγισης – δέκτης) πραγματοποιήθηκαν οι έλεγχοι Pearson and Spearman ανάλογα με την κατανομή των προς εξέταση παραμέτρων μετά από επιπλέον προσαρμογή τύπου Bonferroni. 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 $P < 0,01$, ενώ σε συγκρίσεις ανάμεσα σε υποομάδες χαμηλού αριθμού δειγμάτων (π.χ. πρωτεωμική ανάλυση ανάλογα με τη μεταλλαγή του αιμοδότη) τα αποτελέσματα, πλέον της στατιστικής σημασίας, αξιολογήθηκαν και με βάση το ποσοστό αυξομείωσης (fold change > 1,25).

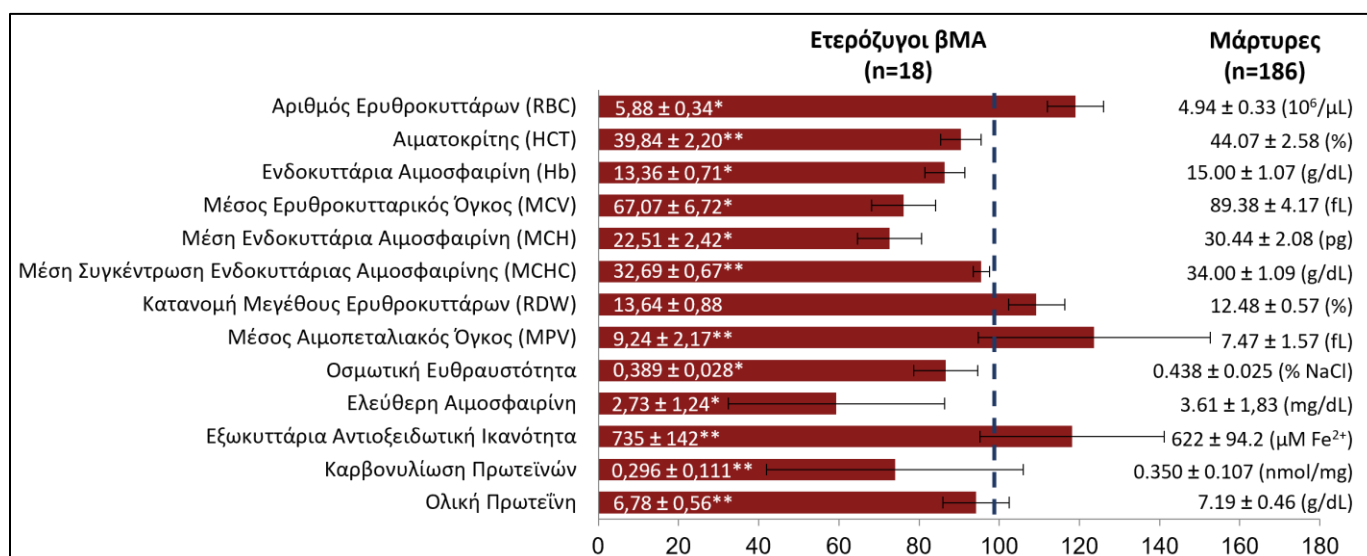
Η ανάλυση δικτύων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Cytoscape (έκδοση 3.2.0) το οποίο ενδείκνυται για την οπτικοποίηση και την ανάλυση βιολογικών δικτύων συσχετίσεων και

αλληλεπιδράσεων. Ως δεδομένα εισόδου χρησιμοποιήθηκαν αιματολογικές, βιοχημικές, μεταβολικές, πρωτεϊνικές και βιολογικές παράμετροι ανάμεσα στις οποίες παρατηρήθηκαν 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, συμπεριλήφθηκαν αποκλειστικά συσχετίσεις που ικανοποιούσαν τη συνθήκη $P < 0,01$.

Δ. Αποτελέσματα

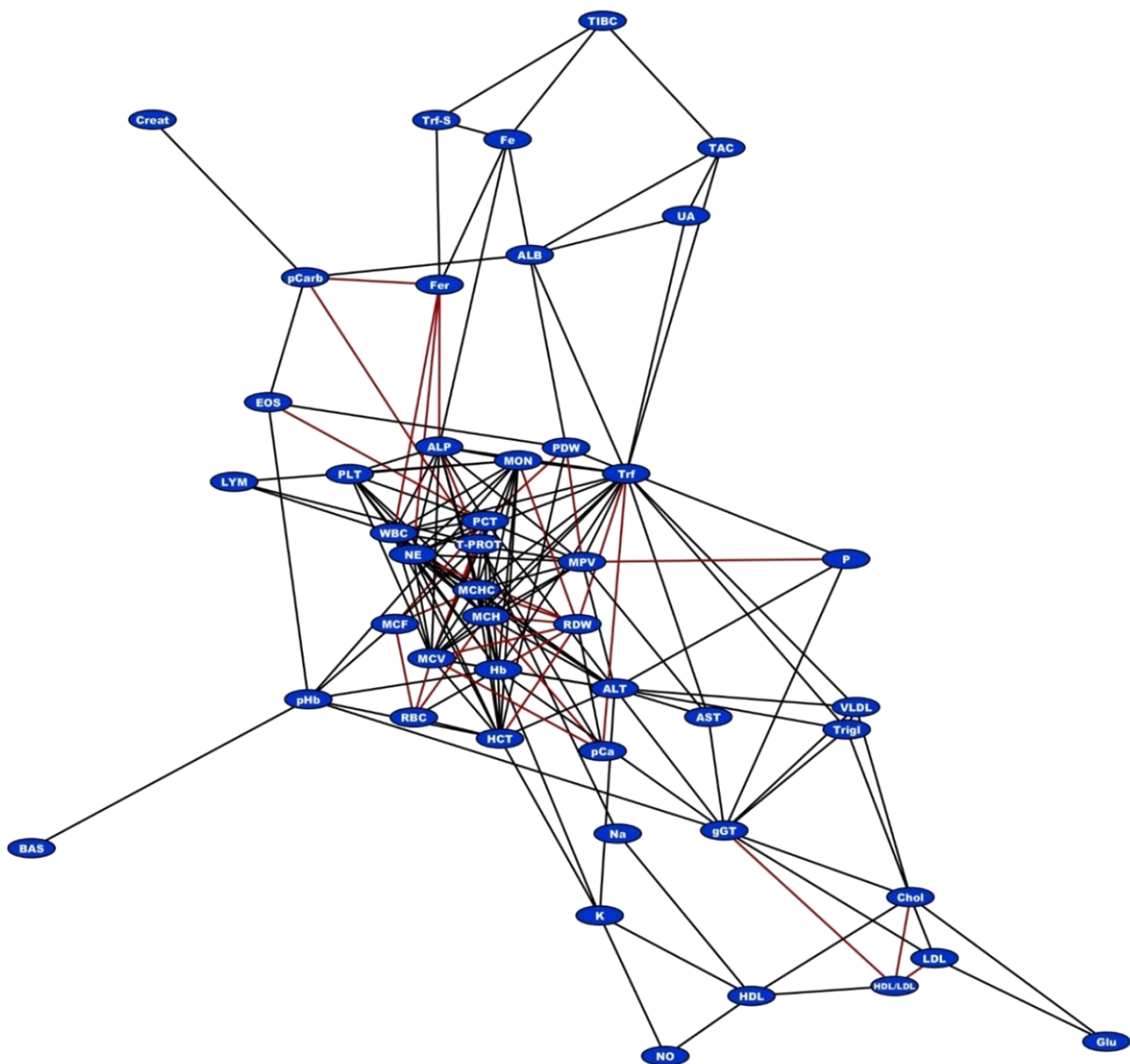
Δ.1 Μελέτη Φρέσκου Αίματος

Στο σύνολο των 204 αιμοδοτών που στρατολογήθηκαν, το 9% βρέθηκαν ετερόζυγοι για μεταλλαγές στο γονίδιο της β-σφαιρίνης. Μελετώντας τον τρόπο ζωής των αιμοδοτών, δεν παρουσιάστηκαν διαφορές μεταξύ των 2 κατηγοριών (κάπνισμα, σωματική άσκηση, αλκοόλ). Στην ομάδα των ετερόζυγων για βΜΑ αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική μείωση σε αιματολογικές παραμέτρους, όπως τον αιματοκρίτη, τον μέσο ερυθροκυτταρικό όγκο (MCV) και τη μέση αιμοσφαιρίνη του ερυθροκυττάρου (MCH) (**Εικόνα Δ1**). Αντιθέτως, βρέθηκε αυξημένος ο συνολικός αριθμός ερυθροκυττάρων. Διαφορές βρέθηκαν και σε παραμέτρους αιμόλυσης, με τους αιμοδότες με στίγμα να εμφανίζουν μειωμένη αυθόρμητη και οσμωτική αιμόλυση. Επιπλέον, οι ίδιοι αιμοδότες εμφάνισαν τάση για χαμηλότερη ολική πρωτεϊνική συγκέντρωση και πρωτεϊνική καρβονυλίωση στο πλάσμα σε συνδυασμό με οριακή τάση για ενισχυμένη αντιοξειδωτική ικανότητα (**Εικόνα Δ1**).

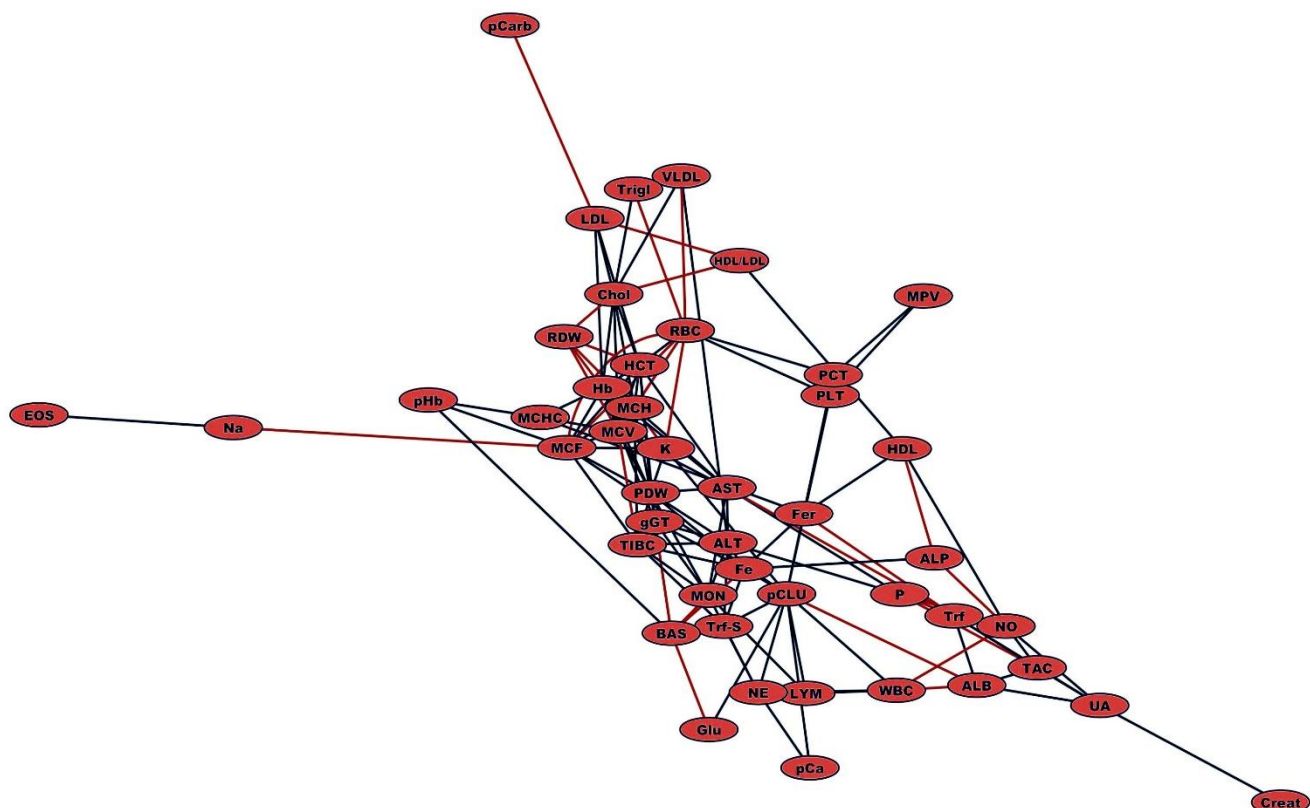


Εικόνα Δ1: Διαγραμματική απεικόνιση αιματολογικών, αιμολυτικών και οξειδοαναγωγικών παραμέτρων στο φρέσκο αίμα ετερόζυγων για β-μεσογειακή αναιμία αιμοδοτών μετά από κανονικοποίηση προς τα επίπεδα των αιμοδοτών-μαρτύρων (μπλε διακεκομμένη γραμμή). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. (*) $P < 0,05$, (**) οριακή στατιστική σημασία.

Ακολούθησε ανάλυση εύρεσης συσχετίσεων και οπτικοποίηση αυτών ως βιολογικά δίκτυα (**Εικόνες Δ2, Δ3**). Ο συνολικός αριθμός των συνδέσεων δε διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων, ενώ κοινή ήταν και η πυρήνωση κλασσικών αιματολογικών παραμέτρων, καθώς και η δημιουργία συστάδας λιπιδίων – λιποπρωτεϊνών. Παρ' όλα αυτά, στο δίκτυο των ετερόζυγων κεντρική θέση, μαζί με τους αιματολογικούς δείκτες, κατείχαν παράμετροι ομοιόστασης σιδήρου και ηπατικής λειτουργίας, καθώς και η κλαστερίνη. Στους ετερόζυγους εντοπίστηκε, επίσης, συσχέτιση του δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας με τα εξωκυττάρια επίπεδα K^+ και Na^+ , ενώ η παρουσία της πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης στο δίκτυό τους ήταν αισθητά μικρότερη σε σχέση με το αντίστοιχο των μαρτύρων (**Εικόνες Δ2, Δ3**).



Εικόνα Δ2: Βιολογικό δίκτυο στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων μεταξύ παραμέτρων του φρέσκου αίματος αιμοδοτών-μαρτύρων. Με μαύρη γραμμή αναπαρίστανται οι θετικές, ενώ με κόκκινη οι αρνητικές συσχετίσεις. **ALB:** αλβουμίνη ορού, **ALP:** αλκαλική φωσφατάση, **ALT:** αμινοτρανσφεράση της αλανίνης, **AST:** αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος, **BAS:** βασεόφιλα, **Chol:** χοληστερόλη, **Creat:** κρεατινίνη, **EOS:** ηωσινόφιλα, **Fe:** σίδηρος, **Fer:** φερριτίνη, **gGT:** γ-γλουταμυλ-τρανσφεράση, **Glu:** γλυκόζη ορού, **Hb:** ενδοκυττάρια αιμοσφαιρίνη, **HCT:** αιματοκρίτης, **HDL:** λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, **K:** ιόντα καλίου, **LDL:** λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας, **LYM:** λεμφοκύτταρα, **MCF:** δείκτης οσμωτικής ευθραυστότητας, **MCH:** μέση ερυθροκυτταρική αιμοσφαιρίνη, **MCHC:** μέση συγκέντρωση ερυθροκυτταρικής αιμοσφαιρίνης, **MCV:** μέσος ερυθροκυτταρικός όγκος, **MON:** μονοκύτταρα, **MPV:** μέσος αιμοπεταλιακός όγκος, **Na:** ιόντα νατρίου, **NE:** ουδετερόφιλα, **NO:** μονοξείδιο του αζώτου, **P:** φώσφορος, **pCa:** ασβέστιο ορού, **pCarb:** καρβονυλίωση πρωτεϊνών πλάσματος, **PCT:** αιμοπεταλιοκρίτης, **PDW:** κατανομή μεγέθους αιμοπεταλίων, **pHb:** ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, **PLT:** αριθμός αιμοπεταλίων, **RBC:** αριθμός ερυθροκυττάρων, **RDW:** κατανομή μεγέθους ερυθροκυττάρων, **T-PROT:** ολική πρωτεΐνη πλάσματος, **TAC:** αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος, **TIBC:** ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα, **Trf:** τρανσφερίνη, **Trf-S:** κορεσμός τρανσφερίνης, **Trigl:** τριγλυκερίδια, **UA:** ουρικό οξύ ορού, **VLDL:** λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας, **WBC:** λευκά αιμοσφαίρια.



Εικόνα Δ3: Βιολογικό δίκτυο στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων μεταξύ παραμέτρων του φρέσκου αίματος αιμοδοτών-ετερόζυγων για βΜΑ. Με μαύρη γραμμή αναπαρίστανται οι θετικές, ενώ με κόκκινη οι αρνητικές συσχετίσεις. **ALB:** αλβουμίνη ορού, **ALP:** αλκαλική φωσφατάση, **ALT:** αμινοτρανσφεράση της αλανίνης, **AST:** αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος, **BAS:** βασεόφιλα, **Chol:** χοληστερόλη, **Creat:** κρεατινίνη, **EOS:** ηωσινόφιλα, **Fe:** σίδηρος, **Fer:** φερριτίνη, **gGT:** γ-γλουταμυλ-τρανσφεράση, **Glu:** γλυκόζη ορού, **Hb:** ενδοκυττάρια αιμοσφαιρίνη, **HCT:** αιματοκρίτης, **HDL:** λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, **K:** ιόντα καλίου, **LDL:** λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας, **LYM:** λεμφοκύτταρα, **MCF:** δείκτης οσμωτικής ευθραυστότητας, **MCH:** μέση ερυθροκυτταρική αιμοσφαιρίνη, **MCHC:** μέση συγκέντρωση ερυθροκυτταρικής αιμοσφαιρίνης, **MCV:** μέσος ερυθροκυτταρικός όγκος, **MON:** μονοκύτταρα, **MPV:** μέσος αιμοπεταλιακός όγκος, **Na:** ιόντα νατρίου, **NE:** ουδετερόφιλα, **NO:** μονοξείδιο του αζώτου, **P:** φώσφορος, **pCa:** ασβέστιο ορού, **pCarb:** καρβονυλίωση πρωτεϊνών πλάσματος, **pCLU:** κλαστερίνη πλάσματος, **PCT:** αιμοπεταλιοκρίτης, **PDW:** κατανομή μεγέθους αιμοπεταλίων, **pHb:** ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, **PLT:** αριθμός αιμοπεταλίων, **RBC:** αριθμός ερυθροκυττάρων, **RDW:** κατανομή μεγέθους ερυθροκυττάρων, **TAC:** αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος, **TIBC:** ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα, **Trf:** τρανσφερρίνη, **Trf-S:** κορεσμός τρανσφερρίνης, **Trigl:** τριγλυκερίδια, **UA:** ουρικό οξύ ορού, **VLDL:** λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας, **WBC:** λευκά αιμοσφαίρια.

Δ.2 Αποθηκευτική Ικανότητα Ερυθροκυττάρων

Από το σύνολο των 204 αιμοδοτών επιλέχθηκαν 18 ετερόζυγοι και 20 μάρτυρες για να πραγματοποιηθεί μία κατά ζεύγη μελέτη της φυσιολογίας, του μεταβολισμού και της πρωτεϊνικής σύστασης τόσο πριν, όσο και κατά τη διάρκεια της αποθηκευτικής περιόδου σε συνθήκες τράπεζας αίματος.

Δ.2.1 Δημογραφικά - Αιματολογικά Στοιχεία

Οι δύο ομάδες αιμοδοτών παρουσίαζαν παρόμοια σύσταση βάσει φύλου, ηλικίας και φυλετικής καταγωγής, και είχαν κοινές συνήθειες σε σχέση με το κάπνισμα και τη συχνότητα αιμοδοσίας. Όσον αφορά στις ομάδες αίματος, υπήρχε μία επικράτηση της ομάδας 0 στην ομάδα των ετερόζυγων. Αναφορικά με τις

αιματολογικές παραμέτρους, οι αιμοδοτές με στίγμα είχαν αυξημένους τους δείκτες του συνολικού αριθμού ερυθροκυττάρων, της κατανομής του μεγέθους τους (RDW) και της HbA₂, ενώ εμφάνιζαν μειωμένους τους δείκτες MCV και MCH (**Πίνακας Δ1**). Η επαλήθευση της ετεροζυγωτίας έγινε με ανίχνευση των μεταλλαγών στο γονίδιο της β-σφαιρίνης. Οι μεταλλαγές που εντοπίστηκαν ήταν κλασικές μεσογειακές μεταλλαγές, συχνά εμφανιζόμενες στον Ελλαδικό χώρο (IVS I-1, IVS I-6, IVS I-110, IVS II-1 και IVS II-745).

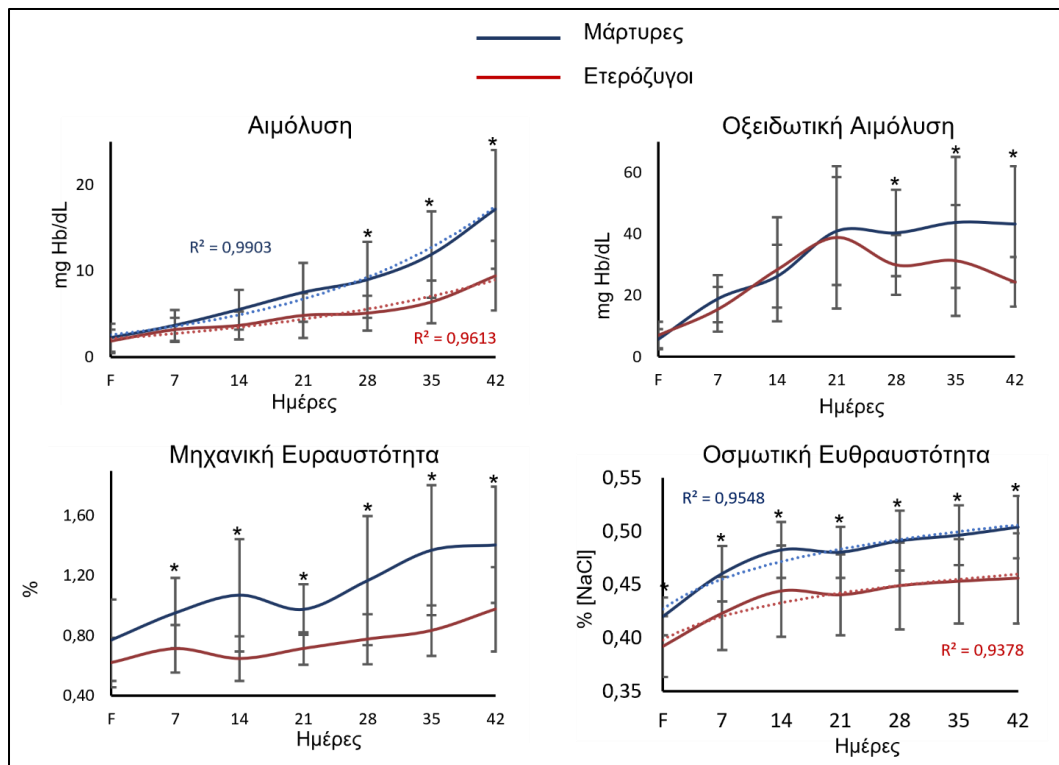
Πίνακας Δ1. Δημογραφικά και Αιματολογικά Στοιχεία Αιμοδοτών

	Μάρτυρες (n=20)	Ετερόζυγοι βMA (n=18)
Φύλο (Α/Θ)	16/4	15/3
Ηλικία (χρόνια)	38±14	40±10
Εθνικότητα	Ελληνική	Ελληνική
Ομάδα Αίματος (Α/Β/Ο)	9/2/9	5/0/13
Rhesus (+/-)	17/3	14/4
Κάπνισμα (Ν/Ο)	10/10	10/8
Συχνότητα Αιμοδοσίας/Χρόνο	1,72±0,46	1,63±0,67
Αριθμός Ερυθροκυττάρων (RBC) (x10 ⁶ /μL)	5,05±0,35	6,48±0,49*
Αιματοκρίτης (Hct) (%)	43,70±3,77	42,58±2,32
Συνολική Αιμοσφαιρίνη (Hb) (g/dL)	14,49±1,45	13,93±0,53
Μέσος Ερυθροκυτταρικός Όγκος (MCV) (fL)	86,67±6,34	65,59±6,26*
Μέση Κυτταρική Αιμοσφαιρίνη (MCH) (pg)	28,72±2,32	21,16±2,36*
Μέση Συγκέντρωση Κυτταρικής Αιμοσφαιρίνης (MCHC) (g/dL)	33,13±1,31	32,21±1,18
Κατανομή Μεγέθους Ερυθροκυττάρων (RDW) (%)	13,36±1,33	15,84±2,16*
Λευκά Αιμοσφαίρια (WBC) (x10 ³ /μL)	7,27±2,07	7,55±1,47
Αριθμός Αιμοπεταλίων (x10 ³ /μL)	255±52	230±41
Αιμοπεταλιοκρίτης (PCT) (%)	0,26±0,08	0,24±0,05
Μέσος Αιμοπεταλιακός Όγκος (MPV) (fL)	10,22±1,59	10,67±1,30
Γλυκοζυλιωμένη Αιμοσφαιρίνη (HbA _{1c}) (%)	4,94±0,35	5,17±0,40
Αιμοσφαιρίνη A ₂ (HbA ₂) (%)	2,50±0,66	4,80±0,63*

Η ηλικία, η συχνότητα αιμοδοσίας και οι αιματολογικές παράμετροι παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. (*) P < 0,05

Δ.2.2 Παράμετροι Αιμόλυσης

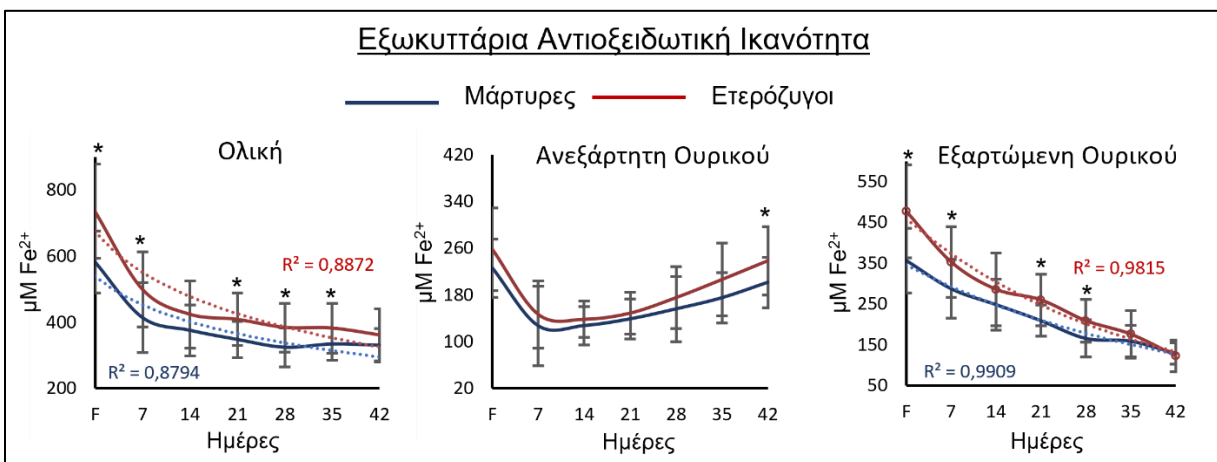
Τα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων για βMA αιμοδοτών παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα αυθόρμητης και οξειδωτικής αιμόλυσης κατά τις τελευταίες 2 εβδομάδες της αποθήκευσης, ενώ εμφάνισαν χαμηλότερους δείκτες μηχανικής και οσμωτικής ευθραυστότητας καθολικά κατά την παραμονή τους στις μονάδες μετάγγισης. Μάλιστα, από τις τέσσερις παραμέτρους αιμόλυσης που μελετήθηκαν, η οσμωτική αιμόλυση εμφάνιζε διαφορά ήδη *in vivo*. Οι διαφορές στις παραμέτρους αιμόλυσης παρουσιάζονται διαγραμματικά στην **Εικόνα Δ4**.



Εικόνα Δ4: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων αυθόρμητης, οξειδωτικής, μηχανικής και οσμωτικής αιμόλυσης σε ερυθροκύτταρα αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν γραμμές τάσης εκθετικών ή λογαριθμικών μοντέλων για την αυθόρμητη και οσμωτική αιμόλυση, αντίστοιχα. (*) P < 0,05.

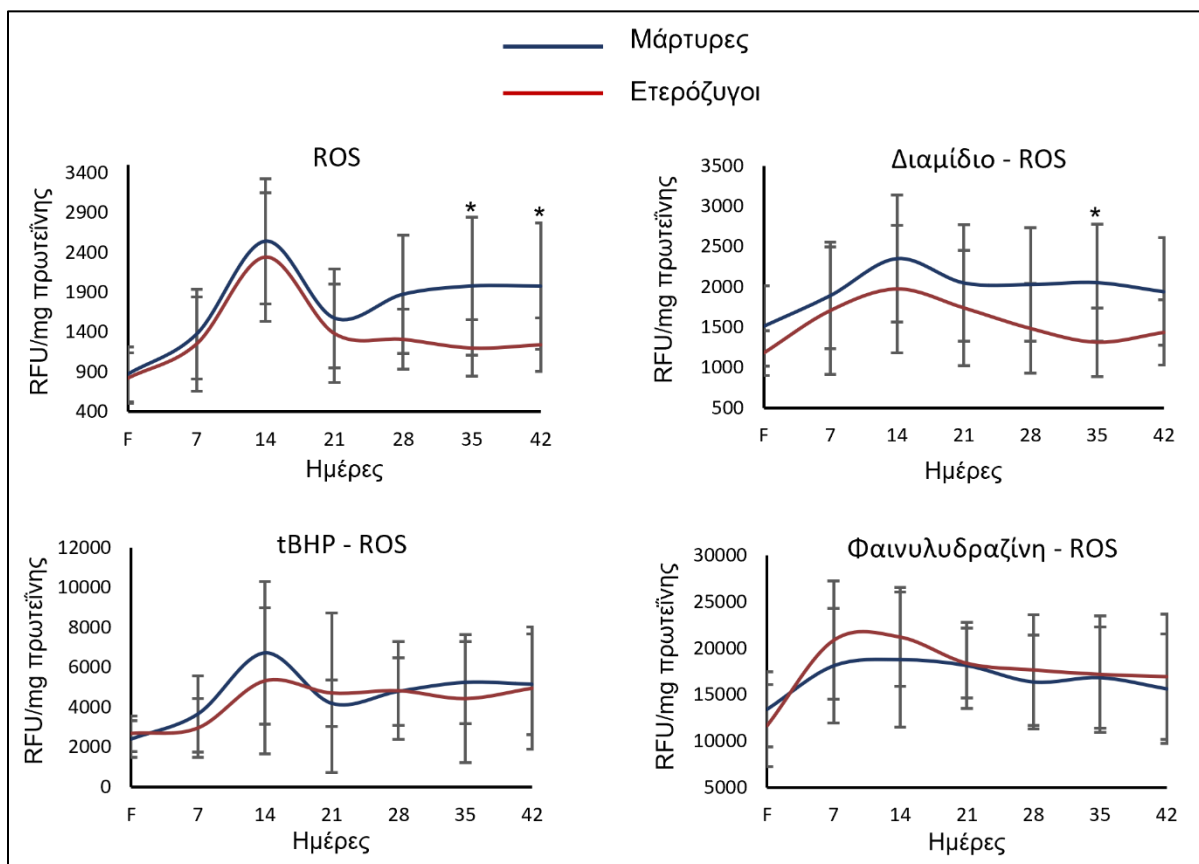
Δ.2.3 Οξειδοαναγωγικό Ισοζύγιο – Ομοιόσταση Ασβεστίου

Τόσο η ολική, όσο και η εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ εξωκυττάρια αντιοξειδωτική ικανότητα, βρέθηκαν αυξημένες στο πλάσμα και το υπερκείμενο των ετερόζυγων για βΜΑ αιμοδοτών, σε πλήρη αντίθεση με την ανεξάρτητη του ουρικού αντιοξειδωτική ικανότητα (**Εικόνα Δ5**).



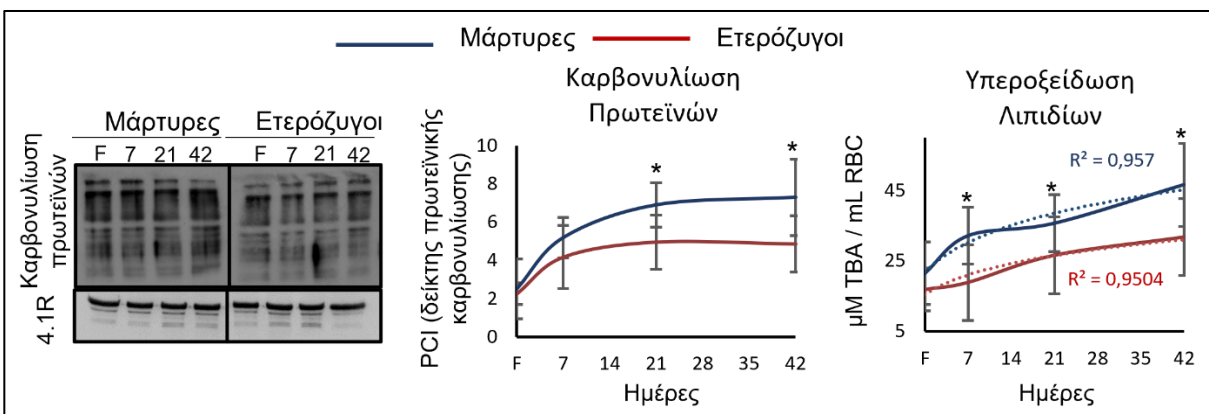
Εικόνα Δ5: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα/υπερκείμενο αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν γραμμές τάσης λογαριθμικών μοντέλων. (*) P < 0,05.

Εντός του κυττάρου παρατηρήθηκε τάση, που στη συνέχεια αναδείχθηκε ως στατιστικά σημαντική διαφορά, στην εγγενή παραγωγή ROS από το μέσο της αποθήκευσης και μετά, με τα κύτταρα των ετερόζυγων να πέφτουν σε χαμηλότερα επίπεδα από τα αντίστοιχα των μαρτύρων μετά την κορύφωση τη δεύτερη εβδομάδα παραμονής στον ασκό (**Εικόνα Δ6**). Μετά τη δράση του διαμιδίου, το οποίο έχει ως στόχο τη γλουταθειόνη (και κατ' επέκταση τις ομάδες θείου), παρατηρήθηκε η ίδια εικόνα με τις εγγενείς ROS, με χαμηλότερα επίπεδα στους ετερόζυγους στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου. Αντιθέτως, η επίδραση με τερτ-βούτυλ-υδροϋπεροξειδίο (tBHP) ή φαινυλδραζίνη – οξειδωτικά μόρια με γενική στόχευση ή εστιασμένη στην αιμοσφαιρίνη, αντίστοιχα – δε φάνηκε να επηρεάζει διαφορικά τις δύο κατηγορίες κυττάρων (**Εικόνα Δ6**).



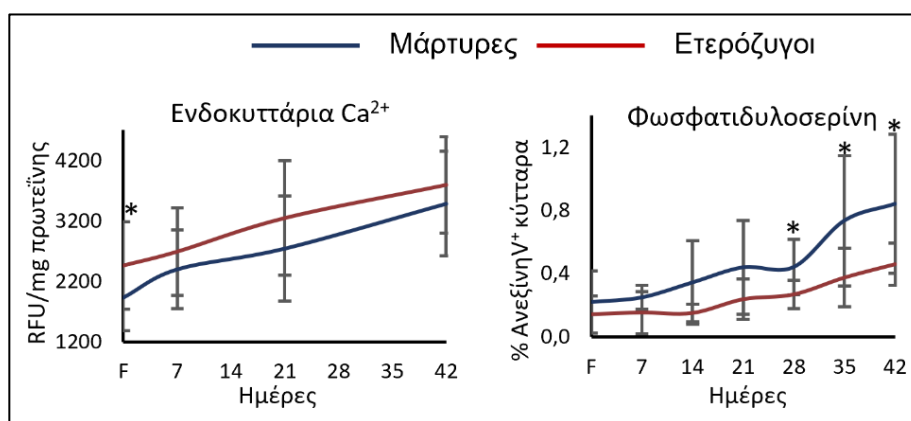
Εικόνα Δ6: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων ενδοκυττάρων δραστικών ριζών οξυγόνου, με ή χωρίς εξωγενές ερέθισμα, σε ερυθροκύτταρα αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. (*) P < 0,05.

Περνώντας στις οξειδωτικές βλάβες, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με στίγμα βΜΑ παρουσίασαν μειωμένη καρβονυλίωση και υπεροξειδωση, αντίστοιχα, είτε από το μέσο της αποθήκευσης και μετά, είτε καθολικά (**Εικόνα Δ7**).



Εικόνα Δ7: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων οξειδωσης μεμβρανικών συστατικών σε ερυθροκύτταρα αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. Διακεκομμένες γραμμές: γραμμές τάσης λογαριθμικών μοντέλων. Στην ανοσοεντόπιση: πρωτεΐνη 4.1R ως μάρτυρας ισοφόρτωσης. (*) $P < 0,05$.

Στην περίπτωση της ενδοκυττάριας συσσώρευσης ασβεστίου, παρότι οι ετερόζυγοι ξεκίνησαν με αυξημένα επίπεδα *in vivo*, η διαφορά αυτή διατηρήθηκε μόνο ως τάση κατά την αποθήκευση και δε μεταφράστηκε σε εξωτερική φωσφατιδυλοσερίνης (**Εικόνα Δ8**). Αντιθέτως, από το μέσο της αποθήκευσης και μετά στην επιφάνεια των κυττάρων των ετερόζυγων για βΜΑ εντοπίστηκε λιγότερη εξωτερικευμένη φωσφατιδυλοσερίνη σε σχέση με των μαρτύρων (**Εικόνα Δ8**).

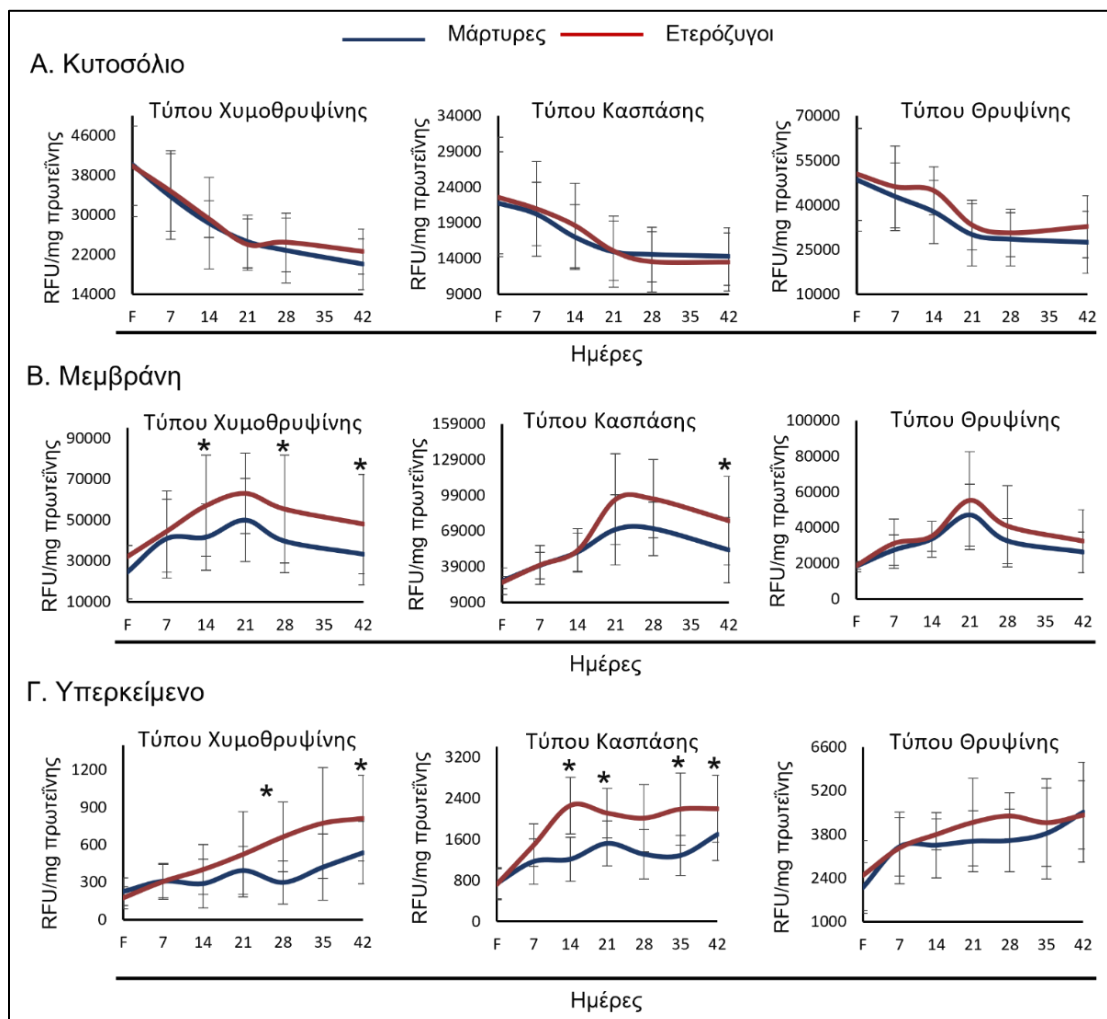


Εικόνα Δ8: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων ενδοκυττάριας ιόντων ασβεστίου και εξωτερικευμένης φωσφατιδυλοσερίνης, σε ερυθροκύτταρα αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. (*) $P < 0,05$.

Δ.2.4 Πρωτεασωμική Ενεργότητα

Όσον αφορά στο πρωτεοστατικό δυναμικό των ερυθροκυττάρων, η κυτοσολική πρωτεασωμική ενεργότητα (τύπου χυμοθρυψίνης, θρυψίνης και κασπάσης) δε διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων. Βρέθηκαν, όμως, αυξημένες οι ενεργότητες τύπου χυμοθρυψίνης και κασπάσης στη μεμβράνη και το υπερκείμενο των μονάδων από το μέσο της αποθηκευτικής περιόδου και μετά, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα Δ9**. Παρά τις όποιες διαφορές μεταξύ των δύο κατηγοριών αιμοδοτών, οι 3 πρωτεασωμικές ενεργότητες ακολουθούσαν το ίδιο

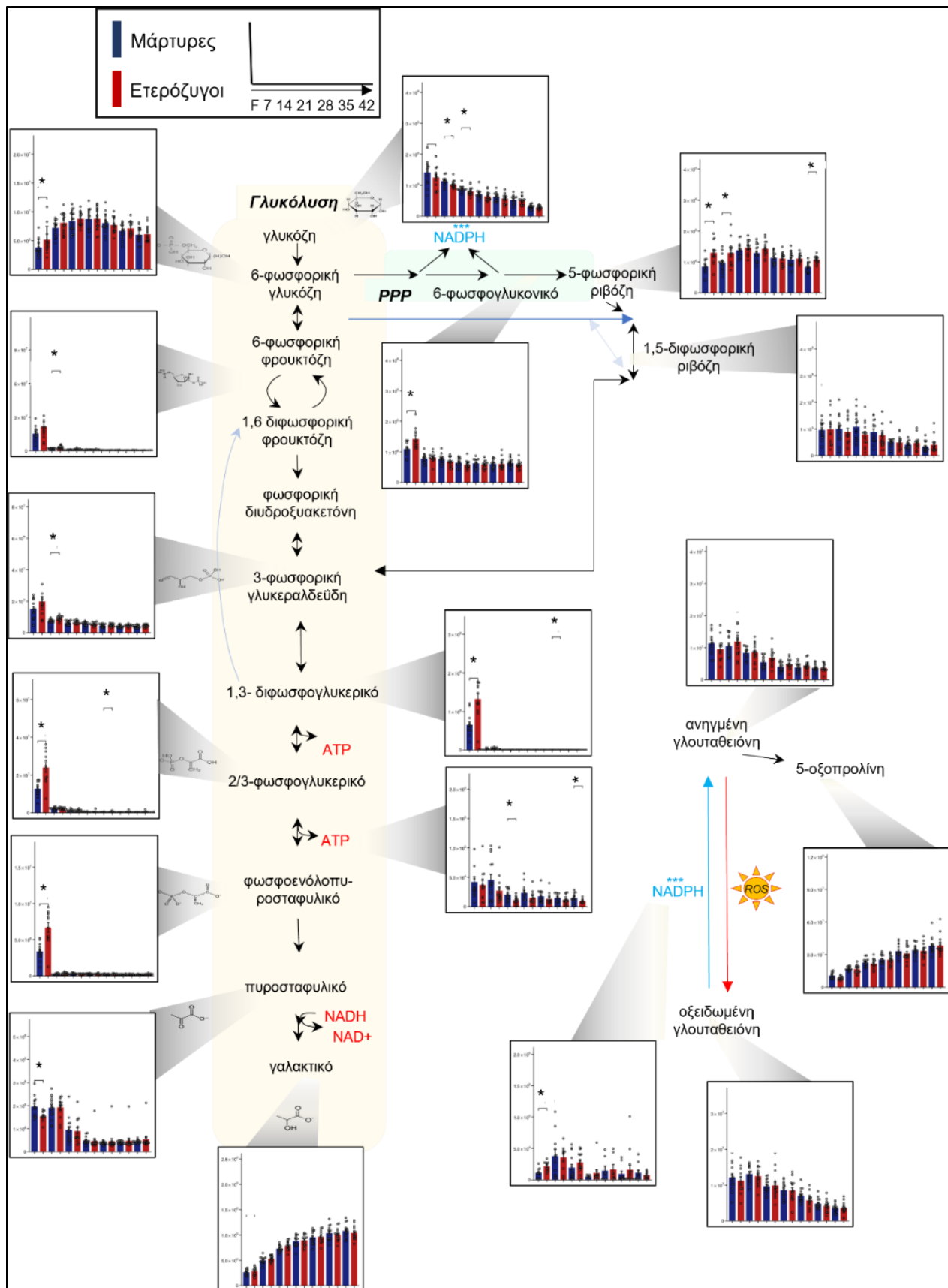
χρόνο-εξαρτώμενο μοτίβο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης: πτωτική πορεία στο κυτοσόλιο, αύξηση και πτώση στη μεμβράνη με μέγιστες τιμές προς το μέσο της αποθηκευτικής περιόδου, και αυξητική πορεία στο υπερκείμενο (Εικόνα Δ9).



Εικόνα Δ9: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων πρωτεασωματικής ενεργότητας στο κυτοσόλιο (Α), τη μεμβράνη (Β) και το υπερκείμενο (Γ) ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. (*) $P < 0,05$.

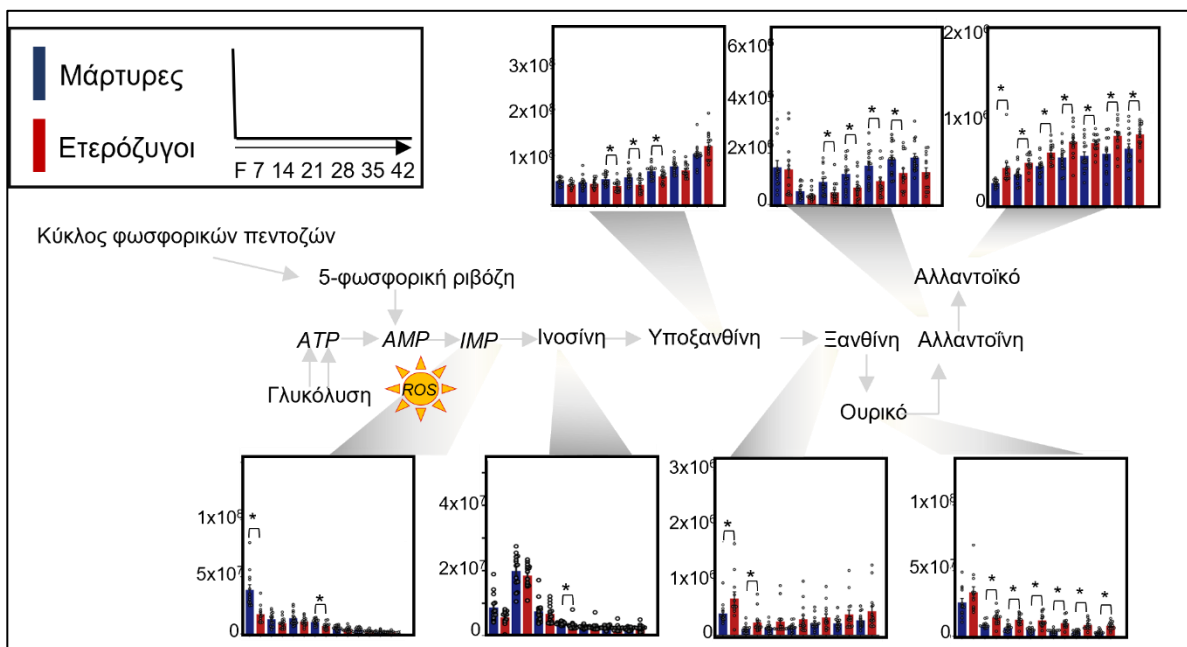
Δ.2.5 Μεταβολισμός

Μέσω μεταβολωμικής ανάλυσης αναδείχθηκαν διαφορές σε ορισμένα μεταβολικά μονοπάτια. Πιο συγκεκριμένα, καθολικά διαφοροποιημένα βρέθηκαν το μονοπάτι της γλυκόλυσης και ο κύκλος των φωσφορικών πεντοζών στα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων για βΜΑ *in vivo*, με αυξημένους τους μεταβολίτες αναρροϊκά της κινάσης του πυροσταφυλικού, χωρίς να επηρεάζεται όμως ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης (Εικόνα Δ10). Η διαφορά αυτή χάθηκε κατά την αποθήκευση και δεν συνεχίστηκε στον κύκλο των καρβοξυλικών οξέων.



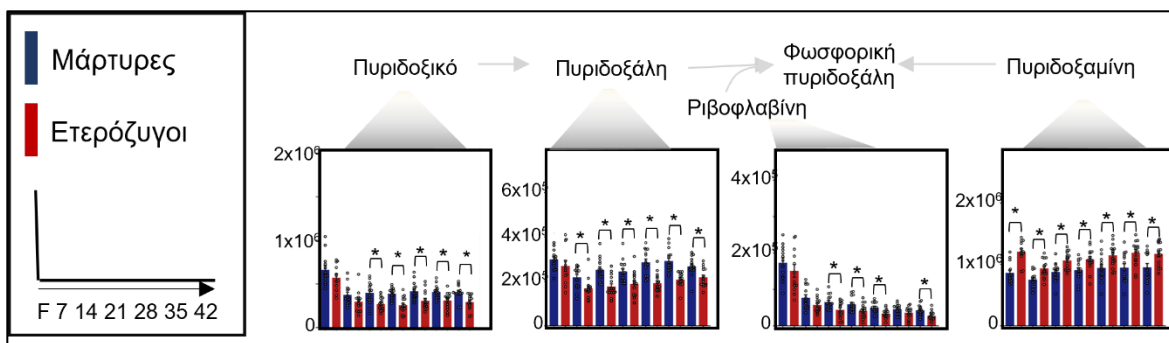
Εικόνα Δ10: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων μεταβολιτών των μονοπατιών της γλυκόλυσης, των φωσφορικών πεντοζών (PPP) και της οξείδωσης της γλουταθειόνης, σε ερυθροκύτταρα αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. (*) P < 0,05.

Σημαντικές διαφορές ανιχνεύθηκαν στο μεταβολισμό των πουρινών, με τους ετερόζυγους να εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ερυθροκυτταρικού ουρικού και αλλαντοϊκού οξέος κατά την αποθήκευση, αλλά παράλληλα μειωμένα επίπεδα αλλαντοΐνης και υποξανθίνης, όπως φαίνεται στην **Εικόνα Δ11**.



Εικόνα Δ11: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων μεταβολιτών της οξείδωσης/απαμίνωσης των πουρινών, σε ερυθροκύτταρα αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. (*) $P < 0,05$.

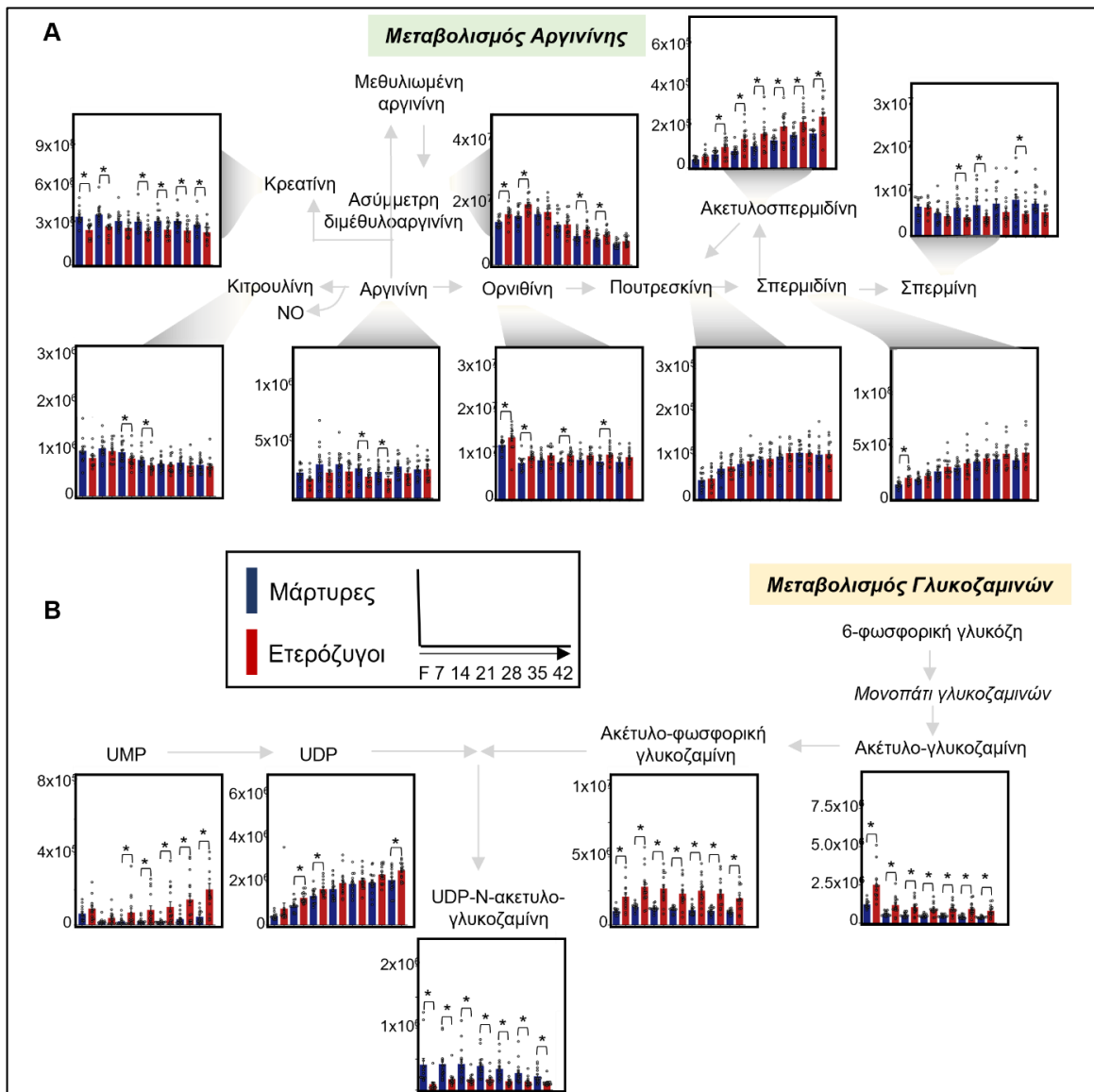
Επιπλέον, διαφοροποιημένος βρέθηκε ο μεταβολισμός της βιταμίνης B6, με τα ερυθροκύτταρα με μεταλλαγές στο γονίδιο της β-σφαιρίνης να εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα πυριδοξικού και πυριδοξάλης, αλλά αυξημένα επίπεδα πυριδοξαμίνης (**Εικόνα Δ12**).



Εικόνα Δ12: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων μορίων του μεταβολισμού της βιταμίνης B6, σε ερυθροκύτταρα αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. (*) $P < 0,05$.

Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχαν οι αλλαγές που εντοπίστηκαν στο μεταβολισμό της αργινίνης και των γλυκοζαμινών. Τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα των αιμοδοτών με στίγμα βΜΑ περιείχαν χαμηλότερα επίπεδα αργινίνης, κιτροουλίνης και κρεατίνης, αλλά ταυτόχρονα αυξημένα επίπεδα ορνιθίνης, ακέτυλ-σπερμιδίνης και

ασύμμετρης διμέθυλοαργινίνης, είτε σποραδικά είτε καθ' όλη τη διάρκεια της αποθηκευτικής περιόδου (**Εικόνα Δ13.A**). Στο μονοπάτι των γλυκοζαμινών, η ετεροζυγωτία συνδεόταν με αυξημένα επίπεδα όλων των προδρόμων μορίων της UDP-N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης, μειωμένα όμως επίπεδα του ίδιου του τελικού προϊόντος (**Εικόνα Δ13.B**).

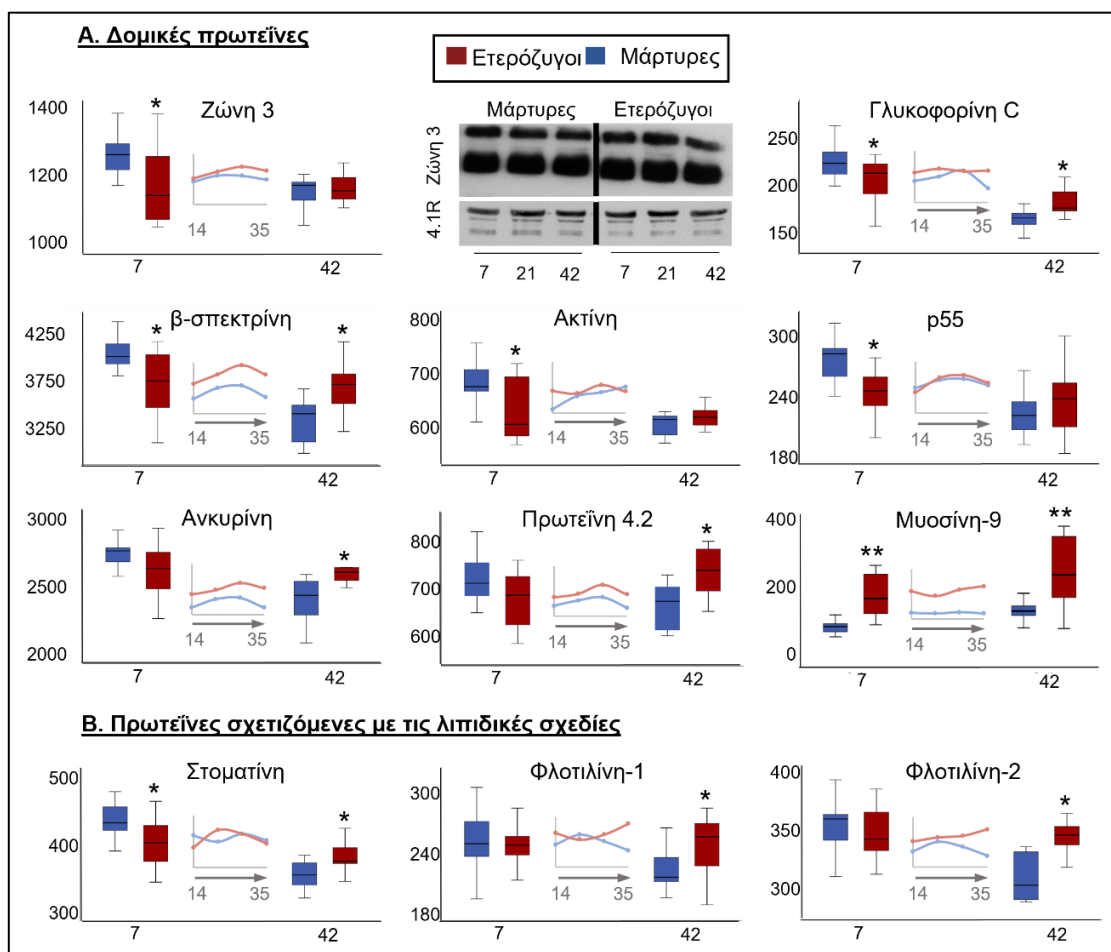


Εικόνα Δ13: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων μορίων του μεταβολισμού της αργινίνης (A) και των γλυκοζαμινών (B), σε ερυθροκύτταρα αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία, τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. (*) $P < 0,05$.

Δ.2.6 Πρωτεϊνική Σύσταση και Δέσμευση Πρωτεϊνών στη Μεμβράνη

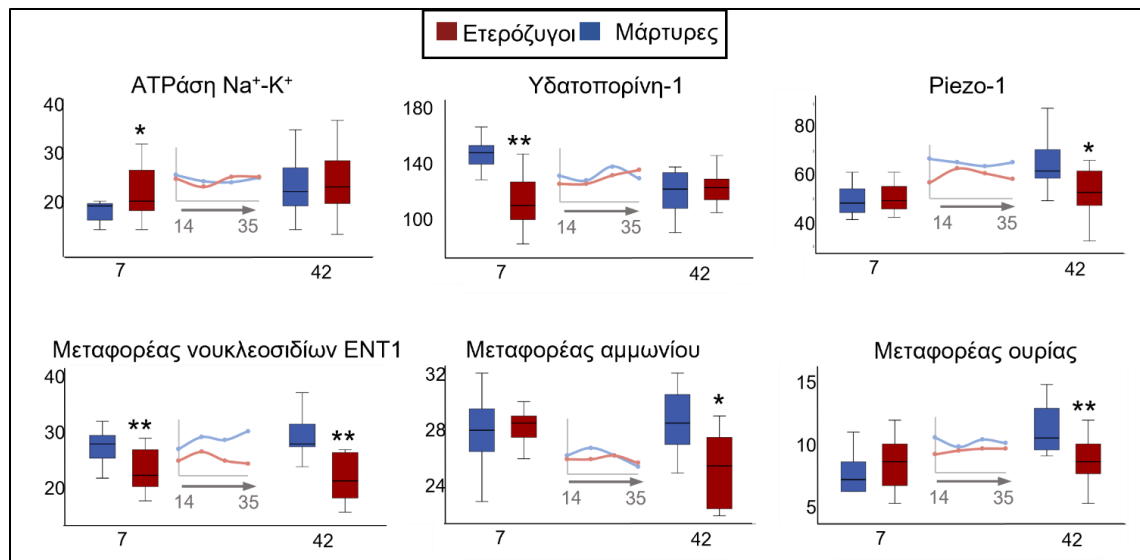
Για να εξεταστεί ολοκληρωμένα η πρωτεϊνική σύσταση της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων, καθώς και η δέσμευση πρωτεϊνών σε αυτά, πραγματοποιήθηκε πρωτεωμική ανάλυση σε αποθηκευμένες μεμβράνες πρώιμης και προχωρημένης αποθήκευσης – και pooled ανάλυση για τις υπόλοιπες χρονικές στιγμές της αποθήκευσης – ενώ διενεργήθηκαν και στοχευμένα πειράματα ανοσοεντόπισης.

Όσον αφορά σε βασικές δομικές πρωτεΐνες της μεμβράνης και του σκελετού του ερυθροκυττάρου, παρ' ότι οι ετερόζυγοι εμφάνισαν αρχικά μειωμένα επίπεδα αρκετών εξ αυτών, όπως είναι η ζώνη-3, η σπεκτρίνη και η ακτίνη, η διαταραχή των επιπέδων λόγω της παρόδου της αποθήκευσης ήταν λιγότερο εμφανής σε αυτούς, με αποτέλεσμα να καταλήγουν την τελευταία ημέρα με ίσα ή και υψηλότερα επίπεδα δομικών πρωτεϊνών (**Εικόνα Δ14.A**). Παρόμοια ήταν και η εικόνα σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στις λιπιδικές σχεδίες (**Εικόνα Δ14.B**). Αξίζει να αναφερθεί πως εντυπωσιακά αυξημένη βρέθηκε η μυοσίνη-9 καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης στα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων αιμοδοτών (**Εικόνα Δ14.A**).



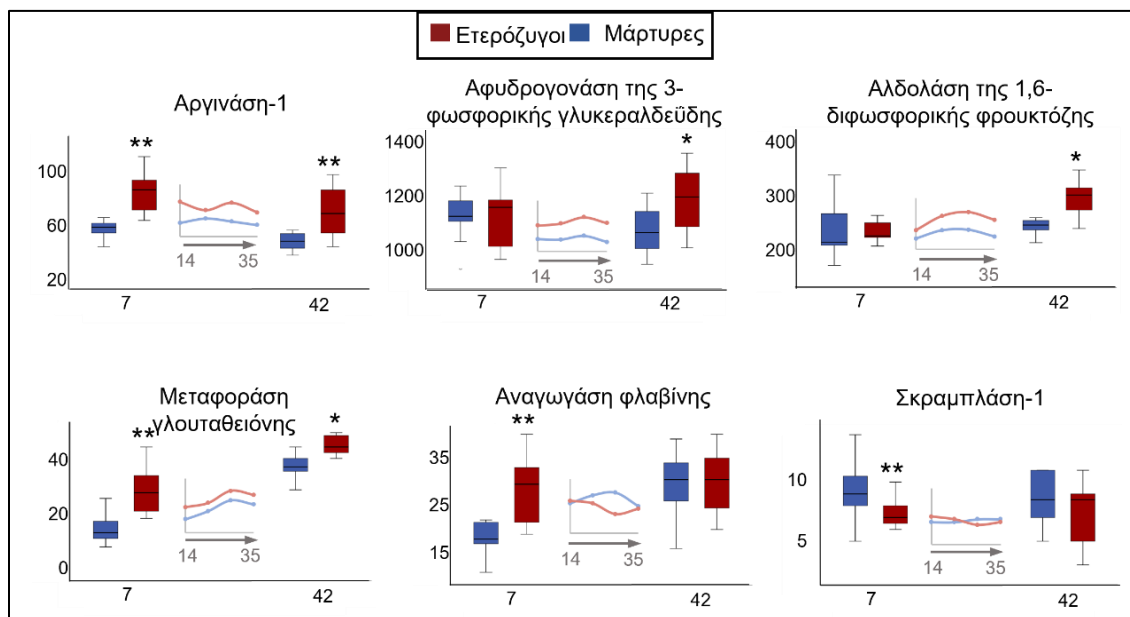
Εικόνα Δ14: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων δομικών πρωτεϊνών (A) και πρωτεϊνών που συσχετίζονται με τις λιπιδικές σχεδίες (B), σε μεμβράνες ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Η πρωτεΐνη 4.1R χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης στα πειράματα ανοσοεντόπισης. Οριζόντιος άξονας: ημέρες αποθήκευσης. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης, ενώ τα ένθετα διαγράμματα αντιστοιχούν στην pooled πρωτεωμική ανάλυση των ενδιάμεσων ημερών της αποθηκευτικής περιόδου. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,05$ και fold $> 1,25$.

Μία ακόμη ευρεία κατηγορία πρωτεϊνών που βρέθηκε τροποποιημένη στα ερυθροκύτταρα από ετερόζυγους αιμοδότες, ήταν οι μεμβρανικοί μεταφορείς (**Εικόνα Δ15**). Συγκεκριμένα, διαφοροποιημένα επίπεδα παρουσίασαν πρωτεΐνες-μεταφορείς με ρόλο στη ρύθμιση του όγκου του κυττάρου, όπως η ΑΤΡάση Na^+/K^+ (αυξημένα επίπεδα στα νεαρά ερυθροκύτταρα), η υδατοπορίνη και η *piezo-1* (μειωμένα επίπεδα στα νεαρά ή τα πιο γηρασμένα ερυθροκύτταρα, αντίστοιχα).



Εικόνα Δ15: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων πρωτεϊνών-μεταφορέων σε μεμβράνες ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οριζόντιος άξονας: ημέρες αποθήκευσης. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης, ενώ τα ένθετα διαγράμματα αντιστοιχούν στην pooled πρωτεωμική ανάλυση των ενδιάμεσων ημερών της αποθηκευτικής περιόδου. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,05$ και fold $> 1,25$.

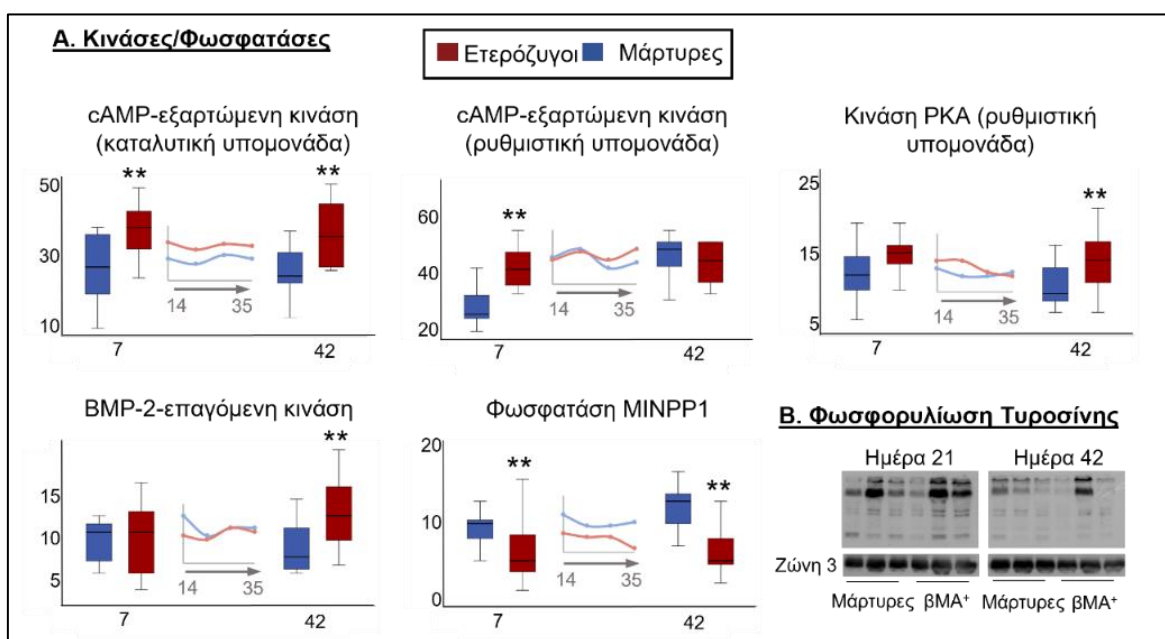
Επίσης, μεταφορείς που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του αζώτου, όπως μεταφορείς νουκλεοσιδίων, αμμωνίου και ουρίας, βρέθηκαν μειωμένοι είτε στο τέλος είτε καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης στην ομάδα των ερυθροκυττάρων από αιμοδότες με μεταλλαγές στη β-σφαιρίνη (**Εικόνα Δ15**).



Εικόνα Δ16: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων ενζύμων σε μεμβράνες ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οριζόντιος άξονας: ημέρες αποθήκευσης. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης, ενώ τα ένθετα διαγράμματα αντιστοιχούν στην pooled πρωτεωμική ανάλυση των ενδιάμεσων ημερών της αποθηκευτικής περιόδου. (*) $P < 0,05$, (**) $P < 0,05$ και fold $> 1,25$.

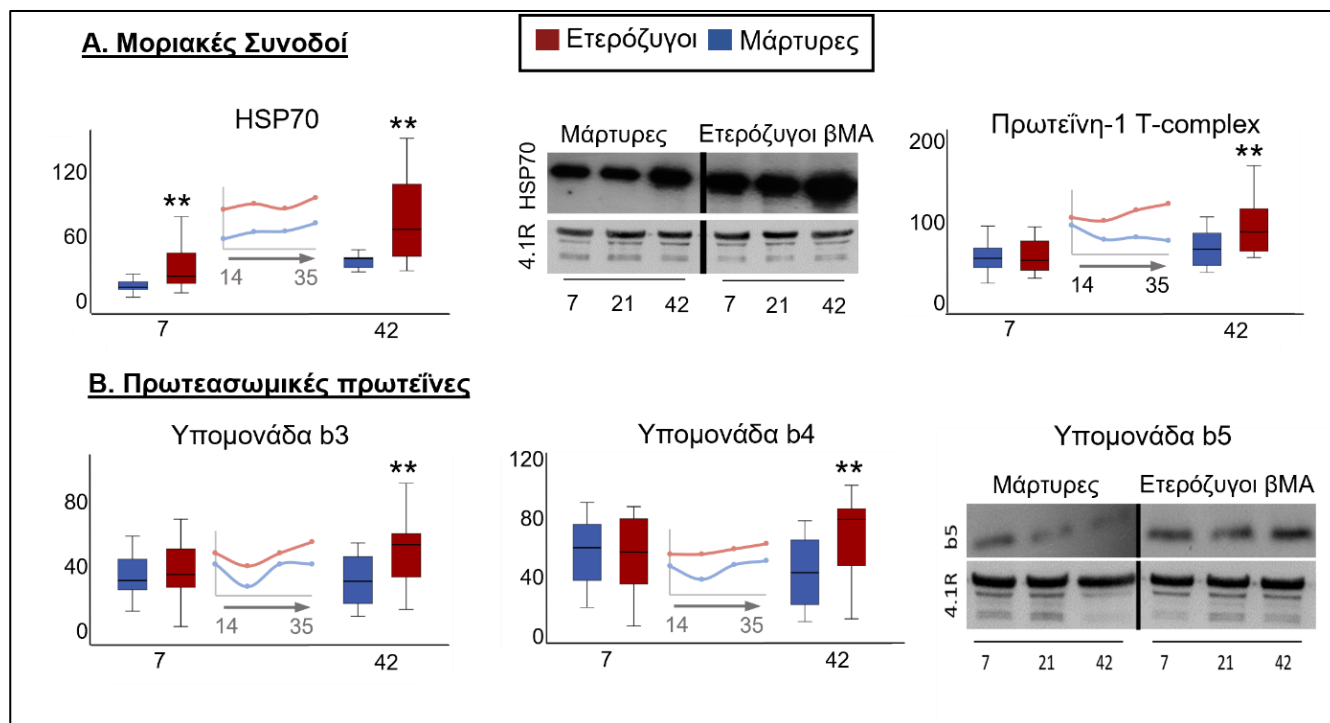
Ποικίλα ένζυμα βρέθηκαν διαφορικά δεσμευμένα μεταξύ των μεμβρανών των δύο κατηγοριών αιμοδοτών (**Εικόνα Δ16**). Υψηλότερα (είτε σποραδικά είτε καθολικά) ήταν τα επίπεδα της αργινάσης, γλυκολυτικών ενζύμων, όπως η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης, αλλά και αντιοξειδωτικών, όπως η αναγωγάση της φλαβίνης και η μεταφοράση της γλουταθειόνης. Αντιθέτως, μειωμένα ήταν τα επίπεδα της σκραμπλάσης στα ερυθροκύτταρα επταήμερης αποθήκευσης των ετερόζυγων αιμοδοτών (**Εικόνα Δ16**).

Στις μεμβράνες των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με ετεροζυγωτία στη βΜΑ βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα κινασών, αλλά χαμηλότερα φωσφατασών (**Εικόνα Δ17Α**), μία διαφορετική δέσμευση που συνοδεύταν από εντονότερη φωσφορυλίωση της ζώνης 3 στα ίδια ερυθροκύτταρα (**Εικόνα Δ17Β**). Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών μελετήθηκε με τη χρήση αναστολέων φωσφατασών και αφορά μόνο στη φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης.



Εικόνα Δ17: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων κινασών και φωσφατασών (Α) και ανοσοεντόπιση φωσφορυλιωμένης τυροσίνης (Β) σε μεμβράνες ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οριζόντιος άξονας: ημέρες αποθήκευσης. Η ζώνη 3 χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης στα πειράματα ανοσοεντόπισης. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης, ενώ τα ένθετα διαγράμματα αντιστοιχούν στην pooled πρωτεωμική ανάλυση των ενδιάμεσων ημερών της αποθηκευτικής περιόδου. (**) $P < 0,05$ και fold $> 1,25$.

Η τελευταία κατηγορία πρωτεϊνών που διέφεραν εντυπωσιακά μεταξύ των δύο ομάδων, διαφορές που αναδείχθηκαν και από την ολιστική ανάλυση της πρωτεωμικής και από στοχευμένα πειράματα ανοσοεντόπισης, ήταν οι μοριακές συνοδοί και γενικότερα οι πρωτεοστατικές πρωτεΐνες. Τόσο πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs), όσο και υπομονάδες του συμπλόκου T (T-complex), βρέθηκαν αυξημένες στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων από αιμοδοτές με μεταλλαγές στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (**Εικόνα Δ18.Α**). Πρωτεασωμικές υπομονάδες, ιδιαιτέρως του πρωτεασώματος 20S το οποίο κυριαρχεί στα ερυθροκύτταρα, εντοπίστηκαν κυρίως στις μεμβράνες των προχωρημένης αποθήκευσης ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με βΜΑ ετεροζυγωτία (**Εικόνα Δ18.Β**).



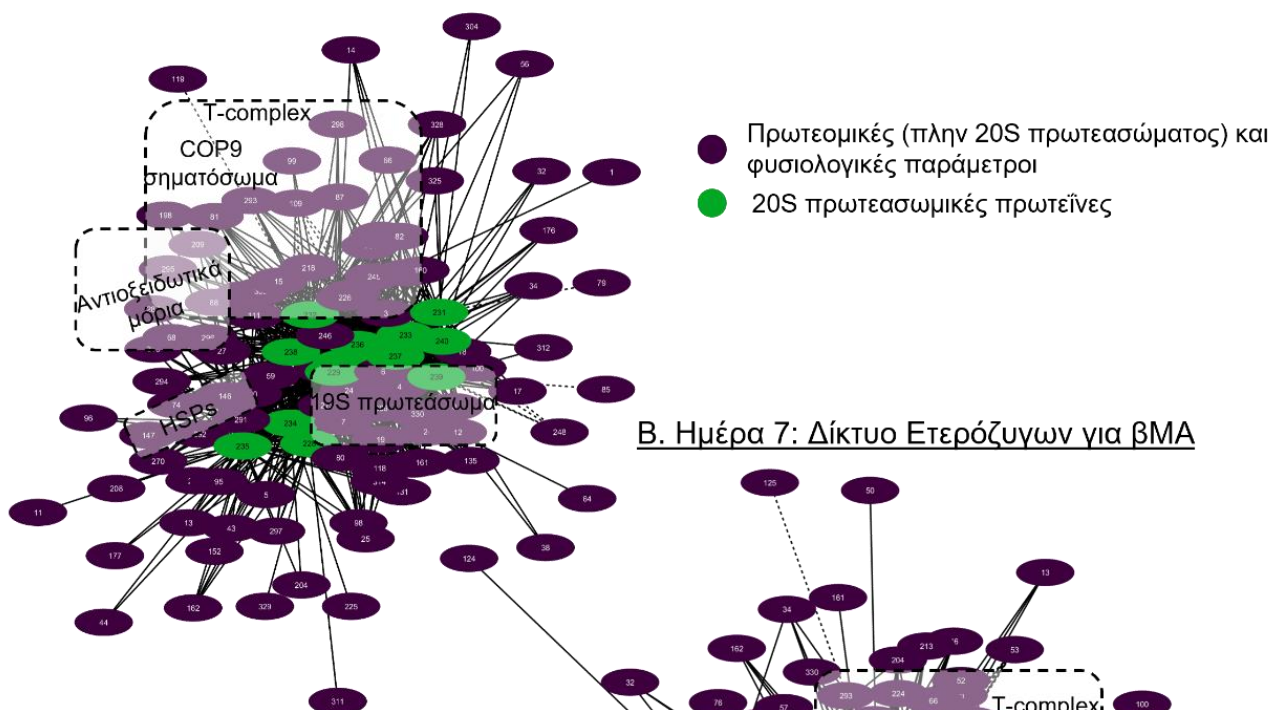
Εικόνα Δ18: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων μοριακών συνοδών (A) και πρωτεασωμικών υπομονάδων (B) σε μεμβράνες ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οριζόντιος άξονας: ημέρες αποθήκευσης. Η πρωτεΐνη 4.1R χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης στα πειράματα ανοσοεντόπισης. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης, ενώ τα ένθετα διαγράμματα αντιστοιχούν στην pooled πρωτεωμική ανάλυση των ενδιάμεσων ημερών της αποθηκευτικής περιόδου. (**) $P < 0,05$ και fold $> 1,25$.

Δ.2.7 Δικτύωση πρωτεομικών και φυσιολογικών παραμέτρων με πυρήνα το 20S πρωτεάσωμα

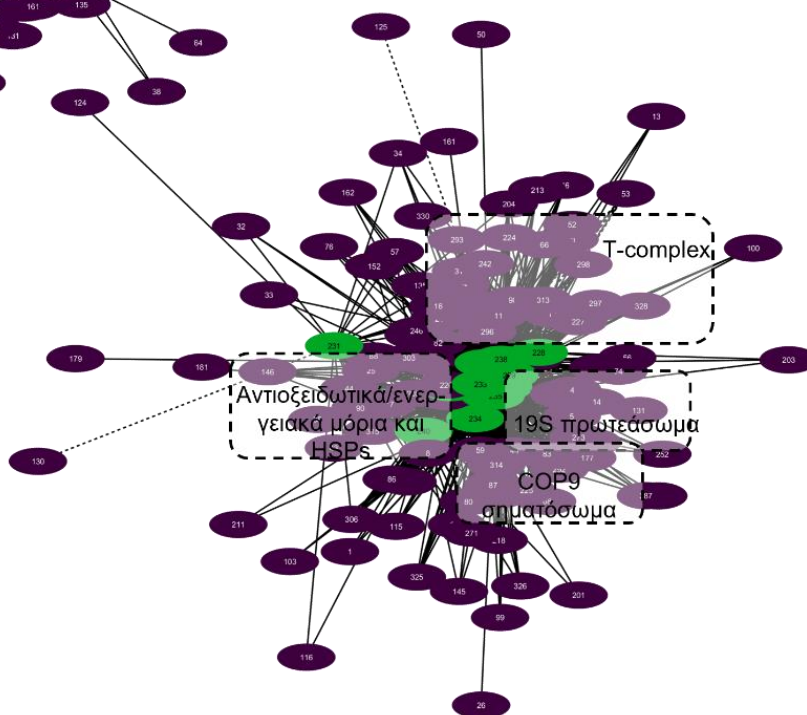
Η ισχυρότερη μεμβρανική πρωτεόσταση, που αναδείχθηκε τόσο μέσω πρωτεωμικής και ανοσοεντόπισης, όσο και μέσω μέτρησης πρωτεασωμικής ενεργότητας, ξεχώρισε και μέσω ανάλυσης βιολογικών δικτύων. Κατασκευάστηκαν δίκτυα με το σύνολο των πρωτεωμικών και φυσιολογικών παραμέτρων που βρέθηκαν να συσχετίζονται στατιστικά σημαντικά με τις πρωτεΐνες του πυρήνα 20S του πρωτεασώματος.

Οι κατηγορίες που βρέθηκαν να συσχετίζονται θετικά με τις πρωτεΐνες 20S και στις δύο ομάδες ήταν: (α) οι πρωτεασωμικές ενεργότητες, (β) υπομονάδες του 19S πρωτεασώματος, πρωτεασωμικοί «συνεργοί» και πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ουβικουιτίνη, (γ) μοριακές συνοδοί (π.χ. HSP70, T-complex), (δ) μόρια που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση και τον μεταβολισμό λιπιδίων (π.χ. συνθάση λιπαρών οξέων), (ε) ασβεστιο-εξαρτώμενες πρωτεΐνες, (στ) ενεργειακά και αντιοξειδωτικά μόρια (π.χ. καταλάση), και (ζ) πρωτεΐνες του μεταβολισμού των νουκλεοσιδίων (**Εικόνες Δ19, Δ20**). Πολύ λιγότερες ήταν οι αρνητικές συνδέσεις, και αφορούσαν ως επί το πλείστον σε δομικά συστατικά της μεμβράνης, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη δόμηση των λιπιδικών σχεδίων (π.χ. φλοτιλίνες), μικρές GTPάσες και ανοσοσφαιρίνες.

A. Ημέρα 7: Δίκτυο Μαρτύρων



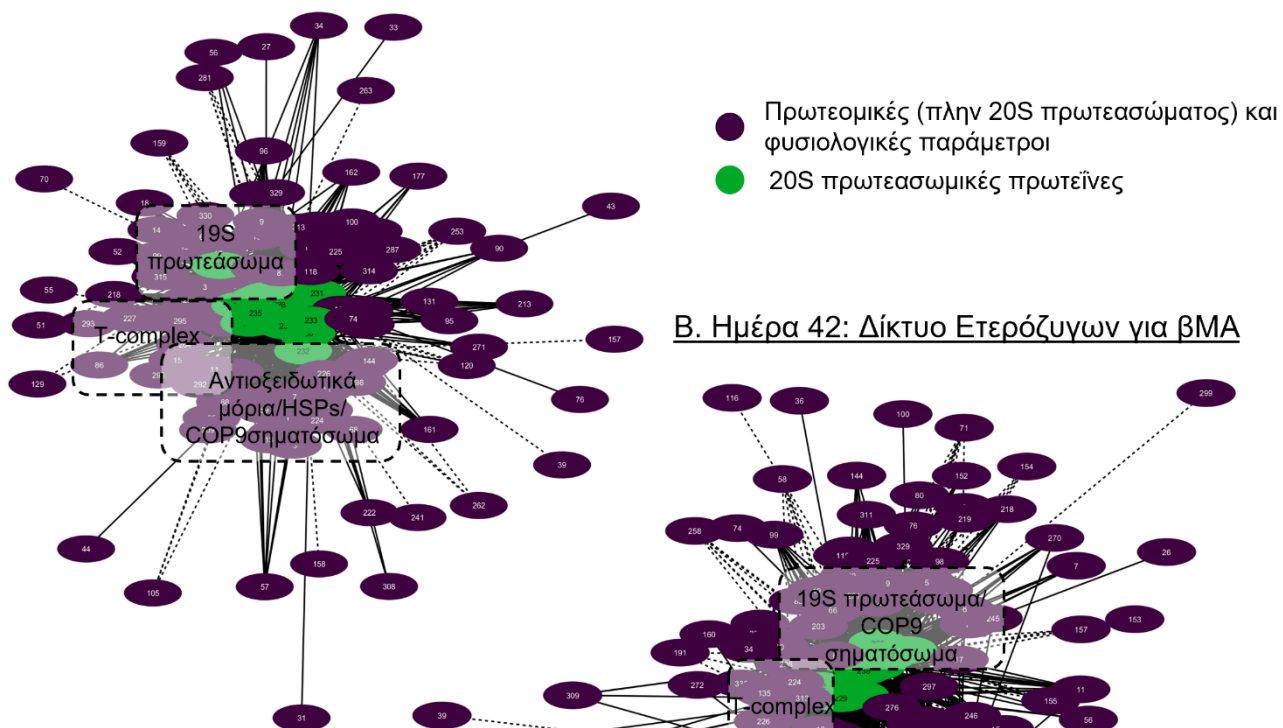
B. Ημέρα 7: Δίκτυο Ετερόζυγων για βΜΑ



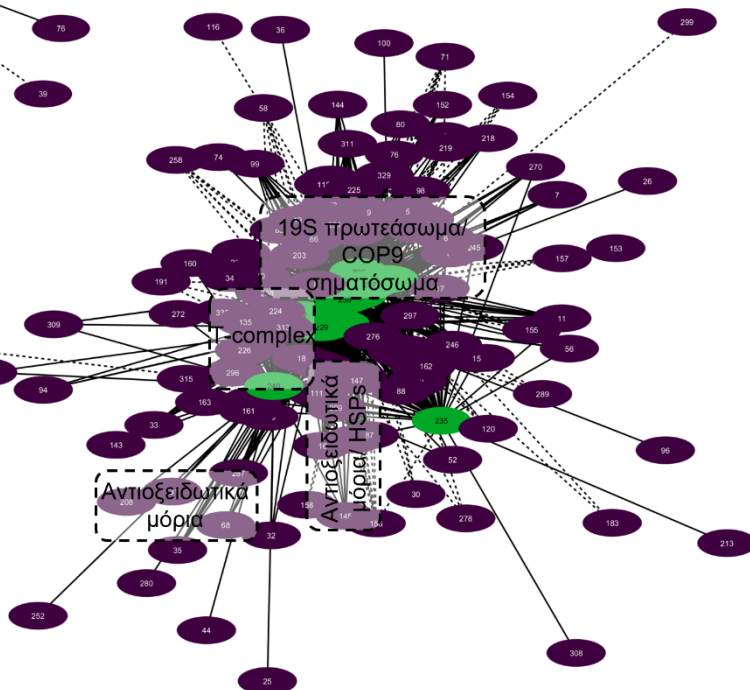
Εικόνα Δ19: Δικτύωση (συσχετίσεις με $p < 0,01$) πρωτεωμικών και φυσιολογικών παραμέτρων με τον πυρήνα 20S του πρωτεασώματος σε ερυθροκύτταρα αιμοδοτών μαρτύρων (Α) και ετερόζυγων για β-μεσογειακή αναιμία (Β) αιμοδοτών, που ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες τράπεζας αίματος για 7 ημέρες. Οι συμπαγείς γραμμές αντικατοπτρίζουν τις θετικές συσχετίσεις, ενώ οι διακεκομμένες τις αρνητικές. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις παραμέτρους του Πίνακα Π1 (Παράρτημα).

Παρά τις κοινές κατηγορίες που εντοπίστηκαν στα δίκτυα των δύο ομάδων, τα κύτταρα των ετερόζυγων εμφάνισαν αρκετά παραπάνω συνδέσεις, ήδη από τη μέρα 7, και κατέληξαν σε παρόμοιο αριθμό συνδέσεων στο τέλος της αποθήκευσης σε σχέση με τους μάρτυρες. Οι επιπλέον συνδέσεις της πρώιμης αποθήκευσης οφείλονται στην υψηλή συνδεσιμότητα του 20S πρωτεασώματος με μοριακές συνοδούς (141 έναντι 85 συσχετίσεων, ετερόζυγοι έναντι μαρτύρων), μόρια του ενεργειακού μεταβολισμού, καθώς και υπεροξειδοσίνες (26 έναντι 12 συσχετίσεων, ετερόζυγοι έναντι μαρτύρων).

A. Ημέρα 42: Δίκτυο Μαρτύρων



B. Ημέρα 42: Δίκτυο Ετερόζυγων για βΜΑ

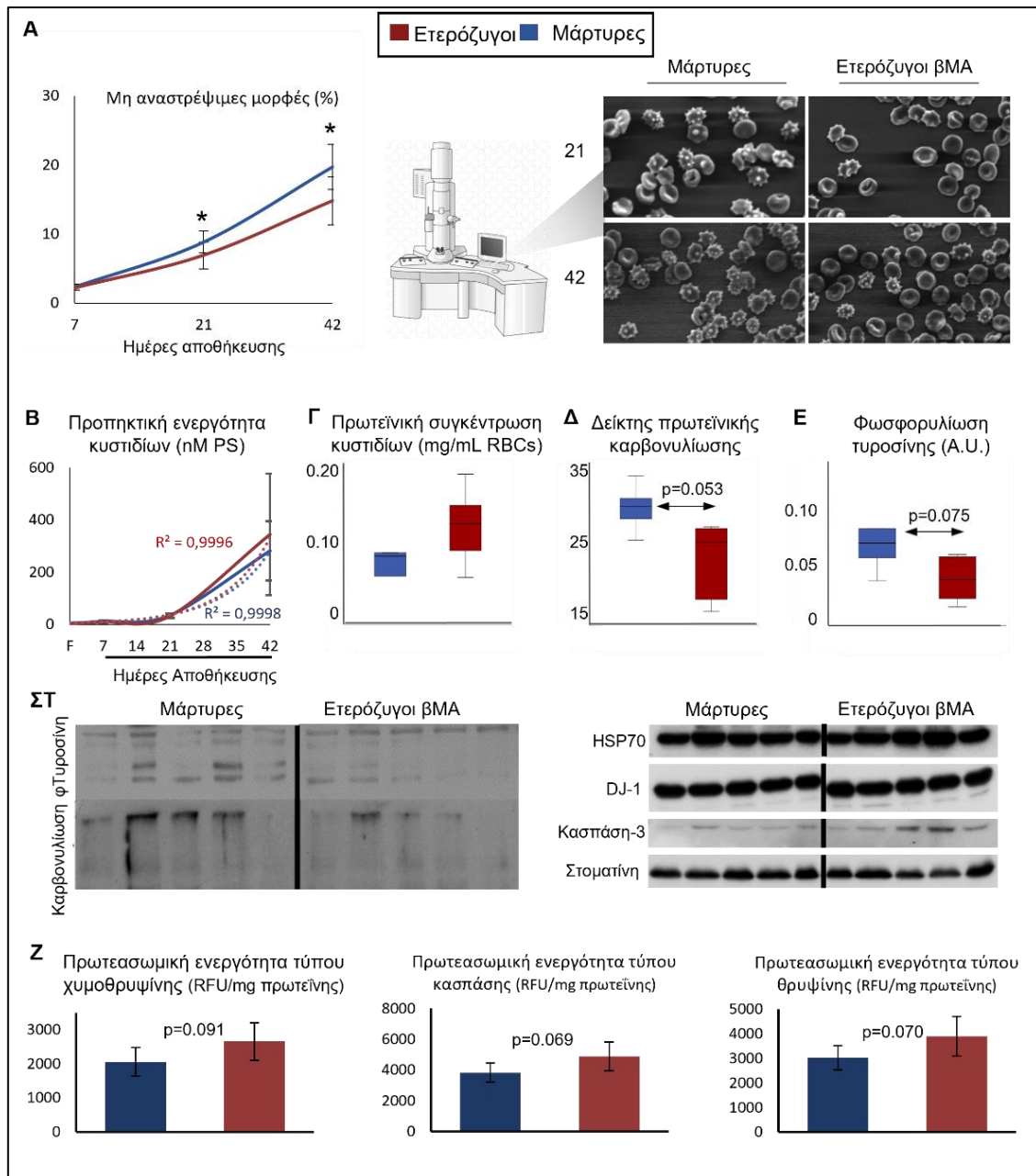


Εικόνα Δ20: Δικτύωση (συσχετίσεις με $p < 0,01$) πρωτεωμικών και φυσιολογικών παραμέτρων με τον πυρήνα 20S του πρωτεασώματος σε ερυθροκύτταρα αιμοδοτών μαρτύρων (Α) και ετερόζυγων για β-μεσογειακή αναιμία (Β) αιμοδοτών, που ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες τράπεζας αίματος για 42 ημέρες. Οι συμπαγείς γραμμές αντικατοπτρίζουν τις θετικές συσχετίσεις, ενώ οι διακεκομμένες τις αρνητικές. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις παραμέτρους του Πίνακα Π1 (Παράρτημα).

Δ.2.8 Παράμετροι Μορφολογίας – Κυστιδιοποίησης

Ερυθροκύτταρα πρώιμης, μέσης και προχωρημένης αποθήκευσης από τις δύο ομάδες αιμοδοτών μονιμοποιήθηκαν και παρατηρήθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης για να καταμετρηθούν οι μη αναστρέψιμες μορφές. Τόσο στο μέσο, όσο και στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου, οι μη αναστρέψιμες αλλοιώσεις ήταν λιγότερες στα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων για βΜΑ (**Εικόνα Δ21.Α**). Δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά ως προς την πηκτική ικανότητα των κυστιδίων των δύο ομάδων κατά την αποθήκευση (**Εικόνα Δ21.Β**), ούτε ως προς την πρωτεϊνική συγκέντρωση των κυστιδίων που είχαν συσσωρευθεί στη μονάδα μετάγγισης την ημέρα 42 (**Εικόνα Δ21.Γ**). Παρ' όλα αυτά, τα κυστίδια των ετερόζυγων για βΜΑ παρουσίασαν οριακή τάση για χαμηλότερη καρβονυλίωση και φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, με ταυτόχρονη αυξημένη παρουσία

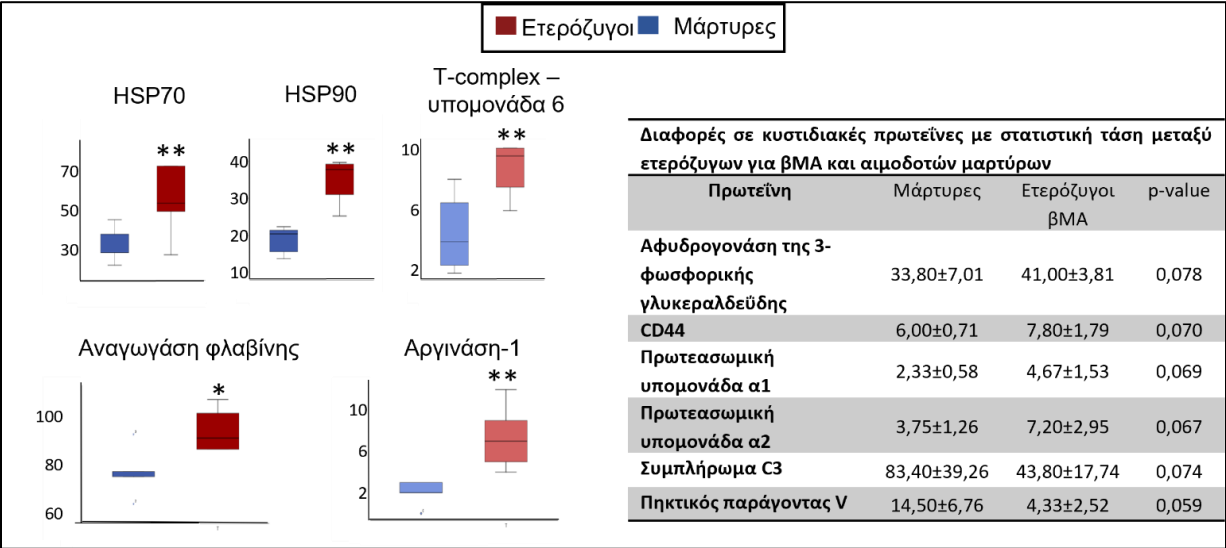
HSP70, DJ-1 και κασπάσης-3 (**Εικόνα Δ21.Δ-ΣΤ**). Επιπλέον, οι τρεις τύποι πρωτεασωματικής ενεργότητας βρέθηκαν οριακά αυξημένες στα κυστίδια που προέρχονταν από ερυθροκύτταρα με ετεροζυγωτία στη βΜΑ (**Εικόνα Δ21.Ζ**).



Εικόνα Δ21: Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού μη αναστρέψιμων μορφών ερυθροκυττάρων κατά την αποθήκευση, συνοδευόμενη από ενδεικτικές εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (μεγέθυνση 1000x) (Α). Κυστιδιακή ανάλυση (Β-Ζ): ικανότητα επαγωγής πήξης (Β), πρωτεϊνική συγκέντρωση (Γ), πρωτεϊνική καρβονυλίωση (Δ) και φωσφορυλίωση (Ε), παρουσία επιλεγμένων πρωτεϊνών (ΣΤ), και πρωτεασωματική ενεργότητα (Ζ) σε κυστίδια αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία στη β-μεσογειακή αναιμία. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν γραμμές τάσης εκθετικών μοντέλων. Η στοματίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης στα πειράματα ανοσοεντόπισης. (*) $P < 0,05$.

Πέραν των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών, πραγματοποιήθηκε πρωτεωμική ανάλυση και σε απομονωμένα κυστίδια προχωρημένης αποθήκευσης. Και στις δύο ομάδες τα κύρια συστατικά των κυστιδίων ήταν η αιμοσφαιρίνη, πρωτεΐνες της μεμβράνης όπως η στοματίνη και η ζώνη 3, αλλά και

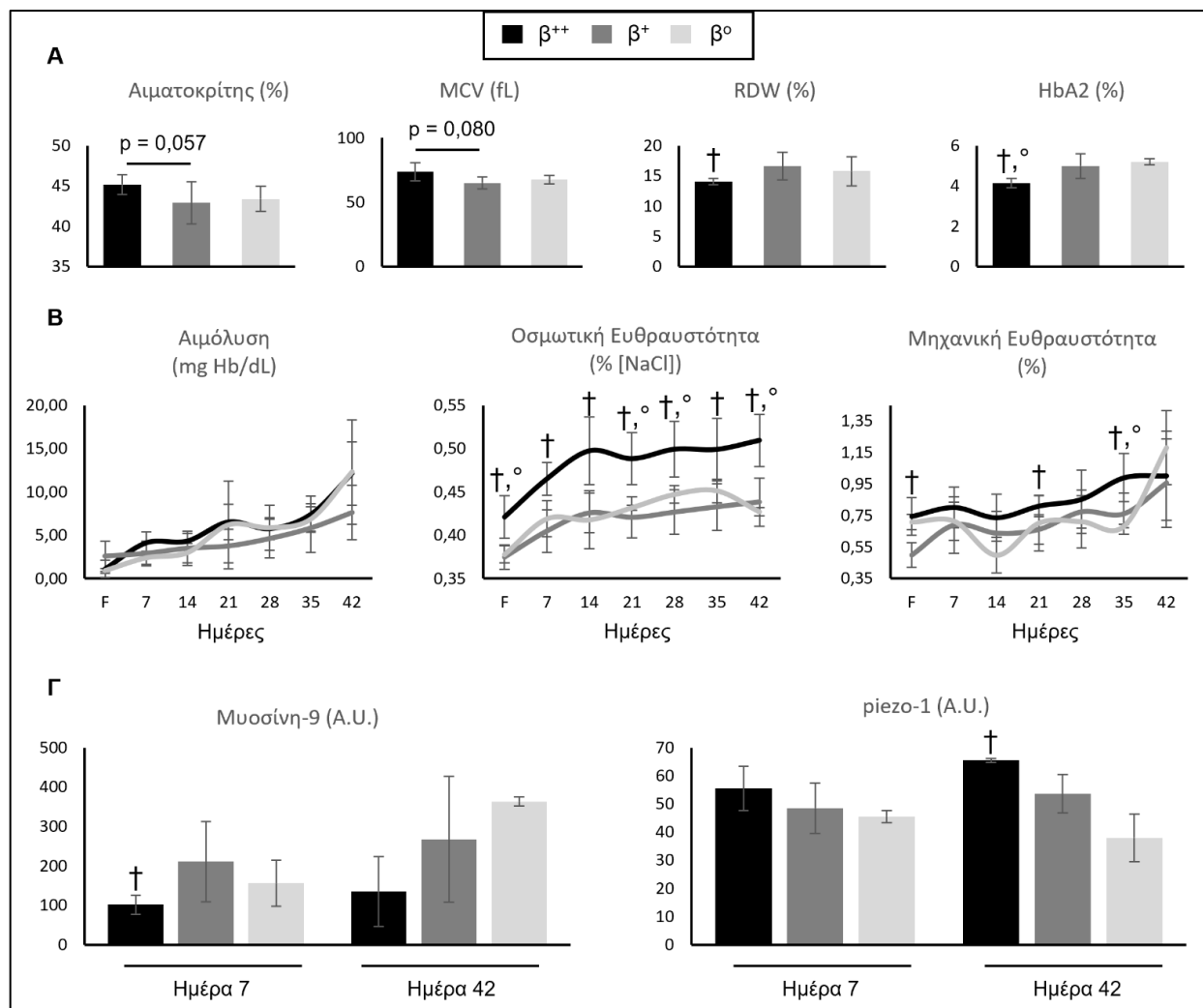
ενεργειακά/αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η καταλάση και η υπεροξειδοσίνη-2. Τα αποτελέσματα της πρωτεωμικής έδειξαν επιπλέον εμπλουτισμό (με στατιστική σημασία ή τάση) των κυστιδίων των ετερόζυγων σε μοριακές συνοδούς (π.χ. HSP70) και πρωτεασωματικές υπομονάδες, σε ένζυμα όπως η αργινάση, η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης και η αναγωγή της φλαβίνης, αλλά μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνών του συμπληρώματος και των μονοπατιών πήξης (**Εικόνα Δ22**).



Εικόνα Δ22: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων μοριακών συνοδών και ενζύμων σε κυστίδια που απομονώθηκαν από μονάδες συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία για β-μεσογειακή αναιμία την τελευταία ημέρα της αποθήκευσής τους σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Ένθετος πίνακας: πρωτεΐνες που παρουσιάζουν διαφορές με στατιστική τάση μεταξύ των δύο κατηγοριών αιμοδοτών. Τα αποτελέσματα στον πίνακα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. Τα ανοιχτά και σκούρα χρώματα υποδηλώνουν πρωτεΐνες χαμηλής και υψηλής αφθονίας στα κυστίδια, αντίστοιχα. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. (*) P < 0,05, (**) P < 0,05 και fold > 1,25.

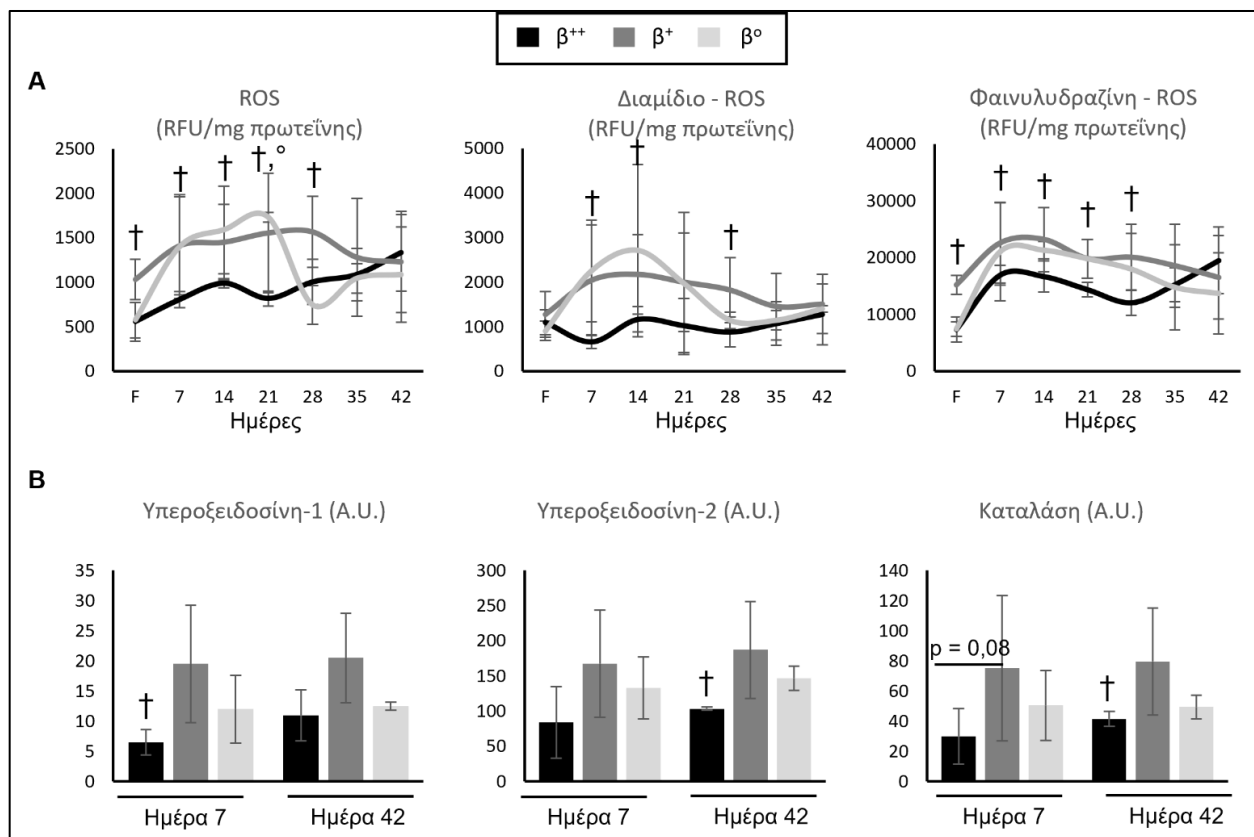
Δ.2.9 Διακύμανση αποθηκευτικών παραμέτρων εντός της ομάδας των ετερόζυγων αιμοδοτών

Καθώς οι μεταλλαγές της β-μεσογειακής αναιμίας είναι αρκετές εκατοντάδες, στο επόμενο βήμα της παρούσας διατριβής έγινε κατηγοριοποίηση των ετερόζυγων αιμοδοτών σε β⁰, β⁺ και β⁺⁺, ανάλογα με το πόσο επηρέαζε η μεταλλαγή τη σύνθεση των αλυσίδων β-σφαιρίνης (παντελής έλλειψη, σημαντικά μειωμένη και ελάχιστα μειωμένη σύνθεση, αντίστοιχα). Παρ’ ότι οι ομάδες που προέκυψαν αποτελούνταν από πολύ μικρό αριθμό ατόμων η καθεμία (2 έναντι 9 έναντι 4, αντίστοιχα) αναδείχθηκαν ενδιαφέρουσες διαφορές σε κάποιες παραμέτρους. Αρχικά, εντοπίστηκαν διαφορές στις αιματολογικές μετρήσεις του φρέσκου αίματος, όπως αυξημένος αιματοκρίτης και MCV αλλά μειωμένο RDW και HbA₂ στην ομάδα των β⁺⁺ έναντι κυρίως των β⁺ (**Εικόνα Δ23.Α**). Προχωρώντας στην αποθήκευση, παρότι δεν εμφανίστηκε κάποια διαφορά στην αυθόρμητη αιμόλυση μεταξύ των 3 ομάδων, τα ερυθροκύτταρα β⁺⁺ παρουσίασαν αυξημένο δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας σε σχέση με τα β⁺ και τα β⁰ –χαρακτηριστικό που κατείχαν ήδη *in vivo* (**Εικόνα Δ23.Β**). Ομοίως, εμφάνισαν σποραδικά αυξημένο δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας έναντι των β⁺ (**Εικόνα Δ23.Β**). Κατά την πρώιμη αποθήκευση τα ερυθροκύτταρα β⁺⁺ είχαν χαμηλότερα επίπεδα μυοσίνης-9 σε σχέση με τα β⁺, ενώ την ημέρα 42 παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα piezo-1 (**Εικόνα Δ23.Γ**).



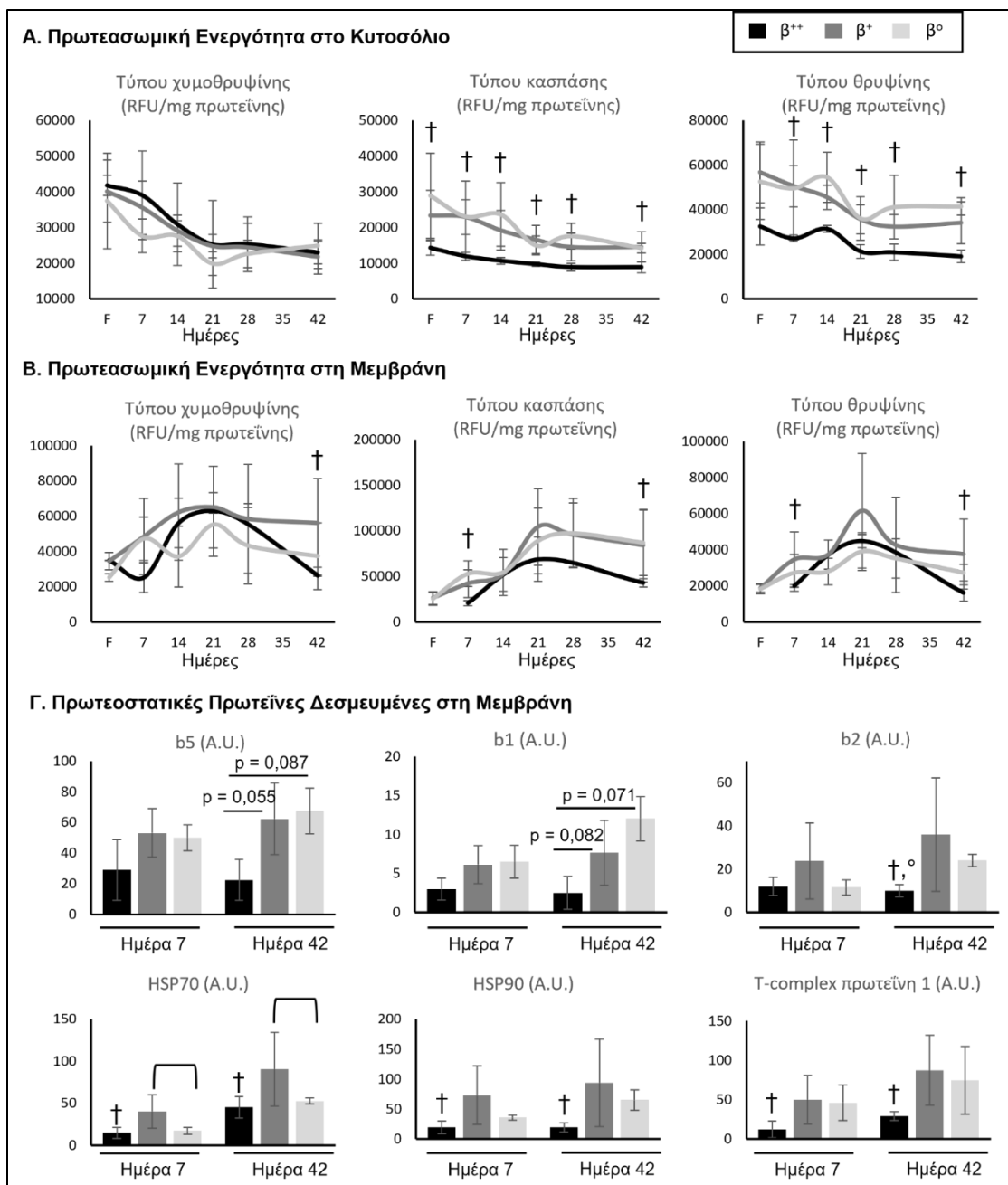
Εικόνα Δ23: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων αιματολογικών παραμέτρων στο φρέσκο αίμα (Α), και των παραμέτρων αιμόλυσης σε φρέσκο αίμα και αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα (Β) ετερόζυγων β^{++} , β^{+} και β^{0} σε συνθήκες τράπεζας αίματος. (Γ) Επιλεγμένες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό και τη ρύθμιση όγκου του κυττάρου. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. A.U.: αυθαίρετες μονάδες (arbitrary units). (†) $P < 0,05$, β^{++} έναντι β^{+} . (°) $P < 0,05$, β^{++} έναντι β^{0} .

Ποικιλομορφία εντός της ομάδας εντοπίστηκε επίσης σε παραμέτρους οξειδωτικού ισοζυγίου. Τα ερυθροκύτταρα της ομάδας β^{++} συσώρευαν τόσο πριν όσο και μέχρι το μέσο της αποθηκευτικής περιόδου λιγότερες ενδογενείς και επαγόμενες (π.χ. με χρήση φαινυλδραζίνης) ROS σε σχέση με τα β^{+} (**Εικόνα Δ24.Α**). Επιπλέον, παρατηρήθηκε διαφορετική πρόσδεση κυτοσολικών αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών στη μεμβράνη τους, με μειωμένη την παρουσία υπεροξειδοσίνης και καταλάσης είτε στην αρχή είτε και στο πέρας των 42 ημερών (**Εικόνα Δ24.Β**).



Εικόνα Δ24: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων ενδοκυττάρων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) σε φρέσκο αίμα και αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα ετερόζυγων β^{++} , β^{+} και β^{0} σε συνθήκες τράπεζας αίματος (Α). (Β) Επιλεγμένες πρωτεΐνες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. A.U.: αυθαίρετες μονάδες (arbitrary units). (†) $P < 0,05$, β^{++} έναντι β^{+} . (°) $P < 0,05$, β^{++} έναντι β^{0} .

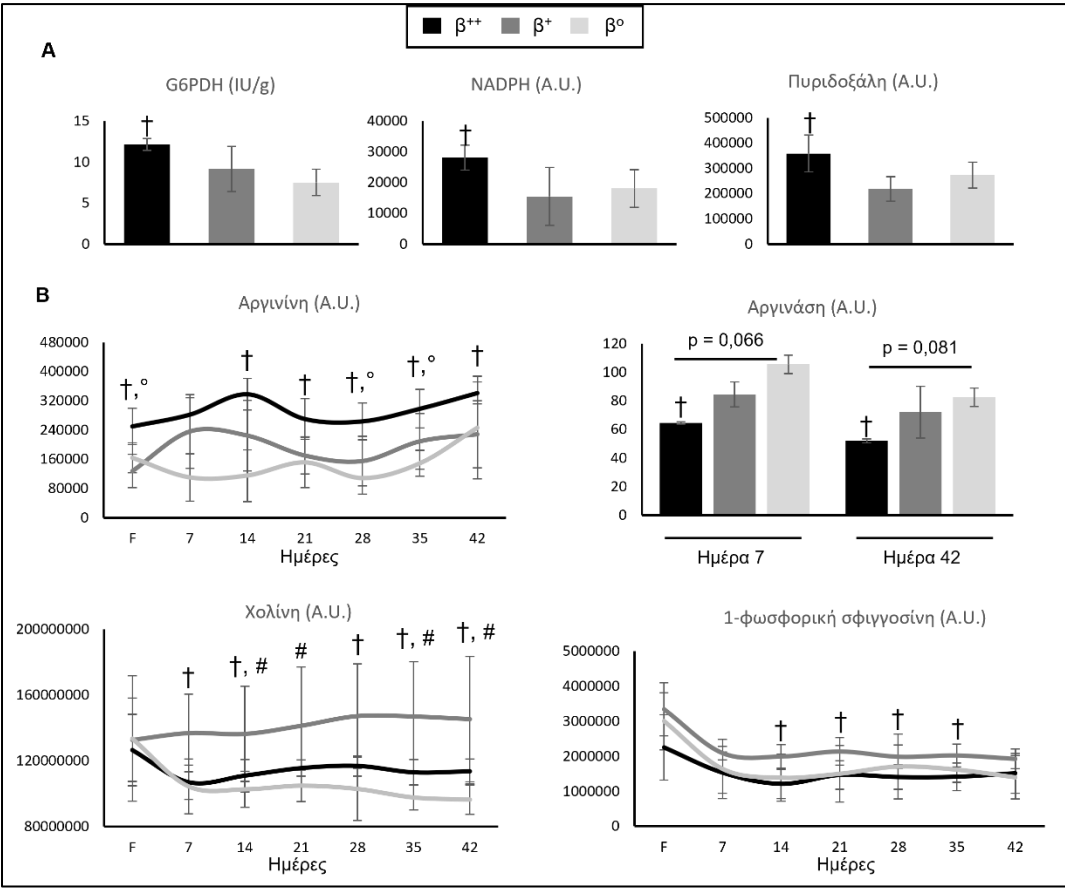
Παρά το γεγονός ότι οι ετερόζυγοι δεν εμφάνισαν κάποια διαφορά στα κυτοσολικά επίπεδα πρωτεασωμικής ενεργότητας ερυθροκυττάρων σε σύγκριση με τους μάρτυρες, εντός της ομάδας οι ενεργότητες τύπου κασπάσης και θρυψίνης παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές στους β^{++} σε σύγκριση με τους β^{+} (**Εικόνα Δ25.Α**). Η πρωτεασωμική ενεργότητα στη μεμβράνη επέδειξε πιο σποραδικές διαφορές, με την ίδια ομάδα ετερόζυγων να παρουσιάζει χαμηλότερα επίπεδα και των τριών τύπων ενεργότητας στην αρχή ή/και το τέλος της αποθηκευτικής περιόδου σε σχέση με τους β^{+} (**Εικόνα Δ25.Β**). Αξίζει να αναφερθεί ότι οι υπομονάδες του πρωτεασωμικού συμπλόκου 20S που αντιστοιχούν στις τρεις διακριτές ενεργότητες, δηλαδή η β5 (τύπου χυμοθρυψίνης), β1 (τύπου κασπάσης) και β2 (τύπου θρυψίνης), βρέθηκαν λιγότερο δεσμευμένες στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων β^{++} της ημέρας 42 σε σύγκριση με τις μεμβράνες ερυθροκυττάρων στις δύο άλλες ομάδες ετερόζυγων αιμοδοτών (**Εικόνα Δ25.Γ**). Μοριακές συνοδοί, όπως οι HSPs και υπομονάδες του συμπλόκου T, ήταν επίσης μειωμένες στην ομάδα των β^{++} σε σχέση με των β^{+} , ενώ συγκεκριμένα η HSP70 εμφάνισε μέγιστες τιμές στους β^{+} έναντι των δύο άλλων ομάδων (**Εικόνα Δ25.Γ**).



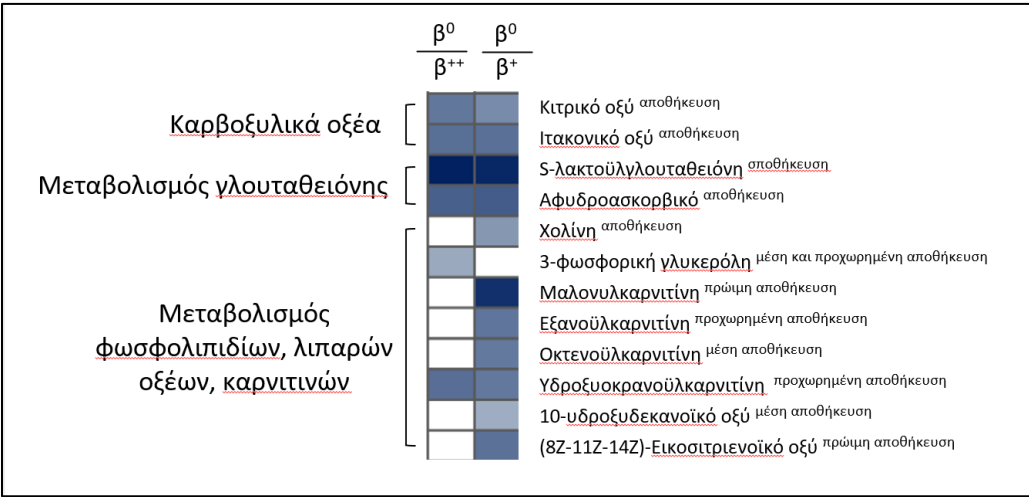
Εικόνα Δ25: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων κυτοσολικής (Α) και μεμβρανικής (Β) πρωτεασωματικής ενεργότητας σε φρέσκο αίμα και αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα ετερόζυγων β⁺, β⁺ και β⁰ σε συνθήκες τράπεζας αίματος. (Γ) Επιλεγμένες πρωτεοστατικές πρωτεΐνες. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. A.U.: αυθαίρετες μονάδες (arbitrary units). (†) p < 0,05, β⁺ έναντι β⁺. (°) p < 0,05, β⁺ έναντι β⁰. (n) p < 0,05, β⁺ έναντι β⁰.

Τέλος, αναδείχθηκαν διαφορές και σε μεταβολικές παραμέτρους. Στα κυκλοφορούντα ερυθροκύτταρα των αιμοδοτών β⁺, η ενεργότητα G6PD και τα επίπεδα NADPH και πυριδοξάλης ήταν αυξημένα σε σχέση με αυτά των β⁺ (**Εικόνα Δ26.Α**). Κατά την αποθήκευση, ξεχώρισε η αργινίνη, η οποία διατήρησε τα υψηλότερα επίπεδα που παρουσίαζε και *in vivo* στην ομάδα β⁺ έναντι των υπόλοιπων ομάδων, συνοδευόμενη από την αργινάση, με τη μειωμένη παρουσία της στη μεμβράνη των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων των ίδιων αιμοδοτών (**Εικόνα Δ26.Β**). Επίσης, οι β⁺, συγκρινόμενοι με τους β⁺, εμφάνισαν χαμηλότερα ερυθροκυτταρικά επίπεδα χολίνης και 1-φωσφορικής σφιγγοσίνης κατά την αποθήκευση (**Εικόνα Δ26.Β**). Εστιάζοντας στους β⁰, μεταβολίτες των

καρβοξυλικών οξέων, του μονοπατιού της γλουταθειόνης αλλά και του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων βρέθηκαν μειωμένοι στα ερυθροκύτταρά τους έναντι των άλλων δύο υποκατηγοριών ετερόζυγων (Εικόνα Δ27).



Εικόνα Δ26: Διαγραμματική απεικόνιση επιπέδων μεταβολιτών σε ερυθροκύτταρα ετερόζυγων β⁺⁺, β⁺ και β⁰. (Α) Επίπεδα ενεργότητας G6PD και σχετικών μεταβολιτών σε κυκλοφορούντα ερυθροκύτταρα. (Β) Επίπεδα μεταβολιτών και σχετιζόμενων πρωτεϊνών σε φρέσκο αίμα και αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα σε συνθήκες τράπεζας αίματος. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. F: φρέσκο αίμα. A.U.: αυθαίρετες μονάδες (arbitrary units). (†) p < 0,05, β⁺⁺ έναντι β⁺. (°) p < 0,05, β⁺⁺ έναντι β⁰. (#) p < 0,05, β⁺ έναντι β⁰.



Εικόνα Δ27: Απεικόνιση επιπέδων μεταβολιτών σε ερυθροκύτταρα ετερόζυγων β⁰ σε σχέση με β⁺⁺ και β⁺ με τη μορφή θερμικού χάρτη. Οι δείκτες αφορούν στην αποθηκευτική περίοδο που παρατηρούνται οι διαφορές. Όσο πιο σκούρο το μπλε χρώμα, τόσο πιο μικρός είναι ο λόγος β⁰/β⁺⁺ ή β⁰/β⁺. Ισχύει p < 0,05 και fold > 1.25 σε όλες τις διαφορές.

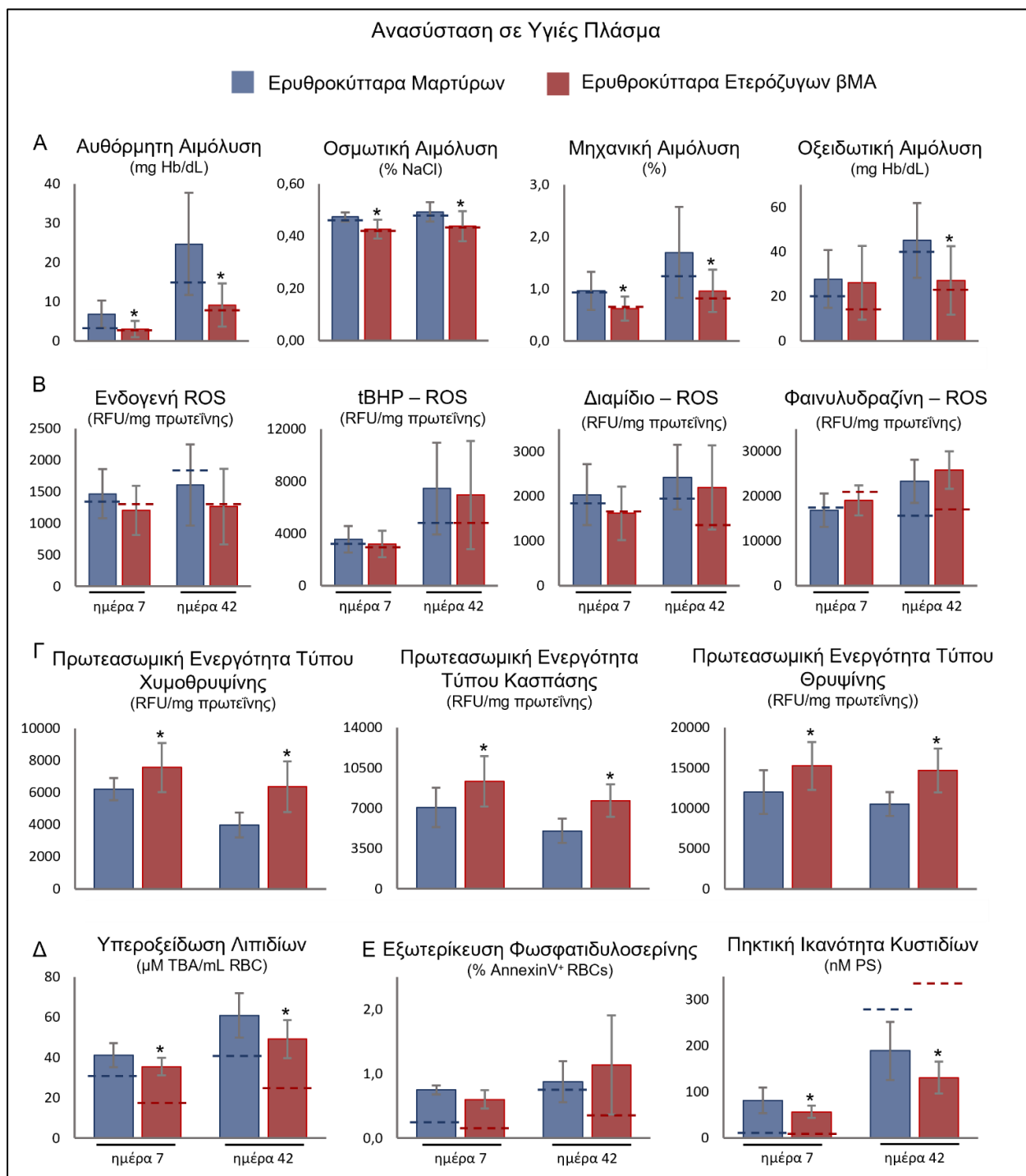
Δ.3 Μετα-μεταγγισιακή Μελέτη *in vitro* και *in vivo*

Για να μελετηθούν τα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων για β-μεσογειακή αναιμία σε όλους τους κρίκους της αλυσίδας της μετάγγισης πραγματοποιήθηκαν πειράματα προσομοίωσης *in vitro*, καθώς και μεταγγίσεις σημασμένων ερυθροκυττάρων σε ζωικά μοντέλα.

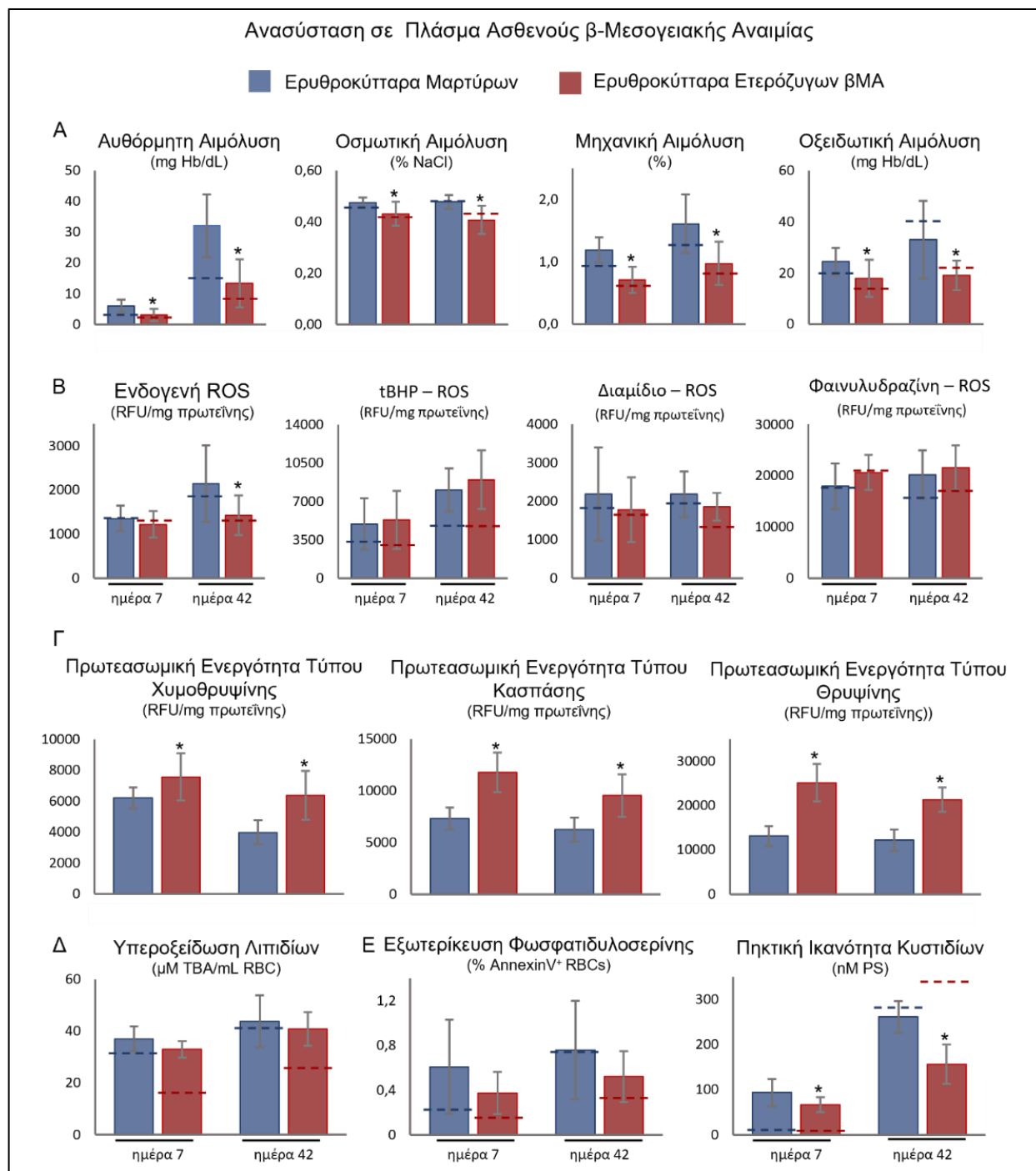
Δ.3.1 *In vitro* Μοντέλο Μετάγγισης

Αρχικά, ερυθροκύτταρα από δέκα αιμοδοτές κάθε ομάδας αναμίχθηκαν με πλάσμα υποψήφιων αιμοληπτών (υγιών και μεταγγισιοεξαρτώμενων βΜΑ ασθενών) στην αρχή και το τέλος της αποθηκευτικής περιόδου. Όπως αναλύθηκε στην παράγραφο των Μεθόδων, η αναλογία της ανάμιξης αντιστοιχεί στη χορήγηση δύο μονάδων μετάγγισης. Ακολούθησε 24ωρη επώαση σε θερμοκρασία σώματος και μετρήσεις πλήθους παραμέτρων αιμόλυσης, οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου και πρωτεόστασης.

Η έκθεση σε υγιές πλάσμα και θερμοκρασία σώματος οδήγησε στη διατήρηση της χαμηλότερης αυθόρμητης, οσμωτικής και μηχανικής αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με μεταλλαγές στο γονίδιο της β-σφαιρίνης, τόσο εκείνων πρώιμης όσο και προχωρημένης αποθήκευσης (**Εικόνα Δ28.Α**). Μάλιστα, τα κύτταρα ετερόζυγων αιμοδοτών ημέρας 42 εμφάνισαν και χαμηλότερα επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης μετά από οξειδωτικό ερέθισμα. Όσον αφορά στα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS, δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά μεταξύ των ανασυσταμένων κυττάρων των δύο ομάδων, είτε με είτε χωρίς την εφαρμογή εξωτερικού οξειδωτικού ερεθίσματος (**Εικόνα Δ28.Β**). Από την άλλη, οι πρωτεασωμικές ενεργότητες τύπου χυμοθρυψίνης, κασπάσης και θρυψίνης παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα στα ερυθροκύτταρα της ομάδας αιμοδοτών με στίγμα σε σχέση με των μαρτύρων, και στις δύο χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν (**Εικόνα Δ28.Γ**). Στη μεμβράνη, η υπεροξειδωση των λιπιδίων βρέθηκε χαμηλότερη στην ίδια ομάδα αιμοδοτών (**Εικόνα Δ28.Δ**). Τέλος, ενώ η εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης μετά την προσομοίωση της μετάγγισης δε διέφερε μεταξύ των δύο κατηγοριών ερυθροκυττάρων, τα παραγόμενα κυστίδια που εκθέτουν το συγκεκριμένο μόριο ήταν λιγότερα σε βΜΑ ετερόζυγα ερυθροκύτταρα πρώιμης και προχωρημένης αποθήκευσης (**Εικόνα Δ28.Ε**). Όπως στο υγιές πλάσμα, έτσι και στο θαλασαιμικό, τα ερυθροκύτταρα με στίγμα βΜΑ εμφάνισαν χαμηλότερη αυθόρμητη λύση, καθώς και μειωμένη επιρρέπεια σε λύση μετά από μηχανικό, οσμωτικό και οξειδωτικό ερέθισμα (**Εικόνα Δ29.Α**). Τα ερυθροκύτταρα προχωρημένης αποθήκευσης της ομάδας των ετερόζυγων που ανασυστάθηκαν με βΜΑ πλάσμα είχαν μικρότερη συσσώρευση ενδογενών ROS σε σχέση με τα αντίστοιχα των αιμοδοτών-μαρτύρων, αποτέλεσμα που δεν εμφανίστηκε στις επαγόμενες ROS (**Εικόνα Δ29.Β**). Για ακόμη μία φορά, οι τρεις πρωτεασωμικές ενεργότητες βρέθηκαν υψηλότερες καθολικά στα ανασυσταμένα κύτταρα των αιμοδοτών με στίγμα βΜΑ (**Εικόνα Δ29.Γ**). Σε αντίθεση με το υγιές πλάσμα, η έκθεση σε πλάσμα ασθενούς δεν οδήγησε σε ανάδειξη διαφορών στην υπεροξειδωση των λιπιδίων της μεμβράνης των δύο κατηγοριών κυττάρων (**Εικόνα Δ29.Δ**). Όμως, παρά την απουσία διαφοράς στην εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, πάλι ήταν λιγότερα τα πηκτικά κυστίδια που δημιουργήθηκαν μετά την ανασύσταση βΜΑ ετερόζυγων ερυθροκυττάρων σε σύγκριση με των μαρτύρων, ανεξαρτήτως χρόνου αποθήκευσης (**Εικόνα Δ29.Ε**).



Εικόνα Δ28: Διαγραμματική απεικόνιση φυσιολογικών παραμέτρων ανασυσταμένων σε υγιές πλάσμα ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία στη β-μεσογειακή αναιμία. Επίπεδα παραμέτρων (Α) αιμόλυσης, (Β) οξειδωτικού φορτίου, (Γ) πρωτεασωμικής ενεργότητας, (Δ) υπεροξειδωσης λιπιδίων και (Ε) εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο των αποθηκευτικών επιπέδων. (*) $P < 0,05$, ετερόζυγοι έναντι μαρτύρων.



Εικόνα Δ29: Διαγραμματική απεικόνιση φυσιολογικών παραμέτρων ανασυσταμένων σε θαλασσαιμικό πλάσμα ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με ή χωρίς ετεροζυγωτία στη β-μεσογειακή αναίμια. Επίπεδα παραμέτρων (Α) αιμόλυσης, (Β) οξειδωτικού φορτίου, (Γ) πρωτεασωμικής ενεργότητας, (Δ) υπεροξειδωσης λιπιδίου και (Ε) εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στο μέσο όρο των αποθηκευτικών επιπέδων. (*) $P < 0,05$, ετερόζυγοι έναντι μαρτύρων.

Δ.3.2 Ζωικό Μοντέλο Μετάγγισης

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μετάγγισης σε μύες, παραλήφθηκαν δεκαέξι επιπλέον μονάδες μετάγγισης (8 από κάθε ομάδα). Το πρώτο βήμα, ήταν να ελεγχθεί ότι η συγκεκριμένη ομάδα ετερόζυγων ήταν αντιπροσωπευτική, πως παρουσίαζε δηλαδή τις ίδιες διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες. Για το λόγο αυτό,

εκτελέστηκαν διάφορα φυσιολογικά πειράματα στην αρχή, το μέσο και το τέλος της αποθηκευτικής περιόδου των νέων μονάδων. Οι διαφορές παρουσιάζονται στον **Πίνακα Δ2**.

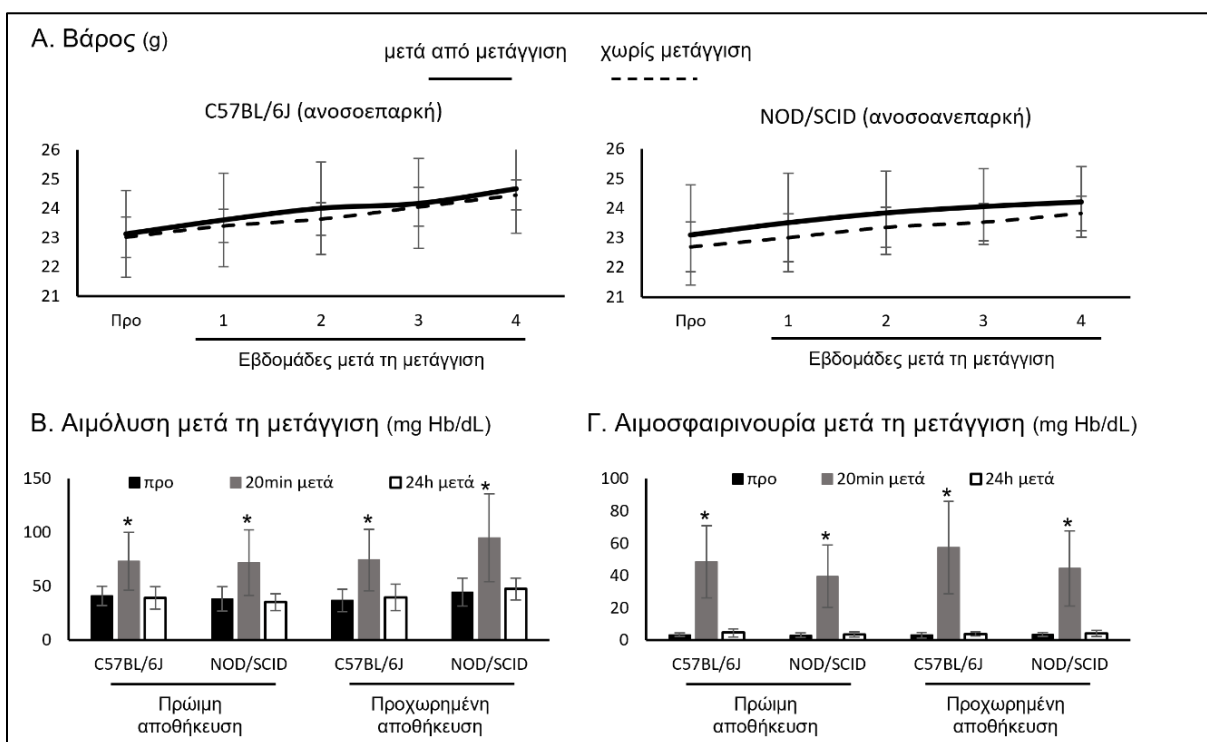
Πίνακας Δ2. Διαφορές σε φυσιολογικές παραμέτρους κατά την αποθήκευση ερυθροκυττάρων από ετερόζυγους για βΜΑ και αιμοδότες μάρτυρες.

Παράμετροι	Ημέρα 7		Ημέρα 21		Ημέρα 42	
	Μάρτυρες	Ετερόζυγοι	Μάρτυρες	Ετερόζυγοι	Μάρτυρες	Ετερόζυγοι
Αυθόρμητη Αιμόλυση (mg Hb/dL)	10,47±3,78	8,70±2,24	22,8±4,70	17,10±3,67*	37,22±7,69	25,66±5,61*
Οσμωτική Αιμόλυση (% NaCl)	0,443±0,011	0,381±0,029*	0,474±0,010	0,408±0,036*	0,480±0,019	0,409±0,032*
Μηχανική Αιμόλυση (%)	1,025±0,190	0,623±0,147*	1,148±0,195	0,756±0,082*	1,302±0,181	0,977±0,146*
Οξειδωτική Αιμόλυση (mg Hb/dL)	14,57±3,85	13,26±3,39	29,88±7,42	19,34±6,50*	48,60±12,53	29,93±8,81*
Αντιοξειδωτική Ικανότητα (Α.Ι.) Υπερκειμένου (μM Fe ²⁺)	418±60	523±95*	392±36	472±103	355±52	380±63
Εξαρτώμενη από το Ουρικό Α.Ι. (μM Fe ²⁺)	239±29	358±69*	231±38	296±51*	161±45	155±64
Ανεξάρτητη από το Ουρικό Α.Ι. (μM Fe ²⁺)	178±59	165±48	161±34	176±96	194±39	235±35
Ενδογενείς ROS (RFU/mg πρωτεΐνης)	980±201	840±133	1084±102	942±110*	870±145	694±72*
tBHP – ROS (RFU/mg πρωτεΐνης)	3043±964	2520±832	3994±1217	2987±1233	2435±571	2112±610
Διαμίδιο – ROS (RFU/mg πρωτεΐνης)	2067±612	1888±679	2198±621	1983±633	1933±688	1463±591
Φαινυλυδραζίνη – ROS (RFU/mg πρωτεΐνης)	15751±5380	18152±5552	16492±4238	16713±3425	14211±5344	15407±6125
Υπεροξειδωση Λιπιδίων (μM TBA/ mL RBC)	35,16±5,26	30,57±3,19	43,32±6,04	36,10±4,58*	48,41±5,12	41,30±5,16*

Οι τιμές αντιστοιχούν σε μέσο όρο ± τυπική απόκλιση. (*) P < 0,05. ROS: δραστικές ρίζες οξυγόνου. tBHP: τερτ-βούτυλ-υδροπεροξειδίο. TBA: θειοβαρβιτουρικό οξύ.

Τα ερυθροκύτταρα της νεο-παραληφθείσας ομάδας ετερόζυγων όντως παρουσίασαν τα χαρακτηριστικά που αναλύθηκαν στην αποθηκευτική μελέτη της προηγούμενης ομάδας. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκαν ανθεκτικότερα σε λύση με ή χωρίς επιπλέον ερέθισμα και εμφάνισαν μειωμένες ενδογενείς ROS και χαμηλότερη υπεροξείδωση λιπιδίων από το μέσο της αποθήκευσης και μετά, συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα των αιμοδοτών-μαρτύρων. Επίσης, η εξωκυτάρια αντιοξειδωτική τους ικανότητα βρέθηκε αυξημένη, κυρίως εκείνη που εξαρτάται από το ουρικό οξύ.

Μετά τη μετάγγιση μίγματος διαφορετικά σημασμένων ερυθροκυττάρων από τις δύο ομάδες σε μύες (ανοσοεπαρκείς και ανοσοανεπαρκείς), δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά στη συμπεριφορά των ζώων. Συγκεκριμένα, οι μύες δεν ήταν ληθαργικοί αλλά χαρακτηρίζονταν από φυσιολογική κινητικότητα, κατανάλωναν την αναμενόμενη ποσότητα τροφής και νερού και διατηρούσαν την κοινωνικότητά τους. Έγινε εβδομαδιαία καταμέτρηση του βάρους τους, σε σύγκριση με αντίστοιχους μύες που δεν είχαν δεχθεί μετάγγιση, και δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή (**Εικόνα Δ30.Α**). Απευθείας μετά τη μετάγγιση (εντός εικοσαλέπτου) οι μύες, ανεξαρτήτως του ανοσολογικού τους υποβάθρου, εμφάνισαν αυξημένη ελεύθερη αιμοσφαιρίνη τόσο στο πλάσμα (**Εικόνα Δ30.Β**), όσο και στα ούρα (**Εικόνα Δ30.Γ**), αποτέλεσμα που δεν παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά.

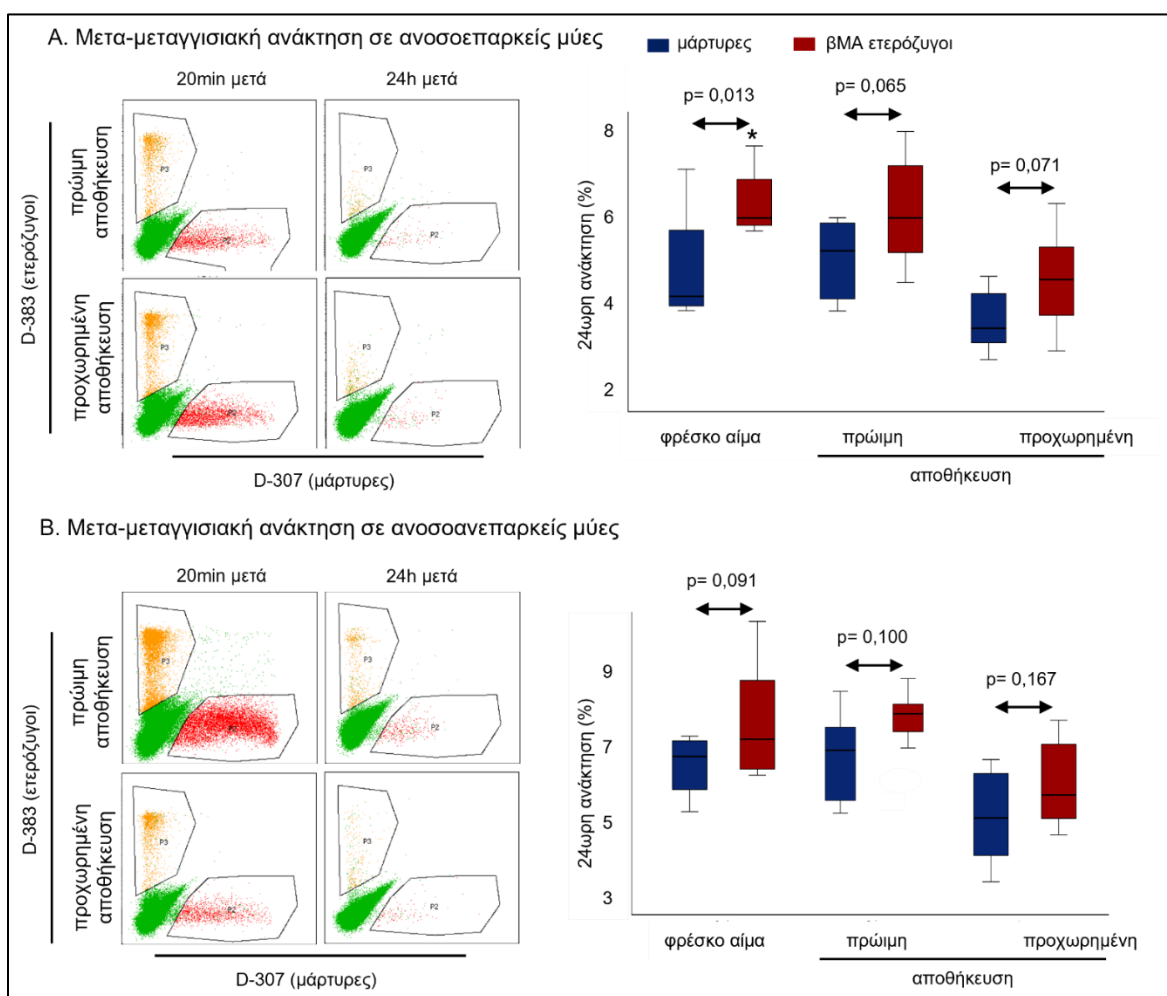


Εικόνα Δ30: Διαγραμματική απεικόνιση παραμέτρων ευζωίας και αιμόλυσης σε μύες που δέχθηκαν μετάγγιση ανθρώπινων ερυθροκυττάρων. (Α) Μεταβολή του βάρους μεταγγιζόμενων μυών σε σχέση με μύες-μάρτυρες. Ελεύθερη αιμοσφαιρίνη στο πλάσμα (Β) και στα ούρα (Γ) μυών πριν, αμέσως μετά και 24 ώρες μετά τη μετάγγιση. Οι μπάρες σφάλματος αντιστοιχούν σε τιμή τυπικής απόκλισης. (*) $P < 0,05$, 20min μετά έναντι πριν από- και 24 ώρες μετά- τη μετάγγιση.

Για να αποσαφηνιστεί εάν η παρατηρούμενη ελεύθερη αιμοσφαιρίνη οφείλεται περισσότερο σε κάποια εκ των δύο κατηγοριών ερυθροκυττάρων, και έτσι να εξακριβωθεί εάν υπάρχει διαφορά που μπορεί να επηρεάσει τα μετα-μεταγγισιακά αποτελέσματα, έγινε και διακριτή μετάγγιση μυών με ερυθροκύτταρα των δύο

ομάδων. Όμως, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στα επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα (π.χ., ερυθροκύτταρα προχωρημένης αποθήκευσης, 20 λεπτά σε ανοσοεπαρκείς μύες: $81,37 \pm 38,55$ έναντι $85,62 \pm 31,57$ / σε ανοσοανεπαρκείς μύες: $92,55 \pm 32,12$ έναντι $87,32 \pm 28,48$, ετερόζυγοι έναντι μαρτύρων), ούτε και στα ούρα (π.χ., ερυθροκύτταρα προχωρημένης αποθήκευσης, 20 λεπτά σε ανοσοεπαρκείς μύες: $48,52 \pm 19,35$ έναντι $42,86 \pm 21,7$ / σε ανοσοανεπαρκείς μύες: $40,32 \pm 26,70$ έναντι $51,28 \pm 32,52$, ετερόζυγοι έναντι μαρτύρων).

Μετά τη μετάγγιση μίγματος φρέσκων ή αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων από ετερόζυγους και αιμοδοτές-μάρτυρες (σε αναλογία 1:1), που είχαν σημειωθεί με τις φθορίζουσες χρωστικές D-383 και D-307, αντίστοιχα, αναδείχθηκαν τάσεις για αυξημένη ανάκτηση των ερυθροκυττάρων που προέρχονταν από ετερόζυγους αιμοδοτές, ανεξαρτήτως του γενετικού υποβάθρου του ζώου-δέκτη και της ηλικίας των κυττάρων (**Εικόνα Δ31**).



Εικόνα Δ31: Διαγραμματική απεικόνιση της 24ωρης ανάκτησης μετά από μετάγγιση ανθρώπινων ερυθροκυττάρων (μαρτύρων και ετερόζυγων για β-μεσογειακή αναιμία) σε ανοσοεπαρκείς (A) και ανοσοανεπαρκείς (B) μύες. Στην εικόνα φαίνονται κι επιλεγμένα dot plots από την κυτταρομετρία ροής. (*) $P < 0,05$, ετερόζυγοι έναντι μαρτύρων.

Παρότι οι συγκεκριμένες χρωστικές έχουν ξαναχρησιμοποιηθεί σε πρωτόκολλα μετα-μεταγγισιακής ανάκτησης, δεν έχουν δοκιμαστεί στο παρελθόν σε ερυθροκύτταρα αιμοδοτών με μεταλλαγές στη β-σφαιρίνη, επομένως πραγματοποιήθηκε και η αντίστροφη χρώση με σκοπό την επιβεβαίωση του παρατηρούμενου

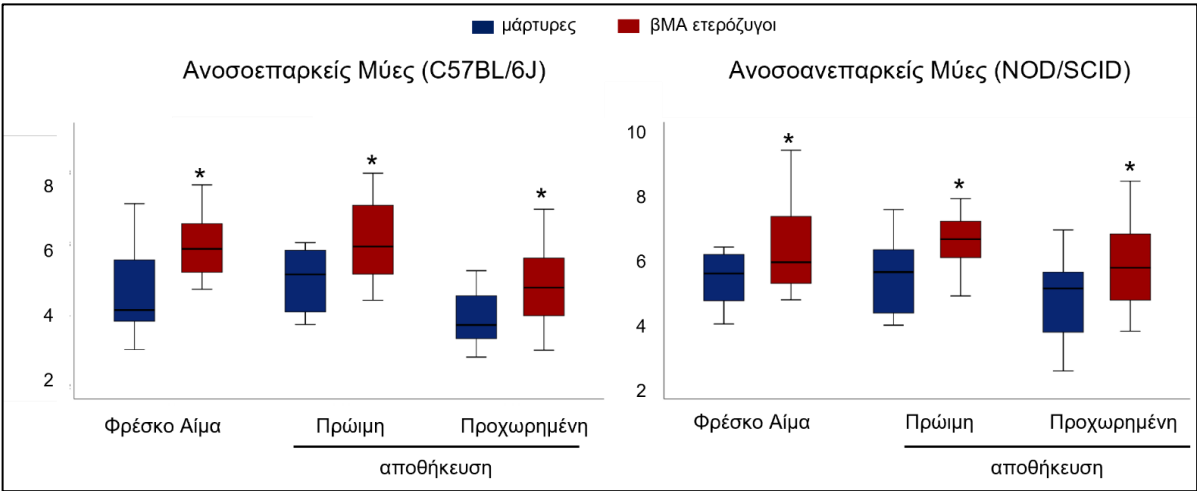
προτύπου. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα Δ3**, η διαφορετική επιβίωση στο ξενοβιωτικό μοντέλο μετάγγισης επιβεβαιώθηκε και στις νέες συνθήκες.

Πίνακας Δ3. Μετα-μεταγγισιακή ανάκτηση ερυθροκυττάρων ετερόζυγων για β-μεσογειακή αναιμία και μαρτύρων μετά από αντίστροφη σήμανση.

	Φρέσκα Ερυθροκύτταρα		Πρώιμη Αποθήκευση		Προχωρημένη Αποθήκευση	
	Μάρτυρες	Ετερόζυγοι	Μάρτυρες	Ετερόζυγοι	Μάρτυρες	Ετερόζυγοι
Ανάκτηση σε C57BL/6J	4,36±1,32	5,59±1,06	4,83±0,89	5,96±1,19*	4,10±0,82	5,05±1,22
μύες (%)	P=0,059		P=0,049		P=0,091	
Ανάκτηση σε NOD/SCID	6,26±0,97	7,03±1,35	6,27±1,08	7,29±0,91	5,43±1,30	6,53±1,33
μύες (%)	P=0,224		P=0,085		P=0,116	

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. (*) P < 0,05.

Η συνέπεια των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο συνδυασμών χρώσης των κυττάρων, δηλαδή η σταθερά παρατηρούμενη τάση υπέρ των ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με στίγμα βΜΑ, κατέστησε δυνατή τη συνολική αξιολόγηση της ευρεθείσας διαφορικής ανάκτησης. Πιο συγκεκριμένα, μέσω ανάλυσης του συνόλου των ποσοστών 24ωρης ανάκτησης που προέκυψαν από τους δύο τρόπους χρώσης (**Εικόνα Δ31, Πίνακας Δ3**), όλες οι διαφορές, ανεξαρτήτως χρόνου αποθήκευσης και ανοσοεπάρκειας δέκτη, αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές (**Εικόνα Δ32**).



Εικόνα Δ32: Διαγραμματική απεικόνιση της 24ωρης ανάκτησης μετά από μετάγγιση ανθρώπινων ερυθροκυττάρων (μαρτύρων και ετερόζυγων για β-μεσογειακή αναιμία) σε ανοσοεπαρκείς (Α) και ανοσοανεπαρκείς (Β) μύες, ανεξαρτήτως χρώσης. (*) P < 0,05, ετερόζυγοι έναντι μαρτύρων.

Δ.4 Διασύνδεση Αιμοδότη – Μετα-μεταγγισιακών Φαινοτύπων

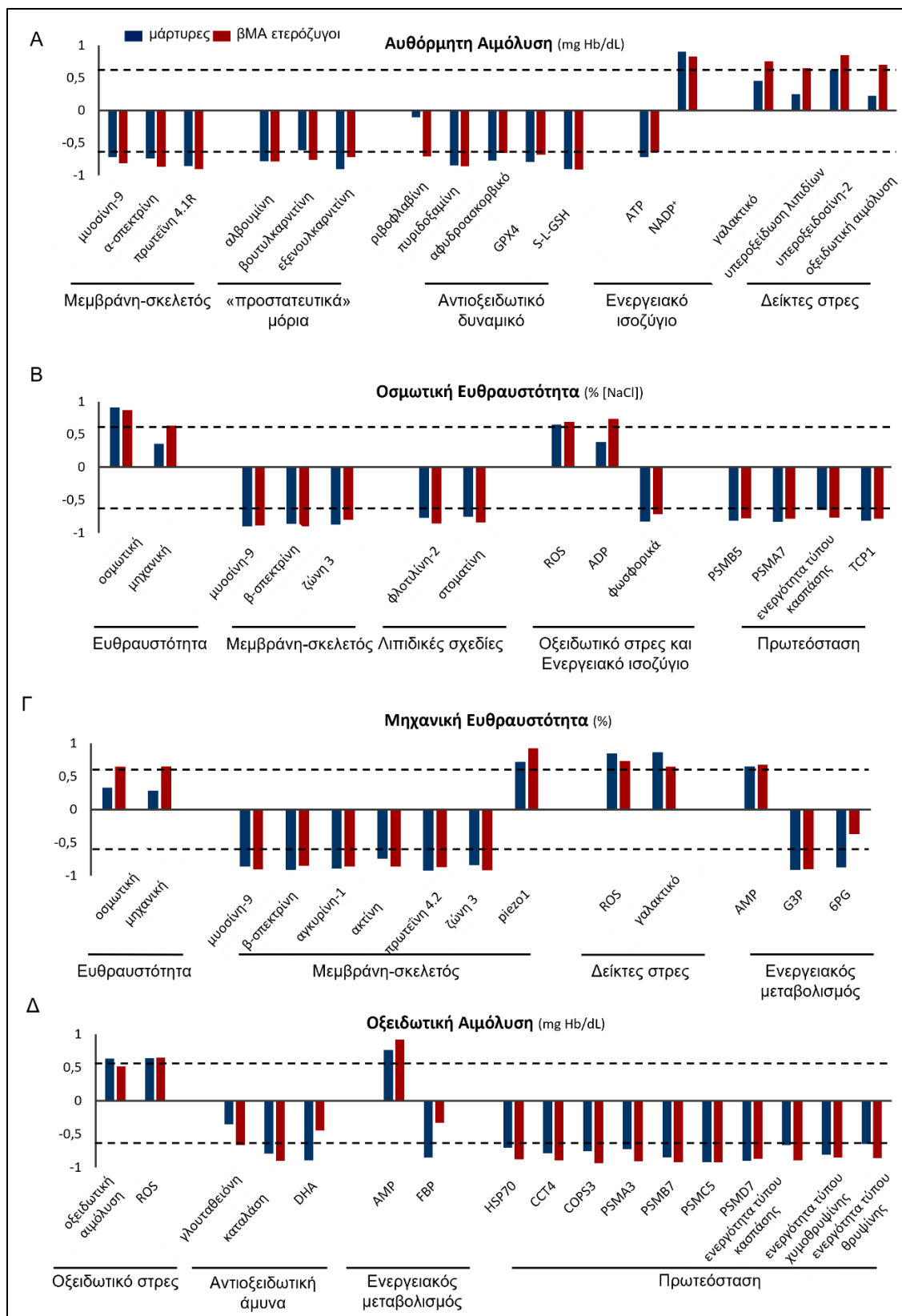
Μεταξύ των δύο κατηγοριών αιμοδοτών παρατηρήθηκαν διαφορές σε κάθε κρίκο της αλυσίδας μετάγγισης, επομένως, για να βρεθούν πιθανές υποβόσκουσες αιτίες, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις συσχέτισης

μεταξύ παραμέτρων των τριών διακριτών τμημάτων της αλυσίδας. Οι συσχετίσεις αυτές μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για διενέργεια στοχευμένων πειραμάτων που θα οδηγήσουν στην ανίχνευση του μηχανιστικού υποβάθρου των παρατηρούμενων διαφορών μεταξύ των δύο ομάδων.

Δ.4.1 Συσχετίσεις Αποθηκευτικών – Μετα-μεταγγισιακών Παραμέτρων *in vitro* και *in vivo*

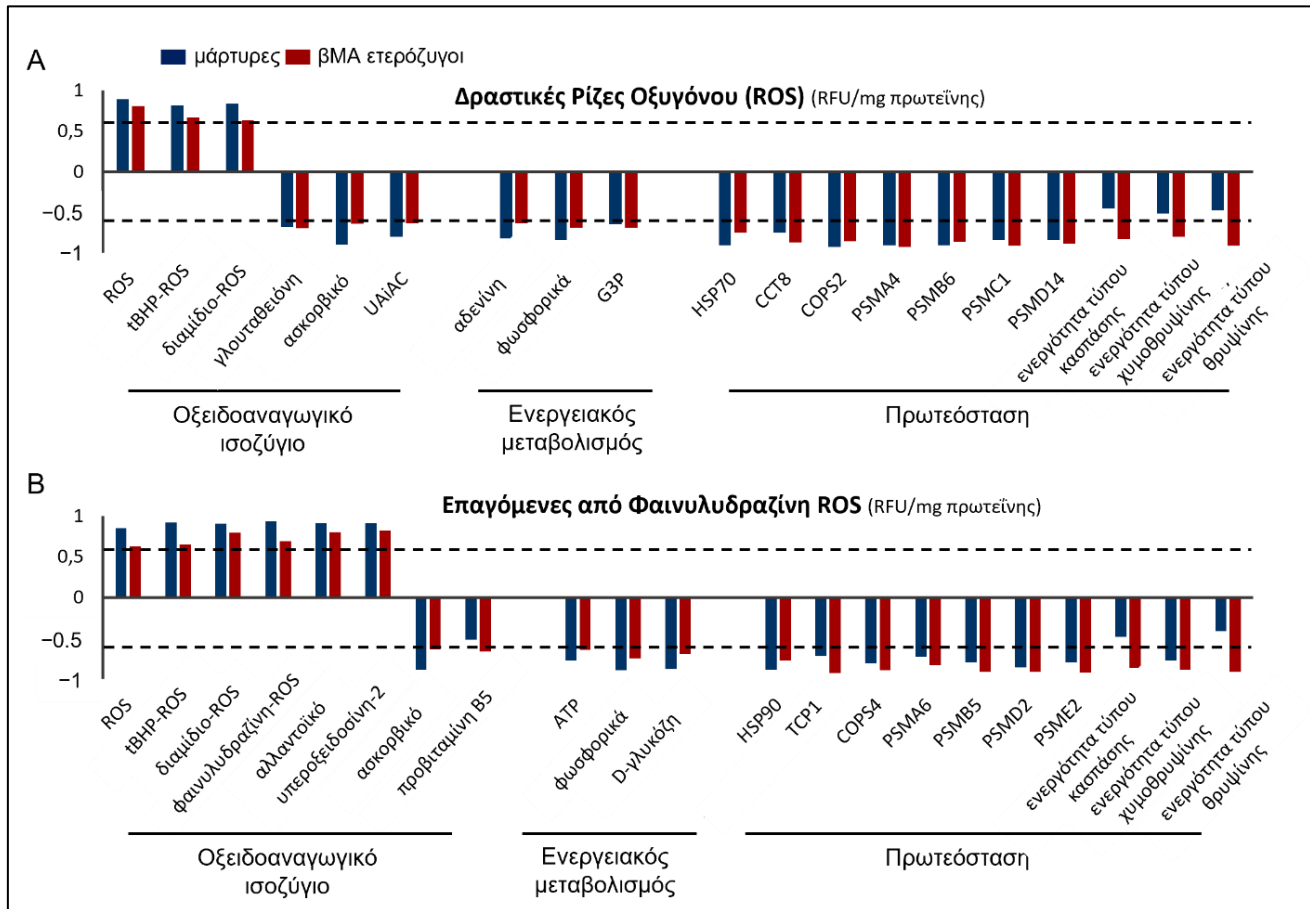
Πρώτα απ' όλα, ελέγχθηκε η ύπαρξη στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων μεταξύ φυσιολογικών και ολιστικών παραμέτρων των αποθηκευμένων δειγμάτων και φυσιολογικών παραμέτρων ή της ανάκτησης μετά την *in vitro* ή *in vivo* μετάγγιση, αντίστοιχα. Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης όσον αφορά σε ερυθροκύτταρα προχωρημένης αποθήκευσης, ανασυσταμένα σε θαλασσαιμικό πλάσμα, όμως αντίστοιχα αποτελέσματα αναδείχθηκαν και στις υπόλοιπες συνθήκες της παρούσας μελέτης.

Συστατικά του κυτταροσκελετού, όπως η σπεκτρίνη, αλλά και μόρια όπως η αλβουμίνη και οι καρνιτίνες των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων, βρέθηκαν αρνητικά συσχετιζόμενα με την αυθόρμητη αιμόλυση μετά την ανασύσταση, ανεξαρτήτως της ύπαρξης ή όχι μεταλλαγών στη β-σφαιρίνη (**Εικόνα Δ33.Α**). Αντιοξειδωτικά μόρια, συμπεριλαμβανομένης της πυριδοξαμίνης και του αφυδροασκορβικού οξέος, καθώς και το ενδοκυττάριο ATP παρουσίασαν αντίστοιχη εικόνα. Αντιθέτως, το NADP⁺ και δείκτες στρες, όπως το γαλακτικό (μόνο στους ετερόζυγους) ή η πρόσδεση υπεροξειδοσίνης-2 στη μεμβράνη, βρέθηκαν θετικά συσχετιζόμενα με την αυθόρμητη αιμόλυση μετά την *in vitro* μετάγγιση (**Εικόνα Δ33.Α**). Η οσμωτικά επαγόμενη αιμόλυση των ανασυσταμένων ερυθροκυττάρων βρέθηκε ανάλογη της αντίστοιχης κατά την αποθήκευση και στις δύο κατηγορίες αιμοδοτών, και επιπλέον ανάλογη της μηχανικής αιμόλυσης αποκλειστικά στους ετερόζυγους (**Εικόνα Δ33.Β**). Ο κυτταροσκελετός, οι λιπιδικές σχεδίες και το οξειδωτικό/ενεργειακό ισοζύγιο εμφάνισαν στην οσμωτική ευθραυστότητα το ίδιο μοτίβο με εκείνο που παρατηρήθηκε στην αυθόρμητη λύση. Επιπλέον, η παρουσία πρωτεοστατικών μορίων στη μεμβράνη φάνηκε να συνδέεται αρνητικά με τη συγκεκριμένη παράμετρο (**Εικόνα Δ33.Β**). Η μηχανική αιμόλυση των ανασυσταμένων ερυθροκυττάρων που προέρχονταν από ετερόζυγους αιμοδότες εμφάνισε επίπεδα ανάλογα τόσο της μηχανικής όσο και της οσμωτικής αιμόλυσης κατά την αποθήκευση (**Εικόνα Δ33.Γ**). Και σε αυτή την παράμετρο, συστατικά του κυτταροσκελετού, συμπεριλαμβανομένης της μυοσίνης-9, δείκτες στρες και ο ενεργειακός μεταβολισμός, παρουσίασαν και στις δύο κατηγορίες ερυθροκυττάρων αποτελέσματα αντίστοιχα των προαναφερθέντων. Αξίζει να αναφερθεί πως τα επίπεδα του μηχανοευαίσθητου καναλιού piezo-1 συσχετίζονταν θετικά με τη μηχανική ευθραυστότητα μετά την ανασύσταση (**Εικόνα Δ33.Γ**). Τέλος, τόσο τα εγγενή επίπεδα ROS, όσο και η οξειδωτική αιμόλυση (κυρίως στους μάρτυρες) των αποθηκευμένων κυττάρων, μαζί με δείκτες ενεργειακού στρες (AMP) αναδείχθηκαν ως θετικά συσχετιζόμενα με την οξειδωτική αιμόλυση των *in vitro* «μεταγγισμένων» ερυθροκυττάρων (**Εικόνα Δ33.Δ**). Στον αντίποδα, αντιοξειδωτικές παράμετροι, όπως η γλουταθειόνη (στοιχείο ετερόζυγους) και το αφυδροασκορβικό οξύ (στοιχείο μάρτυρες), καθώς και πλήθος πρωτεοστατικών παραμέτρων, συμπεριλαμβανομένων των τριών ενεργοτήτων του πρωτεασώματος, παρουσίασαν αρνητικές συνδέσεις με την οξειδωτική αιμόλυση (**Εικόνα Δ33.Δ**).



Εικόνα Δ33: Διαγραμματική απεικόνιση συσχετίσεων (κατακόρυφος άξονας: r) παραμέτρων της αποθήκευσης (οριζόντιος άξονας) και της μετα-αποθηκευτικής αυθόρμητης (Α), οσμωτικής (Β), μηχανικής (Γ) και οξειδωτικής αιμόλυσης (Δ). Διακεκομμένη γραμμή: όριο στατιστικής σημασίας. 6PG: 6-φωσφογλυκονικό οξύ, CCT: υπομονάδα συμπλόκου T, COPS: υπομονάδα COP9 σηματοσώματος, DHA: αφυδροασκορβικό οξύ, FBP: 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη, G3P: 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, GPX4: υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, PSM: πρωτεασωμική υπομονάδα, S-L-GSH: S-λακτοϋλγκουταθειόνη, TCP1: πρωτεΐνη 1 του συμπλόκου T.

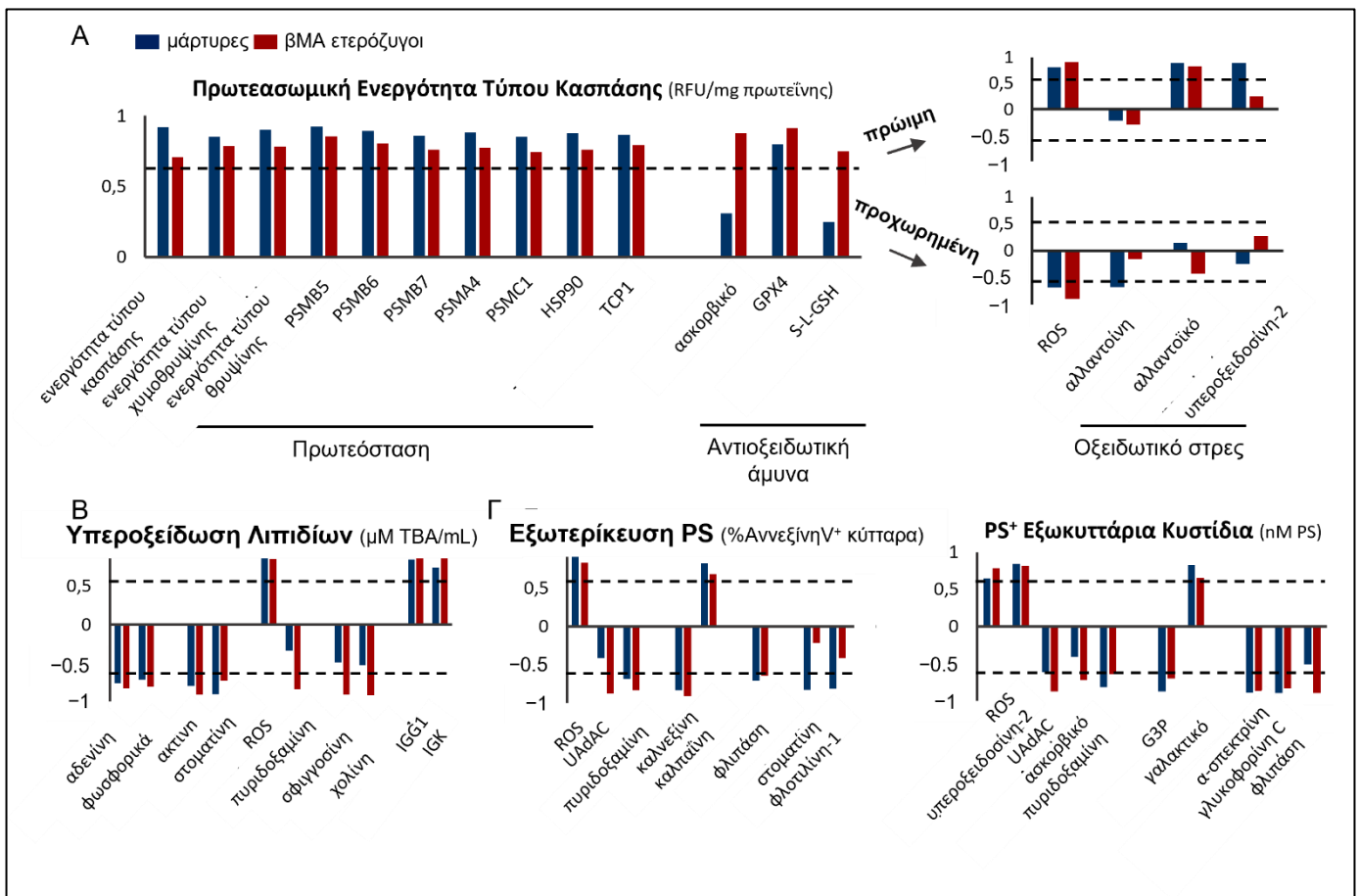
Όσον αφορά στο οξειδωτικό φορτίο (εγγενές ή επαγόμενο) των ανασυσταμένων ερυθροκυττάρων, εντοπίστηκε μία γενική διασύνδεση με τα επίπεδα εγγενών/επαγόμενων ROS κατά την αποθήκευση, παράλληλα με μία αντίστροφη συσχέτιση με αντιοξειδωτικά μόρια, όπως το ασκορβικό ή η γλουταθειόνη (**Εικόνα Δ34**). Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ του ενεργειακού μεταβολισμού (ATP, φωσφορικό), καθώς και πρωτεοστατικών πρωτεϊνών των αποθηκευμένων κυττάρων, και της συσσώρευσης ROS μετά την προσομοίωση της μετάγγισης. Είναι σημαντικό να μην παραληφθεί το γεγονός ότι οι ενεργότητες του πρωτεασώματος εμφάνισαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση μόνο στην ομάδα των ετερόζυγων αιμοδοτών (**Εικόνα Δ34**).



Εικόνα Δ34: Διαγραμματική απεικόνιση συσχετίσεων (κατακόρυφος άξονας: r) παραμέτρων της αποθήκευσης (οριζόντιος άξονας) και της μετα-αποθηκευτικής ενδοκυττάριας συσσώρευσης ενδογενών (Α) και επαγόμενων από φαινυλδραζίνη (Β) δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS). Αντίστοιχες συσχετίσεις βρέθηκαν και μετά την επαγωγή με τερτ-βουτυλ-υδροϋπεροξειδίο (tBHP) και διαμίδιο. Διακεκομμένη γραμμή: όριο στατιστικής σημασίας. CCT: υπομονάδα συμπλόκου T, COPS: υπομονάδα COP9 σηματοσώματος, G3P: 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, PSM: πρωτεασωματική υπομονάδα, TCP1: πρωτεΐνη 1 του συμπλόκου T, UAIAc: εξωκυττάρια αντιοξειδωτική ικανότητα ανεξάρτητη του ουρικού.

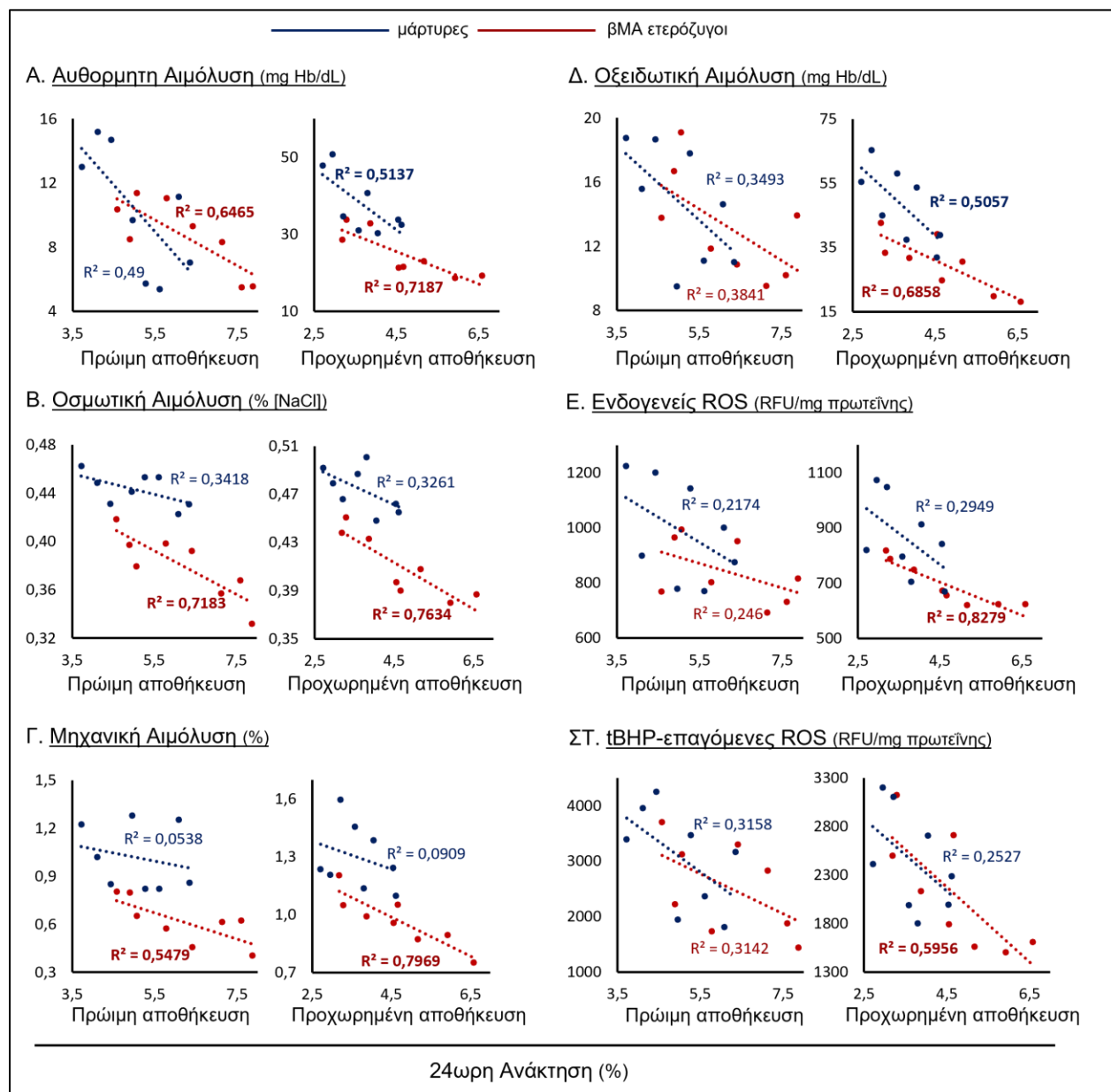
Η πρωτεασωματική ενεργότητα των ανασυσταμένων ερυθροκυττάρων βρέθηκε ανάλογη της αντίστοιχης κατά την αποθήκευση, όπως και ανάλογη της ύπαρξης πρωτεασωματικών υπομονάδων και μοριακών συνοδών στη μεμβράνη (**Εικόνα Δ35.Α**). Το οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο εμφανίστηκε για άλλη μία φορά στη συγκεκριμένη ανάλυση, με αντιοξειδωτικές παραμέτρους (κυρίως στην ομάδα των ετερόζυγων) να συνδέονται θετικά και οξειδωτικούς δείκτες να εμφανίζουν διακριτό μοτίβο ανάλογα με το χρόνο αποθήκευσης: θετική σύνδεση στην

αρχή (π.χ. αλλαντοϊκό οξύ) και αρνητική στο τέλος (π.χ. εγγενή ROS) (**Εικόνα Δ35.Α**). Η υπεροξειδωση των λιπιδίων στο περιβάλλον προσομοίωσης του δέκτη, βρέθηκε να συσχετίζεται αρνητικά με το ενεργειακό δυναμικό (π.χ. αδενίνη) και τη στοματίνη και στις δύο ομάδες αιμοδοτών, ενώ αναδείχθηκε επιπλέον αρνητική συσχέτιση με την πυριδοξαμίνη και τη σφινγοσίνη στα ερυθροκύτταρα που προέρχονταν από ετερόζυγους (**Εικόνα Δ35.Β**). Αντιθέτως, θετικές συνδέσεις εμφανίστηκαν με τις εγγενείς ROS και τα επίπεδα συνδεδεμένων ανοσοσφαιρινών στη μεμβράνη (**Εικόνα Δ35.Β**). Η εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και η παραγωγή κυστιδίων που την εκφράζουν φάνηκε να συνδέεται με το οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο των αποθηκευμένων κυττάρων (π.χ. θετικά με τις εγγενείς ROS), καθώς και με παραμέτρους σχετιζόμενες με την ασύμμετρη κατανομή των λιπιδίων στη μεμβράνη (π.χ. αρνητικά με τη φλιπάση) (**Εικόνα Δ35.Γ**). Όπως ήταν αναμενόμενο, μόρια της ομοιόστασης του ασβεστίου αναδείχθηκαν στις συσχετίσεις με την εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, ενώ το ενεργειακό ισοζύγιο στις αντίστοιχες με τα προθρομβωτικά κυστίδια (**Εικόνα Δ35.Γ**).



Εικόνα Δ35: Διαγραμματική απεικόνιση συσχετίσεων (κατακόρυφος άξονας: r) παραμέτρων της αποθήκευσης (οριζόντιος άξονας) και της μετα-αποθηκευτικής πρωτεασωμικής ενεργότητας τύπου κασπάσης (Α), υπεροξειδωσης λιπιδίων της μεμβράνης (Β) και εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης (PS) σε κύτταρα και κυστίδια (Γ). Αντίστοιχες συσχετίσεις αναδείχθηκαν και στις ενεργότητες τύπου χυμοθρυψίνης και θρυψίνης. Διακεκομμένη γραμμή: όριο στατιστικής σημασίας. G3P: 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, GPX4: υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, PSM: πρωτεασωμική υπομονάδα, S-L-GSH: S-λακτοϋλγλουταθειόνη, tBHP: τερτ-βουτυλ-υδροπεροξείδιο, TCP1: πρωτεΐνη 1 του συμπλόκου T, UAdAC: εξωκυττάρια αντιοξειδωτική ικανότητα εξαρτώμενη του ουρικού.

Τέλος, ελέγχθηκε η ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ παραμέτρων της αποθήκευσης και της ανάκτησης στους μύες-δέκτες. Τόσο η αυθόρμητη, όσο και η οσμωτική και η μηχανική αιμόλυση εμφάνισαν αρνητική συσχέτιση με την 24ωρη ανάκτηση των ερυθροκυττάρων ετερόζυγων για βΜΑ πρώιμης και προχωρημένης αποθήκευσης (**Εικόνα Δ36.Α-Γ**). Από αυτές τις παραμέτρους μόνο η αυθόρμητη αιμόλυση των γηρασμένων ερυθροκυττάρων-μαρτύρων παρουσίασε την ίδια σύνδεση (**Εικόνα Δ36.Α**). Ανάμεσα στις οξειδωτικές παραμέτρους ξεχώρισε η οξειδωτική αιμόλυση στο τέλος της αποθήκευσης, η οποία βρέθηκε αντίστροφα συσχετιζόμενη με την ανάκτηση και στις δύο ομάδες αιμοδοτών, ενώ την ίδια σύνδεση παρουσίασαν οι ενδογενείς και tBHP-επαγόμενες ROS στα ερυθροκύτταρα προχωρημένης αποθήκευσης των ετερόζυγων για βΜΑ (**Εικόνα Δ36.Δ-ΣΤ**).



Εικόνα Δ36: Διαγραμματική απεικόνιση συσχετίσεων μεταξύ φυσιολογικών παραμέτρων των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων και της μετα-μεταγγισιακής ανάκτησης σε ανοσοεπαρκείς μύες. Παρουσιάζονται οι συσχετίσεις της ανάκτησης με την αυθόρμητη (Α), οσμωτική (Β), μηχανική (Γ) και οξειδωτική (Δ) αιμόλυση, καθώς και με τις εγγενείς (Ε) και επαγόμενες από τερτ-βούτυλ υδροϋπεροξείδιο (tBHP, ΣΤ) δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS). $R^2 > 0,5$ για $P < 0,05$. Παρόμοια αποτελέσματα, με ελαφρώς τροποποιημένα R^2 , αναδείχθηκαν και στους ανοσοανεπαρκείς μύες.

Δ.4.2 Άμεση και Έμμεση Σύνδεση Αιμοδότη – Μετα-μεταγγισιακών Φαινοτύπων

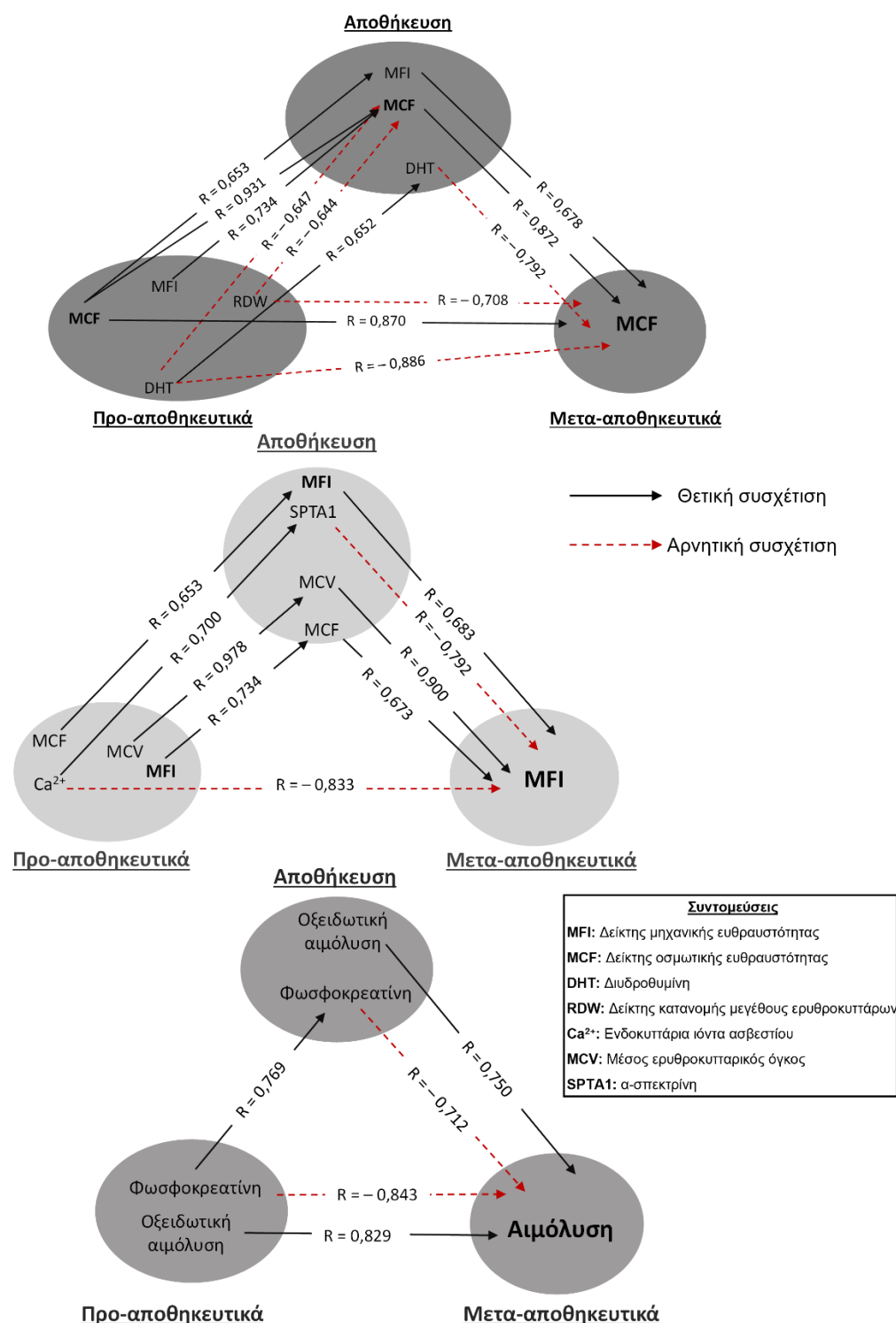
Οι σημαντικές διαφορές που παρατηρήθηκαν στην ομάδα των ετερόζυγων για βΜΑ αιμοδοτών σε όλα τα επίπεδα που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία, οδήγησαν στην προσπάθεια σύνδεσης της *in vivo* φυσιολογίας του αίματός τους με την «ανώτερη» μετα-μεταγγισιακή εικόνα των ερυθροκυττάρων τους. Ελέγχθηκαν τόσο οι απευθείας συνδέσεις αιμοδότη/μετα-μεταγγισιακού φαινοτύπου, όσο και οι έμμεσες συνδέσεις μέσω της μονάδας μετάγγισης. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις συσχέτισης μεταξύ παραμέτρων του φρέσκου, του αποθηκευμένου και του ανασυσταμένου/μεταγγισμένου αίματος, ολοκληρώνοντας έτσι μία «τριγωνική» μελέτη της αλυσίδας της μετάγγισης (**Εικόνα Δ37**).



Εικόνα Δ37: Σχηματική απεικόνιση της «τριγωνικής» μεθόδου μελέτης των τριών κρίκων της αλυσίδας της μετάγγισης.

Ξεκινώντας με τις παραμέτρους αιμόλυσης, όπως φαίνεται στην **Εικόνα Δ38** τα επίπεδα του δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας διατηρούσαν μία αναλογία μεταξύ των τριών γωνιών του τριγώνου μετάγγισης. Επιπλέον, η οσμωτική αιμόλυση του δότη βρέθηκε θετικά συσχετιζόμενη με τη μηχανική αιμόλυση του παραγώγου, η οποία με τη σειρά της αναδείχθηκε ανάλογη της οσμωτικής μετά την προσομοίωση της μετάγγισης. Η πρώτη σύνδεση παρατηρήθηκε και αντίστροφα. Αντιθέτως, ο δείκτης RDW *in vivo* παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με την οσμωτική αιμόλυση τόσο κατά την αποθήκευση όσο και μετά την ανασύσταση, κάτι που παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της διυδροθυμίνης, τα αποθηκευτικά επίπεδα της οποίας συνδέονταν θετικά με τα αντίστοιχα προαποθηκευτικά και επιπλέον αρνητικά με την οσμωτική ευθραυστότητα στο *in vitro* μοντέλο μετάγγισης. Η μηχανικά επαγόμενη αιμόλυση των ανασυσταμένων κυττάρων βρέθηκε να συσχετίζεται θετικά τόσο με τη μηχανική όσο και με την οσμωτική αιμόλυση των αποθηκευμένων, καθώς και με τον δείκτη MCV, ο οποίος διατηρούσε μία αναλογία των επιπέδων του σε σχέση με την προαποθηκευτική φάση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προξένησε η αρνητική σύνδεση μεταξύ των *in vivo* επιπέδων ενδοκυττάριου ασβεστίου και της μηχανικής αιμόλυσης στο περιβάλλον προσομοίωσης του δέκτη, μία σύνδεση που «σπάει» στις δύο πλευρές του

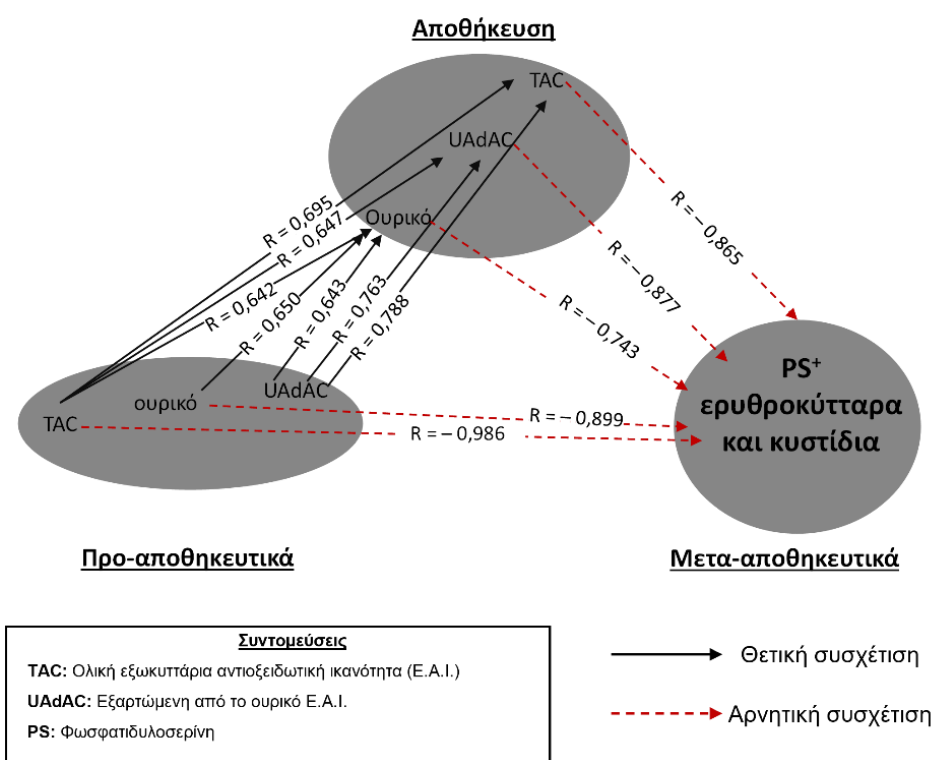
τριγώνου ως εξής: (α) θετική συσχέτιση ασβεστίου *in vivo* με δομικές μεμβρανικές/σκελετικές πρωτεΐνες στο παράγωγο, και (β) αρνητική συσχέτιση των τελευταίων με τη μηχανική ευθραυστότητα μετά την ανασύσταση.



Εικόνα Δ38: Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ φρέσκου αίματος, αποθηκευμένων και ανασυσταμένων ερυθροκυττάρων από ετερόζυγους για β-μεσογειακή αναιμία. Τα μεταγγισιακά τρίγωνα εστιάζουν στην οσμωτική, τη μηχανική και την αυθόρμητη αιμόλυση μετά την *in vitro* μετάγγιση. Η σπεκτρίνη δείχνεται ως παράδειγμα πλήθους δομικών πρωτεϊνών που εμφάνισαν τις παραπάνω συνδέσεις (π.χ. γλυκοφορίνη C, αγκυρίνη-1 κ.α.).

Όσον αφορά στην αυθόρμητη μετα-αποθηκευτική αιμόλυση, βρέθηκε θετικά συσχετιζόμενη με την οξειδωτική αιμόλυση των φρέσκων και αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων. Επιπροσθέτως, αναδείχθηκε ένα ολοκληρωμένο «μεταγγισιακό τρίγωνο» στη συγκεκριμένη παράμετρο: τα *in vivo* επίπεδα φωσφοκρεατίνης ήταν ανάλογα με τα αντίστοιχα κατά την αποθήκευση και αμφότερα εμφάνιζαν αρνητική σύνδεση με την αιμόλυση των ανασυσταμένων δειγμάτων (**Εικόνα Δ38**).

Η ολική και η εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ εξωκυττάρια αντιοξειδωτικές ικανότητες εμφάνισαν αλληλοδιασύνδεση μεταξύ των επιπέδων τους στο φρέσκο αίμα και το παράγωγο (**Εικόνα Δ39**). Επίσης, τα *in vivo* επίπεδά τους, καθώς και τα ενδοκυττάρια επίπεδα ουρικού συσχετίζονταν θετικά με τα αντίστοιχα επίπεδα ουρικού στη μονάδα μετάγγισης. Στο σύνολό τους οι τρεις αντιοξειδωτικές παράμετροι της αποθήκευσης βρέθηκαν αρνητικά συσχετιζόμενες με τη μετα-αποθηκευτική εξωτερική φωσφατιδυλοσερίνης και την παραγωγή κυστιδίων που τη φέρουν στην επιφάνειά τους. Μάλιστα, δημιουργήθηκαν δύο ολοκληρωμένα «μεταγγισιακά τρίγωνα», καθώς τα *in vivo* επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και ουρικού ήταν απευθείας αντίστροφα συνδεδεμένα με τον εν λόγω μετα-αποθηκευτικό φαινότυπο (**Εικόνα Δ39**).

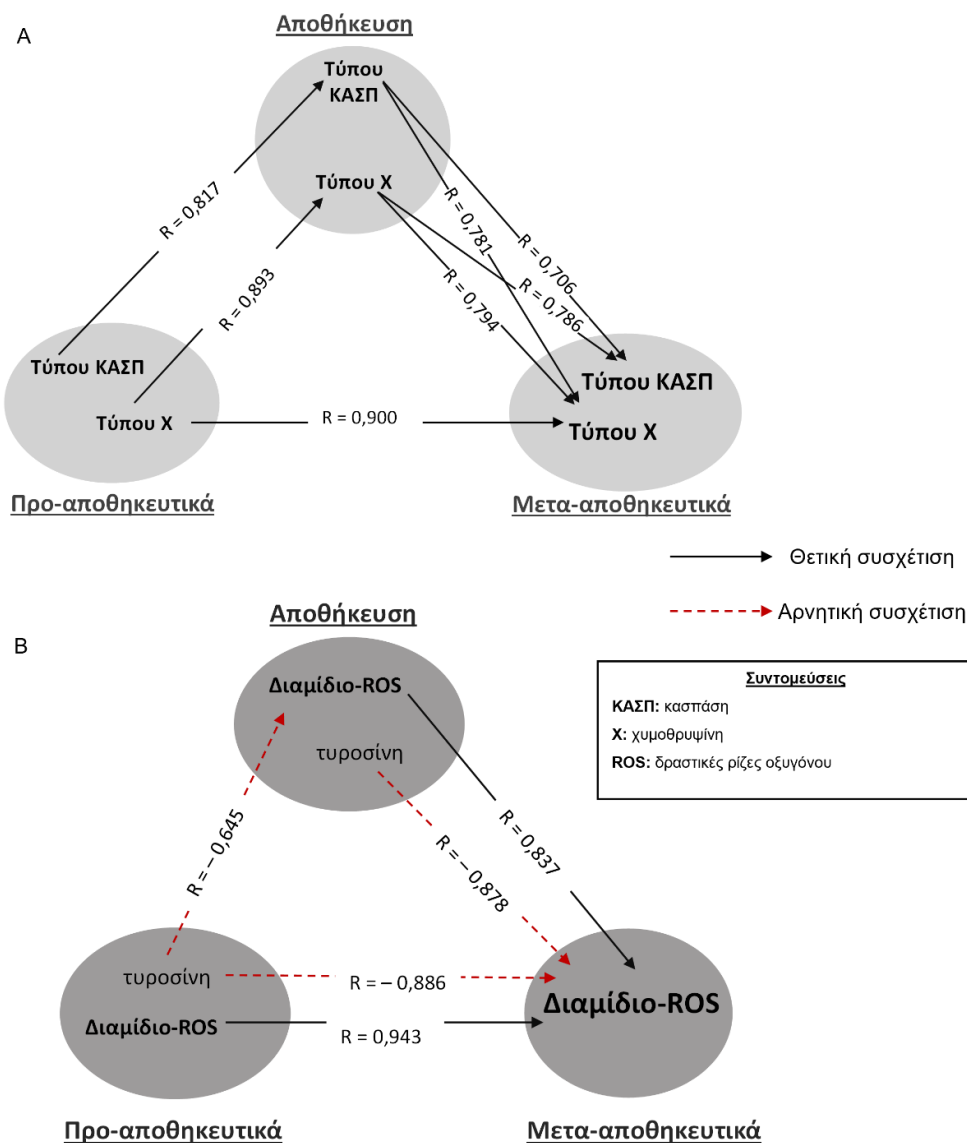


Εικόνα Δ39: Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ φρέσκου αίματος, αποθηκευμένων και ανασυσταμένων ερυθροκυττάρων από ετερόζυγους για β-μεσογειακή αναιμία. Το παρόν μεταγγισιακό τρίγωνο εστιάζει στην εξωτερική φωσφατιδυλοσερίνης και την παραγωγή κυστιδίων που την εκφράζουν μετά την *in vitro* μετάγγιση. Το ουρικό στην εικόνα αφορά στον ενδοκυττάριο μεταβολίτη.

Στην περίπτωση του πρωτεασώματος, τα επίπεδα της ενεργότητας τύπου χυμοθρυψίνης συνδέονταν μεταξύ των τριών κρίκων της αλυσίδας μετάγγισης και σχημάτιζαν ένα ολοκληρωμένο τρίγωνο (**Εικόνα Δ40.Α**). Η ενεργότητα τύπου κασπάσης κατά την αποθήκευση επίσης εμφάνιζε επίπεδα ανάλογα των προ-αποθηκευτικών

και επιπλέον, όπως και η ενεργότητα τύπου χυμοθρυψίνης, συνδεόταν θετικά με τα μετα-αποθηκευτικά επίπεδα και των δύο ενεργοτήτων (**Εικόνα Δ40.Α**).

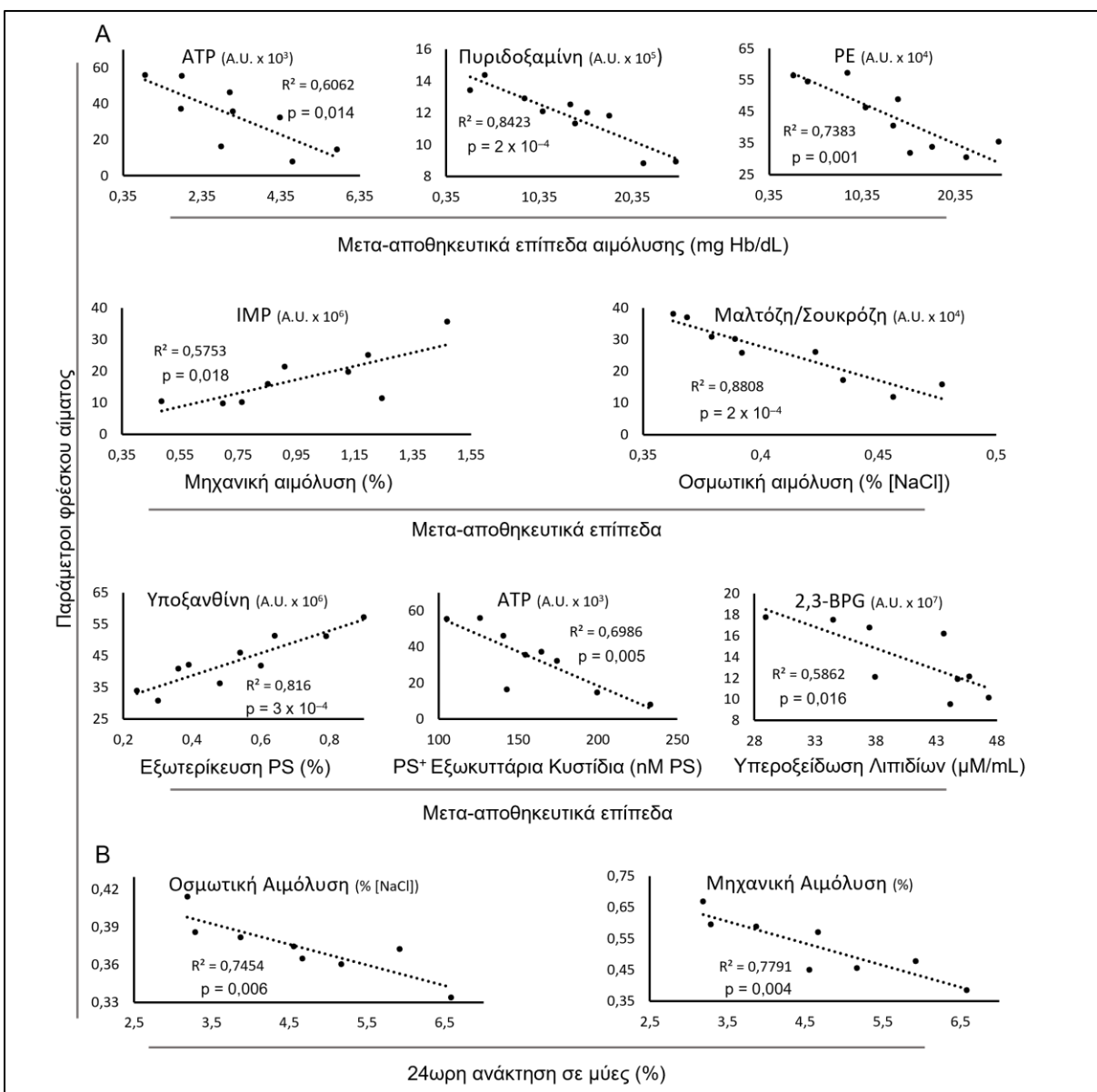
Στα ανασυσταμένα κύτταρα η συσσώρευση ROS μετά από οξειδωτικό ερέθισμα, και συγκεκριμένα διαμίδιο, ήταν ανάλογη της αντίστοιχης τόσο πριν όσο και κατά την αποθήκευση (**Εικόνα Δ40.Β**). Αντιθέτως, η παρουσία τυροσίνης είτε στο φρέσκο αίμα είτε στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα βρέθηκε αντίστροφα συνδεδεμένη με την επαγόμενη από διαμίδιο παραγωγή ROS, τόσο σε αποθηκευμένα όσο και σε ανασυσταμένα κύτταρα (**Εικόνα Δ40.Β**).



Εικόνα Δ40: Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ φρέσκου αίματος, αποθηκευμένων και ανασυσταμένων ερυθροκυττάρων από ετερόζυγους για β-μεσογειακή αναιμία. Τα μεταγγισιακά τρίγωνα εστιάζουν στην πρωτεασωμική ενεργότητα (A) και την επαγόμενη από διαμίδιο παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS).

Ορισμένες ενδιαφέρουσες συσχετίσεις παρατηρήθηκαν στην ομάδα των ετερόζυγων μεταξύ της *in vivo* κατάστασης και της *in vitro* προσομοίωσης της μετάγγισης/ανάκτησης στους μύες. Τα επίπεδα της αυθόρμητης

αιμόλυσης των ανασυσταμένων δειγμάτων βρέθηκαν αρνητικά συνδεδεμένα με τα *in vivo* επίπεδα ATP, πυριδοξαμίνης και φωσφοαιθανολαμίνης (Εικόνα Δ41.Α). Όσον αφορά στις δύο κυτταρικές ευθραυστότητες μετα-αποθηκευτικά, η μηχανική βρέθηκε θετικά συσχετιζόμενη με τα προαποθηκευτικά επίπεδα IMP, ενώ η οσμωτική αρνητικά συσχετιζόμενη με τα αντίστοιχα επίπεδα μαλτόζης/σουκρόζης. Τα *in vivo* επίπεδα υποξανθίνης εμφάνισαν θετική συσχέτιση με την μετα-αποθηκευτική εξωτερίκευση PS, ενώ αρνητική συσχέτιση είχαν τα *in vivo* επίπεδα ATP και 2,3 διφωσφογλυκερικού με την παραγωγή προθρομβωτικών κυστιδίων και τη λιπιδική υπεροξείδωση, αντίστοιχα, μετά την *in vitro* «μετάγγιση» (Εικόνα Δ41.Α). Τέλος, οι δύο κυτταρικές ευθραυστότητες των φρέσκων ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με στίγμα βΜΑ παρουσίασαν αντίστροφη συσχέτιση με την 24ωρη ανάκτηση στους μύες-δέκτες (Εικόνα Δ41.Β).



Εικόνα Δ41: Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ παραμέτρων του φρέσκου αίματος και της φυσιολογίας μετά την ανασύσταση (Α) ή της μετα-μεταγγισιακής ανάκτησης μετά τη μετάγγιση σε μύες (Β) ερυθροκυττάρων από ετερόζυγους για β-μεσογειακή αναιμία. 2,3-BPG: 2,3-διφωσφογλυκερικό, PE: φωσφοαιθανολαμίνη, PS: φωσφατιδυλοσερίνη.

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναλύθηκε στην Εισαγωγή της παρούσας Διατριβής, τα τελευταία χρόνια έχει έρθει στο προσκήνιο της έρευνας της μετάγγισης η επίδραση των εγγενών χαρακτηριστικών του αιμοδότη στην αποτελεσματικότητα αυτής. Οι αιμοδοτές με στίγμα β-μεσογειακής αναιμίας (βΜΑ) μελετήθηκαν για πρώτη φορά και τα ερυθροκύτταρά τους αποδείχθηκαν καλύτερα όσον αφορά στην αποθηκευτική ικανότητά τους, ενώ παρουσίασαν πλεονεκτική μετα-μεταγγισιακή εικόνα σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα μετάγγισης.

Ε.1 Προ-αποθηκευτική Μελέτη (*in vivo*)

Το πρώτο στάδιο της Διατριβής αποσκοπούσε στην εύρεση του ποσοστού των ετερόζυγων για βΜΑ σε ένα αντιπροσωπευτικό σύνολο 200 τακτικών αιμοδοτών, καθώς και στη σύγκριση ποικίλων παραμέτρων του φρέσκου αίματός τους με τον μέσο αιμοδότη. Οι ετερόζυγοι φορείς β-μεσογειακής αναιμίας φαίνεται πως αποτελούν μη αμελητέο ποσοστό του αιμοδοτικού πληθυσμού της Ελλάδας, επομένως είναι σημαντικό να ελεγχθεί η απόκριση των ερυθροκυττάρων τους στο αποθηκευτικό στρες και η μετα-μεταγγισιακή τους εικόνα. Αξίζει να αναφερθεί πως σημαντικά ποσοστά ετερόζυγων αιμοδοτών έχουν ανιχνευθεί και σε Ασιατικές χώρες, όπως η Ινδία (Sundh et al. 2020), η Ταϊλάνδη (Kittisares et al. 2019) και η Μαλαισία (Rosline et al. 2006).

Όσον αφορά στην προ-αποθηκευτική σύγκρισή τους με τους αιμοδοτές-μάρτυρες, αρχικά επιβεβαιώθηκαν ορισμένα ήδη γνωστά γνωρίσματα των ερυθροκυττάρων τους που αφορούν κυρίως στο αιματολογικό τους προφίλ, όπως είναι οι χαμηλότερες τιμές μέσου ερυθροκυτταρικού όγκου (MCV) και μέσης ερυθροκυτταρικής αιμοσφαιρίνης (MCH) (Sanghani and Haldankar 2006). Η εύρεση ευρέως γνωστών αιματολογικών διαφορών καθιστά αξιόπιστο το υπό μελέτη σύνολο ετερόζυγων που έχει συσταθεί. Στην ίδια κατηγορία γνώριμων διαφοροποιημένων παραμέτρων ανήκει και ο χαμηλότερος δείκτης οσμωτικής ευθραυστότητας, ο οποίος έχει μάλιστα χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του στίγματος βΜΑ (Mamtani et al. 2006). Παρ' όλα αυτά, το εύρος του συγκεκριμένου δείκτη βρέθηκε αυξημένο, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη ετερόζυγων με τιμές οσμωτικής αιμόλυσης συγκρίσιμες με του γενικού πληθυσμού, εύρημα που βρίσκεται σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες (El-Beshlawy et al. 2007). Επιπλέον, τα επίπεδα της αυθόρμητης αιμόλυσης –παραμέτρος που βρέθηκε να συσχετίζεται με την οσμωτική αιμόλυση– ήταν σημαντικά χαμηλότερα στο πλάσμα των φορέων. Τα ερυθροκύτταρα φορέων με στίγμα βΜΑ διαφέρουν εγγενώς από τα αντίστοιχα του γενικού πληθυσμού, καθώς παρουσιάζουν μειωμένο κυτταρικό όγκο και αυξημένο λόγο επιφάνειας:όγκο (Gunn et al. 1972). Πίσω από τον συγκεκριμένο φαινότυπο κρύβεται σε μεγάλο βαθμό η τροποποιημένη ομοιόσταση ιόντων που τα χαρακτηρίζει, η οποία οδηγεί στην έξοδο οσμωτικά ενεργών μορίων (O. Olivieri et al. 1994). Η εύρεση σημαντικής συσχέτισης των εξωκυττάρων ιόντων νατρίου και καλίου με την οσμωτική ευθραυστότητα ενισχύει τη συγκεκριμένη υπόθεση. Επιπλέον, η παρατηρούμενη αυξημένη εξωκυττάρια αντιοξειδωτική ικανότητα πιθανώς να προστατεύει τη μεμβράνη από οξειδωτικές βλάβες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε λύση, καθώς και τις πρωτεΐνες του πλάσματος οι οποίες βρέθηκαν λιγότερο οξειδωμένες. Ο αισθητά μειωμένος αριθμός συσχετίσεων των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών του πλάσματος στην ομάδα των ετερόζυγων πιθανώς

οφείλεται στα προαναφερθέντα χαμηλά επίπεδα καρβονυλίωσης, καθώς μπορεί να «κρύβουν» ορισμένες συνδέσεις ή/και να υπονοούν την απουσία αυτών συγκριτικά με την κατηγορία του μέσου αιμοδότη. Για παράδειγμα, δεν είναι σπάνιο να αναδεικνύονται ή όχι συγκεκριμένες συσχετίσεις ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι ουδών στα επίπεδα των εμπλεκόμενων παραμέτρων. Τέλος, η εντονότερη δικτύωση της κλαστερίνης στους ετερόζυγους, πρωτεΐνη που αποτελεί σημαντική μοριακή συνοδό (Satapathy and Wilson 2021), καθώς και η διαφορετική τοπολογία του μονοξειδίου του αζώτου υποδεικνύουν την ύπαρξη τροποποιημένης πρωτεόστασης και ιδιαίτερου μεταβολισμού στα συγκεκριμένα κύτταρα.

E.2 Αποθηκευτική Ικανότητα – *In vitro* Μοντέλο Μετάγγισης

E.2.1 Προφίλ Αιμόλυσης

Τόσο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους σε συνθήκες τράπεζας αίματος, όσο και μετά την προσομοίωση της μετάγγισης *in vitro*, τα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων για βΜΑ αιμοδοτών επέδειξαν εντυπωσιακή ανθεκτικότητα σε λύση. Η διατήρηση της εγγενούς τους αντίστασης σε οσμωτική λύση ήταν σχετικά αναμενόμενη, καθώς ο δείκτης οσμωτικής ευθραυστότητας αποτελεί παράμετρο με υψηλά ποσοστά αναλογίας μεταξύ των προ-αποθηκευτικών, αποθηκευτικών και μετα-αποθηκευτικών επιπέδων της (Tzounakas et al. 2021b). Επιπλέον, η οσμωτικά επαγόμενη αιμόλυση κατά την αποθήκευση αποτελεί σημαντικό ποσοστό της συνολικής αιμόλυσης (Tzounakas et al. 2017). Όπως αναφέρθηκε και στην ανάλυση του φρέσκου αίματος, εφόσον η ετεροζυγωτία στη βΜΑ αποτελεί μία από τις συχνότερα αναφερόμενες μικροκυτταρικές αναιμίες, η ανθεκτικότητα σε λύση θα μπορούσε εν μέρει να εξηγηθεί από το μικρότερο μέγεθος και την ιδιαίτερη γεωμετρία των συγκεκριμένων κυττάρων. Η ερμηνεία αυτή ενισχύεται από τη συμμετοχή αιματολογικών δεικτών που υποδηλώνουν όγκο/μέγεθος στο «τρίγωνο μετάγγισης» της μετα-αποθηκευτικής οσμωτικής και μηχανικής αιμόλυσης. Μάλιστα, αντίστοιχη συσχέτιση του δείκτη ανισοκυττάρωσης RDW έχει βρεθεί με την οσμωτική σταθερότητα ερυθροκυττάρων διαβητικών (Knychala et al. 2021). Σε συχνούς αιμοδότες με χαμηλά αποθέματα σιδήρου και φερριτίνης, έχει παρατηρηθεί βελτιωμένο αποθηκευτικό προφίλ όσον αφορά στην οξειδωτική αιμόλυση (Kaniyas et al. 2019), αποτέλεσμα που θα μπορούσε εν μέρει να παραλληλιστεί με τους ετερόζυγους αιμοδότες που έχουν *in vivo* μειωμένα επίπεδα δεικτών αιμοσφαιρίνης και ταυτόχρονα μικρότερη αποθηκευτική επιρρέπεια των ερυθροκυττάρων τους σε οξειδωτική λύση.

Πρόσφατη μελέτη γενετικής συσχέτισης συνέδεσε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οργάνωση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και του κυτταροσκελετού, όπως η ζώνη 3, η σπεκτρίνη και η μυοσίνη, με την οσμωτική αιμόλυση των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων (Page et al. 2021). Πρωτεΐνες που ανήκουν στη συγκεκριμένη κατηγορία βρέθηκαν να διατηρούνται με την πάροδο του χρόνου στην ομάδα των ετερόζυγων, σε αντίθεση με τους μάρτυρες, ενώ εντυπωσιακό είναι το παράδειγμα της μυοσίνης που παρουσίασε πολύ υψηλότερα επίπεδα στην ίδια ομάδα. Παράλληλα, πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την ενεργότητα της μυοσίνης, όπως οι κινάσες και η καλμοδουλίνη (Mizuno et al. 2008), παρουσίασαν αυξημένη πρόσδεση στη μεμβράνη των ετερόζυγων για βΜΑ. Το γεγονός ότι τα ίδια κύτταρα εμφάνισαν λιγότερες μη αναστρέψιμες παραμορφώσεις με

την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης, συνάδει με την ακεραιότητά τους, καθώς μεταβολές στη μεμβράνη και τις συνδέσεις της με τον κυτταροσκελετό έχουν σχετιστεί με αλλαγές στην ερυθροκυτταρική μορφολογία (Kozlova et al. 2022). Ο εξειδικευμένος ερυθροκυτταρικός σκελετός και οι πολλαπλές συνδέσεις του με τη μεμβράνη επιτρέπει στα ερυθροκύτταρα να παραμορφώνονται αντιστρεπτά κατά την κυκλοφορία τους μέσα από τα πολύ στενά τριχοειδή αγγεία, ενώ πλήθος μεταλλαγών σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη συγκεκριμένη οργάνωση οδηγούν σε αιμολυτικά φαινόμενα (Risinger and Kalfa 2020). Συγκεκριμένα η μη-μυϊκή μυοσίνη II έχει συσχετιστεί με την ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης (A.S. Smith et al. 2018), η οποία αποτελεί δείκτη της οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων (Orbach et al. 2017). Εφόσον οι πρωτεΐνες του σκελετού φάνηκαν να συσχετίζονται με το μετα-αποθηκευτικό αιμολυτικό προφίλ και των δύο κατηγοριών αιμοδοτών στην παρούσα εργασία, η διαφορική τους ποσότητα/σταθερότητα μεταξύ των δύο ομάδων πολύ πιθανό να συνδράμει στην καθολική ανωτερότητα των ετερόζυγων στις παραμέτρους αιμόλυσης.

Ποικιλία δομικών πρωτεϊνών εμφανίστηκε στο «μεταγγισιακό τρίγωνο» της μετα-αποθηκευτικής μηχανικής αιμόλυσης, σε στενή αντίστροφη σύνδεση με τα επίπεδα ασβεστίου *in vivo*. Μέσα στο σύνολο των μονοπατιών και μεταβολών που εξαρτώνται ή επηρεάζονται από τα ιόντα ασβεστίου είναι η αντιστρεπτή «χαλάρωση» του κυτταροσκελετού όταν το κύτταρο διέρχεται από μικρής διαμέτρου αγγεία (Bogdanova et al. 2013), καθώς και η φωσφορυλίωση της ζώνης 3 (η οποία βρέθηκε αυξημένη στους ετερόζυγους) που οδηγεί σε αποδέσμευση των γλυκολυτικών ενζύμων και άρα ενεργειακή στήριξη του κυττάρου (Chu and Low 2006). Τα ιόντα ασβεστίου μπορούν λοιπόν εμμέσως να επιδράσουν στη μηχανική σταθερότητα μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τον κυτταροσκελετό και τη μεμβράνη.

Πέρα από τον ενισχυμένο κυτταροσκελετό, όσον αφορά στη μηχανική ευθραυστότητα, στις συσχετίσεις της ξεχώρισε η *piezo-1*. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη ρυθμίζει τον όγκο του κυττάρου μέσω μετατροπής μηχανικών ερεθισμάτων σε διαμεμβρανική ροή κατιόντων (Svetina et al. 2019). Τα μικρότερα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων πιθανώς να είναι λιγότερο επιρρεπή σε μηχανικό στρες στην κυκλοφορία και έτσι να απαιτούν μειωμένη σηματοδότηση από τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Σε πρόσφατες μελέτες η *piezo-1* έχει σχετιστεί και με την οσμωτική αιμόλυση (Page et al. 2021). Ο ρόλος της ως μηχανοαισθητήρας (μηχανικό στρες) και ρυθμιστής όγκου (οσμωτικό στρες), η συσχέτισή της με τις αντίστοιχες αιμολύσεις, και τα ιδιαίτερα επίπεδα όλων των αναφερθέντων παραμέτρων στους ετερόζυγους, πιθανώς να βρίσκονται στη βάση της επιλεκτικής αλληλοσυσχέτισης των δύο κυτταρικών ευθραυστοτήτων στην ομάδα αυτή. Η ενδο-ομαδική διαφορά στις κυτταρικές ευθραυστότητες, με τα ανθεκτικότερα ερυθροκύτταρα των β^+ ετερόζυγων να παρουσιάζουν αυξημένη μυοσίνη και μειωμένη *piezo-1* έναντι των β^{++} συμπληρώνει τις παραπάνω εξηγήσεις. Επιπροσθέτως, η αυξημένη πρόσδεση της υπεροξειδοσίνης-2 στη μεμβράνη των β^+ σε σχέση με των β^{++} μπορεί να συνδράμει εμμέσως στην οσμωτική ανθεκτικότητα λόγω της αλληλεπίδρασής της με τα κανάλια Gardos και της επικείμενης απομάκρυνσης ιόντων καλίου (F.M. Low et al. 2008).

Το γεγονός ότι οι παράμετροι αιμόλυσης είναι χαμηλότερες στους ετερόζυγους τόσο κατά την αποθήκευση όσο και μετά-αποθηκευτικά είναι ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα. Η αποθηκευτική αιμόλυση αποτελεί μία από τις βασικές ποιοτικές παραμέτρους της μετάγγισης και φαινότυποι αιμόλυσης έχουν βρεθεί πολλές φορές αρνητικά συσχετιζόμενοι με μετα-μεταγγισιακές παραμέτρους. Πρώτα απ' όλα, η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει μονοξείδιο του αζώτου, μειώνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητά του. Το συγκεκριμένο μόριο είναι υψίστης σημασίας για την αγγειοδιαστολή, επομένως η τοπική του ανεπάρκεια οδηγεί σε αγγειοσυστολή και ελλιπή οξυγόνωση των ιστών (Kahn et al. 2013). Επιπλέον, μπορεί να προκύψουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις λόγω φαινομένων τοξικότητας αιμόλυσης/σιδήρου (Hod et al. 2010). Στην παρούσα εργασία η αυθόρμητη και η οξειδωτική αιμόλυση των γηρασμένων αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων βρέθηκαν να συσχετίζονται αρνητικά με την ανάκτηση στους μύες και στις δύο ομάδες, ενώ οι δύο κυτταρικές ευθραυστότητες μόνο στους ετερόζυγους. Αντίστοιχη μελέτη από άλλες ερευνητικές ομάδες έδειξε πως η αποθηκευτική και η οσμωτική αιμόλυση ερυθροκυττάρων από παχύσαρκους αιμοδότες συνδέεται αρνητικά με την επιβίωση σε ξеноβιωτικά μοντέλα μετάγγισης (Hazegh et al. 2021). Η υψηλότερη αντοχή σε οσμωτικά ερεθίσματα δίνει μία επιπλέον δυνατότητα στα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων: μπορούν να χρησιμεύσουν σε εναλλακτικές μεθόδους αποθήκευσης. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει μία κινητικότητα προς την επαναξιολόγηση του «κατεψυγμένου αίματος», βασικό μειονέκτημα του οποίου είναι τα αυξημένα επίπεδα αιμόλυσης λόγω οσμωτικών φαινομένων κατά την απόψυξη (Henkelman et al. 2010). Η καταγραφή των ετερόζυγων αιμοδοτών και η επιλογή τους για ενίσχυση του αποθέματος «κατεψυγμένου αίματος» πιθανώς να μπορεί να ευνοήσει τη βέλτιστη διαχείριση του αίματος.

E.2.2 Μεταβολισμός και Οξειδοαναγωγικό Ισοζύγιο

E.2.2.1 Ενεργειακός Μεταβολισμός

Οι ετερόζυγοι παρουσίασαν αυξημένους ερυθροκυτταρικούς μεταβολίτες γλυκόλυσης αναρροϊκά της κινάσης του πυροσταφυλικού *in vivo*, με έντονη τη δραστηριότητα του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών και την παραγωγή αναγωγικής δύναμης (NADPH). Μελέτες σε ερυθροκύτταρα από ασθενείς με βΜΑ ανίχνευσαν υψηλά επίπεδα 2,3-διφωσφογλυκερικού (Kuci et al. 2006), καθώς και αυξημένη ροή στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών (Ting et al. 1994). Αντίστοιχα αποτελέσματα, με αυξορυθμισμένα γλυκολυτικά ένζυμα και τροποποιημένα τα μονοπάτια της γλυκόλυσης και των φωσφορικών πεντοζών, έχουν προκύψει κι από έρευνες σε ερυθροβλάστες (Leecharoenkiat et al. 2011) και χοριακές λάχνες (Monni et al. 2019) ομόζυγων ή/και ετερόζυγων για βΜΑ, αντίστοιχα. Φαίνεται λοιπόν πως *in vivo* οι ετερόζυγοι παρουσιάζουν ορισμένα χαρακτηριστικά που θυμίζουν τους ομόζυγους για βΜΑ, τουλάχιστον όσον αφορά στον ενεργειακό τους μεταβολισμό, και ιδιαίτερα την αναγωγική δύναμη που προσδίδει αντιοξειδωτικό πλεονέκτημα. Αυτές οι διαφορές με τον γενικό πληθυσμό αιμοδοτών χάνονται κατά την αποθήκευση. Είναι γνωστό πως εντός της μονάδας μετάγγισης προοδευτικά τα ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν γλυκολυτικές ιδιότητες ανεξάρτητες των επιπέδων οξυγόνωσης της αιμοσφαιρίνης. Έτσι, επηρεάζεται η βασική διακλάδωση που προσδίδει στο κύτταρο το πολύτιμο NADPH και δυσχεραίνεται το οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο (Rogers et al. 2021). Επίσης, μειώνονται πολύ οι μεταβολικοί ρυθμοί

και ελαχιστοποιούνται τα επίπεδα ATP και 2,3-διφωσφογλυκερικού (Kuci et al. 2006), τα οποία όμως επανέρχονται άμεσα μετα-μεταγγισιακά (Dern et al. 1967, A. Heaton et al. 1989). Φαίνεται λοιπόν πως η επίδραση του αποθηκευτικού στρες «εξαφανίζει» τις προϋπάρχουσες ενεργειακές διαφορές στις δύο ομάδες. Εξάιρεση αποτελούν οι β^ο αιμοδοτές, τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα των οποίων παρουσιάζουν μειωμένους ενεργειακούς μεταβολίτες (νουκλεοσίδια, μόρια του κύκλου Krebs, λιπίδια) σε σχέση με τις άλλες δύο κατηγορίες ετερόζυγων, παράμετροι που έχουν βρεθεί μειωμένες σε ορό από ομόζυγους για βMA (Musharraf et al. 2017) ή πνευμονικά δείγματα από μύες-μοντέλα της ασθένειας (Buehler et al. 2021).

Πλήθος ενεργειακών μεταβολιτών αναδείχθηκαν στις συσχετίσεις με όλους τους μετα-αποθηκευτικούς φαινοτύπους των ερυθροκυττάρων των μαρτύρων και των ετερόζυγων για βMA. Τα ερυθροκύτταρα τα οποία παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ATP ή ενδιάμεσων της γλυκόλυσης παρά την ταχύτατη εξάντληση του ενεργειακού τους αποθέματος κατά την αποθήκευση, εμφανίζουν πλεονέκτημα όσον αφορά στις μετα-αποθηκευτικές παραμέτρους που μελετήθηκαν. Αντιθέτως, δείκτες ενεργειακής εξάντλησης και μεταβολικού στρες, όπως το AMP και το γαλακτικό οξύ δείχνουν θετική συσχέτιση με φαινοτύπους αιμόλυσης και οξειδωτικής ανισορροπίας. Οι ενεργειακοί μεταβολίτες έχειδειχθεί πως ευνοούν την ερυθροκυτταρική ακεραιότητα κατά την αποθήκευση (Van 't Erve et al. 2015), εύρημα απολύτως αναμενόμενο αν ληφθεί υπόψη η αφθονία διαύλων, πρωτεϊνών διατήρησης της ασυμμετρίας της μεμβράνης και αντιοξειδωτικών που στηρίζονται στο ενεργειακό απόθεμα του κυττάρου (van Wijk and van Solinge 2005). Μάλιστα, εστιάζοντας στο ATP, ερυθροκύτταρα με πλεονεκτικά επίπεδα έχουν αυξημένη βιωσιμότητα μετα-μεταγγισιακά (Nakao et al. 1962, W.A. Heaton 1992). Ένα ακόμη μόριο που σχετίζεται με την ενέργεια είναι η φωσφοκρεατίνη, τα επίπεδα της οποίας βρέθηκαν αρνητικά συσχετιζόμενα με την μετα-αποθηκευτική αιμόλυση. Πέρα της προφανούς αιτίας της ενεργειακής υποστήριξης της κυτταρικής ακεραιότητας, είναι γνωστό πως το συγκεκριμένο μόριο είναι μεμβrano-προστατευτικό (Tokarska-Schlattner et al. 2012), ενώ αντίστοιχη συσχέτισή του με την αιμόλυση έχειδειχθεί και κατά την αποθήκευση (Alexander et al. 2021).

E.2.2.2 Μεταβολισμός Πουρινών και Οξειδοαναγωγικό Ισοζύγιο

Οι εγγενείς και επαγόμενες από διαμίδιο ROS βρέθηκαν χαμηλότερες στην ομάδα των ετερόζυγων κατά το τέλος της αποθηκευτικής περιόδου. Αξίζει να αναφερθεί πως την ίδια χρονική περίοδο βρέθηκε στην ίδια ομάδα μειωμένη εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, επισημαίνοντας το ρόλο του οξειδωτικού φορτίου στο συγκεκριμένο φαινότυπο (Yoshida et al. 2019). Παρά το γεγονός ότι λόγω του εγγενούς οξειδωτικού τους φορτίου εξαιτίας της περίσσειας α-σφαιρινών (N.F. Olivieri 1999) θα αναμέναμε αυξημένο οξειδωτικό στρες, ειδικά κατά την αποθήκευση που το κύτταρο επιβαρύνεται περεταίρω, φαίνεται πως η «εκπαίδευση» των συγκεκριμένων κυττάρων σε σταθερό αλλά ήπιο οξειδωτικό στρες *in vivo* τα ευνοεί αποθηκευτικά. Όντως, τα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων για βMA είναι εξοπλισμένα με αυξορυθμισμένα αντιοξειδωτικά ένζυμα (Teran et al. 2020), ενώ το πλάσμα/υπερκείμενο των υπό εξέταση αιμοδοτών [σε αντίθεση με άλλες έρευνες (Selek et al. 2007)] παρουσιάζει ενισχυμένη εξαρτώμενη του ουρικού αντιοξειδωτική ικανότητα. Σε συνδυασμό με τον τροποποιημένο

μεταβολισμό πουρινών, με αυξημένο το ενδοκυττάριο ουρικό και μειωμένο το παράγωγο οξειδωσής του, την αλλαντοΐνη (Kand'ar and Zakova 2008), τα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων καθίστανται ανώτερα όσον αφορά στο αντιοξειδωτικό δυναμικό, γεγονός που αντικατοπτρίζεται και στην ελάχιστη οξειδωτικά καταπονημένη μεμβράνη. Μάλιστα, στη μεμβράνη των ετερόζυγων βρίσκονται συνδεδεμένα περισσότερα μόρια αντιοξειδωτικών ή σχετιζόμενων με το οξειδωτικό στρες πρωτεϊνών, όπως είναι η μεταφοράση της γλουταθειόνης (Strange et al. 2001) και η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης. Η τελευταία κατά την αποθήκευση μετατοπίζεται στη μεμβράνη μετά από οξειδωτική τροποποίηση και ευνοεί τη ροή γλυκόζης στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών (Rinalducci et al. 2015), ενώ έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε ερυθροβλάστες ομόζυγων για βΜΑ (Leecharoenkiat et al. 2011). Ο επιβλαβής ρόλος των α-αλυσίδων σφαιρίνης αναδεικνύεται μετά από την κατηγοριοποίηση των ετερόζυγων σε υπο-ομάδες: οι β^{++} που χαρακτηρίζονται από μικρή περίσσεια α-αλυσίδων εμφανίζουν χαμηλότερες ROS σε σχέση με τους β^{+} , καθώς και μειωμένη πρόσδεση πρωτεϊνών-δεικτών οξειδωτικού στρες στη μεμβράνη τους. Το ενισχυμένο αντιοξειδωτικό τους σύστημα πιθανώς δεν έχει να αντιμετωπίσει τα ίδια επίπεδα οξειδωτικού στρες με την δεύτερη υπο-κατηγορία. Επιπλέον, μετά από επίδραση με φαινυλδραζίνη, η οποία στοχεύει την αιμοσφαιρίνη, τα ερυθροκύτταρα που παράγουν περισσότερες ROS είναι αυτά των β^{+} , έπειτα των μαρτύρων και τέλος των β^{++} , αποδεικνύοντας για ακόμη μία φορά την ταυτόχρονη δράση της περίσσειας α-αλυσίδων και του ανώτερου αντιοξειδωτικού δυναμικού.

Πέραν του μεταβολισμού των πουρινών, διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν και σε μεμβρανικούς μεταφορείς που σχετίζονται με αυτόν. Για παράδειγμα, ο ερυθροκυτταρικός μεταφορέας νουκλεοσιδίων ENT1 που βρέθηκε μειωμένος στις μεμβράνες των ετερόζυγων είναι απαραίτητος για την πρόσληψη νουκλεοσιδίων από τον εξωκυττάριο χώρο. Ο συγκεκριμένος μεταφορέας έχει βρεθεί μειωμένος και στις μεμβράνες ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία (Song et al. 2012), καθώς και σε άτομα με ανεπάρκεια G6PD (Al-Ansari and Craik 2015). Σε ερυθροκύτταρα που δεν τον εκφράζουν έχει παρατηρηθεί τροποποιημένη φωσφορυλίωση συστατικών του κυτταροσκελετού και της μεμβράνης, καθώς και μεταβολή του κυτταρικού σχήματος και της ικανότητας παραμόρφωσης, χωρίς να επηρεάζονται οι δείκτες αιμόλυσης (Mikdar et al. 2021). Παρά την ύψιστη σημασία του ENT1 για το μεταβολισμό του ερυθροκυττάρου, η μειωμένη του έκφραση θα μπορούσε να αποτελεί πλεονέκτημα όσον αφορά στην ελονοσία. Έχειδειχθεί πως το πλασμώδιο της ελονοσίας εξαρτάται από την πρόσληψη πουρινών μέσω του ENT1 του ξενιστή για να αναπτυχθεί (Quashie et al. 2010). Μάλιστα, το πλασμώδιο *in vitro* δεν είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό σε οξειδωτικό στρες (Preuss et al. 2012), ενώ η ενεργότητα του μεταφορέα ENT1 αναστέλλεται μετά από οξειδωτικό ερέθισμα στα ερυθροκύτταρα (Gero et al. 1991). Το γεγονός ότι ο συγκεκριμένος μεταφορέας έχει βρεθεί μειωμένος σε ομάδες που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην ελονοσία και ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται από ένα εγγενές αυξημένο οξειδωτικό στρες που θα μπορούσε να μειώσει περεταίρω τη λειτουργία του ENT1, ενισχύει τη σημασία του στον κύκλο ζωής του πλασμωδίου.

Το οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο, όπως και το ενεργειακό, βρέθηκε να συσχετίζεται με όλους τους μετα-αποθηκευτικούς φαινοτύπους και στις δύο κατηγορίες αιμοδοτών. Το οξειδωτικό στρες κρύβεται πίσω από πλήθος αποθηκευτικών βλαβών (Kriebardis et al. 2007, Yoshida et al. 2019), ενώ τα αντιοξειδωτικά μόρια των

αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων έχουν συσχετιστεί με την 24ωρη ανάκτηση σε μύες (de Wolski et al. 2016). Τα παρόντα αποτελέσματα έρχονται επομένως σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Το ενδοκυττάριο οξειδωτικό φορτίο φαίνεται να σχετίζεται με πιο εύθραυστα κύτταρα, επιρρεπέστερα σε οξειδωτικές βλάβες και με την εξωτερίκευση δεικτών απομάκρυνσης. Όντως, οι οξειδωτικές ρίζες που παράγονται κατά την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων βλάπτουν βασικά δομικά και λειτουργικά συστατικά οδηγώντας σε μείωση της ικανότητας ελαστικής παραμόρφωσης (Fortier et al. 1988, Orbach et al. 2017) και σε εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης (Yoshida et al. 2019). Στην ομάδα των ετερόζυγων η επιρρέπεια σε οξειδωτική λύση πριν ή κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης φαίνεται να «συμμετέχει» εν μέρει στη μετα-αποθηκευτική αιμόλυση. Η οξείδωση της αιμοσφαιρίνης σχετίζεται με την κυτταρική γήρανση, την απώλεια δομικής ακεραιότητας, και επομένως, την αιμόλυση κατά την αποθήκευση (Kaniyas and Acker 2010). Αξίζει να αναφερθεί, πως η αρχικά θετική και προοδευτικά αρνητική συσχέτιση μεταξύ των αποθηκευτικών οξειδωτικών δεικτών (π.χ. ROS) και της μετα-αποθηκευτικής πρωτεασωμικής ενεργότητας, υποστηρίζει την υπόθεση της ικανότητας του πρωτεασώματος να αντιμετωπίζει το οξειδωτικό φορτίο (Fujii et al. 2021), αλλά και να «προσβάλλεται» από αυτό (Delobel et al. 2016). Τα *in vivo* επίπεδα μεταβολιτών που εμπίπτουν στην απαμίνωση των πουρινών, όπως το IMP και η υποξανθίνη, βρέθηκαν να επιδρούν αρνητικά (και επιλεκτικά στους ετερόζυγους) στη μηχανική σταθερότητα και την εμφάνιση δεικτών απομάκρυνσης στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, αντίστοιχα. Το ενδοκυττάριο IMP έχει συσχετιστεί στο παρελθόν με την αποθηκευτική αιμόλυση (Alexander et al. 2021), ενώ η υποξανθίνη αποτελεί βιοδείκτη μειωμένης μετα-μεταγγισιακής ανάκτησης (Nemkov et al. 2018). Το γεγονός ότι τα επίπεδα των 2 μεταβολιτών διαφέρουν *in vivo* μεταξύ των δύο ομάδων μπορεί να εξηγεί την επιλεκτική συσχέτιση, καθώς μπορεί να υπάρχει κάποια ουδός επιπέδων που οδηγεί στην εμφάνιση της σύνδεσης. Στον αντίποδα, πλήθος αντιοξειδωτικών μορίων φαίνεται να δρουν προστατευτικά, καθώς συσχετίζονται με ευνοϊκό τρόπο με τις μετα-αποθηκευτικές παραμέτρους. Η αντίστροφη συσχέτιση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης με την αιμόλυση, καθώς και της εξωκυττάριας αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη συσσώρευση ROS και πηκτικών κυστιδίων, έχουν δειχθεί και κατά την αποθήκευση (Tzounakas et al. 2018, Stolwijk et al. 2021). Φαίνεται, λοιπόν, πως η θετική τους επίδραση συνεχίζεται και μετα-αποθηκευτικά. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι πρωτεωμική ανάλυση σε αιμοδότες που παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα αποθηκευτικής αιμόλυσης έχει αναδείξει μείωση σε μεμβρανοσυνδεόμενες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες (D. Chen et al. 2017). Όσον αφορά στην εξωκυττάρια αντιοξειδωτική ικανότητα, μαζί με τα ενδοκυττάρια επίπεδα ουρικού, δημιούργησαν (μόνο στους ετερόζυγους) ένα ολοκληρωμένο «μεταγγισιακό τρίγωνο» με τη μετα-αποθηκευτική εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης σε κύτταρα και κυστίδια. Αντιοξειδωτικά μόρια των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων βρέθηκαν επίσης θετικά συσχετιζόμενα με την πρωτεασωμική ενεργότητα των ανασυσταμένων κυττάρων, κυρίως στους ετερόζυγους, αναδεικνύοντας μία ιδιαίτερη διασύνδεση του αντιοξειδωτικού και πρωτεοστατικού δικτύου στη συγκεκριμένη ομάδα, η οποία θα αναλυθεί διεξοδικά στη συνέχεια.

Ε.2.2.3 Μεταβολισμός Αργινίνης, Βιταμίνης Β6 και Γλυκοζαμινών

Τόσο πριν, όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συνθήκες τράπεζας αίματος, τα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων αιμοδοτών εμφάνισαν τροποποιημένο μεταβολισμό αργινίνης, με μειωμένη αργινίνη και κρεατίνη και αυξημένη ασύμμετρη δι-μέθυλο-αργινίνη και ακετυλο-σπερμιδίνη. Τις παραπάνω διαφοροποιήσεις έρχεται να συμπληρώσει η αυξημένη αργινάση-1 στις μεμβράνες των ετερόζυγων αιμοδοτών. Η αργινάση-1 ανταγωνίζεται τη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου για το κοινό τους υπόστρωμα, την αργινίνη. Το μονοξείδιο του αζώτου είναι απαραίτητο για την αγγειοδιαστολή στην κυκλοφορία, επομένως η βιοδιαθεσιμότητά του είναι υψίστης σημασίας (Moncada and Higgs 1993). Ο μεταβολισμός της αργινίνης είναι τροποποιημένος στους ασθενείς με βΜΑ. Μάλιστα, καθώς πρόκειται για μία αιμολυτική αναιμία, όταν τα ερυθροκύτταρά λύνονται, απελευθερώνεται αργινάση η οποία μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα της αργινίνης και επομένως δυσχεραίνει την αγγειοδιαστολή, οδηγώντας ακόμη και σε πνευμονική υπέρταση (Morris et al. 2015). Επιπλέον, η αργινάση των θαλασσαιμικών, όπως και των ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία, παρουσιάζει αυξημένη ενεργότητα (Reynolds et al. 1957, Morris et al. 2005). Εντός της ομάδας των ετερόζυγων η αργινίνη βρέθηκε προοδευτικά χαμηλότερη ξεκινώντας από τους β^{++} και καταλήγοντας στους β^0 , ενώ η αργινάση ήταν μειωμένη στη μεμβράνη των β^{++} σε σχέση με των β^+ . Κατά το εξαρτώμενο από το γήρας οξειδωτικό στρες, τα επίπεδα της αργινάσης-1 αυξάνονται σε ζωικά μοντέλα (Pandya et al. 2019), επομένως κατ' αντιστοιχία, το εξαρτώμενο από τις α -σφαιρίνες προοδευτικό οξειδωτικό στρες θα μπορούσε να συμμετέχει στον διαφορικό μεταβολισμό της αργινίνης εντός της ομάδας.

Διαφοροποιημένος βρέθηκε και ο μεταβολισμός της βιταμίνης Β6 στην ομάδα των ετερόζυγων. Τα επίπεδα πυριδοξαμίνης βρέθηκαν αυξημένα τόσο πριν, όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στην ομάδα των ετερόζυγων. Έχει βρεθεί πως ο μεταβολισμός της πυριδοξαμίνης έχει μειωμένο ρυθμό σε ετερόζυγους για βΜΑ, λόγω της χαμηλότερης ενεργότητας της οξειδάσης της πυριδοξαμίνης (Clements et al. 1981), η οποία οδηγεί στην παραγωγή της -ελαττωμένης στα δείγματά μας- φωσφορικής πυριδοξάλης. Μάλιστα, η αύξηση του ρυθμού μέσω χορήγησης ριβοφλαβίνης, οδηγεί σε παραγωγή ολικής αιμοσφαιρίνης (B.B. Anderson et al. 1979). Η ιδιαιτερότητα των ετερόζυγων στο συγκεκριμένο μονοπάτι φαίνεται να τους δίνει ένα πλεονέκτημα αποθηκευτικά και μετά την *in vitro* μετάγγιση. Η πυριδοξαμίνη έχει δειχθεί πως αναστέλλει την οξείδωση της μεμβράνης και τη μείωση της ενεργότητας της ΑΤΡάσης Na^+/K^+ (Jain and Lim 2001) σε ερυθροκύτταρα που προσομοιάζουν εκείνα των διαβητικών. Ταυτόχρονα, σύγχρονες μελέτες υποστηρίζουν πως τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο συντηρητικό διάλυμα της μονάδας μετάγγισης οδηγούν σε φαινοτύπους (ιδιαίτερα στα πιο γηρασμένα κύτταρα) που θυμίζουν ερυθροκύτταρα διαβητικών (Livshits et al. 2021). Συνδυάζοντας τα παραπάνω, θα μπορούσε να θεωρηθεί λογική η συσχέτιση της πυριδοξαμίνης των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων με διάφορες μετα-αποθηκευτικές παραμέτρους και των δύο κατηγοριών αιμοδοτών, καθώς και των *in vivo* επιπέδων της με την αιμόλυση μόνο σε ανασυσταμένα κύτταρα ετερόζυγων.

Το τελευταίο μονοπάτι που βρέθηκε τροποποιημένο στους φορείς βΜΑ ήταν αυτό τον γλυκοζαμινών. Ενώ το τελικό παράγωγο, δηλαδή η UDP-N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνη, βρέθηκε μειωμένο, ήταν αντίστροφη η εικόνα των πρόδρομων μορίων του. Το συγκεκριμένο μόριο χρησιμοποιείται από γλυκοζυλ-τρανσφεράσες για τη μεταφορά υπολειμμάτων N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης σε υποστρώματα, με σκοπό την παραγωγή γλυκοζαμινογλυκανών, πρωτεογλυκανών και γλυκολιπιδίων. Το παρόν εύρημα υπονοεί είτε την υπερβολική κατανάλωση της UDP-N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης, είτε τη μειωμένη σύνθεσή της λόγω κάποιας παρεμπόδισης στα τελευταία στάδια του μονοπατιού. Πιθανώς ο ζυγός να γέρνει προς τη δεύτερη εξήγηση μιας και (α) έχουν βρεθεί μειωμένα επίπεδα γλυκοζυλιωμένων μορίων που φέρουν N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνη στη μεμβράνη ασθενών με β-θαλασσαιμία (Basu et al. 2008), και (β) η συγκεκριμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση είναι ιδιαίτερα κοινή στις πρωτεΐνες του *Plasmodium falciparum* (στο οποίο είναι ανθεκτικοί οι ετερόζυγοι) μετά την είσοδό του στον ξενιστή (Kupferschmid et al. 2017).

E.2.3. Πρωτεόσταση

Ανεξαρτήτως δότη, η πρωτεασωματική ενεργότητα παρουσίασε το ίδιο χρονικό πρότυπο, με προοδευτική μείωση στο κυτοσόλιο και προσωρινή αύξηση στη μεμβράνη στο μέσο της αποθηκευτικής περιόδου. Παρόμοια κατανομή έχει δείχθει και σε αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα αιμοδοτών με ανεπάρκεια G6PD (Tzounakas et al. 2022b), υπονοώντας μία μετατόπιση ή ενεργοποίηση μεμβρανικών πρωτεασωμάτων περίπου την ημέρα 21. Η συγκεκριμένη χρονική στιγμή είναι βασική για πλήθος αλλαγών που παρατηρούνται κατά την αποθήκευση, όπως είναι η συσσώρευση δραστικών ριζών οξυγόνου (Tzounakas et al. 2021a) και η επαναδικτύωση του μεταβολισμού (Reisz et al. 2016), επομένως δεν είναι καθόλου απίθανο να είναι εξίσου σημαντική για τη ρύθμιση της λειτουργίας του πρωτεασώματος. Στους αιμοδότες με ανεπάρκεια G6PD, το πρωτεάσωμα μεταναστεύει στη μεμβράνη μαζί με πρωτεΐνες «Επιδιόρθωσης ή Καταστροφής», συμπεριλαμβανομένων αντιοξειδωτικών ενζύμων και μοριακών συνοδών (Tzounakas et al. 2022b). Στην παρούσα εργασία, αντίστοιχες συνδέσεις βρέθηκαν μεταξύ του μεμβρανικού πρωτεασώματος και πρωτεοστατικών πρωτεϊνών και στις δύο ομάδες. Τόσο πρωτεωμικές, όσο και βιοχημικές αναλύσεις φαίνεται να αναδεικνύουν για άλλη μία φορά τον κεντρικό ρόλο της μεμβράνης στη ρύθμιση της ερυθροκυτταρικής ομοιόστασης (Bosman 2016). Η πρωτεόσταση είναι ιδιαίτερα σημαντική για τα ερυθροκύτταρα λόγω της αδυναμίας τους να συνθέσουν νέες πρωτεΐνες, επομένως δεν προξένησε έκπληξη το γεγονός ότι το πρωτεάσωμα, σε συνδυασμό με πλήθος πρωτεϊνών του συστήματος «Επιδιόρθωσης ή Καταστροφής», κυριάρχησαν στο πρωτεϊνικό βιολογικό δίκτυο. Σε πρωτεϊνικά αλληλεπιδροσώματα (interactomes) άλλων ερευνητικών ομάδων έχει ομοίως αναδειχθεί η κεντρική θέση της πρωτεόστασης (Goodman et al. 2007, D'Alessandro et al. 2010, Sae-Lee et al. 2022). Μιας και το ερυθροκύτταρο υπόκειται σε έντονο οξειδωτικό στρες, τα υψηλότερα επίπεδα του 20S πυρήνα σε σχέση με το ολοένζυμο του πρωτεασώματος (Sae-Lee et al. 2022) πιθανώς εξηγούνται από το γεγονός ότι είναι ιδιαίτερα ανθεκτικός απέναντι στο οξειδωτικό στρες (Reinheckel et al. 1998), αλλά και αποτελεσματικός όσον αφορά στην αποδόμηση οξειδωμένων πρωτεϊνών (Davies 2001). Το έναυσμα για τη μετατόπιση του πρωτεοστατικού μηχανισμού στη μεμβράνη πιθανώς να δίνεται από τη συσσώρευση οξειδωτικών βλαβών και την προσκόλληση αποδιοταγμένων/οξειδωμένων πρωτεϊνών στη

μεμβράνη (Antonelou et al. 2010b, Reisz et al. 2016, Wither et al. 2016). Παρ' όλα αυτά, όσο επιβαρύνεται το πρωτεώμα του ερυθροκυττάρου με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης, βλάπτεται και το ίδιο το πρωτεάσωμα, κι έτσι παρατηρείται πτώση στη μεμβρανική του ενεργότητα (Delobel et al. 2016).

Τα ερυθροκύτταρα με στίγμα βΜΑ εμφάνισαν κατά την αποθήκευση ενισχυμένη μεμβρανική πρωτεόσταση, τόσο λόγω της αυξημένης πρωτεασωμικής ενεργότητας, όσο και της δέσμευσης μορίων πρωτεϊνικού ελέγχου στη μεμβράνη τους. Οι μοριακές συνοδοί έχουν τη δυνατότητα να διατηρούν την πρωτεολυτική ενεργότητα του πρωτεασώματος (Conconi et al. 1998), κάτι που συνάδει με την αυξημένη παρουσία τους στη μεμβράνη των ετερόζυγων και την ταυτόχρονη θετική συσχέτισή τους με τη μεμβρανική πρωτεασωμική ενεργότητα. Καθώς αντίστοιχο πρότυπο, με υψηλότερα επίπεδα πρωτεασωμικής ενεργότητας, βρέθηκε και στα κύτταρα των αιμοδοτών με ανεπάρκεια G6PD (Tzounakas et al. 2022b), θα μπορούσε η συγκεκριμένη ενίσχυση να αποτελεί προσαρμογή των συγκεκριμένων ερυθροκυττάρων στο σταθερό οξειδωτικό στρες που βιώνουν *in vivo* (Fujii et al. 2021), και να αναδεικνύεται κατά την αποθήκευση που χαρακτηρίζεται από υψηλό οξειδωτικό φορτίο, με σκοπό την προστασία της μεμβράνης. Όντως, η παρουσία του συμπλόκου πρωτεόστασης φαίνεται να έχει θετική επίδραση στην ομάδα των ετερόζυγων, μιας και η μεμβράνη τους παρουσιάζει μειωμένη πρωτεϊνική καρβονυλίωση. Μάλιστα, σε πρόδρομα κύτταρα β-θαλασσαιμικών έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση πρωτεασωμικών υπομονάδων με σκοπό την αποσυμφόρηση από τις αλυσίδες α-σφαιρίνης (Khandros et al. 2012). Αυξημένη ενεργότητα έχει βρεθεί και σε ερυθροκύτταρα ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία (Strader et al. 2020), καθώς και σε ερυθροκύτταρα που υφίστανται οξειδωτική βλάβη (Abi Habib et al. 2020). Εντός της ομάδας των ετερόζυγων, ενισχυμένη βρέθηκε η πρωτεόσταση στα κύτταρα των β^+ και β^0 σε σχέση με εκείνα των β^{++} , αποτρέποντας την εμφάνιση περισσότερων μεμβρανικών βλαβών λόγω των αλυσίδων α-σφαιρίνης. Ειδικά στα ερυθροκύτταρα των β^+ που παρουσίασαν υψηλές ROS, το οξειδωτικό στρες δε μεταφράστηκε σε υπερβολική επιβάρυνση της μεμβράνης και λύση, αναδεικνύοντας ξανά τη λειτουργία του πρωτεασώματος στην αποσυμφόρηση από τις ελεύθερες αλυσίδες α-σφαιρινών. Παρότι και στους ετερόζυγους και στους μάρτυρες το πρωτεάσωμα βρέθηκε στην καρδιά του πρωτεϊνικού δικτύου συνδεδεμένο με μοριακές συνοδούς, αντιοξειδωτικά μόρια και ένζυμα του ενεργειακού μεταβολισμού, οι συνδέσεις αυτές ήταν περισσότερες ήδη από τη μέρα 7 στο δίκτυο των πρώτων. Παρόμοια ενισχυμένο έχει βρεθεί και το πρωτεϊνικό αλληλεπιδρόσωμα των ερυθροκυττάρων ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία (Ammann and Goodman 2009). Η απώλεια αυτής της ποσοτικής διαφοράς μέχρι το πέρας της αποθηκευτικής περιόδου, υποδηλώνει για ακόμη μία φορά την «προδιάθεση» που χαρακτηρίζει τα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων όσον αφορά στην αντιμετώπιση πρόσθετου οξειδωτικού, πρωτεοτοξικού κι ενεργειακού στρες.

Πέραν της ποσοτικής ασυμφωνίας, αναδείχθηκαν και ορισμένες διαφορές σε επιμέρους συνδέσεις, και μάλιστα με πρωτεΐνες που διαφέρουν ποσοτικά στις δύο ομάδες. Οι πρωτεασωμικές ενεργότητες των ετερόζυγων βρέθηκαν συσχετιζόμενες με ιοντικά κανάλια, αποτέλεσμα που πιθανώς χρήζει περαιτέρω μελέτης δεδομένης της συμμετοχής πρωτεασωμικών μονοπατιών στη ρύθμιση και την επιφανειακή έκφραση ιοντικών καναλιών (Abriel and Staub 2005). Για παράδειγμα, η σύνδεση του πρωτεασώματος με την *piezo-1* θα μπορούσε να υπονοεί τη

σημασία της ενισχυμένης πρωτεόστασης στη μηχανική αντοχή των βΜΑ ετερόζυγων ερυθροκυττάρων. Έχει όντως δειχθεί πως η μηχανική έκταση (stretch) σηματοδοτεί την αποδόμηση της piezo-1 από το πρωτεάσωμα σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Miroshnikova et al. 2021). Επιλεκτική σύνδεση παρουσίασε και η αργινάση-1 με το πρωτεάσωμα των ετερόζυγων. Η ανταγωνιστική της δράση με την συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου, με την ενδοθηλιακή λειτουργία της οποίας έχει σχετιστεί η πρωτεασωμική ενεργότητα (Wei and Xia 2006), θα μπορούσε να ευθύνεται για τη συγκεκριμένη σύνδεση.

Τα αποθηκευτικά επίπεδα πρωτεοστατικών μορίων βρέθηκαν να συνδέονται ευνοϊκά με την οξειδωτική αιμόλυση και τη συσσώρευση ROS μετα-αποθηκευτικά στο *in vitro* μοντέλο μετάγγισης. Επίσης, εμφάνισαν ενδο-συσχετίσεις και στις δύο ομάδες, γεγονός που μπορεί μερικώς να αιτιολογήσει τη διατήρηση των υψηλών επιπέδων πρωτεασωμικής ενεργότητας στα ανασυσταμένα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων για βΜΑ. Αν λάβουμε υπόψη ολόκληρη την αλυσίδα μετάγγισης, παρατηρείται πρωτεασωμική διατήρηση κυρίως στην ομάδα των ετερόζυγων η οποία χαρακτηρίζεται από ισχυρή πρωτεόσταση. Έχει δειχθεί πως παρουσία οξειδωτικού στρες, η έκθεση υδρόφοβων αμινοξέων στην αιμοσφαιρίνη φαίνεται να πυροδοτεί την πρωτεόλυσή της από πρωτεασώματα (Pacifici et al. 1993, Abi Habib et al. 2020). Η εντυπωσιακή πρωτεόσταση στην ομάδα των ετερόζυγων, ο ρόλος της στην αντιμετώπιση της οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης και οι (παρούσες και στις δύο ομάδες) συνδέσεις της με την οξειδωτική λύση μετά από *in vitro* μετάγγιση, θα μπορούσε να ευθύνεται εν μέρει για τη μετα-αποθηκευτική μειωμένη οξειδωτική αιμόλυση στα ερυθροκύτταρα με στίγμα βΜΑ.

E.2.4 Ερυθροκυτταρική Μορφολογία – Κυστιδιοποίηση

Τα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων αιμοδοτών διατήρησαν σε μεγάλο βαθμό τη μορφολογία τους κατά την αποθηκευτική περίοδο. Είναι γνωστό πως κατά την παραμονή τους εντός της μονάδας μετάγγισης τα ερυθροκύτταρα εμφανίζουν αλλοιώσεις στο σχήμα τους, τόσο λόγω αλλαγών στο μεμβρανικό δυναμικό, όσο και λόγω της εκτεταμένης κυστιδιοποίησης (Antonellou et al. 2012, Blasi et al. 2012). Επιπλέον, έχει δειχθεί πως τα μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης ερυθροκύτταρα (σφαιροκύτταρα, σφαιροεχινοκύτταρα, σφαιροστοματοκύτταρα) είναι λιγότερο ανθεκτικά στην οσμωτική καταπόνηση (Wallas 1979, Hogman et al. 2006) και τη λύση (Melzak et al. 2021), παρατήρηση που συνάδει με τις λιγότερες αλλοιωμένες μορφές στα ανθεκτικά σε αιμόλυση αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων για βΜΑ. Κατά την αποθήκευση, βιοχημικοί και φυσικοί παράγοντες ευθύνονται για αναδιατάξεις στην οργάνωση του ερυθροκυττάρου, διαταράσσοντας τις σχέσεις μεταξύ κυτταροσκελετού – μεμβρανικής επιφάνειας – μορφολογίας (Sherstyukova et al. 2021, Kozlova et al. 2022). Η διατήρηση των επιπέδων ορισμένων κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της σπεκτρίνης, στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων για βΜΑ, πιθανώς να συμβάλλει στην αντοχή σε μορφολογικές αλλοιώσεις.

Τα κυστίδια που συσσωρεύτηκαν στις μονάδες μετάγγισης των ετερόζυγων αιμοδοτών κατά την αποθήκευση, χαρακτηρίζονταν από μειωμένα επίπεδα δεικτών στρες (π.χ. καρβονυλίωση) και απομάκρυνσης (π.χ. συμπλήρωμα), γεγονός που υπονοεί την παρατεταμένη παρουσία τους στην κυκλοφορία πιθανών

αιμοδοκτών σε σχέση με εκείνα των αιμοδοτών-μαρτύρων. Τα ερυθροκυτταρικά κυστίδια έχουν τη δυνατότητα να ρυθμίζουν τη βιοδιαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου (Liu et al. 2013), ενώ συμμετέχουν στην οξειδοαναγωγική ισορροπία (Jank and Salzer 2011) και την ανοσορύθμιση (Menocha and Muszynski 2019). Αξίζει να αναφερθεί πως συγκεκριμένα η HSP70, μοριακή συνοδός που βρέθηκε αυξημένη στα εξωκυττάρια κυστίδια των ετερόζυγων αιμοδοτών, έχειδειχθεί πως στην εξωκυττάρια μορφή της (εντός ή εκτός κυστιδίων) είναι ικανή να ενεργοποιεί *in vitro* την κυτταροτοξικότητα των κυττάρων φυσικών-φονέων (natural killer cells), εμφανίζοντας αντικαρκινική δράση (Komarova et al. 2021).

Ε.3 Ζωικό Μοντέλο Μετάγγισης

Η ιδιαίτερη φυσιολογία των ερυθροκυττάρων των ετερόζυγων για βΜΑ φαίνεται, πέραν της αποθήκευσης, να τα ευνοεί και στην κυκλοφορία του μεταγγιζόμενου μυός, οδηγώντας σε αυξημένη επιβίωση των συγκεκριμένων κυττάρων 24 ώρες μετά τη μετάγγιση σε σχέση με εκείνα που προέρχονταν από αιμοδοτές μάρτυρες. Η διαφορά αυτή δεν οφειλόταν σε άμεση απομάκρυνση λόγω αιμολυτικών φαινομένων, μιας και η αιμοσφαιρίνη τόσο στο πλάσμα όσο και στα ούρα των μυών ήταν παρόμοια ανεξαρτήτως του αίματος που τους χορηγήθηκε. Η ανάδειξη συσχετίσεων μεταξύ παραμέτρων κυτταρικής ευθραυστότητας (τόσο του φρέσκου όσο και του αποθηκευμένου αίματος) με την μετα-μεταγγισιακή ανάκτηση επιλεκτικά στην ομάδα των αιμοδοτών με στίγμα βΜΑ ενισχύει την εμπλοκή της ιδιαίτερης φυσιολογίας των κυττάρων τους στην μειωμένη απομάκρυνσή τους από την κυκλοφορία. Παρόμοια συσχέτιση, και συγκεκριμένα της οσμωτικής αιμόλυσης με τη μετα-μεταγγισιακή ανάκτηση σε μύες-δέκτες έχει βρεθεί και για παχύσαρκους αιμοδοτές (Hazegh et al. 2021). Τα ερυθροκύτταρα με μειωμένη ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης «εγκλωβίζονται» στον σπλήνα (Deplaine et al. 2011), ενώ *in vitro* προσομοίωση των σπληνικών σχισμών με διατάξεις μικροροής υποστηρίζει πως τα μηχανικά «γηρασμένα» ερυθροκύτταρα είναι επιρρεπέστερα σε φαγοκυττάρωση και χαρακτηρίζονται από απώλεια πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη δομή του κυτταροσκελετού, τον μεταβολισμό και την αντιοξειδωτική άμυνα (Garcia-Herreros et al. 2021). Πέραν της οσμωτικής και μηχανικής τους ανθεκτικότητας, η διατήρηση της μορφολογίας των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων των ετερόζυγων προδιαθέτει επίσης για καλύτερη επιβίωση, μιας και τα μη αντιστρεπτής μορφολογίας μικρο-ερυθροκύτταρα απομακρύνονται άμεσα μετα-μεταγγισιακά και μειώνουν την ανάκτηση (Roussel et al. 2021).

Σίγουρα δεν πρέπει να παραλειφθεί πως το μέγεθος των μεταγγιζόμενων ερυθροκυττάρων, το οποίο είναι μικρότερο στην περίπτωση των ετερόζυγων, έχει βρεθεί αντίστροφα συσχετιζόμενο με την ανάκτηση σε ξενοβιωτικά μοντέλα μετάγγισης. Όμως, τα ερυθροκύτταρα των υπό εξέταση βΜΑ ετερόζυγων αιμοδοτών δεν χαρακτηρίζονταν από υπερβολικά χαμηλές τιμές MCV, ακριβώς για να ελαχιστοποιηθεί η συμβολή του μεγέθους στην απομάκρυνση, ενώ χορηγήθηκαν και ζεύγη (ετερόζυγων-μαρτύρων) ερυθροκυττάρων με παραπλήσιες τιμές MCV και η διαφορά συνέχιζε να γέρνει υπέρ των ετερόζυγων. Επίσης, οι μηχανικές καταπονήσεις που δέχονται τα κύτταρα στον μυ είναι ακόμα πιο έντονες από τις ήδη ισχυρές καταπονήσεις που δέχονται στην ανθρώπινη κυκλοφορία (σπληνικές σχισμές διαμέτρου 0,5-1,0 μm (L.T. Chen and Weiss 1973)). Παρ' όλα αυτά, τα

μεταγγισμένα ερυθροκύτταρα των ετερόζυγων θα λάβουν μικρότερες πιέσεις και στην κυκλοφορία ενός πιθανού δέκτη (ανθρώπου), μιας και χαρακτηρίζονται τόσο από μικρότερο μέγεθος, όσο και από λιγότερες υποθανάτιες βλάβες.

Ε.4 Συγκεντρωτικά Συμπεράσματα

Συνολικά, οι αιμοδότες με ετεροζυγωτία σε μεταλλαγές της βΜΑ αποτελούν μη αμελητέο ποσοστό του αιμοδοτικού πληθυσμού της χώρας μας και τα ερυθροκύτταρά τους παρουσιάζουν σημαντικές ιδιομορφίες από τη στιγμή της αιμοδοσίας μέχρι και μετά την αποθήκευσή σε μονάδες μετάγγισης. Με τη χρήση πληθώρας ερευνητικών προσεγγίσεων, συμπεριλαμβανομένων ολιστικών τεχνικών πρωτεωμικής και μεταβολωμικής ανάλυσης, στοχευμένων πειραμάτων φυσιολογικής επάρκειας και ενδεδειγμένης βιοστατιστικής ανάλυσης, σχηματίστηκε για πρώτη φορά μία σαφής εικόνα όσον αφορά στην ποιότητα των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων αιμοδοτών με στίγμα βΜΑ.

Τα κύτταρα αυτά αντιμετωπίζουν εντυπωσιακά το αποθηκευτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα, είναι ανθεκτικά σε λύση ανεξαρτήτως ερεθίσματος και διαθέτουν βελτιωμένο οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο σε σύγκριση με εκείνα του μέσου αιμοδότη. Η αντίσταση σε κυτταρική λύση μοιάζει να είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ιδιαίτερη γεωμετρία των κυττάρων των ετερόζυγων και τη σταθερότητα δομικών πρωτεϊνών κατά την πρόοδο του χρόνου αποθήκευσης. Επιπλέον, το σύνολο των αποτελεσμάτων, είτε αφορούν στη φυσιολογία και το μεταβολισμό είτε στην πρωτεϊνική σύσταση και την πρωτεόσταση, σχηματίζει την εικόνα ενός κυττάρου καλά προσαρμοσμένου σε σταθερά πλην ήπια επίπεδα οξειδωτικού στρες, έτοιμου να αντιμετωπίσει περαιτέρω οξειδωτικές προκλήσεις. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών και πρωτεοστατικών ενζύμων βρέθηκαν πλεονεκτικότερα στα κύτταρα των ετερόζυγων, τα οποία παράλληλα έφεραν μειωμένες οξειδωτικές βλάβες και χαμηλότερο οξειδωτικό φορτίο, κυρίως προς το τέλος της αποθηκευτικής περιόδου. Με δεδομένο το βασικό ρόλο του οξειδωτικού στρες στην πρόοδο της αποθηκευτικής βλάβης, φαίνεται πως τα ερυθροκύτταρα με στίγμα βΜΑ μπορούν χάρη στην «εκπαίδευσή» σε ελαφρώς αυξημένο οξειδωτικό φορτίο να την αντιμετωπίζουν πλεονεκτικότερα.

Η «υπεροχή» σε επίπεδο αποθήκευσης, που αντικατοπτρίζεται έντονα στα μειωμένα επίπεδα αποθηκευτικής αιμόλυσης (μοναδικό ποιοτικό χαρακτηριστικό της αποθήκευσης αίματος σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας), συνοδεύεται και από βελτιωμένο πρότυπο απόκρισης σε μετα-μεταγγισιακό στρες. Τα αποτελέσματα από τα *in vitro* και ζωικά μοντέλα μετάγγισης συγκλίνουν και (α) αναδεικνύουν τη διατήρηση της πλεονεκτικότερης κυτταρικής φυσιολογίας μετά τη μετάγγιση, και (β) υπαινίσσονται αυξημένη 24ωρη *in vivo* ανάκτηση των μεταγγισμένων ερυθροκυττάρων (μοναδική μετα-μεταγγισιακή μέτρηση επιτυχούς μετάγγισης σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας) στην περίπτωση των ετερόζυγων για βΜΑ. Μέσω της «τριγωνικής» ανάλυσης για τη σύνδεση των τριών κρίκων της αλυσίδας της μετάγγισης, χαρακτηριστικά των ετερόζυγων, όπως οι χαμηλοί δείκτες ευθραυστότητας και το μέγεθος των κυττάρων τους, καθώς και η ισχυρή εξωκυττάρια αντιοξειδωτική ικανότητα, βρέθηκαν να σχετίζονται με χαμηλή μετα-μεταγγισιακή αιμόλυση και

επιβίωση των ερυθροκυττάρων τους στην κυκλοφορία του δέκτη. Φαίνεται λοιπόν πως ορισμένες παράμετροι που διακρίνουν τους ετερόζυγους *in vivo* ή/και αποθηκευτικά, δεν είναι ουδέτερες ως προς τη μετα-μεταγγισιακή φυσιολογία/επάρκεια των ερυθροκυττάρων τους.

Συμπερασματικά, τα ερυθροκύτταρα ατόμων με ετεροζυγωτία βΜΑ που είναι αποδεκτοί αιμοδότες κατέχουν εγγενή χαρακτηριστικά που τα καθιστούν πλεονεκτικά τόσο όσον αφορά στην αποθήκευσή τους σε μονάδες μετάγγισης όσο και μετά τη μετάγγισή τους σε ζωικά μοντέλα. Τα εν λόγω αποτελέσματα χαρτογραφούν με μεγάλη λεπτομέρεια τη φυσιολογία και το μεταβολισμό του αίματος των συγκεκριμένων αιμοδοτών παρέχοντας (α) το υπόβαθρο για το σχεδιασμό τελικών τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών οι οποίες θα αποσαφηνίσουν πλήρως την εικόνα και (β) τις πληροφορίες για εναλλακτική διαχείριση ή αποθήκευση του αίματος διακριτών γενετικών ομάδων (π.χ. ερυθροκύτταρα ετερόζυγων αιμοδοτών ως κατεψυγμένο αίμα λόγω ανθεκτικότητας στη λύση κατά την απόψυξη).

Βιβλιογραφία

- Abi Habib, J., De Plaen, E., Stroobant, V., Zivkovic, D., Bousquet, M. P., Guillaume, B., Wahni, K., Messens, J., Busse, A., Vigneron, N. and Van den Eynde, B. J., 2020. "Efficiency of the four proteasome subtypes to degrade ubiquitinated or oxidized proteins." *Sci Rep* 10(1): 15765.
- Abriel, H. and Staub, O., 2005. "Ubiquitylation of ion channels." *Physiology (Bethesda)* 20: 398-407.
- Agnihotri, N., Pal, L., Thakur, M. and Kumar, P., 2014. "The need to label red blood cell units with their haemoglobin content: a single centre study on haemoglobin variations due to donor-related factors." *Blood Transfus* 12(4): 520-526.
- Al-Ansari, M. and Craik, J. D., 2015. "Decreased erythrocyte nucleoside transport and hENT1 transporter expression in glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency." *BMC Hematol* 15: 17.
- Alayash, A. I., Patel, R. P. and Cashon, R. E., 2001. "Redox reactions of hemoglobin and myoglobin: biological and toxicological implications." *Antioxid Redox Signal* 3(2): 313-327.
- Alexander, K., Hazegh, K., Fang, F., Sinchar, D., Kiss, J. E., Page, G. P., D'Alessandro, A. and Kanias, T., 2021. "Testosterone replacement therapy in blood donors modulates erythrocyte metabolism and susceptibility to hemolysis in cold storage." *Transfusion* 61(1): 108-123.
- Alfarouk, K. O., Ahmed, S. B. M., Elliott, R. L., Benoit, A., Alqahtani, S. S., Ibrahim, M. E., Bashir, A. H. H., Alhoufie, S. T. S., Elhassan, G. O., Wales, C. C., Schwartz, L. H., Ali, H. S., Ahmed, A., Forde, P. F., Devesa, J., Cardone, R. A., Fais, S., Harguindey, S. and Reshkin, S. J., 2020. "The Pentose Phosphate Pathway Dynamics in Cancer and Its Dependency on Intracellular pH." *Metabolites* 10(7).
- Almizraq, R., Tchir, J. D., Holovati, J. L. and Acker, J. P., 2013. "Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and in vitro quality." *Transfusion* 53(10): 2258-2267.
- Ammann, L. P. and Goodman, S. R., 2009. "Cluster analysis for the impact of sickle cell disease on the human erythrocyte protein interactome." *Exp Biol Med (Maywood)* 234(6): 703-711.
- Anderson, B. B., Perry, G. M., Modell, C. B., Child, J. A. and Mollin, D. L., 1979. "Abnormal red-cell metabolism of pyridoxine associated with beta-thalassaemia." *Br J Haematol* 41(4): 497-507.
- Anderson, N. L. and Anderson, N. G., 2002. "The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects." *Mol Cell Proteomics* 1(11): 845-867.
- Antonelou, M. H., Kriebardis, A. G. and Papassideri, I. S., 2010a. "Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice." *Blood Transfus* 8 Suppl 3: s39-47.
- Antonelou, M. H., Kriebardis, A. G., Stamoulis, K. E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L. H. and Papassideri, I. S., 2010b. "Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol." *Transfusion* 50(2): 376-389.
- Antonelou, M. H., Kriebardis, A. G., Stamoulis, K. E., Trougakos, I. P. and Papassideri, I. S., 2011. "Apolipoprotein J/clusterin in human erythrocytes is involved in the molecular process of defected material disposal during vesiculation." *PLoS One* 6(10): e26033.
- Antonelou, M. H. and Seghatchian, J., 2016. "Update on extracellular vesicles inside red blood cell storage units: Adjust the sails closer to the new wind." *Transfus Apher Sci* 55(1): 92-104.
- Antonelou, M. H., Tzounakas, V. L., Velentzas, A. D., Stamoulis, K. E., Kriebardis, A. G. and Papassideri, I. S., 2012. "Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome." *J Proteomics* 76 Spec No.: 220-238.
- Antunes, F., Han, D. and Cadenas, E., 2002. "Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions." *Free Radic Biol Med* 33(9): 1260-1267.
- Aoki, T., 2017. "A Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins." *Membranes (Basel)* 7(4).
- Arashiki, N. and Takakuwa, Y., 2017. "Maintenance and regulation of asymmetric phospholipid distribution in human erythrocyte membranes: implications for erythrocyte functions." *Curr Opin Hematol* 24(3): 167-172.

- Arias, C. F. and Arias, C. F., 2017. "How do red blood cells know when to die?" *R Soc Open Sci* 4(4): 160850.
- Asaro, R. J. and Zhu, Q., 2020. "Vital erythrocyte phenomena: what can theory, modeling, and simulation offer?" *Biomech Model Mechanobiol* 19(5): 1361-1388.
- Asha, K., 2018. *Sweet biochemistry : remembering structures, cycles, and pathways by mnemonics*. London, United Kingdom, Elsevier, Academic Press.
- Aziz, H. and Mohiuddin, S. S. (2022). Biochemistry, Hexose Monophosphate Pathway. *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Badior, K. E. and Casey, J. R., 2018. "Molecular mechanism for the red blood cell senescence clock." *IUBMB Life* 70(1): 32-40.
- Bain, B. J., 2004. *A beginner's guide to blood cells*. Malden, Mass., Blackwell Pub.
- Barbarino, F., Waschenbach, L., Cavalho-Lemos, V., Dillenberger, M., Becker, K., Gohlke, H. and Cortese-Krott, M. M., 2021. "Targeting spectrin redox switches to regulate the mechanoproperties of red blood cells." *Biol Chem* 402(3): 317-331.
- Bardyn, M., Rappaz, B., Jaferzadeh, K., Crettaz, D., Tissot, J. D., Moon, I., Turcatti, G., Lion, N. and Prudent, M., 2017. "Red blood cells ageing markers: a multi-parametric analysis." *Blood Transfus* 15(3): 239-248.
- Barshtein, G., Pajic-Lijakovic, I. and Gural, A., 2021. "Deformability of Stored Red Blood Cells." *Front Physiol* 12: 722896.
- Baskurt, O. K. and Meiselman, H. J., 2003. "Blood rheology and hemodynamics." *Semin Thromb Hemost* 29(5): 435-450.
- Basu, S., Banerjee, D., Chandra, S. and Chakrabarti, A., 2008. "Loss of phospholipid membrane asymmetry and sialylated glycoconjugates from erythrocyte surface in haemoglobin E beta-thalassaemia." *Br J Haematol* 141(1): 92-99.
- Becker, P. S., Schwartz, M. A., Morrow, J. S. and Lux, S. E., 1990. "Radiolabel-transfer cross-linking demonstrates that protein 4.1 binds to the N-terminal region of beta spectrin and to actin in binary interactions." *Eur J Biochem* 193(3): 827-836.
- Belinskaia, D. A., Voronina, P. A., Shmurak, V. I., Vovk, M. A., Batalova, A. A., Jenkins, R. O. and Goncharov, N. V., 2020. "The Universal Soldier: Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant Functions of Serum Albumin." *Antioxidants (Basel)* 9(10).
- Benesch, R. and Benesch, R. E., 1967. "The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin." *Biochem Biophys Res Commun* 26(2): 162-167.
- Benga, G., 2012. "The first discovered water channel protein, later called aquaporin 1: molecular characteristics, functions and medical implications." *Mol Aspects Med* 33(5-6): 518-534.
- Benzie, I. F. and Strain, J. J., 1996. "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay." *Anal Biochem* 239(1): 70-76.
- Berezina, T. L., Zaets, S. B., Morgan, C., Spillert, C. R., Kamiyama, M., Spolarics, Z., Deitch, E. A. and Machiedo, G. W., 2002. "Influence of storage on red blood cell rheological properties." *J Surg Res* 102(1): 6-12.
- Bertolone, L., Roy, M. K., Hay, A. M., Morrison, E. J., Stefanoni, D., Fu, X., Kanas, T., Kleinman, S., Dumont, L. J., Stone, M., Nemkov, T., Busch, M. P., Zimring, J. C. and D'Alessandro, A., 2020. "Impact of taurine on red blood cell metabolism and implications for blood storage." *Transfusion* 60(6): 1212-1226.
- Blasi, B., D'Alessandro, A., Ramundo, N. and Zolla, L., 2012. "Red blood cell storage and cell morphology." *Transfus Med* 22(2): 90-96.
- Boas, F. E., Forman, L. and Beutler, E., 1998. "Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 3077-3081.
- Boehm, R., Cohen, C., Pulcinelli, R., Caletti, G., Balsan, A., Nascimento, S., Rocha, R., Calderon, E., Saint'Pierre, T., Garcia, S., Sekine, L., Onsten, T., Gioda, A. and Gomez, R., 2019. "Toxic elements in

- packed red blood cells from smoker donors: a risk for paediatric transfusion?" *Vox Sang* 114(8): 808-815.
- Boehm, R. E., Arbo, B. D., Leal, D., Hansen, A. W., Pulcinelli, R. R., Thiesen, F. V., Balsan, A. M., Onsten, T. G. H. and Gomez, R., 2018. "Smoking fewer than 20 cigarettes per day and remaining abstinent for more than 12 hours reduces carboxyhemoglobin levels in packed red blood cells for transfusion." *PLoS One* 13(9): e0204102.
- Boehm, R. E., Do Nascimento, S. N., Cohen, C. R., Bandiera, S., Pulcinelli, R. R., Balsan, A. M., Fao, N. S., Peruzzi, C., Garcia, S. C., Sekine, L., Onsten, T. G. H. and Gomez, R., 2020. "Cigarette smoking and antioxidant defences in packed red blood cells prior to storage." *Blood Transfus* 18(1): 40-48.
- Bogdanova, A., Makhro, A., Wang, J., Lipp, P. and Kaestner, L., 2013. "Calcium in red blood cells-a perilous balance." *Int J Mol Sci* 14(5): 9848-9872.
- Bordbar, A., Johansson, P. I., Paglia, G., Harrison, S. J., Wichuk, K., Magnusdottir, M., Valgeirsdottir, S., Gybel-Brask, M., Ostrowski, S. R., Palsson, S., Rolfsson, O., Sigurjonsson, O. E., Hansen, M. B., Gudmundsson, S. and Palsson, B. O., 2016. "Identified metabolic signature for assessing red blood cell unit quality is associated with endothelial damage markers and clinical outcomes." *Transfusion* 56(4): 852-862.
- Bosman, G. J., 2013. "Survival of red blood cells after transfusion: processes and consequences." *Front Physiol* 4: 376.
- Bosman, G. J., 2016. "The Proteome of the Red Blood Cell: An Auspicious Source of New Insights into Membrane-Centered Regulation of Homeostasis." *Proteomes* 4(4).
- Bosman, G. J., Lasonder, E., Groenen-Dopp, Y. A., Willekens, F. L. and Werre, J. M., 2012. "The proteome of erythrocyte-derived microparticles from plasma: new clues for erythrocyte aging and vesiculation." *J Proteomics* 76 Spec No.: 203-210.
- Bradford, M. M., 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Buehler, P. W., Swindle, D., Pak, D. I., Fini, M. A., Hassell, K., Nuss, R., Wilkerson, R. B., D'Alessandro, A. and Irwin, D. C., 2021. "Murine models of sickle cell disease and beta-thalassemia demonstrate pulmonary hypertension with distinctive features." *Pulm Circ* 11(4): 20458940211055996.
- Bunn, H. F. and Jandl, J. H., 1968. "Exchange of heme among hemoglobins and between hemoglobin and albumin." *J Biol Chem* 243(3): 465-475.
- Burger, P., Hilarius-Stokman, P., de Korte, D., van den Berg, T. K. and van Bruggen, R., 2012. "CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis." *Blood* 119(23): 5512-5521.
- Cahalan, S. M., Lukacs, V., Ranade, S. S., Chien, S., Bandell, M. and Patapoutian, A., 2015. "Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume." *Elife* 4.
- Campanella, M. E., Chu, H. and Low, P. S., 2005. "Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(7): 2402-2407.
- Carruthers, A., DeZutter, J., Ganguly, A. and Devaskar, S. U., 2009. "Will the original glucose transporter isoform please stand up!" *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(4): E836-848.
- Cha, M. K. and Kim, I. H., 1996. "Glutathione-linked thiol peroxidase activity of human serum albumin: a possible antioxidant role of serum albumin in blood plasma." *Biochem Biophys Res Commun* 222(2): 619-625.
- Chaudhry, R. and Varacallo, M. (2022). *Biochemistry, Glycolysis*. [StatPearls](#). Treasure Island (FL).
- Chen, D., Schubert, P. and Devine, D. V., 2017. "Proteomic analysis of red blood cells from donors exhibiting high hemolysis demonstrates a reduction in membrane-associated proteins involved in the oxidative response." *Transfusion* 57(9): 2248-2256.
- Chen, L. T. and Weiss, L., 1973. "The role of the sinus wall in the passage of erythrocytes through the spleen." *Blood* 41(4): 529-537.

- Cho, C. S., Yoon, H. J., Kim, J. Y., Woo, H. A. and Rhee, S. G., 2014. "Circadian rhythm of hyperoxidized peroxiredoxin II is determined by hemoglobin autoxidation and the 20S proteasome in red blood cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(33): 12043-12048.
- Chu, H. and Low, P. S., 2006. "Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3." *Biochem J* 400(1): 143-151.
- Chung, C. C., Chan, L., Chen, J. H., Hung, Y. C. and Hong, C. T., 2021. "Plasma Extracellular Vesicle alpha-Synuclein Level in Patients with Parkinson's Disease." *Biomolecules* 11(5).
- Clements, J. E., Anderson, B. B. and Perry, G. M., 1981. "Low red cell activity of pyridoxine (pyridoxamine) phosphate oxidase and glutathione reductase associated with thalassaemia." *Biomedicine* 34(3): 119-123.
- Cohen, G. and Hochstein, P., 1963. "Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes." *Biochemistry* 2: 1420-1428.
- Conconi, M., Petropoulos, I., Emod, I., Turlin, E., Biville, F. and Friguet, B., 1998. "Protection from oxidative inactivation of the 20S proteasome by heat-shock protein 90." *Biochem J* 333 (Pt 2): 407-415.
- Corrons, J. L. V., Casafont, L. B. and Frasnado, E. F., 2021. "Concise review: how do red blood cells born, live, and die?" *Ann Hematol* 100(10): 2425-2433.
- D'Alessandro, A., Blasi, B., D'Amici, G. M., Marrocco, C. and Zolla, L., 2013. "Red blood cell subpopulations in freshly drawn blood: application of proteomics and metabolomics to a decades-long biological issue." *Blood Transfus* 11(1): 75-87.
- D'Alessandro, A., D'Amici, G. M., Vaglio, S. and Zolla, L., 2012. "Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red blood cell concentrates: from metabolism to proteomics." *Haematologica* 97(1): 107-115.
- D'Alessandro, A., Fu, X., Kanias, T., Reisz, J. A., Culp-Hill, R., Guo, Y., Gladwin, M. T., Page, G., Kleinman, S., Lanteri, M., Stone, M., Busch, M. P., Zimring, J. C., Recipient, E. and Donor Evaluation, S., III, 2021. "Donor sex, age and ethnicity impact stored red blood cell antioxidant metabolism through mechanisms in part explained by glucose 6-phosphate dehydrogenase levels and activity." *Haematologica* 106(5): 1290-1302.
- D'Alessandro, A., Fu, X., Reisz, J. A., Kanias, T., Page, G. P., Stone, M., Kleinman, S., Zimring, J. C., Busch, M., Recipient, E. and Donor Evaluation, S., III, 2020a. "Stored RBC metabolism as a function of caffeine levels." *Transfusion* 60(6): 1197-1211.
- D'Alessandro, A., Fu, X., Reisz, J. A., Stone, M., Kleinman, S., Zimring, J. C., Busch, M., Recipient, E. and Donor Evaluation, S., III, 2020b. "Ethyl glucuronide, a marker of alcohol consumption, correlates with metabolic markers of oxidant stress but not with hemolysis in stored red blood cells from healthy blood donors." *Transfusion* 60(6): 1183-1196.
- D'Alessandro, A., Kriebardis, A. G., Rinalducci, S., Antonelou, M. H., Hansen, K. C., Papassideri, I. S. and Zolla, L., 2015. "An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies." *Transfusion* 55(1): 205-219.
- D'Alessandro, A., Nemkov, T., Yoshida, T., Bordbar, A., Palsson, B. O. and Hansen, K. C., 2017. "Citrate metabolism in red blood cells stored in additive solution-3." *Transfusion* 57(2): 325-336.
- D'Alessandro, A., Righetti, P. G. and Zolla, L., 2010. "The red blood cell proteome and interactome: an update." *J Proteome Res* 9(1): 144-163.
- D'Alessandro, A., Zimring, J. C. and Busch, M., 2019. "Chronological storage age and metabolic age of stored red blood cells: are they the same?" *Transfusion* 59(5): 1620-1623.
- D'Amici, G. M., Mirasole, C., D'Alessandro, A., Yoshida, T., Dumont, L. J. and Zolla, L., 2012. "Red blood cell storage in SAGM and AS3: a comparison through the membrane two-dimensional electrophoresis proteome." *Blood Transfus* 10 Suppl 2: s46-54.

- Dantas de Medeiros, T. M., Ortega, K. C., Mion, D., Jr., Nonoyama, K. and Barretto, O. C., 2002. "Normal erythrocyte calpain I activity on membrane proteins under near-physiological conditions in patients with essential hypertension." *Sao Paulo Med J* 120(1): 5-8.
- Dasgupta, S. K., Abdel-Monem, H., Guchhait, P., Nagata, S. and Thiagarajan, P., 2008. "Role of lactadherin in the clearance of phosphatidylserine-expressing red blood cells." *Transfusion* 48(11): 2370-2376.
- Davies, K. J., 2001. "Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome." *Biochimie* 83(3-4): 301-310.
- Davies, K. J. and Goldberg, A. L., 1987. "Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells." *J Biol Chem* 262(17): 8227-8234.
- de Back, D. Z., Kostova, E. B., van Kraaij, M., van den Berg, T. K. and van Bruggen, R., 2014. "Of macrophages and red blood cells; a complex love story." *Front Physiol* 5: 9.
- de Jong, K., Rettig, M. P., Low, P. S. and Kuypers, F. A., 2002. "Protein kinase C activation induces phosphatidylserine exposure on red blood cells." *Biochemistry* 41(41): 12562-12567.
- De Tullio, R., Franchi, A., Martines, A., Aversa, M., Pedrazzi, M., Melloni, E. and Sparatore, B., 2018. "Unexpected role of the L-domain of calpastatin during the autoproteolytic activation of human erythrocyte calpain." *Biosci Rep* 38(2).
- de Wolski, K., Fu, X., Dumont, L. J., Roback, J. D., Waterman, H., Odem-Davis, K., Howie, H. L. and Zimring, J. C., 2016. "Metabolic pathways that correlate with post-transfusion circulation of stored murine red blood cells." *Haematologica* 101(5): 578-586.
- Delobel, J., Prudent, M., Rubin, O., Crettaz, D., Tissot, J. D. and Lion, N., 2012. "Subcellular fractionation of stored red blood cells reveals a compartment-based protein carbonylation evolution." *J Proteomics* 76 Spec No.: 181-193.
- Delobel, J., Prudent, M., Tissot, J. D. and Lion, N., 2016. "Proteomics of the red blood cell carbonylome during blood banking of erythrocyte concentrates." *Proteomics Clin Appl* 10(3): 257-266.
- Delobel, J., Rubin, O., Prudent, M., Crettaz, D., Tissot, J. D. and Lion, N., 2010. "Biomarker analysis of stored blood products: emphasis on pre-analytical issues." *Int J Mol Sci* 11(11): 4601-4617.
- Deplaine, G., Safeukui, I., Jeddi, F., Lacoste, F., Brousse, V., Perrot, S., Biligui, S., Guillotte, M., Guitton, C., Dokmak, S., Aussilhou, B., Sauvanet, A., Cazals Hatem, D., Paye, F., Thellier, M., Mazier, D., Milon, G., Mohandas, N., Mercereau-Puijalon, O., David, P. H. and Buffet, P. A., 2011. "The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro." *Blood* 117(8): e88-95.
- Dern, R. J., Brewer, G. J. and Wiorkowski, J. J., 1967. "Studies on the preservation of human blood. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other in vitro measures to red cell storageability." *J Lab Clin Med* 69(6): 968-978.
- DeSimone, R. A., Hayden, J. A., Mazur, C. A., Vasovic, L. V., Sachais, B. S., Zhao, Z., Goel, R., Hsu, Y. S., Racine-Brzostek, S. E. and Cushing, M. M., 2019. "Red blood cells donated by smokers: A pilot investigation of recipient transfusion outcomes." *Transfusion* 59(8): 2537-2543.
- Dodge, J. T., Mitchell, C. and Hanahan, D. J., 1963. "The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes." *Arch Biochem Biophys* 100: 119-130.
- Dreischer, P., Duszenko, M., Stein, J. and Wieder, T., 2022. "Eryptosis: Programmed Death of Nucleus-Free, Iron-Filled Blood Cells." *Cells* 11(3).
- Dumaswala, U. J., Zhuo, L., Jacobsen, D. W., Jain, S. K. and Sukalski, K. A., 1999. "Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione." *Free Radic Biol Med* 27(9-10): 1041-1049.
- Dunham, P. B. and Gunn, R. B., 1972. "Adenosine triphosphatase and active cation transport in red blood cell membranes." *Arch Intern Med* 129(2): 241-247.
- Duplancic, D., Kukoc-Modun, L., Modun, D. and Radic, N., 2011. "Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity." *Molecules* 16(8): 7058-7068.

- Duranton, C., Huber, S. M. and Lang, F., 2002. "Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells." *J Physiol* 539(Pt 3): 847-855.
- Edgren, G., Ullum, H., Rostgaard, K., Erikstrup, C., Sartipy, U., Holzmänn, M. J., Nyren, O. and Hjalgrim, H., 2017. "Association of Donor Age and Sex With Survival of Patients Receiving Transfusions." *JAMA Intern Med* 177(6): 854-860.
- Eggleton, P., Tenner, A. J. and Reid, K. B., 2000. "C1q receptors." *Clin Exp Immunol* 120(3): 406-412.
- El-Beshlawy, A., Kaddah, N., Moustafa, A., Mouktar, G. and Youssry, I., 2007. "Screening for beta-thalassaemia carriers in Egypt: significance of the osmotic fragility test." *East Mediterr Health J* 13(4): 780-786.
- Endeward, V., Musa-Aziz, R., Cooper, G. J., Chen, L. M., Pelletier, M. F., Virkki, L. V., Supuran, C. T., King, L. S., Boron, W. F. and Gros, G., 2006. "Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane." *FASEB J* 20(12): 1974-1981.
- Eshghifar, N., Maghsudlu, M. and Amini Kafi-Abad, S., 2021. "The Effect of Pre-Storage Irradiation Blood on Quality of Red Blood Cells." *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 15(1): 1-6.
- Eylar, E. H., Madoff, M. A., Brody, O. V. and Oncley, J. L., 1962. "The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte." *J Biol Chem* 237: 1992-2000.
- Falco, C., Vaya, A., Iborra, J., Moreno, I., Palanca, S. and Aznar, J., 2003. "Erythrocyte aggregability and disaggregability in thalassemia trait carriers analyzed by a laser backscattering technique." *Clin Hemorheol Microcirc* 28(4): 245-249.
- Farley, A., Hendry, C. and McLafferty, E., 2012. "Blood components." *Nurs Stand* 27(13): 35-42.
- Ficarra, S., Tellone, E., Giardina, B., Scatena, R., Russo, A., Misiti, F., Clementi, M. E., Colucci, D., Bellocco, E., Lagana, G., Barreca, D. and Galtieri, A., 2009. "Derangement of erythrocytic AE1 in beta-thalassemia by caspase 3: pathogenic mechanisms and implications in red blood cell senescence." *J Membr Biol* 228(1): 43-49.
- Foller, M., Mahmud, H., Gu, S., Kucherenko, Y., Gehring, E. M., Shumilina, E., Floride, E., Sprengel, R. and Lang, F., 2009. "Modulation of suicidal erythrocyte cation channels by an AMPA antagonist." *J Cell Mol Med* 13(9B): 3680-3686.
- Fortier, N., Snyder, L. M., Garver, F., Kiefer, C., McKenney, J. and Mohandas, N., 1988. "The relationship between in vivo generated hemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane rigidity." *Blood* 71(5): 1427-1431.
- Francis, R. O., D'Alessandro, A., Eisenberger, A., Soffing, M., Yeh, R., Coronel, E., Sheikh, A., Rapido, F., La Carpia, F., Reisz, J. A., Gehrke, S., Nemkov, T., Thomas, T., Schwartz, J., Divgi, C., Kessler, D., Shaz, B. H., Ginzburg, Y., Zimring, J. C., Spitalnik, S. L. and Hod, E. A., 2020. "Donor glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency decreases blood quality for transfusion." *J Clin Invest* 130(5): 2270-2285.
- Franco, R. S., Puchulu-Campanella, M. E., Barber, L. A., Palascak, M. B., Joiner, C. H., Low, P. S. and Cohen, R. M., 2013. "Changes in the properties of normal human red blood cells during in vivo aging." *Am J Hematol* 88(1): 44-51.
- Fujii, J., Homma, T., Kobayashi, S., Warang, P., Madkaikar, M. and Mukherjee, M. B., 2021. "Erythrocytes as a preferential target of oxidative stress in blood." *Free Radic Res* 55(5): 562-580.
- Garcia-Herreros, A., Yeh, Y.-T., Peng, Z. and Del Alamo, J., 2021. Cyclic mechanical stresses alter erythrocyte membrane composition and microstructure and trigger macrophage phagocytosis. *bioRxiv*.
- Gero, A. M., Wood, A. M., Hogue, D. L. and Upston, J. M., 1991. "Effect of diamide on nucleoside and glucose transport in Plasmodium falciparum and Babesia bovis infected erythrocytes." *Mol Biochem Parasitol* 44(2): 195-206.
- Ghosh, S., Adisa, O. A., Chappa, P., Tan, F., Jackson, K. A., Archer, D. R. and Ofori-Aquah, S. F., 2013. "Extracellular hemin crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice." *J Clin Invest* 123(11): 4809-4820.

- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. and Cong, J., 2003. "The calpain system." *Physiol Rev* 83(3): 731-801.
- Goodman, S. R., Krebs, K. E., Whitfield, C. F., Riederer, B. M. and Zagon, I. S., 1988. "Spectrin and related molecules." *CRC Crit Rev Biochem* 23(2): 171-234.
- Goodman, S. R., Kurdia, A., Ammann, L., Kakhniashvili, D. and Daescu, O., 2007. "The human red blood cell proteome and interactome." *Exp Biol Med (Maywood)* 232(11): 1391-1408.
- Gottlieb, Y., Topaz, O., Cohen, L. A., Yakov, L. D., Haber, T., Morgenstern, A., Weiss, A., Chait Berman, K., Fibach, E. and Meyron-Holtz, E. G., 2012. "Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis in vivo but not in vitro." *Haematologica* 97(7): 994-1002.
- Grace, R. F. and Glader, B., 2018. "Red Blood Cell Enzyme Disorders." *Pediatr Clin North Am* 65(3): 579-595.
- Grubina, R., Huang, Z., Shiva, S., Joshi, M. S., Azarov, I., Basu, S., Ringwood, L. A., Jiang, A., Hogg, N., Kim-Shapiro, D. B. and Gladwin, M. T., 2007. "Concerted nitric oxide formation and release from the simultaneous reactions of nitrite with deoxy- and oxyhemoglobin." *J Biol Chem* 282(17): 12916-12927.
- Grune, T., Catalgol, B., Licht, A., Ermak, G., Pickering, A. M., Ngo, J. K. and Davies, K. J., 2011. "HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress." *Free Radic Biol Med* 51(7): 1355-1364.
- Gudi, T. and Gupta, C. M., 1993. "hsp 70-like protein in rhesus erythrocyte cytosol and its interactions with membrane skeleton under heat and pathologic stress." *J Biol Chem* 268(28): 21344-21350.
- Gunn, R. B., Silvers, D. N. and Rosse, W. F., 1972. "Potassium permeability in -thalassemia minor red blood cells." *J Clin Invest* 51(5): 1043-1050.
- Hadjesfandiari, N., Khorshidfar, M. and Devine, D. V., 2021. "Current Understanding of the Relationship between Blood Donor Variability and Blood Component Quality." *Int J Mol Sci* 22(8).
- Halliwel, B., 1988. "Albumin--an important extracellular antioxidant?" *Biochem Pharmacol* 37(4): 569-571.
- Hamasaki, N. and Yamamoto, M., 2000. "Red blood cell function and blood storage." *Vox Sang* 79(4): 191-197.
- Han, B. G., Nunomura, W., Takakuwa, Y., Mohandas, N. and Jap, B. K., 2000. "Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization." *Nat Struct Biol* 7(10): 871-875.
- Han, V., Serrano, K. and Devine, D. V., 2010. "A comparative study of common techniques used to measure haemolysis in stored red cell concentrates." *Vox Sang* 98(2): 116-123.
- Hand, H., 2001. "Blood and the classification of anaemia." *Nurs Stand* 15(39): 45-53; quiz 54-45.
- Harboe, M., 1959. "A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry." *Scand J Clin Lab Invest* 11: 66-70.
- Hatae, H., Inaka, K., Okamura, R., Furubayashi, N., Kamo, M., Kobayashi, T., Abe, Y., Iwata, S. and Hamasaki, N., 2018. "Crystallization of Human Erythrocyte Band 3, the anion exchanger, at the International Space Station "KIBO"." *Anal Biochem* 559: 91-93.
- Hazegh, K., Fang, F., Bravo, M. D., Tran, J. Q., Muench, M. O., Jackman, R. P., Roubinian, N., Bertolone, L., D'Alessandro, A., Dumont, L., Page, G. P. and Kanias, T., 2021. "Blood donor obesity is associated with changes in red blood cell metabolism and susceptibility to hemolysis in cold storage and in response to osmotic and oxidative stress." *Transfusion* 61(2): 435-448.
- Heaton, A., Keegan, T. and 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* 71(1): 131-136.
- Heaton, W. A., 1992. "Evaluation of posttransfusion recovery and survival of transfused red cells." *Transfus Med Rev* 6(3): 153-169.
- Henkelman, S., Lagerberg, J. W., Graaff, R., Rakhorst, G. and Van Oeveren, W., 2010. "The effects of cryopreservation on red blood cell rheologic properties." *Transfusion* 50(11): 2393-2401.

- Herrera, M., Hong, N. J. and Garvin, J. L., 2006. "Aquaporin-1 transports NO across cell membranes." *Hypertension* 48(1): 157-164.
- Hess, J. R., 2006. "An update on solutions for red cell storage." *Vox Sang* 91(1): 13-19.
- Hirano, R., Kondo, K., Iwamoto, T., Igarashi, O. and Itakura, H., 1997. "Effects of antioxidants on the oxidative susceptibility of low-density lipoprotein." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 43(4): 435-444.
- Hod, E. A., Zhang, N., Sokol, S. A., Wojczyk, B. S., Francis, R. O., Ansaldi, D., Francis, K. P., Della-Latta, P., Whittier, S., Sheth, S., Hendrickson, J. E., Zimring, J. C., Brittenham, G. M. and Spitalnik, S. L., 2010. "Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation." *Blood* 115(21): 4284-4292.
- Hogman, C. F., Lof, H. and Meryman, H. T., 2006. "Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate." *Transfusion* 46(9): 1543-1552.
- Holinstat, M., 2017. "Normal platelet function." *Cancer Metastasis Rev* 36(2): 195-198.
- Hornung, T. C. and Biesalski, H. K., 2019. "Glut-1 explains the evolutionary advantage of the loss of endogenous vitamin C-synthesis: The electron transfer hypothesis." *Evol Med Public Health* 2019(1): 221-231.
- Hovav, T., Yedgar, S., Manny, N. and Barshtein, G., 1999. "Alteration of red cell aggregability and shape during blood storage." *Transfusion* 39(3): 277-281.
- Hsieh, C., Prabhu, N. C. S. and Rajashekaraiah, V., 2020. "Influence of AS-7 on the storage lesion in young and old circulating erythrocytes." *Transfus Apher Sci* 59(6): 102905.
- 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* 9: 733.
- Huber, S. M., Uhlemann, A. C., Gamper, N. L., Duranton, C., Kremsner, P. G. and Lang, F., 2002. "Plasmodium falciparum activates endogenous Cl(-) channels of human erythrocytes by membrane oxidation." *EMBO J* 21(1-2): 22-30.
- Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresser, M. J. and Ramachandran, C., 1997. "Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate." *J Biol Chem* 272(2): 843-851.
- Issaian, A., Hay, A., Dzieciatkowska, M., Roberti, D., Perrotta, S., Darula, Z., Redzic, J., Busch, M. P., Page, G. P., Rogers, S. C., Doctor, A., Hansen, K. C., Eisenmesser, E. Z., Zimring, J. C. and D'Alessandro, A., 2021. "The interactome of the N-terminus of band 3 regulates red blood cell metabolism and storage quality." *Haematologica* 106(11): 2971-2985.
- Iwao, Y., Ishima, Y., Yamada, J., Noguchi, T., Kragh-Hansen, U., Mera, K., Honda, D., Suenaga, A., Maruyama, T. and Otagiri, M., 2012. "Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants." *IUBMB Life* 64(5): 450-454.
- Jain, S. K. and Lim, G., 2001. "Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na⁺ + K⁺)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes." *Free Radic Biol Med* 30(3): 232-237.
- Jank, H. and Salzer, U., 2011. "Vesicles generated during storage of red blood cells enhance the generation of radical oxygen species in activated neutrophils." *ScientificWorldJournal* 11: 173-185.
- Johansson, E. and Falk, A. B. (2021). Erythrocytes as Biomarkers of Virus and Bacteria in View of Metal Ion Homeostasis. *Erythrocyte - A Peripheral Biomarker For Infection and Inflammation*, IntechOpen.
- Joncas, F. H., Lucien, F., Rouleau, M., Morin, F., Leong, H. S., Pouliot, F., Fradet, Y., Gilbert, C. and Toren, P., 2019. "Plasma extracellular vesicles as phenotypic biomarkers in prostate cancer patients." *Prostate* 79(15): 1767-1776.
- Kahn, M. J., Maley, J. H., Lasker, G. F. and Kadowitz, P. J., 2013. "Updated role of nitric oxide in disorders of erythrocyte function." *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 13(1): 83-87.

- Kamel, N., Goubran, F., Ramsis, N. and Ahmed, A. S., 2010. "Effects of storage time and leucocyte burden of packed and buffy-coat depleted red blood cell units on red cell storage lesion." *Blood Transfus* 8(4): 260-266.
- Kand'ar, R. and Zakova, P., 2008. "Allantoin as a marker of oxidative stress in human erythrocytes." *Clin Chem Lab Med* 46(9): 1270-1274.
- Kanias, T. and Acker, J. P., 2010. "Biopreservation of red blood cells--the struggle with hemoglobin oxidation." *FEBS J* 277(2): 343-356.
- Kanias, T., Lanteri, M. C., Page, G. P., Guo, Y., Endres, S. M., Stone, M., Keating, S., Mast, A. E., Cable, R. G., Triulzi, D. J., Kiss, J. E., Murphy, E. L., Kleinman, S., Busch, M. P. and Gladwin, M. T., 2017. "Ethnicity, sex, and age are determinants of red blood cell storage and stress hemolysis: results of the REDS-III RBC-Omics study." *Blood Adv* 1(15): 1132-1141.
- Kanias, T., Stone, M., Page, G. P., Guo, Y., Endres-Dighe, S. M., Lanteri, M. C., Spencer, B. R., Cable, R. G., Triulzi, D. J., Kiss, J. E., Murphy, E. L., Kleinman, S., Gladwin, M. T., Busch, M. P., Mast, A. E. and Program, N. R. E. D. E. S.-I., 2019. "Frequent blood donations alter susceptibility of red blood cells to storage- and stress-induced hemolysis." *Transfusion* 59(1): 67-78.
- Khandros, E., Thom, C. S., D'Souza, J. and Weiss, M. J., 2012. "Integrated protein quality-control pathways regulate free alpha-globin in murine beta-thalassemia." *Blood* 119(22): 5265-5275.
- Kiefer, C. R. and Snyder, L. M., 2000. "Oxidation and erythrocyte senescence." *Curr Opin Hematol* 7(2): 113-116.
- Kittisares, K., Palasuwan, D., Nulsri, E. and Palasuwan, A., 2019. "Thalassemia trait and G6PD deficiency in Thai blood donors." *Transfus Apher Sci* 58(2): 201-206.
- Klarl, B. A., Lang, P. A., Kempe, D. S., Niemoeller, O. M., Akel, A., Sobiesiak, M., Eisele, K., Podolski, M., Huber, S. M., Wieder, T. and Lang, F., 2006. "Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion." *Am J Physiol Cell Physiol* 290(1): C244-253.
- Klei, T. R., Meinderts, S. M., van den Berg, T. K. and van Bruggen, R., 2017. "From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis." *Front Immunol* 8: 73.
- Klei, T. R. L., Dalimot, J., Nota, B., Veldthuis, M., Mul, F. P. J., Rademakers, T., Hoogenboezem, M., Nagelkerke, S. Q., van, I. W. F. J., Oole, E., Svendsen, P., Moestrup, S. K., van Alphen, F. P. J., Meijer, A. B., Kuijpers, T. W., van Zwieten, R. and van Bruggen, R., 2020a. "Hemolysis in the spleen drives erythrocyte turnover." *Blood* 136(14): 1579-1589.
- Klei, T. R. L., Dalimot, J. J., Beuger, B. M., Veldthuis, M., Ichou, F. A., Verkuijlen, P., Seignette, I. M., Ligthart, P. C., Kuijpers, T. W., van Zwieten, R. and van Bruggen, R., 2020b. "The Gardos effect drives erythrocyte senescence and leads to Lu/BCAM and CD44 adhesion molecule activation." *Blood Adv* 4(24): 6218-6229.
- Knight, R., 2013. *Transfusion and transplantation science*. Oxford, Oxford University Press.
- Knychala, M. A., Garrote-Filho, M. D. S., Batista da Silva, B., Neves de Oliveira, S., Yasminy Luz, S., Marques Rodrigues, M. O. and Penha-Silva, N., 2021. "Red cell distribution width and erythrocyte osmotic stability in type 2 diabetes mellitus." *J Cell Mol Med* 25(5): 2505-2516.
- Koch, C. G., Figueroa, P. I., Li, L., Sabik, J. F., 3rd, Mihaljevic, T. and Blackstone, E. H., 2013. "Red blood cell storage: how long is too long?" *Ann Thorac Surg* 96(5): 1894-1899.
- Komarova, E. Y., Suezov, R. V., Nikotina, A. D., Aksenov, N. D., Garaeva, L. A., Shtam, T. A., Zhakhov, A. V., Martynova, M. G., Bystrova, O. A., Istomina, M. S., Ischenko, A. M., Margulis, B. A. and Guzhova, I. V., 2021. "Hsp70-containing extracellular vesicles are capable of activating of adaptive immunity in models of mouse melanoma and colon carcinoma." *Sci Rep* 11(1): 21314.
- Konstantinidis, D. G., Pushkaran, S., Johnson, J. F., Cancelas, J. A., Manganaris, S., Harris, C. E., Williams, D. A., Zheng, Y. and Kalfa, T. A., 2012. "Signaling and cytoskeletal requirements in erythroblast enucleation." *Blood* 119(25): 6118-6127.

- Koshkaryev, A., Livshits, L., Pajic-Lijakovic, I., Gural, A., Barshtein, G. and Yedgar, S., 2020. "Non-oxidative band-3 clustering agents cause the externalization of phosphatidylserine on erythrocyte surfaces by a calcium-independent mechanism." *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1862(6): 183231.
- Kozlova, E., Sergunova, V., Sherstyukova, E., Gudkova, O., Kozlov, A., Inozemtsev, V., Lyapunova, S. and Chernysh, A., 2022. "Topological Relationships Cytoskeleton-Membrane Nanosurface-Morphology as a Basic Mechanism of Total Disorders of RBC Structures." *Int J Mol Sci* 23(4).
- Kriebardis, A. G., Antonelou, M. H., Stamoulis, K. E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L. H. and Papassideri, I. S., 2006. "Membrane protein carbonylation in non-leukodepleted CPDA-preserved red blood cells." *Blood Cells Mol Dis* 36(2): 279-282.
- Kriebardis, A. G., Antonelou, M. H., Stamoulis, K. E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L. H. and Papassideri, I. S., 2007. "Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells." *J Cell Mol Med* 11(1): 148-155.
- Kriebardis, A. G., Antonelou, M. H., Stamoulis, K. E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L. H. and Papassideri, I. S., 2008. "RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components." *Transfusion* 48(9): 1943-1953.
- Kruger, N. J. and von Schaewen, A., 2003. "The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation." *Curr Opin Plant Biol* 6(3): 236-246.
- Kuci, Z., Hins, J., Kuci, S., Renner, S., Flottmann, D. and Bruchelt, G., 2006. "Determination of glucose metabolites in stored erythrocytes and in erythrocytes from patients with thalassemia by analytical isotachopheresis." *J Biochem Biophys Methods* 69(1-2): 79-87.
- Kuhn, V., Diederich, L., Keller, T. C. S. t., Kramer, C. M., Luckstadt, W., Panknin, C., Suvorava, T., Isakson, B. E., Kelm, M. and Cortese-Krott, M. M., 2017. "Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia." *Antioxid Redox Signal* 26(13): 718-742.
- Kunzelmann-Marche, C., Freyssinet, J. M. and Martinez, M. C., 2001. "Regulation of phosphatidylserine transbilayer redistribution by store-operated Ca²⁺ entry: role of actin cytoskeleton." *J Biol Chem* 276(7): 5134-5139.
- Kupferschmid, M., Aquino-Gil, M. O., Shams-Eldin, H., Schmidt, J., Yamakawa, N., Krzewinski, F., Schwarz, R. T. and Lefebvre, T., 2017. "Identification of O-GlcNAcylated proteins in *Plasmodium falciparum*." *Malar J* 16(1): 485.
- Laemmli, U. K., 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lang, F., Abed, M., Lang, E. and Foller, M., 2014. "Oxidative stress and suicidal erythrocyte death." *Antioxid Redox Signal* 21(1): 138-153.
- Lang, K. S., Lang, P. A., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S. M. and Lang, F., 2005. "Mechanisms of suicidal erythrocyte death." *Cell Physiol Biochem* 15(5): 195-202.
- Lang, K. S., Myssina, S., Brand, V., Sandu, C., Lang, P. A., Berchtold, S., Huber, S. M., Lang, F. and Wieder, T., 2004. "Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes." *Cell Death Differ* 11(2): 231-243.
- Lang, K. S., Myssina, S., Tanneur, V., Wieder, T., Huber, S. M., Lang, F. and Duranton, C., 2003. "Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride." *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 367(4): 391-396.
- Lang, P. A., Kempe, D. S., Myssina, S., Tanneur, V., Birka, C., Laufer, S., Lang, F., Wieder, T. and Huber, S. M., 2005. "PGE₂ in the regulation of programmed erythrocyte death." *Cell Death Differ* 12(5): 415-428.
- Leal, J. K. F., Adjobo-Hermans, M. J. W. and Bosman, G., 2018. "Red Blood Cell Homeostasis: Mechanisms and Effects of Microvesicle Generation in Health and Disease." *Front Physiol* 9: 703.
- Leecharoenkiat, A., Wannatung, T., Lithanatudom, P., Svasti, S., Fucharoen, S., Chokchaichamnankit, D., Srisomsap, C. and Smith, D. R., 2011. "Increased oxidative metabolism is associated with erythroid precursor expansion in beta⁰-thalassaemia/Hb E disease." *Blood Cells Mol Dis* 47(3): 143-157.

- Leichner, T. and Kambayashi, T. (2014). White Blood Cells and Lymphoid Tissue. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier, Elsevier.
- Lew, V. L. and Tiffert, T., 2017. "On the Mechanism of Human Red Blood Cell Longevity: Roles of Calcium, the Sodium Pump, PIEZO1, and Gardos Channels." *Front Physiol* 8: 977.
- Lindberg, F. P., Gresham, H. D., Schwarz, E. and Brown, E. J., 1993. "Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in alpha v beta 3-dependent ligand binding." *J Cell Biol* 123(2): 485-496.
- Liu, C., Zhao, W., Christ, G. J., Gladwin, M. T. and Kim-Shapiro, D. B., 2013. "Nitric oxide scavenging by red cell microparticles." *Free Radic Biol Med* 65: 1164-1173.
- Livshits, L., Barshtein, G., Arbell, D., Gural, A., Levin, C. and Guizouarn, H., 2021. "Do We Store Packed Red Blood Cells under "Quasi-Diabetic" Conditions?" *Biomolecules* 11(7).
- Low, F. M., Hampton, M. B. and Winterbourn, C. C., 2008. "Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte." *Antioxid Redox Signal* 10(9): 1621-1630.
- Low, P. S., Waugh, S. M., Zinke, K. and Drenckhahn, D., 1985. "The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging." *Science* 227(4686): 531-533.
- Lutz, H. U. and Bogdanova, A., 2013. "Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans." *Front Physiol* 4: 387.
- Lutz, H. U., Flepp, R. and Stringaro-Wipf, G., 1984. "Naturally occurring autoantibodies to exoplasmic and cryptic regions of band 3 protein, the major integral membrane protein of human red blood cells." *J Immunol* 133(5): 2610-2618.
- Lux, S. E. t., 2016. "Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions." *Blood* 127(2): 187-199.
- Mamtani, M., Jawahirani, A., Das, K., Rughwani, V. and Kulkarni, H., 2006. "Bias-corrected diagnostic performance of the naked-eye single-tube red-cell osmotic fragility test (NESTROFT): an effective screening tool for beta-thalassemia." *Hematology* 11(4): 277-286.
- Mandal, D., Baudin-Creuz, V., Bhattacharyya, A., Pathak, S., Delaunay, J., Kundu, M. and Basu, J., 2003. "Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3)." *J Biol Chem* 278(52): 52551-52558.
- Mankelov, T. J., Satchwell, T. J. and Burton, N. M., 2012. "Refined views of multi-protein complexes in the erythrocyte membrane." *Blood Cells Mol Dis* 49(1): 1-10.
- Manwani, D. and Bieker, J. J., 2008. "The erythroblastic island." *Curr Top Dev Biol* 82: 23-53.
- Mathangasinghe, Y., Fauvet, B., Jane, S. M., Goloubinoff, P. and Nillegoda, N. B., 2021. "The Hsp70 chaperone system: distinct roles in erythrocyte formation and maintenance." *Haematologica* 106(6): 1519-1534.
- Matte, A., Bertoldi, M., Mohandas, N., An, X., Bugatti, A., Brunati, A. M., Rusnati, M., Tibaldi, E., Siciliano, A., Turrini, F., Perrotta, S. and De Franceschi, L., 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.
- Mattoo, R. U. H., Sharma, S. K., Priya, S., Finka, A. and Goloubinoff, P., 2013. "Hsp110 is a bona fide chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with Hsp70 to solubilize protein aggregates." *J Biol Chem* 288(29): 21399-21411.
- Mayer, M. P., 2010. "Gymnastics of molecular chaperones." *Mol Cell* 39(3): 321-331.
- McCord, J. M. and Fridovich, I., 1969. "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)." *J Biol Chem* 244(22): 6049-6055.
- McVey, M. J., Kuebler, W. M., Orbach, A., Arbell, D., Zelig, O., Barshtein, G. and Yedgar, S., 2020. "Reduced deformability of stored red blood cells is associated with generation of extracellular vesicles." *Transfus Apher Sci* 59(5): 102851.

- Melville, M. W., McClellan, A. J., Meyer, A. S., Darveau, A. and Frydman, J., 2003. "The Hsp70 and TRiC/CCT chaperone systems cooperate in vivo to assemble the von Hippel-Lindau tumor suppressor complex." *Mol Cell Biol* 23(9): 3141-3151.
- Melzak, K. A., Spouge, J. L., Boecker, C., Kirschhofer, F., Brenner-Weiss, G. and Bieback, K., 2021. "Hemolysis Pathways during Storage of Erythrocytes and Inter-Donor Variability in Erythrocyte Morphology." *Transfus Med Hemother* 48(1): 39-47.
- Menocha, S. and Muszynski, J. A., 2019. "Transfusion-related immune modulation: functional consequence of extracellular vesicles?" *Transfusion* 59(12): 3553-3555.
- Messana, I., Ferroni, L., Misiti, F., Girelli, G., Pupella, S., Castagnola, M., Zappacosta, B. and Giardina, B., 2000. "Blood bank conditions and RBCs: the progressive loss of metabolic modulation." *Transfusion* 40(3): 353-360.
- Mikdar, M., Gonzalez-Menendez, P., Cai, X., Zhang, Y., Serra, M., Dembele, A. K., Bosch, A. C., Sanquer, S., Chhuon, C., Guerrero, I. C., Sitbon, M., Hermine, O., Colin, Y., Le Van Kim, C., Kinet, S., Mohandas, N., Xia, Y., Peyrard, T., Taylor, N. and Azouzi, S., 2021. "The equilibrative nucleoside transporter ENT1 is critical for nucleotide homeostasis and optimal erythropoiesis." *Blood* 137(25): 3548-3562.
- Miroshnikova, Y. A., Manet, S., Li, X., Wickstrom, S. A., Faurobert, E. and Albiges-Rizo, C., 2021. "Calcium signaling mediates a biphasic mechanoadaptive response of endothelial cells to cyclic mechanical stretch." *Mol Biol Cell* 32(18): 1724-1736.
- Mizuno, Y., Isotani, E., Huang, J., Ding, H., Stull, J. T. and Kamm, K. E., 2008. "Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo." *Am J Physiol Cell Physiol* 295(2): C358-364.
- Mohandas, N. and Gallagher, P. G., 2008. "Red cell membrane: past, present, and future." *Blood* 112(10): 3939-3948.
- Mohanty, J. G., Nagababu, E. and Rifkind, J. M., 2014. "Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging." *Front Physiol* 5: 84.
- Moncada, S. and Higgs, A., 1993. "The L-arginine-nitric oxide pathway." *N Engl J Med* 329(27): 2002-2012.
- Monni, G., Murgia, F., Corda, V., Peddes, C., Iuculano, A., Tronci, L., Balsamo, A. and Atzori, L., 2019. "Metabolomic Investigation of beta-Thalassemia in Chorionic Villi Samples." *J Clin Med* 8(6).
- Morris, C. R., Kato, G. J., Poljakovic, M., Wang, X., Blackwelder, W. C., Sachdev, V., Hazen, S. L., Vichinsky, E. P., Morris, S. M., Jr. and Gladwin, M. T., 2005. "Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease." *JAMA* 294(1): 81-90.
- Morris, C. R., Kim, H. Y., Klings, E. S., Wood, J., Porter, J. B., Trachtenberg, F., Sweeters, N., Olivieri, N. F., Kwiatkowski, J. L., Virzi, L., Hassell, K., Taher, A., Neufeld, E. J., Thompson, A. A., Larkin, S., Suh, J. H., Vichinsky, E. P., Kuypers, F. A. and Thalassaemia Clinical Research, N., 2015. "Dysregulated arginine metabolism and cardiopulmonary dysfunction in patients with thalassaemia." *Br J Haematol* 169(6): 887-898.
- Mosser, D. M. and Zhang, X., 2011. "Measuring opsonic phagocytosis via Fcγ receptors and complement receptors on macrophages." *Curr Protoc Immunol Chapter 14: Unit 14 27*.
- Musharraf, S. G., Iqbal, A., Ansari, S. H., Parveen, S., Khan, I. A. and Siddiqui, A. J., 2017. "beta-Thalassemia Patients Revealed a Significant Change of Untargeted Metabolites in Comparison to Healthy Individuals." *Sci Rep* 7: 42249.
- Nakao, K., Wada, T., Kamiyama, T., Nakao, M. and Nagano, K., 1962. "A direct relationship between adenosine triphosphate-level and in vivo viability of erythrocytes." *Nature* 194: 877-878.
- Namvar, A., Blanch, A. J., Dixon, M. W., Carmo, O. M. S., Liu, B., Tiash, S., Looker, O., Andrew, D., Chan, L. J., Tham, W. H., Lee, P. V. S., Rajagopal, V. and Tilley, L., 2021. "Surface area-to-volume ratio, not cellular viscoelasticity, is the major determinant of red blood cell traversal through small channels." *Cell Microbiol* 23(1): e13270.

- Neef, D. W., Jaeger, A. M., Gomez-Pastor, R., Willmund, F., Frydman, J. and Thiele, D. J., 2014. "A direct regulatory interaction between chaperonin TRiC and stress-responsive transcription factor HSF1." *Cell Rep* 9(3): 955-966.
- Neef, D. W., Turski, M. L. and Thiele, D. J., 2010. "Modulation of heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target for small molecule intervention in neurodegenerative disease." *PLoS Biol* 8(1): e1000291.
- Neelam, S., Kakhniashvili, D. G., Wilkens, S., Levene, S. D. and Goodman, S. R., 2011. "Functional 20S proteasomes in mature human red blood cells." *Exp Biol Med (Maywood)* 236(5): 580-591.
- Nemkov, T., Hansen, K. C. and D'Alessandro, A., 2017. "A three-minute method for high-throughput quantitative metabolomics and quantitative tracing experiments of central carbon and nitrogen pathways." *Rapid Commun Mass Spectrom* 31(8): 663-673.
- Nemkov, T., Hansen, K. C., Dumont, L. J. and D'Alessandro, A., 2016. "Metabolomics in transfusion medicine." *Transfusion* 56(4): 980-993.
- Nemkov, T., Reisz, J. A., Gehrke, S., Hansen, K. C. and D'Alessandro, A., 2019. "High-Throughput Metabolomics: Isocratic and Gradient Mass Spectrometry-Based Methods." *Methods Mol Biol* 1978: 13-26.
- Nemkov, T., Stefanoni, D., Bordbar, A., Issaian, A., Palsson, B. O., Dumont, L. J., Hay, A., Song, A., Xia, Y., Redzic, J. S., Eisenmesser, E. Z., Zimring, J. C., Kleinman, S., Hansen, K. C., Busch, M. P., D'Alessandro, A., Recipient, E. and Donor Evaluation Study, I. I. R. B. C.-O. S., 2021. "Blood donor exposome and impact of common drugs on red blood cell metabolism." *JCI Insight* 6(3).
- Nemkov, T., Sun, K., Reisz, J. A., Song, A., Yoshida, T., Dunham, A., Wither, M. J., Francis, R. O., Roach, R. C., Dzieciatkowska, M., Rogers, S. C., Doctor, A., Kriebardis, A., Antonelou, M., Papassideri, I., Young, C. T., Thomas, T. A., Hansen, K. C., Spitalnik, S. L., Xia, Y., Zimring, J. C., Hod, E. A. and D'Alessandro, A., 2018. "Hypoxia modulates the purine salvage pathway and decreases red blood cell and supernatant levels of hypoxanthine during refrigerated storage." *Haematologica* 103(2): 361-372.
- Nillegoda, N. B., Kirstein, J., Szlachcic, A., Berynsky, M., Stank, A., Stengel, F., Arnsburg, K., Gao, X., Scior, A., Aebersold, R., Guilbride, D. L., Wade, R. C., Morimoto, R. I., Mayer, M. P. and Bukau, B., 2015. "Crucial HSP70 co-chaperone complex unlocks metazoan protein disaggregation." *Nature* 524(7564): 247-251.
- Nillegoda, N. B., Wentink, A. S. and Bukau, B., 2018. "Protein Disaggregation in Multicellular Organisms." *Trends Biochem Sci* 43(4): 285-300.
- Noulsri, E., Lerdwana, S., Palasuwan, D. and Palasuwan, A., 2021. "Cell-Derived Microparticles in Blood Products from Blood Donors Deficient in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase." *Lab Med* 52(6): 528-535.
- Oldenborg, P. A., Zheleznyak, A., Fang, Y. F., Lagenaur, C. F., Gresham, H. D. and Lindberg, F. P., 2000. "Role of CD47 as a marker of self on red blood cells." *Science* 288(5473): 2051-2054.
- Olivieri, N. F., 1999. "The beta-thalassemias." *N Engl J Med* 341(2): 99-109.
- Olivieri, O., De Franceschi, L., Capellini, M. D., Girelli, D., Corrocher, R. and Brugnara, C., 1994. "Oxidative damage and erythrocyte membrane transport abnormalities in thalassemias." *Blood* 84(1): 315-320.
- Orbach, A., Zelig, O., Yedgar, S. and Barshtein, G., 2017. "Biophysical and Biochemical Markers of Red Blood Cell Fragility." *Transfus Med Hemother* 44(3): 183-187.
- Orrico, F., Lopez, A. C., Saliwonczyk, D., Acosta, C., Rodriguez-Grecco, I., Mouro-Chanteloup, I., Ostuni, M. A., Denicola, A., Thomson, L. and Moller, M. N., 2022. "The permeability of human red blood cell membranes to hydrogen peroxide is independent of aquaporins." *J Biol Chem* 298(1): 101503.
- Osei-Hwedie, D. O., Kanias, T., Croix, C. S., Jessup, M., Xiong, Z., Sinchar, D., Franks, J., Xu, Q., E, M. N., Sertorio, J. T., Potoka, K., Binder, R. J., Basu, S., Belanger, A. M., Kim-Shapiro, D. B., Triulzi, D., Lee,

- J. S. and Gladwin, M. T., 2016. "Sickle Cell Trait Increases Red Blood Cell Storage Hemolysis and Post-Transfusion Clearance in Mice." *EBioMedicine* 11: 239-248.
- Pacifici, R. E., Kono, Y. and Davies, K. J., 1993. "Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome." *J Biol Chem* 268(21): 15405-15411.
- Page, G. P., Kanias, T., Guo, Y. J., Lanteri, M. C., Zhang, X., Mast, A. E., Cable, R. G., Spencer, B. R., Kiss, J. E., Fang, F., Endres-Dighe, S. M., Brambilla, D., Nouraie, M., Gordeuk, V. R., Kleinman, S., Busch, M. P., Gladwin, M. T., National Heart, L. and Blood Institute Recipient Epidemiology Donor Evaluation Study, I. I. I. p., 2021. "Multiple-ancestry genome-wide association study identifies 27 loci associated with measures of hemolysis following blood storage." *J Clin Invest* 131(13).
- Paglia, G., D'Alessandro, A., Rolfsson, O., Sigurjonsson, O. E., Bordbar, A., Palsson, S., Nemkov, T., Hansen, K. C., Gudmundsson, S. and Palsson, B. O., 2016. "Biomarkers defining the metabolic age of red blood cells during cold storage." *Blood* 128(13): e43-50.
- Pandya, C. D., Lee, B., Toque, H. A., Mendhe, B., Bragg, R. T., Pandya, B., Atawia, R. T., Isales, C., Hamrick, M., Caldwell, R. W. and Fulzele, S., 2019. "Age-Dependent Oxidative Stress Elevates Arginase 1 and Uncoupled Nitric Oxide Synthesis in Skeletal Muscle of Aged Mice." *Oxid Med Cell Longev* 2019: 1704650.
- Pantaleo, A., De Franceschi, L., Ferru, E., Vono, R. and Turrini, F., 2010. "Current knowledge about the functional roles of phosphorylative changes of membrane proteins in normal and diseased red cells." *J Proteomics* 73(3): 445-455.
- Pantaleo, A., Giribaldi, G., Mannu, F., Arese, P. and Turrini, F., 2008. "Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions." *Autoimmun Rev* 7(6): 457-462.
- Papadopoulos, C., Tentes, I. and Anagnostopoulos, K., 2021. "Erythrocytes Contribute to the Immunometabolic Cross-Talk." *Immunometabolism* 3(2).
- Pasetto, L., Callegaro, S., Corbelli, A., Fiordaliso, F., Ferrara, D., Brunelli, L., Sestito, G., Pastorelli, R., Bianchi, E., Cretich, M., Chiari, M., Potrich, C., Moglia, C., Corbo, M., Soraru, G., Lunetta, C., Calvo, A., Chio, A., Mora, G., Pennuto, M., Quattrone, A., Rinaldi, F., D'Agostino, V. G., Basso, M. and Bonetto, V., 2021. "Decoding distinctive features of plasma extracellular vesicles in amyotrophic lateral sclerosis." *Mol Neurodegener* 16(1): 52.
- Pastore, A., Piemonte, F., Locatelli, M., Lo Russo, A., Gaeta, L. M., Tozzi, G. and Federici, G., 2001. "Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects." *Clin Chem* 47(8): 1467-1469.
- Picart, C., Dalhaimer, P. and Discher, D. E., 2000. "Actin protofilament orientation in deformation of the erythrocyte membrane skeleton." *Biophys J* 79(6): 2987-3000.
- Pomorski, T. G. and Menon, A. K., 2016. "Lipid somersaults: Uncovering the mechanisms of protein-mediated lipid flipping." *Prog Lipid Res* 64: 69-84.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V. and Casini, A. F., 2003. "The changing faces of glutathione, a cellular protagonist." *Biochem Pharmacol* 66(8): 1499-1503.
- Poon, S., Easterbrook-Smith, S. B., Rybchyn, M. S., Carver, J. A. and Wilson, M. R., 2000. "Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state." *Biochemistry* 39(51): 15953-15960.
- Preuss, J., Jortzik, E. and Becker, K., 2012. "Glucose-6-phosphate metabolism in *Plasmodium falciparum*." *IUBMB Life* 64(7): 603-611.
- Qadri, S. M., Bissinger, R., Solh, Z. and Oldenborg, P. A., 2017. "Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes." *Blood Rev* 31(6): 349-361.

- Quashie, N. B., Ranford-Cartwright, L. C. and de Koning, H. P., 2010. "Uptake of purines in Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes is mostly mediated by the human equilibrative nucleoside transporter and the human facilitative nucleobase transporter." *Malar J* 9: 36.
- Ramot, Y., Koshkaryev, A., Goldfarb, A., Yedgar, S. and Barshtein, G., 2008. "Phenylhydrazine as a partial model for beta-thalassaemia red blood cell hemodynamic properties." *Br J Haematol* 140(6): 692-700.
- Rampelt, H., Kirstein-Miles, J., Nillegoda, N. B., Chi, K., Scholz, S. R., Morimoto, R. I. and Bukau, B., 2012. "Metazoan Hsp70 machines use Hsp110 to power protein disaggregation." *EMBO J* 31(21): 4221-4235.
- Rao, S., Balint, S., Cossins, B., Guallar, V. and Petrov, D., 2009. "Raman study of mechanically induced oxygenation state transition of red blood cells using optical tweezers." *Biophys J* 96(1): 209-216.
- Rapoport, S. and Luebering, J., 1950. "The formation of 2,3-diphosphoglycerate in rabbit erythrocytes: the existence of a diphosphoglycerate mutase." *J Biol Chem* 183(2): 507-516.
- Raposo, G. and Stoorvogel, W., 2013. "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends." *J Cell Biol* 200(4): 373-383.
- Raval, J. S., Waters, J. H., Seltsam, A., Scharberg, E. A., Richter, E., Daly, A. R., Kameneva, M. V. and Yazer, M. H., 2010. "The use of the mechanical fragility test in evaluating sublethal RBC injury during storage." *Vox Sang* 99(4): 325-331.
- Raynes, R., Pomatto, L. C. and Davies, K. J., 2016. "Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways." *Mol Aspects Med* 50: 41-55.
- Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K. J. and Grune, T., 1998. "Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress." *Biochem J* 335 (Pt 3): 637-642.
- Reinheckel, T., Ullrich, O., Sitte, N. and Grune, T., 2000. "Differential impairment of 20S and 26S proteasome activities in human hematopoietic K562 cells during oxidative stress." *Arch Biochem Biophys* 377(1): 65-68.
- Reisz, J. A., Chessler, K. M., Dzieciatkowska, M., D'Alessandro, A. and Hansen, K. C., 2017. "Blood and Plasma Proteomics: Targeted Quantitation and Posttranslational Redox Modifications." *Methods Mol Biol* 1619: 353-371.
- Reisz, J. A., Wither, M. J., Dzieciatkowska, M., Nemkov, T., Issaian, A., Yoshida, T., Dunham, A. J., Hill, R. C., Hansen, K. C. and D'Alessandro, A., 2016. "Oxidative modifications of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase regulate metabolic reprogramming of stored red blood cells." *Blood* 128(12): e32-42.
- Reithmeier, R. A., Casey, J. R., Kalli, A. C., Sansom, M. S., Alguel, Y. and Iwata, S., 2016. "Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context." *Biochim Biophys Acta* 1858(7 Pt A): 1507-1532.
- Rettig, M. P., Low, P. S., Gimm, J. A., Mohandas, N., Wang, J. and Christian, J. A., 1999. "Evaluation of biochemical changes during in vivo erythrocyte senescence in the dog." *Blood* 93(1): 376-384.
- Reynolds, J., Follette, J. H. and Valentine, W. N., 1957. "The arginase activity of erythrocytes and leukocytes with particular reference to pernicious anemia and thalassemia major." *J Lab Clin Med* 50(1): 78-92.
- Rifkind, J. M. and Nagababu, E., 2013. "Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging." *Antioxid Redox Signal* 18(17): 2274-2283.
- Rinalducci, S., Ferru, E., Blasi, B., Turrini, F. and Zolla, L., 2012. "Oxidative stress and caspase-mediated fragmentation of cytoplasmic domain of erythrocyte band 3 during blood storage." *Blood Transfus* 10 Suppl 2: s55-62.
- Rinalducci, S., Marrocco, C. and Zolla, L., 2015. "Thiol-based regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in blood bank-stored red blood cells: a strategy to counteract oxidative stress." *Transfusion* 55(3): 499-506.

- Risinger, M. and Kalfa, T. A., 2020. "Red cell membrane disorders: structure meets function." *Blood* 136(11): 1250-1261.
- Rogers, S. C., Ge, X., Brummet, M., Lin, X., Timm, D. D., d'Avignon, A., Garbow, J. R., Kao, J., Prakash, J., Issaian, A., Eisenmesser, E. Z., Reisz, J. A., D'Alessandro, A. and Doctor, A., 2021. "Quantifying dynamic range in red blood cell energetics: Evidence of progressive energy failure during storage." *Transfusion* 61(5): 1586-1599.
- Rosline, H., Ahmed, S. A., Al-Joudi, F. S., Rapiaah, M., Naing, N. N. and Adam, N. A., 2006. "Thalassemia among blood donors at the Hospital Universiti Sains Malaysia." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37(3): 549-552.
- Roubinian, N. H., Reese, S. E., Qiao, H., Plimier, C., Fang, F., Page, G. P., Cable, R. G., Custer, B., Gladwin, M. T., Goel, R., Harris, B., Hendrickson, J. E., Kanias, T., Kleinman, S., Mast, A. E., Sloan, S. R., Spencer, B. R., Spitalnik, S. L., Busch, M. P., Hod, E. A., National Heart, L., Blood Institute Recipient, E. and Donor Evaluation Study, I. V. P., 2022. "Donor genetic and nongenetic factors affecting red blood cell transfusion effectiveness." *JCI Insight* 7(1).
- Rousseau, A. and Bertolotti, A., 2018. "Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(11): 697-712.
- Roussel, C., Morel, A., Dussiot, M., Marin, M., Colard, M., Fricot-Monsinjon, A., Martinez, A., Chambrion, C., Henry, B., Casimir, M., Volle, G., Depond, M., Dokmak, S., Paye, F., Sauvanet, A., Le Van Kim, C., Colin, Y., Georgeault, S., Roingeard, P., Spitalnik, S. L., Ndour, P. A., Hermine, O., Hod, E. A., Buffet, P. A. and Amireault, P., 2021. "Rapid clearance of storage-induced microerythrocytes alters transfusion recovery." *Blood* 137(17): 2285-2298.
- Rozga, J., Piatek, T. and Malkowski, P., 2013. "Human albumin: old, new, and emerging applications." *Ann Transplant* 18: 205-217.
- Rushton, D. H., Dover, R., Sainsbury, A. W., Norris, M. J., Gilkes, J. J. and Ramsay, I. D., 2001. "Why should women have lower reference limits for haemoglobin and ferritin concentrations than men?" *BMJ* 322(7298): 1355-1357.
- Sae-Lee, W., McCafferty, C. L., Verbeke, E. J., Havugimana, P. C., Papoulas, O., McWhite, C. D., Houser, J. R., Vanuytsel, K., Murphy, G. J., Drew, K., Emili, A., Taylor, D. W. and Marcotte, E. M., 2022. The protein organization of a red blood cell. *bioRxiv*.
- Safeukui, I., Buffet, P. A., Deplaine, G., Perrot, S., Brousse, V., Ndour, A., Nguyen, M., Mercereau-Puijalon, O., David, P. H., Milon, G. and Mohandas, N., 2012. "Quantitative assessment of sensing and sequestration of spherocytic erythrocytes by the human spleen." *Blood* 120(2): 424-430.
- Sagiv, E., Fasano, R. M., Luban, N. L. C., Josephson, C. D., Stowell, S. R., Roback, J. D., Francis, R. O. and Yee, M. E. M., 2018. "Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficient red blood cell units are associated with decreased posttransfusion red blood cell survival in children with sickle cell disease." *Am J Hematol* 93(5): 630-634.
- Sahu, I. and Glickman, M. H., 2021. "Structural Insights into Substrate Recognition and Processing by the 20S Proteasome." *Biomolecules* 11(2).
- Sahu, I., Mali, S. M., Sulkshane, P., Xu, C., Rozenberg, A., Morag, R., Sahoo, M. P., Singh, S. K., Ding, Z., Wang, Y., Day, S., Cong, Y., Kleifeld, O., Brik, A. and Glickman, M. H., 2021. "The 20S as a stand-alone proteasome in cells can degrade the ubiquitin tag." *Nat Commun* 12(1): 6173.
- Salo, D. C., Pacifici, R. E., Lin, S. W., Giulivi, C. and Davies, K. J., 1990. "Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation." *J Biol Chem* 265(20): 11919-11927.
- Salomao, M., Zhang, X., Yang, Y., Lee, S., Hartwig, J. H., Chasis, J. A., Mohandas, N. and An, X., 2008. "Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(23): 8026-8031.

- Sanghani, S. P. and Haldankar, V. A., 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* 21(2): 28-33.
- Satapathy, S. and Wilson, M. R., 2021. "The Dual Roles of Clusterin in Extracellular and Intracellular Proteostasis." *Trends Biochem Sci* 46(8): 652-660.
- Schrier, S. L. and Mohandas, N., 1992. "Globin-chain specificity of oxidation-induced changes in red blood cell membrane properties." *Blood* 79(6): 1586-1592.
- Schrier, S. L., Rachmilewitz, E. and Mohandas, N., 1989. "Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemic erythrocytes are different: implication for differences in clinical manifestations." *Blood* 74(6): 2194-2202.
- Selek, S., Aslan, M., Horoz, M., Gur, M. and Erel, O., 2007. "Oxidative status and serum PON1 activity in beta-thalassemia minor." *Clin Biochem* 40(5-6): 287-291.
- Sens, P. and Gov, N., 2007. "Force balance and membrane shedding at the red-blood-cell surface." *Phys Rev Lett* 98(1): 018102.
- Setty, B. N., Kulkarni, S. and Stuart, M. J., 2002. "Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion." *Blood* 99(5): 1564-1571.
- Sevanian, A., Davies, K. J. and Hochstein, P., 1991. "Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid." *Am J Clin Nutr* 54(6 Suppl): 1129S-1134S.
- Sherstyukova, E., Chernysh, A., Moroz, V., Kozlova, E., Sergunova, V. and Gudkova, O., 2021. "The relationship of membrane stiffness, cytoskeleton structure and storage time of pRBCs." *Vox Sang* 116(4): 405-415.
- Smith, A. S., Nowak, R. B., Zhou, S., Giannetto, M., Gokhin, D. S., Papoin, J., Ghiran, I. C., Blanc, L., Wan, J. and Fowler, V. M., 2018. "Myosin IIA interacts with the spectrin-actin membrane skeleton to control red blood cell membrane curvature and deformability." *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(19): E4377-E4385.
- Smith, L. J., Kahraman, A. and Thornton, J. M., 2010. "Heme proteins--diversity in structural characteristics, function, and folding." *Proteins* 78(10): 2349-2368.
- Song, A., Zhang, Y., Ning, C., Grenz, A., Etlzschig, H., Kellems, R., Juneja, H. and Xia, Y., 2012. Reduced Erythrocyte Equilibrative Nucleoside Transporter Expression Underlies Increased Circulating Adenosine Levels and Contributes to Pathophysiology of Sickle Cell Disease. 54th ASH Annual Meeting, Atlanta, Georgia, Blood.
- Sorimachi, H. and Suzuki, K., 2001. "The structure of calpain." *J Biochem* 129(5): 653-664.
- Sparrow, R. L., Payne, K. A. and Adams, G. G., 2021. "Higher donor body mass index is associated with increased hemolysis of red blood cells at 42-days of storage: A retrospective analysis of routine quality control data." *Transfusion* 61(2): 449-463.
- Spillman, N. J., Beck, J. R., Ganesan, S. M., Niles, J. C. and Goldberg, D. E., 2017. "The chaperonin TRiC forms an oligomeric complex in the malaria parasite cytosol." *Cell Microbiol* 19(6).
- Stefanoni, D., Fu, X., Reisz, J. A., Kanas, T., Nemkov, T., Page, G. P., Dumont, L., Roubinian, N., Stone, M., Kleinman, S., Busch, M., Zimring, J. C., D'Alessandro, A., Recipient, E. and Donor Evaluation, S., III, 2020. "Nicotine exposure increases markers of oxidant stress in stored red blood cells from healthy donor volunteers." *Transfusion* 60(6): 1160-1174.
- Stefanovic, M., Puchulu-Campanella, E., Kodippili, G. and Low, P. S., 2013. "Oxygen regulates the band 3-ankyrin bridge in the human erythrocyte membrane." *Biochem J* 449(1): 143-150.
- Stolwijk, J. M., Stefely, J. A., Veling, M. T., van 't Erve, T. J., Wagner, B. A., Raife, T. J. and Buettner, G. R., 2021. "Red blood cells contain enzymatically active GPx4 whose abundance anticorrelates with hemolysis during blood bank storage." *Redox Biol* 46: 102073.
- Strader, M. B., Jana, S., Meng, F., Heaven, M. R., Shet, A. S., Thein, S. L. and Alayash, A. I., 2020. "Post-translational modification as a response to cellular stress induced by hemoglobin oxidation in sickle cell disease." *Sci Rep* 10(1): 14218.

- Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S. and Fryer, A. A., 2001. "Glutathione-S-transferase family of enzymes." *Mutat Res* 482(1-2): 21-26.
- Straub, A. C., Butcher, J. T., Billaud, M., Mutchler, S. M., Artamonov, M. V., Nguyen, A. T., Johnson, T., Best, A. K., Miller, M. P., Palmer, L. A., Columbus, L., Somlyo, A. V., Le, T. H. and Isakson, B. E., 2014. "Hemoglobin alpha/eNOS coupling at myoendothelial junctions is required for nitric oxide scavenging during vasoconstriction." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(12): 2594-2600.
- Sun, K., D'Alessandro, A. and Xia, Y., 2017. "Purinergic control of red blood cell metabolism: novel strategies to improve red cell storage quality." *Blood Transfus* 15(6): 535-542.
- Sundh, A., Kaur, P., Palta, A. and Kaur, G., 2020. "Utility of screening tools to differentiate beta thalassemia trait and iron-deficiency anemia - do they serve a purpose in blood donors?" *Blood Res* 55(3): 169-174.
- Svetina, S., Svelc Kebe, T. and Bozic, B., 2019. "A Model of Piezo1-Based Regulation of Red Blood Cell Volume." *Biophys J* 116(1): 151-164.
- Szczesny-Malysiak, E., Mohaissen, T., Bulat, K., Kaczmarska, M., Wajda, A. and Marzec, K. M., 2021. "Sex-dependent membranopathy in stored human red blood cells." *Haematologica* 106(10): 2779-2782.
- Tam, S., Geller, R., Spiess, C. and Frydman, J., 2006. "The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions." *Nat Cell Biol* 8(10): 1155-1162.
- Tavazzi, B., Amorini, A. M., Fazzina, G., Di Pierro, D., Tuttobene, M., Giardina, B. and Lazzarino, G., 2001. "Oxidative stress induces impairment of human erythrocyte energy metabolism through the oxygen radical-mediated direct activation of AMP-deaminase." *J Biol Chem* 276(51): 48083-48092.
- Teran, M. M., Monaco, M. E., Lazarte, S. S., Haro, C., Ledesma Achem, E., Asensio, N. A. and Isse, B. A., 2020. "Genetic Regulation of Redox Balance in beta-Thalassemia Trait." *Hemoglobin* 44(2): 122-127.
- Thein, S. L., 2013. "The molecular basis of beta-thalassemia." *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(5): a011700.
- Thiagarajan, P., Parker, C. J. and Prchal, J. T., 2021. "How Do Red Blood Cells Die?" *Front Physiol* 12: 655393.
- Ting, Y. L., Naccarato, S., Qualtieri, A., Chidichimo, G. and Brancati, C., 1994. "In vivo metabolic studies of glucose, ATP and 2,3-DPG in beta-thalassaemia intermedia, heterozygous beta-thalassaemic and normal erythrocytes: ¹³C and ³¹P MRS studies." *Br J Haematol* 88(3): 547-554.
- Tissot, J. D., Bardyn, M., Sonogo, G., Abonnenc, M. and Prudent, M., 2017. "The storage lesions: From past to future." *Transfus Clin Biol* 24(3): 277-284.
- Tokarska-Schlattner, M., Epand, R. F., Meiler, F., Zandomenighi, G., Neumann, D., Widmer, H. R., Meier, B. H., Epand, R. M., Saks, V., Wallimann, T. and Schlattner, U., 2012. "Phosphocreatine interacts with phospholipids, affects membrane properties and exerts membrane-protective effects." *PLoS One* 7(8): e43178.
- Trejo-Soto, C., Lázaro, G. R., Pagonabarraga, I. and Hernández-Machado, A., 2022. "Microfluidics Approach to the Mechanical Properties of Red Blood Cell Membrane and Their Effect on Blood Rheology." *Membranes* 12(217).
- Tyurina, Y. Y., Shvedova, A. A., Kawai, K., Tyurin, V. A., Kommineni, C., Quinn, P. J., Schor, N. F., Fabisiak, J. P. and Kagan, V. E., 2000. "Phospholipid signaling in apoptosis: peroxidation and externalization of phosphatidylserine." *Toxicology* 148(2-3): 93-101.
- Tzounakas, V. L., Anastasiadi, A. T., Drossos, P. V., Karadimas, D. G., Valsami, S. E., Stamoulis, K. E., Papassideri, I. S., Politou, M., Antonelou, M. H. and Kriebardis, A. G., 2021a. "Sex-related aspects of the red blood cell storage lesion." *Blood Transfus* 19(3): 224-236.
- Tzounakas, V. L., Anastasiadi, A. T., Karadimas, D. G., Zeqo, R. A., Georgatzakou, H. T., Pappa, O. D., Papatzitze, O. A., Stamoulis, K. E., Papassideri, I. S., Antonelou, M. H. and Kriebardis, A. G., 2017.

- "Temperature-dependent haemolytic propensity of CPDA-1 stored red blood cells vs whole blood - Red cell fragility as donor signature on blood units." *Blood Transfus* 15(5): 447-455.
- Tzounakas, V. L., Anastasiadi, A. T., Lekka, M. E., Papageorgiou, E. G., Stamoulis, K., Papassideri, I. S., Kriebardis, A. G. and Antonelou, M. H., 2022a. "Deciphering the Relationship Between Free and Vesicular Hemoglobin in Stored Red Blood Cell Units." *Front Physiol* 13: 840995.
- Tzounakas, V. L., Anastasiadi, A. T., Valsami, S. I., Stamoulis, K. E., Papageorgiou, E. G., Politou, M., Papassideri, I. S., Kriebardis, A. G. and Antonelou, M. H., 2021b. "Osmotic hemolysis is a donor-specific feature of red blood cells under various storage conditions and genetic backgrounds." *Transfusion* 61(9): 2538-2544.
- Tzounakas, V. L., Dzieciatkowska, M., Anastasiadi, A. T., Karadimas, D. G., Vergaki, A., Siourounis, P., Stamoulis, K., Papassideri, I. S., Kriebardis, A. G., D'Alessandro, A. and Antonelou, M. H., 2022b. "Red cell proteasome modulation by storage, redox metabolism and transfusion." *Blood Transfus* 20(1): 27-39.
- Tzounakas, V. L., Karadimas, D. G., Anastasiadi, A. T., Georgatzakou, H. T., Kazepidou, E., Moschovas, D., Velentzas, A. D., Kriebardis, A. G., Zafeiropoulos, N. E., Avgeropoulos, A., Lekka, M., Stamoulis, K. E., Papassideri, I. S. and Antonelou, M. H., 2018. "Donor-specific individuality of red blood cell performance during storage is partly a function of serum uric acid levels." *Transfusion* 58(1): 34-40.
- Tzounakas, V. L., Kriebardis, A. G., Georgatzakou, H. T., Foudoulaki-Papapizos, L. E., Dzieciatkowska, M., Wither, M. J., Nemkov, T., Hansen, K. C., Papassideri, I. S., D'Alessandro, A. and Antonelou, M. H., 2016a. "Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient subjects may be better "storers" than donors of red blood cells." *Free Radic Biol Med* 96: 152-165.
- Tzounakas, V. L., Kriebardis, A. G., Papassideri, I. S. and Antonelou, M. H., 2016b. "Donor-variation effect on red blood cell storage lesion: A close relationship emerges." *Proteomics Clin Appl* 10(8): 791-804.
- Van 't Erve, T. J., Wagner, B. A., Martin, S. M., Knudson, C. M., Blendowski, R., Keaton, M., Holt, T., Hess, J. R., Buettner, G. R., Ryckman, K. K., Darbro, B. W., Murray, J. C. and Raife, T. J., 2015. "The heritability of hemolysis in stored human red blood cells." *Transfusion* 55(6): 1178-1185.
- van den Akker, E., Satchwell, T. J., Williamson, R. C. and Toye, A. M., 2010. "Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men." *Blood Cells Mol Dis* 45(1): 1-8.
- Van Kim, C. L., Colin, Y. and Cartron, J. P., 2006. "Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane." *Blood Rev* 20(2): 93-110.
- van Niel, G., D'Angelo, G. and Raposo, G., 2018. "Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles." *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(4): 213-228.
- van Wijk, R. and van Solinge, W. W., 2005. "The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis." *Blood* 106(13): 4034-4042.
- van Zwieten, R., Verhoeven, A. J. and Roos, D., 2014. "Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells." *Free Radic Biol Med* 67: 377-386.
- Vaya, A., Iborra, J., Falco, C., Moreno, I., Bolufer, P., Ferrando, F., Perez, M. L. and Justo, A., 2003. "Rheological behaviour of red blood cells in beta and deltabeta thalassemia trait." *Clin Hemorheol Microcirc* 28(2): 71-78.
- von Lindern, M., Egee, S., Bianchi, P. and Kaestner, L., 2022. "The Function of Ion Channels and Membrane Potential in Red Blood Cells: Toward a Systematic Analysis of the Erythroid Channelome." *Front Physiol* 13: 824478.
- Wallas, C. H., 1979. "Sodium and potassium changes in blood bank stored human erythrocytes." *Transfusion* 19(2): 210-215.
- Wei, Q. and Xia, Y., 2006. "Proteasome inhibition down-regulates endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and function." *J Biol Chem* 281(31): 21652-21659.

- Weinreb, G. E., Mukhopadhyay, K., Majumder, R. and Lentz, B. R., 2003. "Cooperative roles of factor V(a) and phosphatidylserine-containing membranes as cofactors in prothrombin activation." *J Biol Chem* 278(8): 5679-5684.
- Wesseling, M. C., Wagner-Britz, L., Huppert, H., Hanf, B., Hertz, L., Nguyen, D. B. and Bernhardt, I., 2016. "Phosphatidylserine Exposure in Human Red Blood Cells Depending on Cell Age." *Cell Physiol Biochem* 38(4): 1376-1390.
- West, D., Pinard, M. A., Tu, C., Silverman, D. N. and McKenna, R., 2014. "Human carbonic anhydrase II-cyanate inhibitor complex: putting the debate to rest." *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 70(Pt 10): 1324-1327.
- Wieschhaus, A., Khan, A., Zaidi, A., Rogalin, H., Hanada, T., Liu, F., De Franceschi, L., Brugnara, C., Rivera, A. and Chishti, A. H., 2012. "Calpain-1 knockout reveals broad effects on erythrocyte deformability and physiology." *Biochem J* 448(1): 141-152.
- Willekens, F. L., Bosch, F. H., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Dopp, Y. A. and Werre, J. M., 1997. "Quantification of loss of haemoglobin components from the circulating red blood cell in vivo." *Eur J Haematol* 58(4): 246-250.
- Willekens, F. L., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Dopp, Y. A., Bos, H. J., Bosman, G. J., van den Bos, A. G., Verkleij, A. J. and Werre, J. M., 2003. "Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation." *Blood* 101(2): 747-751.
- Willekens, F. L., Werre, J. M., Groenen-Dopp, Y. A., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., de Pauw, B. and Bosman, G. J., 2008. "Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism?" *Br J Haematol* 141(4): 549-556.
- Willekens, F. L., Werre, J. M., Kruijt, J. K., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Dopp, Y. A., van den Bos, A. G., Bosman, G. J. and van Berkel, T. J., 2005. "Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors." *Blood* 105(5): 2141-2145.
- Wither, M., Dzieciatkowska, M., Nemkov, T., Strop, P., D'Alessandro, A. and Hansen, K. C., 2016. "Hemoglobin oxidation at functional amino acid residues during routine storage of red blood cells." *Transfusion* 56(2): 421-426.
- Wood, B. L., Gibson, D. F. and Tait, J. F., 1996. "Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations." *Blood* 88(5): 1873-1880.
- Yachie-Kinoshita, A., Nishino, T., Shimo, H., Suematsu, M. and Tomita, M., 2010. "A metabolic model of human erythrocytes: practical application of the E-Cell Simulation Environment." *J Biomed Biotechnol* 2010: 642420.
- Yeum, K. J., Russell, R. M., Krinsky, N. I. and Aldini, G., 2004. "Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma." *Arch Biochem Biophys* 430(1): 97-103.
- Yoshida, T., Prudent, M. and D'Alessandro, A., 2019. "Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences." *Blood Transfus* 17(1): 27-52.
- Zeidan, Y. H. and Hannun, Y. A., 2010. "The acid sphingomyelinase/ceramide pathway: biomedical significance and mechanisms of regulation." *Curr Mol Med* 10(5): 454-466.
- Zeller, M. P., Rochweg, B., Jamula, E., Li, N., Hillis, C., Acker, J. P., Runciman, R. J. R., Lane, S. J., Ahmed, N., Arnold, D. M. and Heddle, N. M., 2019. "Sex-mismatched red blood cell transfusions and mortality: A systematic review and meta-analysis." *Vox Sang* 114(5): 505-516.
- Zhang, R., Zhang, C., Zhao, Q. and Li, D., 2013. "Spectrin: structure, function and disease." *Sci China Life Sci* 56(12): 1076-1085.
- Zolla, L. and D'Alessandro, A., 2012. "Preface to the Special Issue: Integrated omics." *J Proteomics* 76 Spec No.: 3-9.

Παράρτημα

Πίνακας Παραρτήματος Π1. Αριθμητικός κώδικας που χρησιμοποιείται στην παρουσίαση των πρωτεωμικών και φυσιολογικών παραμέτρων των βιολογικών δικτύων στις Εικόνες Δ19 και Δ20.

Παράμετρος	Αύξων Αριθμός
14-3-3 protein epsilon	1
2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	2
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	3
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	4
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	5
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	6
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	7
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	8
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	9
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	10
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	11
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	12
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	13
26S proteasome regulatory subunit 10B	14
26S proteasome regulatory subunit 4	15
26S proteasome regulatory subunit 6A	16
26S proteasome regulatory subunit 6B	17
26S proteasome regulatory subunit 7	18
26S proteasome regulatory subunit 8	19
55 kDa erythrocyte membrane protein	20
Acetylcholinesterase	21
Actin, alpha skeletal muscle	22
Actin, cytoplasmic 1	23
Acylamino-acid-releasing enzyme	24
Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	25
Alpha-adducin	26
Alpha-centractin	27
Ammonium transporter Rh type A	28
Ankyrin-1	29
Annexin A4	30
Annexin A7	31

AP-1 complex subunit beta-1	32
AP-2 complex subunit alpha-1	33
AP-2 complex subunit alpha-2	34
AP-2 complex subunit beta	35
AP-2 complex subunit mu	36
Aquaporin-1	37
Arginase-1	38
Atlastin-3	39
ATP-binding cassette sub-family B member 6	40
ATP-binding cassette sub-family G member 2	41
ATP-citrate synthase	42
ATP-dependent 6-phosphofructokinase	43
ATP-dependent 6-phosphofructokinase	44
Band 3 anion transport protein	45
Basal cell adhesion molecule	46
Basigin	47
Beta-2-glycoprotein 1	48
Beta-actin-like protein 2	49
Beta-adducin	50
Blood group Rh(CE) polypeptide	51
BMP-2-inducible protein kinase	52
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	53
Calmodulin-1	54
Calnexin	55
Calpain small subunit 1	56
Calpain-1 catalytic subunit	57
Calpain-5	58
Calpastatin	59
Calreticulin	60
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	61
cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	62
Carbonic anhydrase 1	63
Casein kinase I isoform alpha	64
Caspase-like activity (cytosol)	65
Caspase-like activity (membrane)	66

Caspase-like activity (supernatant)	67
Catalase	68
CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1	69
CD44 antigen	70
CD59 glycoprotein	71
Cell division control protein 42 homolog	72
Chymotrypsin-like activity (cytosol)	73
Chymotrypsin-like activity (membrane)	74
Chymotrypsin-like activity (supernatant)	75
Clathrin heavy chain 1	76
Coiled-coil and C2 domain-containing protein 1A	77
Complement decay-accelerating factor	78
Complement receptor type 1	79
COP9 signalosome complex subunit 2	80
COP9 signalosome complex subunit 3	81
COP9 signalosome complex subunit 4	82
COP9 signalosome complex subunit 6	83
Copine-3	84
Copper-transporting ATPase 1	85
Cullin-1	86
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	87
Delta-aminolevulinic acid dehydratase	88
Dematin	89
Deoxyribose-phosphate aldolase	90
Diamide-induced ROS generation	91
Disheveled-associated activator of morphogenesis 1	92
DnaJ homolog subfamily B member 1	93
DnaJ homolog subfamily C member 13	94
Dynactin subunit 1	95
Dynactin subunit 2	96
Dynamin-2	97
E2 ubiquitin-conjugating enzyme	98
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	99
E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	100
Elongation factor 1-alpha	101

Endonuclease domain-containing 1 protein	102
Endoplasmic reticulum chaperone BiP	103
Endoplasmic reticulum resident protein 44	104
Endoplasmin	105
Epoxide hydrolase 1	106
Equilibrative nucleoside transporter 1	107
Erythrocyte band 7 integral membrane protein	108
Erythrocyte membrane protein band 4.2	109
Erythroid membrane-associated protein	110
Exportin-7	111
Extracellular potassium levels	112
Extracellular sodium levels	113
Extracellular vesicles' procoagulant activity	114
Ezrin	115
F-actin-capping protein subunit alpha-1	116
F-actin-capping protein subunit beta	117
Fatty acid synthase	118
Flavin reductase (NADPH)	119
Flotillin-1	120
Flotillin-2	121
Fructose-bisphosphate aldolase A	122
Fructose-bisphosphate aldolase C	123
G protein-coupled receptor kinase 6	124
Galectin-3	125
Gamma-adducin	126
Glutathione S-transferase LANCL1	127
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	128
Glycophorin-A	129
Glycophorin-C	130
GMP reductase 1	131
Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	132
GTPase KRas	133
GTPase NRas	134
GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1	135
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	136

Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) subunit beta-1	137
Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) subunit beta-2	138
Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	139
Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	140
Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	141
Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	142
Heat shock 70 kDa protein 1A	143
Heat shock 70 kDa protein 4	144
Heat shock cognate 71 kDa protein	145
Heat shock protein HSP 90-alpha	146
Heat shock protein HSP 90-beta	147
Hematocrit	148
Hemoglobin subunit alpha	149
Hemoglobin subunit beta	150
Hemoglobin subunit delta	151
Hsc70-interacting protein	152
Immunoglobulin gamma-1 heavy chain	153
Immunoglobulin heavy constant gamma 2	154
Immunoglobulin heavy constant gamma 3	155
Immunoglobulin heavy constant mu	156
Immunoglobulin kappa constant	157
Immunoglobulin kappa light chain	158
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	159
Importin subunit beta-1	160
Importin-5	161
Importin-7	162
Intercellular adhesion molecule 4	163
Intermediate conductance calcium-activated potassium channel protein 4	164
Intracellular calcium levels	165
Intracellular hemoglobin	166
Intrinsic ROS generation	167
Irreversible RBC shape transformation (percentage)	168
Junctional adhesion molecule A	169
Kell blood group glycoprotein	170
Keratin, type I cytoskeletal 10	171

Keratin, type I cytoskeletal 9	172
Keratin, type II cytoskeletal 1	173
Keratin, type II cytoskeletal 2	174
Keratin, type II cytoskeletal 6A	175
LanC-like protein 2	176
L-lactate dehydrogenase B chain	177
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3	178
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	179
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 6	180
Lymphocyte function-associated antigen 3	181
Mean Cell Volume (MCV)	182
Mean Corpuscular Fragility (MCF)	183
Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH)	184
Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC)	185
Mechanical Fragility	186
Membrane Lipid Peroxidation	187
Methyltransferase-like protein 7A	188
Moesin	189
Monocarboxylate transporter 1	190
Multidrug resistance-associated protein 1	191
Multidrug resistance-associated protein 4	192
Multidrug resistance-associated protein 5	193
Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1	194
Myosin light chain 4	195
Myosin regulatory light chain 12B	196
Myosin-10	197
Myosin-9	198
NADH-cytochrome b5 reductase 3	199
Neuropathy target esterase	200
Neutral alpha-glucosidase AB	201
Neutral cholesterol ester hydrolase 1	202
Nucleosome assembly protein 1-like 1	203
Nucleosome assembly protein 1-like 4	204
Oxidative hemolysis	205
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	206

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	207
Peroxiredoxin-1	208
Peroxiredoxin-2	209
Phenylhydrazine-induced ROS generation	210
Phosphatidylinositide phosphatase SAC1	211
Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	212
Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 alpha	213
Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	214
Phosphatidylserine exposure	215
Phospholipid scramblase 1	216
Phospholipid transfer protein C2CD2L	217
Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	218
Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1	219
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	220
Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	221
Polypyrimidine tract-binding protein 1	222
Polyubiquitin-B	223
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	224
Proteasome activator complex subunit 1	225
Proteasome activator complex subunit 2	226
Proteasome adapter and scaffold protein ECM29	227
Proteasome subunit alpha type-1	228
Proteasome subunit alpha type-2	229
Proteasome subunit alpha type-3	230
Proteasome subunit alpha type-4	231
Proteasome subunit alpha type-5	232
Proteasome subunit alpha type-6	233
Proteasome subunit alpha type-7	234
Proteasome subunit beta type-1	235
Proteasome subunit beta type-2	236
Proteasome subunit beta type-3	237
Proteasome subunit beta type-4	238
Proteasome subunit beta type-5	239
Proteasome subunit beta type-7	240
Protein 4.1	241

Protein arginine N-methyltransferase 5	242
Protein argonaute-2	243
Protein carbonylation	244
Protein DDI1 homolog 2	245
Protein diaphanous homolog 1	246
Protein disulfide-isomerase	247
Protein disulfide-isomerase A3	248
Protein disulfide-isomerase A6	249
Protein XRP2	250
Pyrroline-5-carboxylate reductase 3	251
Radixin	252
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	253
Ras-related protein Rab-10	254
Ras-related protein Rab-18	255
Ras-related protein Rab-21	256
Ras-related protein Rab-2B	257
Ras-related protein Rab-35	258
Ras-related protein Rab-5C	259
Ras-related protein Rab-7a	260
Ras-related protein Rab-8A	261
Ras-related protein Rab-8B	262
Ras-related protein Ral-A	263
Ras-related protein Rap-1A	264
Ras-related protein Rap-1b	265
Ras-related protein Rap-2a	266
Ras-related protein Rap-2b	267
Red blood cell count (RBC)	268
Red cell distribution width (RDW)	269
Retinal dehydrogenase 1	270
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	271
RuvB-like 1	272
RuvB-like 2	273
Semaphorin-7A	274
Serum albumin	275
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	276

SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 2	277
Small integral membrane protein 1	278
Small membrane A-kinase anchor protein	279
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	280
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	281
Solute carrier family 40 member 1	282
Sorbitol dehydrogenase	283
Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	284
Spectrin beta chain, erythrocytic	285
Storage hemolysis	286
Stress-induced-phosphoprotein 1	287
Syntaxin-7	288
Syntaxin-binding protein 3	289
TBC1 domain family member 24	290
T-complex protein 1 subunit alpha	291
T-complex protein 1 subunit beta	292
T-complex protein 1 subunit delta	293
T-complex protein 1 subunit epsilon	294
T-complex protein 1 subunit eta	295
T-complex protein 1 subunit gamma	296
T-complex protein 1 subunit theta	297
T-complex protein 1 subunit zeta	298
Tensin-1	299
tert-butyl-hydroperoxide induced ROS generation	300
Total antioxidant capacity (supernatant)	301
Transforming protein RhoA	302
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	303
Transmembrane emp24 domain-containing protein 2	304
Transmembrane protein 222	305
Tripeptidyl-peptidase 2	306
Tropomodulin-1	307
Tropomyosin alpha-1 chain	308
Tropomyosin alpha-3 chain	309
Trypsin-like activity (cytosol)	310
Trypsin-like activity (membrane)	311

Trypsin-like activity (supernatant)	312
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	313
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	314
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	315
UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	316
Unconventional myosin-XVIIIa	317
Urea transporter 1	318
Uric acid dependent antioxidant capacity (supernatant)	319
Uric acid independent antioxidant capacity (supernatant)	320
Vacuolar protein sorting-associated protein 13A	321
Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	322
Vesicle-associated membrane protein 3	323
Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	324
Vesicle-fusing ATPase	325
Vesicle-trafficking protein SEC22b	326
Vesicular integral-membrane protein VIP36	327
V-type proton ATPase subunit B	328
WD repeat-containing protein 81	329
WD repeat-containing protein 91	330
Zinc transporter 1	331

Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ/ΣΠΟΥΔΕΣ

ΙΔΡΥΜΑ	ΠΤΥΧΙΟ	ΠΕΡΙΟΔΟΣ	ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)	PhD	2019-2022	Φυσιολογία – Βιοχημεία του Ερυθροκυττάρου
Τμήμα Βιολογίας / Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)	M.Sc.	2016-2019	Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)	B.Sc.	2012-2016	Βιολογία

A. Δημοσιεύσεις – Δείκτες Ερευνητικής Επίδοσης

Δημοσιεύσεις: **16**, Πρώτη Συγγραφέας: **8**, Δεύτερη Συγγραφέας: **5**, Αναφορές: **82** (Scopus), *h-index*: **5**.

2022:

1. Tzounakas VL, **Anastasiadi AT**, Arvaniti V-Z, Lelli V, Fanelli G, Paronis EC, Apostolidou AC, Balafas EG, Kostomitsopoulos NG, Papageorgiou EG, Papassideri IS, Stamoulis K, Kriebardis AG, Rinalducci S, Antonelou MH. Supplementation with uric and ascorbic acid protects stored red blood cells through enhancement of non-enzymatic antioxidant activity and metabolic rewiring. *Redox Biology Journal* (Accepted Manuscript)
2. **Anastasiadi AT**[#], Tzounakas VL, Dzieciatkowska M, Arvaniti V-Z, Papageorgiou EG, Papassideri IS, Stamoulis K, D'Alessandro A, Kriebardis AG, Antonelou MH[#]. Innate Variability in Physiological and Omics Aspects of the Beta Thalassemia Trait-Specific Donor Variation Effects. *Frontiers in Physiology* 2022, 13:907444; [10.3389/fphys.2022.907444](https://doi.org/10.3389/fphys.2022.907444) [#]**equal correspondence** (Προσωπική πρόσκληση στο Ειδικό Τεύχος: Rising Stars in Red Blood Cell Physiology)
3. Tzounakas VL, **Anastasiadi AT**, Karadimas DG, Velentzas AD, Anastasopoulou VI, Papageorgiou EG, Stamoulis K, Papassideri IS, Kriebardis AG, Antonelou MH. Early and Late-Phase 24h Responses of Stored Red Blood Cells to Recipient-Mimicking Conditions. *Frontiers in Physiology* 2022, 13:907497 [10.3389/fphys.2022.907497](https://doi.org/10.3389/fphys.2022.907497)
4. **Anastasiadi AT**, Arvaniti V-Z, Paronis EC, Kostomitsopoulos NG, Stamoulis K, Papassideri IS, D'Alessandro A, Kriebardis AG, Tzounakas VL, Antonelou MH. Corpuscular Fragility and Metabolic Aspects of Freshly Drawn Beta-Thalassemia Minor RBCs Impact Their Physiology and Performance Post Transfusion: A Triangular Correlation Analysis In Vitro and In Vivo. *Biomedicines* 2022 10, 530. [10.3390/biomedicines10030530](https://doi.org/10.3390/biomedicines10030530)
5. Tzounakas VL, **Anastasiadi AT**, Lekka ME, Papageorgiou EG, Stamoulis K, Papassideri IS, Kriebardis AG, Antonelou MH. Deciphering the Relationship Between Free and Vesicular Hemoglobin in Stored Red Blood Cell Units. *Frontiers in Physiology* 2022 13:840995. [10.3389/fphys.2022.840995](https://doi.org/10.3389/fphys.2022.840995)
6. Tzounakas VL, Dzieciatkowska M, **Anastasiadi AT**, Karadimas DG, Vergaki A, Siourounis P, Stamoulis K, Papassideri IS, Kriebardis AG, D'Alessandro A, Antonelou MH. Red cell proteasome modulation by storage, redox metabolism and transfusion. *Blood Transfusion* 2022 20: 27-39 [10.2450/2020.0179-20](https://doi.org/10.2450/2020.0179-20)
7. Tzounakas VL*, **Anastasiadi AT***, Stefanoni D, Cendali F, Bertolone L, Gamboni F, Dzieciatkowska M, Rousakis P, Vergaki A, Soulikis V, Tsitsilonis OE, Stamoulis K, Papassideri IS, Kriebardis AG, D'Alessandro A,

Antonelou MH. Beta-thalassemia minor is a beneficial determinant of red blood storage lesion. Haematologica 2022 107(1):112-125 [10.3324/haematol.2020.273946](https://doi.org/10.3324/haematol.2020.273946) *first co-authors

2021:

8. **Anastasiadi AT**, Paronis EC, Arvaniti V-Z, Velentzas AD, Apostolidou AC, Balafas EG, Dzieciatkowska M, Kostomitsopoulos NG, Stamoulis K, Papassideri IS, D'Alessandro A, Kriebardis AG, Antonelou MH, Tzounakas VL#. The post-storage performance of RBCs from beta-thalassemia trait donors is related to their storability profile. International Journal of Molecular Sciences 2021 22, 12281. [10.3390/ijms22212281](https://doi.org/10.3390/ijms22212281)

9. **Anastasiadi AT***, Tzounakas VL*, Arvaniti V-Z, Dzieciatkowska M, Stamoulis K, Lekka ME, Papassideri IS, D'Alessandro A, Kriebardis AG and Antonelou MH. Red blood cell proteasome in beta-thalassemia trait: topology, activity, and networking in blood bank conditions. Membranes 2021, 11(9), 716; [10.3390/membranes11090716](https://doi.org/10.3390/membranes11090716) * first co-authors

10. Tzounakas VL, **Anastasiadi AT**, Valsami SI, Stamoulis KE, Papageorgiou EG, Politou M, Papassideri IS, Kriebardis AG, Antonelou MH. Osmotic hemolysis is a donor-specific feature of red blood cells under various storage conditions and genetic backgrounds. Transfusion 2021 61:2538–2544. [10.1111/trf.16558](https://doi.org/10.1111/trf.16558)

11. Tzounakas VL, Stamoulis KE, **Anastasiadi AT**, Papassideri IS, Kriebardis AG, Rinalducci S, Antonelou MH. Leukoreduction makes a difference: a pair proteomics study of extracellular vesicles in red blood cell units. Transfus Apher Sci. 2021, 103166, [10.1016/j.transci.2021.103166](https://doi.org/10.1016/j.transci.2021.103166) (μετά από πρόσκληση)

12. Tzounakas VL*, **Anastasiadi AT***, Dzieciatkowska M, Karadimas DG, Stamoulis K, Papassideri IS, Hansen KC, D'Alessandro A, Kriebardis AG, Antonelou MH. Proteome of stored RBC membrane and vesicles from heterozygous beta thalassemia donors. International Journal of Molecular Sciences 2021, 22, 3369. [10.3390/ijms22073369](https://doi.org/10.3390/ijms22073369) * first co-authors.

13. Tzounakas VL*, **Anastasiadi AT***, Drossos PV, Karadimas DG, Valsami SI, Stamoulis KE, Papassideri IS, Politou M, Antonelou MH, Kriebardis AG. Sex-related aspects of the red blood cell storage lesion. Blood Transfus 2021 May;19(3):224-236. [10.2450/2020.0141-20](https://doi.org/10.2450/2020.0141-20) * first co-authors.

2020:

14. **Anastasiadi AT***, Tzounakas VL*, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Seghatchian J and, Antonelou MH. When I need you most: frozen red blood cells for transfusion. Transfus Apher Sci, 2020 Jun;59(3):102786. [10.1016/j.transci.2020.102786](https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102786) * first co-authors.

2018:

15. Tzounakas VL, Karadimas DG, **Anastasiadi AT**, Georgatzakou HT, Kazepidou E, Moschovas D, Velentzas AD, Kriebardis AG, Zafeiropoulos NE, Avgeropoulos A, Lekka M, Stamoulis KE, Papassideri IS, Antonelou MH. Donor-specific individuality of red blood cell performance during storage is partly a function of serum uric acid levels. Transfusion. 2018 Jan;58(1):34-40. [10.1111/trf.14379](https://doi.org/10.1111/trf.14379)

2017:

16. Tzounakas VL, **Anastasiadi AT**, Karadimas DG, Zeqo RA, Georgatzakou HT, Pappa OD, Papatitze OA, Stamoulis KE, Papassideri IS, Antonelou MH, Kriebardis AG. Temperature-dependent haemolytic propensity of CPDA-1 stored erythrocytes versus whole blood - Red cell fragility as a donor's signature on blood units. Blood Transfus 2017 Sep;15(5):447-455. [10.2450/2017.0332-16](https://doi.org/10.2450/2017.0332-16)

Β. Συμμετοχή σε Ερευνητικά Προγράμματα – Χρηματοδοτούμενα Πρότζεκτ

02/2020-07/2022:

Άμισθη επιστημονική συνεργασία σε ερευνητικό πρόγραμμα με μορφή υποτροφίας Ι.Κ.Υ. «Ενίσχυση Μεταδιδασκτόρων ερευνητών/ερευνητριών - Β Κύκλος». Πράξη με κωδικό 5033021 του Ε.Π. «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση» (ΕΣΠΑ 2014-2020)».

Υπότροφος: Βασίλειος Τζούνακας

Επιβλέπουσα: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Μαριάννα Αντωνέλου

Ίδρυμα: Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.

07/2018-12/2021:

Μέλος της κύριας ερευνητικής ομάδας (αμειβόμενο μέλος ως Υποψήφια Διδάκτωρ: 05/2019-08/2021 και ως Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια 10/2018 – 12/2018) ερευνητικού προγράμματος της 1^{ης} προκήρυξης ερευνητικών έργων ΕΛΙΔΕΚ για την ενίσχυση μεταδιδακτορικών ερευνητών.

Κωδικός έργου: #2032.

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Βασίλειος Τζούνακας.

Ίδρυμα: Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ (Ακαδημαϊκή Σύμβουλος: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Μαριάννα Αντωνέλου).

Γ. Συμμετοχή σε Επιστημονικά Συνέδρια:

Σύνολο: 25. Διεθνή: 12, Εγχώρια: 13.

Δ. Βραβεύσεις

2021: **Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης, 31^ο Ευρωπαϊκό Συνέδριο της Διεθνούς Εταιρίας Μεταγγισιοθεραπείας.** Antioxidants supplementation effects on red blood cell storage lesion. Tzounakas VL, **Anastasiadi AT**, Arvaniti VZ, Pavlou E, Stamoulis KE, Papasideri IS, Kriebardis AG, Antonelou MH

2018: **Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης, 29^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο.** Αιματολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τακτικών αιμοδοτών με ετερόζυγη β-Μεσογειακή αναιμία. Β. Τζούνακας, Π. Δρόσος, **Α. Αναστασιάδη**, Σ. Βαλσάμη, Μ. Πολίτου, Κ. Σταμούλης, Ι. Παπασιδέρη, Α. Κριεμπάρδης, Μ. Αντωνέλου

Δημοσιεύσεις που αφορούν στα αποτελέσματα της διατριβής

1. **Anastasiadi AT[#]**, Tzounakas VL, Dzieciatkowska M, Arvaniti V-Z, Papageorgiou EG, Papassideri IS, Stamoulis K, D'Alessandro A, Kriebardis AG, Antonelou MH[#]. Innate Variability in Physiological and Omics Aspects of the Beta Thalassemia Trait-Specific Donor Variation Effects. *Frontiers in Physiology* 2022, 13:907444; [10.3389/fphys.2022.907444](https://doi.org/10.3389/fphys.2022.907444) ***equal corresponding authors** (Δημοσίευση μετά από προσωπική πρόσκληση στο Ειδικό Τεύχος με τίτλο: Rising Stars in Red Blood Cell Physiology)
2. **Anastasiadi AT**, Arvaniti V-Z, Paronis EC, Kostomitsopoulos NG, Stamoulis K, Papassideri IS, D'Alessandro A, Kriebardis AG, Tzounakas VL, Antonelou MH. Corpuscular Fragility and Metabolic Aspects of Freshly Drawn Beta-Thalassemia Minor RBCs Impact Their Physiology and Performance Post Transfusion: A Triangular Correlation Analysis In Vitro and In Vivo. *Biomedicines* 2022 10, 530. [10.3390/biomedicines10030530](https://doi.org/10.3390/biomedicines10030530)
3. Tzounakas VL*, **Anastasiadi AT***, Stefanoni D, Cendali F, Bertolone L, Gamboni F, Dzieciatkowska M, Rousakis P, Vergaki A, Soulikis V, Tsitsilonis OE, Stamoulis K, Papassideri IS, Kriebardis AG, D'Alessandro A, Antonelou MH. Beta-thalassemia minor is a beneficial determinant of red blood storage lesion. *Haematologica* 2022 107(1):112-125 [10.3324/haematol.2020.273946](https://doi.org/10.3324/haematol.2020.273946) ***equal first authors**
4. **Anastasiadi AT**, Paronis EC, Arvaniti V-Z, Velentzas AD, Apostolidou AC, Balafas EG, Dzieciatkowska M, Kostomitsopoulos NG, Stamoulis K, Papassideri IS, D'Alessandro A, Kriebardis AG, Antonelou MH[#], Tzounakas VL[#]. The post-storage performance of RBCs from beta-thalassemia trait donors is related to their storability profile. *International Journal of Molecular Sciences* 2021 22, 12281. [10.3390/ijms22212281](https://doi.org/10.3390/ijms22212281)
5. **Anastasiadi AT***, Tzounakas VL*, Arvaniti V-Z, Dzieciatkowska M, Stamoulis K, Lekka ME, Papassideri IS, D'Alessandro A, Kriebardis AG and Antonelou MH. Red blood cell proteasome in beta-thalassemia trait: topology, activity, and networking in blood bank conditions. *Membranes* 2021, 11(9), 716; [10.3390/membranes11090716](https://doi.org/10.3390/membranes11090716) ***equal first authors**
6. Tzounakas VL*, **Anastasiadi AT***, Dzieciatkowska M, Karadimas DG, Stamoulis K, Papassideri IS, Hansen KC, D'Alessandro A, Kriebardis AG, Antonelou MH. Proteome of stored RBC membrane and vesicles from heterozygous beta thalassemia donors. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 3369. [10.3390/ijms22073369](https://doi.org/10.3390/ijms22073369) ***equal first authors.**



Innate Variability in Physiological and Omics Aspects of the Beta Thalassemia Trait-Specific Donor Variation Effects

Alkmini T. Anastasiadi^{1*}, Vassilis L. Tzounakas¹, Monika Dzieciatkowska², Vasiliki-Zoi Arvaniti¹, Effie G. Papageorgiou³, Issidora S. Papassideri¹, Konstantinos Stamoulis⁴, Angelo D'Alessandro², Anastasios G. Kriebardis³ and Marianna H. Antonelou^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Giampaolo Minetti,
University of Pavia, Italy

Reviewed by:

Egarit Noursi,
Mahidol University, Thailand
Alessandro Matte',
University of Verona, Italy

*Correspondence:

Alkmini T. Anastasiadi
alkanast@biol.uoa.gr
Marianna H. Antonelou
manton@biol.uoa.gr

Specialty section:

This article was submitted to
Red Blood Cell Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 29 March 2022

Accepted: 02 May 2022

Published: 08 June 2022

Citation:

Anastasiadi AT, Tzounakas VL, Dzieciatkowska M, Arvaniti V-Z, Papageorgiou EG, Papassideri IS, Stamoulis K, D'Alessandro A, Kriebardis AG and Antonelou MH (2022) Innate Variability in Physiological and Omics Aspects of the Beta Thalassemia Trait-Specific Donor Variation Effects. *Front. Physiol.* 13:907444. doi: 10.3389/fphys.2022.907444

¹Department of Biology, School of Science, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), Athens, Greece, ²Department of Biochemistry and Molecular Genetics, School of Medicine, University of Colorado, Aurora, CO, United States, ³Laboratory of Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology (HemQcR), Department of Biomedical Sciences, School of Health and Welfare Sciences, University of West Attica (UniWA), Egaleo, Greece, ⁴Hellenic National Blood Transfusion Centre, Athens, Greece

The broad spectrum of beta-thalassemia (β Thal) mutations may result in mild reduction (β^{++}), severe reduction (β^{+}) or complete absence (β^0) of beta-globin synthesis. β Thal heterozygotes eligible for blood donation are “good storers” in terms of red blood cell (RBC) fragility, proteostasis and redox parameters of storage lesion. However, it has not been examined if heterogeneity in genetic backgrounds among β Thal-trait donors affects their RBC storability profile. For this purpose, a paired analysis of physiological and omics parameters was performed in freshly drawn blood and CPD/SAGM-stored RBCs donated by eligible volunteers of β^{++} (N = 4), β^{+} (N = 9) and β^0 (N = 2) mutation-based phenotypes. Compared to β^{+} , β^{++} RBCs were characterized by significantly lower RDW and HbA₂ but higher hematocrit, MCV and NADPH levels *in vivo*. Moreover, they had lower levels of reactive oxygen species and markers of oxidative stress, already from baseline. Interestingly, their lower myosin and arginase membrane levels were accompanied by increased cellular fragility and arginine values. Proteostasis markers (proteasomal activity and/or chaperoning-protein membrane-binding) seem to be also diminished in β^{++} as opposed to the other two phenotypic groups. Overall, despite the low number of samples in the sub-cohorts, it seems that the second level of genetic variability among the group of β Thal-trait donors is reflected not only in the physiological features of RBCs *in vivo*, but almost equally in their storability profiles. Mutations that only slightly affect the globin chain equilibrium direct RBCs towards phenotypes closer to the average control, at least in terms of fragility indices and proteostatic dynamics.

Keywords: genetic variability, storage lesion, beta-thalassemia trait, red blood cells, omics

INTRODUCTION

The storability profile of red blood cells (RBCs) seems to be highly dependent on intrinsic donor characteristics. Both genetic and environmental factors have been studied during the last decade in the context of donor variation effects upon storage and transfusion therapy. Donor's sex (Szczeny-Malysiak et al., 2021), ethnicity (Kanas et al., 2017) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity (Tzounakas et al., 2016; Francis et al., 2020), as well as lifestyle aspects, such as smoking (Stefanoni et al., 2020) and caffeine or alcohol consumption (D'Alessandro et al., 2020a; D'Alessandro et al., 2020b) have been proven to affect differentially the storage and/or post-transfusion efficacy of donated RBCs. The same is true for RBCs with distinct hemoglobin (Hb) variants. For instance, stored RBCs from donors with elevated glycosylated Hb present increased susceptibility to lysis, phosphatidylserine (PS) externalization and non-reversible shape modifications (Li et al., 2022). Moreover, polymorphisms in *HbA2* gene are associated with a reduced hemoglobin increment (Roubinian et al., 2022), and sickle cell trait with increased storage hemolysis and removal in animal models of transfusion (Osei-Hwedie et al., 2016).

RBCs from beta-thalassemia minor (β Thal⁺) eligible donors have been extensively studied lately with respect to their physiological, metabolic and proteomic profiles during storage. These cells seem to possess an intrinsic resistance to both spontaneous and induced lysis (Tzounakas et al., 2022), as well as an array of metabolic and proteomic features indicative of advantageous control of oxidative and proteotoxic stresses (Anastasiadi et al., 2021b; Tzounakas et al., 2021; Tzounakas et al., 2022). Regarding their post-transfusion aspects, stored β Thal⁺ RBCs demonstrate resilience against lysis following exposure to plasma at body temperature, along with a trend for increased recovery post transfusion in mice recipients (Anastasiadi et al., 2021a). These superior post-storage phenotypes have been found linked to β Thal⁺-specific variations in baseline or storage parameters, such as cell fragilities, cytoskeleton composition, or urate (Anastasiadi et al., 2021a; Anastasiadi et al., 2022).

Besides divergence of specific donor cohorts from the average control, a range of within-group variation is also anticipated. In the case of beta-thalassemia the highly heterogenous genetic setting of mutations and related polymorphisms is translated to a broad spectrum of clinical and cellular phenotypes (Giardine et al., 2021) with variable prevalence within distinct national settings. More specifically, in Greece, mutations leading to severe reduction in β -globin synthesis (β^+) represent almost 50% of the reported thalassemia alleles (Boussiou et al., 2008) followed by mutations resulting in null synthesis or slight reduction of β -chains. Therefore, the cellular effects of each mutation might lead to a different storability phenotype. Having this in mind, the aim of the present study was to examine the innate variation of hematological, physiological, metabolic and protein parameters in freshly drawn and stored RBCs from a group of β Thal⁺ donors stratified by the degree of β -globin synthesis imposed by the affected allele.

MATERIALS AND METHODS

Biological Samples and Blood Unit Preparation

Venous blood from fifteen regular β Thal⁺ blood donors was collected into EDTA and citrate vacutainer tubes. The same subjects donated blood to prepare and store RBC units in citrate-phosphate-dextrose (CPD)/saline-adenine-glucose-mannitol (SAGM), for 42 days at 4°C. β Thal⁺ trait was confirmed by Hb electrophoresis and molecular identification of mutations (IVS I-1, IVS I-6, IVS I-110, IVS II-1 and IVS II-745). The samples were subsequently categorized as β^{++} ($n = 4$), β^+ ($n = 9$) and β^0 ($n = 2$) according to the impact that the mutations have upon the β -globin synthesis (from slight $-\beta^{++}$ to severe $-\beta^0$ reduction in β -globin levels). The RBC units were sampled every week under aseptic conditions. The study was approved by the Ethics Committee of the Department of Biology, School of Science, NKUA and investigations were carried out upon donor consent, in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

Hematological and Biochemical Measurements

BC-3000 PLUS, MINDRAY Celltac E, MEK-7222 K, NIHON KOHDEN automatic blood cell counters were used for complete blood count through double measurements to achieve maximum reliability, while the automatic analysers Hitachi 902, AVL Series Electrolyte Analyzer 9,180 and Elecsys Systems Analyzer (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Switzerland) were used for the biochemical analysis of triglycerides, lipoproteins, iron (Fe), electrolytes and ferritin.

Hemolysis Parameters

Storage hemolysis was calculated via spectrophotometry using Harboe's method (Harboe, 1959) followed by Allen's correction. For assessment of osmotic hemolysis, the samples were exposed to ascending concentrations of NaCl and then the mean corpuscular fragility (MCF) index (i.e., %NaCl at 50% hemolysis) was calculated. Mechanical hemolysis was estimated following rocking of RBCs with stainless steel beads for 1 h and measurement of the Hb released in the supernatant compared to non-rocked counterparts (Tzounakas et al., 2022).

Reactive Oxygen Species Accumulation and Proteasome Activity

The intracellular accumulation of reactive oxygen species (ROS) was measured via fluorometry (BIORAD Hercules, CA, United States) by using the membrane permeable and redox-sensitive probe 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydro-fluoresceindiacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA; Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, United States). This assay was performed with or without prior oxidative stimulation of RBCs by diamide (2 mM) or phenylhydrazine (PHZ; 100 μ M) for 45 min at 37°C. Fluorometry was also used for the determination of

caspase-like (CASP-like), chymotrypsin-like (CH-like) and trypsin-like (TR-like) proteasome activities in cytosol and membrane fractions. For this purpose, 120–200 µg of protein samples were incubated with the fluorogenic substrates Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-aminomethylcoumarin (AMC) (CH-like), z-Leu-Leu-Glu-AMC (CASP-like), and Boc-Leu-Arg-Arg-AMC (TR-like) for 1.30 h (CH-like) or 3 h (CASP- and TR-like) at 37°C in the dark (Anastasiadi et al., 2021b). All substrates were produced from Enzo Life Sciences (New York, NY, United States). Fluorescent units were normalized to protein levels to reach a quantitative result.

Metabolomics and Proteomics Analyses

For the metabolomics analysis, 100 µl of stored RBCs (or 20 µl of plasma/supernatants) were collected on a weekly basis, extracted at 1:6 (or 1:25) dilution in methanol:acetonitrile:water (5:3:2) and analyzed by UHPLC-MS (Ultimate 3000 RSLC-Q Exactive, Thermo Fisher), as previously described (D'Alessandro et al., 2019; Nemkov et al., 2019). Sample extracts (10 µl) were loaded onto a Kinetex XB-C18 column (150 mm × 2.1 mm × 1.7 µm—Phenomenex, Torrance, CA, United States). A 5-min gradient from 5 to 95% B (phase A: water +0.1% formic acid and B: acetonitrile +0.1% formic acid) eluted metabolites into a Q Exactive system (Thermo, Bremen, Germany), scanning in full MS mode or performing acquisition independent fragmentation (MS/MS analysis—5 min method) at 70,000 resolution in the 60–900 m/z range, 4 kV spray voltage, 15 sheath gas, and five auxiliary gas, operated in negative and then positive ion mode (separate runs). Metabolite assignment was performed against an in-house standard library, as reported (Nemkov et al., 2017), through the freely available software Maven (Princeton University, United States). No data pre-processing (neither normalization nor log-transformation) was performed. Proteomics analysis was performed on isolated membranes of early- and late-stored RBCs ($n = 12$ at each time point; $n = 2$ for β^{++} , $n = 8$ for β^+ , $n = 2$ for β^0 ; obtained by hypotonic lysis). Samples (200 ng) were loaded onto individual Evotips (desalting) and were subsequently washed (20 µl 0.1% formic acid), followed by the addition of 0.1% formic acid to keep the Evotips wet. The Evosep One system was coupled to a timsTOF Pro mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Data were collected over a m/z range of 100–1700 for MS and MS/MS on the timsTOF Pro instrument using an accumulation and ramp time of 100 ms. PEAKS studio (Version X+, Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON, United States) was used for post-processing. The relative protein levels were normalized on the total amount of proteins.

Statistical Analysis

All physiological experiments were performed in triplicate. Statistical analysis was performed by using the statistical package SPSS Version 22.0 (IBM Hellas, Athens, Greece, administered by NKUA). Between-group differences in freshly drawn blood (*in vivo* comparison) were assessed by independent *t*-test. Repeated measures ANOVA with Bonferroni-like adjustments for multiple comparisons was used for the evaluation of time-course and between groups differences in

stored RBC units. Significance was accepted at $p < 0.05$. Due to the low number of samples analyzed by proteomics methods (distinguished by dashed boxes throughout the figures in order to highlight their mostly qualitative assessment) or those falling into the β^0 category (Figure 4) all selected parameters satisfied the criteria of both statistical significance (<0.05) and fold change (>1.25), with the exception of Piezo-1 that satisfies only the first criterion.

RESULTS

At first, we focused on probable differences between β^{++} (slight reduction in β -globin) and β^+ (severe reduction but not null synthesis of β -globin chains) samples. In freshly drawn blood, β^{++} heterozygotes presented a trend toward higher hematocrit and mean corpuscular volume (MCV), but significantly lower red cell distribution width (RDW) and HbA₂ (Figure 1A). Moving on to storage, while similar levels of spontaneous hemolysis were observed in β^{++} and β^+ units (e.g., late storage: 7.42 ± 2.10 vs. 5.83 ± 2.81 mg Hb/dL, β^{++} vs. β^+ , $p = 0.294$), β^{++} RBCs presented increased osmotic fragility and sporadically increased mechanical fragility throughout storage, with both differences evident in freshly drawn blood as well (Figure 1B). At the same time, different levels of myosin-9 and piezo-1 proteins (that play a role in RBC deformability and volume regulation) were also detected in those groups (Figure 1B).

Concerning biochemical and proteomic features that vary as a function of the oxidative burden of RBCs, β^{++} RBCs presented lower intracellular levels of ROS when compared to β^+ , either intrinsic or induced by thiol- and hemoglobin-oxidizing agents, from the beginning until the middle of the storage period (Figure 1C). Interestingly, intrinsic, and phenylhydrazine-induced ROS already differed at baseline. The binding of redox-related proteins on the membrane was also distinct: members of the peroxiredoxin family, along with catalase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were less evident in the isolated β^{++} membranes (Figure 1C). It should be noted that no differences arose regarding membrane protein carbonylation (e.g., protein carbonylation index day 21: 36.73 ± 7.04 vs. 33.43 ± 9.12 , β^{++} vs. β^+ , $p > 0.05$) and extracellular antioxidant capacity (e.g., total antioxidant capacity day 35: 428 ± 93 vs. 354 ± 64 µM Fe²⁺, β^{++} vs. β^+ , $p > 0.05$).

Proteostasis was also affected by the degree of β -globin synthesis. In the cytosol of β^{++} , CASP- and TR-like (but not CH-like) activities were significantly reduced before (for TR-like activity at baseline $p = 0.057$) and during storage (Figure 2A) compared to the β^+ values. With regards to the membrane, all three proteasomal activities presented lower levels in β^{++} vs. β^+ at both early and late storage. This finding was accompanied by a trend for lower binding of the b5, b1 and b2 proteasome subunits (where the three different proteolytic specificities of the proteasome are located) in the membrane, especially at late storage, in β^{++} RBCs (Figure 2A). In parallel, heat shock proteins and components of the chaperoning T-complex also exhibited lower levels in the membranes of β^{++} RBCs in comparison to β^+ (Figure 2B).

Moreover, the RBCs of β^{++} donors demonstrated increased levels of G6PD activity and of the relevant metabolites NADPH and pyridoxal *in vivo* (Figure 3A). Both before and throughout storage, L-arginine stood out by presenting elevated values in β^{++} vs. β^{+} RBCs, probably in agreement with the lower membrane binding levels of arginase-1 (Figure 3B). Another metabolite that was differentially affected by the mutation's severity was dihydrothymine. Either throughout storage (intracellularly) or in the last 2 weeks of it (extracellularly) lower levels of dihydrothymine were detected in the group of β^{++} versus β^{+} (Figure 3C). Finally, two metabolites implicated in the biosynthesis of glycerophospholipids, namely choline and sphingosine-1-phosphate (S1P), also showed lower levels in the same subgroup throughout the storage period (Figure 3D). All other metabolites tested presented similar levels between the two groups (e.g., urate day 7: $17 \times 10^6 \pm 6 \times 10^6$ vs. $13 \times 10^6 \pm 5 \times 10^6$ A.U., β^{++} vs. β^{+}).

Despite the low number of β^0 donors, that renders comparisons with the other groups mainly qualitative, the β^0 (null β -globin synthesis) subjects were characterized by higher levels of HbA₂ but lower levels of ferritin, transferrin and osmotic fragility compared to β^{++} or β^{+} donors *in vivo* (Figure 4A). In terms of metabolism, β^0 RBCs presented a downregulated amino acid metabolism sporadically during storage, as in the case of L-arginine (lower levels than in β^{+}) and L-tryptophan (lower levels than in β^{++}). Nucleotides such as IMP, carboxylic acids and glutathione-related metabolites were also decreased in β^0 , mainly throughout storage and against both other donor groups. Additionally, molecules related to fatty acid and carnitine metabolism were found significantly lower in the same group, especially when compared to β^{+} RBCs in specific storage periods (Figure 4A). Lastly, some proteins also exhibited distinct profiles in the β^0 RBC membrane (Figure 4B), including several proteasome subunits that along with GAPDH were upregulated during late or early storage, respectively, when compared to β^{++} . On the other hand, the presence of annexin A7 and peroxiredoxin-1 was minor in the membrane of late-stored β^0 in comparison to β^{+} . Another protein that differed among the three groups was carnitine O-palmitoyltransferase 1, the early levels of which gradually declined from the β^{++} to the β^0 status (Figure 4B).

DISCUSSION

As previously shown, RBCs from β Thal⁺ donors can effectively cope with storage lesion, especially with regards to the storage-related hemolysis stress, maintaining at the same time enhanced proteostasis capacity and uric acid-related intracellular and extracellular antioxidant power. Hereby, we report a variation within the group of heterozygotes, with β^{++} donors exhibiting worse RBC fragility indices but lower oxidative burden and proteasome activity than β^{+} . It was surprising to also find some β^0 subjects within the cohort of eligible donors, who showed unique nucleotide and amino acid metabolism features. A rather expected variation was found in hematological and biochemical data among the three subgroups (β^{++} , β^{+} and β^0) *in vivo*.

Silent mutations, which lie behind the β^{++} phenotype, lead to just a small imbalance of the α -/ β -globin synthesis ratio (Cao and Galanello, 2010), therefore, less excess of α -chains is present in cells. It is established that the accumulation of unpaired α -globin chains promotes the generation of ROS, thus, modifying the redox equilibrium of the cell and leading to oxidative damages (Olivieri, 1999). At the same time, RBCs in beta-thalassemia trait seem to possess an advantageous genetic regulation of antioxidant enzymes, leading to upregulated expression of peroxiredoxin-2 and superoxide dismutase (Teran et al., 2020). Our cohort of beta-thalassemia carriers, in contrast to previously studied groups (Selek et al., 2007), also exhibits higher than average extracellular antioxidant capacity, as well as superior intracellular equilibrium of redox metabolites (e.g., increased urate, decreased s-allantoin) (Tzounakas et al., 2022), irrespectively to the variable degree of beta-globin synthesis imposed by the heterozygous state of β^{++} and β^{+} underlying mutations. It is tempting to hypothesize that the slight excess of α -globin chains in β^{++} vs. β^{+} subjects, along with the boosted antioxidant system observed in both subgroups, altogether provide the first with an advantage regarding the control of ROS accumulation. The above hypothesis is also supported by the susceptibility to PHZ- (and thus, to oxidized-Hb) induced ROS production: while overall similar to the control (when all mutations analyzed as a group), when stratified in the currently examined subgroups β^{+} RBCs present sporadically higher but β^{++} lower susceptibility to ROS elevation (e.g., day 28: $20,079 \pm 5,267$ vs. $16,165 \pm 4,529$ vs. $12,058 \pm 1,946$ RFU/mg of protein, β^{+} vs. control vs. β^{++} , $p < 0.05$). Moreover, while the storage levels of ROS in the β^{+} subgroup followed the general variation pattern observed in heterozygous versus control samples, namely lower levels at late-storage (Tzounakas et al., 2022), the levels of β^{++} RBCs were inferior throughout the storage period (e.g., day 14: $2,321 \pm 678$ vs. $2,539 \pm 789$ vs. $1,584 \pm 83$ RFU/mg of protein, β^{+} vs. control vs. β^{++} , $p > 0.05$ only for β^{+} vs. control). In this context, it would be very interesting to study the redox equilibrium of RBCs from the minority group of β^0 eligible donors during the storage period.

Following binding to the RBC cytoskeletal network, the free α -globin chains tend to autoxidize and cause massive membrane oxidative damage (Ficarra et al., 2009). The enhanced proteostatic system of β^{+} and β^0 cells, observed through the elevated levels of proteasomal activity and/or the increased binding of chaperone and proteasome proteins to the membrane, seems capable to ameliorate the detrimental effects of oxidative stress upon the membrane. Indeed, we found no difference between the levels of membrane protein carbonylation between the distinct subgroups. The proteasome machinery is abundant in the beta-thalassemic precursor cells to decongest the cell from the free α -globin chains (Khandros et al., 2012; Rivella, 2012), while in mature RBCs the same supramolecular complex appears to be involved in the degradation of oxidized Hb (Abi Habib et al., 2020). Regarding the latter, it has been indicated that several chaperones are also involved in α -globin detoxification (Khandros et al., 2012). The simultaneous recruitment of antioxidant cytosolic proteins such as peroxiredoxin-2 (Cho

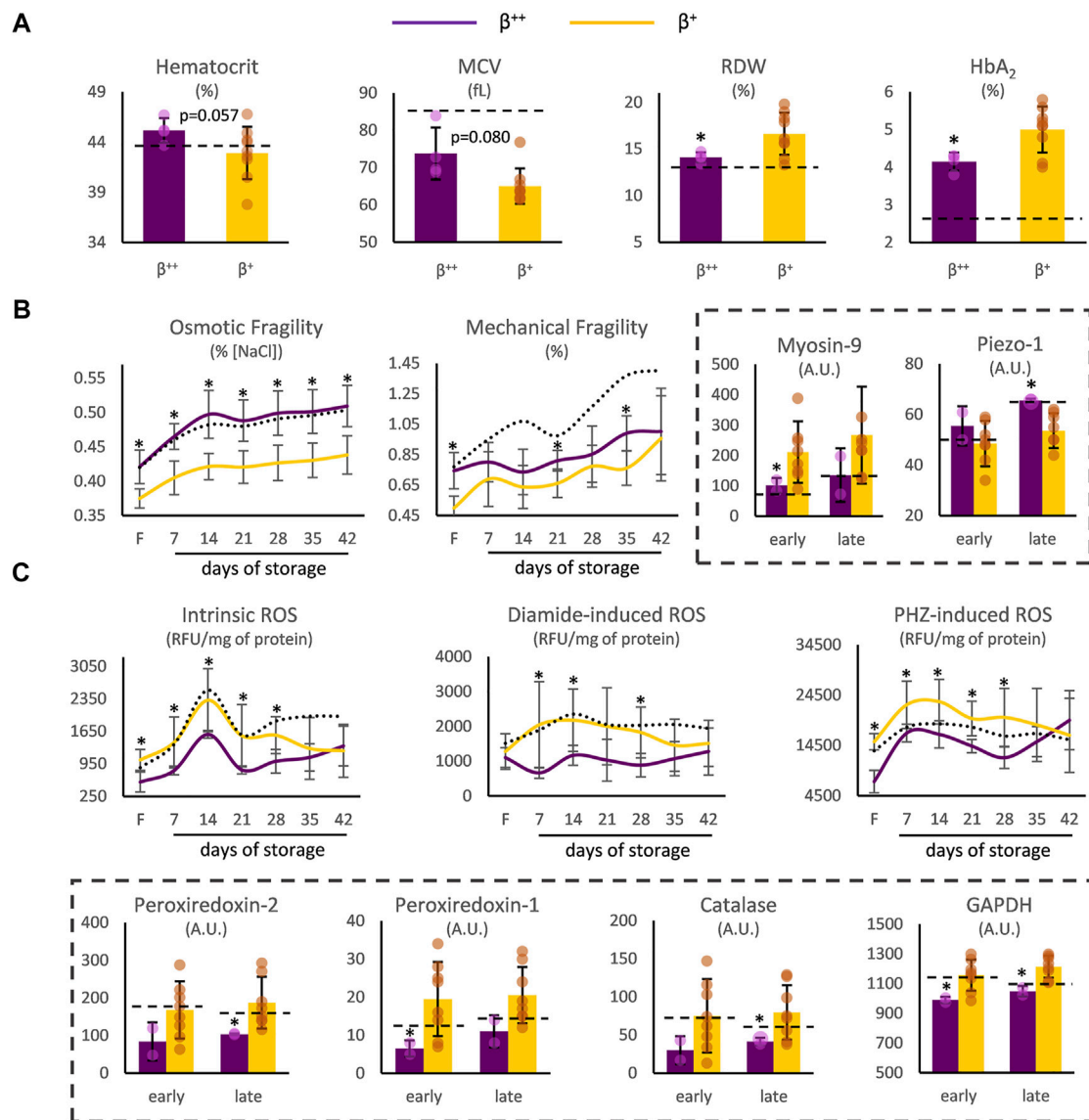


FIGURE 1 | RBC indices and physiology differences between β^{++} and β^{+} heterozygotes. **(A)** Hematological indices in freshly drawn blood. **(B)** Cellular fragility and **(C)** redox parameters before and during storage. Values for average controls are shown by dashed lines. Proteomic parameters are shown in dashed boxes ($n = 2$ vs. 8, β^{++} vs. β^{+}). (*) $p < 0.05$. F: freshly drawn blood; A.U., arbitrary units; ROS: reactive oxygen species; RFU: relative fluorescence units; PHZ: phenylhydrazine; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

et al., 2014) in the membrane of β^{+} RBCs (which is considered a response to local oxidative stress) (Rocha et al., 2009), might also assist in the overall membrane protection, especially considering the remarkable crosstalk between the redox and proteostasis networks in β^{Thal+} stored RBCs (Anastasiadi et al., 2021b). It should not be omitted that peroxiredoxin-2 competes with hemichromes for Band 3 binding and can prevent the latter's clustering and formation of senescence neo-antigen (Bayer et al., 2016). Nonetheless, excess of hemichromes, as shown in RBCs of β^{Thal} mice models can displace peroxiredoxin-2 from the membrane, highlighting the excessive oxidative challenges (Matte et al., 2010). Thus, there might be a fine line regarding

the recruitment of peroxiredoxin-2 to the membrane under different levels of oxidative stress. In our case, the increased oxidative stress of β^{+} RBCs, that is additionally burdened during the stressful storage period, seems not to be translated to extreme membrane damage and subsequent cell lysis, since the β^{Thal+} sub-groups presented similar spontaneous hemolysis levels. In striking contrast, in beta-thalassemia intermedia and major RBCs, the severe defects of the membrane components, caused by the precipitation of the unstable α -globin chains, contribute to hemolysis (Romanello et al., 2018). The increased binding of the cytosolic GAPDH to the membranes of β^0 and β^{+} RBCs further highlights the oxidative stress imposed by the

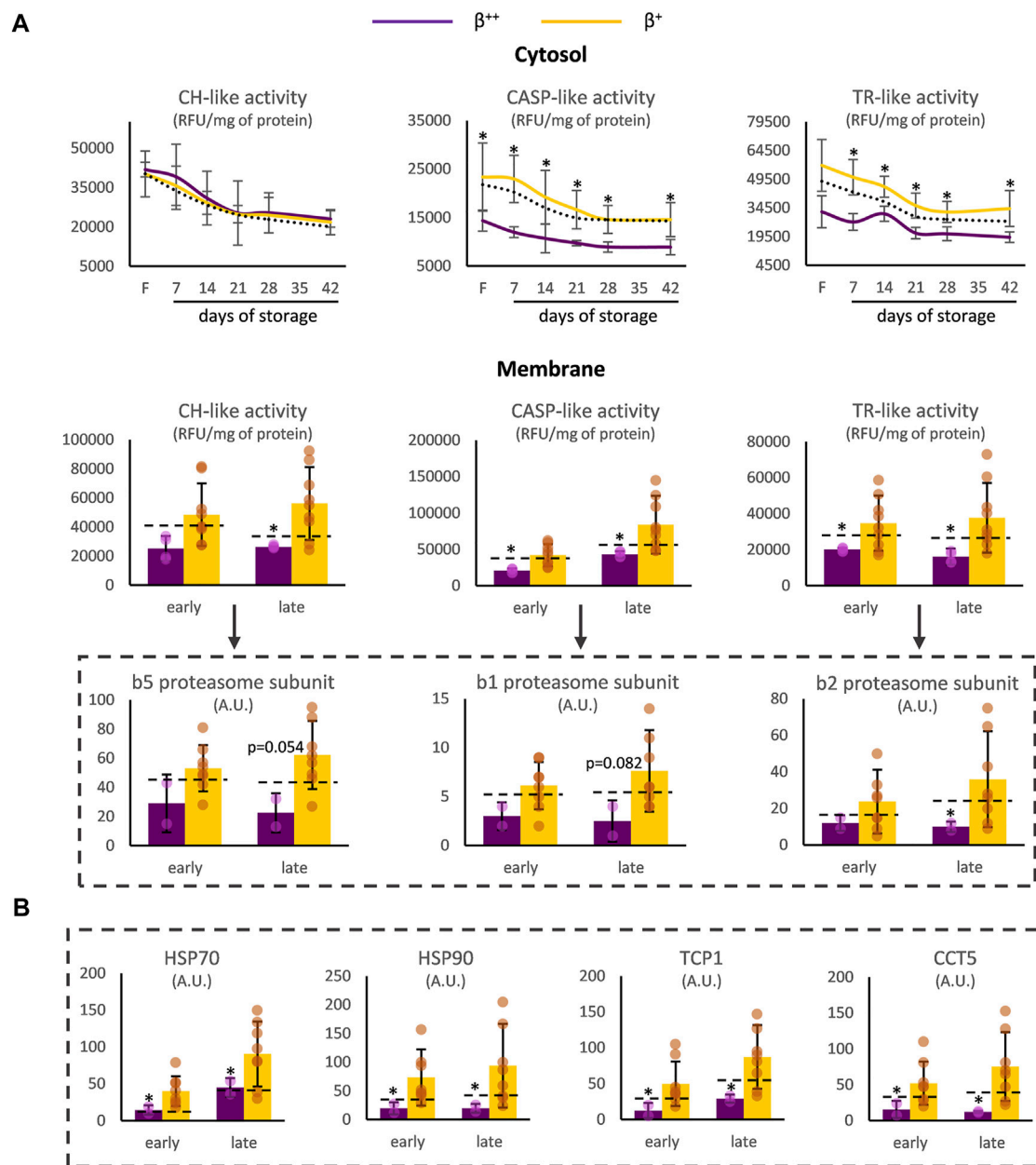


FIGURE 2 | Proteostasis differences between β^{++} and β^{+} heterozygotes. **(A)** Proteasome activity in the cytosol and the membrane and binding of proteasome activity subunits on the membrane. **(B)** Binding of chaperoning proteins on the membrane. Values for average controls are shown by dashed lines. Proteomic parameters are shown in dashed boxes ($n = 2$ vs. 8, β^{++} vs. β^{+}). (*) $p < 0.05$. F: freshly drawn blood; CH-like: chymotrypsin-like, CASP-like: caspase-like, TR-like: trypsin-like proteasome activities; RFU: relative fluorescence units; A.U., arbitrary units; HSP: heat shock protein; TCP1: T-complex protein one; CCT: T-complex subunit.

unmatched α -globin chains, since the relocation of GAPDH is observed under pro-oxidant conditions during storage and triggers glucose consumption through the pentose phosphate pathway to supply RBCs with reducing power (Reisz et al., 2016).

It has been previously shown that the α -globin related oxidation of membrane and skeletal proteins in thalassemic RBCs affects their mechanical stability (Schrier and Mohandas, 1992). The augmented proteostasis at the membrane level along

with the observed variation in the membrane association of myosin proteoforms and piezo-1 protein could take the credit for the superior fragility of β^{+} versus β^{++} RBCs. Indeed, non-muscle myosin IIA plays a significant role in the control of RBC shape and deformability (Smith et al., 2018), while piezo-1 is involved in the regulation of cell volume (Svetina et al., 2019). Moreover, it has been shown that the membrane localization of peroxiredoxin-2 promotes K^{+} efflux through activation of the

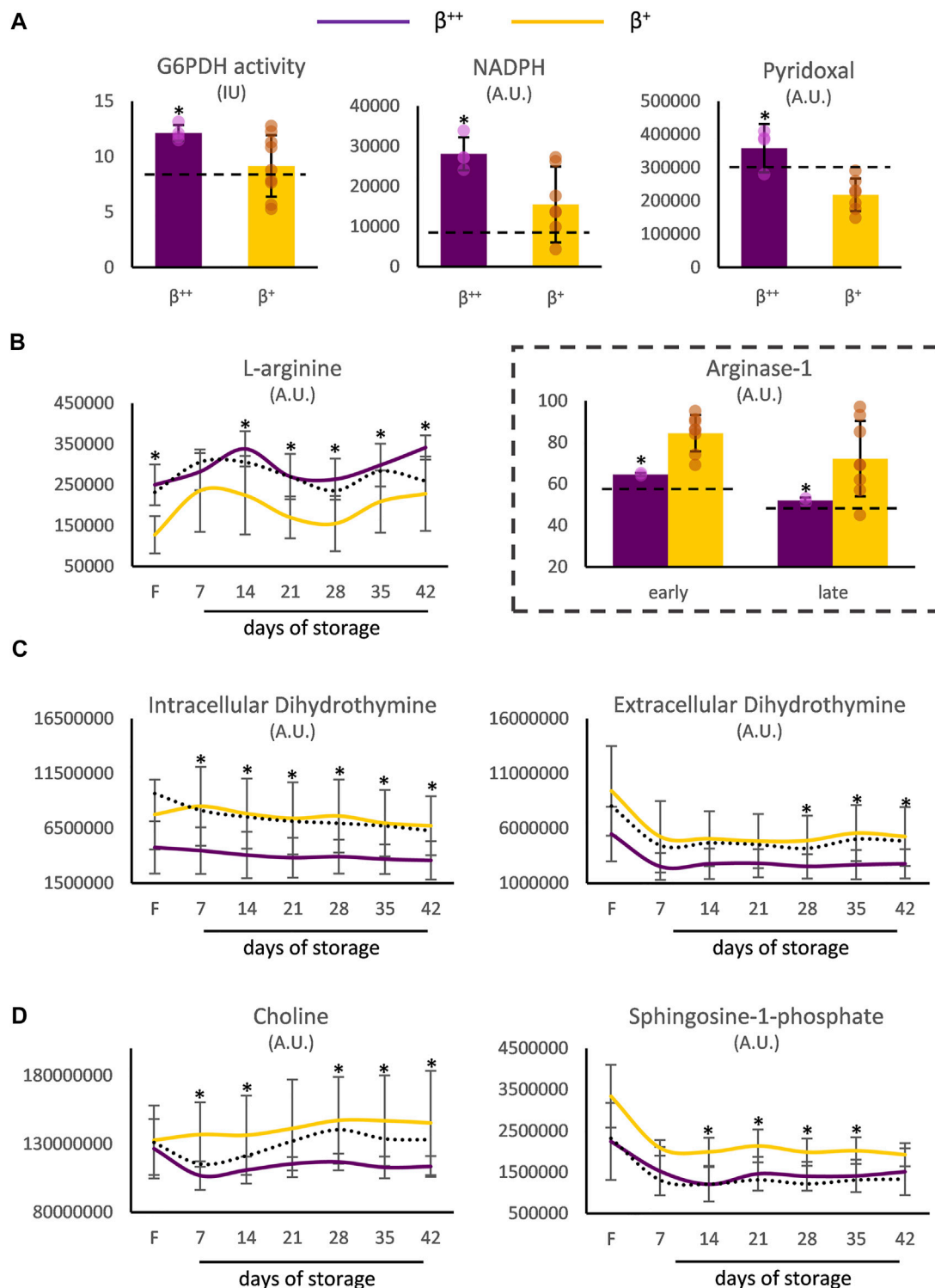
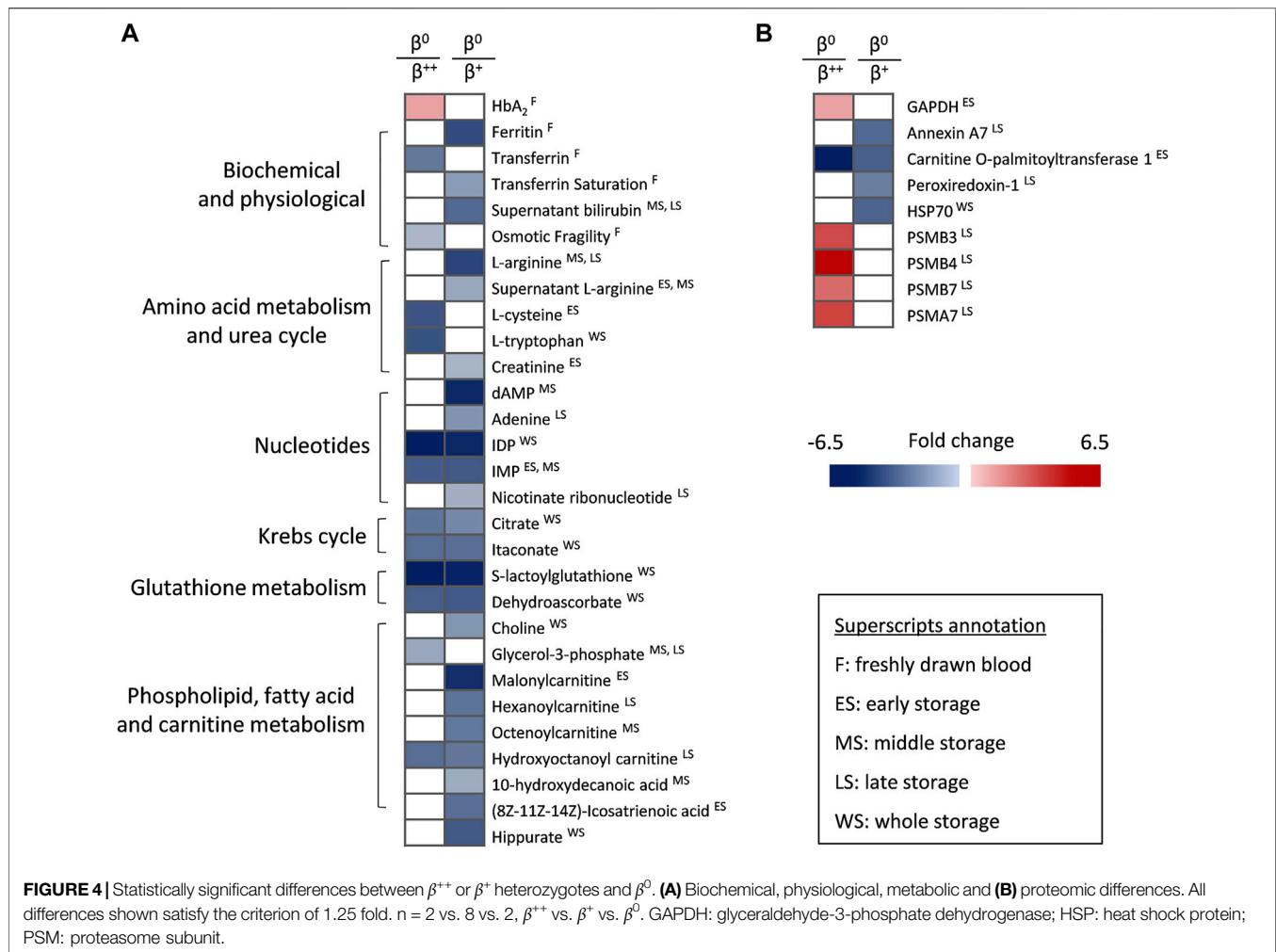


FIGURE 3 | Metabolism differences between β^{++} and β^{+} heterozygotes. **(A)** *In vivo* differences in reducing and antioxidant powers. Differences in freshly drawn and stored red blood cells in **(B)** arginine, **(C)** dihydrothymine and **(D)** metabolites implicated in the biosynthesis of glycerophospholipids. Values for average controls are shown by dashed lines. Proteomic parameters are shown in dashed boxes ($n = 2$ vs. 8, β^{++} vs. β^{+}). (*) $p < 0.05$. F: freshly drawn blood; G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase; IU: international units; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; A.U. arbitrary units.



Gardos channel (Low et al., 2008), benefitting the cell in terms of osmotic stress tolerance. To further support this, elevated RBC osmotic fragility has been previously shown in Gardos-knockout mice (Grgic et al., 2009).

Only a few differences were detected in the levels of RBC metabolites between the three β Thal⁺ subgroups, revealing that the metabolism of RBCs is rather compact in the thalassemia trait. Freshly drawn RBCs from β^{++} subjects presented a redox equilibrium advantage compared to the β^+ counterparts, since they were enriched in NADPH –the driving force of several antioxidant pathways in RBCs– and the redox-related pyridoxal (Jain and Lim, 2001), a finding that is in line with the lower levels of ROS accumulation observed in this subgroup. Arginine was found in gradually lower levels from the β^{++} towards the β^0 stored RBCs. It is known that arginine metabolism is dysregulated in thalassemia (Jain and Lim, 2001), while increased arginase-1 expression (currently observed in β^+ versus β^{++}) and activity, in parallel with low L-arginine levels have been linked to oxidative stress and hemolysis (Morris et al., 2017; Contreras-Zentella et al., 2019). In this context, the arginase-1 enriched β^+ RBCs also presented increased intrinsic oxidative burden when compared to β^{++} . During aging-related oxidative stress, arginase-1 is elevated

(at least in animal models (Pandya et al., 2019)), thus the successively higher α -globin chain accumulation in the β Thal⁺ subgroups might play a role in the differential arginine metabolism. Another metabolite that distinguished β^{++} from β^+ was dihydrothymine. Interestingly, this pyrimidine metabolite that has been associated with the beneficial osmotic stability of β Thal⁺ RBCs in previous studies (Anastasiadi et al., 2022) is currently found increased in the least fragile group. Nonetheless, the mechanistic basis (if any) underlying these observations needs further examination. Of note, the elevated levels of spingosine-1-phosphate in β^+ compared to β^{++} stored RBCs, a lysophospholipid related to RBC energy metabolism regulation (Sun et al., 2016) and transfusion biology (Selim et al., 2011), predispose for favorable storability profile under hypoxic storage conditions. To support this, a previous study on G6PD deficient donors demonstrated significant correlations between baseline spingosine-1-phosphate levels and quality characteristics of stored RBCs (Reisz et al., 2017). Finally, β^0 RBCs presented decreased metabolites of the carboxylic acid, nucleotide, fatty acid and glutathione pathways when compared to the other two subgroups. RBCs from beta-thalassemic patients are characterized by decreased glutathione levels (Kalpravidh

et al., 2013) and, therefore, sustained oxidative stress that can be ameliorated by inhibitors of glutathione efflux transporters (Muanprasat et al., 2013). In the same context, serum from beta-thalassemic subjects demonstrates down-regulated fatty acid metabolism (Musharraf et al., 2017), whereas carboxylic acids and metabolites of the arginine and glutathione routes were found slightly or significantly downregulated in the lungs of murine models of beta-thalassemia (Buehler et al., 2021). According to these findings, it appears that the metabolism features of β^0 RBCs are closer to the thalassemia disease profile, even though the currently studied β^0 heterozygotes were considered eligible blood donors. Again, the metabolic profile of donated RBCs from the β^0 subgroup deserves further examination by studies in bigger cohorts.

Overall, while presenting some solid characteristics that differentiate them from control RBCs, including the highly important superior end-of-storage hemolysis and antioxidant arsenal (such as urate), βThal^+ stored RBCs also exhibit an inside-group variation. It is plausible to suspect that this variation is α -globin excess-dependent, since milder mutations lead to phenotypes closer to the average control, while severe mutations tend to phenotypic features that are closer (at some level) to the disease state. One limitation of this study that does not allow drawing of broad hypotheses is the low number of donors enrolled, especially in the group of β^0 subjects, and the small number of samples used for proteomics analyses. However, this is the first time that the special features of the βThal^+ donor subgroups are reported in the research field of RBC transfusion and donor variation effects. In fact, it would be really interesting and helpful to design large-scale studies, with βThal^+ subgroups exhibiting wider genetic heterogeneity. Such targeted research could give us the ability to draw more sound conclusions regarding the relation between the magnitude of the thalassemia imprint on RBCs and their storage quality metrics.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

REFERENCES

- Abi Habib, J., De Plaen, E., Stroobant, V., Zivkovic, D., Bousquet, M.-P., Guillaume, B., et al. (2020). Efficiency of the Four Proteasome Subtypes to Degrade Ubiquitinated or Oxidized Proteins. *Sci. Rep.* 10 (1), 15765. doi:10.1038/s41598-020-71550-5
- Anastasiadi, A. T., Arvaniti, V.-Z., Paronis, E. C., Kostomitsopoulos, N. G., Stamoulis, K., Papassideri, I. S., et al. (2022). Corpuscular Fragility and Metabolic Aspects of Freshly Drawn Beta-Thalassemia Minor RBCs Impact Their Physiology and Performance Post Transfusion: A Triangular Correlation Analysis *In Vitro* and *In Vivo*. *Biomedicines* 10, 530. doi:10.3390/biomedicines10030530
- Anastasiadi, A. T., Paronis, E. C., Arvaniti, V.-Z., Velentzas, A. D., Apostolidou, A. C., Balafas, E. G., et al. (2021a). The Post-Storage Performance of RBCs from Beta-Thalassemia Trait Donors Is Related to Their Storability Profile. *Ijms* 22 (22), 12281. doi:10.3390/ijms222212281
- Anastasiadi, A. T., Tzounakas, V. L., Arvaniti, V.-Z., Dzieciatkowska, M., Stamoulis, K., Lekka, M. E., et al. (2021b). Red Blood Cell Proteasome in Beta-Thalassemia Trait: Topology of Activity and Networking in Blood Bank Conditions. *Membranes* 11 (9), 716. doi:10.3390/membranes11090716
- Bayer, S. B., Low, F. M., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2016). Interactions Between Peroxiredoxin 2, Hemichrome and the Erythrocyte Membrane. *Free Radic. Res.* 50 (12), 1329–1339. doi:10.1080/10715762.2016.1241995
- Boussiou, M., Karababa, P., Sinopoulou, K., Tsafaridis, P., Plata, E., and Loutradi-Anagnostou, A. (2008). The Molecular Heterogeneity of β -Thalassemia in Greece. *Blood Cells, Mol. Dis.* 40 (3), 317–319. doi:10.1016/j.bcmd.2007.11.003
- Buehler, P. W., Swindle, D., Pak, D. I., Fini, M. A., Hassell, K., Nuss, R., et al. (2021). Murine Models of Sick Cell Disease and Beta-Thalassemia Demonstrate Pulmonary Hypertension with Distinctive Features. *Pulm. Circ.* 11 (4), 1–12. doi:10.1177/20458940211055996
- Cao, A., and Galanello, R. (2010). Beta-Thalassemia. *Genet. Med.* 12 (2), 61–76. doi:10.1097/GIM.0b013e3181cd68ed

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by The Ethics Committee of the Department of Biology, School of Science, NKUA. Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

VT and MA designed the study. AA, VT, and V-ZA performed the physiological experiments. MD performed the proteomic analyses. AD'A analysed the metabolomic data. AA and VT analysed the results and prepared the figures. KS and AK were responsible for the sample acquisition and the preparation of RBC units. AA, VT, and MA wrote the first draft of the manuscript. MD, V-ZA, EP, IP, KS, AD'A, and AK drafted the manuscript and contributed to the final version. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This project has received funding from the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI) and the General Secretariat for Research and Innovation (GSRI), under grant agreement No 2032.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the blood donation volunteers and the NKUA students Dimitrios Karadimas (MSc) and Christos Cristogeorgos (BSc) who contributed to a part of the physiological experiments. M. S. Jacovides Hellas S.A. is specially acknowledged for the kind offer of the LTRC blood bags. We are very grateful toward the post graduate program “Pedagogy through innovative Technologies and Biomedical approaches” for supporting this research.

- Cho, C.-S., Yoon, H. J., Kim, J. Y., Woo, H. A., and Rhee, S. G. (2014). Circadian Rhythm of Hyperoxidized Peroxiredoxin II Is Determined by Hemoglobin Autooxidation and the 20S Proteasome in Red Blood Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (33), 12043–12048. doi:10.1073/pnas.1401100111
- Contreras-Zentella, M. L., Sánchez-Sevilla, L., Suárez-Cuenca, J. A., Olguín-Martínez, M., Alatríste-Contreras, M. G., García-García, N., et al. (2019). The Role of Oxidant Stress and Gender in the Erythrocyte Arginine Metabolism and Ammonia Management in Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS One* 14 (7), e0219481. doi:10.1371/journal.pone.0219481
- D'Alessandro, A., Fu, X., Reisz, J. A., Kanas, T., Page, G. P., Stone, M., et al. (2020a). Stored RBC Metabolism as a Function of Caffeine Levels. *Transfusion* 60 (6), 1197–1211. doi:10.1111/trf.15813
- D'Alessandro, A., Fu, X., Reisz, J. A., Stone, M., Kleinman, S., Zimring, J. C., et al. (2020b). Ethyl Glucuronide, a Marker of Alcohol Consumption, Correlates with Metabolic Markers of Oxidant Stress but Not with Hemolysis in Stored Red Blood Cells from Healthy Blood Donors. *Transfusion* 60 (6), 1183–1196. doi:10.1111/trf.15811
- D'Alessandro, A., Reisz, J. A., Zhang, Y., Gehrke, S., Alexander, K., Kanas, T., et al. (2019). Effects of Aged Stored Autologous Red Blood Cells on Human Plasma Metabolome. *Blood Adv.* 3 (6), 884–896. doi:10.1182/bloodadvances.2018029629
- Ficarra, S., Tellone, E., Giardina, B., Scatena, R., Russo, A., Misiti, F., 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.* 228 (1), 43–49. doi:10.1007/s00232-009-9157-5
- Francis, R. O., D'Alessandro, A., Eisenberger, A., Soffing, M., Yeh, R., Coronel, E., et al. (2020). Donor Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Decreases Blood Quality for Transfusion. *J. Clin. Invest* 130 (5), 2270–2285. doi:10.1172/JCI133530
- Giardine, B. M., Joly, P., Pissard, S., Wajzman, H., K. Chui, D. H., Hardison, R. C., et al. (2021). Clinically Relevant Updates of the HbVar Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemia Mutations. *Nucleic Acids Res.* 49 (D1), D1192–D1196. doi:10.1093/nar/gkaa959
- Grgic, I., Kaistha, B. P., Paschen, S., Kaistha, A., Busch, C., Si, H., et al. (2009). Disruption of the Gardos Channel (KCa3.1) in Mice Causes Subtle Erythrocyte Macrocytosis and Progressive Splenomegaly. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* 458 (2), 291–302. doi:10.1007/s00424-008-0619-x
- Harboe, M. (1959). A Method for Determination of Hemoglobin in Plasma by Near-Ultraviolet Spectrophotometry. *Scand. J. Clin. Laboratory Investigation* 11, 66–70. doi:10.3109/00365515909060410
- Jain, S. K., and Lim, G. (2001). Pyridoxine and Pyridoxamine Inhibits Superoxide Radicals and Prevents Lipid Peroxidation, Protein Glycosylation, and (Na⁺ + K⁺)-ATPase Activity Reduction in High Glucose-Treated Human Erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 30 (3), 232–237. doi:10.1016/s0891-5849(00)00462-7
- Kalpravidh, R. W., Tangjaidee, T., Hatairaktham, S., Charoensakdi, R., Panichkul, N., Siritanaratkul, N., et al. (2013/2013). Glutathione Redox System In β -Thalassemia/Hb E Patients. *Sci. World J.* 2013, 1–7. doi:10.1155/2013/543973
- Kanas, T., Lanteri, M. C., Page, G. P., Guo, Y., Endres, S. M., Stone, M., et al. (2017). Ethnicity, Sex, and Age Are Determinants of Red Blood Cell Storage and Stress Hemolysis: Results of the REDS-III RBC-Omics Study. *Blood Adv.* 1 (15), 1132–1141. doi:10.1182/bloodadvances.2017004820
- Khandros, E., Thom, C. S., D'Souza, J., and Weiss, M. J. (2012). Integrated Protein Quality-Control Pathways Regulate Free α -Globin in Murine β -Thalassemia. *Blood* 119 (22), 5265–5275. doi:10.1182/blood-2011-12-397729
- Li, H., Fang, K., Peng, H., He, L., and Wang, Y. (2022). The Relationship Between Glycosylated Hemoglobin Level and Red Blood Cell Storage Lesion in Blood Donors. *Transfusion* 62 (3), 663–674. doi:10.1111/trf.16815
- Low, F. M., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2008). Peroxiredoxin 2 and Peroxide Metabolism in the Erythrocyte. *Antioxidants Redox Signal.* 10 (9), 1621–1630. doi:10.1089/ars.2008.2081
- Matte, A., Low, P. S., Turrini, F., Bertoldi, M., Campanella, M. E., Spano, D., et al. (2010). Peroxiredoxin-2 Expression Is Increased in β -Thalassemic Mouse Red Cells but Is Displaced from the Membrane as a Marker of Oxidative Stress. *Free Radic. Biol. Med.* 49 (3), 457–466. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.003
- Morris, C. R., Hamilton-Reeves, J., Martindale, R. G., Sarav, M., and Ochoa Gautier, J. B. (2017). Acquired Amino Acid Deficiencies: A Focus on Arginine and Glutamine. *Nutr. Clin. Pract.* 32, 30S–47S. doi:10.1177/0884533617691250
- Muanprasat, C., Wongborisuth, C., Pathomthongtawecheai, N., Satitsri, S., and Hongeng, S. (2013). Protection against Oxidative Stress in Beta Thalassemia/hemoglobin E Erythrocytes by Inhibitors of Glutathione Efflux Transporters. *PLoS One* 8 (1), e55685. doi:10.1371/journal.pone.0055685
- Musharraf, S. G., Iqbal, A., Ansari, S. H., Parveen, S., Khan, I. A., and Siddiqui, A. J. (2017). β -Thalassemia Patients Revealed a Significant Change of Untargeted Metabolites in Comparison to Healthy Individuals. *Sci. Rep.* 7, 42249. doi:10.1038/srep42249
- Nemkov, T., Hansen, K. C., and D'Alessandro, A. (2017). A Three-Minute Method for High-Throughput Quantitative Metabolomics and Quantitative Tracing Experiments of Central Carbon and Nitrogen Pathways. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 31 (8), 663–673. doi:10.1002/rcm.7834
- Nemkov, T., Reisz, J. A., Gehrke, S., Hansen, K. C., and D'Alessandro, A. (2019). High-Throughput Metabolomics: Isocratic and Gradient Mass Spectrometry-Based Methods. *Methods Mol. Biol.* 1978, 13–26. doi:10.1007/978-1-4939-9236-2_2
- Olivieri, N. F. (1999). The β -Thalassemias. *N. Engl. J. Med.* 341 (2), 99–109. doi:10.1056/NEJM199907083410207
- Osei-Hwedie, D. O., Kanas, T., Croix, C. S., Jessup, M., Xiong, Z., Sinchar, D., et al. (2016). Sickle Cell Trait Increases Red Blood Cell Storage Hemolysis and Post-Transfusion Clearance in Mice. *EBioMedicine* 11, 239–248. doi:10.1016/j.ebiom.2016.08.006
- Pandya, C. D., Lee, B., Toque, H. A., Mendhe, B., Bragg, R. T., Pandya, B., et al. (2019). Age-Dependent Oxidative Stress Elevates Arginase 1 and Uncoupled Nitric Oxide Synthesis in Skeletal Muscle of Aged Mice. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2019, 1–9. doi:10.1155/2019/1704650
- Reisz, J. A., Tzounakas, V. L., Nemkov, T., Voulgaridou, A. I., Papassideri, I. S., Kriebardis, A. G., et al. (2017). Metabolic Linkage and Correlations to Storage Capacity in Erythrocytes from Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase-Deficient Donors. *Front. Med.* 4, 248. doi:10.3389/fmed.2017.00248
- Reisz, J. A., Wither, M. J., Dzieciatkowska, M., Nemkov, T., Issaian, A., Yoshida, T., et al. (2016). Oxidative Modifications of Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Regulate Metabolic Reprogramming of Stored Red Blood Cells. *Blood* 128 (12), e32–e42. doi:10.1182/blood-2016-05-714816
- Rivella, S. (2012). Do Not Super-Excess Me! *Blood* 119 (22), 5064–5065. doi:10.1182/blood-2012-04-418590
- Rocha, S., Costa, E., Coimbra, S., Nascimento, H., Catarino, C., Rocha-Pereira, P., et al. (2009). Linkage of Cytosolic Peroxiredoxin 2 to Erythrocyte Membrane Imposed by Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress. *Blood Cells, Mol. Dis.* 43 (1), 68–73. doi:10.1016/j.bcmd.2009.03.002
- Romanello, K. S., Teixeira, K. K. L., Silva, J. P. M. O., Nagamatsu, S. T., Bezerra, M. A. C., Domingos, I. F., et al. (2018). Global Analysis of Erythroid Cells Redox Status Reveals the Involvement of Prdx1 and Prdx2 in the Severity of Beta Thalassemia. *PLoS One* 13 (12), e0208316. doi:10.1371/journal.pone.0208316
- Roubinian, N. H., Reese, S. E., Qiao, H., Plimier, C., Fang, F., Page, G. P., et al. (2022). Donor Genetic and Nongenetic Factors Affecting Red Blood Cell Transfusion Effectiveness. *JCI Insight* 7 (1). doi:10.1172/jci.insight.152598
- Schrier, S., and Mohandas, N. (1992). Globin-Chain Specificity of Oxidation-Induced Changes in Red Blood Cell Membrane Properties. *Blood* 79 (6), 1586–1592. doi:10.1182/blood.v79.6.1586.1586
- Selek, S., Aslan, M., Horoz, M., Gur, M., and Erel, O. (2007). Oxidative Status and Serum PON1 Activity in Beta-Thalassemia Minor. *Clin. Biochem.* 40 (5–6), 287–291. doi:10.1016/j.clinbiochem.2006.10.028
- Selim, S., Sunkara, M., Salous, A. K., Leung, S. W., Berdyshev, E. V., Bailey, A., et al. (2011). Plasma Levels of Sphingosine 1-Phosphate Are Strongly Correlated with Haematocrit, but Variably Restored by Red Blood Cell Transfusions. *Clin. Sci. (Lond)* 121 (12), 565–572. doi:10.1042/CS20110236
- Smith, A. S., Nowak, R. B., Zhou, S., Giannetto, M., Gokhin, D. S., Papoin, J., et al. (2018). Myosin IIA Interacts with the Spectrin-Actin Membrane Skeleton to Control Red Blood Cell Membrane Curvature and Deformability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115 (19), E4377–E4385. doi:10.1073/pnas.1718285115
- Stefanoni, D., Fu, X., Reisz, J. A., Kanas, T., Nemkov, T., Page, G. P., et al. (2020). Nicotine Exposure Increases Markers of Oxidant Stress in Stored Red Blood Cells from Healthy Donor Volunteers. *Transfusion* 60 (6), 1160–1174. doi:10.1111/trf.15812
- Sun, K., Zhang, Y., D'Alessandro, A., Nemkov, T., Song, A., Wu, H., et al. (2016). Sphingosine-1-Phosphate Promotes Erythrocyte Glycolysis and Oxygen

- Release for Adaptation to High-Altitude Hypoxia. *Nat. Commun.* 7, 12086. doi:10.1038/ncomms12086
- Svetina, S., Švelc Kebe, T., and Božič, B. (2019). A Model of Piezo1-Based Regulation of Red Blood Cell Volume. *Biophysical J.* 116 (1), 151–164. doi:10.1016/j.bpj.2018.11.3130
- Szczesny-Malysiak, E., Mohaissen, T., Bulat, K., Kaczmarek, M., Wajda, A., and Marzec, K. M. (2021). Sex-Dependent Membranopathy in Stored Human Red Blood Cells. *Haematol.* 106 (10), 2779–2782. doi:10.3324/haematol.2021.278895
- Terán, M. M., Mónaco, M. E., Lazarte, S. S., Haro, C., Ledesma Achem, E., Asensio, N. A., et al. (2020). Genetic Regulation of Redox Balance in β -Thalassemia Trait. *Hemoglobin* 44 (2), 122–127. doi:10.1080/03630269.2020.1765794
- Tzounakas, V. L., Anastasiadi, A. T., Dzieciatkowska, M., Karadimas, D. G., Stamoulis, K., Papassideri, I. S., et al. (2021). Proteome of Stored RBC Membrane and Vesicles from Heterozygous Beta Thalassemia Donors. *Ijms* 22 (7), 3369. doi:10.3390/ijms22073369
- Tzounakas, V. L., Anastasiadi, A. T., Stefanoni, D., Cendali, F., Bertolone, L., Gamboni, F., et al. (2022). Beta Thalassemia Minor Is a Beneficial Determinant of Red Blood Cell Storage Lesion. *Haematol.* 107 (1), 112–125. doi:10.3324/haematol.2020.273946
- Tzounakas, V. L., Kriebardis, A. G., Georgatzakou, H. T., Foudoulaki-Papazios, L. E., Dzieciatkowska, M., Wither, M. J., et al. (2016). Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficient Subjects May Be Better “Storers” Than Donors of Red Blood Cells. *Free Radic. Biol. Med.* 96, 152–165. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.005

Conflict of Interest: Though unrelated to the contents of this manuscript, AD'A declares that he is a founder of Omix Technologies Inc and Altis Biosciences LLC and a consultant for Hemanext Inc.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Anastasiadi, Tzounakas, Dzieciatkowska, Arvaniti, Papageorgiou, Papassideri, Stamoulis, D'Alessandro, Kriebardis and Antonelou. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article

Corpuscular Fragility and Metabolic Aspects of Freshly Drawn Beta-Thalassemia Minor RBCs Impact Their Physiology and Performance Post Transfusion: A Triangular Correlation Analysis In Vitro and In Vivo

Alkmini T. Anastasiadi ¹, Vasiliki-Zoi Arvaniti ¹, Efthymios C. Paronis ², Nikolaos G. Kostomitsopoulos ² , Konstantinos Stamoulis ³, Issidora S. Papassideri ¹, Angelo D'Alessandro ⁴ , Anastasios G. Kriebardis ⁵ , Vassilis L. Tzounakas ^{1,*} and Marianna H. Antonelou ^{1,*} 

¹ Department of Biology, Section of Cell Biology and Biophysics, School of Science, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), 15784 Athens, Greece; alkanast@biol.uoa.gr (A.T.A.); vazoarvaniti@gmail.com (V.-Z.A.); ipapasid@biol.uoa.gr (I.S.P.)

² Center of Clinical, Experimental Surgery & Translational Research, Biomedical Research Foundation, Academy of Athens (BRFAA), 11527 Athens, Greece; eparonis@bioacademy.gr (E.C.P.); nkostom@bioacademy.gr (N.G.K.)

³ Hellenic National Blood Transfusion Centre, Acharnes, 13677 Athens, Greece; kostas.stamoulis@gmail.com

⁴ Department of Biochemistry and Molecular Genetics, School of Medicine, Anschutz Medical Campus, University of Colorado, Aurora, CO 80045, USA; angelo.dalessandro@ucdenver.edu

⁵ Laboratory of Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology (HemQcR), Department of Biomedical Sciences, School of Health & Welfare Sciences, University of West Attica (UniWA), 12243 Egaleo, Greece; akrieb@uniwa.gr

* Correspondence: tzounak@biol.uoa.gr (V.L.T.); manton@biol.uoa.gr (M.H.A.)

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Anastasiadi, A.T.; Arvaniti, V.-Z.; Paronis, E.C.; Kostomitsopoulos, N.G.; Stamoulis, K.; Papassideri, I.S.; D'Alessandro, A.; Kriebardis, A.G.; Tzounakas, V.L.; Antonelou, M.H. Corpuscular Fragility and Metabolic Aspects of Freshly Drawn Beta-Thalassemia Minor RBCs Impact Their Physiology and Performance Post Transfusion: A Triangular Correlation Analysis In Vitro and In Vivo. *Biomedicines* **2022**, *10*, 530. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030530>

Academic Editors: Thomas Mohr and Saverio Francesco Retta

Received: 11 January 2022

Accepted: 22 February 2022

Published: 23 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The clarification of donor variation effects upon red blood cell (RBC) storage lesion and transfusion efficacy may open new ways for donor–recipient matching optimization. We hereby propose a “triangular” strategy for studying the links comprising the transfusion chain—donor, blood product, recipient—as exemplified in two cohorts of control and beta-thalassemia minor (βThal^+) donors ($n = 18$ each). It was unraveled that RBC osmotic fragility and caspase-like proteasomal activity can link both donor cohorts to post-storage states. In the case of heterozygotes, the geometry, size and intrinsic low RBC fragility might be lying behind their higher post-storage resistance to lysis and recovery in mice. Moreover, energy-related molecules (e.g., phosphocreatine) and purine metabolism factors (IMP, hypoxanthine) were specifically linked to lower post-storage hemolysis and phosphatidylserine exposure. The latter was also ameliorated by antioxidants, such as urate. Finally, higher proteasomal conservation across the transfusion chain was observed in heterozygotes compared to control donors. The proposed “triangularity model” can be (a) expanded to additional donor/recipient backgrounds, (b) enriched by big data, especially in the post-transfusion state and (c) fuel targeted experiments in order to discover new quality biomarkers and design more personalized transfusion medicine schemes.

Keywords: transfusion; donor variation; biomarkers; red blood cells; fragility; purine metabolism; energy metabolism

1. Introduction

While originally suggested by the middle of the 1960s [1], the concept of donor variation effects, namely, that blood donors' characteristics, both genetic and environmental, may affect the storability and post-transfusion efficacy of red blood cells (RBCs) [2,3], has only been established in the last decade. In terms of transfusion outcome, blood units from female donors have been proposed to be better for same-sex recipients [4,5],

whereas glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient individuals have proven to be inadequate donors [6,7]. Moreover, recovery of RBCs from obese donors seems to be lower in animal models [8], while there have also been concerns about administering blood units from smokers to pediatric patients [9,10].

The unique physiology and RBC storability of these (and many additional) distinctive donor groups may be linked to differential post-transfusion phenotypes. There is an increasing number of studies discussing the importance of linking specific physiological and metabolic characteristics of freshly drawn or stored RBCs with post-transfusion parameters of individual events [11–13] to reveal possible biomarkers of good storability or beneficial transfusion combinations and move towards more personalized transfusion schemes. For instance, the osmotic fragility of RBCs in transfusion-mimicking conditions is proportional to that of freshly drawn and stored counterparts [14]. Moreover, both storage and osmotic types of hemolysis have been negatively associated with the recovery of RBCs from obese subjects [8]. In the same context, the baseline levels of ribose phosphate in RBCs from G6PD-deficient donors positively impact their post-transfusion recovery, but storage levels of hypoxanthine have the opposite effect [7], a finding also evident in G6PD-normal donors [15]. Finally, a recent retrospective study linked donor polymorphisms in myosin IXB and hemoglobin alpha 2 with decreased hemoglobin increment post transfusion [13]. Most of the studies either link (a) the donor with the blood unit or the post-transfusion efficacy or (b) the blood unit with post-storage parameters. We hereby propose a more “complete” model to study the transfusion chain, by performing paired donor-blood unit-recipient analyses and trying to link—directly or indirectly—freshly drawn blood characteristics with transfusion outcomes. To better clarify the proposed analysis method, we applied it to RBCs from average control and beta-thalassemia minor donors pre-, during and post-storage, using in vitro and in vivo models of transfusion.

Circulating RBCs from donors with beta-thalassemia traits (βThal^+) differ from those of the general population, especially regarding their osmotic fragility and energy metabolism [16]. When stored, βThal^+ RBCs are resistant to lysis and to membrane/cytoskeleton disruptions and are also able to counteract oxidative and proteotoxic insults [16–18]. In the final step of the transfusion chain, βThal^+ RBCs maintain their resilience against rupture and augmented proteasome activity in an in vitro model of transfusion and they also exhibit a slightly superior recovery in mouse recipients [19]. Since we have already found some statistical links between storage and post-storage phenotypes, we proceeded to search for links between in vivo and (a) storage or (b) post-storage variables. Thus, the aim of the present study was the investigation of any direct or indirect connection between in vivo and post-storage/post-transfusion variables of donated control and βThal^+ RBCs by bypassing the blood unit or passing through it (Figure 1). Such an analysis will help (a) discover easily accessible candidate biomarkers of post-storage performance and (b) reveal the links between the baseline physiology of βThal^+ RBCs and their superior post-storage characteristics.

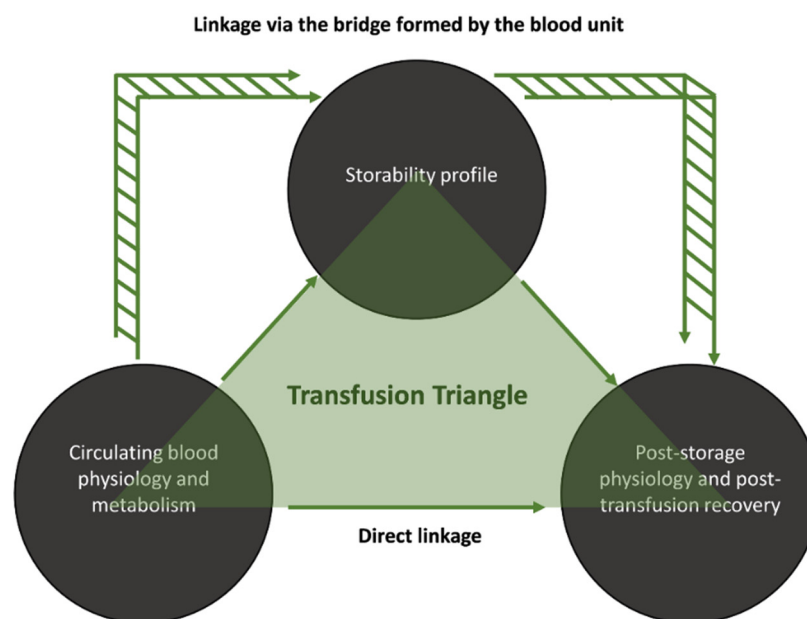


Figure 1. Study design. Proposed routes for the linkage between donor parameters and post-storage/post-transfusion variables.

2. Materials and Methods

2.1. Biological Samples

Freshly drawn blood in citrate vacutainers and leukoreduced units of RBCs stored in citrate–phosphate–dextrose (CPD)/saline–adenine–glucose–mannitol (SAGM) from 18 control and 18 beta-thalassemia heterozygotes were analyzed as previously reported [16–19] for a significant number (approximately 300 or 700 variables in freshly drawn or stored samples, respectively) of quantitative hematological, biochemical, hemolysis (storage, osmotic, mechanical, oxidative), redox (extracellular antioxidant capacity), metabolome and proteome parameters. Heterozygosity was confirmed by Hb electrophoresis and molecular identification of mutations (including the common Mediterranean mutations IVS I-1, IVS I-6, IVS I-110, IVS II-1 and IVS II-745) [16]. All studies were approved by the Ethics Committee of the Department of Biology, School of Science, NKUA and investigations were carried out with donor consent, in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

2.2. Post-Storage Experiments

Stored RBCs from 10 units per group were reconstituted in plasma from healthy and transfusion-dependent beta-thalassemia major subjects ($n = 10$ per group) in a RBC/plasma volume ratio corresponding to transfusion of two RBC units. Then, the reconstituted samples were incubated for 24 h at body temperature before measuring several hemolysis and redox parameters, as previously reported [19]. Freshly drawn and stored RBCs from the remaining eight donors per group were transfused to immunosufficient (C57BL/6J) and immunodeficient (NOD.CB17-Prkdcscid/J) mice to assess their 24 h recovery [19]. The study was approved by the Department of Agriculture and Veterinary Service of the Prefecture of Athens (Permit Number: 534915, 23 July 2020).

2.3. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the statistical package SPSS Version 22.0 (IBM Hellas, Athens, Greece, administered by NKUA) and significance was accepted at $p < 0.05$ according to the following rationale, graphically presented in Figure 1. Considering that the aim of the present study is to reveal potential linkages between the pre- and post-storage states of RBCs, there are two possible paths to follow, which in combination

produce a “transfusion triangle”: (a) the direct one, namely, “pre-storage to post-storage” that bypasses the storage itself and (b) the indirect one, which links freshly drawn blood to storage and subsequently storage to post-storage variables. In the second case, the parameters connecting pre- and post-storage states via the storage bridge had to satisfy the Bonferroni-like adjustment for multiple comparisons. In this context, we examined, for the first time, possible connections between freshly drawn blood and either stored or reconstituted/transfused RBCs. Moreover, we evaluated which of the previously reported storage/post-storage connections [19] satisfy the new statistical criteria. Correlations between freshly drawn, stored and post-storage parameters (including recovery in animal models) were evaluated by the Pearson’s test following examination of the variables for normal distribution and the presence of outliers (Shapiro–Wilk, Kolmogorov–Smirnov tests and detrended normal Q–Q plots). Since Pearson’s test is highly sensitive to outliers, such values were excluded, and the analysis was performed again to minimize the false discovery rate associated with the small size of our groups. If the outcome was not modified, the outlier was included back in the subgroup. In addition, all correlations were also validated by Spearman’s test. Regarding links between non-stored and stored samples, only correlations that were evident at every time-point of storage (weekly measurements) were accepted as reliable. This was also the case for the links between non-stored/stored and post-storage variables, where both time-points (early and late storage) and plasma environments (healthy and beta-thalassemic) were considered, unless otherwise stated.

3. Results

3.1. Transfusion Triangles Evident in Both Donor Cohorts

In order to determine whether the currently proposed model can provide new information, we applied it to control and βThal^+ donor groups. The triangularity analysis highlighted two physiological parameters in both cohorts studied: osmotic fragility and caspase-like (CASP-like) proteasomal activity. Regarding osmotic hemolysis, the pre-storage levels were proportional to those of storage and post-storage in vitro states, with an interesting strong intra-correlation linkage present between the stored and reconstituted samples (Figures 2 and 3A). In addition, CASP-like activity during storage was proportional to the one before, and furthermore positively correlated with the post-storage levels in vitro (Figures 2 and 4B).

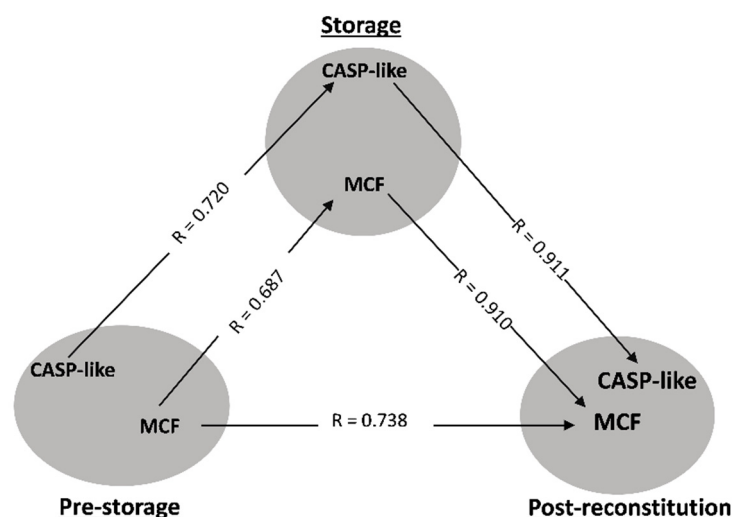


Figure 2. Statistically significant correlations between freshly drawn blood, stored, and reconstituted RBCs from control donors. The correlation triangles focus on osmotic fragility (MCF) and caspase-like (CASP-like) proteasomal activity. All connections represent repeatable (at every recipient plasma and storage time-point measured) significant correlations. The R-values concern late storage and thalassemic plasma.

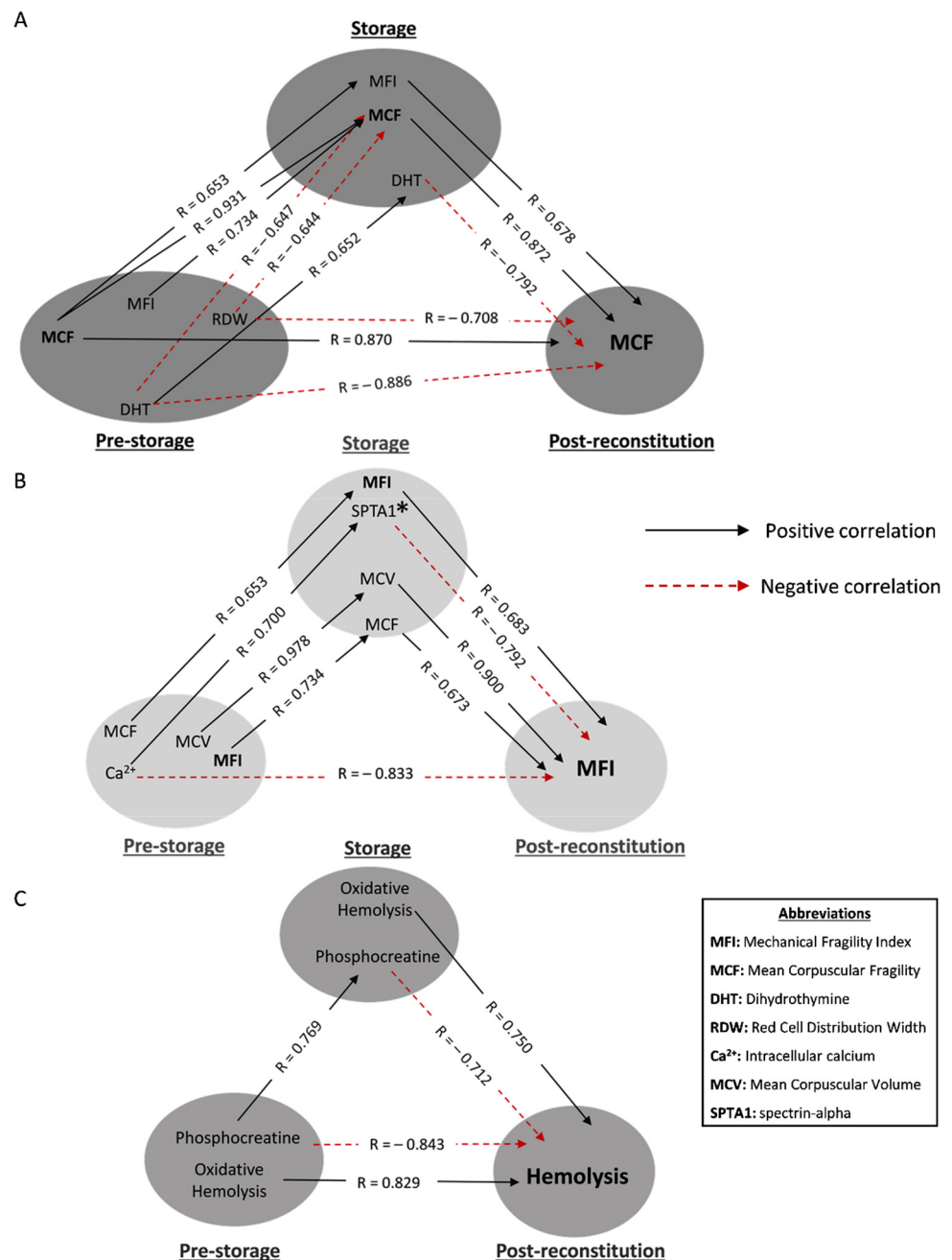


Figure 3. Statistically significant hemolysis correlations between freshly drawn blood, stored, and reconstituted RBCs from beta-thalassemia trait (βThal^+) donors. The correlation triangles focus on (A) osmotic, (B) mechanical and (C) spontaneous hemolysis of reconstituted samples. All connections represent repeatable (at every recipient plasma and storage time-point measured) significant correlations. The R-values concern late storage and thalassemic plasma. * SPTA1 was used as an example of an array of structural components that correlate with MFI (e.g., ankyrin-1, glycophorin C and 4.2 protein).

Besides these two parameters, which formed “complete” (three connections) or “partial” (two connections) transfusion triangles in both the average control and βThal^+ donors, there were additional variables that satisfied the triangularity criteria in the case of heterozygotes, as described in the following paragraphs.

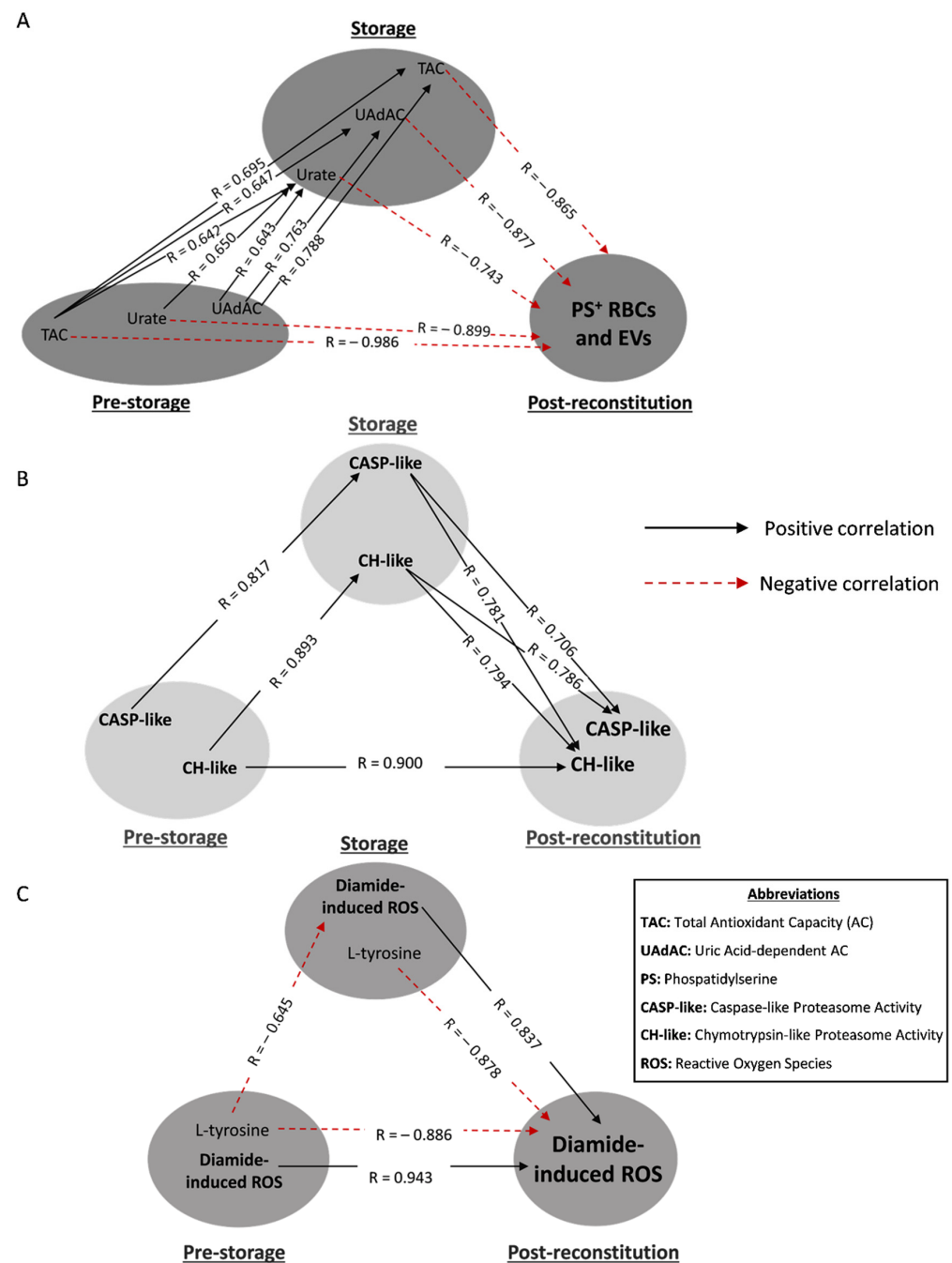


Figure 4. Statistically significant redox-related correlations between freshly drawn blood, stored, and reconstituted RBCs from beta-thalassemia trait (βThal^+) donors. The correlation triangles focus on (A) PS-exposing RBCs and extracellular vesicles (EVs), (B) proteasome activity and (C) diamide-induced intracellular ROS of reconstituted samples. All connections represent repeatable (at every recipient plasma and storage time-point measured) significant correlations. The R-values concern late storage and thalassemic plasma. Antioxidant capacities of (A) are extracellular, while urate is the intracellular metabolite.

3.2. Hemolysis-Related Transfusion Triangles in βThal^+

Initially, we focused on transfusion triangles targeting post-storage hemolysis profiles (Figure 3).

The osmotically induced hemolysis of freshly drawn βThal^+ RBCs positively correlated with the mechanically induced one in the unit, which was in turn linked to osmotic

fragility post storage (Figure 3A). The first link was also observed vice versa, i.e., the mechanical fragility pre-storage was associated with the osmotic fragility during storage. Moving on to negative correlations, the red cell distribution width (RDW) index of freshly drawn RBCs was inversely associated with the osmotic hemolysis of both stored and reconstituted samples, as was the case for dihydrothymine, too. This metabolite presented stored levels proportional to the in vivo ones and inversely proportional to the osmotic fragility post reconstitution (Figure 3A).

The mechanical hemolysis of reconstituted samples positively correlated with both the mechanical and osmotic fragility of stored RBCs, as well as with their mean corpuscular volume (MCV), which varied proportionally to the in vivo levels (Figure 3B). An interesting finding was the direct negative link between the baseline levels of intracellular calcium and mechanical hemolysis under in vitro recipient-mimicking conditions. This link was broken in the other two sides of the triangle by (a) a positive correlation of calcium with integral membrane/cytoskeletal proteins of stored RBCs and (b) a subsequent negative correlation of the latter with the mechanical fragility index post storage (Figure 3B).

The levels of spontaneous hemolysis post storage in the same donor group were positively related to the oxidatively induced hemolysis levels of both freshly drawn and stored RBCs (Figure 3C). A “complete triangle” was formed for the following parameter as well: the in vivo and storage levels of phosphocreatine were correlated with each other, and both of them seemed to negatively affect post-storage hemolysis (Figure 3C).

3.3. Redox- and Proteostasis-Related Transfusion Triangles in β Thal⁺

Concerning the antioxidant power of the RBC units, the levels of total (TAC) and uric acid-dependent antioxidant capacities (UAdAC) of fresh β Thal⁺ plasma intra- and inter-correlated with the respective levels in the supernatant, as well as with the intracellular levels of urate in stored RBCs. Moreover, all three storage parameters were negatively associated with the externalization of phosphatidylserine (PS) and the production of PS⁺ extracellular vesicles (EVs) under recipient-mimicking conditions (Figure 4A). Urate also presented an intra-correlation between fresh and stored RBCs. Remarkably, two “complete triangles” were formed since the in vivo levels of both TAC and urate were also directly inversely linked to the PS⁺ RBCs and EVs post storage (Figure 4A).

In the case of proteasome, the (mainly cytosolic) levels of chymotrypsin-like (CH-like) activity were linked with each other in a “complete transfusion triangle” (Figure 4B). Notably, the storage levels of CASP-like and CH-like activities positively correlated with their levels post storage (Figure 4B).

The accumulation of reactive oxygen species (ROS) post stimulation of reconstituted β Thal⁺ RBCs with thiol-oxidizing agents (in our case, diamide), was proportional to the in vivo and storage levels (Figure 4C). On the contrary, the levels of L-tyrosine either in freshly drawn RBCs or their stored counterparts seem to be inversely linked to the production of diamide-induced ROS in both stored and reconstituted RBCs (Figure 4C).

3.4. Direct Linkages of Freshly Drawn β Thal⁺ RBCs to Transfusion Variables In Vitro and In Vivo

Finally, some interesting correlations were evident between freshly drawn and reconstituted/transfused β Thal⁺ RBCs, as shown in Figure 5.

The levels of spontaneous hemolysis in the reconstituted samples were negatively associated with those of ATP, pyridoxamine and phosphoethanolamine of freshly drawn RBCs (Figure 5A). Regarding the two RBC fragilities post storage, the mechanical and the osmotic, they were positively or negatively related to the in vivo levels of IMP and maltose/sucrose, respectively. Interestingly, there was a positive correlation of the pre-storage erythrocytic hypoxanthine with the post-storage exposure of PS, along with an inverse linkage between ATP and PS⁺ EVs of the same RBC states. Of note, the in vivo levels of 2,3-bisphosphoglycerate negatively correlated with the magnitude of lipid peroxidation in the reconstituted samples' membrane (Figure 5A). Some of the above-mentioned correlations (e.g., in vivo levels of ATP and hemolysis post storage ($R^2 = 0.568$, $p = 0.141$), in vivo

levels of 2,3-BPG and lipid peroxidation post storage ($R^2 = 0.528$, $p = 0.165$)) presented the same trend in the control group, too. However, the smaller number of paired control samples compared to the βThal^+ pairs rendered the statistical analysis highly unsound in this cohort. Last but not least, osmotic and mechanical fragilities of freshly drawn βThal^+ RBCs exhibited an inverse link with their 24 h recovery in mouse recipients (Figure 5B). In this case, the linkage is strongly related to the physiology of the βThal^+ RBCs, since it did not emerge in the control cohort which consisted of in vivo vs. transfused RBC pairs equal to βThal^+ ($R^2 = 0.355$ for osmotic and $R^2 = 0.298$ for mechanical fragility, $p > 0.05$).

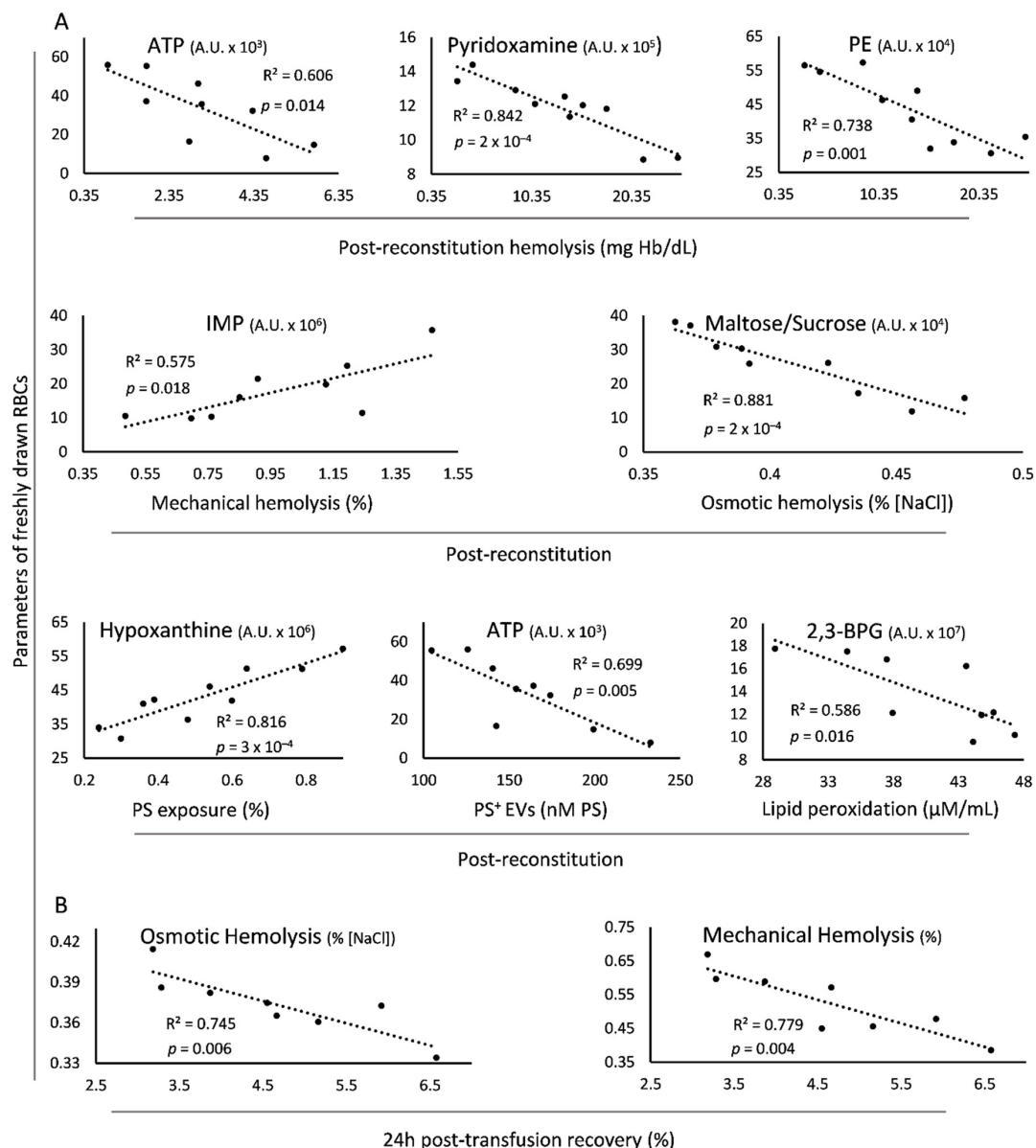


Figure 5. Statistically significant correlations of parameters of freshly drawn blood with the post-reconstitution physiology and 24 h recovery of beta-thalassemia trait (βThal^+) donated RBCs. (A) Baseline levels of metabolites correlating with physiological parameters of reconstituted RBCs. (B) Baseline fragility indices correlating with post-transfusion recovery in mice. The selected scatterplots concern late storage, thalassemic plasma (A) and C57BL/6J mice (B), but significant connections (with slightly different R^2 values) were evident at every condition tested (i.e., early/late storage, control/thalassemic plasma, immunodeficient/sufficient mice), with the exception of ATP and hemolysis, a correlation evident only in early storage. PE: phosphoethanolamine; 2,3-BPG: 2,3-bisphosphoglycerate; PS: phosphatidylserine; EVs: extracellular vesicles.

4. Discussion

We hereby propose a paired “triangular” model for studying the transfusion chain, presenting it through a correlation analysis of paired donor–storage–post-storage data. Interestingly, out of hundreds of variables tested in freshly drawn blood and stored RBCs, two parameters stood out, fulfilling the triangularity criteria in both the average and genetically distinct βThal^+ donor groups: osmotic fragility and CASP-like proteasome activity, which have the potential to link donors to post-storage RBC features, at least in vitro. Furthermore, we provide evidence regarding a well-characterized and homogeneous (in terms of RBC geometry, proteostasis and metabolism) donor group, in which a variety of fragility and redox parameters, along with metabolites of purine and energy pathways, seem to be linked directly or indirectly to their overall superior post-storage phenotypes.

The currently proposed triangular approach of transfusion research has the potential to provide reliable and statistically solid links between donors, blood units and post-storage/post-transfusion metrics (probably recipient factors, too). It also highlights the significance of (a) cellular indices that may affect RBC performance, as with the case of sub-lethal storage lesions in βThal^+ RBCs and (b) direct linking between donor attributes and transfusion outcomes, which presuppose analyses in freshly drawn blood. Regarding the first point, the correlation profile of sublethal defects versus the typical hemolysis metric stands as a representative example. It seems that the multiparametric nature of spontaneous hemolysis [20] does not allow for the completion of a transfusion triangle, while at the same time both osmotic and mechanical fragilities arise as candidate biomarkers of RBC physiology and 24 h post-transfusion recovery in mice. As for the second observation, notable potential links of donor characteristics (including RBC metabolism) with the post-transfusion performance have been lately reported in obese and G6PD-deficient donor groups [7,8]. However, the need for such paired studies cannot a priori bypass the storage factor since the blood unit represents a dynamic rather than a static state (i.e., aging pathways related to both storage and metabolic time) that links donors to recipients in time and space; therefore, it is important to consider both the links between freshly drawn and stored blood [21,22], as well as those between stored and transfused blood [7,19].

Paired analyses, like the one presented in our study, can serve as the first step in elucidating biomarkers of storage and transfusion quality out of a large number of metrics that arise through the implementation of high- or low-throughput techniques. Such studies can feed more targeted experimental approaches in larger cohorts and different donor groups to validate, expand or reject hypotheses that lean on initial observations. Whatever the result of the latter approaches might be, the search for donor/recipient signatures in specific transfusion events will narrow, step by step, the distance between where we currently stand and the much-anticipated future of precise transfusion medicine. Such information can also guide blood logistics strategies in periods of inventory shortage, such as the one imposed worldwide by the COVID-19 pandemic.

The application of the proposed model expanded the previously reported [14] biomarker potential of osmotic fragility since the direct connection between the pre-donation and post-storage levels completed the transfusion triangle in both donor cohorts. However, in terms of post-transfusion performance, it seems plausible that the low susceptibility of βThal^+ RBCs to both osmotic and mechanical lysis benefits them in the circulation of transfused mice mainly due to their unique geometry and membrane/cytoskeleton proteome [18,23] in comparison to controls. The contribution of cell size and geometry to the mechanical and osmotic stability of stored/reconstituted βThal^+ RBCs is also hinted at by the presence of hematological indices, such as MCV and RDW in the respective transfusion triangles. The lower volume (MCV: 70.4 ± 5.8 vs. 85.2 ± 4.6 fL, βThal^+ vs. control in vivo), expressed (directly or indirectly) by the above-mentioned variables, probably protects the cells from stress-induced rupture, a hypothesis consistent with the previously observed positive correlation between RDW and osmotic stability in diabetic samples [24]. The size and shape of these cells might also be one of the reasons behind the special interplay between mechanical and osmotic fragility. It should be noted that the effect of both fragilities

(in vivo and during storage [19]) upon recovery emphasizes the importance of sublethal storage lesions in the efficacy of transfusion therapy.

The metabolism of β Thal⁺ cells was found to be tightly related to several physiological features. Breakdown intermediates of pyrimidines and purines were found to be “connected” positively or negatively, respectively, to cell fragility and the exposure of removal signals. Focusing on purine metabolism, the negative association between in vivo levels of IMP and mechanical hemolysis post storage came as no surprise in the light of the formerly revealed positive correlations between IMP and storage hemolysis in control samples [25]. In the same context, the observed positive correlation between hypoxanthine and PS externalization, either in cells or vesicles, comes to support the previously shown negative effect of this metabolite upon post-transfusion recovery [15]. Of note, both parameters present lower baseline levels in heterozygotes when compared to controls [16]. High-energy compounds, such as ATP, along with glycolysis intermediates, constitute frequently occurring beneficial biomarkers in transfusion medicine [20,25–27], hence their currently observed protective properties with regards to lysis (e.g., in vivo ATP and spontaneous post-storage hemolysis) and oxidative stress-related (e.g., in vivo 2,3-bisphosphoglycerate and post-storage lipid peroxidation) variables in both β Thal⁺ and control (though as a trend). This regular emergence of energy-related molecules in such analyses, both ex vivo and in vivo, is consistent with the abundance of volume-regulating channels, membrane-asymmetry maintaining molecules and antioxidants that rely on the energy reservoir of the cells [28]. An interesting observation was the linkage of post-reconstitution β Thal⁺ osmotic hemolysis with maltose/sucrose, oligosaccharides known to decrease the membrane lesions on frozen RBCs [29]. Another energy-related molecule, phosphocreatine, was found to anticorrelate with spontaneous hemolysis post-storage, forming another “complete transfusion triangle” in heterozygotes. Apart from providing energy-based support, this molecule is also known to interact with the membrane in a protective manner [30], as previously supported by its negative association with hemolysis in early storage [25].

As in the case of phosphocreatine, the donor levels of antioxidant pyridoxamine—the storage levels of which also anticorrelate with post-storage hemolysis [19]—similarly possesses biomarker potential in β Thal⁺ RBCs. Pyridoxamine, which has been found to be elevated in these RBCs [16], plays a significant cytoprotective role by eliminating free radicals and maintaining Na⁺/K⁺-ATPase activity [31]. On the other hand, susceptibility to oxidative lysis, either before or during storage, seems to increase the propensity to spontaneous lysis after exposure of β Thal⁺ RBCs to plasma and body temperature. Indeed, hemoglobin oxidation is associated with cellular aging, loss of integrity and, consequently, hemolysis during cryopreservation [32]. In the same context, the interplay between the redox active amino acid L-tyrosine, known for its radical scavenging properties [33], and the generation of ROS with thiol-targeting reagents was rather anticipated.

The most integrated transfusion triangle in our study was the one connecting the antioxidant powers (extra- and intra-cellular) with the post-storage exposure of PS in β Thal⁺ RBCs. The mitigation of oxidative stress inside and outside the cell, mediated by non-enzymatic antioxidants, such as urate, appears to be associated with a decrease in PS exposure. The slightly elevated, though within normal range, baseline levels of Ca²⁺ in β Thal⁺ cells [16] seemed to affect neither the lipid bilayer asymmetry [34] nor calpain recruitment to the membrane [18] but, on the contrary, they positively correlated to a superior cytoskeleton preservation, “protecting”—directly or not—the mechanical integrity of the cell. Calcium cations participate in a huge variety of intracellular metabolic and signaling networks in RBCs [35], including the reversible loosening of the cytoskeleton during passage through low-diameter capillaries [35] and the tyrosine phosphorylation of Band 3 (increased in stored β Thal⁺ membranes [18]) that may energetically support the RBC through unbinding of glycolytic enzymes [36]. Interestingly, a part of the proteostasis of RBCs, the CH-like and CASP-like proteasome activities, is highly preserved both in bag and post storage, highlighting the proteasome as a strong β Thal⁺-specific feature in RBCs previously reported to exhibit unique proteo-vigilance abilities during storage [17].

Overall, the application of the currently proposed approach to our donor cohorts provided interesting (either anticipated or biologically reasonable) information and unraveled variables as potential biomarkers of RBC performance. The abundance of transfusion triangles in the group of β Thal minor donors reflects the “compactness” of this cohort in regard to several of the currently measured parameters. It may also be associated with the fact that a significant part of the freshly drawn blood variables (e.g., cellular fragilities, intracellular Ca^{2+} , pyridoxamine, extracellular antioxidant capacity) that are linked—directly or indirectly—to post-storage physiology or performance differ between β Thal⁺ and control donors from the time of donation or during storage, too [16]. On the other hand, there are also parameters, such as proteasome activities, dihydrothymine or phosphocreatine, with control range variation which satisfy the “triangularity criterion” only in β Thal⁺ donors, indicating a unique, β Thal⁺-related variability. Although it is tempting to hypothesize the presence of thresholds producing differential correlation profiles in distinct genetic subgroups (in our case, β Thal⁺ carriers with Hb levels > 13.5 g/dL) the small size of our cohort cannot allow us to draw strict conclusions for such cut-off values.

In conclusion, we strongly believe that the application of the triangularity approach to wide cohorts of average donors and to different donor/recipient backgrounds, as well as its enrichment by omics data (genomics, lipidomics, metabolomics, proteomics, modifomics, etc.) corresponding to RBCs, plasma and extracellular vesicles may lead to the discovery of a significant number of candidate biomarkers for assessing the transfusion quality of RBCs.

Author Contributions: Conceptualization, V.L.T. and M.H.A.; methodology, E.C.P., A.D., V.L.T. and M.H.A.; validation, A.T.A., A.D. and V.L.T.; formal analysis, A.T.A., V.-Z.A. and V.L.T.; investigation, A.T.A., V.-Z.A., E.C.P. and V.L.T.; resources, N.G.K., K.S., I.S.P., A.D., A.G.K. and M.H.A.; data curation, A.T.A. and V.L.T.; writing—original draft preparation, A.T.A., V.L.T. and M.H.A.; writing—review and editing, V.-Z.A., E.C.P., N.G.K., K.S., I.S.P., A.D. and A.G.K.; visualization, A.T.A. and V.L.T.; supervision, N.G.K., A.D., V.L.T. and M.H.A.; project administration, V.L.T. and M.H.A.; funding acquisition, V.L.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project has received funding from the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI) and the General Secretariat for Research and Innovation (GSRI), under grant agreement No. 2032.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Department of Biology, School of Science, NKUA (IRB301214/30-12-2015), the Department of Agriculture and Veterinary Service of the Prefecture of Athens (534915/23-07-2020) and the Bioethics Committee of Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens (BRFAA) (69/6-7-2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All data presented in this study are available upon request.

Acknowledgments: The authors would like to thank Dimitrios G. Karadimas, Christos Christogeorgos, Christos Lialias and Vassiliki Kourkouva for their participation in a part of the storage/in vitro experiments in the context of their master’s and bachelor’s theses; Evangelos Balafas, Anastasia Apostolidou, Pavlos Alexakos and Konstantinos Paschidis for their contribution in the initial in vivo experiments.

Conflicts of Interest: Though unrelated to the contents of this manuscript, A.D. declares that he is a founder of Omix Technologies Inc. and Altis Biosciences LLC and a consultant for Hemanext Inc.

References

1. Dern, R.J.; Gwinn, R.P.; Wiorkowski, J.J. Studies on the preservation of human blood. I. Variability in erythrocyte storage characteristics among healthy donors. *J. Lab. Clin. Med.* **1966**, *67*, 955–965. [PubMed]
2. Tzounakas, V.L.; Kriebardis, A.G.; Papassideri, I.S.; Antonelou, M.H. Donor-variation effect on red blood cell storage lesion: A close relationship emerges. *Proteom. Clin. Appl.* **2016**, *10*, 791–804. [CrossRef] [PubMed]
3. Roubinian, N.H.; Plimier, C.; Woo, J.P.; Lee, C.; Bruhn, R.; Liu, V.X.; Escobar, G.J.; Kleinman, S.H.; Triulzi, D.J.; Murphy, E.L.; et al. Effect of donor, component, and recipient characteristics on hemoglobin increments following red blood cell transfusion. *Blood* **2019**, *134*, 1003–1013. [CrossRef]

4. Kanas, T.; Sinchar, D.; Osei-Hwedie, D.; Baust, J.J.; Jordan, A.; Zimring, J.C.; Waterman, H.R.; de Wolski, K.S.; Acker, J.P.; Gladwin, M.T. Testosterone-dependent sex differences in red blood cell hemolysis in storage, stress, and disease. *Transfusion* **2016**, *56*, 2571–2583. [\[CrossRef\]](#)
5. Zeller, M.P.; Rochweg, B.; Jamula, E.; Li, N.; Hillis, C.; Acker, J.P.; Runciman, R.J.R.; Lane, S.J.; Ahmed, N.; Arnold, D.M.; et al. Sex-mismatched red blood cell transfusions and mortality: A systematic review and meta-analysis. *Vox Sang.* **2019**, *114*, 505–516. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Tzounakas, V.L.; Kriebardis, A.G.; Georgatzakou, H.T.; Foudoulaki-Paparizos, L.E.; Dzieciatkowska, M.; Wither, M.J.; Nemkov, T.; Hansen, K.C.; Papassideri, I.S.; D'Alessandro, A.; et al. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient subjects may be better “storers” than donors of red blood cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *96*, 152–165. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Francis, R.O.; D'Alessandro, A.; Eisenberger, A.; Soffing, M.; Yeh, R.; Coronel, E.; Sheikh, A.; Rapido, F.; la Carpia, F.; Reisz, J.A.; et al. Donor glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency decreases blood quality for transfusion. *J. Clin. Invest.* **2020**, *130*, 2270–2285. [\[CrossRef\]](#)
8. Hazegh, K.; Fang, F.; Bravo, M.D.; Tran, J.Q.; Muench, M.O.; Jackman, R.P.; Roubinian, N.; Bertolone, L.; D'Alessandro, A.; Dumont, L.; et al. Blood donor obesity is associated with changes in red blood cell metabolism and susceptibility to hemolysis in cold storage and in response to osmotic and oxidative stress. *Transfusion* **2021**, *61*, 435–448. [\[CrossRef\]](#)
9. Boehm, R.; Cohen, C.; Pulcinelli, R.; Caletti, G.; Balsan, A.; Nascimento, S.; Rocha, R.; Calderon, E.; Saint’Pierre, T.; Garcia, S.; et al. Toxic elements in packed red blood cells from smoker donors: A risk for paediatric transfusion? *Vox Sang.* **2019**, *114*, 808–815. [\[CrossRef\]](#)
10. Stefanoni, D.; Fu, X.; Reisz, J.A.; Kanas, T.; Nemkov, T.; Page, G.P.; Dumont, L.; Roubinian, N.; Stone, M.; Kleinman, S.; et al. Nicotine exposure increases markers of oxidant stress in stored red blood cells from healthy donor volunteers. *Transfusion* **2020**, *60*, 1160–1174. [\[CrossRef\]](#)
11. D'Alessandro, A.; Nemkov, T.; Reisz, J.; Dzieciatkowska, M.; Wither, M.J.; Hansen, K.C. Omics markers of the red cell storage lesion and metabolic linkage. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* **2017**, *15*, 137–144. [\[CrossRef\]](#)
12. Tzounakas, V.L.; Kriebardis, A.G.; Seghatchian, J.; Papassideri, I.S.; Antonelou, M.H. Unraveling the Gordian knot: Red blood cell storage lesion and transfusion outcomes. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* **2017**, *15*, 126–130. [\[CrossRef\]](#)
13. Roubinian, N.H.; Reese, S.E.; Qiao, H.; Plimier, C.; Fang, F.; Page, G.P.; Cable, R.G.; Custer, B.; Gladwin, M.T.; Goel, R.; et al. Donor genetic and non-genetic factors affecting red blood cell transfusion effectiveness. *JCI Insight* **2022**, *7*, e152598. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Tzounakas, V.L.; Anastasiadi, A.T.; Valsami, S.I.; Stamoulis, K.E.; Papageorgiou, E.G.; Politou, M.; Papassideri, I.S.; Kriebardis, A.G.; Antonelou, M.H. Osmotic hemolysis is a donor-specific feature of red blood cells under various storage conditions and genetic backgrounds. *Transfusion* **2021**, *61*, 2538–2544. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Nemkov, T.; Sun, K.; Reisz, J.A.; Song, A.; Yoshida, T.; Dunham, A.; Wither, M.J.; Francis, R.O.; Roach, R.C.; Dzieciatkowska, M.; et al. Hypoxia modulates the purine salvage pathway and decreases red blood cell and supernatant levels of hypoxanthine during refrigerated storage. *Haematologica* **2018**, *103*, 361–372. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Tzounakas, V.L.; Anastasiadi, A.T.; Stefanoni, D.; Cendali, F.; Bertolone, L.; Gamboni, F.; Dzieciatkowska, M.; Rousakis, P.; Vergaki, A.; Soulikis, V.; et al. Beta thalassemia minor is a beneficial determinant of red blood cell storage lesion. *Haematologica* **2022**, *107*, 112–125. [\[CrossRef\]](#)
17. Anastasiadi, A.T.; Tzounakas, V.L.; Arvaniti, V.Z.; Dzieciatkowska, M.; Stamoulis, K.; Lekka, M.E.; Papassideri, I.S.; D'Alessandro, A.; Kriebardis, A.G.; Antonelou, M.H. Red blood cell proteasome in beta-thalassemia trait: Topology of activity and networking in blood bank conditions. *Membranes* **2021**, *11*, 716. [\[CrossRef\]](#)
18. Tzounakas, V.L.; Anastasiadi, A.T.; Dzieciatkowska, M.; Karadimas, D.G.; Stamoulis, K.; Papassideri, I.S.; Hansen, K.C.; D'Alessandro, A.; Kriebardis, A.G.; Antonelou, M.H. Proteome of stored RBC membrane and vesicles from heterozygous beta thalassemia donors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3369. [\[CrossRef\]](#)
19. Anastasiadi, A.T.; Paronis, E.C.; Arvaniti, V.Z.; Velentzas, A.D.; Apostolidou, A.C.; Balafas, E.G.; Dzieciatkowska, M.; Kostomit-sopoulos, N.G.; Stamoulis, K.; Papassideri, I.S.; et al. The post-storage performance of RBCs from beta-thalassemia trait donors is related to their storability profile. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12281. [\[CrossRef\]](#)
20. Reisz, J.A.; Tzounakas, V.L.; Nemkov, T.; Voulgaridou, A.I.; Papassideri, I.S.; Kriebardis, A.G.; D'Alessandro, A.; Antonelou, M.H. Metabolic linkage and correlations to storage capacity in erythrocytes from glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient donors. *Front. Med.* **2017**, *4*, 248. [\[CrossRef\]](#)
21. Hazegh, K.; Anawalt, B.D.; Dumont, L.J.; Kanas, T. Toxic masculinity in red blood cell units? Testosterone therapy in blood donors revisited. *Transfusion* **2021**, *61*, 3174–3180. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. D'Alessandro, A.; Fu, X.; Kanas, T.; Reisz, J.A.; Culp-Hill, R.; Guo, Y.; Gladwin, M.T.; Page, G.; Kleinman, S.; Lanteri, M.; et al. Donor sex, age and ethnicity impact stored red blood cell antioxidant metabolism through mechanisms in part explained by glucose 6-phosphate dehydrogenase levels and activity. *Haematologica* **2021**, *106*, 1290–1302. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Page, G.P.; Kanas, T.; Guo, Y.J.; Lanteri, M.C.; Zhang, X.; Mast, A.E.; Cable, R.G.; Spencer, B.R.; Kiss, J.E.; Fang, F.; et al. Multiple-ancestry genome-wide association study identifies 27 loci associated with measures of hemolysis following blood storage. *J. Clin. Invest.* **2021**, *131*, e146077. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

24. Knychala, M.A.; Garrote-Filho, M.D.S.; Batista da Silva, B.; Neves de Oliveira, S.; Yasminy Luz, S.; Marques Rodrigues, M.O.; Penha-Silva, N. Red cell distribution width and erythrocyte osmotic stability in type 2 diabetes mellitus. *J. Cell. Mol. Med.* **2021**, *25*, 2505–2516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Alexander, K.; Hazegh, K.; Fang, F.; Sinchar, D.; Kiss, J.E.; Page, G.P.; D'Alessandro, A.; Kanas, T. Testosterone replacement therapy in blood donors modulates erythrocyte metabolism and susceptibility to hemolysis in cold storage. *Transfusion* **2021**, *61*, 108–123. [[CrossRef](#)]
26. Nakao, K.; Wada, T.; Kamiyama, T.; Nakao, M.; Nagano, K. A direct relationship between adenosine triphosphate-level and in vivo viability of erythrocytes. *Nature* **1962**, *194*, 877–878. [[CrossRef](#)]
27. Van't Erve, T.J.; Wagner, B.A.; Martin, S.M.; Knudson, C.M.; Blendowski, R.; Keaton, M.; Holt, T.; Hess, J.R.; Buettner, G.R.; Ryckman, K.K.; et al. The heritability of hemolysis in stored human red blood cells. *Transfusion* **2015**, *55*, 1178–1185. [[CrossRef](#)]
28. Van Wijk, R.; van Solinge, W.W. The energy-less red blood cell is lost: Erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood* **2005**, *106*, 4034–4042. [[CrossRef](#)]
29. Quan, G.B.; Han, Y.; Liu, M.X.; Fang, L.; Du, W.; Ren, S.P.; Wang, J.X.; Wang, Y. Addition of oligosaccharide decreases the freezing lesions on human red blood cell membrane in the presence of dextran and glucose. *Cryobiology* **2011**, *62*, 135–144. [[CrossRef](#)]
30. Tokarska-Schlattner, M.; Epand, R.F.; Meiler, F.; Zandomeneghi, G.; Neumann, D.; Widmer, H.R.; Meier, B.H.; Epand, R.M.; Saks, V.; Wallimann, T.; et al. Phosphocreatine interacts with phospholipids, affects membrane properties and exerts membrane-protective effects. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43178. [[CrossRef](#)]
31. Jain, S.K.; Lim, G. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na⁺ + K⁺)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 232–237. [[CrossRef](#)]
32. Kanas, T.; Acker, J.P. Biopreservation of red blood cells—The struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J.* **2010**, *277*, 343–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Gulcin, I. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids* **2007**, *32*, 431–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bissinger, R.; Bhuyan, A.A.M.; Qadri, S.M.; Lang, F. Oxidative stress, eryptosis and anemia: A pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. *FEBS J.* **2019**, *286*, 826–854. [[CrossRef](#)]
35. Bogdanova, A.; Makhro, A.; Wang, J.; Lipp, P.; Kaestner, L. Calcium in red blood cells—a perilous balance. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 9848–9872. [[CrossRef](#)]
36. Chu, H.; Low, P.S. Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3. *Biochem. J.* **2006**, *400*, 143–151. [[CrossRef](#)]



Beta thalassemia minor is a beneficial determinant of red blood cell storage lesion

Vassilis L. Tzounakas,^{1*} Alkmini T. Anastasiadi,^{1*} Davide Stefanoni,² Francesca Cendali,² Lorenzo Bertolone,² Fabia Gamboni,² Monika Dzieciatkowska,² Pantelis Rousakis,³ Athina Vergaki,⁴ Vassilis Soulakis,⁴ Ourania E. Tsitsilonis,³ Konstantinos Stamoulis,⁵ Issidora S. Papassideri,¹ Anastasios G. Kriebardis,⁶ Angelo D'Alessandro² and Marianna H. Antonelou¹

Haematologica 2022
Volume 107(1):112-125

¹Department of Biology, Section of Cell Biology and Biophysics, School of Science, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), Athens, Greece; ²Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Colorado, School of Medicine–Anschutz Medical Campus, Aurora, CO, USA; ³Department of Biology, Section of Animal and Human Physiology, School of Science (NKUA), Athens, Greece; ⁴Regional Blood Transfusion Center, “Agios Panteleimon” General Hospital of Nikea, Piraeus, Greece; ⁵Hellenic National Blood Transfusion Center, Acharnes, Athens, Greece and ⁶Department of Biomedical Science, School of Health & Caring Science, University of West Attica (UniWA), Egaleo, Greece.

*VLT and ATA contributed equally as co-first authors.

ABSTRACT

Blood donor genetics and lifestyle affect the quality of red blood cell (RBC) storage. Heterozygotes for beta thalassemia (β Thal⁺) constitute a non-negligible proportion of blood donors in the Mediterranean and other geographical areas. The unique hematological profile of β Thal⁺ could affect the capacity of enduring storage stress, however, the storability of β Thal⁺ RBC is largely unknown. In this study, RBC from 18 β Thal⁺ donors were stored in the cold and profiled for primary (hemolysis) and secondary (phosphatidylserine exposure, potassium leakage, oxidative stress) quality measures, and metabolomics, *versus* sex- and age-matched controls. The β Thal⁺ units exhibited better levels of storage hemolysis and susceptibility to lysis following osmotic, oxidative and mechanical insults. Moreover, β Thal⁺ RBC had a lower percentage of surface removal signaling, reactive oxygen species and oxidative defects to membrane components at late stages of storage. Lower potassium accumulation and higher urate-dependent antioxidant capacity were noted in the β Thal⁺ supernatant. Full metabolomics analyses revealed alterations in purine and arginine pathways at baseline, along with activation of the pentose phosphate pathway and glycolysis upstream to pyruvate kinase in β Thal⁺ RBC. Upon storage, substantial changes were observed in arginine, purine and vitamin B6 metabolism, as well as in the hexosamine pathway. A high degree of glutamate generation in β Thal⁺ RBC was accompanied by low levels of purine oxidation products (IMP, hypoxanthine, allantoin). The β Thal mutations impact the metabolism and the susceptibility to hemolysis of stored RBC, suggesting good post-transfusion recovery. However, hemoglobin increment and other clinical outcomes of β Thal⁺ RBC transfusion deserve elucidation by future studies.

Correspondence:

MARIANNA H. ANTONELOU
manton@biol.uoa.gr

ANGELO D'ALESSANDRO
angelo.dalessandro@cuanschutz.edu

Received: October 6, 2020.

Accepted: December 4, 2020.

Pre-published: March 18, 2021.

<https://doi.org/10.3324/haematol.2020.273946>

©2022 Ferrata Storti Foundation

Material published in *Haematologica* is covered by copyright. All rights are reserved to the Ferrata Storti Foundation. Use of published material is allowed under the following terms and conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>. Copies of published material are allowed for personal or internal use. Sharing published material for non-commercial purposes is subject to the following conditions: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>, sect. 3. Reproducing and sharing published material for commercial purposes is not allowed without permission in writing from the publisher.



Introduction

Inter-donor heterogeneity significantly impacts the two “gold standards” of red blood cell (RBC) storage quality, namely end of storage hemolysis and *in vivo* 24-hour post-transfusion recovery.¹ Donor age, sex, ethnicity² and lifestyle (smoking, drinking, caffeine consumption³) all impact stored RBC energy and redox metabolism, and thereby RBC capacity to cope with oxidant and other insults. These factors ultimately affect transfusion efficacy, as gleaned by outcomes like hemoglobin (Hb) increments upon transfusion.⁴ Genetic factors impacting RBC redox status and antioxidant capacity have been linked to alteration of the metabolic age

of stored RBC,⁵ such as deficiency in the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) resulting both in increased oxidant stress⁶ and lower recovery in healthy blood donors.⁷ Like G6PD deficiency, genetic polymorphisms associated with non-canonical hemoglobin traits are enriched in certain donor populations. Carrier state for beta thalassemia (β Thal⁺) is characterized by mild effects on globin synthesis and RBC survival, and as such, many β Thal⁺ subjects are eligible blood donors.⁸ Despite their unique hematological profile, that could affect the capacity of enduring storage stress in either a negative or a positive way, little is known about the storability and recovery of β Thal⁺ RBC.

Apart from RBC indices and minor Hb variants,⁹ β Thal⁺ RBC may exhibit differences in membrane structure,¹⁰ deformability and ion exchange,¹¹ among others. Free heme and iron reactions bring about mild but sustained oxidative stress that when combined with decreased plasma antioxidant capacity,¹² may lead to oxidative defects in skeletal proteins¹³ and membrane lipids. Augmented protein phosphorylation¹⁴ and proteolytic cleavage of band 3¹⁵ have been also observed as a probable result of caspase-3 activation. Since the N-terminus of band 3 can regulate metabolic fluxes through glycolysis by means of inhibitory binding to glycolytic enzymes, the aforementioned alterations could trigger excessive consumption of glucose through the glycolytic pathway at the expense of NADPH production by the pentose phosphate pathway (PPP),¹¹ with a consequent deficit in the capacity to fuel several antioxidant systems that rely on this cofactor. Many of these β Thal⁺ RBC distortions are typical storage lesion aspects and some of them have already been linked to poor recovery or adverse transfusion effects.

On the other hand, the geometry¹⁶ and membrane cation permeability of β Thal⁺ RBC render them osmotically resistant, a probably advantageous feature for RBC at storage conditions.¹⁷ Of note, baseline adult hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) and fetal hemoglobin (HbF) levels in the general donor population have been found to be positively associated with resistance of stored RBC to stress hemolysis.¹⁸ Moreover, β Thal⁺ RBC exhibit low aggregability,¹⁹ probably rendering them less susceptible to the storage-induced tendency to cell aggregation. Improved metabolic²⁰ and total cardiovascular risk profiles,²¹ along with survival following malaria infection²² have been also reported thalassemia traits. The aim of the present study was to clarify whether the homeostasis of these unique RBC acts positively or negatively towards the challenges of blood banking.

Methods

Biological samples and blood unit preparation

Venous blood from n=204 regular blood donors was collected into EDTA, citrate and serum vacutainer tubes (*in vivo* study). Thirty-eight donors (18 β Thal⁺ and 20 controls) were selected to evaluate RBC storability in citrate-phosphate-dextrose (CPD)/saline-adenine-glucose-mannitol (SAGM) for 42 days at 4°C. The two donor groups exhibited typical hematological differences between them but minimal baseline variation in sex, age, donation frequency and other demographics (*Online Supplementary Table S1*). β Thal⁺ trait was confirmed by Hb electrophoresis and molecular identification of mutations. The study was approved by the Ethics Committee of the Department of

Biology, School of Science, NKUA. Investigations were carried out upon donor consent, in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

Physiological parameters

Free Hb levels were measured in plasma/supernatant through spectrophotometry,²³ followed by the Allen correction. In order to examine the osmotically induced hemolysis, RBC were exposed to solutions of increasing saline (NaCl) concentration and the mean corpuscular fragility (MCF; concentration of NaCl at 50% hemolysis) was calculated. The mechanical fragility index (MFI) was determined by measuring the amount of Hb released in the supernatant of RBC rocked with stainless steel beads for 1 hour (h). Oxidative hemolysis levels were evaluated following treatment of RBC with 17 mM phenylhydrazine (PHZ) for 1 h at 37°C. Reactive oxygen species (ROS) and calcium accumulation were measured by fluorometry; the extracellular antioxidant activity and lipid peroxidation were determined spectrophotometrically; phosphatidylserine (PS) exposure and RBC membrane protein carbonylation were estimated by multicolor flow cytometry and western blotting, respectively (see the *Online Supplementary Methods* for details).

Omics analyses

Preliminary proteomics analyses were performed in stored samples of RBC membranes through a filter-aided sample preparation digestion prior to analysis via nano-ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer (nano-UHPLC-MS/MS) (Evosep One system coupled to timsTOF Pro mass spectrometer - Bruker Daltonics, Bremen, Germany), as extensively described in prior technical notes.²⁴ Metabolomics analyses were performed as previously reported.²⁵ 100 μ L of stored RBC were collected on a weekly basis, extracted at 1:6 dilution in methanol:acetonitrile:water (5:3:2) and analyzed by UHPLC-MS (Ultimate 3000 RSLC-Q Exactive, Thermo Fisher) (see the *Online Supplementary Methods* for details). Metabolite assignment was performed against an in house standard library, as reported,²⁶ through the freely available software Maven (Princeton University, USA). No data pre-processing (neither normalization nor log-transformation) was performed.

Statistical analysis

For statistical analysis (SPSS Version 22.0, IBM Corp, NKUA) Shapiro-Wilk test and detrended normal Q-Q plots (for testing normal distribution and outliers), independent *t*-test or repeated measures analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni-like adjustment (for intergroup differences) and Pearson's or Spearman's tests (for correlation analysis) were used. Variables that exhibited repeatable correlations between each individual storage day (six time points) and fresh blood were used for the construction of *in vivo/ex vivo* biological networks (Cytoscape 3.7.2). Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to find out parameters strongly indicative of β Thal⁺ status in stored RBC. Significance was accepted at $P < 0.05$.

Results

Baseline features and storability of beta thalassemia red blood cells

In a cohort of 204 eligible blood donors the β Thal⁺ subgroup was approximately 9%. As expected, lower Hb concentration and RBC indices but higher RBC count and HbA_{1c} concentration were measured in β Thal⁺ donors (ROC curve: area under the curve [AUC] for mean cor-

puscular volume [MCV] = 0.965, for HbA_{1c} = 1,000), who carried an array of β -Hb mutations commonly found in Greece (IVS I-1, IVS I-6, IVS I-110, IVS II-1 and IVS II-745). While osmotic fragility was significantly lower in β Thal⁺ RBC, free Hb levels were similar to control. A trend for high total antioxidant capacity (TAC) and low plasma protein carbonylation was also observed in β Thal⁺ (Table 1).

For RBC storability analysis, the subgroup of β Thal⁺ donors (n=18) was compared to an equivalent group of average controls (n=20). The β Thal⁺ units exhibited lower levels of free Hb (storage, oxidative, mechanical and osmotic hemolysis) either throughout the storage period (mechanically and osmotically induced hemolysis) or for the last 2 weeks of it (storage and oxidative hemolysis) (Figure 1A). According to ROC curve analysis, the osmotic, mechanical and storage hemolysis have very good potential to predict the β Thal⁺ status at every time point of storage (*Online Supplementary Figure S1A*). Of note, only osmotic fragility (which follows a logarithmic increase during storage) was lower in the β Thal⁺ *versus* control RBC *in vivo*. Apart from hemolysis, the extracellular K⁺ was also lower in β Thal⁺ plasma and day 42-supernatant (Figure 1B). Preliminary proteomics analysis revealed differences between the two groups in the abundance of membrane proteins physiologically related to the RBC volume control/cation homeostasis, including piezo-1, Na⁺/K⁺ ATPase and aquaporin-1 (Figure 1C).

Higher TAC and uric acid-dependent antioxidant capacities (UAdAC) were measured in the plasma/supernatant of the β Thal⁺ samples compared to control (Figure 2A). ROC curve analysis revealed variations in both TAC and UAdAC, strongly indicative of the β Thal⁺ status in stored RBC (*Online Supplementary Figure S1B*), in contrast to the uric acid-independent antioxidant capacity (UAiAC) levels that were very similar to control (Figure 2A). Membrane lipid peroxidation and protein carbonylation were significantly lower in the β Thal⁺ *versus* control RBC throughout the storage period or from middle storage onwards, respectively (Figure 2B). Spontaneous intracellular ROS levels were quite similar between the two donor groups at early storage, but lower levels were detected in β Thal⁺ *versus* control RBC in the late period (Figure 2C). Stress-induced (e.g., by tBHP, diamide,

phenylhydrazine) ROS generation basically resulted in no between-group differences. Although significantly higher at baseline, the intracellular Ca²⁺ of β Thal⁺ RBC exhibited only a trend toward higher levels during storage compared to controls (Figure 2D). In contrast, while similar at baseline (and for the first weeks of storage), PS externalization was significantly lower in β Thal⁺ RBC for the last 2 weeks (Figure 2E). According to a preliminary proteomics analysis, the membrane expression of calcium related proteins (such as calmodulin, calpain and annexin A7/synexin) and of the lipid remodeling protein scramblase differed significantly between the two groups of stored RBC (Figure 2F).

Metabolic profile of beta thalassemia red blood cells *in vivo* and during storage in CPD-SAGM

Full metabolomics analyses were performed in paired fresh and stored samples from the control and β Thal⁺ groups (n=15, *Online Supplementary Figures S2 to S11*). In the case of fresh RBC (Figure 3A) partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) separated the two groups across principal component 1 (PC1), explaining approximately 11% of the total variance (Figure 3B). The top 25 metabolic changes between the two groups – as determined by *t*-test – are highlighted in the heat map in Figure 3C. Increases were observed in β Thal⁺ RBC with respect to metabolites derived from glycolysis or branching pathways (2,3-diphosphoglycerate, phosphoglycerate isomers, phosphoenolpyruvate) and PPP (6-phosphogluconate, ribose mono and diphosphate, NADPH) (Figure 3C). Overall, these steady state analyses are suggestive of activation of PPP and glycolysis upstream to pyruvate kinase in fresh β Thal⁺ RBC, in the absence of significant alterations of glutathione pools and turn-over (Figure 4A to C, respectively). Indeed, β Thal⁺ RBC were characterized by decreases in pyruvate, arginine, creatine, glycine, inosine and monophosphate (Figure 3C), suggestive of alterations in purine deamination/oxidation and arginine/polyamine metabolism (Figure 4D to E).

Metabolomics analyses were thus performed on stored RBC units from the same donors on a weekly basis (Figure 3D). Unsupervised principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering analysis of significant metabolites by repeated measures ANOVA are shown in

Table 1. Selected characteristics of beta thalassemia blood minor *in vivo* compared to control.

	Control (n=186)	β Thal ⁺ (n=18)
Red blood cells (x10 ⁶ /μL)	4.94 ± 0.33	5.88 ± 0.34*
Hematocrit (%)	44.07 ± 2.58	39.84 ± 2.20 [§]
Total Hemoglobin (g/dL)	15.00 ± 1.07	13.36 ± 0.71*
Mean corpuscular volume (fL)	89.38 ± 4.17	67.07 ± 6.72*
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	30.44 ± 2.08	22.51 ± 2.42*
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dL)	34.00 ± 1.09	32.69 ± 0.67 [§]
Red cell distribution width (%)	12.48 ± 0.57	13.64 ± 0.88
Mean platelet volume (fL)	7.47 ± 1.57	9.24 ± 2.17 [§]
Mean corpuscular fragility (% [NaCl])	0.438 ± 0.025	0.389 ± 0.028*
Free hemoglobin (mg/dL)	3.61 ± 1.83	2.73 ± 1.24
Total antioxidant capacity of plasma (TAC) (μM Fe ²⁺)	622 ± 94.2	735 ± 142 [§]
Carbonylated proteins of plasma (nmol/mg)	0.350 ± 0.107	0.296 ± 0.111 [§]
Total plasma proteins (g/dL)	7.19 ± 0.46	6.78 ± 0.56 [§]

Data are presented as mean ± standard deviation. *P<0.05; (°) marginal significance. β Thal⁺: beta thalassemia minor.

Figure 3E and F, respectively. Of note, several of the metabolic differences between the two groups at baseline were further exacerbated during storage, with significantly lower levels of IMP, hypoxanthine and adenosine monophosphate (AMP) in the stored β Thal⁺ RBC (Figure 5A). On the other hand, the β Thal⁺ RBC had higher levels of urate throughout storage. Since human RBC lack a functional uricase, chemical oxidation of urate promotes further catabolism to allantoin and allantoate, that were found significantly lower and higher in the β Thal⁺ RBC, respectively, throughout storage (Figure 5A). These

observations were accompanied by a higher degree of glutamine consumption and glutamate generation in β Thal⁺ RBC after storage day 7 (Figure 5A; *Online Supplementary Figure S8*, respectively), suggestive of ongoing glutaminolysis. Interestingly, metabolites of purine metabolism such as urate, allantoate and glutamine represent very good predictors of β Thal⁺ status in stored RBC (ROC curve analysis, *Online Supplementary Figure S1C*). Intertwined with purine (especially adenosine) metabolism, S-adenosylmethionine (SAM) synthesis and consumption were not significantly altered in

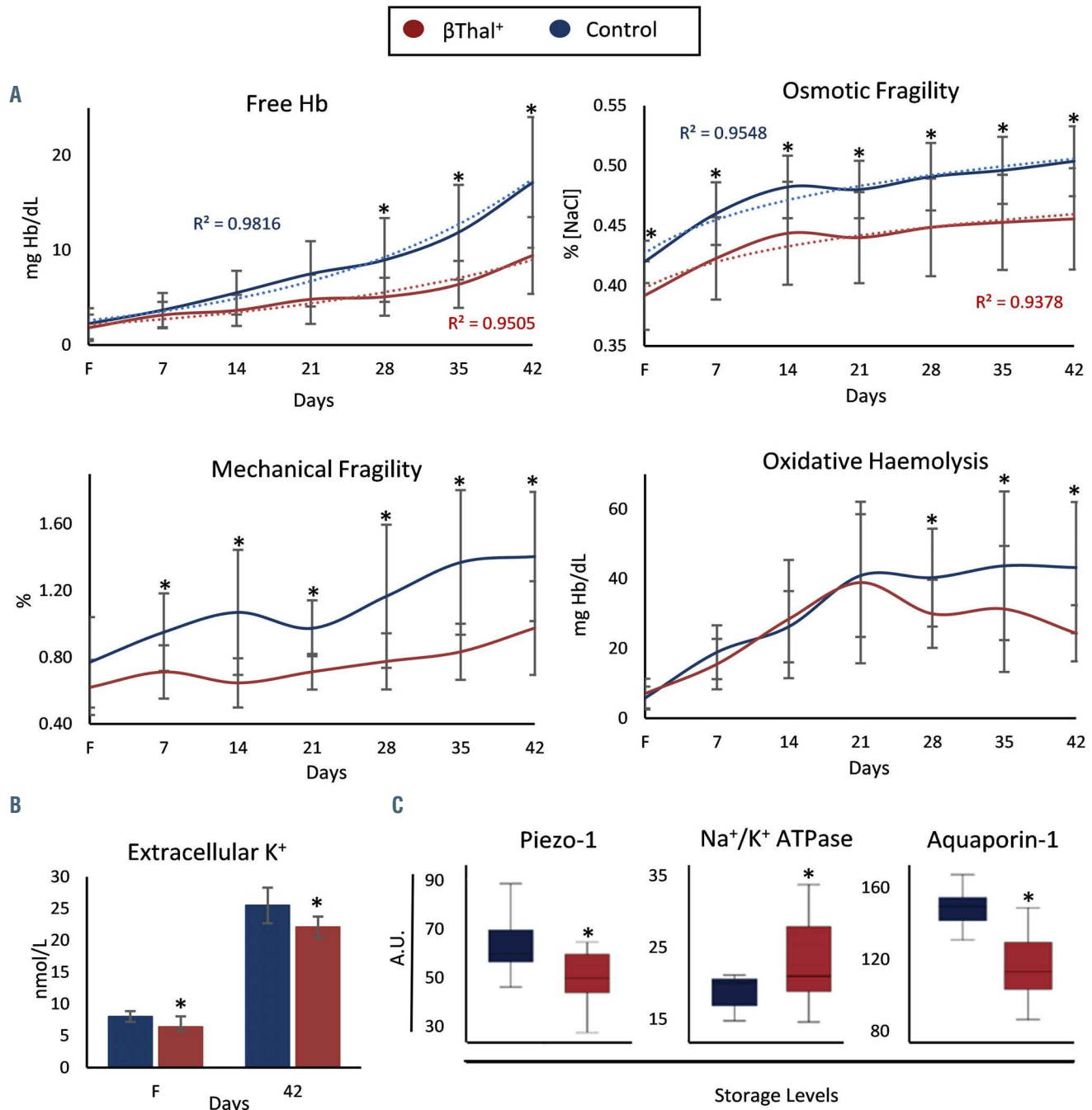


Figure 1. Variation in hemolysis variables of fresh and stored red blood cells in beta thalassemia minor and control donors. (A) Time course evaluation of storage, osmotic, mechanical and oxidative hemolysis. Dashed lines represent trend lines of exponential or logarithmic models for storage and osmotic hemolysis, respectively. (B) Potassium leakage. (C) Storage levels of selected proteins related to osmotic/mechanical hemolysis. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. * $P < 0.05$; F: fresh blood; A.U.: arbitrary units; β Thal⁺: beta thalassemia minor.

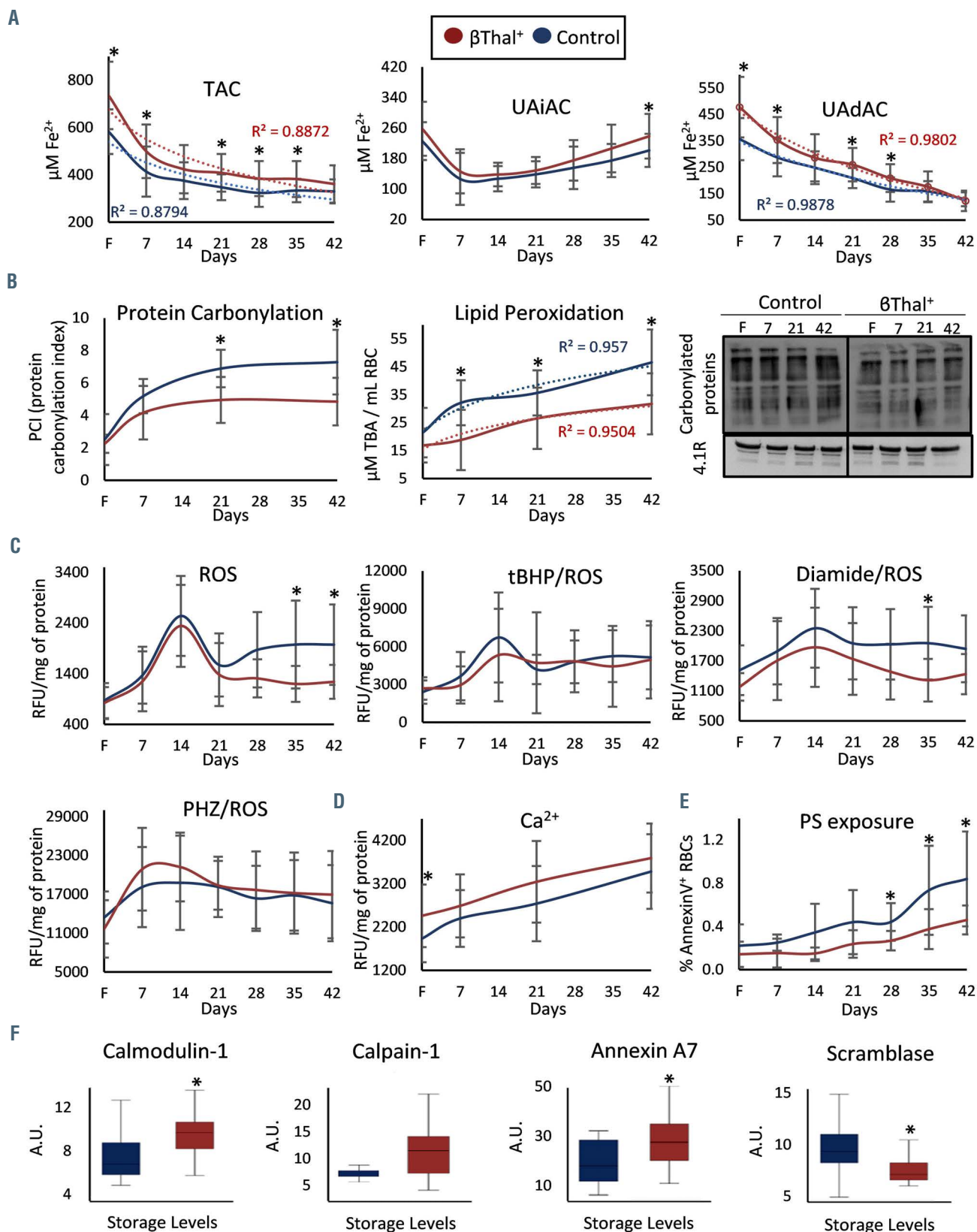


Figure 2. Redox status and calcium signaling of red blood cells from beta thalassemia minor and control donors. (A) Time course variation of total (TAC), uric acid-independent (UAiAC) and uric acid-dependent (UAdAC) antioxidant capacity. (B) Membrane lipid peroxidation and protein carbonylation (n=8 per group; 4.1R protein was used for internal control). (C) Variation of endogenous/exogenously induced (tert-butyl-hydroperoxide; tBHP, diamide and phenylhydrazine; PHZ) reactive oxygen species (ROS) levels. (D) Intracellular calcium accumulation. (E) Phosphatidylserine (PS) exposure. (F) Storage levels of selected proteins related to calcium homeostasis and lipid remodeling. Dashed lines represent trendlines of logarithmic models. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. * $P < 0.05$; F: fresh blood; TBA: thiobarbituric acid; β Thal⁺: beta thalassemia minor.

terized by significantly lower arginine and creatine and higher asymmetric dimethyl-arginine and acetyl-spermidine levels throughout storage (Figure 6A). Of all the pathways assessed in this study, the most notable between-group changes were unexpectedly found in vitamin B6 metabolism (Figure 6B) and in the hexosamine pathway (Figure 6C). β Thal⁺ RBC were characterized by lower pyridoxate and pyridoxal and higher pyridoxamine levels throughout storage. On the other hand, all intermediates of the hexosamine pathway (uridine monophosphate -

UMP, acetyl-glucosamine, acetyl-glucosamine phosphate) were significantly higher in β Thal⁺ RBC at all storage time points, while the final product of this pathway – uridine diphosphate (UDP) *N*-acetyl-glucosamine was significantly lower in β Thal⁺ RBC (Figure 6C), suggestive of either a

blockade at the metabolic step catalyzed by UDP-*N*-acetylglucosamine phosphorylase or an increased consumption of its product for protein O-GlcNAcylation (post-translational attachment of O-linked *N*-acetylglucosamine moieties to serine and threonine residues).

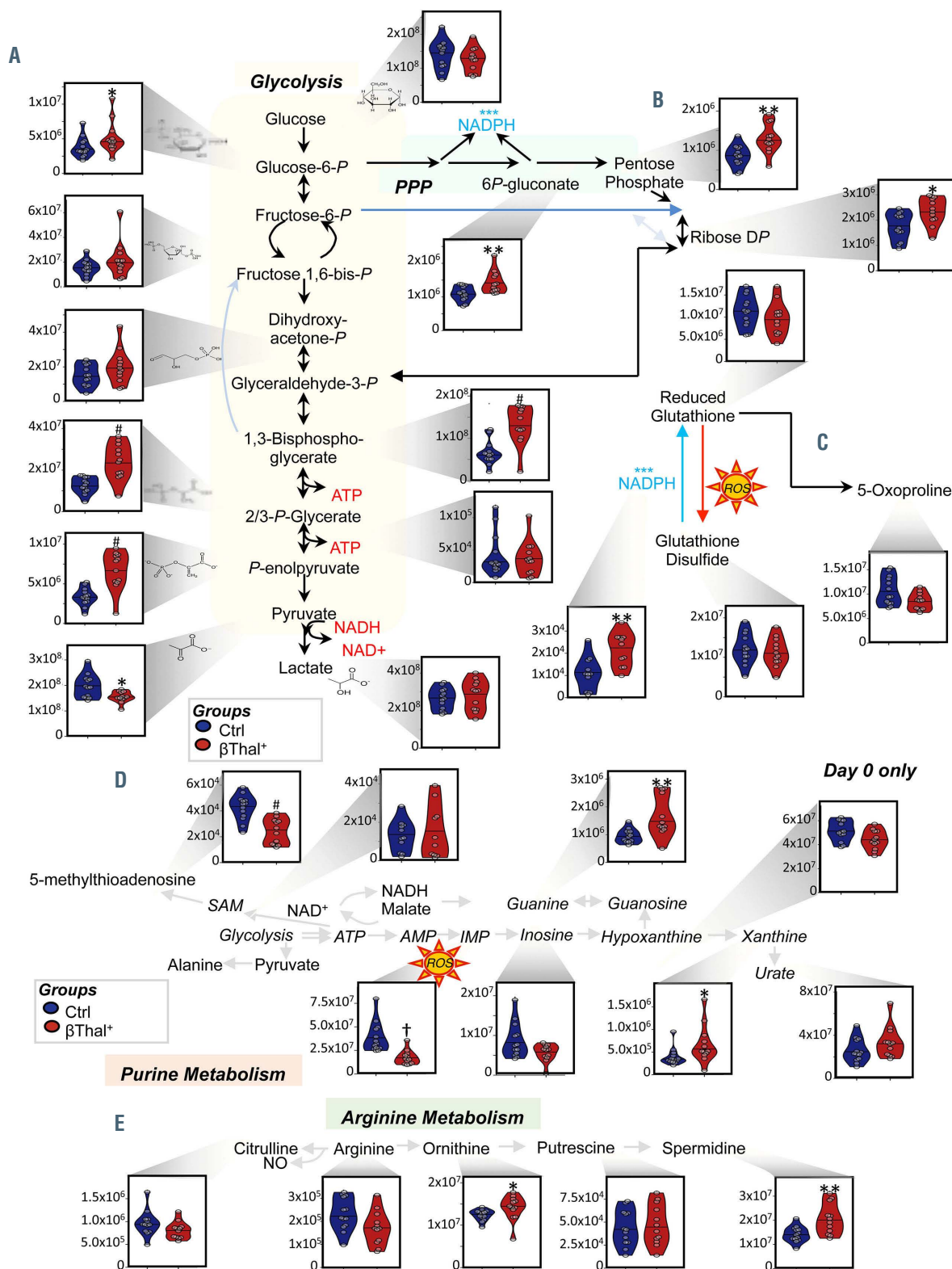


Figure 4. Main metabolic differences between control and beta thalassemia minor donors in circulating red blood cells. (A) Glycolysis. (B) Pentose phosphate pathway (PPP) metabolites. (C) Glutathione oxidation. (D) Purine metabolism. (E) Arginine metabolism. SAM: S-adenosyl methionine. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, # $P < 0.0001$.

Again, ROC curve analysis highlighted the potential of glucosamines to distinguish stored β Thal⁺ RBC from their control counterparts (*Online Supplementary Figure S1D*). Finally, RBC from β Thal⁺ donors were characterized by higher levels of carnosine and indole-acetate – metabolites

with either antioxidant activity or associated microbial metabolism, respectively, from baseline throughout storage, with no storage-dependent fluctuations, suggestive of differences in the circulating blood metabolome between the two groups at the time of donation (Figure 6D).

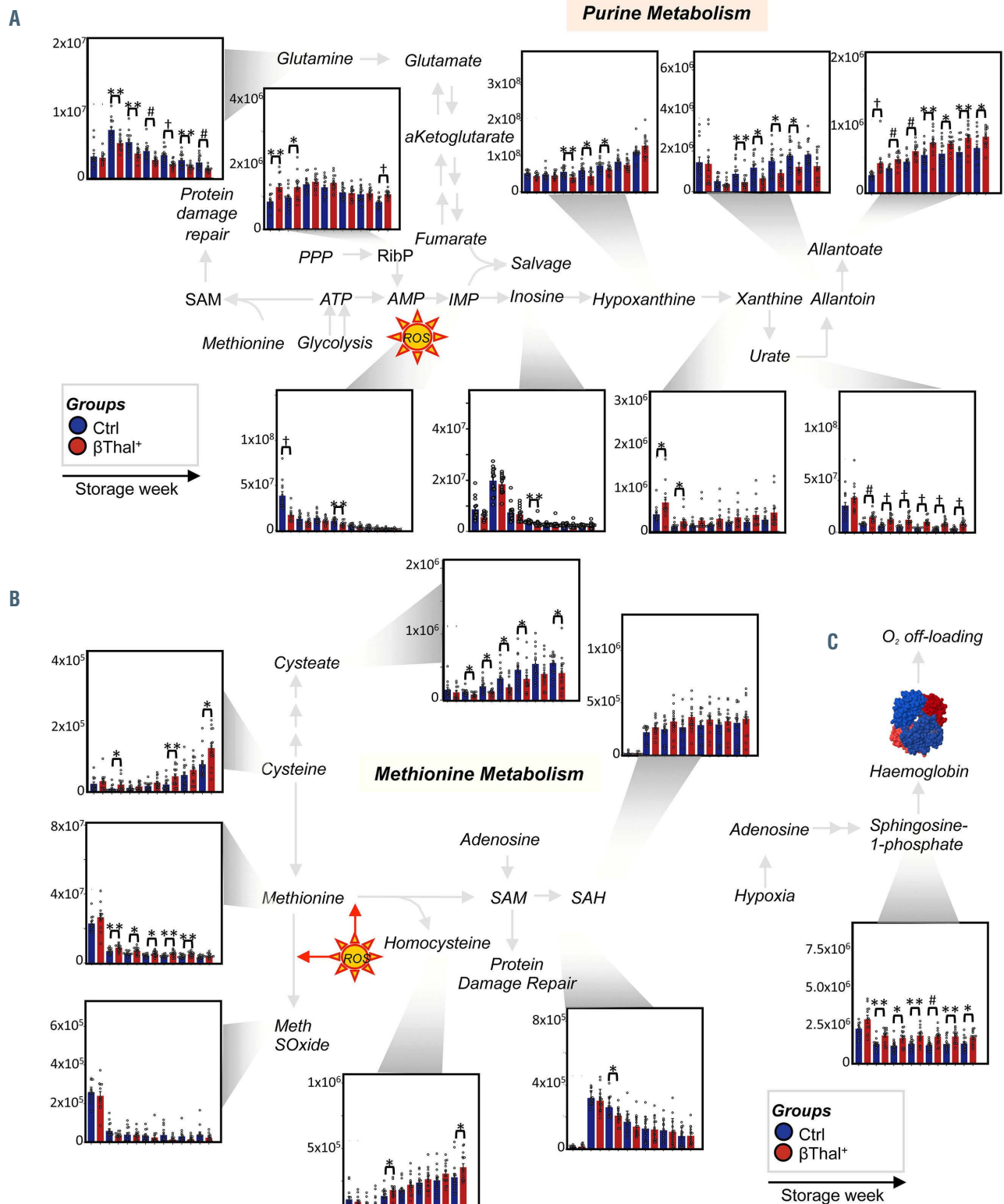


Figure 5. Distinct metabolic pathways in beta thalassemia minor donors during storage I. (A) Purine metabolism. (B) Methionine metabolism. (C) Hypoxia modulated hemoglobin loading via a sphingosine-1-phosphate effect. SAM: S-adenosyl methionine; SAH: S-adenosyl homocysteine; RibP: ribose phosphate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, † $P < 0.0001$.

Intertwining biological networks in stored red blood cells and supernatants

In order to find out major aspects of β Thal⁺ RBC physiology, able to interconnect the *in vivo/ex vivo* states, and thus, to reveal the “effect” (if any) of baseline variables

upon storage, we proceeded to comparative β Thal⁺ *versus* control *in vivo/ex vivo* network analysis.

Our findings highlighted osmotic hemolysis as a “hub” parameter in β Thal⁺ networks, with significant differences in the type and the amount of connections between

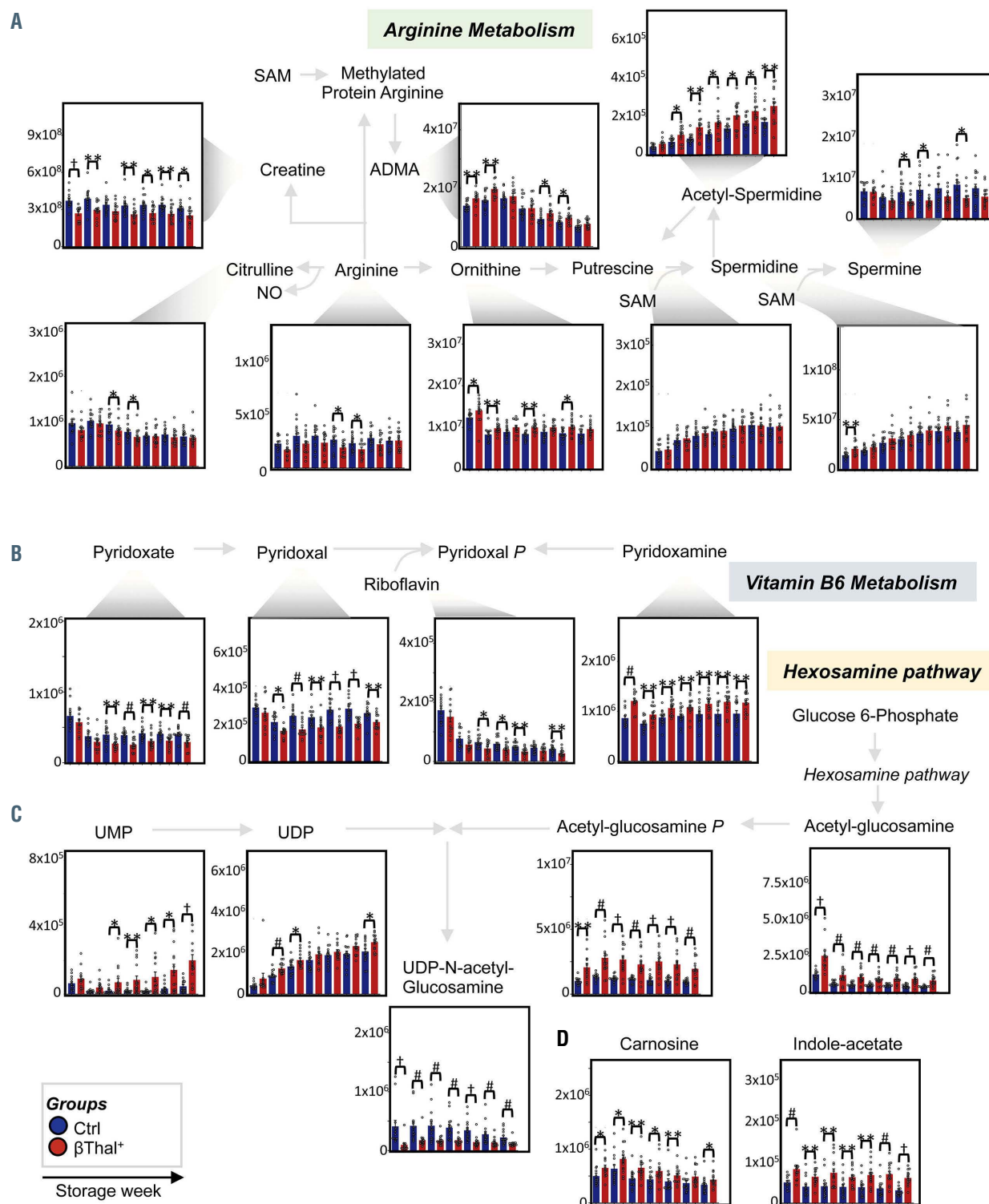
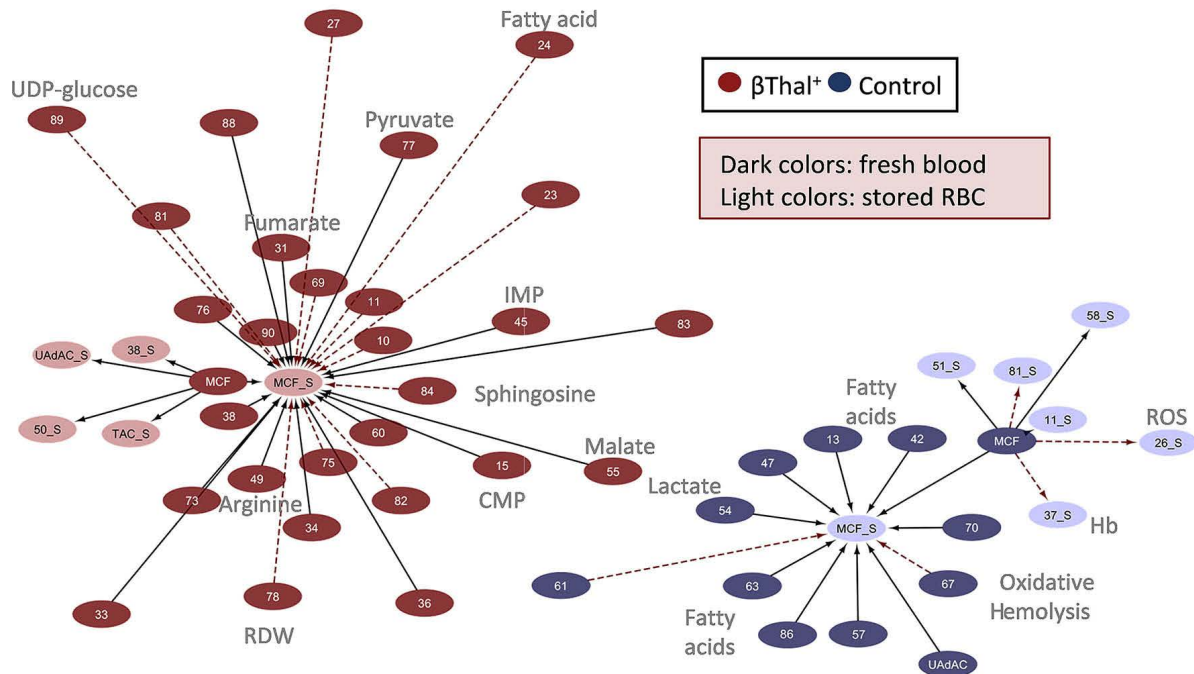


Figure 6. Distinct metabolic pathways in beta thalassemia minor donors during storage II. (A) Arginine metabolism. (B) Vitamin B6 metabolism. (C) Hexosamine pathway. (D) Carnosine and indole-acetate. SAM: S-adenosyl methionine; ADMA: asymmetric dimethylarginine; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, † $P < 0.0001$.

A



B

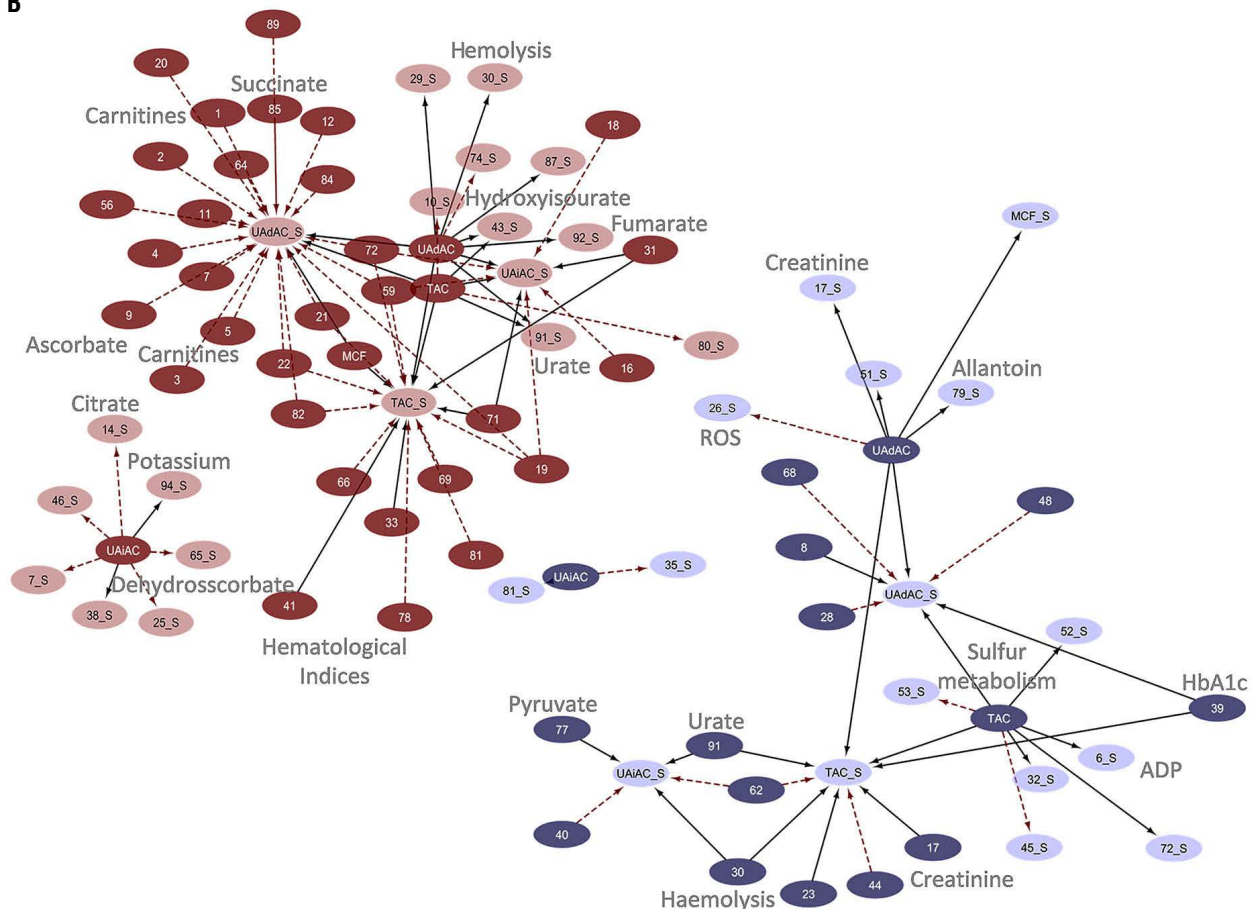


Figure 7. Network analysis of statistically significant repeated correlations between parameters of fresh blood and stored red blood cells. (A) Osmotic fragility hub. (B) Plasma/supernatant antioxidant activity hub. Solid black lines: positive correlation; dashed red lines: negative correlation. MCF: mean corpuscular fragility; TAC/UAdAC/UAIAC: total, uric acid dependent and uric acid independent antioxidant capacities. Numbers correspond to the definitions provided in the *Online Supplementary Table S2*.

the groups. The osmotic fragility of stored β Thal⁺ RBC exhibited strong correlations with several biochemical (e.g., transferrin, $r=0.560$, $P<0.01$), cellular (e.g., RBC mechanical hemolysis, $r=0.771$, $P<0.01$), protein and metabolic (e.g., L-arginine, $r=0.697$, sphingosine-1-phosphate, $r=-0.636$, $P<0.01$) parameters of β Thal⁺ RBC and plasma, in striking contrast to the controls (Figure 7A). Notably, in the case of β Thal⁺ RBC, fragility variation during storage was less correlated to the *in vivo* levels of fatty acids but more correlated to those of carboxylic acids, compared to control. Despite the above-mentioned differences, osmotic hemolysis during storage was found interrelated with the *in vivo* levels of RBC aging markers and energy metabolism in both donor groups.

In similarity to the MCF network, the extracellular antioxidant capacity of the β Thal⁺ units presented higher connectivity with baseline parameters compared to control (twice the number of connections) including several metabolites of energy metabolism (e.g., D-glucose/UAAdAC, $r=-0.705$, $P<0.01$), purine oxidation (e.g., TAC/5-hydroxyisourate, $r=0.756$, $P<0.01$), urea cycle (e.g., ornithine/UAAdAC, $r=-0.769$, $P<0.01$) and carnitines (Figure 7B). Those findings suggested that the basic physiology of β Thal⁺ is strongly and intrinsically related with the unique resistance to osmotic hemolysis and the high antioxidant capacity of the RBC units throughout storage.

Discussion

According to an increasing number of studies, genetic diversity among donors substantially affects RBC storage stability. Results of the REDS-III-Omics study showed that female sex and African American or Asian race-ethnicity² predispose to low susceptibility to storage and stress hemolysis. RBC from G6PD-deficient donors exhibit control levels of storage hemolysis, opposite to sickle cell trait RBC that are more susceptible to spontaneous hemolysis during storage.²⁸ Our study reports for the first time that β Thal⁺ RBC are superior to those of the general population in terms of all hemolysis measures (including the less studied mechanical one), either throughout the storage period or for the more susceptible last 2 weeks of it. Superior secondary metrics of storage quality (including removal signaling and extracellular potassium) were also detected in β Thal⁺. As expected, the unique storage capacity of β Thal⁺ RBC was found mechanistically linked to changes in specific metabolic flows and membrane protein expression profiles.

A tentative explanation for resistance to hemolysis lies in the appreciation of decreased HCT, MCH and Hb levels in β Thal⁺. Similar findings in high frequency blood donors have been associated with decreases in ferritin and total iron pools and improved hemolytic parameters,²⁹ in keeping with a negative role of iron levels and metabolism with RBC storage quality and post-transfusion efficacy.³⁰ Moreover, β Thal⁺ RBC are intrinsically different from control, with reduced cellular volume and increased surface:volume ratio.³¹ Altered ion transport homeostasis leading to efflux of osmotically active components³² underlies to great extent this phenotype. In support, serum levels of osmotically active ions in β Thal⁺ exhibit significant correlation with RBC osmotic fragility.³³ Under normal membrane and skeletal networks

(*manuscript in preparation*) these features contribute to increased resistance to osmotic (and probably to mechanical) stress.

The biological networks suggested that the resistance of stored RBC to osmotic stress is a multifactorial phenotype exhibiting numerous correlations with the baseline RBC physiology (such as the energy metabolism) especially in the case of β Thal⁺ RBC. Indeed, the levels of several biochemical and metabolic features of β Thal⁺ RBC *in vivo* exhibited strong correlations with those of osmotic hemolysis throughout storage, including L-arginine³⁴ and sphingosine-1-phosphate, which significantly differed between the two groups under examination at baseline. Of note, similar correlations were also detected in G6PD-deficient donors.³⁵ This observation suggests a genetically determined aspect of osmotic hemolysis phenotype in stored RBC that deserves further examination. Since osmotic fragility is strongly donor-specific (storage levels are proportional to baseline levels *in vivo*),¹⁷ the superior osmotic hemolysis (and consequently part of storage hemolysis) of β Thal⁺ RBC was rather anticipated. Resistance to oxidative hemolysis at late storage seemed to follow the fluctuation in ROS levels at the same period, as well as the modulation of purine and arginine metabolism, previously reported in control donor groups.³⁶ Osmotic stress and additional hemolysis triggers may be further associated with the specific protein composition of RBC membrane in β Thal⁺, since our preliminary analysis revealed variations in proteins critically involved in cell volume regulation and transmembrane water/cation flows responsive to osmotic and mechanical stimuli, including aquaporin and piezo. Variation in some of these transporters has already been reported in thalassaemic or other anemic subjects.³⁷ Our study (*Online Supplementary Figure S1A*) showed for the first time that resistance to both spontaneous and induced hemolysis is a distinctive feature of β Thal⁺ RBC storability. However, diversity in β Thal⁺ mutations worldwide should be also taken into consideration. Indeed, certain β Thal⁺ donors exhibited control baseline levels of RBC osmotic fragility (Table 1). The effects of such genetic variation on β Thal⁺ RBC storability and performance deserve further evaluation by future studies in various ethnic groups.

Apart from hemolysis, PS exposure (a potent signal for RBC clearance *in vivo*) was also lower in β Thal⁺ RBC at late storage, when ROS accumulation and membrane expression of phospholipid scramblase³⁸ were also low. In contrast, Ca²⁺ concentration was higher in β Thal⁺ RBC at baseline (and slightly higher during storage) compared to controls, consistent with the distorted divalent cation homeostasis reported in β Thal⁺.³⁹ This finding deserves further attention in the light of β Thal⁺-specific variation in Ca²⁺-dependent membrane proteins that are involved in critical signaling events in RBC. Finally, alterations in the hexosamine pathway in β Thal⁺ RBC are suggestive of either up-regulation of UDP-N-acetyl-glucosamine usage for O-GlcNAcylation or decreased synthesis through blockade of the late steps in this biosynthetic pathway. To the best of our knowledge, this is the first report of this pathway being affected in β Thal⁺. Interestingly, O-GlcNAcylation is a common post-translational modification in *Plasmodium falciparum* proteins following malaria infection, to the extent that therapeutic blockade of this pathway has been proposed as an intervention to shorten the life cycle of the *Plasmodium*.⁴⁰ As such, our observa-

tions may contribute to explain one of the molecular mechanisms through which β Thal⁺ protects from malaria infection.²²

Reports on the oxidative profile of β Thal⁺ RBC and on the plasma antioxidant capacity *in vivo* are quite contradicting.¹² Many studies, however, pointed to increased activity and/or upregulation of several antioxidant enzymes and proteins⁴¹ in β Thal⁺ RBC as a possible adaptation to mild sustained oxidative stress. Metabolism exhibits a similar adaptive response according to the currently reported data showing lower baseline levels of oxidant stress-induced purine deamination, higher levels of sulfur-containing metabolites (methionine and cysteine), increase in glycolysis upstream of pyruvate kinase and an apparent increase in fluxes through the PPP in β Thal⁺ RBC. Combined with increases in PPP-derived reducing equivalents (NADPH), in the absence of significant alterations of total glutathione pools and ratios of oxidized/reduced forms, these data are suggestive of an overall higher antioxidant armamentarium in β Thal⁺ RBC. "Training" to mild oxidative stress *in vivo* may modulate β Thal⁺ RBC storability,⁴¹ as evidenced by ROS accumulation, oxidative hemolysis, and oxidative defects to membrane components. In the same context, the membrane profile of stress markers and the low intracellular allantoin⁴² are suggestive of the protective action of molecular chaperones and other antioxidant molecules, such as urate, present in excess in β Thal⁺ RBC. Despite the fact that urate can act as a pro- or anti-oxidant factor, its minimal oxidation to allantoin at the same period of low ROS generation in β Thal⁺ RBC points towards its antioxidant effect during storage. Moreover, it mostly accounted for the elevated antioxidant capacity of β Thal⁺ plasma/supernatant. Network paired analysis of fresh *versus* stored samples confirmed that the extracellular antioxidant capacity (like osmotic fragility) is an almost "heritable" feature of RBC units in both donor groups,⁴³ and further "signs" β Thal⁺ status in stored RBC (Online Supplementary Figure S1). Of note, the levels of TAC and UAdAC in β Thal⁺ units exhibited inverse correlations with acyl-carnitine RBC metabolites, such as the redox related acetyl-carnitine. These metabolites have been suggested as markers of osmotic fragility in blood donors undergoing testosterone-replacement therapy,⁴⁴ consistent with a role of this pathway in the Lands cycle-dependent remodeling of oxidized membrane lipids.

Genetic variation among donors may have a positive or negative impact on transfusion performance. G6PD-deficient RBC, for instance, are susceptible to hemolysis and oxidative stress post-transfusion,⁶ and exhibit lower 24-hour recovery in autologous transfusion recipients.⁷ Similarly, sickle cell trait RBC were shown to have reduced recovery in animal models.²⁸ Quite to the contrary, the unique storability of β Thal⁺ RBC is suggestive of good post-transfusion recovery. Apart from the low intracellular levels of hypoxanthine, a metabolic marker of storage lesion exhibiting negative correlation with recovery *in vivo*,⁴⁵ the low extracellular Hb/potassium and RBC removal signaling are in favor of therapeutic outcomes mainly through preservation of nitric oxide bioavailability and alleviation of hemolysis/iron-associated toxicity, including inflammatory responses and bacterial infections.⁴⁶ In addition, the advantageous redox phenotype of stored β Thal⁺ is expected to promote their functionality *in vivo* and to ameliorate oxidative stress-

associated adverse clinical outcomes in susceptible patients with G6PD-deficiency and sickle cell disease.⁴⁷ Finally, the modified arginine/nitric oxide metabolism (involved in the induction of HbF⁴⁸) in β Thal⁺ RBC during storage may be relevant to their transfusion in susceptible recipients, including hemoglobinopathies, cancer, lung and cardiovascular disease patients. In the light of those results, we have initiated a study on post-transfusion performance of β Thal⁺ RBC.

Heterozygotes for β Thal⁺ constitute a non-negligible proportion of blood donors not only in the Mediterranean, but also in Africa, Asia and in under-represented minorities of US.⁴⁹ Their typical profile of low Hb concentration, and thus, of lower dose of Hb per unit of RBC, would predispose to reduced Hb increment and lower efficacy of the transfusion therapy compared to control. However, the currently presented data show that β Thal⁺ RBC are unique in terms of susceptibility to hemolysis, redox homeostasis and nitrogen/hexosamine-related metabolism during storage. This favorable storability and thereof improved quality of stored β Thal⁺ RBC may counterpoise the negative effects of lower Hb dose on the recipient. Despite the fact that further studies are needed to clarify the post-transfusion performance of β Thal⁺ RBC in the context of intra-group genetic heterogeneity and recipient variation, the currently reported data may allow considering β Thal⁺ individuals as a novel, high quality, "good storer" group. Indeed, β Thal⁺ RBC may be safely stored for long time periods before transfusion, highlighting the notion of molecular *versus* storage age of blood.⁵ Moreover, β Thal⁺ RBC are probably ideal candidates for alternative storage strategies, like cryopreservation, which involves a deglycerolization step during which RBC are highly susceptible to hypo-osmotic lysis.⁵⁰ These promising data and potentials highlight the emergence of β Thal⁺ donors for a distinct and potentially valuable role in blood transfusions.

Disclosures

Though unrelated to the contents of this manuscript, ADA declares that he is a founder of Omix Technologies Inc and Altis Biosciences LLC and a consultant for Hemanext Inc. All other authors declare no conflicts of interest.

Contributions

VLT and ATA are co-first authors; VLT and MHA designed the study; VLT, ATA, MHA and ADA wrote the manuscript; VLT, ATA and AGK performed the physiological and biochemical experiments; DS, FC, LB and FG performed the metabolomics analyses; MD performed the proteomics experiments; MHA and PR performed the flow cytometry analyses; VLT, ATA, MHA and ADA analyzed the data; AV, VS, KS, and AGK provided project support and organized participant recruitment; MD, OET, ISP, KS, AGK and ADA provided expert knowledge.

Acknowledgements

The authors would like to thank all blood donors that voluntarily participated in this study; M.S. Jacovides Hellas S.A. for the kind offer of the LTRC blood bags; Dr Panetelis Constantoulakis and Dr Stavros Bournazos (Genotypos Science Labs) for their contribution in the mutation identification; the NKUA students Dimitrios G. Karadimas (MSc) and Christos Christogeorgos for their participation in a part of the physiological experiments performed; Dr Hara Georgatzakou, Mrs

Maria Sioumala and the UniWA students Efthimia Pavlou, Panagiotis Drosos, Maria Tsoumpeli, Eirini Tsolou and Kariofyllis Karamperis for their contribution in blood sampling and blood cell counting measurements performed in fresh samples or stored RBC units.

Funding

This project has received funding from the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI) and the General Secretariat for Research and Technology (GSRT), under grant agreement No 2032 (VLT).

References

1. Tzounakas VL, Kriebardis AG, Papassideri IS, Antonelou MH. Donor-variation effect on red blood cell storage lesion: A close relationship emerges. *Proteomics Clin Appl*. 2016;10(8):791-804.
2. Kanas T, Lanteri MC, Page GP, et al. Ethnicity, sex, and age are determinants of red blood cell storage and stress hemolysis: results of the REDS-III RBC-Omics study. *Blood Adv*. 2017;1(15):1132-1141.
3. Stefanoni D, Fu X, Reisz JA, et al. Nicotine exposure increases markers of oxidant stress in stored red blood cells from healthy donor volunteers. *Transfusion*. 2020;60(6):1160-1174.
4. Roubinian NH, Plimier C, Woo JP, et al. Effect of donor, component, and recipient characteristics on hemoglobin increments following red blood cell transfusion. *Blood*. 2019;134(13):1003-1013.
5. D'Alessandro A, Zimring JC, Busch M. Chronological storage age and metabolic age of stored red blood cells: are they the same? *Transfusion*. 2019;59(5):1620-1623.
6. Tzounakas VL, Kriebardis AG, Georgatzakou HT, et al. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient subjects may be better "stomers" than donors of red blood cells. *Free Radic Biol Med*. 2016;96:152-165.
7. Francis RO, D'Alessandro A, Eisenberger A, et al. Donor glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency decreases blood quality for transfusion. *J Clin Invest*. 2020;130(5):2270-2285.
8. Acquaye CT, Oldham JH, Konotey-Ahulu FI. Blood-donor homozygous for hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Lancet*. 1977;1(8015):796-797.
9. Singha K, Taweanan W, Fucharoen G, Fucharoen S. Erythrocyte indices in a large cohort of beta-thalassemia carrier: Implication for population screening in an area with high prevalence and heterogeneity of thalassemia. *Int J Lab Hematol*. 2019;41(4):513-518.
10. Hillier J, Hoffman JF, Parpart AK, Wolman IJ. Ultrastructure of erythrocyte membranes in thalassemia major and minor. *Blood*. 1956;11(10):946-956.
11. Ficarra S, Tellone E, Giardina B, et al. Derangement of erythrocytic AE1 in beta-thalassemia by caspase 3: pathogenic mechanisms and implications in red blood cell senescence. *J Membr Biol*. 2009;228(1):43-49.
12. Manafikhi H, Drummen G, Palmery M, Peluso I. Total antioxidant capacity in beta-thalassemia: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;110:35-42.
13. Fortier N, Snyder LM, Garver F, Kiefer C, McKenney J, Mohandas N. The relationship between in vivo generated hemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane rigidity. *Blood*. 1988;71(5):1427-1431.
14. Pantaleo A, De Franceschi L, Ferru E, Vono R, Turrini F. Current knowledge about the functional roles of phosphorylative changes of membrane proteins in normal and diseased red cells. *J Proteomics*. 2010;73(3):445-455.
15. Mandal D, Baudin-Creuzat V, Bhattacharyya A, et al. Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). *J Biol Chem*. 2003;278(52):52551-52558.
16. Schrier SL, Rachmilewitz E, Mohandas N. Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemic erythrocytes are different: implication for differences in clinical manifestations. *Blood*. 1989;74(6):2194-2202.
17. Tzounakas VL, Anastasiadi AT, Karadimas DG, et al. Temperature-dependent haemolytic propensity of CPDA-1 stored red blood cells vs whole blood - Red cell fragility as donor signature on blood units. *Blood Transfus*. 2017;15(5):447-455.
18. Tzounakas VL, Georgatzakou HT, Kriebardis AG, et al. Donor variation effect on red blood cell storage lesion: a multivariable, yet consistent, story. *Transfusion*. 2016;56(6):1274-1286.
19. Falco C, Vaya A, Iborra J, Moreno I, Palanca S, Aznar J. Erythrocyte aggregability and disaggregability in thalassemia trait carriers analyzed by a laser backscattering technique. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2003;28(4):245-249.
20. Triantafyllou AI, Vyssoulis GP, Karpanou EA, et al. Impact of beta-thalassemia trait carrier state on cardiovascular risk factors and metabolic profile in patients with newly diagnosed hypertension. *J Hum Hypertens*. 2014;28(5):328-332.
21. Maioli M, Pettinato S, Cherchi GM, et al. Plasma lipids in beta-thalassemia minor. *Atherosclerosis*. 1989;75(2-3):245-248.
22. Kuesap J, Chaijaroenkul W, Rungsirunrat K, Pongjantharasatien K, Na-Bangchang K. Coexistence of malaria and thalassemia in malaria endemic areas of Thailand. *Korean J Parasitol*. 2015;53(3):265-270.
23. Harboe M. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. *Scand J Clin Lab Invest*. 1959;11:66-70.
24. Reisz JA, Chessler KM, Dzieciatkowska M, D'Alessandro A, Hansen KC. Blood and plasma proteomics: targeted quantitation and posttranslational redox modifications. *Methods Mol Biol*. 2017;1619:353-371.
25. Nemkov T, Reisz JA, Gehrke S, Hansen KC, D'Alessandro A. High-throughput metabolomics: isocratic and gradient mass spectrometry-based methods. *Methods Mol Biol*. 2019;1978:13-26.
26. Nemkov T, Hansen KC, D'Alessandro A. A three-minute method for high-throughput quantitative metabolomics and quantitative tracing experiments of central carbon and nitrogen pathways. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2017;31(8):663-673.
27. Sun K, Zhang Y, D'Alessandro A, et al. Sphingosine-1-phosphate promotes erythrocyte glycolysis and oxygen release for adaptation to high-altitude hypoxia. *Nat Commun*. 2016;7:12086.
28. Osei-Hwedie DO, Kanas T, Croix CS, et al. Sick cell trait increases red blood cell storage hemolysis and post-transfusion clearance in mice. *EBioMedicine*. 2016;11:239-248.
29. Kanas T, Stone M, Page GP, et al. Frequent blood donations alter susceptibility of red blood cells to storage- and stress-induced hemolysis. *Transfusion*. 2019;59(1):67-78.
30. Howie HL, Hay AM, de Wolski K, et al. Differences in Steap3 expression are a mechanism of genetic variation of RBC storage and oxidative damage in mice. *Blood Adv*. 2019;3(15):2272-2285.
31. Gunn RB, Silvers DN, Rosse WF. Potassium permeability in β -thalassemia minor red blood cells. *J Clin Invest*. 1972;51(5):1043-1050.
32. Olivieri O, De Franceschi L, Capellini MD, Girelli D, Corrocher R, Brugnara C. Oxidative damage and erythrocyte membrane transport abnormalities in thalassemias. *Blood*. 1994;84(1):315-320.
33. Tzounakas V, Drosos P, Karadimas D, et al. Hematological and physiological characteristics of regular blood donors with beta-thalassemia traits. *Vox Sang*. 2019;114(s1):abstract P-059.
34. Belfiore F, Meldolesi J, Calcaro G. Erythrocyte enzymes in thalassemia and thalassodrepanocytosis. *Acta Haematol*. 1965;34(6):329-337.
35. Reisz JA, Tzounakas VL, Nemkov T, et al. Metabolic linkage and correlations to storage capacity in erythrocytes from glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient donors. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:248.
36. D'Alessandro A, Fu X, Kanas T, et al. Donor sex, age and ethnicity impact stored red blood cell antioxidant metabolism through mechanisms in part explained by glucose 6-phosphate dehydrogenase levels and activity. *Haematologica*. 2021;106(5):1290-1302.
37. Omar AK, Ahmed KA, Helmi NM, et al. The sensitivity of Na(+), K(+) ATPase as an indicator of blood diseases. *Afr Health Sci*. 2017;17(1):262-269.
38. Wesseling MC, Wagner-Britz L, Nguyen DB, et al. Novel insights in the regulation of phosphatidylserine exposure in human red blood cells. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39(5):1941-1954.
39. Shalev O, Mogilner S, Shinar E, Rachmilewitz EA, Schrier SL. Impaired erythrocyte calcium homeostasis in beta-thalassemia. *Blood*. 1984;64(2):564-566.
40. Kupferschmid M, Aquino-Gil MO, Shams-Eldin H, et al. Identification of O-GlcNAcylated proteins in Plasmodium falciparum. *Malar J*. 2017;16(1):485.
41. Teran MM, Monaco ME, Lazarte SS, et al. Genetic regulation of redox balance in beta-thalassemia Trait. *Hemoglobin*. 2020;44(2):122-127.
42. Kand'ar R, Zakova P. Allantoin as a marker of oxidative stress in human erythrocytes. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(9):1270-1274.
43. Tzounakas VL, Karadimas DG, Anastasiadi AT, et al. Donor-specific individuality of red

- blood cell performance during storage is partly a function of serum uric acid levels. *Transfusion*. 2018;58(1):34-40.
44. Alexander K, Hazegh K, Fang F, et al. Testosterone replacement therapy in blood donors modulates erythrocyte metabolism and susceptibility to hemolysis in cold storage. *Transfusion*. 2021;61(1):108-123.
 45. Nemkov T, Sun K, Reisz JA, et al. Hypoxia modulates the purine salvage pathway and decreases red blood cell and supernatant levels of hypoxanthine during refrigerated storage. *Haematologica*. 2018;103(2):361-372.
 46. Hod EA, Zhang N, Sokol SA, et al. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. *Blood*. 2010;115(21):4284-4292.
 47. Kanas T, Acker JP. Biopreservation of red blood cells--the struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J*. 2010;277(2):343-356.
 48. Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest*. 2003;111(2):231-239.
 49. Meena LP, Kumar K, Singh VK, Bharti A, Rahman SK, Tripathi K. Study of mutations in beta-thalassemia trait among blood donors in eastern Uttar Pradesh. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(7):1394-1396.
 50. Anastasiadi AT, Tzounakas VL, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Seghatchian J, Antonelou MH. When I need you most: frozen red blood cells for transfusion. *Transfus Apher Sci*. 2020;59(3):102786.



Article

The Post-Storage Performance of RBCs from Beta-Thalassemia Trait Donors Is Related to Their Storability Profile

Alkmini T. Anastasiadi ¹, Efthymios C. Paronis ² , Vasiliki-Zoi Arvaniti ¹, Athanasios D. Velentzas ¹ ,
Anastasia C. Apostolidou ², Evangelos G. Balafas ², Monika Dzieciatkowska ³, Nikolaos G. Kostomitsopoulos ² ,
Konstantinos Stamoulis ⁴, Issidora S. Papassideri ¹, Angelo D'Alessandro ³ , Anastasios G. Kriebardis ⁵ ,
Marianna H. Antonelou ^{1,*} and Vassilis L. Tzounakas ^{1,*}

- ¹ Department of Biology, School of Science, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), 15784 Athens, Greece; alkanast@biol.uoa.gr (A.T.A.); vazoarvaniti@gmail.com (V.-Z.A.); tveletz@biol.uoa.gr (A.D.V.); ipapasid@biol.uoa.gr (I.S.P.)
- ² Center of Clinical, Experimental Surgery & Translational Research, Biomedical Research Foundation, Academy of Athens (BRFAA), 11527 Athens, Greece; eparonis@bioacademy.gr (E.C.P.); apostolidou@bioacademy.gr (A.C.A.); vbalafas@bioacademy.gr (E.G.B.); nkostom@bioacademy.gr (N.G.K.)
- ³ Department of Biochemistry and Molecular Genetics, School of Medicine, Anschutz Medical Campus, University of Colorado, Aurora, CO 80045, USA; monika.dzieciatkowska@ucdenver.edu (M.D.); angelo.dalessandro@ucdenver.edu (A.D.)
- ⁴ Hellenic National Blood Transfusion Centre, Acharnes, 13677 Athens, Greece; kostas.stamoulis@gmail.com
- ⁵ Laboratory of Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology (HemQcR), Department of Biomedical Sciences, School of Health & Welfare Sciences, University of West Attica (UniWA), 12243 Egaleo, Greece; akrieb@uniwa.gr
- * Correspondence: manton@biol.uoa.gr (M.H.A.); tzounak@biol.uoa.gr (V.L.T.)
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Anastasiadi, A.T.; Paronis, E.C.; Arvaniti, V.-Z.; Velentzas, A.D.; Apostolidou, A.C.; Balafas, E.G.; Dzieciatkowska, M.; Kostomitsopoulos, N.G.; Stamoulis, K.; Papassideri, I.S.; et al. The Post-Storage Performance of RBCs from Beta-Thalassemia Trait Donors Is Related to Their Storability Profile. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12281. <https://doi.org/10.3390/ijms222212281>

Academic Editor: Francesco Misiti

Received: 22 October 2021

Accepted: 11 November 2021

Published: 13 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Blood donors with beta-thalassemia traits (βThal^+) have proven to be good “storers”, since their stored RBCs are resistant to lysis and resilient against oxidative/proteotoxic stress. To examine the performance of these RBCs post-storage, stored βThal^+ and control RBCs were reconstituted in plasma donated from transfusion-dependent beta-thalassemic patients and healthy controls, and incubated for 24 h at body temperature. Several physiological parameters, including hemolysis, were evaluated. Moreover, labeled fresh/stored RBCs from the two groups were transfused in mice to assess 24 h recovery. All hemolysis metrics were better in the group of heterozygotes and distinguished them against controls in the plasma environment. The reconstituted βThal^+ samples also presented higher proteasome activity and fewer procoagulant extracellular vesicles. Transfusion to mice demonstrated that βThal^+ RBCs present a marginal trend for higher recovery, regardless of the recipient's immune background and the RBC storage age. According to correlation analysis, several of these advantageous post-storage characteristics are related to storage phenotypes, like the cytoskeleton composition, low cellular fragility, and enhanced membrane proteostasis that characterize stored βThal^+ RBCs. Overall, it seems that the intrinsic physiology of βThal^+ RBCs benefits them in conditions mimicking a recipient environment, and in the circulation of animal models; findings that warrant validation in clinical trials.

Keywords: red blood cells; blood transfusion; beta-thalassemia; biomarkers; donor variation; post-transfusion recovery; mouse model

1. Introduction

Heterozygotes for beta-thalassemia mutations (βThal^+) constitute a significant percentage of the general population in several Mediterranean, Sub-Saharan African, and Southeast Asian areas, and also represent a non-negligible proportion of eligible blood donors [1–3]. The unique physiology of their red blood cells (RBCs) regarding geometry and cation permeability [4], and the slightly elevated oxidative stress these cells encounter

due to imbalanced globin chain synthesis [5], have unexpectedly proven to be advantageous for withstanding the storage lesion under blood bank conditions. Stored RBCs from β Thal⁺ donors are exceptional in terms of spontaneous hemolysis, osmotic, and mechanical fragility [1], probably owing to the differential expression of several membrane and cytoskeleton proteins [6] that may provide resistance to lysis [7]. Moreover, the levels of diverse metabolic (e.g., allantoin) [1], protein (membrane-bound antioxidant enzymes) [6], and physiological (membrane protein carbonylation and end-of-storage reactive oxygen species (ROS) accumulation) [1] variables suggest the existence of a superior antioxidant defense system in stored β Thal⁺ RBCs. The abovementioned redox parameters seem to be strongly connected to an equally remarkable proteostasis network working mainly at the membrane in situ [8].

In the last years, many studies have shown that donors' genetic and non-genetic features may not only impact the storability of the donated RBCs but also their post-transfusion efficacy [9]. For instance, blood units from females appear to be superior in terms of hemolysis [10] and redox [11] variables during storage but can be life-threatening in sex miss-matched transfusions [12]. Another example are glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficient individuals, who while being adequate "storerers" [13–15], are quite poor "donors" according to both in vitro and in vivo studies [13,16]. In the same context, the RBCs from obese donors are prone to storage lesions and exhibit a trend towards lower recovery in mice [17]. The ever-growing list of donor-related effects on storage capacity and recovery highlighted the need to identify potential biomarkers of transfusion efficacy in fresh and stored blood [18–21]. Since RBCs from β Thal⁺ present a superior storability profile, the aim of this study was to unravel (a) their physiological features when exposed to a potential recipient's environment in vitro and their recovery when transfused to animal models; as well as (b) potential links between their storage and post-storage states.

2. Results

2.1. Exposure of Stored RBCs to Plasma at Body Temperature

To study the effects of plasma and body temperature upon stored β Thal⁺ RBCs, we used an in vitro model (Figures 1A and 2A) that mimics part of the recipient's environment. In comparison to controls, β Thal⁺ stored RBCs exhibited lower levels of spontaneous, mechanical, osmotic, and oxidative hemolysis when exposed to either healthy (Figure 1B) or beta-thalassemic (Figure 2B) plasma, following both early and late storage. According to receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, the osmotic, mechanical, storage and oxidative (in late-stored RBCs) types of hemolysis have very good potential to predict the β Thal⁺ status regardless of the plasma environment (Figure S1). Concerning redox-related parameters, while intracellular ROS were equal between the two groups in healthy plasma (Figure 1C), membrane lipid peroxidation was minor in the group of β Thal⁺ (Figure 1E). The pattern was slightly different in the disease environment, where intrinsic intracellular ROS presented lower values in late stored β Thal⁺ RBCs, along with a trend ($p > 0.05$) in diamide-induced ROS (Figure 2C), but lipid peroxidation did not differ from controls (Figure 2E). All three proteasome activities were greater in the same group, regardless of plasma background (Figures 1D and 2D). Lastly, while phosphatidylserine (PS) exposure was equal between the two groups, PS⁺ extracellular vesicles (EVs) were fewer in the heterozygous reconstituted RBCs in both plasma conditions (Figures 1F and 2F).

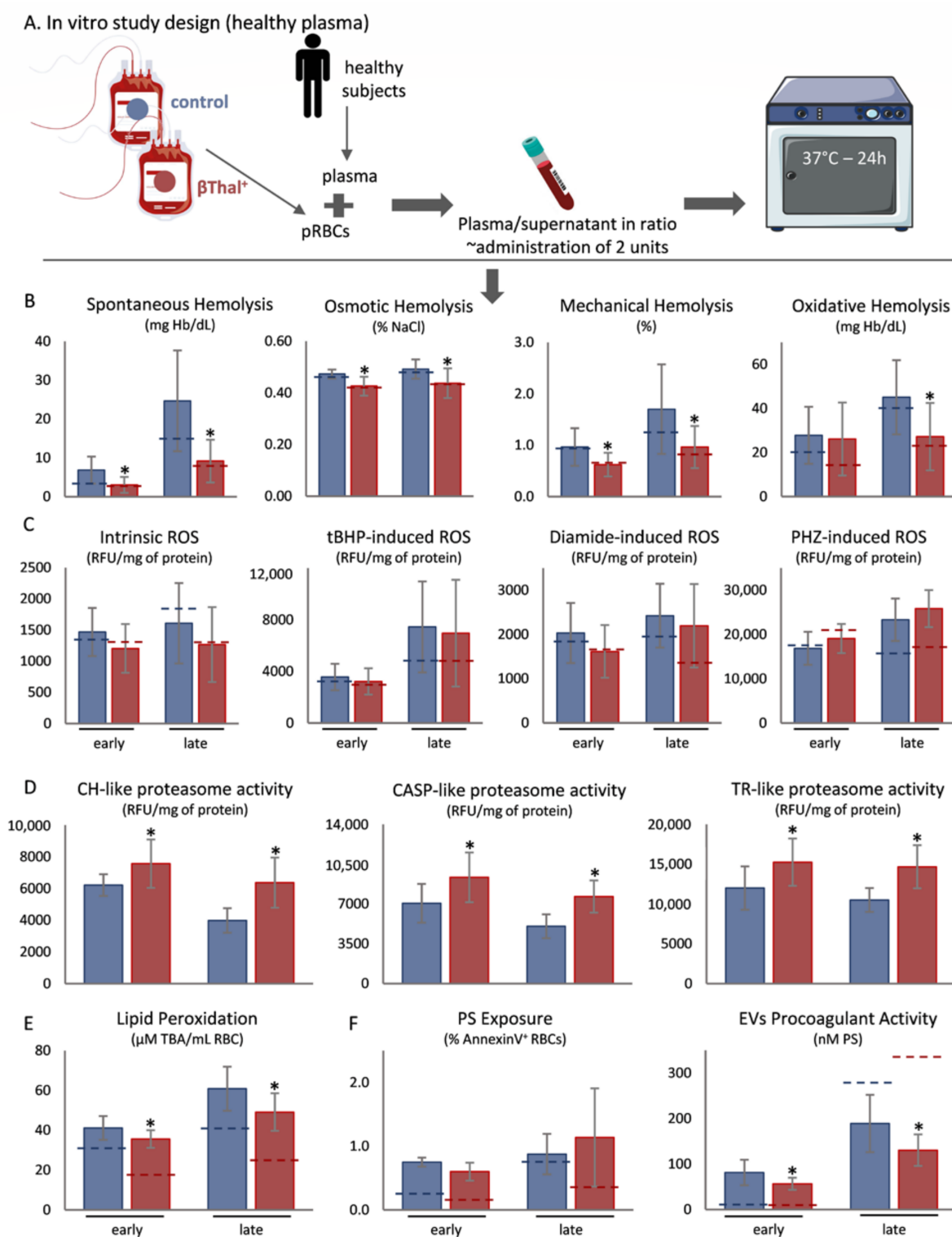


Figure 1. Physiological aspects of beta-thalassemia trait (β Thal⁺) RBCs upon exposure to healthy plasma at body temperature. (A) Experimental design. (B) Hemolysis parameters, (C) intracellular reactive oxygen species (ROS), (D) proteasome activity, (E) membrane lipid peroxidation and (F) phosphatidylserine (PS) exposure on RBCs and extracellular vesicles (EVs), between control and β Thal⁺ reconstituted RBCs ($n = 10$ per group). (*) $p < 0.05$, β Thal⁺ vs. control reconstituted RBCs. Dashed lines: average levels of stored RBCs at 4 °C. tBHP: tert-butyl hydroperoxide; PHZ: phenylhydrazine; CH: chymotrypsin; CASP: caspase; TR: trypsin; TBA: thiobarbituric acid.

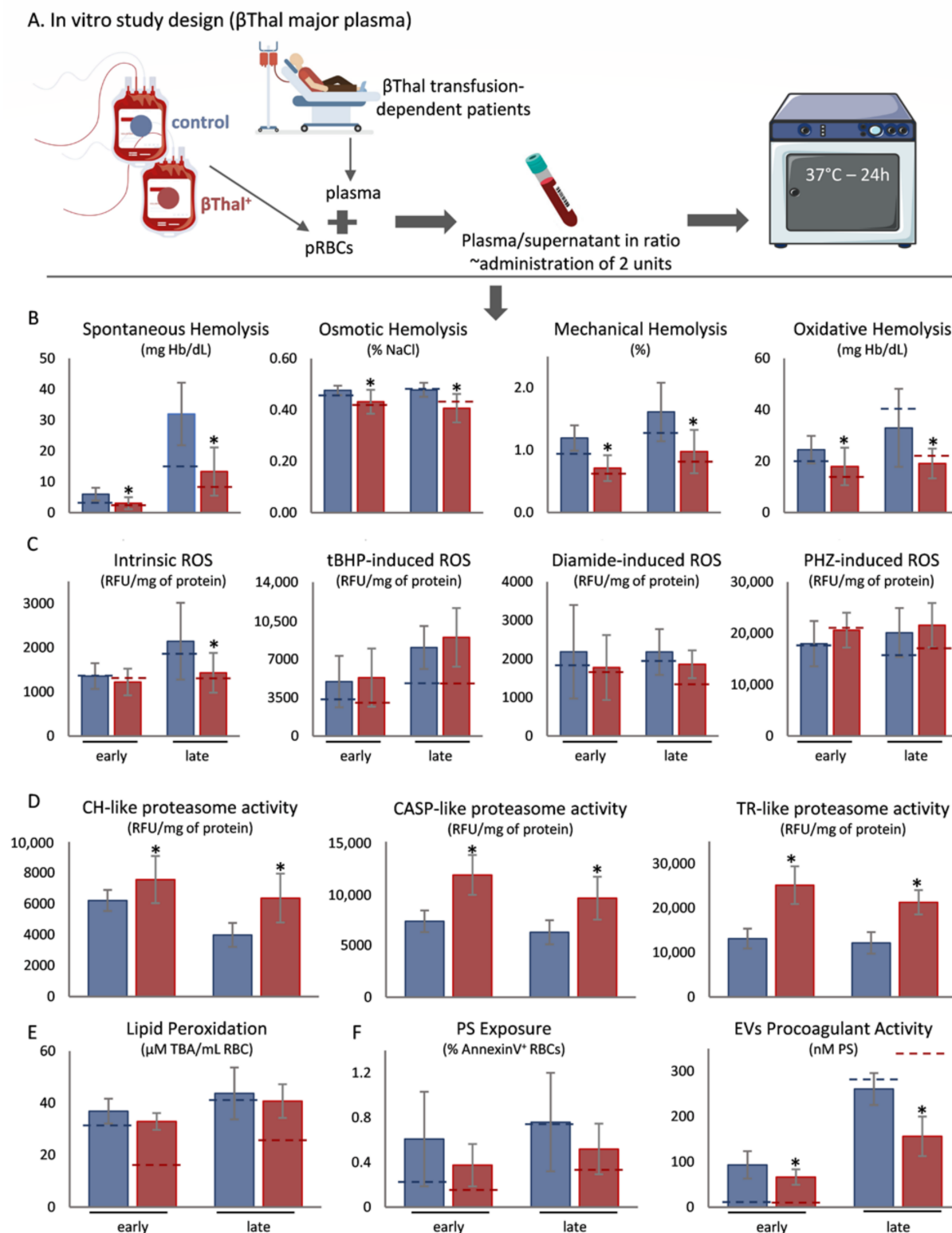


Figure 2. Physiological aspects of beta-thalassemia trait (β Thal⁺) RBCs upon exposure to beta-thalassemic plasma at body temperature. (A) Experimental design. (B) Hemolysis parameters, (C) intracellular reactive oxygen species (ROS), (D) proteasome activity, (E) membrane lipid peroxidation and (F) phosphatidylserine (PS) exposure on RBCs and extracellular vesicles (EVs), between control and β Thal⁺ reconstituted RBCs ($n = 10$ per group). (*) $p < 0.05$, β Thal⁺ vs. control reconstituted RBCs. Dashed lines: average levels of stored RBCs at 4 °C. tBHP: tert-butyl hydroperoxide; PHZ: phenylhydrazine; CH: chymotrypsin; CASP: caspase; TR: trypsin; TBA: thiobarbituric acid.

2.2. Correlations between Storage and Post-Storage Metrics

We then sought to search for links between the storage and post-reconstitution profiles of β Thal⁺ and control RBCs. Interestingly, components of the cytoskeleton, such as spectrin, as well as a variety of carnitines and albumin negatively correlated with post-reconstitution hemolysis in both groups (Figure 3A). This was also the case for antioxidant molecules and intracellular ATP, while the opposite pattern was observed for NADP⁺ and several stress markers, like lactate (in β Thal⁺) and membrane-bound peroxiredoxin-2 (Figure 3A). Osmotic hemolysis of reconstituted RBCs was proportional to that of storage in both donor-groups, and further related to mechanical hemolysis in heterozygotes (Figure 3B). Once again, correlation with membrane and cytoskeletal parameters, along with raft components, was universally evident. While the storage levels of intracellular ROS and ADP (in β Thal⁺) presented a positive correlation with osmotic hemolysis, the presence of proteostatic molecules in the membrane resulted in negative correlations (Figure 3B). Moving on, both osmotic and mechanical fragilities of stored β Thal⁺ RBCs positively correlated with mechanical hemolysis post-mixing, while many members of the cytoskeleton, such as myosin-9, and the mechanosensitive channel piezo-1 presented negative or positive correlations, respectively, in both groups (Figure 3C). Stress markers (e.g., lactate) and energy depletion (e.g., AMP) had further positive correlations with mechanical fragility, while the presence of metabolites of glycolysis, like glyceraldehyde 3-phosphate demonstrated the opposite link (Figure 3C). Finally, even though storage ROS levels were positively associated with oxidative hemolysis post-reconstitution, regardless of the donor, the oxidative hemolysis storage and post-mixing levels were intra-correlated only in the group of controls (Figure 3D). Antioxidant molecules, like catalase, and an abundance of proteostasis-related proteins (e.g., proteasome subunits, HSPs) were inversely associated with oxidative hemolysis, while AMP levels offered a positive association (Figure 3D).

Regarding ROS accumulation post-mixing, a general interconnection between intrinsic/induced ROS of stored samples and intrinsic/phenylhydrazine (PHZ)-induced ROS of reconstituted samples was observed, accompanied by a reverse correlation with antioxidant molecules, like ascorbate or glutathione (Figure 4A,B). Metabolites of energy reserve, like ATP and phosphate, and protein-control parameters, such as proteasome and T-complex subunits, also inversely correlated with intrinsic and PHZ-induced ROS. Of note, correlations with proteasomic activities exceeded the statistical threshold only in the case of β Thal⁺ RBCs (Figure 4A,B). Tert-butyl hydroperoxide (tBHP)- and diamide-induced ROS post-mixing presented analogous connections (e.g., diamide-induced with diamide-induced, $r = 0.837$ vs. $r = 0.914$; T-complex protein 1 with tBHP-induced: $r = -0.746$ vs. $r = -0.732$, β Thal⁺ vs. controls). Concerning caspase (CASP)-like proteasome activity, positive correlations with stored RBCs' proteasome components and activities, chaperones, and antioxidant molecules (mainly in β Thal⁺) were observed in both groups, while oxidative stress markers showed a different pattern in early versus late storage: positive correlations in the beginning (e.g., with allantoin), and negative later on (e.g., with intrinsic ROS) (Figure 4C). Similar correlations were observed in the other two activities (e.g., HSP90 with chymotrypsin (CH)-like activity, $r = 0.812$ vs. $r = 0.875$; PSMB5 with trypsin (TR)-like activity, $r = 0.780$ vs. $r = 0.833$, β Thal⁺ vs. controls). Lipid peroxidation in the recipient environment was negatively associated with the levels of energy potential (e.g., adenine) and raft-related stomatin in both groups, as well as with pyridoxamine and sphingosine in the group of heterozygotes (Figure 4D). Intrinsic ROS and membrane-bound immunoglobulin levels provided positive links (Figure 4D). Notably, PS exposure post-mixing, both in RBCs and EVs, was associated with RBC redox status (e.g., positive with intrinsic ROS), along with flipping-related parameters (e.g., negative with flippase) during storage. As expected, calcium homeostasis was present in the analysis of RBC PS externalization (e.g., positive with calpain), whereas energy equilibrium was reflected in the one of PS⁺ EVs (e.g., positive with lactate).

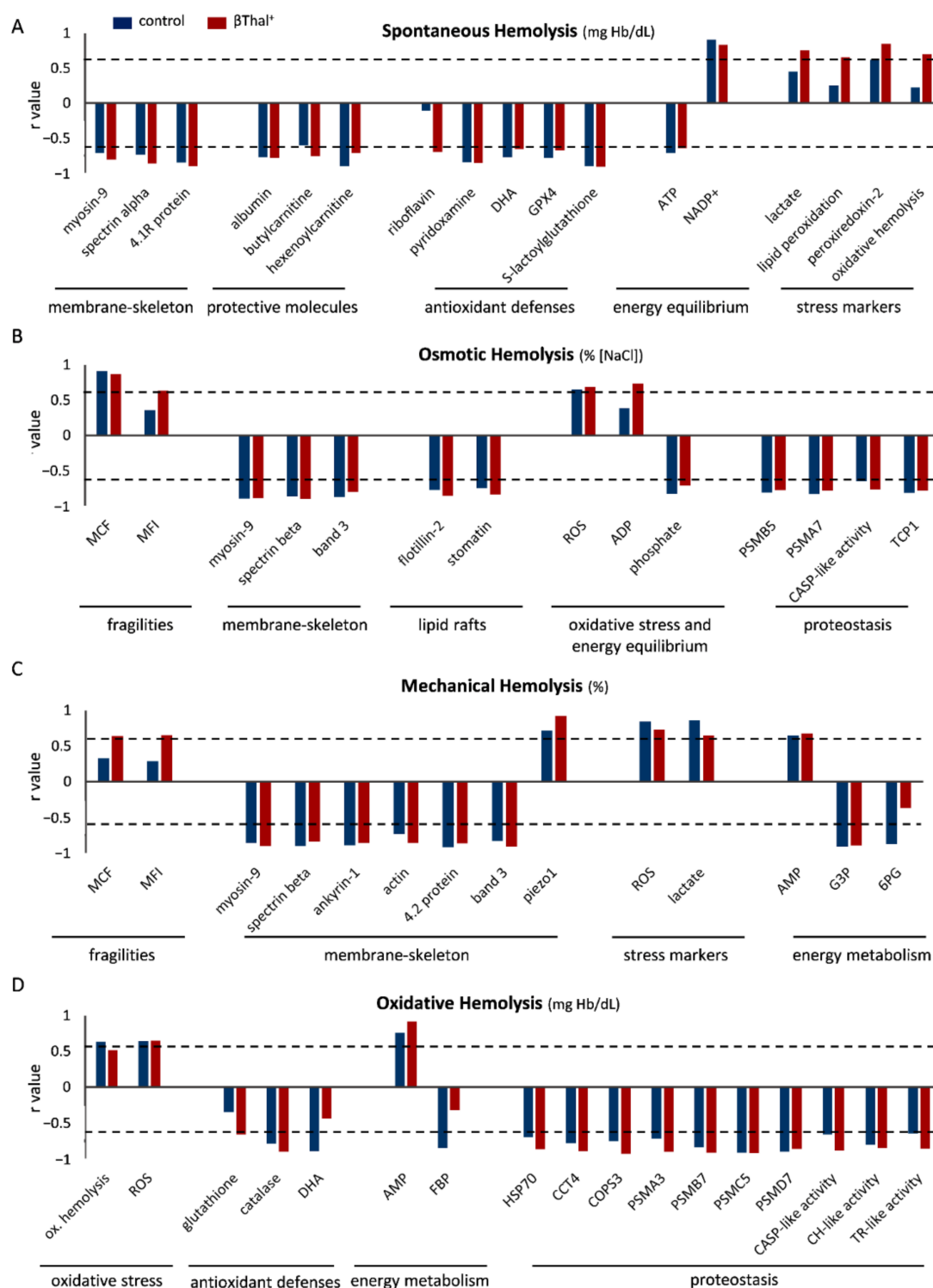


Figure 3. Correlations of storage variables (horizontal axis) with hemolysis parameters post-mixing with plasma. Parameters correlating with (A) spontaneous, (B) osmotic, (C) mechanical, and (D) oxidative hemolysis of late-stored control and beta-thalassemia trait (β Thal⁺) reconstituted RBCs in thalassemic plasma ($n = 10$ per group) are shown. Similar correlations with slightly different r values emerged in all conditions tested. Dashed line: statistical threshold ($p < 0.05$). 6PG: 6-phosphogluconate, CASP: caspase, CCT: T-complex subunit, CH: chymotrypsin, COPS: COP9 signalosome subunit, DHA: dehydroascorbate, FBP: D-fructose 1 6-bisphosphate, G3P: glyceraldehyde 3-phosphate, GPX4: glutathione peroxidase 4, MCF: mean corpuscular fragility, MFI: mechanical fragility index, ox. hemolysis: oxidative, PSM: proteasome subunit, TCP1: T-complex protein 1, TR: trypsin.

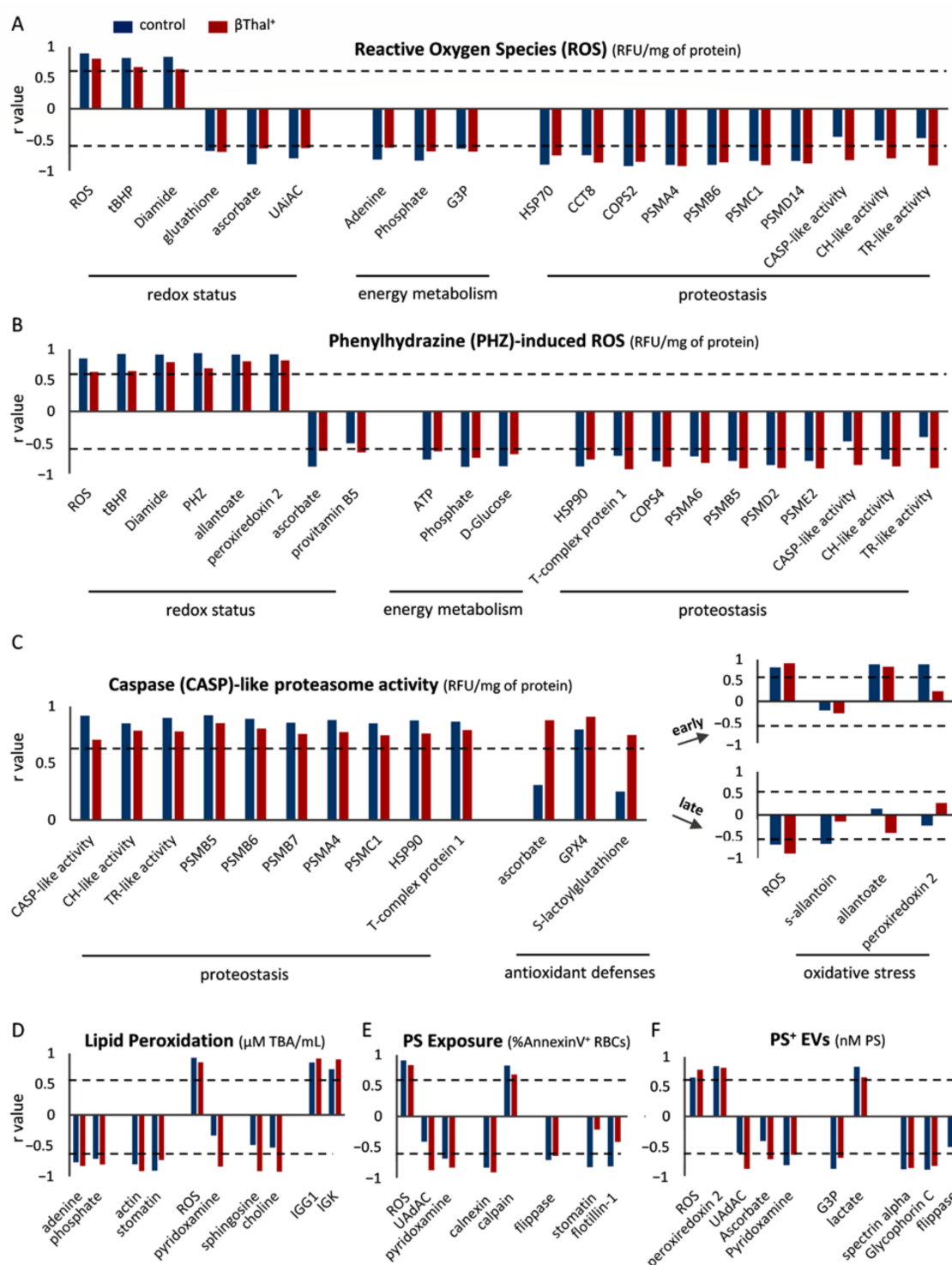


Figure 4. Correlations of storage variables (horizontal axis) with parameters regarding oxidative stress, proteostasis, and phosphatidylserine (PS) exposure post-mixing with plasma. Parameters correlating with (A) intrinsic and (B) phenylhydrazine-induced ROS, (C) caspase-like proteasome activity, (D) lipid peroxidation, (E) phosphatidylserine (PS) exposure, and (F) PS-positive EVs of late-stored control and beta-thalassemia trait (β Thal⁺) reconstituted RBCs in thalassemic plasma ($n = 10$ per group) are shown. Similar correlations with slightly different r values emerged in all conditions tested. Dashed line: statistical threshold ($p < 0.05$). CASP: caspase, CCT: T-complex subunit, CH: chymotrypsin, COPS: COP9 signalosome subunit, G3P: glyceraldehyde 3-phosphate, GPX4: glutathione peroxidase 4, PSM: proteasome subunit, tBHP: tert-butyl hydroperoxide, TR: trypsin, UAdAC: uric-acid-dependent and UAiAC: uric-acid-independent antioxidant capacity.

2.3. Transfusion to Animal Models

To examine the post-transfusion recovery of stored βThal^+ RBCs, the newly derived RBC units were studied throughout storage to confirm that they were representative of the βThal^+ -related storage lesion profile. As expected [1], the βThal^+ RBC units presented lower levels of storage, osmotic, mechanical, and oxidative hemolysis, either throughout storage or at mid-storage onwards, as well as increased extracellular antioxidant capacity, especially uric acid (UA)-dependent (Table S1). There was also a lower accumulation of intrinsic ROS and minor lipid peroxidation already from day 21 (Table S1).

Following transfusion of a mixture of differentially labeled βThal^+ and control RBCs to NOD.CB17-Prkdcscid/J and C57BL/6J mice (Figure 5A), there was no obvious alteration in their behavior. Specifically, animals were not lethargic but with normal mobility, showing normal food and water consumption and visible behavioral patterns concerning sociality like grooming, sniffing, and climbing. Weekly weighing showed no difference between transfused and non-transfused mice (Figure 5B), while there was an increase in free hemoglobin (Hb) in both plasma (Figure 5C) and urine (Figure 5D) 20-min post-transfusion in both immunosufficient and immunodeficient mice, but not 24 h later.

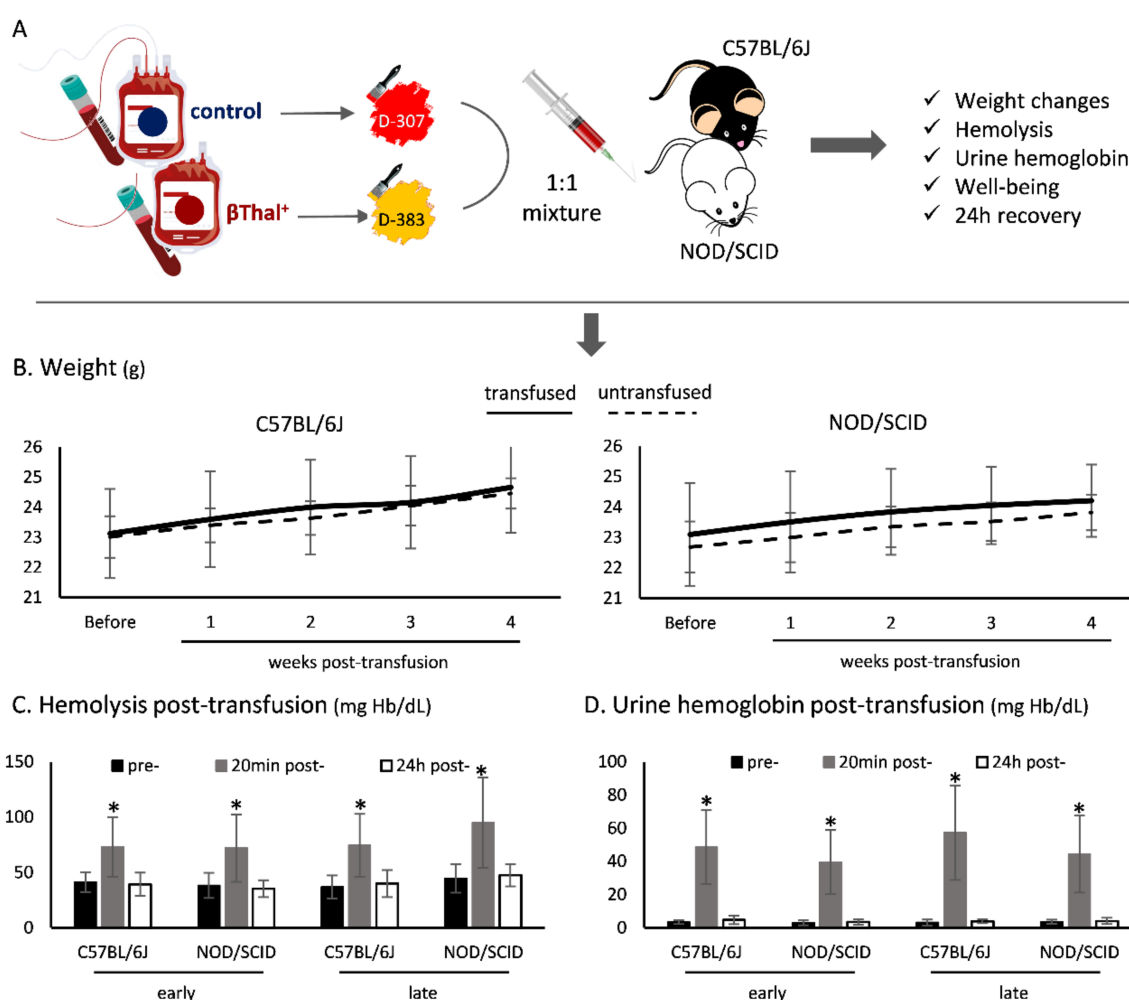


Figure 5. Wellbeing and hemolysis parameters of recipient mice post-transfusion with human RBCs stored under blood bank conditions. (A) Experimental design. (B) Weight changes of mice by weekly measurements post-transfusion, against non-transfused controls. Free hemoglobin in (C) plasma and (D) urine of mice before and after transfusion (*) $p < 0.05$ 20 min post- versus pre- and 24 h post-transfusion. $n = 16$ per group for all measurements.

To be sure that the observed hemolysis did not differ between the two donor groups (and hence did not influence the results of post-transfusion recovery), we infused animals of the two genetic backgrounds with RBCs from controls and heterozygotes separately. No difference was observed neither in plasma (e.g., late-stored, 20 min in C57BL/6J: 81.37 ± 38.55 vs. 85.62 ± 31.57 ; in NOD.CB17-Prkdcscid/J: 92.55 ± 32.12 vs. 87.32 ± 28.48 , βThal^+ vs. controls) nor in urine free Hb (e.g., late-stored, 20 min in C57BL/6J: 48.52 ± 19.35 vs. 42.86 ± 21.7 ; in NOD.CB17-Prkdcscid/J: 40.32 ± 26.70 vs. 51.28 ± 32.52 , βThal^+ vs. controls).

Moving on to post-transfusion recovery, there was a universal trend for higher levels in the RBCs of βThal^+ in both C57BL/6J (Figure 6A) and NOD.CB17-Prkdcscid/J (Figure 6B) mouse recipients.

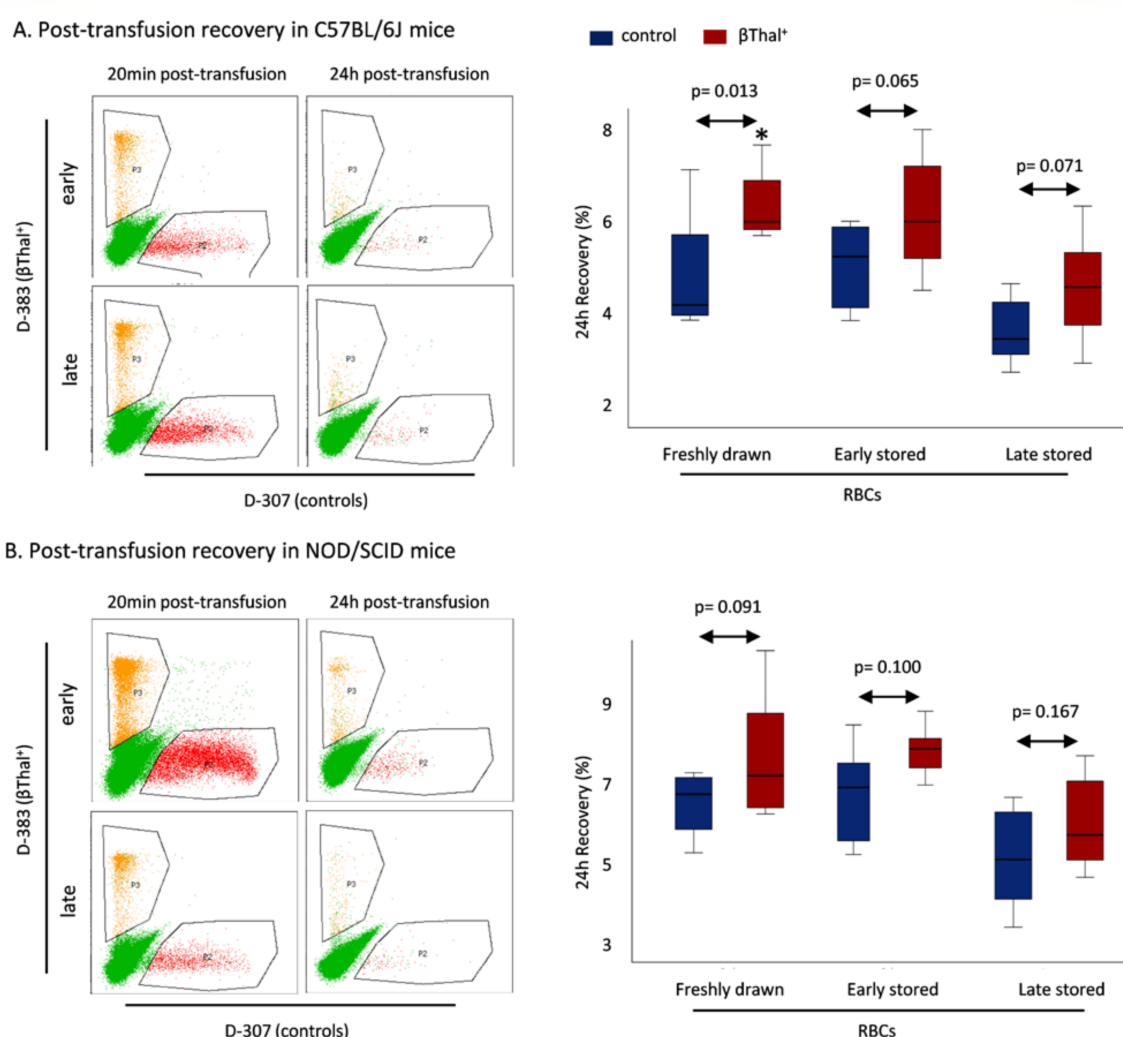


Figure 6. Recovery of human RBCs 24 h post transfusion in recipient-mice. Indicative flow cytometry dot plot images and the levels of post-transfusion recovery are shown in (A) C57BL/6J and (B) NOD.CB17-Prkdcscid/J mice. (*) $p < 0.05$, beta-thalassemia trait (βThal^+) vs. control transfused RBCs ($n = 8$ per group).

While it has been previously shown that the two dyes used do not label differently cells of distinct donor groups and do not alter the transfusion outcome (as evidenced by transfusion of unstained RBCs to mice expressing the green fluorescent protein—GFP [22]), since βThal^+ RBCs have not been tested in post-transfusion recovery experiments yet, we wanted to check for this feature in our samples. Indeed, comparable trends for higher recovery in heterozygotes were observed when βThal^+ and control RBCs were reversely labeled (Table S2). It should be noted that if the two labeling experiments (which provide

equivalent results) are taken together ($n = 16$ transfusion events), the trends and sporadic significant differences, observed in Figure 6 and Table S2, universally surpass the threshold of statistical significance (e.g., early-stored RBCs in NOD.CB17-Prkdcscid/J: 7.57 ± 1.07 vs. 6.54 ± 1.16 , $p = 0.016$; late-stored RBCs in C57BL/6J: 4.83 ± 1.19 vs. 3.89 ± 0.75 , $p = 0.012$, βThal^+ vs. controls).

2.4. Correlations of Recovery with Storage Physiology

Our next and final step was to search for possible correlations between the storage physiology and the post-transfusion recovery of βThal^+ and control RBCs. Interestingly, storage (Figure 7A), osmotic (Figure 7B), and mechanical (Figure 7C) hemolysis demonstrated significant negative correlations with 24 h recovery of βThal^+ RBCs, in both early and late storage, whereas only spontaneous hemolysis of late storage exceeded the significance threshold in the control group (Figure 7A). Among the oxidative-stress-related variables, while end-of-storage oxidative hemolysis was inversely associated with the recovery of both groups' transfused RBCs (Figure 7D), intrinsic (Figure 7E) and tBHP-induced (Figure 7F) ROS exhibited the same link only in the case of heterozygotes.

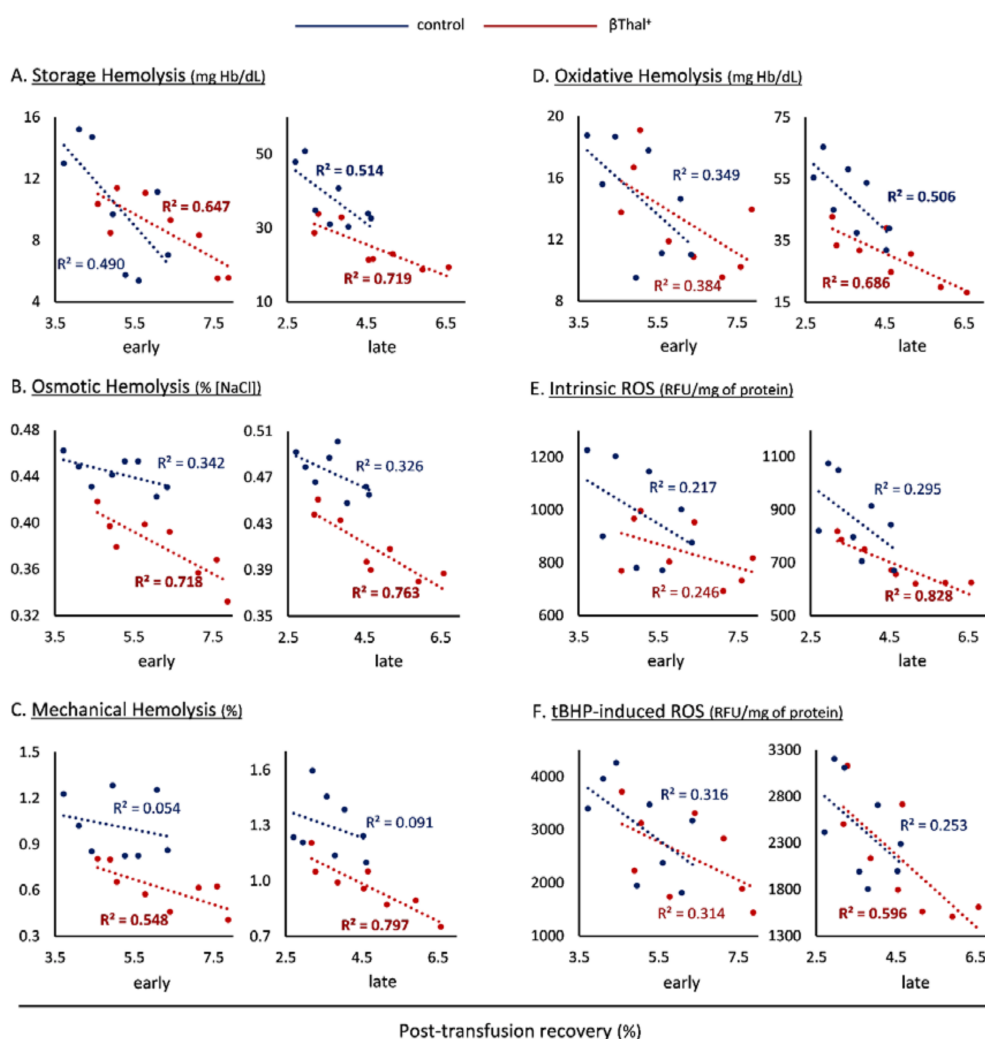


Figure 7. Correlations between physiological parameters of stored RBCs and post-transfusion recovery in C57BL/6J mice. Correlations of recovery with (A) storage, (B) osmotic, (C) mechanical, and (D) oxidative hemolysis, as well as with (E) intrinsic and (F) tBHP-induced ROS are shown for beta-thalassemia trait (βThal^+) and control RBCs ($n = 8$ per group). $R^2 > 0.5$ for $p < 0.05$. Similar results, with slightly different R^2 values emerged in NOD.CB17-Prkdcscid/J recipient mice.

3. Discussion

Previous works from our team have demonstrated that stored RBCs from blood donors with beta-thalassemia traits are superior to the average control regarding (a) hemolysis (spontaneous or stress-induced); (b) removal signaling; (c) redox equilibrium [1]; (d) preservation of membrane and cytoskeleton components [6]; and (e) membrane proteo-vigilance served by a complex network of active proteasomes and recruited “protect, repair, destroy or sacrifice” proteins [8,23]. We hereby validate and expand on these findings from β Thal⁺ stored RBCs, by reporting for the first time maintenance of their outstanding resistance to lysis in a recipient-mimicking environment in vitro, as well as the potential for higher post-transfusion recovery in xenobiotic animal models of transfusion. Furthermore, our results give hints about aspects of RBC physiology, such as hemolysis, energy/redox equilibrium, membrane/cytoskeleton properties, and proteostatic elements, that link the storage and post-storage/post-transfusion behaviors of RBCs.

3.1. Stored RBC Features in Recipient Plasma and Temperature

The current results support that β Thal⁺ RBCs are characterized by favorable hemolysis from the time of donation (mainly fragility indices), throughout storage [1] and even within a potential recipient's environment (Figure S1). The fact that these profiles are evident in both plasma conditions indicates that β Thal⁺ RBCs' resistance to lysis is an intrinsic characteristic, not affected by common soluble plasma factors and ambient temperature. A plausible explanation for this resistance to rupture [24] is the reduced cellular volume and increased surface:volume ratio of β Thal⁺ RBCs [25]. Moreover, it might be connected to their unique cytoskeleton [6], as evidenced by the massive correlation outcomes between fragility indices and several cytoskeletal components. A recent genome-wide association study of the REDS-III program reinforces our findings, especially regarding osmotic fragility: genes known to modulate RBC membrane organization, like band-3, myosin and spectrin, have been found associated with the osmotic hemolysis of stored RBCs [7]. The same was also true for donors carrying common single nucleotide polymorphisms in the N-terminus of band-3 [26]. The specialized spectrin-based RBC cytoskeleton and its numerous linkages to membrane proteins allow the cell to reversibly deform while passing through the narrow capillaries, while a variety of mutations in the genes of the proteins involved lead to hemolytic anemias in humans [27]. Non-muscle myosin II has been also associated with the control of the curvature and deformability—a biophysical marker of RBC fragility [28]—of cells with either actin- or spectrin/actin-based cytoskeletons [29,30]. Altogether; (a) the higher levels and/or stability of several structural proteins in β Thal⁺ RBCs throughout storage [6], (b) the lower levels of post-mixing hemolysis, fragility indices and microvesiculation (indirectly measured) in the same cells, and (c) the mutual—amongst the two groups—negative correlation between (a) and (b), tempt us to assume that the construction of β Thal⁺ RBCs is one of the main reasons behind their resistance to lysis. In addition, piezo-1, a mechanosensor that regulates RBC shape through ion-related volume reduction, was found to be decreased in the same donors [6], in close correlation with mechanical (in both controls and heterozygotes) and in association with osmotic hemolysis [7]. It is very enticing to hypothesize that the microcytic β Thal⁺ RBCs are less susceptible to shear stress in the circulation, and thus minimal signal transduction through piezo-1 molecules is required. Whether decreased levels of piezo-1 molecules are genetically determined in these cells remains unclear, however, association/correlation with osmotic and mechanical fragilities might be the reason behind the observed preferential crosstalk between the two fragility indices only in stored/reconstituted heterozygous erythrocytes.

In the same context, reconstituted β Thal⁺ RBCs possess enhanced proteasome activity, which nonetheless presents a universal correlation with the increased storage levels of proteasome (components and activities) and chaperones compared to controls [6,8]. Moreover, antioxidant defense molecules were found to be tightly connected to β Thal⁺ proteasome activity post-mixing, highlighting once again the closer connection between redox balance

and proteostasis in these subjects [8]. It appears that the storage levels of “protect, repair or destroy” components are not neutral to post-storage proteasome activities; a finding that may be relevant to transfusion outcomes. The interesting change in the correlation sign observed between the storage levels of oxidative stress and post-mixing proteasome activity in early versus late storage further supports—and expands to a post-storage environment—the hypothesis that proteasome machinery is both effective against [31] and affected by [32] the oxidative burden [8]. This interplay between redox equilibrium and protein quality control was anticipated. It has been shown before by protein–protein interactomes and bioinformatics analyses [33,34], and it is currently observed in both directions: proteostasis is not only affected by oxidative stress, but it seems to protect the reconstituted cells from oxidative lysis and ROS accumulation. Interestingly, lower oxidative RBC lysis, after treatment with the Hb-targeting phenylhydrazine, was observed in the proteasome enriched β Thal⁺ samples, implying a role for the proteasome in the degradation of oxidized Hb [35].

Naturally, the redox and energy equilibrium of stored RBCs affected all tested post-mixing parameters in both groups. It is widely established that oxidative stress lies behind storage lesion phenotypes [36], while antioxidant molecules of stored RBCs have been found to correlate with the 24 h post-transfusion recovery in mice [37]. In accordance, our *in vitro* experiments revealed interesting correlations of redox factors with RBC physiology. The oxidative burden of the cells, mainly shown through ROS accumulation, leads to fragile cells that are more prone to oxidative damage and surface exposure of removal signals in both groups post reconstitution, while ROS and oxidative hemolysis levels post-storage are proportional to those before reconstitution. The first observations were expected, since the oxidative stress generated under storage conditions insults key structural and functional RBC components leading to PS exposure [36] and reduction of deformability [28,38]. However, to our knowledge, this is the first time that measures of oxidative stress in stored RBCs have been shown to be conserved in a post-storage state. On the contrary, several antioxidant molecules of stored RBCs counteract to protect them post-storage. For instance, glutathione peroxidase 4 (GPX4) levels anticorrelate with hemolysis, and extracellular antioxidant capacity with ROS accumulation and concentration of procoagulant EVs. Both findings have been previously observed during storage [39,40], so it seems that these antioxidants continue to protect stored RBCs after “re-addition” of plasma. Finally, pyridoxamine, previously shown to (a) ameliorate oxidative and ion transport defects in RBCs [41], and (b) be more abundant in β Thal⁺ stored erythrocytes [1], showed many negative correlations with an array of parameters, a great part of which were favorable in the group of heterozygotes post-mixing (e.g., hemolysis and lipid peroxidation). Stored RBCs are characterized by rapid depletion of energy, even under hypothermic conditions. Lactate, a biomarker of stored RBC age [42], accumulates during storage leading to pH alteration and metabolism inhibition, hence its positive correlation with a variety of lesions. When found in an environment closer to “normal”, like the one of our model, RBC enzymes can restart working at their natural pace, as evidenced by the rapid replenishment of 2,3-diphosphoglycerate [43] and ATP [44] post-transfusion. Nonetheless, the correlations between storage energy metabolism/equilibrium and almost every parameter tested post-reconstitution indicate that better preservation of energy reservoirs benefits even more the cell physiology post-mixing. To support this, stored erythrocytes with greater ATP levels present a higher viability post-transfusion [45,46]. Energy metabolites have been also shown to be beneficial for RBC integrity during storage [47]. The other side of the coin, AMP, a low energy signal also present in our correlation outcomes, is a precursor of hypoxanthine, a metabolite shown to anticorrelate with post-transfusion recovery in both mice and men [48].

3.2. Transfusion to Animal Models

The discrete physiology of β Thal⁺ RBCs that has been proven to be beneficial during storage and post reconstitution, might be the underlying force for the observed trend—or statistical significance if all transfusion replicates/events are taken into account—for

superior post-transfusion recovery in vivo. This strong trend, which was not attributed to acute clearance due to hemolytic reactions (evidenced by similar between-groups levels of plasma and urine Hb), arose in both immunosufficient and immunodeficient mice, with the levels of 24 h recovery being higher in the latter case, as previously reported [49]. Correlations that predominated in β Thal⁺ subjects, mainly between hemolysis (with or without additional stresses) and post-transfusion recovery, further support our claim. Interestingly, a recent study investigating obese blood donors also revealed an inverse association of storage and osmotic hemolysis with post-transfusion recovery [17]. The preferential linkage of fragility indices with RBC survival in the group of heterozygotes is extremely fascinating. It is known that poorly deformable RBCs are retained in the spleen [50], while replication of the inter-endothelial slits in vitro via microfluid devices suggested that the mechanically aged RBCs are susceptible to phagocytosis, showing in parallel loss of proteins involved in cytoskeleton architecture, cell metabolism, antioxidant protection, and microvesiculation of the membrane [51]. Of note, rapid clearance of non-reversible micro-erythrocytes decreases transfusion recovery [52]; a finding consistent with the higher levels of circulating β Thal⁺ RBCs in the blood stream of our transfused mice, since these cells are reported to resist non-reversible transformation during middle/late storage [6]. In this context, it should not be omitted that the size of transfused RBCs (lower in the case of β Thal⁺) has been found to be reversibly associated with recovery in xenobiotic models of transfusion. Nevertheless, (a) our study design involved selection of eligible β Thal⁺ blood donors without extremely low MCV values (73.3 ± 6.8 vs. 82.6 ± 2.1 fL, β Thal⁺ vs. controls) in order to ameliorate the size effect upon RBC clearance; (b) the tendency remained in favor of heterozygotes even in transfused pairs of β Thal⁺-control RBCs with minimal MCV variation between each other; and (c) it's worth remembering that RBCs experience excessive mechanical stress during their passage through the human spleen slits of very small diameter ($0.5\text{--}1.0\text{ }\mu\text{m}$ [53]). The forces deforming RBCs in a mouse environment are more intense. However, our results have the potential to be expanded in a human setting, since β Thal⁺ erythrocytes will still experience less mechanical pressure compared to control: they have both lower size and lower levels of sublethal lesions, including susceptibility to lysis and oxidative insults. What can be argued is that survival in the mouse circulation may not simulate the one in transfused humans, and that absolute values of xenobiotic 24 h RBC recovery cannot be normalized to the gold-standard of transfusion in humans, namely >75%. Nevertheless, these animal models have provided valuable evidence, though not definite conclusions, in studies of other donor backgrounds, such as sickle cell trait [22] and the REDS-III obese cohort [17]. Even though concrete evidence of RBC recovery “success” can be only provided in vivo (in animal models and mainly, in human) our findings further highlight the usefulness of the currently used in vitro models in the field: several correlations between storage and post-storage states were found in common. To support this, G6PD deficient donors were at first characterized as “bad donors” by using a very alike in vitro model [13], and subsequently validated as such in a clinical trial setting [16].

4. Materials and Methods

4.1. Biological Samples and Blood Unit Preparation

Twenty leukoreduced units of packed RBCs in citrate-phosphate-dextrose (CPD)/saline-adenine-glucose-mannitol (SAGM) (10 β Thal⁺ and 10 controls), the storage physiology, metabolism and proteome of which have been analyzed in previous studies of this project [1,6,8], were selected to evaluate the physiological parameters of stored RBCs in recipient plasma at body temperature in vitro. Plasma was isolated from freshly drawn blood donated by 10 healthy volunteers and 10 transfusion-dependent beta-thalassemia major patients (shortly before transfusion), in citrate vacutainers. Sixteen (eight per group) additional RBC units (leukoreduced; CPD/SAGM) were used for the evaluation of RBC recovery in vivo by using animal models of transfusion, following validation of the storage profile of β Thal⁺ RBCs. The study was approved by the Ethics Committees of the Depart-

ment of Biology, School of Science, NKUA and of the Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens (BRFAA). Investigations were carried out upon donor consent, in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

4.2. Exposure of Stored RBCs to Human Plasma at Body Temperature

For the simulation of the effects of body temperature and recipient plasma components upon stored RBCs, an in vitro model was used, as extensively described in the past [13]. Briefly, early (storage day <4) and late (storage day >39) stored RBCs from heterozygotes and controls were incubated for 24 h at 37 °C and in 5% CO₂-air, following reconstitution in freshly drawn plasma from potential recipients (controls and beta-thalassemia major patients) mixed with the same unit's supernatant, in a ratio respective to transfusion of two blood units. To avoid settling, the samples were under constant gentle agitation throughout the incubation period. Measurements of hemolysis, ROS concentration, phosphatidylserine exposure, membrane lipid peroxidation, and proteasome activity were performed in the reconstituted samples.

4.3. Animal Model of Transfusion

All experiments were performed in the Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens (BRFAA), and the study protocol was approved by the Department of Agriculture and Veterinary Service of the Prefecture of Athens (Permit Number: 534915, 23 July 2020). A total of 32 immunodeficient NOD.CB17-Prkdcscid/J and wild type C57BL/6J male mice, 8–12 weeks old (16 per genetic group), were used as a xenobiotic model of transfusion to evaluate the 24 h RBC recovery, as previously described [22,49,54] and extensively analyzed in the Supplementary File. Freshly drawn, early- (<4 days) and late-stored (>39 days) RBCs were labeled with the lipophilic dyes D-383 (1,1'-Didodecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate; for β Thal⁺) and D-307 (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate; for controls), as per manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), prior to their infusion as a 1:1 mixture (~55% hematocrit with sterile PBS 310mOsm) into 16 recipient-mice (8 per genetic group) by intravenous injection in the tail vein. The same procedure was performed in another set of 16 mice, with the opposite RBC labeling. Blood sampling via the facial vein was performed one day before, 20 min (100% recovery) and 24 h (24 h RBC recovery) post-infusion to evaluate (a) the post-transfusion recovery through flow cytometry (FACS Aria IIu/Diva software, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), and (b) the levels of intravascular hemolysis through spectrophotometry. The initial measurement was made 20 min post-transfusion in order to effectively handle the large number of animals and provide reliability in the comparative measurements. Urine was also collected at the same time points to evaluate the hemoglobin (Hb) levels.

4.4. Hemolysis Parameters

Spontaneous hemolysis was evaluated in the supernatant of stored units and reconstituted samples through spectrophotometry [55], followed by the Allen correction. Osmotic hemolysis was assayed by exposing the samples in ascending concentrations of NaCl and calculating the mean corpuscular fragility (MCF) index (i.e., % NaCl at 50% hemolysis). Rocking with stainless steel beads for 1 h was used to implement a mechanical stimulus. The released Hb was measured in the supernatant of rocked and non-rocked samples to infer only the mechanically induced hemolysis. Lastly, oxidative hemolysis levels were evaluated after treatment of RBCs with phenylhydrazine (PHZ; 17 mM) for 1 h at 37 °C [1].

4.5. Oxidative Stress-Related Parameters

ROS accumulation was detected with and without additional oxidative stimuli (tert-butyl hydroperoxide -tBHP, diamide and PHZ) through fluorometry (VersaFluor, BIO-RAD, Hercules, CA, USA), by using the redox-sensitive and membrane permeable 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA,

Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), as thoroughly reported before [1]. The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay [56] was performed in the supernatant of the units, in the absence or presence of uricase treatment, to determine the total (TAC), uric-acid-dependent (UAdAC) and uric-acid-independent (UAiAC) antioxidant capacity. For membrane lipid peroxidation assessment, RBCs were mixed with 20% trichloroacetic acid, and the supernatant (lipid part) of these samples was then treated with 0.67% thiobarbituric acid (TBA, 50 min at 90 °C). TBA and malondialdehyde (MDA; biomarker of lipid peroxidation) form a chromogenic complex that was measured at 532 nm [1]. All oxidative reagents, uricase, TCA and TBA were purchased from Sigma Aldrich (Munich, Germany).

4.6. Proteasome Activity

Caspase (CASP)-like, trypsin (TR)-like and chymotrypsin (CH)-like proteasome activities were determined in stored red blood cells through fluorometry [57]. Briefly, 120–200 µg of packed RBCs in 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5–8.0) were incubated for 1.5 h to 3 h at 37 °C with the substrates: Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-aminomethylcoumarin (AMC) for CH-like, z-Leu-Leu-Glu-AMC for CASP-like and Boc-Leu-Arg-Arg-AMC for TR-like activity. The experiment was also performed in the presence of proteasome inhibitors (10–20 µM bortezomib for the CH- and CASP-like activities, 200 µM MG-132 for the CH-like activity, and 100 µM lactacystin for the TR-like activity) to subtract the unspecific proportion (4–8%) of the total fluorescence levels. All substrates and inhibitors were procured from Enzo Life Sciences (New York, NY, USA).

4.7. Phosphatidylserine Exposure on RBCs and Extracellular Vesicles (EVs)

Phosphatidylserine (PS) exposure was estimated by multicolor flow cytometry following labeling of RBCs with phycoerythrin (PE)-Annexin V and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD235 antibody (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), while an ELISA kit (Zymuphen MP-activity, Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, France) was used to measure the PS-positive (procoagulant) EVs, per the manufacturer's specifications and as previously described [58].

4.8. Statistical Analysis

All physiological experiments were performed in triplicate. For statistical analysis, SPSS (Version 22.0, IBM Hellas, Athens, Greece, administered by NKUA) computer software was used. After testing for normal distribution profile and presence of outliers (Shapiro–Wilk test and detrended normal Q-Q plots), intergroup differences were evaluated by repeated measures analysis of variance (ANOVA). Differences in post-transfusion recovery levels were analyzed by using independent *t*-test. Pearson's and Spearman's tests were performed to assess correlations between parameters. Regarding correlation analysis of the in vitro model data, we considered only the repeatable significant correlations between stored and reconstituted RBCs reliable, i.e., the ones evident at both time points and "recipient plasma" backgrounds. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to identify parameters strongly indicative of β Thal⁺ status in reconstituted RBCs. The proteomic, metabolomic, and physiological data of blood units used for the correlation analysis of Figures 3 and 4 originate from previous works of the β Thal⁺ donors project [1,6,8]. *p* < 0.05 was considered statistically significant.

5. Conclusions

Heterozygotes for mutations in the beta-globin gene are eligible donors whose RBCs are less susceptible to storage lesions and less fragile after re-addition of plasma at body temperature. Their discrete physiology, characterized by a notable cytoskeleton, membrane proteo-vigilance and resistance to lysis, seems to underlie these observed superiorities and probably the currently reported better post-storage performance, both in vitro and in vivo. It appears as if β Thal⁺ RBCs "check" both gold standards of transfusion, namely end-of-storage hemolysis and 24 h post-transfusion recovery (at least in a xenobiotic mouse

model). No doubt, these results need to be expanded and validated in a human setting through clinical trials, to also assess the Hb increment. Although it is feared that carriers of Hb mutations might show a drawback in this parameter, we strongly believe that this would not be the case. Many β Thal⁺ subjects eligible for blood donation (including those reported in the current study) have slightly (rather than significantly) lower than average intracellular Hb levels, and at the same time their stored RBCs show significantly lower hemolysis, surface removal signaling, and sublethal lesions. Consequently, Hb increment post transfusion with β Thal⁺ RBC units is expected to be at least equal, if not superior, to that observed following transfusion with control units. We are looking forward to future studies that will focus on this hypothesis.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms222212281/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.H.A. and V.L.T.; Methodology, E.C.P., A.C.A., A.D.V., E.G.B., M.D., A.D. and V.L.T.; Formal Analysis, A.T.A. and V.L.T.; Investigation, A.T.A., E.C.P., V.-Z.A., A.D.V., A.C.A., E.G.B., M.D., A.D. and V.L.T.; Resources, A.C.A., M.D., N.G.K., K.S., A.D., A.G.K. and M.H.A.; Data Curation, A.T.A. and V.L.T.; Writing—original draft preparation, A.T.A., E.C.P., M.H.A. and V.L.T.; Writing—review and editing, V.-Z.A., A.C.A., A.D.V., E.G.B., M.D., N.G.K., K.S., I.S.P., A.D. and A.G.K.; Visualization, A.T.A., V.-Z.A. and V.L.T.; Supervision, N.G.K., M.H.A. and V.L.T.; Project administration, M.H.A. and V.L.T.; Funding acquisition, V.L.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project has received funding from the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI) and the General Secretariat for Research and Innovation (GSRI), under grant agreement No. 2032.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Department of Biology, School of Science, NKUA (IRB301214/30-12-2015), the Department of Agriculture and Veterinary Service of the Prefecture of Athens (534915/23-07-2020) and the Bioethics Committee of Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens (BRFAA) (69/6-7-2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All physiological data presented in this study are available upon request.

Acknowledgments: The authors would like to thank all blood donors that voluntarily participated in this study; M.S. Jacovides Hellas S.A. for the kind offer of the LTRC blood bags; Dimitrios G. Karadimas and Christos Christogeorgos for their participation in a part of the in vitro experiments in the context of their master's and bachelor's theses, respectively; Efthimia G. Pavlou for her contribution in blood sampling and blood cell counting measurements performed in fresh samples or stored RBC units; Pavlos Alexakos and Konstantinos Paschidis for their contribution in the in vivo experiments.

Conflicts of Interest: Though unrelated to the contents of this manuscript, ADA declares that he is a founder of Omix Technologies Inc. and Altis Biosciences LLC and a consultant for Hemanext Inc.

References

1. Tzounakas, V.L.; Anastasiadi, A.T.; Stefanoni, D.; Cendali, F.; Bertolone, L.; Gamboni, F.; Dzieciatkowska, M.; Rousakis, P.; Vergaki, A.; Soulakis, V.; et al. beta-thalassemia minor is a beneficial determinant of red blood cell storage lesion. *Haematologica* **2021**. [CrossRef]
2. Nuinoon, M.; Kruachan, K.; Sengking, W.; Horpet, D.; Sungyuan, U. Thalassemia and hemoglobin e in southern thai blood donors. *Adv. Hematol.* **2014**, *2014*, 932306. [CrossRef]
3. Haj Khelil, A.; Laradi, S.; Miled, A.; Omar Tadmouri, G.; Ben Chibani, J.; Perrin, P. Clinical and molecular aspects of haemoglobinopathies in Tunisia. *Clin. Chim. Acta* **2004**, *340*, 127–137. [CrossRef] [PubMed]
4. Schrier, S.L.; Rachmilewitz, E.; Mohandas, N. Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemic erythrocytes are different: Implication for differences in clinical manifestations. *Blood* **1989**, *74*, 2194–2202. [CrossRef]

5. Teran, M.M.; Monaco, M.E.; Lazarte, S.S.; Haro, C.; Ledesma Achem, E.; Asensio, N.A.; Isse, B.A. Genetic Regulation of Redox Balance in beta-Thalassemia Trait. *Hemoglobin* **2020**, *44*, 122–127. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Tzounakas, V.L.; Anastasiadi, A.T.; Dzieciatkowska, M.; Karadimas, D.G.; Stamoulis, K.; Papassideri, I.S.; Hansen, K.C.; D'Alessandro, A.; Kriebardis, A.G.; Antonelou, M.H. Proteome of Stored RBC Membrane and Vesicles from Heterozygous Beta Thalassemia Donors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3369. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Page, G.P.; Kanas, T.; Guo, Y.J.; Lanteri, M.C.; Zhang, X.; Mast, A.E.; Cable, R.G.; Spencer, B.R.; Kiss, J.E.; Fang, F.; et al. Multiple-ancestry genome-wide association study identifies 27 loci associated with measures of hemolysis following blood storage. *J. Clin. Investig.* **2021**, *131*. [\[CrossRef\]](#)
8. Anastasiadi, A.T.; Tzounakas, V.L.; Arvaniti, V.Z.; Dzieciatkowska, M.; Stamoulis, K.; Lekka, M.E.; Papassideri, I.S.; D'Alessandro, A.; Kriebardis, A.G.; Antonelou, M.H. Red Blood Cell Proteasome in Beta-Thalassemia Trait: Topology of Activity and Networking in Blood Bank Conditions. *Membranes* **2021**, *11*, 716. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Roubinian, N.H.; Plimier, C.; Woo, J.P.; Lee, C.; Bruhn, R.; Liu, V.X.; Escobar, G.J.; Kleinman, S.H.; Triulzi, D.J.; Murphy, E.L.; et al. Effect of donor, component, and recipient characteristics on hemoglobin increments following red blood cell transfusion. *Blood* **2019**, *134*, 1003–1013. [\[CrossRef\]](#)
10. Kanas, T.; Lanteri, M.C.; Page, G.P.; Guo, Y.; Endres, S.M.; Stone, M.; Keating, S.; Mast, A.E.; Cable, R.G.; Triulzi, D.J.; et al. Ethnicity, sex, and age are determinants of red blood cell storage and stress hemolysis: Results of the REDS-III RBC-Omics study. *Blood Adv.* **2017**, *1*, 1132–1141. [\[CrossRef\]](#)
11. Tzounakas, V.L.; Anastasiadi, A.T.; Drossos, P.V.; Karadimas, D.G.; Valsami, S.E.; Stamoulis, K.E.; Papassideri, I.S.; Politou, M.; Antonelou, M.H.; Kriebardis, A.G. Sex-related aspects of the red blood cell storage lesion. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* **2021**, *19*, 224–236. [\[CrossRef\]](#)
12. Zeller, M.P.; Rochweg, B.; Jamula, E.; Li, N.; Hillis, C.; Acker, J.P.; Runciman, R.J.R.; Lane, S.J.; Ahmed, N.; Arnold, D.M.; et al. Sex-mismatched red blood cell transfusions and mortality: A systematic review and meta-analysis. *Vox Sang.* **2019**, *114*, 505–516. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Tzounakas, V.L.; Kriebardis, A.G.; Georgatzakou, H.T.; Foudoulaki-Papazizos, L.E.; Dzieciatkowska, M.; Wither, M.J.; Nemkov, T.; Hansen, K.C.; Papassideri, I.S.; D'Alessandro, A.; et al. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient subjects may be better “storers” than donors of red blood cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *96*, 152–165. [\[CrossRef\]](#)
14. Tzounakas, V.L.; Kriebardis, A.G.; Georgatzakou, H.T.; Foudoulaki-Papazizos, L.E.; Dzieciatkowska, M.; Wither, M.J.; Nemkov, T.; Hansen, K.C.; Papassideri, I.S.; D'Alessandro, A.; et al. Data on how several physiological parameters of stored red blood cells are similar in glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient and sufficient donors. *Data Brief* **2016**, *8*, 618–627. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. D'Alessandro, A.; Fu, X.; Kanas, T.; Reisz, J.A.; Culp-Hill, R.; Guo, Y.; Gladwin, M.T.; Page, G.; Kleinman, S.; Lanteri, M.; et al. Donor sex, age and ethnicity impact stored red blood cell antioxidant metabolism through mechanisms in part explained by glucose 6-phosphate dehydrogenase levels and activity. *Haematologica* **2021**, *106*, 1290–1302. [\[CrossRef\]](#)
16. Francis, R.O.; D'Alessandro, A.; Eisenberger, A.; Soffing, M.; Yeh, R.; Coronel, E.; Sheikh, A.; Rapido, F.; La Carpia, F.; Reisz, J.A.; et al. Donor glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency decreases blood quality for transfusion. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 2270–2285. [\[CrossRef\]](#)
17. Hazegh, K.; Fang, F.; Bravo, M.D.; Tran, J.Q.; Muench, M.O.; Jackman, R.P.; Roubinian, N.; Bertolone, L.; D'Alessandro, A.; Dumont, L.; et al. Blood donor obesity is associated with changes in red blood cell metabolism and susceptibility to hemolysis in cold storage and in response to osmotic and oxidative stress. *Transfusion* **2021**, *61*, 435–448. [\[CrossRef\]](#)
18. Bordbar, A.; Johansson, P.I.; Paglia, G.; Harrison, S.J.; Wichuk, K.; Magnusdottir, M.; Valgeirsdottir, S.; Gybel-Brask, M.; Ostrowski, S.R.; Palsson, S.; et al. Identified metabolic signature for assessing red blood cell unit quality is associated with endothelial damage markers and clinical outcomes. *Transfusion* **2016**, *56*, 852–862. [\[CrossRef\]](#)
19. Tzounakas, V.L.; Anastasiadi, A.T.; Valsami, S.I.; Stamoulis, K.E.; Papageorgiou, E.G.; Politou, M.; Papassideri, I.S.; Kriebardis, A.G.; Antonelou, M.H. Osmotic hemolysis is a donor-specific feature of red blood cells under various storage conditions and genetic backgrounds. *Transfusion* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
20. Barshtein, G.; Pries, A.R.; Goldschmidt, N.; Zukerman, A.; Orbach, A.; Zelig, O.; Arbell, D.; Yedgar, S. Deformability of transfused red blood cells is a potent determinant of transfusion-induced change in recipient's blood flow. *Microcirculation* **2016**, *23*, 479–486. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Tzounakas, V.L.; Kriebardis, A.G.; Seghatchian, J.; Papassideri, I.S.; Antonelou, M.H. Unraveling the Gordian knot: Red blood cell storage lesion and transfusion outcomes. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* **2017**, *15*, 126–130. [\[CrossRef\]](#)
22. Osei-Hwedie, D.O.; Kanas, T.; Croix, C.S.; Jessup, M.; Xiong, Z.; Sinchar, D.; Franks, J.; Xu, Q.; Novelli, E.M.; Sertorio, J.T.; et al. Sick Cell Trait Increases Red Blood Cell Storage Hemolysis and Post-Transfusion Clearance in Mice. *EBioMedicine* **2016**, *11*, 239–248. [\[CrossRef\]](#)
23. D'Alessandro, A.; Hansen, K.C.; Eisenmesser, E.Z.; Zimring, J.C. Protect, repair, destroy or sacrifice: A role of oxidative stress biology in inter-donor variability of blood storage? *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* **2019**, *17*, 281–288. [\[CrossRef\]](#)
24. Cantu Rajnoldi, A.; Ferrari, M.; Pietri, S.; Travi, M. Glycerol lysis time for screening for beta-thalassaemia trait. *Lancet* **1980**, *2*, 638. [\[CrossRef\]](#)
25. Gunn, R.B.; Silvers, D.N.; Rosse, W.F. Potassium permeability in -thalassemia minor red blood cells. *J. Clin. Investig.* **1972**, *51*, 1043–1050. [\[CrossRef\]](#)

26. Issaian, A.; Hay, A.; Dzieciatkowska, M.; Roberti, D.; Perrotta, S.; Darula, Z.; Redzic, J.; Busch, M.P.; Page, G.P.; Rogers, S.C.; et al. The interactome of the N-terminus of band 3 regulates red blood cell metabolism and storage quality. *Haematologica* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Risinger, M.; Kalfa, T.A. Red cell membrane disorders: Structure meets function. *Blood* **2020**, *136*, 1250–1261. [[CrossRef](#)]
28. Orbach, A.; Zelig, O.; Yedgar, S.; Barshtein, G. Biophysical and Biochemical Markers of Red Blood Cell Fragility. *Transfus. Med. Hemotherapy Off. Organ Der Dtsch. Ges. Fur Transfus. Immunhamatol.* **2017**, *44*, 183–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Barvitenko, N.; Aslam, M.; Lawen, A.; Saldanha, C.; Skverchinskaya, E.; Uras, G.; Manca, A.; Pantaleo, A. Two Motors and One Spring: Hypothetic Roles of Non-Muscle Myosin II and Submembrane Actin-Based Cytoskeleton in Cell Volume Sensing. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Smith, A.S.; Nowak, R.B.; Zhou, S.; Giannetto, M.; Gokhin, D.S.; Papoin, J.; Ghiran, I.C.; Blanc, L.; Wan, J.; Fowler, V.M. Myosin IIA interacts with the spectrin-actin membrane skeleton to control red blood cell membrane curvature and deformability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E4377–E4385. [[CrossRef](#)]
31. Fujii, J.; Homma, T.; Kobayashi, S.; Warang, P.; Madkaikar, M.; Mukherjee, M.B. Erythrocytes as a preferential target of oxidative stress in blood. *Free Radic. Res.* **2021**, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Delobel, J.; Prudent, M.; Tissot, J.D.; Lion, N. Proteomics of the red blood cell carbonylome during blood banking of erythrocyte concentrates. *Proteom. Clin. Appl.* **2016**, *10*, 257–266. [[CrossRef](#)]
33. Goodman, S.R.; Kurdia, A.; Ammann, L.; Kakhniashvili, D.; Daescu, O. The human red blood cell proteome and interactome. *Exp. Biol. Med.* **2007**, *232*, 1391–1408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. D'Alessandro, A.; Righetti, P.G.; Zolla, L. The red blood cell proteome and interactome: An update. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 144–163. [[CrossRef](#)]
35. Abi Habib, J.; De Plaen, E.; Stroobant, V.; Zivkovic, D.; Bousquet, M.P.; Guillaume, B.; Wahni, K.; Messens, J.; Busse, A.; Vigneron, N.; et al. Efficiency of the four proteasome subtypes to degrade ubiquitinated or oxidized proteins. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 15765. [[CrossRef](#)]
36. Yoshida, T.; Prudent, M.; D'Alessandro, A. Red blood cell storage lesion: Causes and potential clinical consequences. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* **2019**, *17*, 27–52. [[CrossRef](#)]
37. de Wolski, K.; Fu, X.; Dumont, L.J.; Roback, J.D.; Waterman, H.; Odem-Davis, K.; Howie, H.L.; Zimring, J.C. Metabolic pathways that correlate with post-transfusion circulation of stored murine red blood cells. *Haematologica* **2016**, *101*, 578–586. [[CrossRef](#)]
38. Fortier, N.; Snyder, L.M.; Garver, F.; Kiefer, C.; McKenney, J.; Mohandas, N. The relationship between in vivo generated hemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane rigidity. *Blood* **1988**, *71*, 1427–1431. [[CrossRef](#)]
39. Stolwijk, J.M.; Stefely, J.A.; Veling, M.T.; van 't Erve, T.J.; Wagner, B.A.; Raife, T.J.; Buettner, G.R. Red blood cells contain enzymatically active GPx4 whose abundance anticorrelates with hemolysis during blood bank storage. *Redox Biol.* **2021**, *46*, 102073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Tzounakas, V.L.; Karadimas, D.G.; Anastasiadi, A.T.; Georgatzakou, H.T.; Kazepidou, E.; Moschovas, D.; Velentzas, A.D.; Kriebardis, A.G.; Zafeiropoulos, N.E.; Avgeropoulos, A.; et al. Donor-specific individuality of red blood cell performance during storage is partly a function of serum uric acid levels. *Transfusion* **2018**, *58*, 34–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Jain, S.K.; Lim, G. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na⁺ + K⁺)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 232–237. [[CrossRef](#)]
42. Paglia, G.; D'Alessandro, A.; Rolfsson, O.; Sigurjonsson, O.E.; Bordbar, A.; Palsson, S.; Nemkov, T.; Hansen, K.C.; Gudmundsson, S.; Palsson, B.O. Biomarkers defining the metabolic age of red blood cells during cold storage. *Blood* **2016**, *128*, e43–e50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Heaton, A.; Keegan, T.; Holme, S. 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.* **1989**, *71*, 131–136. [[CrossRef](#)]
44. Dern, R.J.; Brewer, G.J.; Wiorkowski, J.J. Studies on the preservation of human blood. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other in vitro measures to red cell storageability. *J. Lab. Clin. Med.* **1967**, *69*, 968–978.
45. Heaton, W.A. Evaluation of posttransfusion recovery and survival of transfused red cells. *Transfus. Med. Rev.* **1992**, *6*, 153–169. [[CrossRef](#)]
46. Nakao, K.; Wada, T.; Kamiyama, T.; Nakao, M.; Nagano, K. A direct relationship between adenosine triphosphate-level and in vivo viability of erythrocytes. *Nature* **1962**, *194*, 877–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Van't Erve, T.J.; Wagner, B.A.; Martin, S.M.; Knudson, C.M.; Blendowski, R.; Keaton, M.; Holt, T.; Hess, J.R.; Buettner, G.R.; Ryckman, K.K.; et al. The heritability of hemolysis in stored human red blood cells. *Transfusion* **2015**, *55*, 1178–1185. [[CrossRef](#)]
48. Nemkov, T.; Sun, K.; Reisz, J.A.; Song, A.; Yoshida, T.; Dunham, A.; Wither, M.J.; Francis, R.O.; Roach, R.C.; Dzieciatkowska, M.; et al. Hypoxia modulates the purine salvage pathway and decreases red blood cell and supernatant levels of hypoxanthine during refrigerated storage. *Haematologica* **2018**, *103*, 361–372. [[CrossRef](#)]
49. Blessinger, S.A.; Tran, J.Q.; Jackman, R.P.; Gilfanova, R.; Rittenhouse, J.; Gutierrez, A.G.; Heitman, J.W.; Hazegh, K.; Kanas, T.; Muench, M.O. Immunodeficient mice are better for modeling the transfusion of human blood components than wild-type mice. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0237106. [[CrossRef](#)]
50. Deplaine, G.; Safeukui, I.; Jeddi, F.; Lacoste, F.; Brousse, V.; Perrot, S.; Biligui, S.; Guillotte, M.; Guitton, C.; Dokmak, S.; et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked in vitro. *Blood* **2011**, *117*, e88–e95. [[CrossRef](#)]

-
51. Garcia-Herreros, A.; Yeh, Y.-T.; Peng, Z.; del Álamo, J.C. Cyclic mechanical stresses alter erythrocyte membrane composition and microstructure and trigger macrophage phagocytosis. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
 52. Roussel, C.; Morel, A.; Dussiot, M.; Marin, M.; Colard, M.; Fricot-Monsinjon, A.; Martinez, A.; Chambrion, C.; Henry, B.; Casimir, M.; et al. Rapid clearance of storage-induced microerythrocytes alters transfusion recovery. *Blood* **2021**, *137*, 2285–2298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 53. Chen, L.T.; Weiss, L. The role of the sinus wall in the passage of erythrocytes through the spleen. *Blood* **1973**, *41*, 529–537. [[CrossRef](#)]
 54. Hod, E.A.; Zhang, N.; Sokol, S.A.; Wojczyk, B.S.; Francis, R.O.; Ansaldi, D.; Francis, K.P.; Della-Latta, P.; Whittier, S.; Sheth, S.; et al. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. *Blood* **2010**, *115*, 4284–4292. [[CrossRef](#)]
 55. Harboe, M. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* **1959**, *11*, 66–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 56. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [[CrossRef](#)]
 57. Tzounakas, V.L.; Dzieciatkowska, M.; Anastasiadi, A.T.; Karadimas, D.G.; Vergaki, A.; Siourounis, P.; Stamoulis, K.; Papassideri, I.S.; Kriebardis, A.G.; D’Alessandro, A.; et al. Red cell proteasome modulation by storage, redox metabolism and transfusion. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* **2020**. [[CrossRef](#)]
 58. Tzounakas, V.L.; Gevi, F.; Georgatzakou, H.T.; Zolla, L.; Papassideri, I.S.; Kriebardis, A.G.; Rinalducci, S.; Antonelou, M.H. Redox Status, Procoagulant Activity, and Metabolome of Fresh Frozen Plasma in Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Front. Med.* **2018**, *5*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article

Red Blood Cell Proteasome in Beta-Thalassemia Trait: Topology of Activity and Networking in Blood Bank Conditions

Alkmini T. Anastasiadi ^{1,†}, Vassilis L. Tzounakas ^{1,†}, Vasiliki-Zoi Arvaniti ¹, Monika Dzieciatkowska ², Konstantinos Stamoulis ³, Marilena E. Lekka ^{4,*}, Issidora S. Papassideri ¹, Angelo D'Alessandro ², Anastasios G. Kriebardis ⁵ and Marianna H. Antonelou ^{1,*}

¹ Department of Biology, School of Science, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), 15784 Athens, Greece; alkanast@biol.uoa.gr (A.T.A.); tzounak@biol.uoa.gr (V.L.T.); vazoarvaniti@gmail.com (V.-Z.A.); ipapasid@biol.uoa.gr (I.S.P.)

² Department of Biochemistry and Molecular Genetics, School of Medicine, Anschutz Medical Campus, University of Colorado, Aurora, CO 80045, USA; monika.dzieciatkowska@ucdenver.edu (M.D.); angelo.dalessandro@ucdenver.edu (A.D.)

³ Hellenic National Blood Transfusion Centre, Acharnes, 13677 Athens, Greece; kostas.stamoulis@gmail.com

⁴ Laboratory of Biochemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

⁵ Laboratory of Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology (HemQcR), Department of Biomedical Sciences, School of Health & Welfare Sciences, University of West Attica (UniWA), 12243 Egaleo, Greece; akrieb@uniwa.gr

* Correspondence: mlekk@uoi.gr (M.E.L.); manton@biol.uoa.gr (M.H.A.)

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Anastasiadi, A.T.; Tzounakas, V.L.; Arvaniti, V.-Z.; Dzieciatkowska, M.; Stamoulis, K.; Lekka, M.E.; Papassideri, I.S.; D'Alessandro, A.; Kriebardis, A.G.; Antonelou, M.H. Red Blood Cell Proteasome in Beta-Thalassemia Trait: Topology of Activity and Networking in Blood Bank Conditions. *Membranes* **2021**, *11*, 716. <https://doi.org/10.3390/membranes11090716>

Academic Editor: Arwyn Tomos Jones

Received: 29 July 2021

Accepted: 13 September 2021

Published: 17 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Proteasomes are multi-catalytic complexes with important roles in protein control. Their activity in stored red blood cells (RBCs) is affected by both storage time and the donor's characteristics. However, apart from their abundance in the membrane proteome, not much is known about their topology, activity, and networking during the storage of RBCs from beta-thalassemia trait donors (β Thal⁺). For this purpose, RBC units from fourteen β Thal⁺ donors were fractionated and studied for proteasome activity distribution and interactome through fluorometric and correlation analyses against units of sex- and aged-matched controls. In all the samples examined, we observed a time-dependent translocation and/or activation of the proteasome in the membrane and a tight connection of activity with the oxidative burden of cells. Proteasomes were more active in the β Thal⁺ membranes and supernatants, while the early storage networking of 20S core particles and activities showed a higher degree of connectivity with chaperones, calpains, and peroxiredoxins, which were nonetheless present in all interactomes. Moreover, the β Thal⁺ interactomes were specially enriched in kinases, metabolic enzymes, and proteins differentially expressed in β Thal⁺ membrane, including arginase-1, piezo-1, and phospholipid scramblase. Overall, it seems that β Thal⁺ erythrocytes maintain a considerable "proteo-vigilance" during storage, which is closely connected to their distinct antioxidant dynamics and membrane protein profile.

Keywords: red blood cell; proteostasis; proteasome; activity; regulation; membrane localization; interactome; storage; beta thalassemia trait

1. Introduction

Proteasomes are supramolecular, multi-catalytic complexes tasked with the degradation of aberrant and damaged proteins, which is needed to ensure cell homeostasis [1]. As such, their proteolytic core, the 20S complex, is equipped with three proteolytic activities: caspase (CASP)-like, trypsin (TR)-like, and chymotrypsin (CH)-like, the active centers of which are located at the β 1, β 2, and β 5 subunits of the catalytic chamber, respectively. Misfolded proteins are transferred in the 20S cylinder after being selected by 19S regulatory complexes that recognize ubiquitinated molecules [2]. Of note, while the function of 26S holoenzymes is ATP- and ubiquitin-dependent, the 20S proteasome requires neither [3,4].

The importance of these molecules becomes apparent through their involvement in a number of processes, from post-translational processing [5] to regulation of cell cycle [6], signal transduction, and response to oxidative stress [7,8]. Deregulation of the proteasome results in defects in both proliferation or apoptotic processes and consequently the development of pathologies [9].

In red blood cells (RBCs), particularly, proteasomes are of great interest given the finite nature of the RBCs' proteome. These multi-catalytic machines ("near-organelles") are retained in mature erythrocytes, while the typical organelles are expelled during late erythropoiesis. Their presence and functionality in the RBC cytosol and membrane has been confirmed by several studies [10,11], while an intriguing relative excess of the 20S core over the 26S holoenzyme has been reported at $\approx 20\times$ -fold. Given that oxidative stress is a significant challenge for erythrocytes, this abundance could be attributed to the fact that 20S proteasomes are both more efficient in degrading oxidized proteins [12] but also more resilient against oxidative damage themselves [13]. RBC's proteasomal content and activity are responsive to changes in physiological conditions or to diseases, including anemia [14,15]. Proteasomal subunits have been found upregulated in the RBC cytosol of sickle cell disease patients [16].

In the context of the proteasome's presence and role during RBC storage under blood bank conditions, little is known [17]. However, recent findings show that proteasomal activities demonstrate a decrease in cytosol and an increase in membrane during storage, suggesting a recruitment of proteasomes along with other components of the "repair or destroy" system to the membrane [18]. Moreover, proteasomal activities were detected in extracellular vesicles [17,18] and the unit's supernatant [19], hinting at the release of complexes during late storage. By studying the donor variation effect upon the storage profile of RBCs, the genetically discrete G6PD-deficient RBCs have been shown to exhibit higher levels of proteasomal activity and release during storage [18], whereas membranes from post-menopausal women demonstrate a trend for slightly lower activity levels [20] compared to controls and pre-menopausal women, respectively.

RBCs from heterozygotes for beta-thalassemia (βThal^+) face oxidative challenges due to their genetic background [21]. Nevertheless, during storage—a period strongly associated with oxidative and proteotoxic stresses—they seem to employ a number of protective mechanisms to mitigate this predisposition. In our previous works, we observed lower reactive oxygen species (ROS) levels in late storage and a shift of the metabolism toward the Pentose Phosphate Pathway (PPP), suggesting a higher antioxidant potential compared to controls [22]. Furthermore, a recent comparison of the proteome of βThal^+ and control membranes revealed enrichment of the former in a number of "repair or destroy" molecules during storage, such as chaperone HSP70 and proteasomal subunits, among others [23]. The effectiveness of these compiled protective pathways is also supported by reports of lower levels of protein carbonylation, lipid peroxidation, and other oxidative stress indices, such as the metabolite allantoin during storage in this group [22]. Altogether, (a) the effect of genetic background upon proteasome activity during storage, (b) the multiple hints towards a superior redox and proteostatic profile in βThal^+ stored RBCs, and especially, the differential binding of proteasome subunits in their membrane, and (c) the importance of protein control for the structural and functional integrity of erythrocytes during the stressful period of storage (and probably, later on, in the recipient of transfusion) motivated us to examine the proteasome activity, sub-cellular/extracellular distribution, and networking in stored RBCs donated from healthy, eligible βThal^+ volunteers, to further evaluate their storability compared to control.

2. Materials and Methods

2.1. Biological Samples

Freshly drawn blood in citrate vacutainers and packed RBCs in citrate-phosphate-dextrose (CPD)/saline-adenine-glucose-mannitol (SAGM) leukoreduced units were donated by twenty-eight (14 βThal^+ and 14 control) healthy volunteers, as previously re-

ported [22]. The blood units were stored for 42 days at 4 °C and were sampled every week under aseptic conditions. The beta-thalassemia trait was confirmed by both Hb electrophoresis and molecular identification of mutations. The study was approved by the Ethics Committee of the Department of Biology, School of Science, NKUA. Investigations were carried out upon donor consent in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

2.2. Sample Fractionation

RBCs and plasma/supernatant were separated by centrifugation at $1000\times g$ for 10 min at 4 °C. Then, a volume of RBCs was used for fractionation into membrane and cytosol fractions by centrifugation ($19,000\times g$) following osmotic lysis in hypotonic sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.3 mM phenyl-methyl-sulfonyl fluoride as a protease inhibitor at 4 °C. Cytosol fractions were stored for further analysis, and the pellets of RBC membranes, along with the submembrane cytoskeleton, were repeatedly washed under the same conditions to remove the excess of bound hemoglobin. Extracellular vesicles (EVs, mostly microvesicles) were isolated by the cell-free supernatant of the RBC units by centrifugation at $37,000\times g$ ($n = 5$ per group), post filtering through sterile 0.8 μm nitrocellulose filters (Millipore, Carrigtwohill, County Cork, Ireland), at late storage (day 42) [24]. Proteasome activity was measured in all fractions.

2.3. Proteasome Activities

Proteasome activity in cytosol, membrane, plasma/supernatant, and EV samples was determined by using fluorogenic substrates in a fluorometry approach [18,25]. Briefly, 120–200 μg of protein samples in 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5 for chymotrypsin-like or 8.0 for the other two activities) were incubated with the peptide substrates Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-aminomethylcoumarin (AMC) (for chymotrypsin-like activity), z-Leu-Leu-Glu-AMC (for caspase-like activity), and Boc-Leu-Arg-Arg-AMC (for trypsin-like activity) for 1.30 h (chymotrypsin-like) or 3 h (caspase-like and trypsin-like) at 37 °C in the dark. The relative fluorescence units (excitation filter: 365 nm; emission filter: 460-VersaFluor, BIO-RAD Hercules, CA, USA) were thereafter normalized to protein concentration (Bradford protein assay, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The experiments were also performed in the presence of inhibitors (10–20 μM bortezomib for the chymotrypsin and caspase-like activities, 200 μM MG-132 for the chymotrypsin-like activity, and 100 μM lactacystin for the trypsin-like activity) to discriminate between the generic proteolytic activity and that of proteasome machinery. All proteasome data reported are the final values resulting from the subtraction of the unspecific portion of activity measured by the use of inhibitors (92–96% inhibition of proteasome activities). All substrates and inhibitors were procured from Enzo Life Sciences (New York, NY, USA).

2.4. Physiological and Proteomic Parameters

The hematological (MCV, MCH etc.), physiological (e.g., hemolysis, osmotic fragility, antioxidant capacity, reactive oxygen species (ROS)), and protein (e.g., carbonylation) parameters used for the correlation analyses (scatterplots and biological networks) originate from specific experiments that were performed in the same cohorts of donors as thoroughly analyzed and reported in recent publications related to this project [22,23]. Intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) were assayed with the help of the redox-sensitive and membrane-permeable probe 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA, Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), as extensively described before [26]. ROS accumulation was also determined following stimulation of the cells with the oxidants tert-butyl-hydroperoxide (tBHP), diamide, and phenylhydrazine. Proteomic analysis was performed in 12 membrane samples of each group in early (day 7) and late (day 42) storage, as well as in 5 EV samples of each group, through a FASP digestion prior to analysis via nano-UHPLC-MS/MS (Evosep One

system coupled to timsTOF Pro mass spectrometer-Bruker Daltonics, Bremen, Germany), as extensively described before [23].

2.5. Statistical and Network Analysis

All experiments were performed in triplicate. Statistical analysis was performed by using the statistical package SPSS Version 22.0 (IBM Hellas, Athens, Greece, administered by NKUA). Repeated measures ANOVA with Bonferroni-like adjustment for multiple comparisons was used for the evaluation of time-course and between groups differences. Correlation between physiological and proteomic parameters of stored RBCs was assessed with Pearson's or Spearman's tests after testing for normal distribution and the presence of outliers (Shapiro-Wilk test and detrended normal Q-Q plots). The R values were used for the construction of biological networks (Cytoscape 3.7.2, San Diego, CA, USA). Significance was accepted at $p < 0.05$ or $p < 0.01$ (in the case of network analysis).

3. Results

3.1. Time-Course Evaluation of Proteasome Activity during RBC Storage

The three catalytic activities of the proteasome presented cytosol-, membrane-, and supernatant-specific time-course profiles in the total set of donor samples (Table 1). In the cytosol, there was a decrease in all activities in middle storage when compared to day 7, which further declined later (CH-like and CASP-like activities). An opposite pattern was observed in the membrane: both CASP-like and TR-like activities reached maximum values in the middle of the storage period (peaked at day 21) before a subsequent reduction to early storage levels. Likewise, CH-like activity presented an upward trend from early to middle storage before a statistically significant decrease toward day 42. Moving out of the cell, the activities of the proteasome in the supernatant were characterized by a steady trend for increase during storage, which reached statistical significance either in the middle (CASP-like) or the later periods of it (TR-like and CH-like) (Table 1).

Table 1. Time course evaluation of proteasome activity during red blood cell storage stratified by topology.

		Days of Storage				
	Activities	7	14	21	28	42
Cytosol	CH-like	34 ± 8	29 ± 7 *	24 ± 5 *	24 ± 6 * [§]	21 ± 5 * [§]
	CASP-like	21 ± 5	18 ± 5 *	15 ± 5 * [§]	14 ± 4 * [§]	14 ± 4 * [§]
	TR-like	44 ± 12	40 ± 10	31 ± 10 * [§]	29 ± 8 * [§]	30 ± 11 * [§]
Membrane	CH-like	42 ± 19	48 ± 21	55 ± 21	46 ± 21	39 ± 20 #
	CASP-like	40 ± 13	52 ± 16	81 ± 35 * [§]	81 ± 29 * [§]	63 ± 34 #
	TR-like	29 ± 11	34 ± 9	50 ± 22 * [§]	36 ± 18 #	29 ± 14 #
Supernatant	CH-like	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.3 * [#]
	CASP-like	1.3 ± 0.5	1.7 ± 0.7	1.8 ± 0.5 *	1.7 ± 0.7 *	1.9 ± 0.6 *
	TR-like	3.4 ± 1.0	3.6 ± 0.8	3.9 ± 1.2	4.0 ± 0.9 * [#]	4.5 ± 1.3 *

CH: chymotrypsin, CASP: caspase, TR: trypsin; (*) $p < 0.05$ vs. day 7, (°) $p < 0.05$ vs. day 14, (#) $p < 0.05$ vs. day 21. Data are shown as mean ± SD in $\times 10^3$ RFU/mg of protein.

3.2. Proteasome Activity in β Thal⁺ versus Control RBCs

Despite having a similar variance profile over storage time inside and outside RBCs, the levels of the proteasome activity differed between the two donor groups in both membrane and supernatant fractions. While the β Thal⁺ RBCs had control levels of proteasome activities in the cytosol (Figure 1A), they showed a marginal trend for higher CH-like and CASP-like values in the membrane from mid-storage onwards (e.g., CASP-like day 21: 95,742 ± 38,444 vs. 70,122 ± 29,524 RFU/mg of protein, β Thal⁺ vs. control, $p = 0.052$) (Figure 1B). Of note, while in the overall sum of the samples, CH-like activity did not present a statistical zenith in the membrane on day 21 of storage (as observed in the other two activities; see Table 1), when the analysis was performed for the two groups separately,

this pattern was revealed in the β Thal⁺ but not in the control membrane samples (day 7 vs. day 21, $p = 0.001$). Apart from the membrane, the CH-like and CASP-like activities were higher in the supernatant of the β Thal⁺ units as well, starting from the second (CASP-like) or the fourth week of storage (CH-like) (Figure 1C). Finally, the proteasome activities presented statistical trends for elevated levels in the β Thal⁺ vs. control EVs isolated by the supernatant on day 42 of storage (Figure 1D).

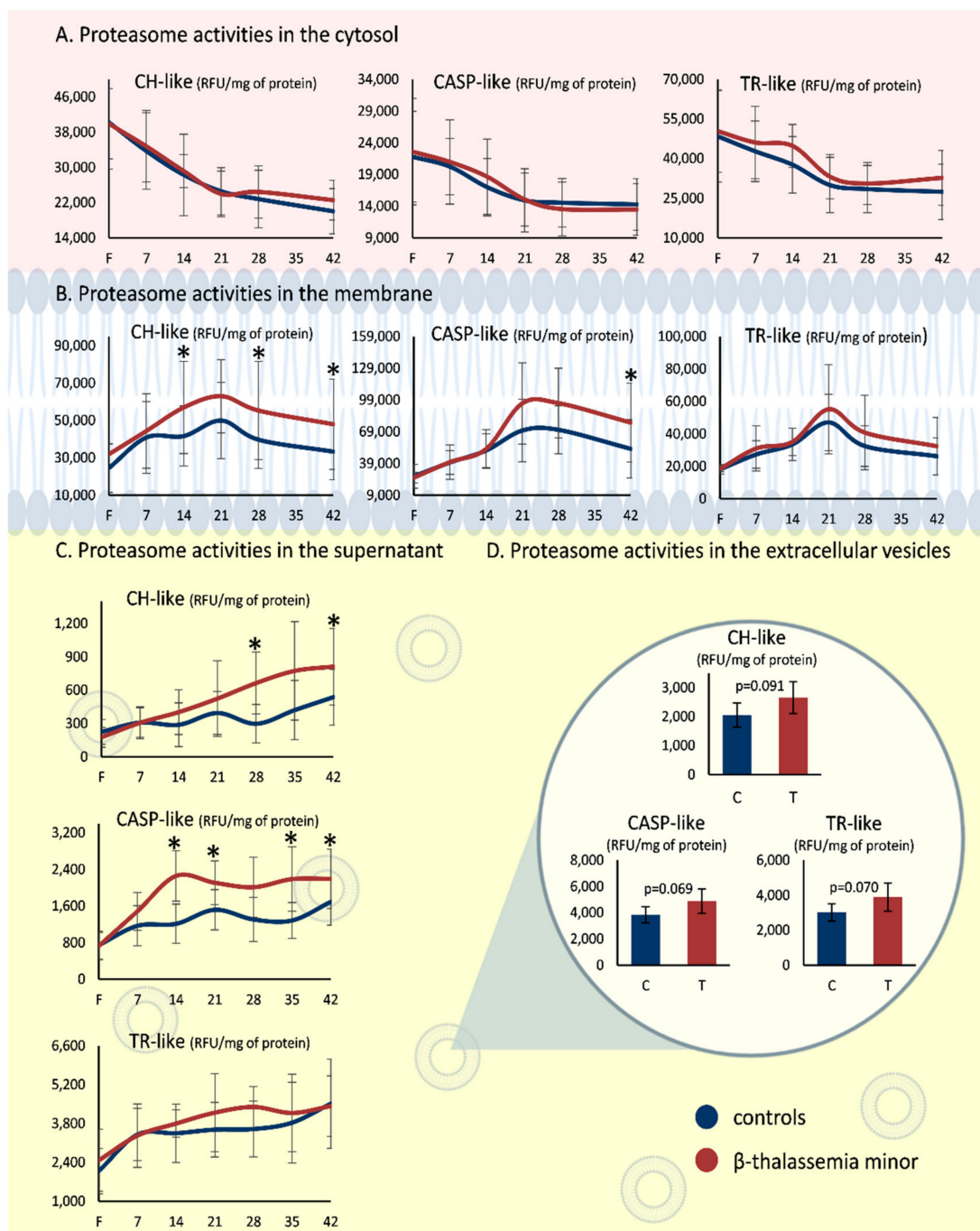


Figure 1. Proteasome activities in red blood cells of beta-thalassemia minor and control donors. Chymotrypsin (CH)-, caspase (CASP)-, and trypsin (TR)-like activities in (A) RBC cytosol, (B) RBC membrane, (C) RBC units' supernatant, and (D) RBC-derived extracellular vesicles on day 42. Horizontal axis: days of storage; F: freshly drawn blood; (*) $p < 0.05$ between β Thal⁺ and controls. Created with BioRender.com.

3.3. Correlations between Proteasome Activities and Reactive Oxygen Species in β Thal⁺ and Control RBCs

Since the proteasome activities in RBCs are responsive to oxidative stress, we next sought to look for statistically significant correlations between them and ROS accumulation in β Thal⁺ and control RBCs as a function of topology and storage time. Interestingly, the cytosolic CASP-like and TR-like activities correlated positively with the intrinsic ROS levels during early and middle storage but negatively at late storage in the β Thal⁺ (but not in control) samples (Figure 2A).

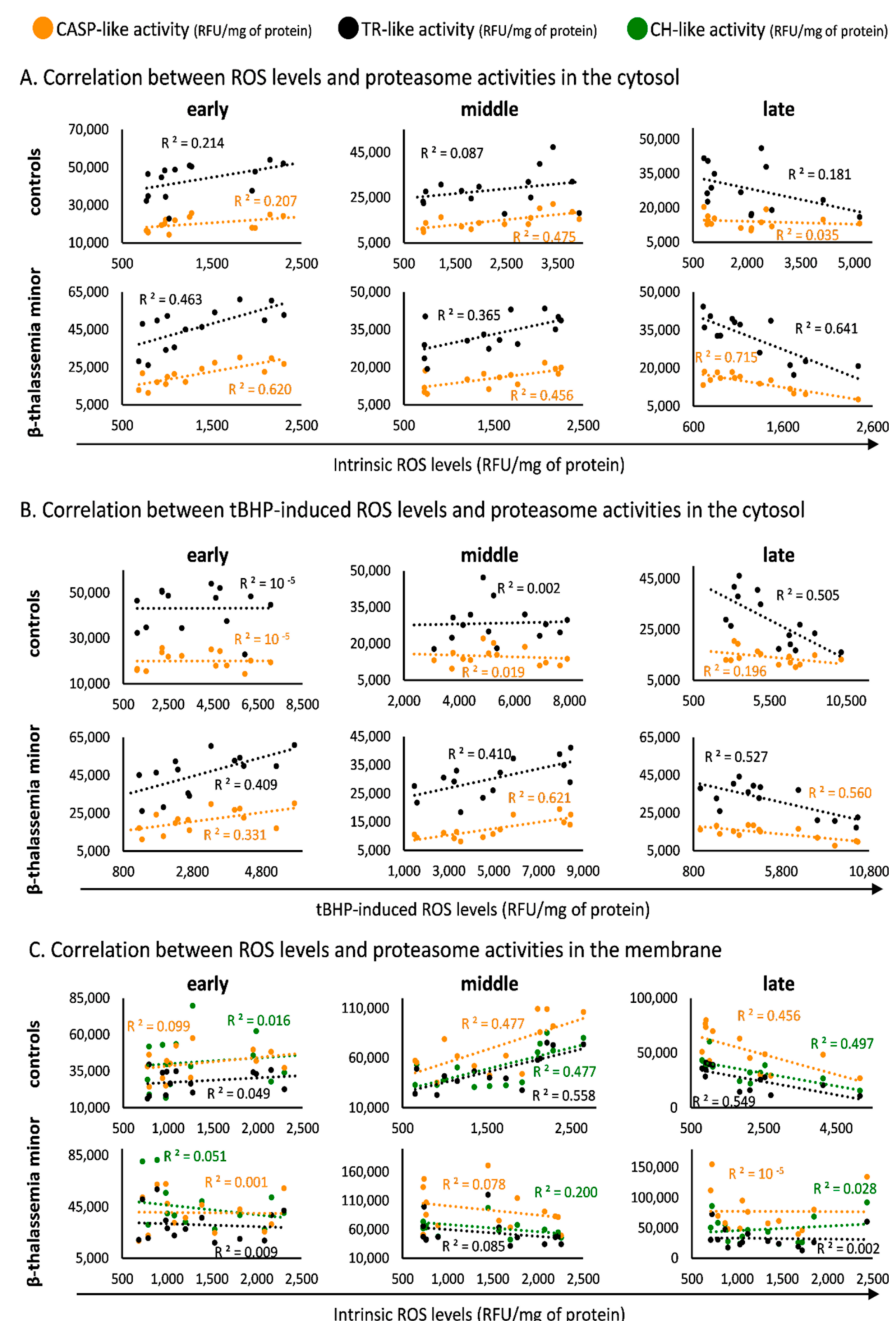


Figure 2. Correlation analysis between reactive oxygen species (ROS) generation and proteasome activities. Indicative scatter plots between (A) intrinsic ROS levels and cytosolic proteasome activities, (B) tert-butyl-hydroperoxide (tBHP)-induced ROS levels and cytosolic proteasome activities, and (C) intrinsic ROS levels and membrane proteasome activities. CASP: caspase, TR: trypsin, CH: chymotrypsin. R^2 values > 0.284 are statistically significant at $p < 0.05$.

The same pattern was observed for ROS accumulation in stored RBCs challenged with tBHP (Figure 2B) or diamide (e.g., TR-like middle storage, βThal^+ : $R^2 = 0.635$, $p = 0.013$; control: $R^2 = 0.110$, $p > 0.05$). Notably, only the CASP-like cytosolic activity correlated (positively or negatively in early/middle or late storage, respectively) with ROS levels following treatment of RBCs with the Hb-targeting phenylhydrazine, and again, this correlation was only observed in βThal^+ RBCs (e.g., middle storage, βThal^+ : $R^2 = 0.574$, $p = 0.001$; control: $R^2 = 0.024$, $p > 0.05$). Regarding the proteasome activities in the membrane of βThal^+ RBCs, they showed no correlations with the ROS levels (throughout the storage period) in contrast to controls, which exhibited strong positive or negative correlations during middle or late storage, respectively (Figure 2C).

3.4. Biological Networks

3.4.1. Biological Networking of Proteomic and Physiological Parameters of RBCs

Network analysis was performed for the topological visualization of the statistically significant correlations between a great variety (>300 nodes) of omics (RBC membrane proteome) and physiological (e.g., cellular fragility, redox equilibrium) parameters of the βThal^+ and control RBC units [22,23], including the proteasome (components and activities). This approach helps to elucidate the possible associations between parameters of stored RBCs that may fuel future more targeted research concerning the regulation of proteasome activity, interactions, recruitment to the membrane, and release during storage. Those complex biological interactomes revealed the centrality and compactness of proteasome-related factors in both groups during the early and late periods of storage (Figure 3). Despite having a similar number of nodes and degree of centralization, the βThal^+ network contained almost 1.5-fold the connections of the control network in early storage, as evidenced by the average number of neighbors per node. However, the number of connections of the βThal^+ network did not increase in late storage as opposed to the control, leading to quantitatively equal networks at the end of the storage period.

3.4.2. Biological Networking of 20S Proteasome

Due to the great excess and the critical role of the 20S core proteasome in RBCs, we then focused on the core 20S interactomes in βThal^+ and control RBCs in early (Figure 4) and late (Figure 5) storage. Those subnetworks represented as much as 25% of the parental ones. In both donor groups, the membrane-bound 20S proteasome subunits presented positive correlations with: (a) the proteasome activities, (b) several regulatory subunits of the 19S particles, proteasome partners (e.g., ECPAS), and ubiquitin-related proteins (e.g., E3 ubiquitin ligase complexes, COP9 signalosome), (c) molecular chaperones (heat shock proteins and components of the chaperonin-containing T-complex), (d) lipid biosynthesis and metabolism (e.g., fatty acid synthase), (e) calcium-dependent proteins (e.g., calpain and calpastatin), (f) energy and redox homeostasis (peroxiredoxins, catalase etc.), (g) proteins involved in nucleoside metabolism (e.g., GMP reductase, ribose-phosphate pyrophosphokinase 1), as well as (h) arginine methyltransferase (Figures 4 and 5). The far fewer inverse correlations were principally found in late storage and concerned structural proteins of the membrane (e.g., glycophorins), raft residents (e.g., CD44, flotillins), small GTPases, and immunoglobins (Figure 5).

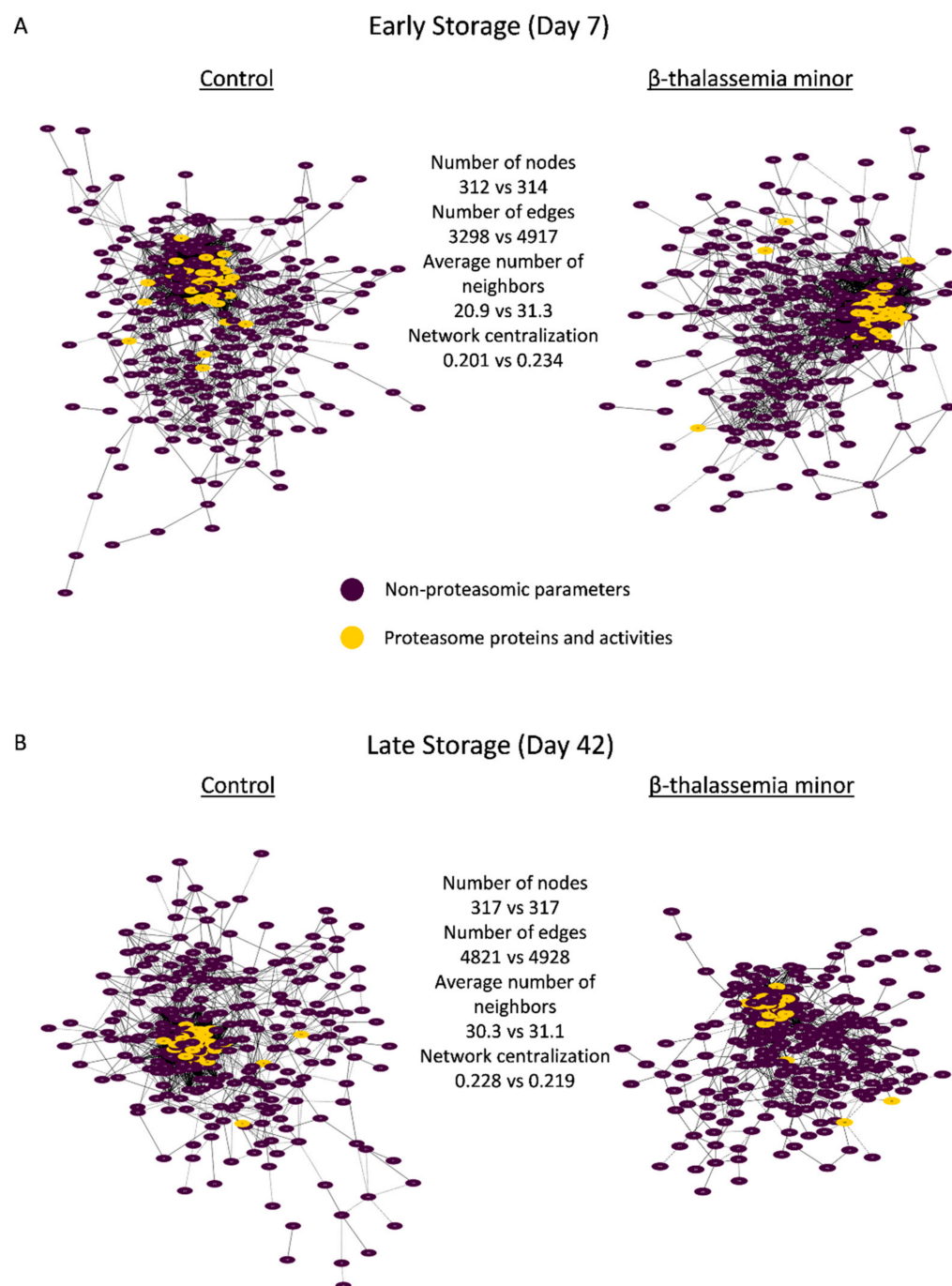


Figure 3. Network analysis of proteomic and physiological parameters in beta-thalassemia minor and control stored red blood cells during early (A) or late (B) storage. The connections represent statistically significant correlations ($p < 0.01$) between RBC proteins found on the membrane/cytoskeleton and physiological parameters. Solid lines: positive correlation; dashed lines: negative correlation. Node numbers correspond to the definitions provided in Table S1.

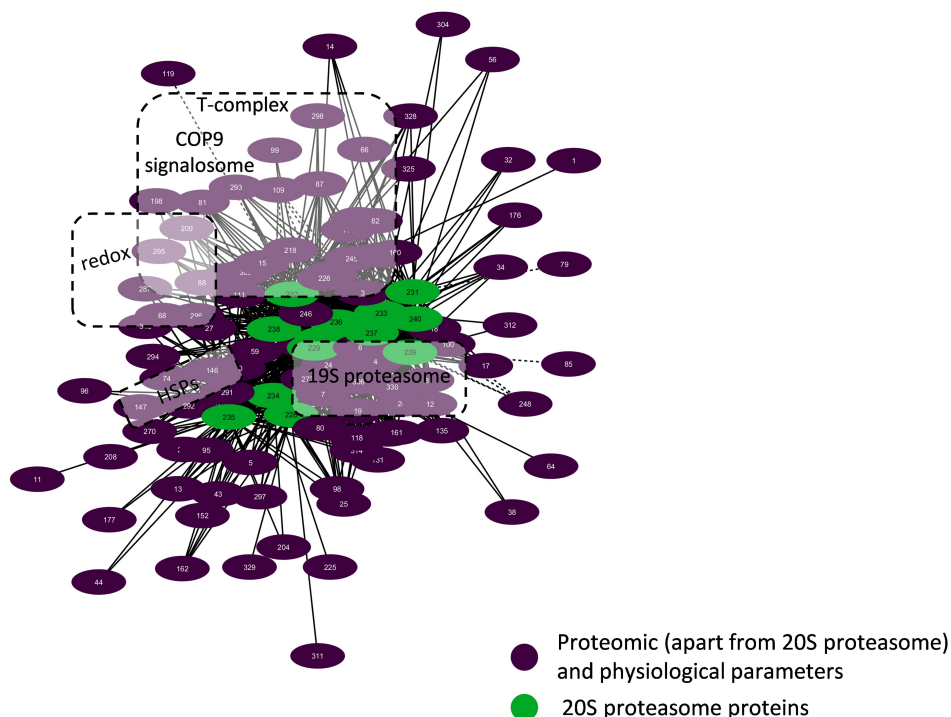
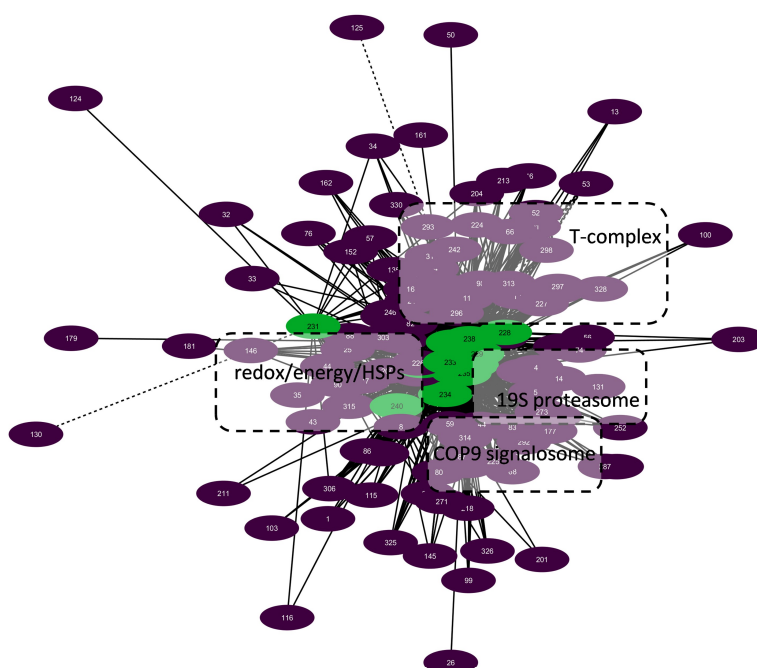
Control network / storage day 7beta-thalassemia minor network / storage day 7

Figure 4. Network analysis for core 20S proteasome proteins in beta-thalassemia minor and control stored red blood cells during early storage. Interactomes showing statistically significant correlations ($p < 0.01$) between RBC parameters and 20S proteasome proteins. Solid lines: positive correlation; dashed lines: negative correlation. Node numbers correspond to the definitions provided in Table S1.

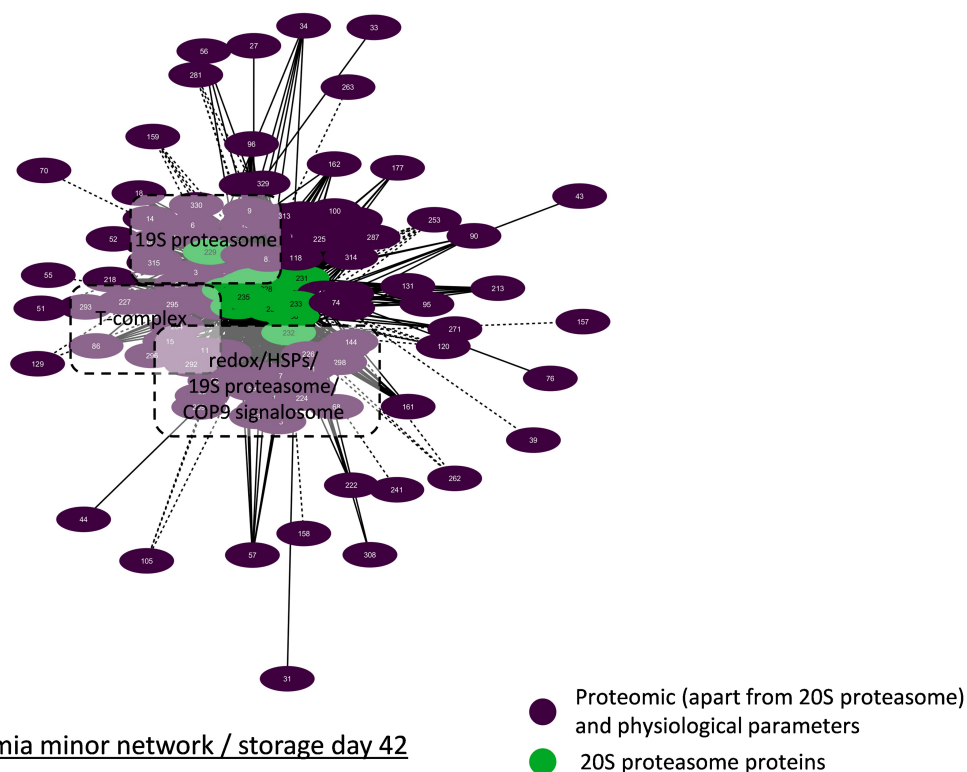
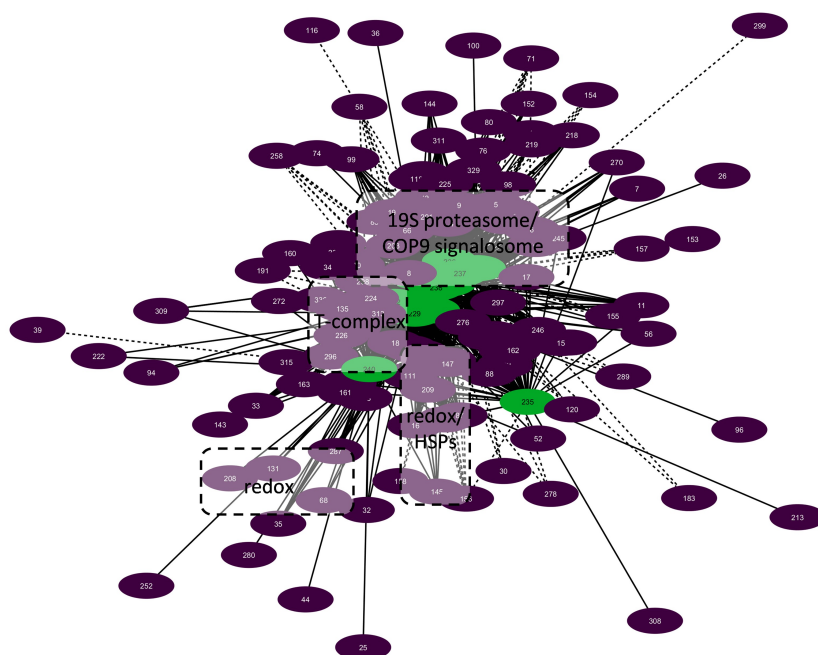
Control network / storage day 42beta-thalassemia minor network / storage day 42

Figure 5. Network analysis for core 20S proteasome proteins in beta-thalassemia minor and control stored red blood cells during late storage. Interactomes showing statistically significant correlations ($p < 0.01$) between RBC parameters and 20S proteasome proteins. Solid lines: positive correlation; dashed lines: negative correlation. Node numbers correspond to the definitions provided in Table S1.

As in the case of the total networks (Figure 3), the βThal^+ network of the 20S core proteasome started with significantly more connections when compared to the control (Figure 4) and ended up with a similar connectivity profile at late storage (Figure 5). Indeed, in early storage, the 20S core proteasome subunits were far more interconnected with

chaperones (141 vs. 85 connections), calpains (19 vs. 3 connections), energy metabolism components, and peroxiredoxins (26 vs. 12 connections) in β Thal⁺ compared to control (Figure 4), which was a difference that was either lost or reversed in late storage (e.g., peroxiredoxins connections: 14 vs. 25 in β Thal⁺ vs. control) (Figure 5). In the last day of storage, the β Thal⁺ 20S proteasome exhibited a higher degree of negative correlations with immunoglobulins (21 vs. 7 connections in control) and with a different array of key structural or raft membrane components (flotillin-1 in both groups; CD59, piezo-1, calpain, and ICAM-4 in β Thal⁺; glucose transporter and RhCE in control).

Concerning the EV fractions, alpha-5 was the only 20S proteasome subunit with high connectivity ($n = 6$) in both groups. In β Thal⁺, its levels positively correlated with protein methyltransferase PCMT1 and alpha synuclein—a typical load of extracellular vesicles—and negatively with immunoglobins and prothrombin. In control EVs, it exhibited positive correlations with the vesicular superoxide dismutase but inverse correlations with the raft-located acetylcholinesterase.

3.4.3. Biological Networks of Proteasome Activities

In a second focal plane, we visualized the interactomes of proteasome activities. Those subnetworks revealed an interesting spatial pattern in both donor groups: most of the connections (>70–90%) referred to the proteasome activities in the membrane, followed by those in the cytosol ($\approx 6\%$) and the supernatant (<3%) (Figures 6 and 7). Only in the early control interactome, there was significant connectivity to proteasome activities of the supernatant (20% of total) and the cytosol (10% of total) (Figure 6).

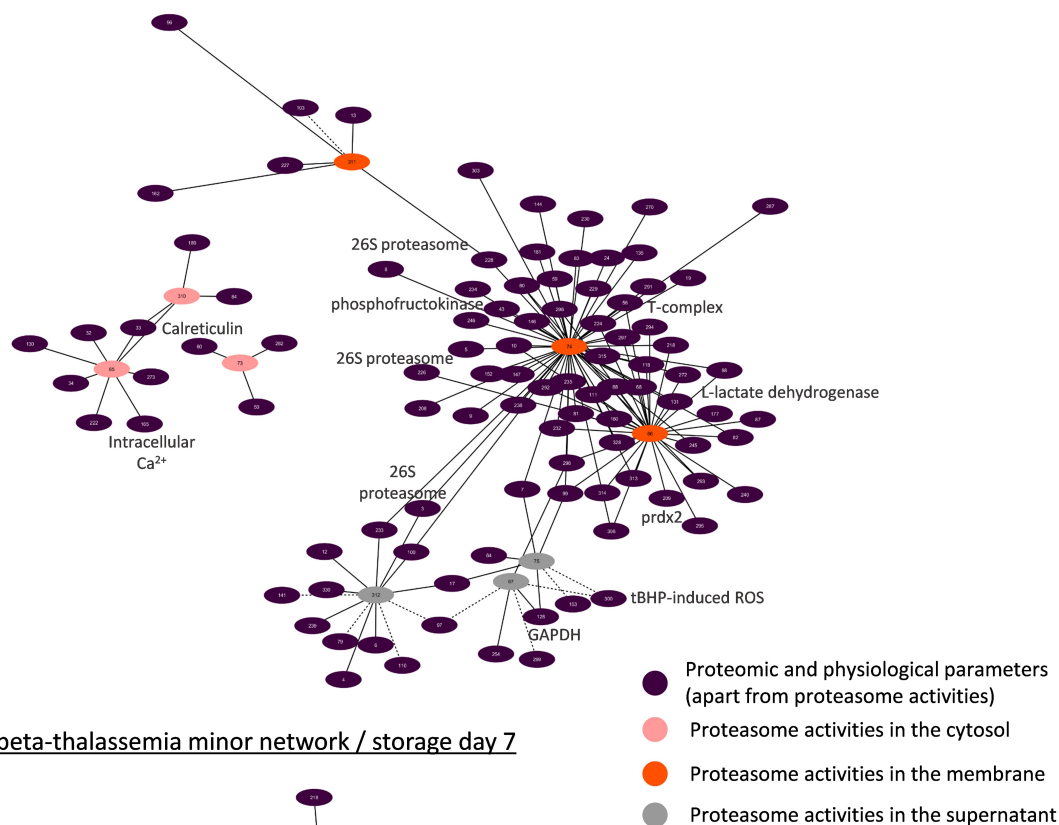
In both groups, the membrane levels of proteasome activities exhibited positive correlations with components of the 20S and 19S particles, the ubiquitin–conjugation pathway, several molecular chaperones, calpain/calpastatin, peroxiredoxins, catalase, and arginine N-methyltransferase. Interestingly, in all networks, there were also positive correlations with the fatty acid synthase (Figures 6 and 7). Metabolic enzymes were more evident in the β Thal⁺ networks, along with an array of kinases. On the other side, the membrane activity of the proteasome showed negative correlations with C-1-tetrahydrofolate synthase in β Thal⁺ during early storage (Figure 6) and with several membrane proteins in both β Thal⁺ (CD59, 4.1R protein, flotillin-1, Piezo-1) and control (4.1R protein, glucose transporter, calnexin) interactomes in the end of it. Lipid raft proteins and immunoglobins were only present in the β Thal⁺ network of day 42 (Figure 7).

Apart from the correlations with intracellular ROS thoroughly analyzed in this study (Figure 2), the levels of proteasome activities in the β Thal⁺ cytosol were positively connected to additional redox-related variables (e.g., glutathione S-transferase, protein carbonylation; see Figures 6 and 7). Of note, some cellular and membrane protein features of β Thal⁺ stored RBCs [22,23] were also present in their activity interactomes in contrast to controls: band 3, phospholipid scramblase-1, osmotic fragility (Figure 6), calpain, arginase-1, RHAG, ATPase Na⁺/K⁺ (Figure 7). On the other hand, the control networks of cytosolic activities were dominated by calcium-related (cytosolic calcium concentration, calreticulin) and internal or membrane-associated components (e.g., day 42: positive with stomatin and myosin; negative with glycophorin A, CD44), the cytosolic concentration of Hb, and several enzymes. Small GTPases were inversely connected to the cytosolic activities in both groups.

Even though the extracellular levels of the proteasome activity were significantly lower compared to those of the RBCs, they showed correlations with both membrane and cytosolic parameters, especially in the control group at early storage. Extracellular activities displayed negative association with intracellular ROS levels in the beginning (β Thal⁺) or throughout storage (controls). In the group of heterozygotes, extracellular proteasome activity was further associated with skeletal components positively at early storage (Figure 6) but negatively at the later period of it (Figure 7). Some interesting correlations arose in the control networks: There were positive connections with the levels of membrane-bound 20S and 19S subunits, ubiquitin–protein ligases, chaperones, glycolytic

enzymes, kinases, and their regulators during early storage, as well as with the hematocrit of the unit, the mean volume, and the osmotic fragility of stored RBCs at the end of it. On the contrary, inverse correlations with complement receptor-1, membrane-bound immunoglobins (day 7), heat shock proteins, and lipid peroxidation (day 42) were also observed (Figures 6 and 7).

Control network / storage day 7



beta-thalassemia minor network / storage day 7

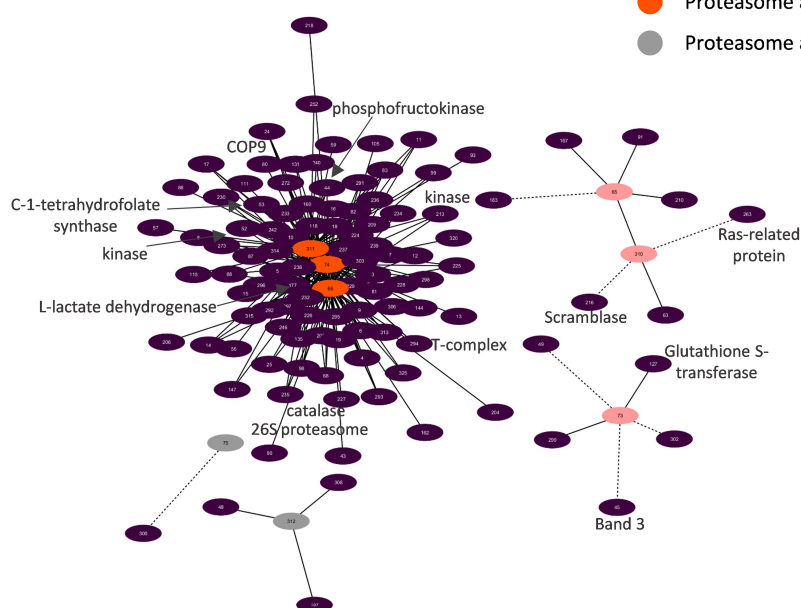


Figure 6. Network analysis for proteasomic activities in beta-thalassemia minor and control stored red blood cells during early storage. Interactomes showing statistically significant correlations ($p < 0.01$) between RBC parameters and proteasome activities. Solid lines: positive correlation; dashed lines: negative correlation. Node numbers correspond to the definitions provided in Table S1. Prdx2: peroxiredoxin-2; tBHP: tert-butyl-hydroperoxide.

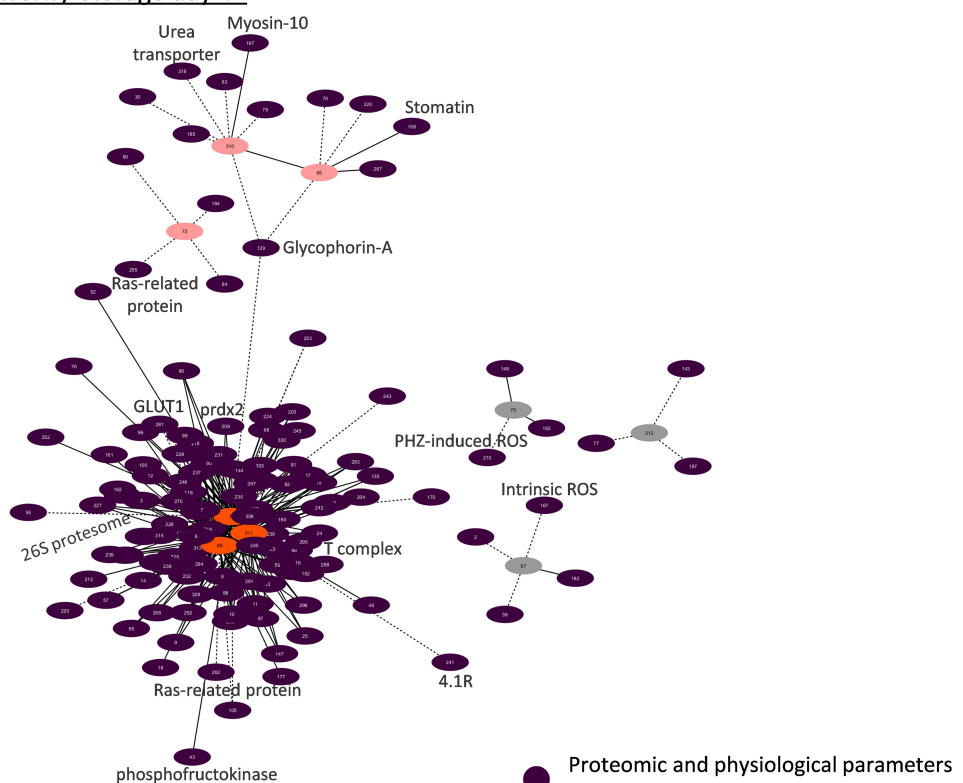
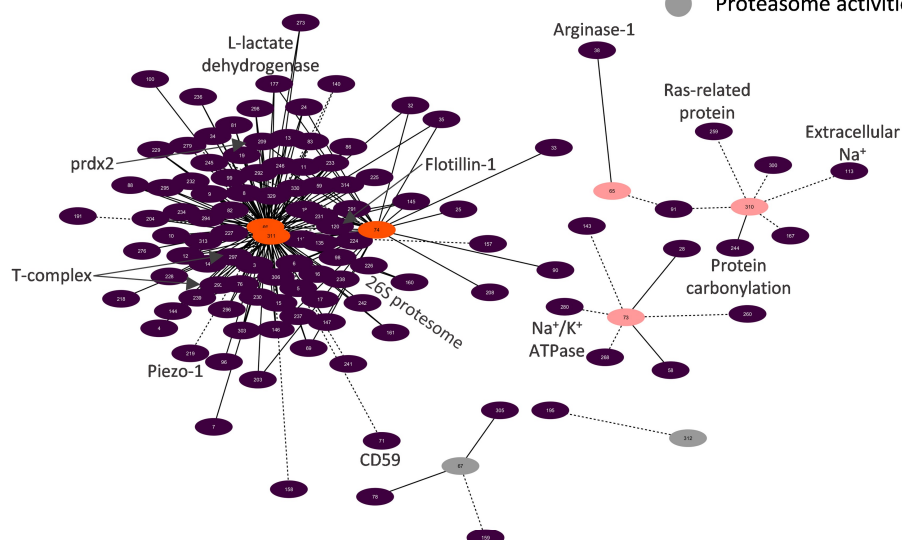
Control network / storage day 42beta-thalassemia minor network / storage day 42

Figure 7. Network analysis for proteasomic activities in beta-thalassemia minor and control stored red blood cells during late storage. Interactomes showing statistically significant correlations ($p < 0.01$) between RBC parameters and proteasome activities. Solid lines: positive correlation; dashed lines: negative correlation. Node numbers correspond to the definitions provided in Table S1. Prdx2: peroxiredoxin-2; GLUT1: glucose transporter-1; PHZ: phenylhydrazine.

4. Discussion

Recent studies of our team revealed that RBCs from β Thal⁺ donors possess (a) superior storage lesion profile in terms of hemolysis (storage, osmotic, mechanical, oxidative) and secondary quality metrics such as removal signaling, (b) resistance to the storage-

related oxidative stress in comparison to the average RBCs [22], and (c) unique proteomic signatures at the membrane, which is consistent with their metabolic and physiological features [23]. The present study expands our work in β Thal⁺ donors by reporting for the first-time different levels of activity and networking of the proteasome in the freshly drawn and stored β Thal⁺ RBCs. These findings are in line with the recently observed abundance of proteasome proteins in β Thal⁺ membranes [23] as well as with the effects of the donor's genetic background and storage time upon proteasome topology and activity [18].

4.1. The Discrete Spatiotemporal Proteasome Activity Profile in Stored RBCs

Based on our results, storage is associated with a tendency for decreasing proteasome activity in the cytosol and a temporal increase in the membrane activity levels around day 21, implying the translocation of active proteasome subunits to the membrane or activation of inactive membrane proteasomes in situ in both donor groups. Similar distributions were detected in stored RBCs from G6PD-deficient donors [18], establishing a storage-driven spatiotemporal proteasome activity profile in RBCs. It is known that storage in the cold promotes ROS generation, oxidative defects to membrane components, and modifications in energy and redox metabolism [27]. Having in mind that middle storage represents a key time-point for the above-mentioned RBC insults, it came as no surprise that this is when all proteasome activities reach their maximum membrane levels. Indeed, ROS [20] and calcium accumulation, carbonylation of membrane proteins, lipid peroxidation [22], as well as the rewiring of the metabolism [28] occur mainly between the second and the third week of storage in CPD-SAGM. In G6PD-deficient RBCs, proteasome subunits seem to co-translocate to the membrane, hand in hand with a variety of members of the “Repair or Destroy” proteins [18], including antioxidant enzymes and chaperones. In a similar way, the 20S core particle (total and activity) interactomes (Figures 4–7) exhibited numerous linkages with heat shock proteins, peroxiredoxins, T-complex components, etc.

4.2. Time-Dependent Cross-Talk between Proteasome Activities and ROS Levels

The repeatable correlation between the proteasome activities and the intracellular ROS further supports the responsiveness of the 20S proteasome toward oxidative-driven defects [29]. It is tempting to hypothesize that ROS levels positively correlate with proteasome activity until the middle of the storage period because the proteasome is still capable of counteracting the accelerated storage-driven oxidative stress. However, since the machinery itself is also a target of oxidation [30], leading to inactivation or other functional defects, it cannot probably cope with the overwhelming redox imbalance of RBCs at the end of storage, resulting in the inverse correlation profile evident in the cytosol of β Thal⁺ RBCs and the membrane of control RBCs. The previously detected accumulation of inactive proteasomes in the supernatant of blood units in late-storage [19] reinforces this claim.

The discrete correlation profile between ROS and proteasome activities in the cytosol for β Thal⁺ RBCs and the membrane for control RBCs might be indicative of (a) a higher need for protein control in the cytosol of β Thal⁺ RBCs, since their membrane seems to be more “protected” (as evidenced by the minor levels of lipid peroxidation or protein carbonylation [22] and the excess of membrane-bound chaperones and redox enzymes [23]), or (b) a different (likely more complex) regulation of membrane proteostasis in β Thal⁺ RBCs, which is not dependent on variations in ROS levels in the cytosol. This finding probably reflects the redox behavior of β Thal⁺ RBCs as imprinted upon the metabolism, proteome, and resistance to storage lesion. After all, proteasome activity can be regulated by many factors, including post-translational modifications of subunits, such as phosphorylation [31]. Indeed, the discrete expression of kinases and phosphatases in the membrane of β Thal⁺ RBCs [23] and their higher connectivity with the proteasome activity in the respective biological networks (Figures 6 and 7) when compared to the controls further support this more complex proteostasis regulation.

4.3. Storage Induces Higher Levels of Proteasome Activity in the Membrane of β Thal⁺ RBCs

Despite having baseline levels and a storage time-course profile similar to the control, CASP-like and CH-like activities presented higher values in the membrane of β Thal⁺ from mid-storage onwards. In the same context, EVs released from the β Thal⁺ membrane—where abundant working proteasomes are attached—contain more active proteasome subunits. This is in line with recent proteomic studies showing a higher abundance of several proteasome subunits and molecular chaperones, which is known to preserve the proteolytic activity of the proteasome [32], in the membrane of stored β Thal⁺ RBCs versus control [23], as well as in old or sickle cell disease RBCs in vivo [33]. The same trend for high proteasome activity has been reported in G6PD-deficient stored RBCs [18], which is another distinct genetic group characterized by sustained levels of oxidative stress. Consequently, the elevated proteasome activity in the membrane could represent an adaptation of RBCs to redox imbalance in vivo [29], which might be recalled by them to better preserve the proteome stability and overall functionality when exposed to additional oxidative challenges, including those imposed by the storage-induced accelerated aging. Although the specific activity of the proteasome in the membrane of RBCs has not been studied so far, high proteasome activities have been reported in the ROS-enriched cytosol of RBCs from sickle cell disease patients [34], which further increased following treatment with hydroxycarbamide [35]. Interestingly, even though β Thal⁺ RBCs are less susceptible to storage hemolysis [22], the β Thal⁺ supernatant was characterized by higher proteasome activity. Previous studies have shown that release of hemoglobin and 20S proteasome particles happen in a parallel manner in the supernatant of control RBC units, though the activity of free proteasomes reaches a plateau upon day 28 [19]. It is possible for the activity to be better preserved in β Thal⁺ RBCs either through a more effective molecular chaperoning of the 20S subunits [23,32] or due to their physical endurance of the sustained oxidative stress they experience in vivo. It should not be omitted that within beta-thalassemic precursor cells, proteasome subunits are upregulated in order to decongest the α -globin-filled cells [36].

4.4. Biological Networking of Proteasome and Proteasome Activities

During maturation, RBCs lose their organelles along with their ability to synthesize proteins. Moreover, upon refrigerated storage, the RBCs undergo an accelerated aging process characterized by redox imbalance, metabolic rewiring, and physiological dysfunctions, including proteotoxic stress. Taken together, these facts highlight the important role of proteostasis in the RBC life cycle. Goodman et al. [10] have shown that the proteostasis machinery is localized in the “heart” of the RBC interactome, as evidenced by protein–protein interaction analysis and further confirmed by larger-scale pathway and network analyses [37]. Our bioinformatic analysis validates and expands these findings by showing the same core position not only of proteasome subunits but also of their individual activities in RBC interactomes enriched with several omics and physiological data. However, it has been suggested that proteasome pools of different subcellular location, subunit composition, and activities may exert distinct functions in cell homeostasis [38]. Generally considered as cytoplasmic in location, the currently reported biological networks highlight several associations of 20S membrane activity with parameters never shown before in RBCs. The numerous correlations with cytosolic components of the 20S and 19S particles, molecular chaperones, ubiquitinylation and redox enzymes, and the proteolytic system of calpain/calpastatin in both groups signify the membrane activity of proteasome as part of a membrane proteostasis macromolecular system in stored RBCs that is subjected to a concerted spatiotemporal regulation: it might be membrane-bound en block. It seems that in the absence of lysosomes, the RBC proteasomes team up with the cytosolic calpain system to regulate degradative processes at the membrane level during storage. Co-variations of proteasome and calpain activities have been reported in several stressful or pathological conditions [39]. Nonetheless, β Thal⁺ stored RBCs seem to possess a more complex proteostatic network compared to controls, given the fact that their early-storage

interactome involves almost 25% more connections between the 20S core particles and peroxiredoxins, HSPs, T-complex components, etc. The complete loss of this difference until the end of the storage period supports the above-mentioned hypothesis that β Thal⁺ RBCs are “primed” to cope with additional levels of oxidative, energy, and proteotoxic stresses, such as the ones that come hand in hand with storage conditions. Similar results have emerged from interactome analyses in sickle cell RBCs [10].

The activity of membrane proteasomes also co-varied with the levels of membrane lipids and proteins in situ. Co-variation with proteins participating in lipid composition, such as the fatty acid synthase, suggests interactions at either structural (e.g., lipid composition of the membrane domain) or regulatory levels. Similar cross-talks have been detected in other cells and animal models. The N-myristoylation-driven membrane localization of the proteasome controls its phosphorylation [40], and in turn, the proteasome activity controls the abundance and activity of enzymes participating in lipid biosynthesis and metabolism [41,42].

Apart from lipids per se, several membrane proteins exhibited negative correlations with the membrane expression and activity of proteasomes, especially at late storage, when the membrane was disorganized by accumulated storage lesion. Several of them (e.g., 4.1R, glycophorin C, myosins, CD44) were components of the updated “repair or destroy” box of the RBC interactome [37]. Of particular importance were the raft-resident flotillins, which are currently correlated not only with the membrane levels of 20S proteins but also with their activity in β Thal⁺ membranes, suggesting a regulatory role for the lateral compartmentalization of the membrane, similar to the one reported in LPS-stimulated macrophages [43]. Of note, fatty acid synthase is also recruited to the macrophage lipid rafts upon LPS treatment [43]. Moreover, the proteasome-enriched membrane of sickle cell disease RBCs has been characterized by decreased levels of RBC raft-resident flotillins and stomatin [10].

The β Thal⁺ proteasome networks did not only differ from controls in terms of degree of connectivity but also in their specificity. Heterozygotes’ proteostasis is intertwined with a great variety of β Thal⁺ specific membrane proteome features in stored RBCs [22,23], producing an interesting subnetwork that seems to characterize these donors. For instance, the connections of proteasome activities with piezo-1 and Na⁺/K⁺ ATPase molecules might prove to be of great importance, since earlier studies have implicated proteasome pathways in modulating the surface expression of several ion channels [44]. In this context, the improved resistance of stored β Thal⁺ RBCs to mechanical stress could be partly related to the higher proteasome maintenance and activity in the membrane and the lower levels of piezo-1. Indeed, it has been found that mechanical stretch triggers piezo-1 degradation via the proteasome in endothelial cells [45]. Another molecule that is more abundant in β Thal⁺ membranes is arginase-1, which is known to compete nitric oxide synthase for their common substrate L-arginine. Its eclectic presence in the β Thal⁺ networks might be indirect, since it is known that the proteasome’s activity is related to the function of endothelial nitric oxide synthase [46]. Finally, the observed dialogue between energy metabolism and the proteasome has already been hinted at in the past, in both RBCs [10,37] and nucleated cells. Interestingly, in the latter ones, energy homeostasis seems to be partly regulated by a ubiquitin-independent proteasome system [47]. The pre-storage differences (increase in glycolysis) observed in the energy metabolism of β Thal⁺ RBCs [22] and the higher expression of both metabolic enzymes and proteasome subunits on their stored membranes [23] might be the reason behind the higher connectivity between energy-related proteins and the proteasome in this group.

5. Conclusions

Membrane proteostasis in stored RBCs is based not only on cytosolic but also on membrane regulatory mechanisms, including proteasomes, working in situ. Intracellular and extracellular proteasome activities vary as a function of the cytosolic ROS levels, the storage age of RBCs, and the presence of β Thal⁺ mutations. Storage is associated with

decreased proteasome activity in the cytosol but increased activity in the membrane and the extracellular supernatant. Furthermore, while β -globin mutations in the heterozygous state do not seem to impact the proteasome activity in vivo, storage stress promotes the elevation of proteasome activity in the membrane of β Thal⁺ RBCs. According to the interactome analyses, variation in membrane activity in stored cells seems to be connected to the lipid composition, the lateral compartmentalization, the structural disorganization, and the binding of the “repair-or-destroy” group of proteins. The highly enriched 20S interactome of stored β Thal⁺ RBCs is indicative of an impressive and primed “proteo-vigilance”, which is likely related to their redox metabolism and distinct membrane protein profile. In the light of recent findings showing the modulation of old-stored RBCs’ proteasome activities by transfusion-mimicking conditions in vitro [18], along with evidence for physiologically important functions of proteasome-containing platelet-derived EVs [48], the currently reported data deserve further investigation in potential RBC transfusion settings in vivo, including patients treated with proteasome inhibitors.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/membranes11090716/s1>. Table S1. Numerical code used for the presentation of proteomic and physiological parameters in the biological networks shown in Figures 3–7.

Author Contributions: Conceptualization, V.L.T. and M.H.A.; Methodology, M.D., A.D. and M.H.A.; Formal Analysis, V.L.T., A.T.A. and V.-Z.A.; Investigation, V.L.T., A.T.A., V.-Z.A. and M.D.; Resources, M.D., K.S., A.D., A.G.K. and M.H.A.; Data Curation, V.L.T., A.T.A. and M.H.A.; Writing—original draft preparation, V.L.T., A.T.A., V.-Z.A. and M.H.A.; Writing—review and editing, M.D., K.S., M.E.L., I.S.P., A.D. and A.G.K.; Visualization, V.L.T. and A.T.A.; Supervision, M.H.A.; Project administration, V.L.T., A.D. and M.H.A.; Funding acquisition, V.L.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project has received funding from the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI) and the General Secretariat for Research and Innovation (GSRI), under grant agreement No 2032.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved (20 December 2014) by the Ethics Committee of the Department of Biology, School of Science, NKUA (IRB301214/2015).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The proteomics data used in this study are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/7/3369> (accessed on 25 March 2021). All physiological data presented in this study are available upon request.

Acknowledgments: The authors would like to thank the post-graduate student Dimitrios G. Karadimas for his kind participation in part of the experiments reported in this study, which were performed in the context of his master’s thesis in the Department of Biology, NKUA. In addition, the authors would like to thank M.S. Jacovides Hellas S.A. for the kind offer of the LTRC blood bags.

Conflicts of Interest: Though unrelated to the contents of this manuscript, A.D. declares that he is a founder of Omix Technologies Inc and Altis Bioscience LLC and a consultant for Hemanext Inc. All other authors declare no conflict of interest.

References

1. Livneh, I.; Cohen-Kaplan, V.; Cohen-Rosenzweig, C.; Avni, N.; Ciechanover, A. The life cycle of the 26S proteasome: From birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Res.* **2016**, *26*, 869–885. [\[CrossRef\]](#)
2. Rousseau, A.; Bertolotti, A. Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 697–712. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Asher, G.; Reuven, N.; Shaul, Y. 20S proteasomes and protein degradation “by default”. *Bioessays* **2006**, *28*, 844–849. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Ben-Nissan, G.; Sharon, M. Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules* **2014**, *4*, 862–884. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Olshina, M.A.; Ben-Nissan, G.; Sharon, M. Functional regulation of proteins by 20S proteasome proteolytic processing. *Cell Cycle* **2018**, *17*, 393–394. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

6. Guo, X.; Dixon, J.E. The 26S proteasome: A cell cycle regulator regulated by cell cycle. *Cell Cycle* **2016**, *15*, 875–876. [[CrossRef](#)]
7. Pickering, A.M.; Koop, A.L.; Teoh, C.Y.; Ermak, G.; Grune, T.; Davies, K.J. The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 α proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem. J.* **2010**, *432*, 585–594. [[CrossRef](#)]
8. Shang, F.; Taylor, A. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 5–16. [[CrossRef](#)]
9. Naujokat, C.; Hoffmann, S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab. Investig.* **2002**, *82*, 965–980. [[CrossRef](#)]
10. Goodman, S.R.; Kurdia, A.; Ammann, L.; Kakhniashvili, D.; Daescu, O. The human red blood cell proteome and interactome. *Exp. Biol. Med.* **2007**, *232*, 1391–1408. [[CrossRef](#)]
11. Neelam, S.; Kakhniashvili, D.G.; Wilkens, S.; Levene, S.D.; Goodman, S.R. Functional 20S proteasomes in mature human red blood cells. *Exp. Biol. Med.* **2011**, *236*, 580–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Davies, K.J. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* **2001**, *83*, 301–310. [[CrossRef](#)]
13. Reinheckel, T.; Sitte, N.; Ullrich, O.; Kuckelkorn, U.; Davies, K.J.; Grune, T. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem. J.* **1998**, *335 Pt 3*, 637–642. [[CrossRef](#)]
14. Pesciotta, E.N.; Lam, H.S.; Kossenkov, A.; Ge, J.; Showe, L.C.; Mason, P.J.; Bessler, M.; Speicher, D.W. In-Depth, Label-Free Analysis of the Erythrocyte Cytoplasmic Proteome in Diamond Blackfan Anemia Identifies a Unique Inflammatory Signature. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0140036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. von Lohneysen, K.; Scott, T.M.; Soldau, K.; Xu, X.; Friedman, J.S. Assessment of the red cell proteome of young patients with unexplained hemolytic anemia by two-dimensional differential in-gel electrophoresis (DIGE). *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34237. [[CrossRef](#)]
16. Basu, A.; Saha, S.; Karmakar, S.; Chakravarty, S.; Banerjee, D.; Dash, B.P.; Chakrabarti, A. 2D DIGE based proteomics study of erythrocyte cytosol in sickle cell disease: Altered proteostasis and oxidative stress. *Proteomics* **2013**, *13*, 3233–3242. [[CrossRef](#)]
17. Bosman, G.J.; Lasonder, E.; Luten, M.; Roerdinkholder-Stoelwinder, B.; Novotny, V.M.; Bos, H.; De Grip, W.J. The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions. *Transfusion* **2008**, *48*, 827–835. [[CrossRef](#)]
18. Tzounakas, V.L.; Dzieciatkowska, M.; Anastasiadi, A.T.; Karadimas, D.G.; Vergaki, A.; Siourounis, P.; Stamoulis, K.; Papassideri, I.S.; Kriebardis, A.G.; D'Alessandro, A.; et al. Red cell proteasome modulation by storage, redox metabolism and transfusion. *Blood Transfus.* **2020**. [[CrossRef](#)]
19. Geng, Q.; Romero, J.; Saini, V.; Patel, M.B.; Majetschak, M. Extracellular 20S proteasomes accumulate in packed red blood cell units. *Vox Sang.* **2009**, *97*, 273–274. [[CrossRef](#)]
20. Tzounakas, V.L.; Anastasiadi, A.T.; Drossos, P.V.; Karadimas, D.G.; Valsami, S.E.; Stamoulis, K.E.; Papassideri, I.S.; Politou, M.; Antonelou, M.H.; Kriebardis, A.G. Sex-related aspects of the red blood cell storage lesion. *Blood Transfus.* **2021**, *19*, 224–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Teran, M.M.; Monaco, M.E.; Lazarte, S.S.; Haro, C.; Ledesma Achem, E.; Asensio, N.A.; Isse, B.A. Genetic Regulation of Redox Balance in beta-Thalassemia Trait. *Hemoglobin* **2020**, *44*, 122–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Tzounakas, V.L.; Anastasiadi, A.T.; Stefanoni, D.; Cendali, F.; Bertolone, L.; Gamboni, F.; Dzieciatkowska, M.; Rousakis, P.; Vergaki, A.; Soulikis, V.; et al. beta-thalassemia minor is a beneficial determinant of red blood cell storage lesion. *Haematologica* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tzounakas, V.L.; Anastasiadi, A.T.; Dzieciatkowska, M.; Karadimas, D.G.; Stamoulis, K.; Papassideri, I.S.; Hansen, K.C.; D'Alessandro, A.; Kriebardis, A.G.; Antonelou, M.H. Proteome of Stored RBC Membrane and Vesicles from Heterozygous Beta Thalassemia Donors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kriebardis, A.G.; Antonelou, M.H.; Stamoulis, K.E.; Economou-Petersen, E.; Margaritis, L.H.; Papassideri, I.S. RBC-derived vesicles during storage: Ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. *Transfusion* **2008**, *48*, 1943–1953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Homma, T.; Kurahashi, T.; Lee, J.; Kang, E.S.; Fujii, J. SOD1 deficiency decreases proteasomal function, leading to the accumulation of ubiquitinated proteins in erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *583*, 65–72. [[CrossRef](#)]
26. Antonelou, M.H.; Tzounakas, V.L.; Velentzas, A.D.; Stamoulis, K.E.; Kriebardis, A.G.; Papassideri, I.S. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: A time-course evaluation from shape to proteome. *J. Proteom.* **2012**, *76*, 220–238. [[CrossRef](#)]
27. Bardyn, M.; Tissot, J.D.; Prudent, M. Oxidative stress and antioxidant defenses during blood processing and storage of erythrocyte concentrates. *Transfus. Clin. Biol.* **2018**, *25*, 96–100. [[CrossRef](#)]
28. Reisz, J.A.; Wither, M.J.; Dzieciatkowska, M.; Nemkov, T.; Issaian, A.; Yoshida, T.; Dunham, A.J.; Hill, R.C.; Hansen, K.C.; D'Alessandro, A. Oxidative modifications of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase regulate metabolic reprogramming of stored red blood cells. *Blood* **2016**, *128*, e32–e42. [[CrossRef](#)]
29. Fujii, J.; Homma, T.; Kobayashi, S.; Warang, P.; Madkaikar, M.; Mukherjee, M.B. Erythrocytes as a preferential target of oxidative stress in blood. *Free Radic. Res.* **2021**, 1–19. [[CrossRef](#)]
30. Delobel, J.; Prudent, M.; Tissot, J.D.; Lion, N. Proteomics of the red blood cell carbonylome during blood banking of erythrocyte concentrates. *Proteom. Clin. Appl.* **2016**, *10*, 257–266. [[CrossRef](#)]

31. VerPlank, J.J.S.; Goldberg, A.L. Regulating protein breakdown through proteasome phosphorylation. *Biochem. J.* **2017**, *474*, 3355–3371. [[CrossRef](#)]
32. Conconi, M.; Petropoulos, I.; Emod, I.; Turlin, E.; Biville, F.; Friguier, B. Protection from oxidative inactivation of the 20S proteasome by heat-shock protein 90. *Biochem. J.* **1998**, *333 Pt 2*, 407–415. [[CrossRef](#)]
33. Biondani, A.; Turrini, F.; Carta, F.; Matte, A.; Filippini, A.; Siciliano, A.; Beuzard, Y.; De Franceschi, L. Heat-shock protein-27, -70 and peroxiredoxin-II show molecular chaperone function in sickle red cells: Evidence from transgenic sickle cell mouse model. *Proteom. Clin. Appl.* **2008**, *2*, 706–719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Strader, M.B.; Jana, S.; Meng, F.; Heaven, M.R.; Shet, A.S.; Thein, S.L.; Alayash, A.I. Post-translational modification as a response to cellular stress induced by hemoglobin oxidation in sickle cell disease. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 14218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Warang, P.; Homma, T.; Pandya, R.; Sawant, A.; Shinde, N.; Pandey, D.; Fujii, J.; Madkaikar, M.; Mukherjee, M.B. Potential involvement of ubiquitin-proteasome system dysfunction associated with oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **2018**, *182*, 559–566. [[CrossRef](#)]
36. Khandros, E.; Thom, C.S.; D'Souza, J.; Weiss, M.J. Integrated protein quality-control pathways regulate free alpha-globin in murine beta-thalassemia. *Blood* **2012**, *119*, 5265–5275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. D'Alessandro, A.; Righetti, P.G.; Zolla, L. The red blood cell proteome and interactome: An update. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 144–163. [[CrossRef](#)]
38. Seelig, A.; Boes, B.; Kloetzel, P.M. Characterization of mouse proteasome subunit MC3 and identification of proteasome subtypes with different cleavage characteristics. Proteasome subunits, proteasome subpopulations. *Enzyme Protein* **1993**, *47*, 330–342. [[CrossRef](#)]
39. Shashova, E.E.; Kolegova, E.S.; Zav'yalov, A.A.; Slonimskaya, E.M.; Kondakova, I.V. Changes in the Activity of Proteasomes and Calpains in Metastases of Human Lung Cancer and Breast Cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2017**, *163*, 486–489. [[CrossRef](#)]
40. Chen, L.; Zhang, Y.; Shu, X.; Chen, Q.; Wei, T.; Wang, H.; Wang, X.; Wu, Q.; Zhang, X.; Liu, X.; et al. Proteasome regulation by reversible tyrosine phosphorylation at the membrane. *Oncogene* **2021**, *40*, 1942–1956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Coates, H.W.; Capell-Hattam, I.M.; Brown, A.J. The mammalian cholesterol synthesis enzyme squalene monooxygenase is proteasomally truncated to a constitutively active form. *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*, 100731. [[CrossRef](#)]
42. Oliva, J.; French, S.W.; Li, J.; Bardag-Gorce, F. Proteasome inhibitor treatment reduced fatty acid, triacylglycerol and cholesterol synthesis. *Exp. Mol. Pathol.* **2012**, *93*, 26–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dhungana, S.; Merrick, B.A.; Tomer, K.B.; Fessler, M.B. Quantitative proteomics analysis of macrophage rafts reveals compartmentalized activation of the proteasome and of proteasome-mediated ERK activation in response to lipopolysaccharide. *Mol. Cell Proteom.* **2009**, *8*, 201–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Abriel, H.; Staub, O. Ubiquitylation of ion channels. *Physiology* **2005**, *20*, 398–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Miroshnikova, Y.A.; Manet, S.; Li, X.; Wickstrom, S.A.; Faurobert, E.; Albiges-Rizo, C. Calcium signaling mediates a biphasic mechanoadaptive response of endothelial cells to cyclic mechanical stretch. *Mol. Biol. Cell* **2021**, *32*, mbcE21030106. [[CrossRef](#)]
46. Wei, Q.; Xia, Y. Proteasome inhibition down-regulates endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and function. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 21652–21659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Sun, L.; Fan, G.; Shan, P.; Qiu, X.; Dong, S.; Liao, L.; Yu, C.; Wang, T.; Gu, X.; Li, Q.; et al. Regulation of energy homeostasis by the ubiquitin-independent REGgamma proteasome. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12497. [[CrossRef](#)]
48. Marcoux, G.; Laroche, A.; Hasse, S.; Bellio, M.; Mbarik, M.; Tamagne, M.; Allaey, I.; Zufferey, A.; Levesque, T.; Rebetz, J.; et al. Platelet EVs contain an active proteasome involved in protein processing for antigen presentation via MHC-I molecules. *Blood* **2021**. [[CrossRef](#)]



Article

Proteome of Stored RBC Membrane and Vesicles from Heterozygous Beta Thalassemia Donors

Vassilis L. Tzounakas ^{1,†}, Alkmini T. Anastasiadi ^{1,†}, Monika Dzieciatkowska ², Dimitrios G. Karadimas ¹, Konstantinos Stamoulis ³, Issidora S. Papassideri ¹, Kirk C. Hansen ², Angelo D'Alessandro ² , Anastasios G. Kriebardis ^{4,*} and Marianna H. Antonelou ^{1,*} 

¹ Department of Biology, School of Science, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), 15784 Athens, Greece; tzounak@biol.uoa.gr (V.L.T.); alkanast@biol.uoa.gr (A.T.A.); dimitriskrd@biol.uoa.gr (D.G.K.); ipapasid@biol.uoa.gr (I.S.P.)

² Department of Biochemistry and Molecular Genetics, School of Medicine—Anschutz Medical Campus, University of Colorado, Aurora, CO 80045, USA; monika.dzieciatkowska@ucdenver.edu (M.D.); KIRK.HANSEN@CUANSCHUTZ.EDU (K.C.H.); ANGELO.DALESSANDRO@UCDENVER.EDU (A.D.)

³ Hellenic National Blood Transfusion Centre, Acharnes, 13677 Athens, Greece; kostas.stamoulis@gmail.com

⁴ Laboratory of Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology (HemQcR), Department of Biomedical Sciences, School of Health & Welfare Sciences, University of West Attica (UniWA), 12243 Egaleo, Greece

* Correspondence: akrieb@uniwa.gr (A.G.K.); manton@biol.uoa.gr (M.H.A.)

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Tzounakas, V.L.; Anastasiadi, A.T.; Dzieciatkowska, M.; Karadimas, D.G.; Stamoulis, K.; Papassideri, I.S.; Hansen, K.C.; D'Alessandro, A.; Kriebardis, A.G.; Antonelou, M.H. Proteome of Stored RBC Membrane and Vesicles from Heterozygous Beta Thalassemia Donors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3369. <https://doi.org/10.3390/ijms22073369>

Academic Editor: Elena Girolotto

Received: 26 February 2021

Accepted: 22 March 2021

Published: 25 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Genetic characteristics of blood donors may impact the storability of blood products. Despite higher basal stress, red blood cells (RBCs) from eligible donors that are heterozygous for beta-thalassemia traits (β Thal⁺) possess a differential nitrogen-related metabolism, and cope better with storage stress compared to the control. Nevertheless, not much is known about how storage impacts the proteome of membrane and extracellular vesicles (EVs) in β Thal⁺. For this purpose, RBC units from twelve β Thal⁺ donors were studied through proteomics, immunoblotting, electron microscopy, and functional ELISA assays, versus units from sex- and aged-matched controls. β Thal⁺ RBCs exhibited less irreversible shape modifications. Their membrane proteome was characterized by different levels of structural, lipid raft, transport, chaperoning, redox, and enzyme components. The most prominent findings include the upregulation of myosin proteoforms, arginase-1, heat shock proteins, and protein kinases, but the downregulation of nitrogen-related transporters. The unique membrane proteome was also mirrored, in part, to that of β Thal⁺ EVs. Network analysis revealed interesting connections of membrane vesiculation with storage and stress hemolysis, along with proteome control modulators of the RBC membrane. Our findings, which are in line with the mild but consistent oxidative stress these cells experience in vivo, provide insight into the physiology and aging of stored β Thal⁺ RBCs.

Keywords: RBC storage lesion; RBC membrane proteome; RBC shape modifications; extracellular vesicles proteome; beta thalassemia trait donors; donor variation effect; network analysis

1. Introduction

The intrinsic characteristics of blood donors might impact the storage capacity of red blood cells (RBCs). Both environmental (alcohol consumption [1], smoking [2]) and genetic (sex [3], ethnicity [4], hemoglobin (Hb) mutation [5]) factors have been shown to affect hemolysis, redox, and metabolic parameters of stored RBCs, as well as their post-transfusion recovery. Beta-thalassemia trait (β Thal⁺) is a heterogeneous group of genetic defects in the beta-globin gene, leading to decreased beta-globin synthesis, ineffective erythropoiesis, excess and precipitation of alpha-globin chains, and oxidative stress.

Individuals with beta thalassemia traits consist a non-negligible proportion of blood donors in several geographical areas, including the Mediterranean. It was recently shown

that stored RBCs from these subjects cope better with storage stress with respect to hemolysis and redox variables, and have a differentiated metabolism, especially with respect to purine oxidation, arginine metabolism, and the hexosamine pathway [5].

Despite a lack of information regarding the storability of βThal^+ RBCs, a significant amount of studies have reported differences in the protein composition of the RBC membrane between thalassemic subjects (minor or major) and controls *in vivo*. The genetic regulation of redox balance in βThal^+ subjects consists of interesting modifications in the transcript levels of several redox regulators that could be associated with changes in the erythrocyte proteome [6]. It has been shown that an excess of Hb chains can bind to spectrin, generating a spectrin-globin complex that increases the rigidity of the RBC membrane [7]. Moreover, several structural and functional alterations have been observed in the most abundant membrane protein with a critical role in gas transport and RBC structure and metabolism, band 3: extensive phosphorylation [8], cleavage by caspase-3 [9], and increased anion exchange [10]. The latter strongly contributes to the unique surface to volume ratio of RBCs in thalassemia, that in turn enhances their resistance to osmotic stress [11]. Variations in the levels of membrane proteins, including spectrin, flotillin-1, and p55, have emerged from proteomics analysis of HbE/beta-thalassemic erythrocytes [12].

Another interesting aspect of RBC physiology in beta thalassemia is the membrane vesiculation profile. There is evidence that thalassemic subjects exhibit higher levels of extracellular vesicles (EVs) *in vivo*, a great part of which are released from erythrocytes [13–15], and present elevated levels of antigens involved in coagulation [13]. Such EVs have been found to be enriched in antioxidant and chaperone proteins, like HSP70 (beta thalassemia intermedia patients) [13], but containing lower levels of free Hb-scavenging plasma proteins and immunoglobulin chains (HbE/beta-thalassemic patients) [16,17].

Nonetheless, apart from our recent preliminary proteomics study that suggested differences in volume and calcium homeostasis in stored RBCs from βThal^+ donors compared to controls [5], not much is known about the membrane proteome of βThal^+ RBCs during storage. Contemporary proteomics approaches that are based on mass spectrometry analysis enable us to effectively analyze protein molecular targets [18] in a sensitive and very high-throughput manner [19]. By applying this technology in combination with classic biochemical and physiological assays, we currently present the first comprehensive report of changes in protein levels of the RBC membrane and EVs from βThal^+ donors compared to a control throughout storage at blood bank conditions.

2. Results

2.1. The Proteome of βThal^+ RBC Membrane during Storage

Proteomics analysis was performed both on single biological replicates (young, day 7; old, day 42) or pooled (from day 7 to day 42 on a weekly basis) membrane samples of stored RBCs from the control and βThal^+ groups ($n = 12$; Figure 1A; Tables S1 and S2). Partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) separated the two groups at both early (week 1) and late (week 6) storage across principal component 1 (PC1), explaining ~24% of the total variance (Figure 1B). Several proteins exhibited different expression levels in the membrane of young and old βThal^+ vs. control RBCs (Figure 1C). The top 50 between-group differences concerning the young RBCs, as determined by an independent *t*-test, are highlighted in the heat map in Figure 1D.

The majority of the differently expressed proteins belonged to seven functional clusters: key structural proteins (including lipid raft-associated components), antigens and immunoglobulins, transporters, metabolic enzymes, kinases/phosphatases, and stress response proteins (including chaperones, proteasome subunits, and proteasome-related components) (Figures 2–7).

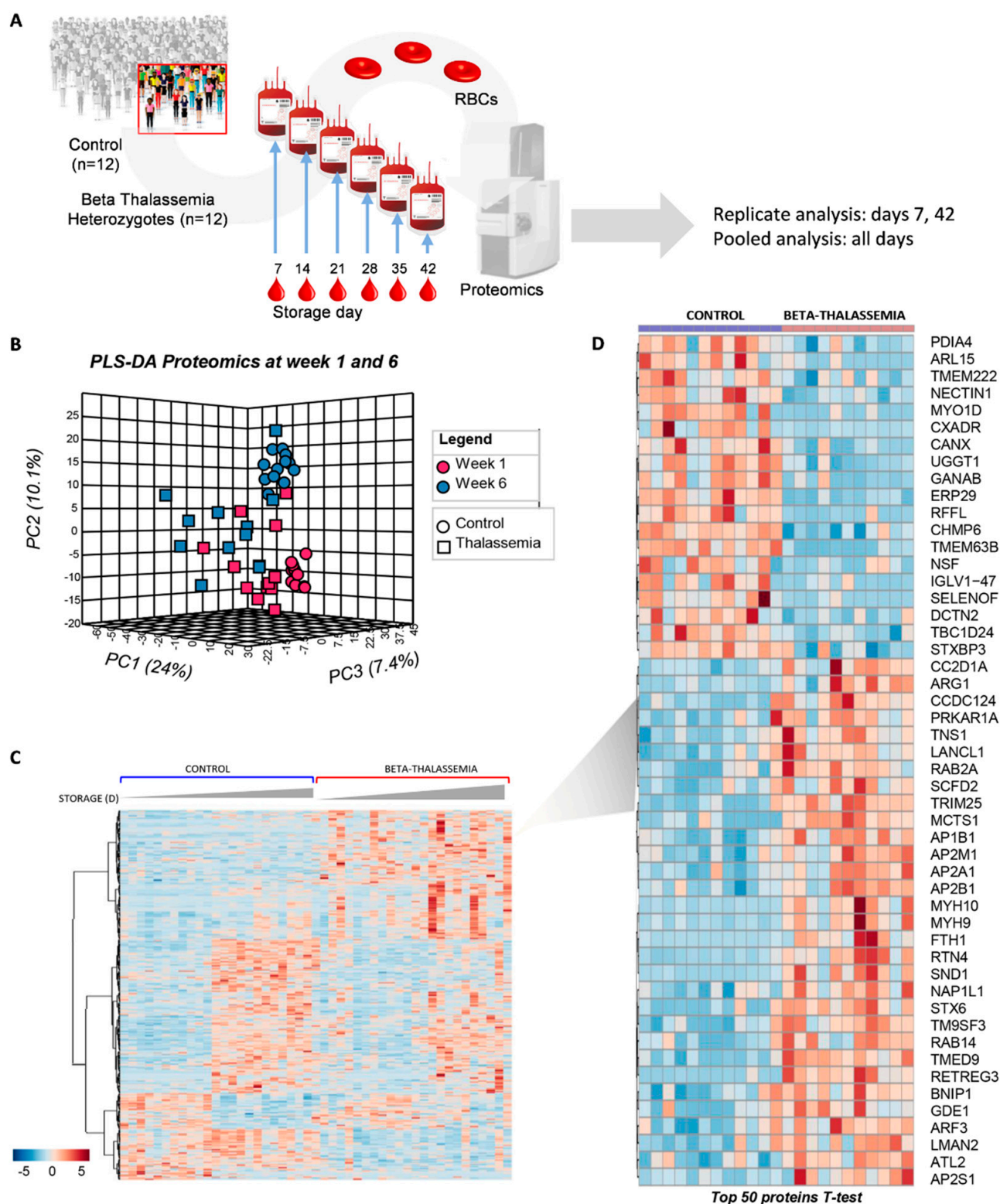


Figure 1. Proteomics analysis of the stored RBC membrane. (A) Isolated membranes from $n = 12$ β Thal⁺ and $n = 12$ control RBC units were analyzed by proteomics tools in single replicates (day 7 and day 42 samples) or in pooled samples (days 7–42 at weekly intervals). (B) Principal component and discriminant analysis of day 7 and day 42 samples. (C) Heat map showing differentially expressed proteins between the two groups at early and late storage. (D) Heat map showing the top 50 proteins differing between β Thal⁺ and control membranes at early storage.

2.1.1. Major Structural Proteins and Lipid Raft-Associated Components

Concerning the major structural proteins, lower content of integral (band 3, glycophorin C), skeletal (spectrin, actin, p55) and raft-associated (stomatin, p55) components were detected in the membrane of βThal^+ RBCs compared to the control at early storage (Figure 2). In striking contrast, numerous myosin proteoforms (e.g., non-muscle myosin IIA, Figure 2A; myosin IIB, 37 ± 9 vs. 146 ± 100 A.U., control vs. βThal^+ , $p = 0.001$, day 42) were found in great excess. For the following storage time, no significant reduction in prominent membrane components (glycophorin C, spectrin, ankyrin, stomatin, etc.) was observed in βThal^+ samples, resulting in higher membrane levels at late storage compared to the control RBCs. Normal levels of membrane-bound globin chains (e.g., day 42: 184 ± 48 vs. 179 ± 54 A.U., control vs. βThal^+) and band 3 oligomers (Figure 2A) were detected in βThal^+ samples by both proteomics and immunoblotting analyses.

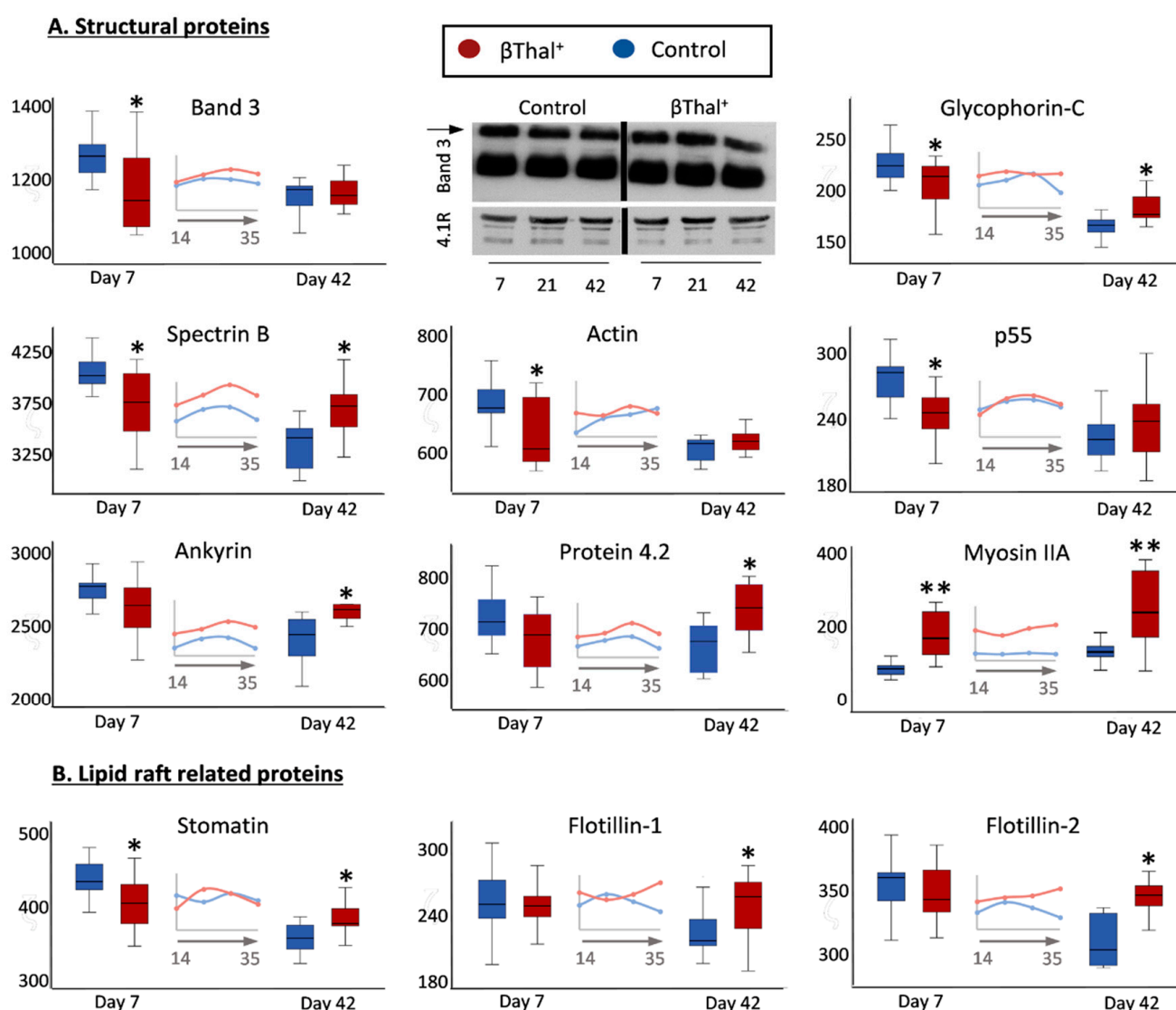


Figure 2. Proteomics analysis of stored RBC membrane: structural proteins. Levels of integral and peripheral membrane proteins (A) as well as of lipid raft-related components (B) in βThal^+ and control RBCs throughout storage. Inserts: pooled analysis of membrane samples at weekly intervals. Representative immunoblots of band 3 monomers and dimers (arrow) are shown ($n = 7$). 4.1R protein was used as internal loading control. (*) $p < 0.05$ βThal^+ vs. controls; (**) $p < 0.05$ and fold > 1.25 βThal^+ vs. controls.

2.1.2. Blood Group Surface Antigens

In the category of membrane proteins carrying blood group antigens, several components were increased (e.g., erythroid membrane-associated protein-ERMAP/Scianna blood group; basal cell adhesion molecule-BCAM/Lutheran antigen; basigin/Ok blood group; Rh-CE glycoprotein) or decreased (CD44, AnWj and In antigens; Semaphorin 7A, John-Milton Hagen blood group antigen; small integral membrane protein-1, SMIM/Vel blood group antigen) in β Thal⁺ samples compared to the control (Figure 3A). With a few exceptions (e.g., IGHG3 Figure 3B), control levels of membrane-bound immunoglobulin proteoforms were detected in the stored β Thal⁺ RBCs. Notably, the junctional adhesion molecule A (F11 receptor), a member of the immunoglobulin superfamily and potential platelet receptor, was detected at lower levels in old stored β Thal⁺ RBCs (Figure 3B).

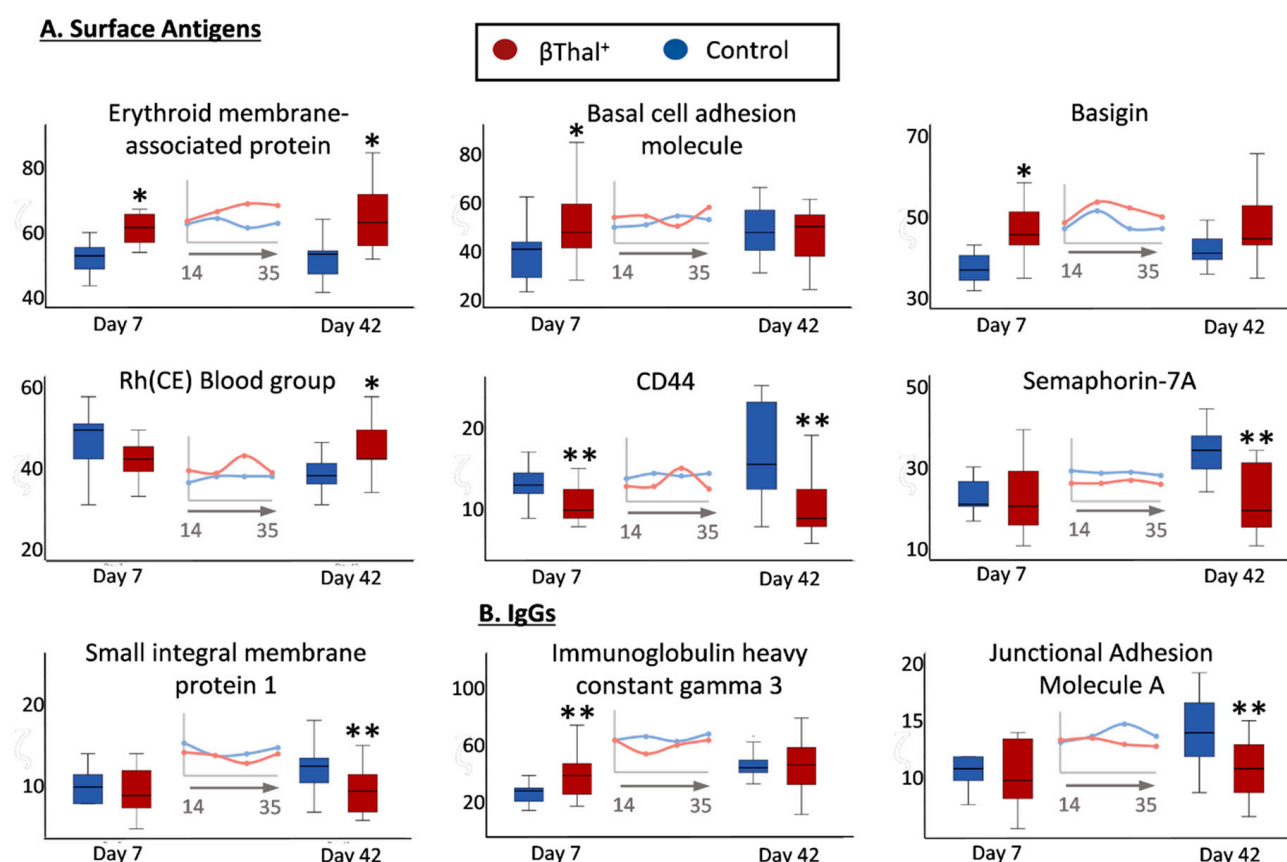


Figure 3. Proteomics analysis of stored RBC membrane: surface antigens and immunoglobulins. Levels of integral protein carriers of surface antigens (A) and of immunoglobulins (B) in β Thal⁺ and control RBCs throughout storage. Inserts: pooled analysis of membrane samples at weekly intervals. (*) $p < 0.05$ β Thal⁺ vs. controls; (**) $p < 0.05$ and fold > 1.25 β Thal⁺ vs. controls.

2.1.3. Transport Across the Membrane: Pumps, Channels, and Transporters

Compared to control RBCs, the β Thal⁺ RBCs had lower levels of many transmembrane transporters, pumps and channels playing significant roles in metabolite influx/efflux and volume regulation, either throughout storage (equilibrate nucleoside transporter 1, ENT1) or at the early (aquaporin-1) or later period of it (N₂ metabolism-associated urea and ammonium transporters; Piezo-1; copper transporting ATPase) (Figure 4). A trend for lower levels of the Gardos ion channel (KCNN4, 16.3 ± 1.5 vs. 14.1 ± 3.2 , $p = 0.052$) was also detected in young stored β Thal⁺ RBCs. On the contrary, there was an increased expression of Na⁺/K⁺ ATPase (in young stored RBCs) and of monocarboxylate transporter-1 (SLC16A1). Syntaxin-4 had low levels in β Thal⁺ samples when compared to controls (Figure 4).

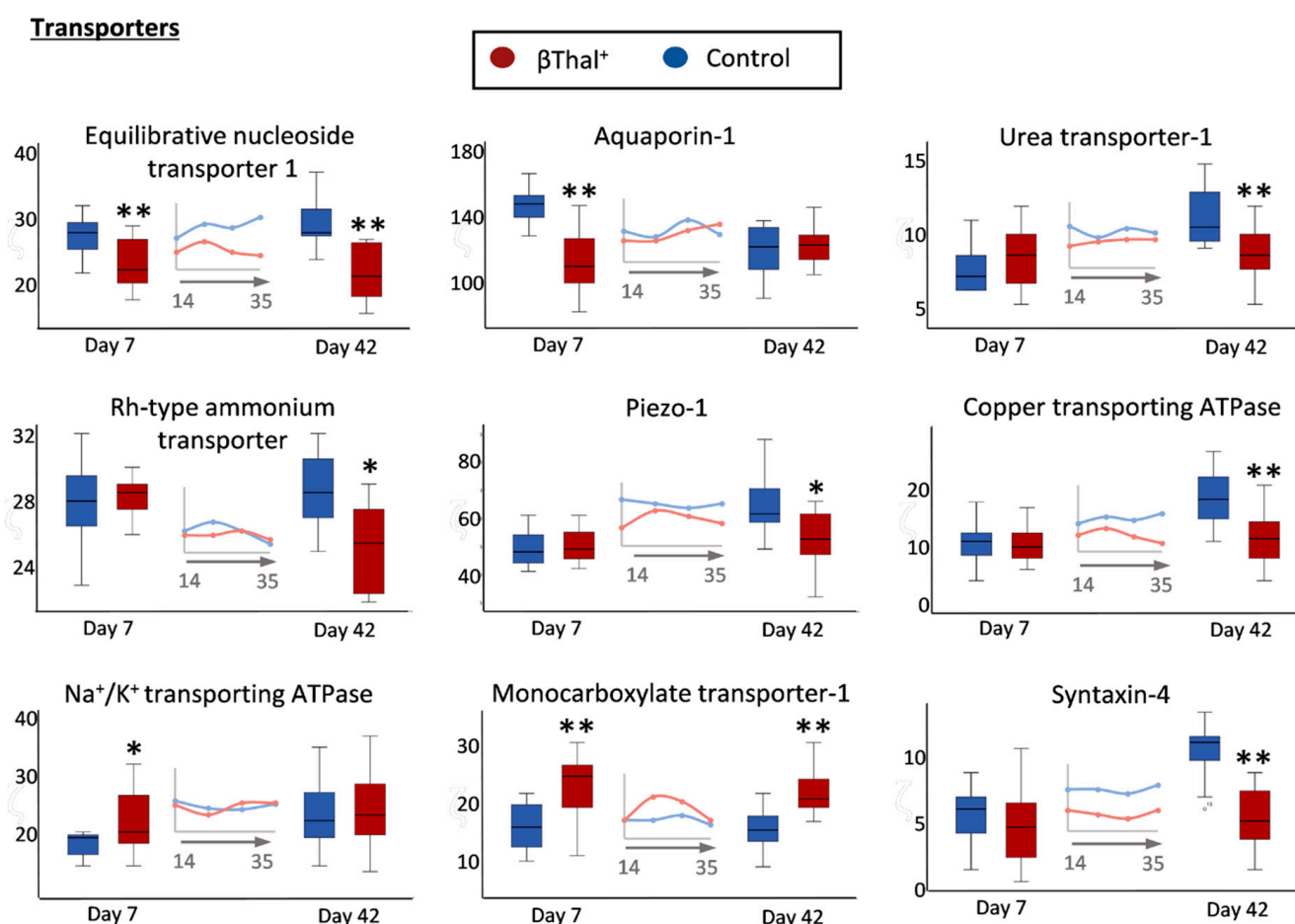


Figure 4. Proteomics analysis of stored RBC membrane: transporters, channels, and pumps. Levels of integral proteins involved in transport across the membrane in βThal^+ and control RBCs throughout storage. Inserts: pooled analysis of membrane samples at weekly intervals. (*) $p < 0.05$ βThal^+ vs. controls; (**) $p < 0.05$ and fold > 1.25 βThal^+ vs. controls.

2.1.4. Enzymes

The βThal^+ RBC repertoire of membrane-bound enzymes was also strikingly different compared to the controls (Figure 5). Enzymes participating in the urea cycle, purine synthesis, and amino acid metabolism (arginase-1, peptidyl-poly cis-trans isomerase, C-1 tetrahydrofolate synthase) in addition to NADPH-dependent redox systems (flavin reductase, glutathione transferase) had significantly increased levels at early storage or throughout it. Carbonic anhydrase and glycolysis-associated enzymes (e.g., glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) were selectively increased in old stored βThal^+ RBCs. On the other side, extremely low levels of enzymes involved in protein glycosylation (UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase), as well as in carbohydrate (neutral alpha-glucosidase) and lipid (neutral cholesterol ester hydrolase 1, very long chain 3-oxoacyl-CoA reductase) catabolism, were detected throughout storage or in old stored βThal^+ RBCs. Notably, downregulation of phospholipid scramblase 1 (participating in the deregulation of membrane phospholipid asymmetry) and of methyltransferase-like protein 7A (a probable sensor of oxidative stress in RBCs), was also detected in young stored βThal^+ samples.

It is worth mentioning that, while several cytosolic kinases exhibited higher membrane binding in the βThal^+ stored RBCs, the phosphatases demonstrated the opposite trend (Figure 6A). Consequently, higher protein tyrosine phosphorylation was detected by immunoblotting analysis in the βThal^+ RBC membrane compared to the control at middle and late storage (Figure 6B).

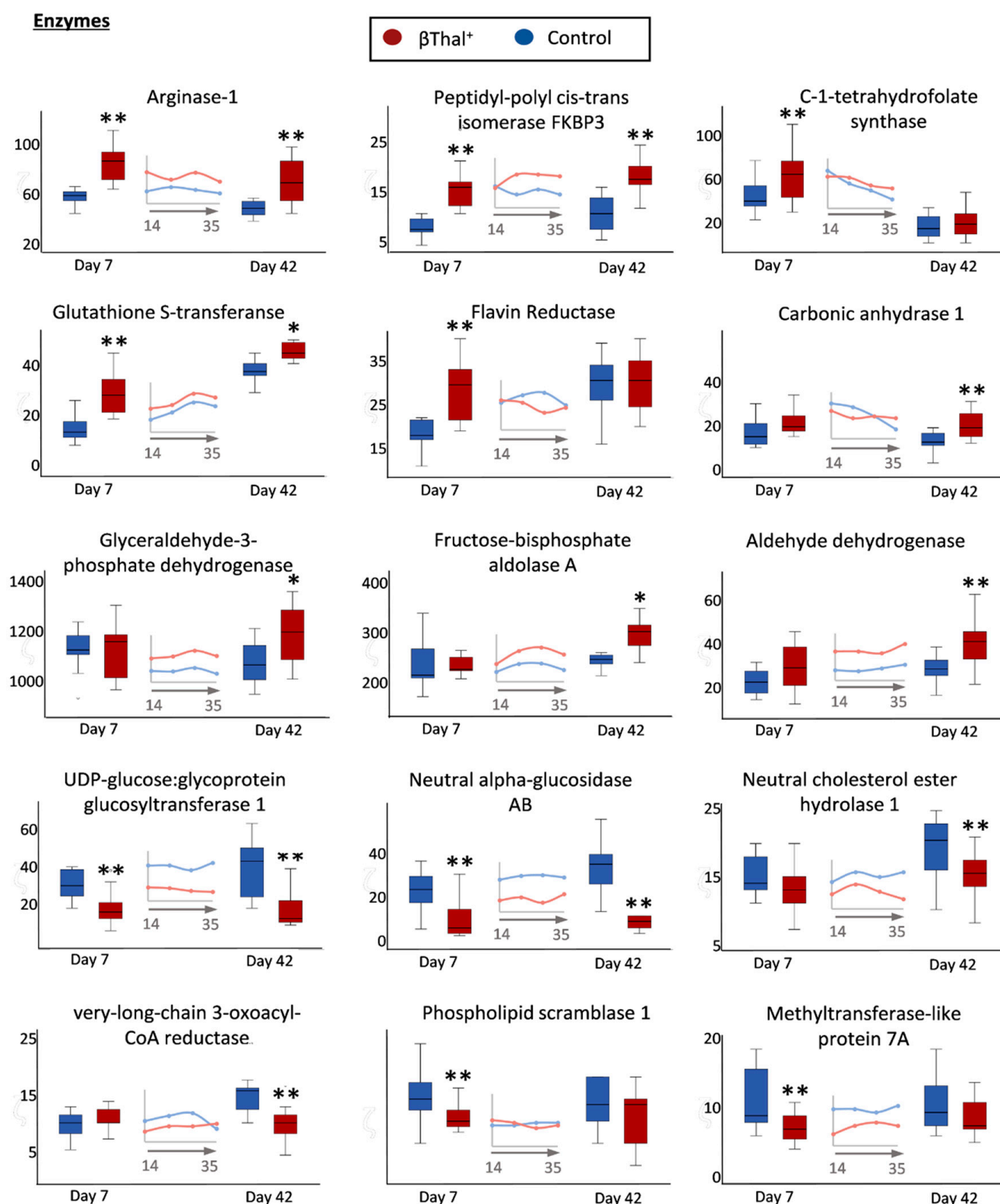


Figure 5. Proteomics analysis of stored RBC membrane: proteins with enzymatic activity. Levels of integral membrane enzymes or cytosolic membrane-bound enzymes in β Thal⁺ and control RBCs throughout storage. Inserts: pooled analysis of membrane samples at weekly intervals. (*) $p < 0.05$ β Thal⁺ vs. controls; (**) $p < 0.05$ and fold > 1.25 β Thal⁺ vs. controls.

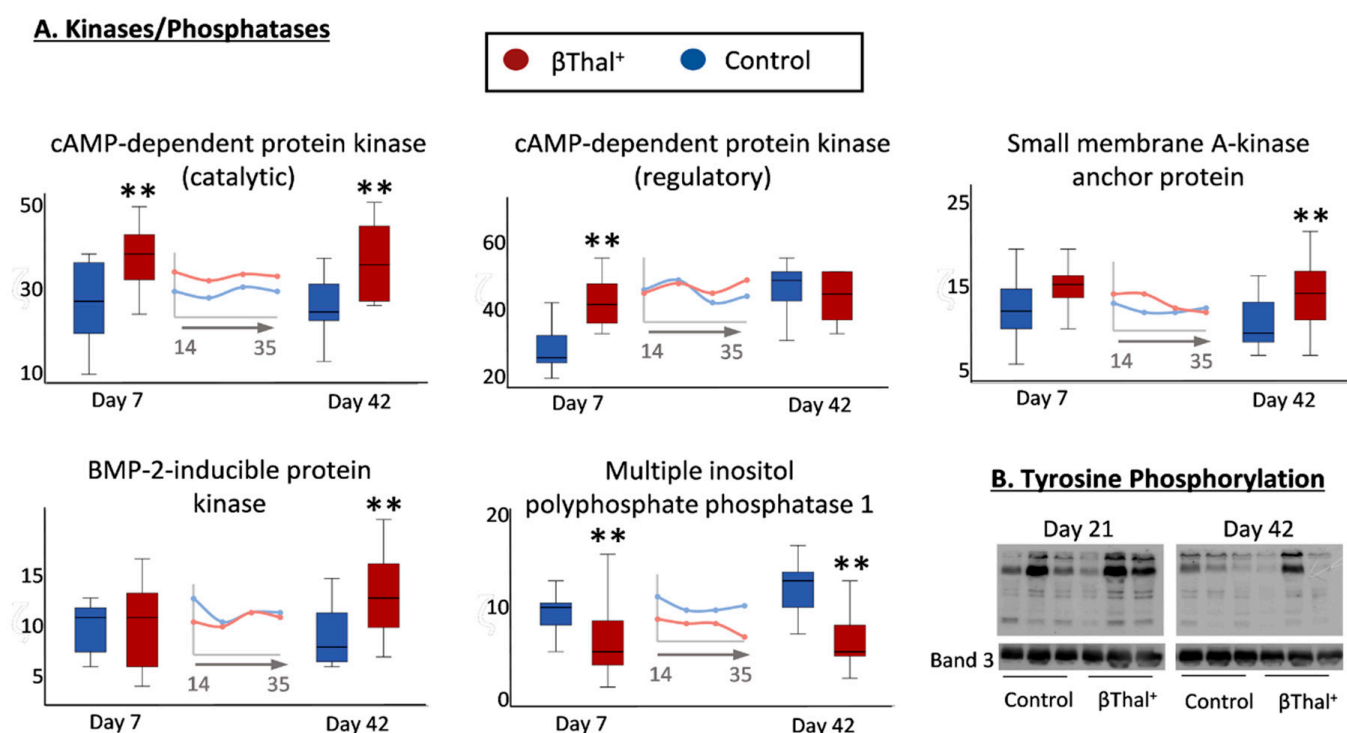


Figure 6. Proteomics analysis of stored RBC membrane: protein phosphorylation. (A) Levels of membrane-bound cytosolic protein kinases and phosphatases in β Thal⁺ and control RBCs throughout storage. Inserts: pooled analysis of membrane samples at weekly intervals. (*) $p < 0.05$ β Thal⁺ vs. controls; (**) $p < 0.05$ and fold > 1.25 β Thal⁺ vs. controls. (B) Representative immunoblots showing variation in the levels of protein Tyrosine phosphorylation in β Thal⁺ and control RBC membrane samples treated with phosphatase inhibitors ($n = 3$ per group) at middle and late storage. Band 3 was used as the internal loading control.

2.1.5. “Repair or Destroy” Proteins

Finally, several proteins with significant differences in stored β Thal⁺ RBCs compared to the controls fall in the group of “repair or destroy” proteins, including chaperones and proteasome molecules participating in stress responses (Figure 7A). Indeed, significant enrichment of β Thal⁺ vs. the control membrane in molecular chaperones, co-chaperones, and protein partners was evident at individual storage times (e.g., stress-induced phosphoprotein 1, STIP1, week 1; T-complex proteins, week 6) or throughout storage (Hsp70; DNAJ 21 $\pm$ 7 vs. 37 $\pm$ 14 A.U., control vs. β Thal⁺, $p = 0.002$, day 42 samples) by proteomics and immunoblotting analyses. In contrast, the calcium-binding chaperones calnexin and calreticulin, as well as several protein disulfide isomerases, were less abundant in the β Thal⁺ membrane (Figure 7A). The membrane association of proteasome subunits, both catalytic and regulatory, was greater in the β Thal⁺ group at late storage (Figure 7B), but protein ubiquitinylation exhibited the opposite pattern (day 42: 19 $\pm$ 5 vs. 14 $\pm$ 4, controls vs. β Thal⁺, $p = 0.006$; see representative immunoblots in Figure 7B). Apart from these protein groups, the membrane of stored β Thal⁺ RBCs was further characterized by the overexpression of protein argonaute-2 (AGO2) implicated in miRNA binding (Figure 7A) and of AP-2 complex members involved in the internalization of transferrin receptor in reticulocytes [20]. Finally, different levels of small GTPases (mostly enrichment) were detected in stored β Thal⁺ RBC membrane (Table S1).

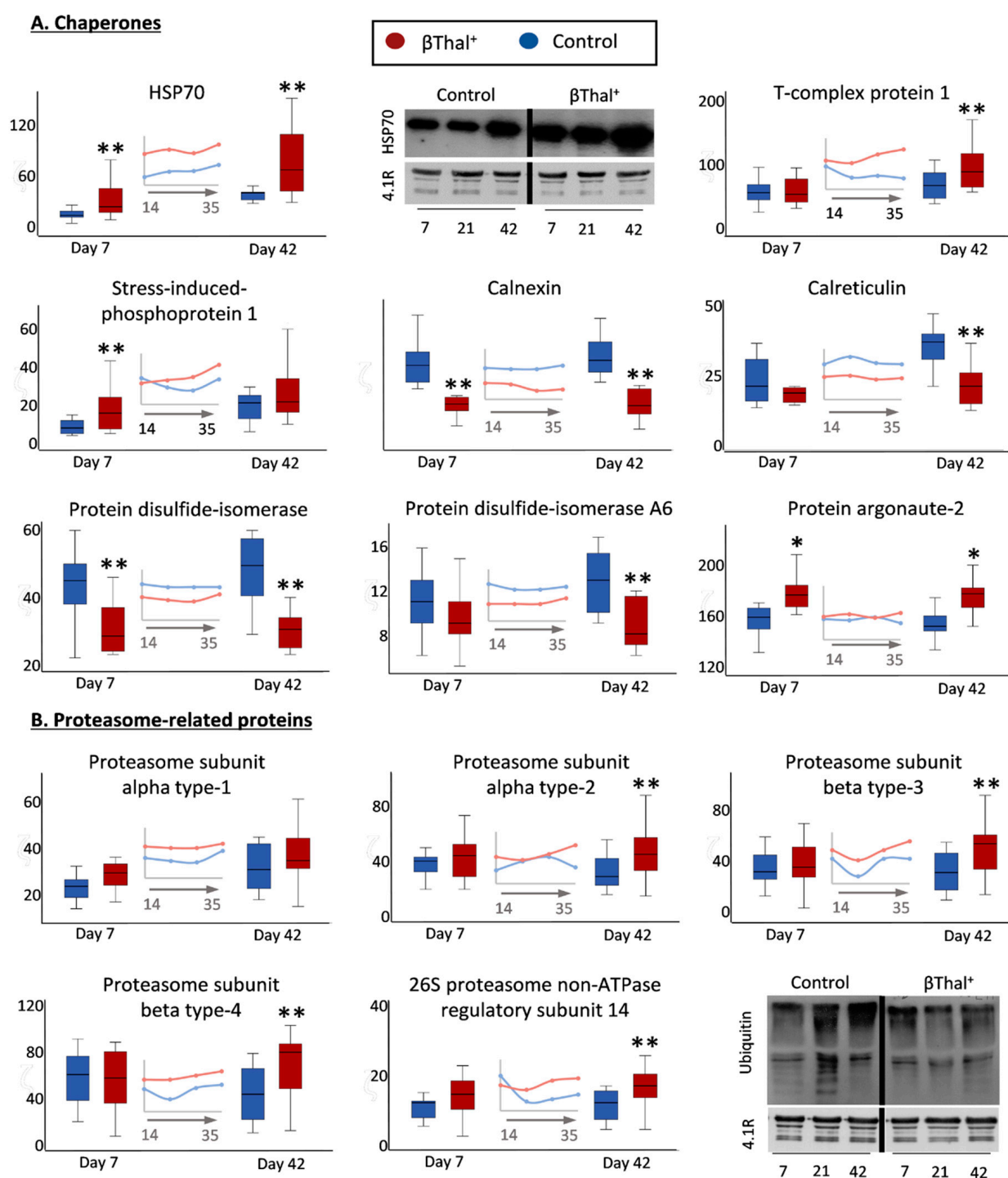


Figure 7. Proteomics analysis of stored RBC membranes: “repair or destroy” group of proteins. Variation in the membrane levels of selected chaperones (A) and of 20S/26S proteasome subunits (B) in β Thal⁺ and control RBCs throughout storage. Inserts: pooled analysis of membrane samples at weekly intervals. (*) $p < 0.05$ β Thal⁺ vs. controls; (**) $p < 0.05$ and fold > 1.25 β Thal⁺ vs. controls. Representative immunoblots showing variation in the levels of heat shock protein-70 (HSP70) and of ubiquitinated proteins at early, middle, and late storage are also shown ($n = 7$ per group). Protein 4.1R was used as internal loading control.

2.2. RBC Shape and Membrane Vesiculation

We then examined whether the abovementioned variation of the RBC membrane proteome was associated with typical storage-induced changes in cellular shape and the degree of membrane vesiculation. To this purpose, we first proceeded to a morphological

evaluation of stored RBCs by scanning electron microscopy. Lower levels of irreversible shape modifications (e.g., spherocytes) were observed in βThal^+ vs. the control units at middle and late storage (Figure 8A). Following sequential isolation of supernatants and then of EVs accumulated into them up to late storage, we found equal levels of procoagulant activity (Figure 8B), but a slightly higher ($p = 0.198$) concentration of total vesicular proteins per volume unit of packed RBCs (Figure 8C). Of note, a trend ($p = 0.053$ – 0.150) for lower levels of post-translational modifications, such as protein carbonylation and phosphorylation (Figure 8D–F, left panel), but overexpression of molecular chaperones (e.g., HSP70, DJ-1) and caspase-3 (Figure 8F, right panel), was detected by immunoblotting in EVs collected from βThal^+ units compared to the control.

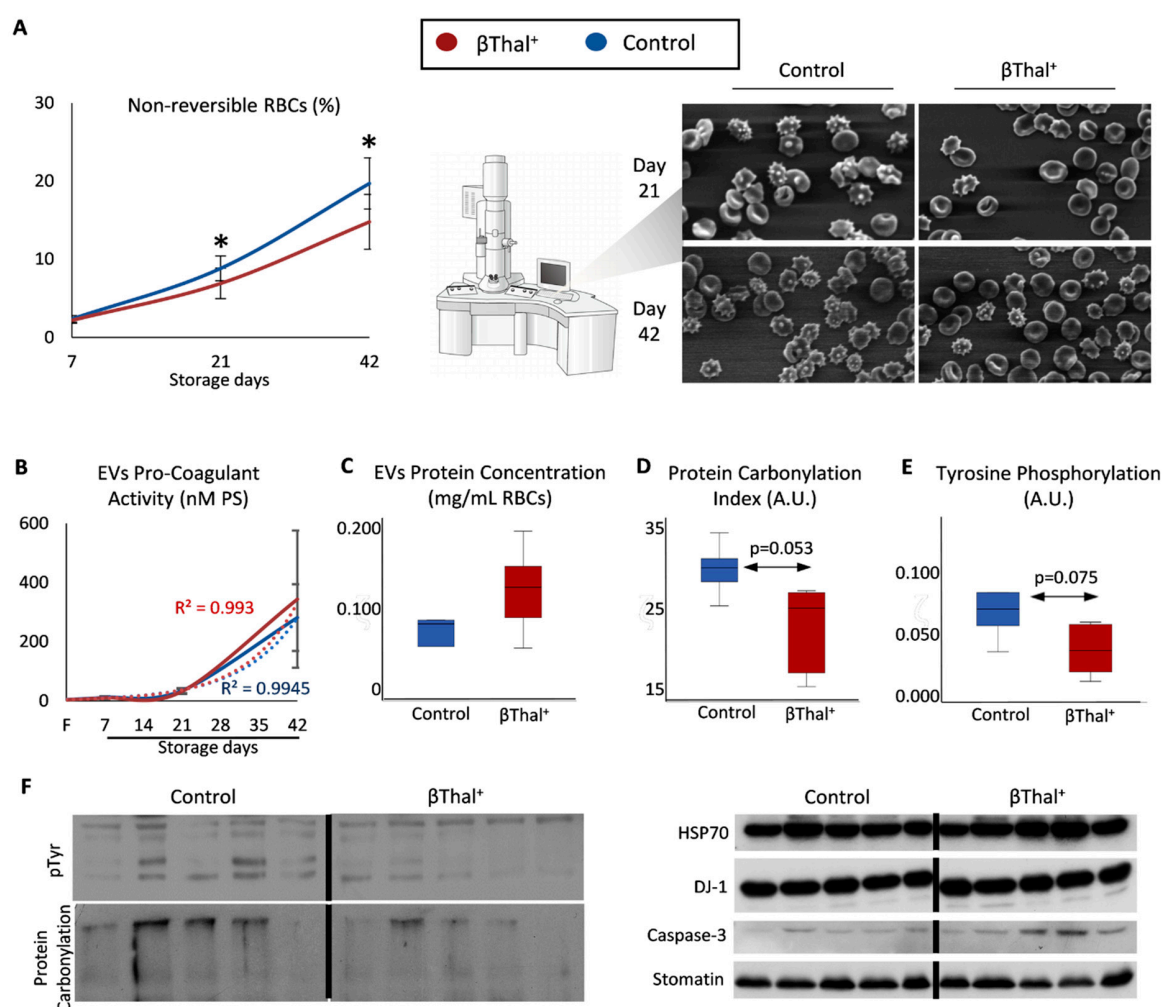


Figure 8. βThal^+ RBC shape modifications and storage EV characteristics. (A) Percentage of non-reversible shape modifications in βThal^+ and control RBC units throughout storage and representative micrographs captured by scanning electron microscopy ($n = 8$ per group; magnification: $1000\times$). (B–F) EV analysis ($n = 5$ per group, except procoagulant activity: $n = 8$ per group): procoagulant activity (B), total protein concentration (C), protein carbonylation (D), and protein tyrosine phosphorylation (E) levels in βThal^+ and control EVs. (F) Representative immunoblots of individual proteins or protein modifications showing a trend for different expression levels in βThal^+ vs. control EVs. Stomatin was used as the internal loading control. (*) $p < 0.05$ βThal^+ vs. controls; F: fresh blood.

Individual proteomics analysis of EVs ($n = 5$ per group) (Table S3) revealed enrichment in plasma proteins (e.g., complement, IgGs) and in several RBC cytosolic proteins, including Hb subunits, carbonic anhydrases, NADPH-dependent redox systems (catalase), and flavin reductase, compared to the RBC membrane of origin in both groups (Table S4). Moreover,

there were significant between-group differences, the top of which are shown in the heat map of Figure 9A. The β Thal⁺ EVs exhibited greater levels of molecular chaperones (HSPs, T-complex proteins), kinases (e.g., TAO kinase 3), calcium-related proteins (calpain, sorcin etc.), ATPases (e.g., Obg like ATPase 1), and enzymes like arginase-1 and flavin reductase (Figure 9B). Nevertheless, apolipoproteins, IgGs, and ceruloplasmin were less evident in β Thal⁺ EVs when compared to the controls (Figure 9B). Some interesting trends for higher (e.g., carbonic anhydrase, transferrin receptor, proteasome subunits) or lower (e.g., complement C3, hemopexin, coagulation factor V) levels of EV proteins in β Thal⁺ vs. the controls are shown in Table S5. Notably, (a) traces of non-muscle myosin IIA were detected only in β Thal⁺-derived EVs and (b) AHSP and ALIX (an exosome marker) were present in both groups' EVs (e.g., ALIX: 22 ± 13 vs. 16 ± 11 A.U., β Thal⁺ vs. control), while absent in RBC membranes.

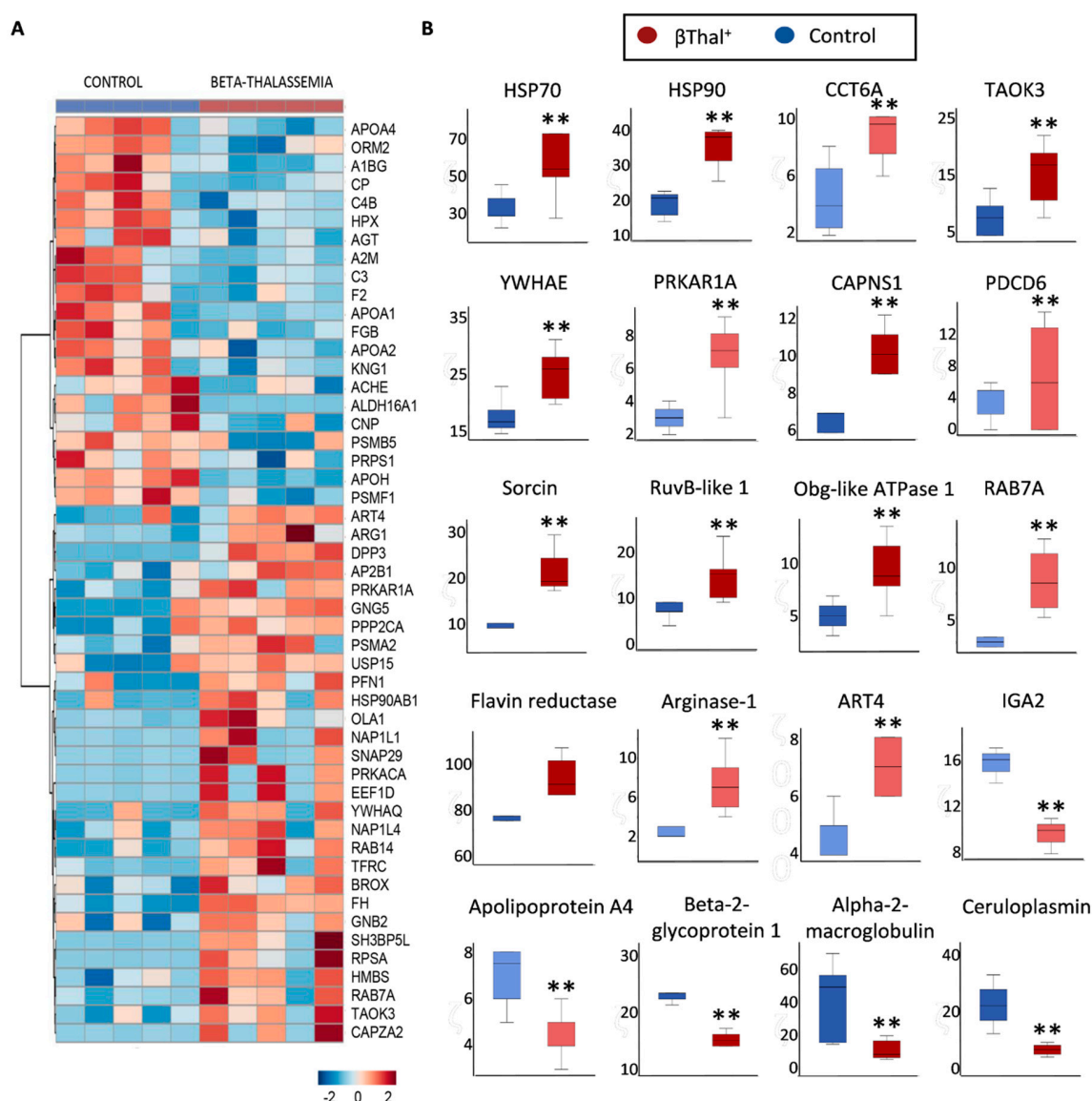


Figure 9. Proteomics analysis of storage EVs. **(A)** Heat map for proteins differing between β Thal⁺ and control vesicles ($n = 5$ per group). **(B)** Representative boxplots showing statistically significant variation in the levels of specific EV proteins between the two groups. Light and dark colors indicate proteins of low and high abundance, respectively. (**) $p < 0.05$ and fold > 1.25 β Thal⁺ vs. controls. Abbreviations: CCT6A: T-complex protein 1 subunit zeta; TAOK3: serine/threonine-protein kinase; YWHAQ: 14-3-3 protein epsilon; PRKAR1A: cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit; CAPNS1: calpain small subunit 1; PDCD6: programmed cell death protein 6; ART4: ecto-ADP-ribosyltransferase 4; IGA2: immunoglobulin alpha-2 heavy chain.

2.3. RBCs vs. EVs Networks

To find out RBC parameters (if any) that exhibited statistically significant correlations with EV phenotypes, we proceeded to compare β Thal⁺ vs. control RBC EVs via network analysis for late storage. Though EVs collected from the supernatant of day 42 units were the cumulative pool of vesicles released throughout storage, the exponential pattern of EV release with the storage time suggests that the old stored RBCs contributed the most to the final pool.

More than 1000 statistically significant ($p < 0.01$) correlations were detected in the control (~1000) and β Thal⁺ (~1350) RBC-EV networks (Figures 10 and 11, respectively; Table S6). Variation in the RBC membrane-bound small GTPases (90 vs. 140 connections, β Thal⁺ vs. control), proteasome subunits, activators (but not ubiquitin-related proteins; 163 vs. 100 connections, β Thal⁺ vs. control), and IgGs (70 vs. 28 connections, β Thal⁺ vs. control, respectively) were more interconnected to the target EV phenotypes that are common (e.g., RBC IgGs connections to EV Hb, acetylcholinesterase, and superoxide dismutase) or different between groups (e.g., RBC proteasome connections to Hb concentration exclusively in β Thal⁺ EVs) (Table S7). Even though the chaperone proteoforms prevailed in the RBC membrane over proteasome subunits, the latter were significantly more interconnected to EV features, including EV Hb, complement, redox metabolism, and protein tyrosine phosphorylation. Binding of small GTPases to the RBC membrane was further related to the vesicular content of heat shock proteins, IgGs and Alix in both groups, but also with the caspase 3 and total EV protein concentration in β Thal⁺ units. Finally, the IgGs load of the membrane in the stored RBCs was strongly connected to the peroxiredoxin protein kinases and protein tyrosine phosphorylation levels in β Thal⁺ units.

Without exception, (a) all of the skeletal proteins, (b) components participating in the vertical linkage of cytoskeleton to the lipid bilayer, (c) lipid-raft associated proteins, and (d) Ca²⁺-regulated proteins of the stored RBCs correlated significantly to EV phenotypes, in accordance with the established mechanisms of EV biogenesis. On the other hand, the release of vesicles by the β Thal⁺ RBCs seemed to be further connected to variation in the parameters not participating at all (e.g., storage, osmotic and oxidative hemolysis, lipid peroxidation, Hb concentration) or showing significantly fewer connections (e.g., MCV, thioredoxins, Ca²⁺-transporting ATPase, antioxidant capacity of the supernatant) in the control network. Notably, Hb concentration in EVs was negatively related to hemolysis parameters of stored RBCs. The kinases contributed significantly more connections compared to the phosphatases in the networks, however, significantly more phosphatases were detected in the β Thal⁺ RBC/EV one (Table S7).

Regarding the “targets” of the RBC features in EVs, apolipoprotein proteoforms absorbed by the residual plasma of the unit constituted the highest connectivity EV hub (where the hub is a parameter with > 15 connections to RBC parameters) in both networks (Table S8). Six additional smaller EV hubs (including EV Hb, carbonic anhydrase, IgGs, and small GTPases) were found in common in the two networks, though at variable connectivity degrees (e.g., twice the number of Hb connections in the β Thal⁺ vs. control EVs). As expected, certain EV hubs characterized each network individually. Redox and stress-associated EV components (e.g., flavin reductase, thioredoxin, peroxiredoxins, α -hemoglobin stabilizing protein, complement regulators) characterized the β Thal⁺ network as opposed to major membrane components (spectrins, glycophorin A), glutathione hydrolase, heat shock proteins, and complement proteoforms found predominantly among the hubs of the control network. The exosomal ALIX protein correlated with the RBC membrane content of small GTPases Rab and redox homeostasis parameters, such as supernatant antioxidant capacity, lipid peroxidation (in β Thal⁺), and glutathione transferase (in control).

The levels of Hb release through vesicles were found to be significantly related to calcium-related factors in both RBC groups, but also to proteasome components and hemolysis levels (as mentioned above) in β Thal⁺ RBCs. Those of complement regulators (β Thal⁺ hub) in EVs were correlated to RBC PS percentage, storage hemolysis, proteasome

and IgG proteoforms. The vesicular α -hemoglobin stabilizing protein (AHSP), flavin reductase, and clusterin levels were found to be highly interconnected with the major RBC membrane proteins, Hb, proteasome subunits, lipid peroxidation, and antioxidant capacity of the supernatant only in the β Thal⁺ network (Table S8).

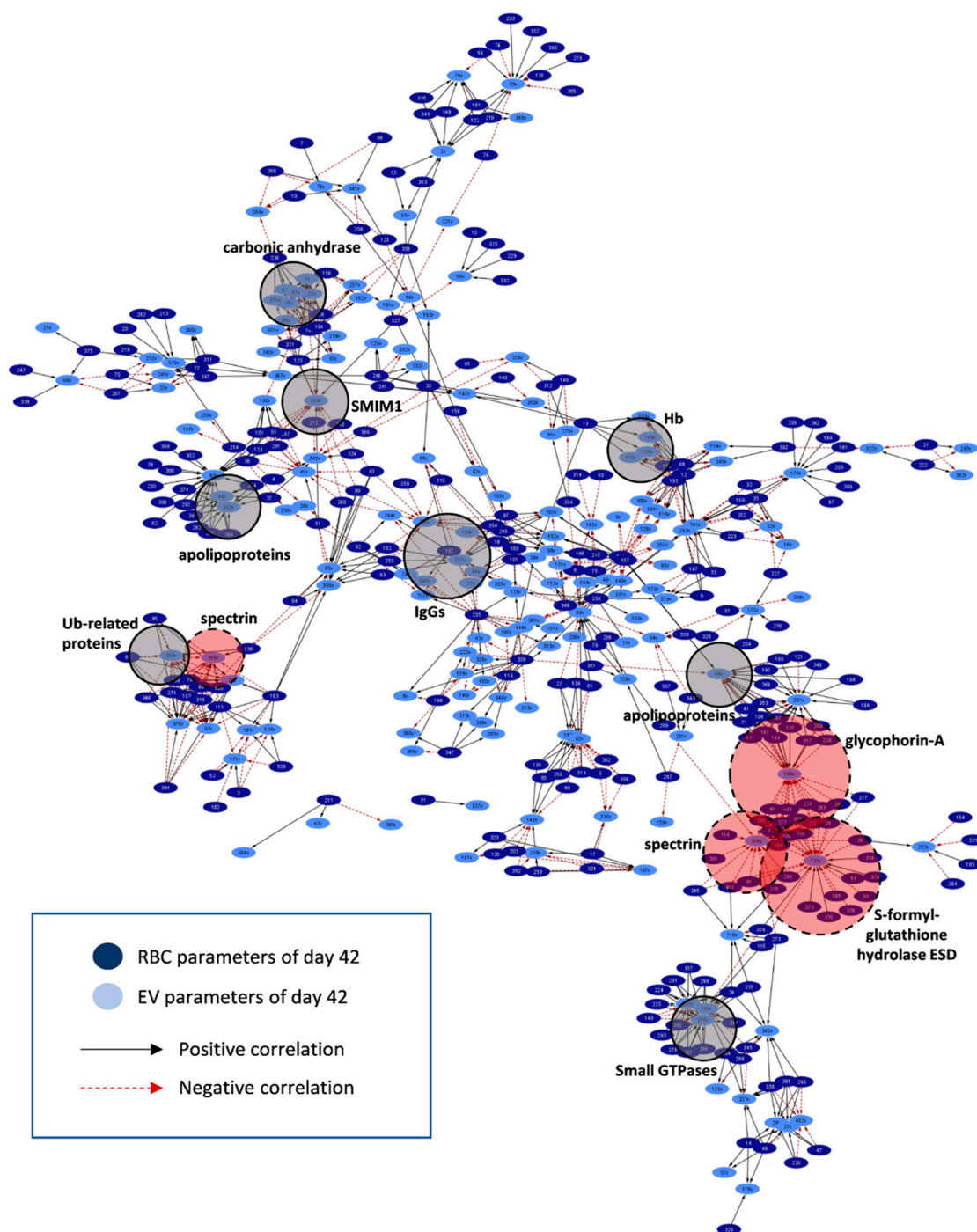


Figure 10. Network connecting RBC to EV parameters in control RBC units on day 42 of storage. Interactome based on the correlation coefficient R values between parameters of stored RBCs and EVs in late storage. The length of each edge is inversely proportional to the R value (the shorter the edge, the higher the R value). All connections are statistically significant at $p < 0.01$. Solid light grey circles focus on high connectivity hubs found in both donor groups. Dashed red circles highlight representative high connectivity hubs that predominate in the control network. For abbreviations, see Table S6.

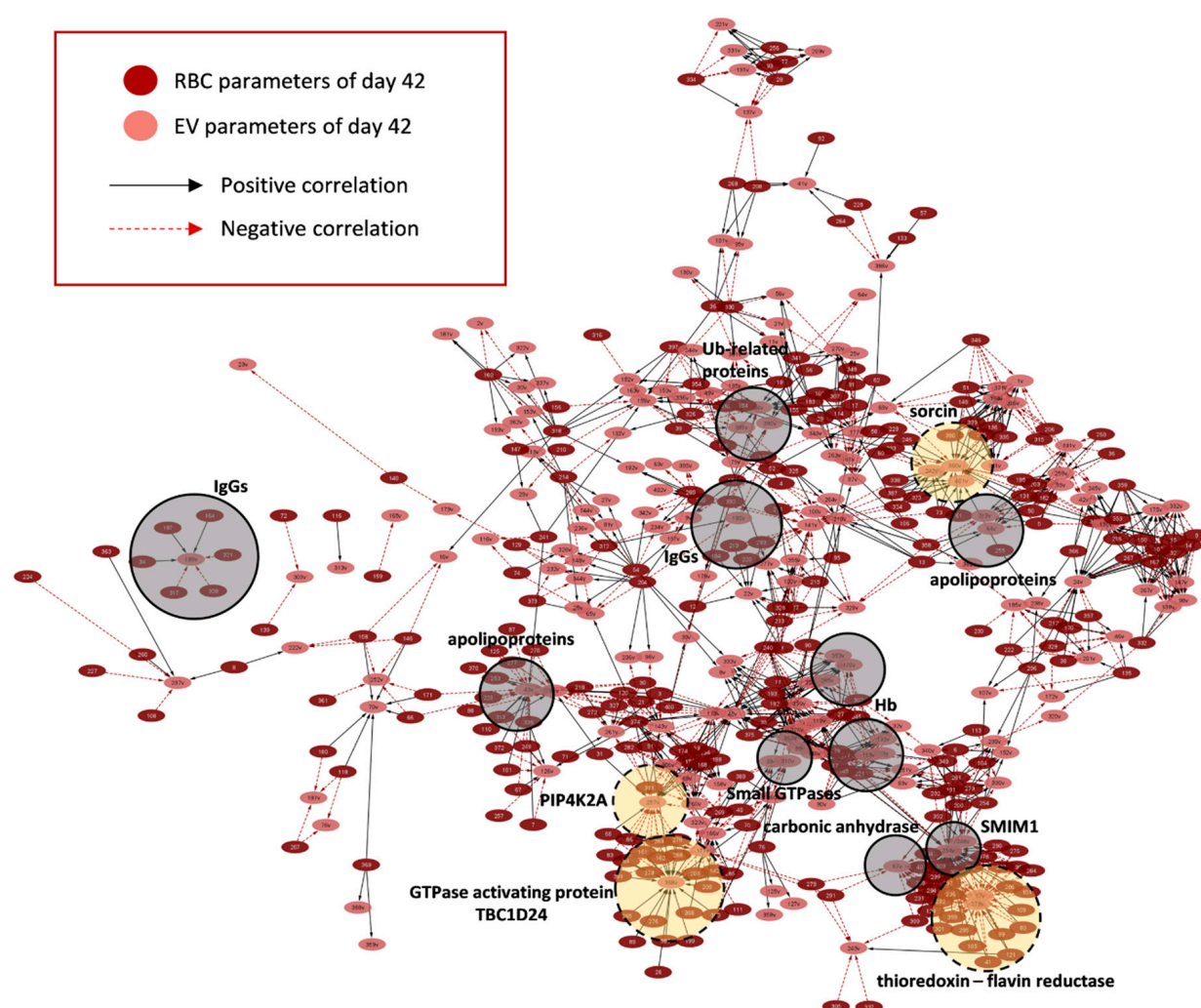


Figure 11. Network connecting RBC to EV parameters in β Thal⁺ RBC units on day 42 of storage. Interactome based on the correlation coefficient R values between parameters of stored RBCs and EVs in late storage. The length of each edge is inversely proportional to the R value (the shorter the edge, the higher the R value). All connections are statistically significant at $p < 0.01$. Solid light grey circles focus on high connectivity hubs found in both donor groups. Dashed yellow circles highlight representative high connectivity hubs that predominate in the β Thal⁺ network. For abbreviations, see Table S6.

3. Discussion

Here, we report the first proteomic dataset comparing the RBC membrane and EVs from β Thal⁺ donors vs. control throughout storage in leuko-reduced CPD-SAGM units. The data highlight beta-thalassemia signatures on RBCs and how they are modified during ex vivo aging. Several modifications have not been reported so far in beta-thalassemia minor. Their detection was based on an advanced proteomics analysis of single replicates ($n = 12$ per group) and validation by targeted immunoblotting experiments. Of note, proteomic findings are consistent with the physiological features of the same RBC units, such as RBC morphology and membrane vesiculation (current work), as well as hemolysis and metabolism data [5]. The findings are relevant to transfusion medicine and beyond, by providing the basis for a more detailed exploration of RBC physiology and aging processes, in vivo and ex vivo, in beta-thalassemia minor.

The membrane composition of young stored β Thal⁺ RBCs was more indicative of the thalassemic background compared to old stored cells, as it is closer to the in vivo status. Indeed, lower content of integral and skeletal proteins has been reported in the RBCs of HbE/ β Thal patients [12], suggesting changes in the architecture of the skeleton

and its adherence to the membrane. Though detected in simple heterozygous state, these shortcomings are not associated with deformability defects, because the mechanical and osmotic hemolysis of βThal^+ RBCs were found to be better than the average control [5]. Upregulation of myosin levels may account for these phenomenally paradoxical findings. As a probable result of different reticulocyte maturation in beta thalassemia [21], it has been considered a cellular volume regulator in the microcytic βThal^+ RBCs [22]. βThal^+ membrane enrichment in several non-muscle myosin proteoforms might contribute to structural integrity, deformability, and resistance to stress [23], including storage-induced stress, since the expression of structural proteins did not reduce with storage time, as opposed to control RBCs. Of note, both regulators of myosin activity, namely kinases/protein phosphorylation and calmodulin, are also overexpressed in the membrane of βThal^+ RBCs [24]. Stomatin, which was observed for the first time to be downregulated in βThal^+ RBCs, followed the same pattern of variation during storage (no significant reduction), resulting (along with flotillins and synexin) in the enrichment of old stored βThal^+ RBCs in lipid raft components that regulate the lateral organization of the membrane. On the other side, no higher membrane binding of Hb (a typical feature of thalassemic RBCs [25]) was found in stored βThal^+ RBCs. All of these protein diversifications may account for the better maintenance of stored RBC morphology in βThal^+ compared to the control.

Several deregulated proteins in βThal^+ RBCs fall in the group of molecular chaperones, proteasome proteins, redox regulators, and free radical scavengers, reflecting proteotoxic stress and activated antioxidant defense. Among these, glutathione transferase, flavin reductase, and aldehyde dehydrogenase were included. The potentially toxic unstable free α -globin chains in βThal^+ RBCs can be eliminated by functionally interconnected protein quality control pathways [26]. It has been suggested that chaperones may be involved in α -globin refolding or targeting for degradation to proteasome [12,27–29], and, consequently, numerous molecular chaperones are upregulated in βThal^+ trait erythroblasts in mice.

Upregulation of proteome stress markers in the βThal^+ RBC membrane at early storage is probably related to higher baseline levels, but many of them were further upregulated later on. Thus, overexpression is the result of both thalassemia- and storage-related [30] proteome and oxidative stresses that are, however, successfully treated, as judged by the low levels of oxidative modifications in βThal^+ RBC membrane proteins and lipids [5]. Moreover, the function of those chaperones is probably unrelated to α -globin chain toxicity, because normal levels of Hb and α -Hb stabilizing chaperone AHSP [12] were found in the membrane and EVs, respectively. Of note, in platelets, heat shock proteins form large complexes with myosin-targeting subunits [31]. Finally, the protein argonaute-2 that seemed to be an abundant protein of the stored RBC membrane, especially in βThal^+ RBCs, forms functional complexes with several miRNAs that are differentially expressed in relation to the storage lesion [32].

Downregulation of several transporters in the membrane of βThal^+ RBCs may be associated with the low levels of the scaffolding protein stomatin [33]. Some of them participate in the regulation of erythropoiesis [34] and in the membrane response to hypoxia [35]. Notably, most of them transport substances directly or indirectly involved in N_2 metabolism. ENT1, for instance, is a key purinergic component that mediates nucleoside (especially adenosine) uptake by RBCs, while the mechanically activated cation channel piezo-1 modifies the kinetics of ATP release under shear conditions in the vasculature [36]. ENT1 levels are regulated post-translationally in response to exposure to hypoxia, and ultimately contribute to RBC metabolic reprogramming in response to oxidant/hypoxic stress, such as at high altitude or in models of intrauterine growth restriction [37,38]. In the same context, enzymes participating in the urea cycle, purine synthesis, and amino acid metabolism had significantly increased levels in βThal^+ vs. control RBCs at early storage or throughout it (see below). Recent metabolomics analyses revealed alterations in the purine oxidation pathway in circulating and stored βThal^+ RBCs [5], while malaria parasites that are purine auxotrophic import purines via their ENT1 homologue [39]. On the other side, while upregulation of monocarboxylate transporter and Na^+/K^+ ATPase is suggestive of

modified fluxes, previously seen in sickle cell trait and disease [40,41], in β Thal⁺ RBCs, it is not associated with increased K⁺ and lactate efflux, nor with RBC dehydration [5], probably due to the mild excess/precipitation of free α -globin chains, and thus, to manageable levels of oxidative stress [42].

Among the enzymes significantly upregulated in the membrane of β Thal⁺ RBCs throughout storage was arginase-1. As the final enzyme in the urea cycle, it is responsible for the hydrolysis of L-arginine to urea and L-ornithine. Arginase-1 competes with the nitric oxide synthase (NOS) that also uses L-arginine as a substrate to produce and release the cardiovascular protective nitric oxide (NO) in the bloodstream [43]. Comparing the two enzymes, NOS is more redox-sensitive than arginase [44], and may be readily inactivated during storage. Increased arginase/NOS activity was indeed observed in human (and non-human primate) RBCs as a function of storage duration through arginine tracing experiments [45]. Thalassemia is characterized by dysregulated arginine metabolism and increased arginase activity in plasma, probably leading to low NO bioavailability and cardiovascular dysfunction [46,47]. Moreover, increased arginase expression and activity (at the expense of NO synthesis) were detected in RBCs from patients with diabetes [48] and in the plasma of recipients of aged stored autologous RBCs [49]. Most of the RBC arginase-1 is bound to the membrane *in vivo* through association with flotillin-1 [50], and this binding increases its enzymatic activity. The currently reported proteomics analysis is consistent with the modulation of arginine and glutamine (an arginine precursor) metabolism recently observed in fresh and stored β Thal⁺ RBCs, including ornithine to arginine and citrulline to arginine ratios [5]. These markers of arginase activity in stored RBCs are indicative of the capacity of transfused RBCs to respond to acetylcholine-induced vasodilation [49]. The low propensity of stored β Thal⁺ RBCs to hemolysis [5] and the low levels of arginase-1 in both storage EVs and RBC units' supernatant (manuscript in preparation) suggest that upregulation of the enzyme in β Thal⁺ RBCs is not associated with increased arginase-1 release. For the β Thal⁺ RBCs *per se*, however, arginine consumption [5] due to increased expression of arginase-1 would repress the NOS-mediated NO synthesis. Interestingly, in pathologies characterized by increased RBC arginase-1 activity, like diabetes, there is also increased oxidative stress and ROS generation. Moreover, the detrimental effects of arginase-1 enriched RBCs on vascular cells (upregulation of arginase-1 and dysfunction) are ROS-dependent [48]. In contrast, stored β Thal⁺ RBCs show lower oxidative defects in lipids and proteins, lower ROS generation at late storage, and an enhanced antioxidant and "repair or destroy" arsenal in their membrane.

Increased arginase activity may be the result of mild, sustained oxidative stress in β Thal⁺ traits, as observed in normal aging [51], and a compensatory defense mechanism against the NOS-associated oxidative/nitrosative stress. In either case, it may contribute to the resistance of β Thal⁺ RBCs to malaria infection, since the host arginine (intracellular and introduced by RBC amino acid transporters) is metabolized by the parasite to sustain its metabolic needs [52,53].

In fact, this feature is only a part of the general context of proteome diversifications potentially related to β Thal⁺ RBC resistance to malaria infection. First of all, the proteome of the β Thal⁺ membrane is characterized by downregulation of several parasite receptors, including band 3, glycophorin C, CD44, complement receptor-1 (CR1), and semaphorin-7A [54,55]. The prevalence of the O blood group among our donors [5,56] and variation in other determinants of malaria risk, including the globin chains *per se*, redox regulators, the protein GNAS [57], and several kinases—potentially involved in protein hyperphosphorylation and thereby membrane destabilization observed in malaria protection [58]—probably work in the same direction. For instance, piezo-1 and beta-spectrin hyperphosphorylation by host kinases is an early RBC response to merozoite attachment on RBCs before parasite entry [59]. Increased activation of protein kinases and protein phosphorylation has been previously reported in erythroblasts of patients with β 0-thalassaemia/Hb E disease [60]. Upregulation of argonaute-2 may be also related to the innate resistance of β Thal⁺ RBCs to

malaria infection; the transfer of argonaute-2 from malaria-infected RBCs to recipient cells through EVs downregulates the expression of essential malaria antigens [61].

The modified expression of membrane receptors, antigens, and IgGs in stored β Thal⁺ RBCs compared to the control may be clinically relevant. Some of them, like the ERMAP-related Scianna blood group antigens [62], the SMIM-1-related Vel blood group [63], the CD44 receptor (AnWj blood group antigen) [64], and semaphorin-7A, are clinically involved in the immunohematology of hemolytic transfusion reactions, adhesion processes, macrophage responses, and erythrophagocytosis. For example, Semaphorin-7A, a ligand for the platelet receptor glycoprotein Ib, enhances thrombo-inflammation in myocardial ischemia-reperfusion injury [65]. Moreover, SMIM-1, which is implicated in the physiology of erythroid cells [66], carries a high-frequency blood group antigen able to induce aggressive hemolytic activity [63]. Finally, the AnWj blood group antigen on the CD44 protein is the RBC receptor of *Haemophilus influenzae*. Apparently, deficiency in these surface molecules renders β Thal⁺ RBCs a safer choice for transfusion therapy.

The proteomics profiles of EVs accumulated in β Thal⁺ and control RBC units throughout storage were also highly revealing. As expected [67], both groups' EVs were enriched in Hb, complement, and carbonic anhydrase and redox proteoforms, including catalase and peroxiredoxins. Of note, the exosome-related ALIX protein was also detected in EVs, suggesting either the presence of exosomes in the residual plasma of the units or the participation of ALIX in the membrane vesiculation of stored RBCs. Both contingencies deserve further investigation. In terms of between-group variance, the composition of the β Thal⁺ EVs reflected, in part, that of the RBCs of origin, since there were several upregulated (chaperones/proteasome, flavin reductase, arginase-1, etc.) or downregulated (e.g., CD44) components. Moreover, porphobilinogen deaminase, sorcin, transferrin receptor, and myosin proteoforms are selectively sorted to β Thal⁺ EVs. Myosin and biliverdin reductase were identified as thalassemia-specific components in the plasma microparticles of β -thal/HbE patients [17]. According to our results, biliverdin reductase is a minor component of storage EVs, independently of the thalassemia background.

The release of slightly more vesicular proteins by β Thal⁺ RBCs showing better preservation of cell morphology under storage seems paradoxical, but it is plasmatic, because the volume unit of the microcytic β Thal⁺ RBCs contains more cells than the control. As opposed to the high levels of PS⁺ microparticles in the plasma of β -thal/HbE patients [17], the β Thal⁺ storage EVs exhibited normal levels of procoagulant activity. Moreover, they contained lower levels of protein stress markers (carbonylation, Tyr-phosphorylation) and removal signals (IgGs, complement), suggesting prolonged circulation time compared to control EVs. Finally, they contain lower levels of plasma components exerting antioxidant (e.g., apolipoprotein A-IV and hemopexin implicated in free heme detoxification) and anti-coagulation (beta-2 glycoprotein, α 2-macroglobulin) activities, in addition to coagulation factor V and the oxireductase ceruloplasmin that is involved in iron metabolism and transfer across the membrane.

Network analysis revealed interesting connections of membrane vesiculation with hemolysis and the membrane proteome of β Thal⁺ RBCs. The degree of protein (mainly Hb) release by β Thal⁺ RBCs was positively related not only to the membrane levels of IgGs and lipid raft/ Ca^{2+} -associated proteins, as expected, but also to variation in the erythroid cell receptor ERMAP that is upregulated in β Thal⁺ RBCs. On the contrary, protein loss through membrane vesiculation exhibited negative correlations with the membrane levels of proteasome, regulators of redox activity, small GTPases, and especially with the oxidative and storage hemolysis of parental β Thal⁺ RBCs, highlighting the homeostatic role of vesiculation in membrane modulation and damage control. The removal of potentially dangerous compounds and activators of hemolysis by RBCs renders them less susceptible to storage and oxidative hemolysis. The currently reported networks contain hundreds of potentially informative correlations between EV and RBC features that deserve investigation by targeted studies. Some of them are expected to shed light on the emerging role of membrane proteasomes in the physiology of RBCs.

4. Materials and Methods

4.1. Biological Samples

Twenty-four (12 β Thal⁺ and 12 control) blood units of packed RBCs in citrate-phosphate-dextrose (CPD)/saline-adenine-glucose-mannitol (SAGM) were stored for 42 days at 4 °C, and were sampled aseptically on a weekly basis. The beta-thalassemia trait was confirmed by Hb electrophoresis and molecular identification of mutations. The study was approved by the Ethics Committee of the Department of Biology, School of Science, NKUA. Investigations were carried out upon donor consent, in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

4.2. Isolation of Membranes and Extracellular Vesicles

Hypotonic lysis was performed to isolate RBC membranes. Briefly, RBCs were lysed with hypotonic sodium phosphate buffer containing protease inhibitors, and the precipitated membranes were washed to remove the excess Hb. To evaluate the extent of tyrosine phosphorylation, stored RBCs ($n = 3$ for each donor group) were treated with 2.0–2.5 mmol/L ortho-vanadate, a known tyrosine phosphatase inhibitor, for 2 h at 37 °C, as extensively described before [68]. Untreated RBCs were used as controls, and membrane isolation was performed as described above.

At late storage, vesicles were isolated from the supernatant of the RBC units ($n = 5$ of each donor group) by high-speed centrifugation at 4 °C. Firstly, RBCs were centrifuged at $2000 \times g$. Their supernatants were ultra-centrifuged at $37,000 \times g$ for 1 h, after passing through sterile 0.8 μ m nitrocellulose filters (Millipore, Carrigtwohill, County Cork, Ireland). The pellet of vesicles was then resuspended in PBS and washed under the same conditions. Protease inhibitors were added to vesicles and their protein concentration was determined by the Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA). The total vesicular protein per RBC unit volume was used to assess vesiculation, as previously described [67].

4.3. Western Blot Analysis

Equal concentrations (12–25 μ g) of isolated RBC membranes ($n = 7$ per group) or vesicles ($n = 5$ per group) were loaded in Laemmli gels and transferred to nitrocellulose membranes. Primary monoclonal and polyclonal antibodies for a variety of proteins were used, along with species-specific secondary antibodies conjugated with HRP. Antibodies to the following proteins were used: band 3 (B 9277) from Sigma-Aldrich (Munich, Germany); ubiquitin (BML-PW8810) from Enzo Life Sciences (New York, NY, USA); HSP70 (sc-1060R) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); and caspase-3 (#9662) and DJ-1 (#5933) from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Antibodies against stomatin and 4.1R were kindly provided by Prof. R. Prohaska (Institute of Medical Biochemistry, University of Vienna, Austria) and Prof. J. Delaunay (Laboratoire d' Hématologie, d' Immunologie et de Cytogénétique, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France), respectively. The immunoblots were developed through chemiluminescence, and the bands were quantified by scanning densitometry (Gel Analyzer v.1.0, Athens, Greece). To estimate oxidative modifications of membrane and vesicular proteins, the Oxyblot kit was used, per the manufacturer's specifications (Oxyblot, Millipore, Chemicon, Temecula, CA, USA). The proteome carbonylation index (PCI) was then calculated [68].

4.4. Procoagulant Activity of Extracellular Vesicles

A functional ELISA assay kit (Zymuphen MP-activity, Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, France) was used to estimate the procoagulant activity of extracellular vesicles ($n = 8$ per group), per the manufacturer's specifications and as previously described [69].

4.5. Scanning Electron Microscopy

Samples of RBCs ($n = 8$ per group) were firstly fixed with 2% glutaraldehyde and then with 1% osmium tetroxide in a 0.1 mol/L sodium cacodylate buffer, with a pH of 7.4. Following dehydration in a gradient of ethanol concentrations, the cells were coated with

gold-palladium (Tousimis Samsputter-2a, Rockville, Maryland, USA) and were microscopically observed (Philips SEM515). Electron micrographs (magnification $\times 1000$) were taken at randomly chosen fields, and the cell shapes were characterized as irreversible or not. A blind evaluation of at least 2000 cells was performed for each sample.

4.6. Proteomics Analysis

Samples (200 ng each) were loaded onto individual Evotips for desalting and then washed with 20 μL of 0.1% formic acid, followed by the addition of 100 μL of storage solvent (0.1% formic acid) to keep the Evotips wet until analysis. The Evosep One system was coupled to a timsTOF Pro mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Data were collected over an m/z range of 100–1700 for MS and MS/MS on the timsTOF Pro instrument using an accumulation and ramp time of 100 ms. Post-processing was performed with PEAKS studio (Version X+, Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON, USA). Graphs and statistical analyses were prepared with GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and GENE E (Broad Institute, Cambridge, MA, USA) [70].

4.7. Statistical Analysis and Network Preparation

Statistical analysis was performed by using the statistical package SPSS Version 22.0 (IBM Hellas, Athens, Greece, administered by NKUA). After testing for normal distribution and the presence of outliers (Shapiro–Wilk test and detrended normal Q–Q plots), the independent t -test was used for the evaluation of differences between groups. Correlation between the parameters of stored RBC and EVs was assessed with Pearson's or Spearman's tests. The R values were used for the construction of biological networks (Cytoscape 3.7.2, San Diego, CA, USA). Significance was accepted at $p < 0.05$ or $p < 0.01$ (in the case of correlation analysis).

5. Conclusions

The RBCs of eligible βThal^+ donors are characterized by a low percentage of irreversible spherocytic modifications compared to the control. Their membrane proteome contains several beta thalassemia signatures related to the expression of structural, lipid raft, chaperoning, proteasome, redox, transport, antigenic, and enzyme components, including the upregulation of myosin, arginase-1, glutathione transferase, and protein kinases, but downregulation of transporters involved in nitrogen, purine, and amino acid metabolism. Some of them are reported for the first time in βThal^+ RBCs. The overall picture is that of an efficient cellular response to a mild alpha-globin excess and oxidative/proteome stress functionally connected to resistance to malaria infection. Storage has a balancing (e.g., Na^+/K^+ transporter) or augmenting (e.g., HSPs) effect on these modifications, or produces new ones, including excess of skeletal proteins. The βThal^+ EVs have normal procoagulant activity, and their composition is related in part to that of parental RBCs. Network analysis revealed interesting connections of membrane vesiculation with proteome control modulators of the RBC membrane, as well as with hemolysis of βThal^+ RBCs. Our findings shed light on the donor variation effect on RBC storability and give hints for potential post-transfusion implications. Moreover, they might provide the basis for a more detailed exploration of RBC physiology and aging processes that occur in beta thalassemia carriers who are eligible for blood donation. Functional aspects of the presently identified variations, including proteostasis, degradome, and other important modifications that fill out the protein profile of βThal^+ RBCs during storage, are currently underway in our labs.

Supplementary Materials: Supplementary tables are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/7/3369/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, V.L.T., A.D. and M.H.A.; Methodology, M.D., K.C.H., A.D. and M.H.A.; Formal Analysis, V.L.T., A.T.A., K.C.H. and A.D.; Investigation, V.L.T., A.T.A., M.D. and D.G.K.; Resources, M.D., K.S., K.C.H., A.D., A.G.K. and M.H.A.; Data Curation, V.L.T., A.T.A., K.C.H., A.D. and M.H.A.; Writing—original draft preparation, V.L.T., A.T.A., A.D., A.G.K. and M.H.A.; Writing—review & editing, M.D., D.G.K., K.S., I.S.P. and K.C.H.; Visualization, V.L.T., A.T.A. and A.D.; Supervision, A.D. and M.H.A.; Project Administration, V.L.T., A.D. and M.H.A.; Funding Acquisition, V.L.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project has received funding from the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI) and the General Secretariat for Research and Technology (GSRT), under grant agreement No 2032.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved (20/12/2014) by the Ethics Committee of the Department of Biology, School of Science, NKUA (IRB301214/2015).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available online at www.mdpi.com/xxx/s1 (Supplementary Tables S1–S3).

Acknowledgments: The authors would like to thank the graduate students Vassiliki Arvaniti, Vassiliki Kourkouva and Christos Christogeorgos for their kind participation in part of the experiments and data analysis reported in this study, which were performed in the context of their diploma theses in the Department of Biology, NKUA. In addition, the authors would like to thank Athanasios Velentzas for his valuable assistance in the electron microscopy experiments.

Conflicts of Interest: Though unrelated to the contents of this manuscript, A.D. declares that he is a founder of Omix Technologies Inc. and Altis Biosciencens LLC and a consultant for Hemanext Inc. All other authors declare no conflicts of interest.

References

1. D'Alessandro, A.; Fu, X.; Reisz, J.A.; Stone, M.; Kleinman, S.; Zimring, J.C.; Busch, M.; Recipient, E.; Donor Evaluation, S., III. Ethyl glucuronide, a marker of alcohol consumption, correlates with metabolic markers of oxidant stress but not with hemolysis in stored red blood cells from healthy blood donors. *Transfusion* **2020**, *60*, 1183–1196. [\[CrossRef\]](#)
2. Stefanoni, D.; Fu, X.; Reisz, J.A.; Kanas, T.; Nemkov, T.; Page, G.P.; Dumont, L.; Roubinian, N.; Stone, M.; Kleinman, S.; et al. Nicotine exposure increases markers of oxidant stress in stored red blood cells from healthy donor volunteers. *Transfusion* **2020**, *60*, 1160–1174. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Tzounakas, V.L.; Anastasiadi, A.T.; Drossos, P.V.; Karadimas, D.G.; Valsami, S.E.; Stamoulis, K.E.; Papassideri, I.S.; Politou, M.; Antonelou, M.H.; Kriebardis, A.G. Sex-related aspects of the red blood cell storage lesion. *Blood Transfus.* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
4. D'Alessandro, A.; Fu, X.; Kanas, T.; Reisz, J.A.; Culp-Hill, R.; Guo, Y.; Gladwin, M.T.; Page, G.; Kleinman, S.; Lanteri, M.; et al. Donor sex, age and ethnicity impact stored red blood cell antioxidant metabolism through mechanisms in part explained by glucose 6-phosphate dehydrogenase levels and activity. *Haematologica* **2020**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Tzounakas, V.L.; Anastasiadi, A.T.; Stefanoni, D.; Cendali, F.; Bertolone, L.; Gamboni, F.; Dzieciatkowska, M.; Rousakis, P.; Vergaki, A.; Soulakis, V.; et al. beta-thalassemia minor is a beneficial determinant of red blood cell storage lesion. *Haematologica* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
6. Teran, M.M.; Monaco, M.E.; Lazarte, S.S.; Haro, C.; Ledesma Achem, E.; Asensio, N.A.; Isse, B.A. Genetic Regulation of Redox Balance in beta-Thalassemia Trait. *Hemoglobin* **2020**, *44*, 122–127. [\[CrossRef\]](#)
7. Fortier, N.; Snyder, L.M.; Garver, F.; Kiefer, C.; McKenney, J.; Mohandas, N. The relationship between in vivo generated hemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane rigidity. *Blood* **1988**, *71*, 1427–1431. [\[CrossRef\]](#)
8. Pantaleo, A.; De Franceschi, L.; Ferru, E.; Vono, R.; Turrini, F. Current knowledge about the functional roles of phosphorylative changes of membrane proteins in normal and diseased red cells. *J. Proteom.* **2010**, *73*, 445–455. [\[CrossRef\]](#)
9. Ficarra, S.; Tellone, E.; Giardina, B.; Scatena, R.; Russo, A.; Misiti, F.; Clementi, M.E.; Colucci, D.; Bellocchio, E.; Lagana, G.; et al. Derangement of erythrocytic AE1 in beta-thalassemia by caspase 3: Pathogenic mechanisms and implications in red blood cell senescence. *J. Membr. Biol.* **2009**, *228*, 43–49. [\[CrossRef\]](#)
10. Olivieri, O.; De Franceschi, L.; Capellini, M.D.; Girelli, D.; Corrocher, R.; Brugnara, C. Oxidative damage and erythrocyte membrane transport abnormalities in thalassemias. *Blood* **1994**, *84*, 315–320. [\[CrossRef\]](#)
11. Gunn, R.B.; Silvers, D.N.; Rosse, W.F. Potassium permeability in -thalassemia minor red blood cells. *J. Clin. Investig.* **1972**, *51*, 1043–1050. [\[CrossRef\]](#)
12. Bhattacharya, D.; Saha, S.; Basu, S.; Chakravarty, S.; Chakravarty, A.; Banerjee, D.; Chakrabarti, A. Differential regulation of redox proteins and chaperones in HbEbeta-thalassemia erythrocyte proteome. *Proteom. Clin. Appl.* **2010**, *4*, 480–488. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

13. Levin, C.; Koren, A.; Rebibo-Sabbah, A.; Koifman, N.; Brenner, B.; Aharon, A. Extracellular Vesicle Characteristics in beta-thalassemia as Potential Biomarkers for Spleen Functional Status and Ineffective Erythropoiesis. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Aharon, A.; Rebibo-Sabbah, A.; Tzoran, I.; Levin, C. Extracellular vesicles in hematological disorders. *Rambam Maimonides Med. J.* **2014**, *5*, e0032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Manakeng, K.; Prasertphol, P.; Phongpao, K.; Chuncharunee, S.; Tanyong, D.; Worawichawong, S.; Svasti, S.; Chaichompoo, P. Elevated levels of platelet- and red cell-derived extracellular vesicles in transfusion-dependent beta-thalassemia/HbE patients with pulmonary arterial hypertension. *Ann. Hematol.* **2019**, *98*, 281–288. [[CrossRef](#)]
16. Kittivorapart, J.; Crew, V.K.; Wilson, M.C.; Heesom, K.J.; Siritanaratkul, N.; Toye, A.M. Quantitative proteomics of plasma vesicles identify novel biomarkers for hemoglobin E/beta-thalassemic patients. *Blood Adv.* **2018**, *2*, 95–104. [[CrossRef](#)]
17. Chaichompoo, P.; Kumya, P.; Khowawisetsut, L.; Chiangjong, W.; Chaiyarit, S.; Pongsakul, N.; Sirithanaratanakul, N.; Fucharoen, S.; Thongboonkerd, V.; Pattanapanyasat, K. Characterizations and proteome analysis of platelet-free plasma-derived microparticles in beta-thalassemia/hemoglobin E patients. *J. Proteom.* **2012**, *76*, 239–250. [[CrossRef](#)]
18. Masuda, T.; Mori, A.; Ito, S.; Ohtsuki, S. Quantitative and targeted proteomics-based identification and validation of drug efficacy biomarkers. *Drug Metab. Pharm.* **2021**, *36*, 100361. [[CrossRef](#)]
19. Alexovic, M.; Urban, P.L.; Tabani, H.; Sabo, J. Recent advances in robotic protein sample preparation for clinical analysis and other biomedical applications. *Clin. Chim. Acta* **2020**, *507*, 104–116. [[CrossRef](#)]
20. Minetti, G.; Achilli, C.; Perotti, C.; Ciana, A. Continuous Change in Membrane and Membrane-Skeleton Organization During Development From Proerythroblast to Senescent Red Blood Cell. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 286. [[CrossRef](#)]
21. Liu, J.; Guo, X.; Mohandas, N.; Chasis, J.A.; An, X. Membrane remodeling during reticulocyte maturation. *Blood* **2010**, *115*, 2021–2027. [[CrossRef](#)]
22. Moura, P.L.; Hawley, B.R.; Mankelov, T.J.; Griffiths, R.E.; Dobbe, J.G.G.; Streekstra, G.J.; Anstee, D.J.; Satchwell, T.J.; Toye, A.M. Non-muscle myosin II drives vesicle loss during human reticulocyte maturation. *Haematologica* **2018**, *103*, 1997–2007. [[CrossRef](#)]
23. Smith, A.S.; Nowak, R.B.; Zhou, S.; Giannetto, M.; Gokhin, D.S.; Papoin, J.; Ghiran, I.C.; Blanc, L.; Wan, J.; Fowler, V.M. Myosin IIA interacts with the spectrin-actin membrane skeleton to control red blood cell membrane curvature and deformability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E4377–E4385. [[CrossRef](#)]
24. Mizuno, Y.; Isotani, E.; Huang, J.; Ding, H.; Stull, J.T.; Kamm, K.E. Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2008**, *295*, C358–C364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Shinar, E.; Shalev, O.; Rachmilewitz, E.A.; Schrier, S.L. Erythrocyte membrane skeleton abnormalities in severe beta-thalassemia. *Blood* **1987**, *70*, 158–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Khandros, E.; Thom, C.S.; D'Souza, J.; Weiss, M.J. Integrated protein quality-control pathways regulate free alpha-globin in murine beta-thalassemia. *Blood* **2012**, *119*, 5265–5275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Romanello, K.S.; Teixeira, K.K.L.; Silva, J.; Nagamatsu, S.T.; Bezerra, M.A.C.; Domingos, I.F.; Martins, D.A.P.; Araujo, A.S.; Lanaro, C.; Breyer, C.A.; et al. Global analysis of erythroid cells redox status reveals the involvement of Prdx1 and Prdx2 in the severity of beta thalassemia. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0208316. [[CrossRef](#)]
28. Rivella, S. Do not super-excess me! *Blood* **2012**, *119*, 5064–5065. [[CrossRef](#)]
29. Chanpeng, P.; Svasti, S.; Paiboonsukwong, K.; Smith, D.R.; Leecharoenkiat, K. Platelet proteome reveals specific proteins associated with platelet activation and the hypercoagulable state in beta-thalassemia/HbE patients. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6059. [[CrossRef](#)]
30. Tzounakas, V.L.; Dzieciatkowska, M.; Anastasiadi, A.T.; Karadimas, D.G.; Vergaki, A.; Siourounis, P.; Stamoulis, K.; Papassideri, I.S.; Kriebardis, A.G.; D'Alessandro, A.; et al. Red cell proteasome modulation by storage, redox metabolism and transfusion. *Blood Transfus.* **2020**. [[CrossRef](#)]
31. Polanowska-Grabowska, R.; Gear, A.R. Heat-shock proteins and platelet function. *Platelets* **2000**, *11*, 6–22. [[CrossRef](#)]
32. Vu, L.; Ragupathy, V.; Kulkarni, S.; Atreya, C. Analysis of Argonaute 2-microRNA complexes in ex vivo stored red blood cells. *Transfusion* **2017**, *57*, 2995–3000. [[CrossRef](#)]
33. Rungaldier, S.; Oberwagner, W.; Salzer, U.; Csaszar, E.; Prohaska, R. Stomatin interacts with GLUT1/SLC2A1, band 3/SLC4A1, and aquaporin-1 in human erythrocyte membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 956–966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zwifelhofer, N.M.; Cai, X.; Liao, R.; Mao, B.; Conn, D.J.; Mehta, C.; Keles, S.; Xia, Y.; Bresnick, E.H. GATA factor-regulated solute carrier ensemble reveals a nucleoside transporter-dependent differentiation mechanism. *PLoS Genet.* **2020**, *16*, e1009286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. D'Alessandro, A.; Xia, Y. Erythrocyte adaptive metabolic reprogramming under physiological and pathological hypoxia. *Curr. Opin. Hematol.* **2020**, *27*, 155–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Cinar, E.; Zhou, S.; DeCoursey, J.; Wang, Y.; Waugh, R.E.; Wan, J. Piezo1 regulates mechanotransductive release of ATP from human RBCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 11783–11788. [[CrossRef](#)]
37. Song, A.; Zhang, Y.; Han, L.; Yegutkin, G.G.; Liu, H.; Sun, K.; D'Alessandro, A.; Li, J.; Karmouty-Quintana, H.; Iriyama, T.; et al. Erythrocytes retain hypoxic adenosine response for faster acclimatization upon re-ascent. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14108. [[CrossRef](#)]
38. Sayama, S.; Song, A.; Brown, B.C.; Couturier, J.; Cai, X.; Xu, P.; Chen, C.; Zheng, Y.; Iriyama, T.; Sibai, B.; et al. Maternal erythrocyte ENT1-mediated AMPK activation counteracts placental hypoxia and supports fetal growth. *JCI Insight* **2020**, *5*. [[CrossRef](#)]

39. Sosa, Y.; Deniskin, R.; Frame, I.J.; Steingina, M.S.; Bandyopadhyay, D.; Graybill, T.L.; Kallal, L.A.; Ouellette, M.T.; Pope, A.J.; Widdowson, K.L.; et al. Identification via a Parallel Hit Progression Strategy of Improved Small Molecule Inhibitors of the Malaria Purine Uptake Transporter that Inhibit Plasmodium falciparum Parasite Proliferation. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5*, 1738–1753. [\[CrossRef\]](#)
40. Sara, F.; Connes, P.; Hue, O.; Montout-Hedreville, M.; Etienne-Julan, M.; Hardy-Dessources, M.D. Faster lactate transport across red blood cell membrane in sickle cell trait carriers. *J. Appl. Physiol.* **2006**, *100*, 427–432. [\[CrossRef\]](#)
41. Izumo, H.; Lear, S.; Williams, M.; Rosa, R.; Epstein, F.H. Sodium-potassium pump, ion fluxes, and cellular dehydration in sickle cell anemia. *J. Clin. Invest.* **1987**, *79*, 1621–1628. [\[CrossRef\]](#)
42. Huisjes, R.; Bogdanova, A.; van Solinge, W.W.; Schiffelers, R.M.; Kaestner, L.; van Wijk, R. Squeezing for Life—Properties of Red Blood Cell Deformability. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 656. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Zhou, Z.; Yang, J.; Pernow, J. Erythrocytes and cardiovascular complications. *Aging* **2018**, *10*, 3643–3644. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Forstermann, U.; Sessa, W.C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur. Heart J.* **2012**, *33*, 829–837. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Bertolone, L.; Shin, H.K.; Stefanoni, D.; Baek, J.H.; Gao, Y.; Morrison, E.J.; Nemkov, T.; Thomas, T.; Francis, R.O.; Hod, E.A.; et al. ZOOMICS: Comparative Metabolomics of Red Blood Cells From Old World Monkeys and Humans. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 593841. [\[CrossRef\]](#)
46. Morris, C.R.; Vichinsky, E.P. Pulmonary hypertension in thalassemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1202*, 205–213. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Morris, C.R.; Kim, H.Y.; Klings, E.S.; Wood, J.; Porter, J.B.; Trachtenberg, F.; Sweeters, N.; Olivieri, N.F.; Kwiatkowski, J.L.; Virzi, L.; et al. Dysregulated arginine metabolism and cardiopulmonary dysfunction in patients with thalassaemia. *Br. J. Haematol.* **2015**, *169*, 887–898. [\[CrossRef\]](#)
48. Zhou, Z.; Mahdi, A.; Tratsiakovich, Y.; Zahoran, S.; Kovamees, O.; Nordin, F.; Uribe Gonzalez, A.E.; Alvarsson, M.; Ostenson, C.G.; Andersson, D.C.; et al. Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2018**, *72*, 769–780. [\[CrossRef\]](#)
49. D'Alessandro, A.; Reisz, J.A.; Zhang, Y.; Gehrke, S.; Alexander, K.; Kanas, T.; Triulzi, D.J.; Donadee, C.; Barge, S.; Badlam, J.; et al. Effects of aged stored autologous red blood cells on human plasma metabolome. *Blood Adv.* **2019**, *3*, 884–896. [\[CrossRef\]](#)
50. Jiang, M.; Ding, Y.; Su, Y.; Hu, X.; Li, J.; Zhang, Z. Arginase-flotillin interaction brings arginase to red blood cell membrane. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 6561–6564. [\[CrossRef\]](#)
51. Pandya, C.D.; Lee, B.; Toque, H.A.; Mendhe, B.; Bragg, R.T.; Pandya, B.; Atawia, R.T.; Isales, C.; Hamrick, M.; Caldwell, R.W.; et al. Age-Dependent Oxidative Stress Elevates Arginase 1 and Uncoupled Nitric Oxide Synthesis in Skeletal Muscle of Aged Mice. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**, *2019*, 1704650. [\[CrossRef\]](#)
52. Cobbold, S.A.; Llinas, M.; Kirk, K. Sequestration and metabolism of host cell arginine by the intraerythrocytic malaria parasite Plasmodium falciparum. *Cell Microbiol.* **2016**, *18*, 820–830. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Teng, R.; Junankar, P.R.; Bubb, W.A.; Rae, C.; Mercier, P.; Kirk, K. Metabolite profiling of the intraerythrocytic malaria parasite Plasmodium falciparum by (1)H NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* **2009**, *22*, 292–302. [\[CrossRef\]](#)
54. Bartholdson, S.J.; Bustamante, L.Y.; Crosnier, C.; Johnson, S.; Lea, S.; Rayner, J.C.; Wright, G.J. Semaphorin-7A is an erythrocyte receptor for P. falciparum merozoite-specific TRAP homolog, MTRAP. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1003031. [\[CrossRef\]](#)
55. Egan, E.S. Beyond Hemoglobin: Screening for Malaria Host Factors. *Trends Genet.* **2018**, *34*, 133–141. [\[CrossRef\]](#)
56. Rowe, J.A.; Handel, I.G.; Thera, M.A.; Deans, A.M.; Lyke, K.E.; Kone, A.; Diallo, D.A.; Raza, A.; Kai, O.; Marsh, K.; et al. Blood group O protects against severe Plasmodium falciparum malaria through the mechanism of reduced rosetting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17471–17476. [\[CrossRef\]](#)
57. Ndila, C.M.; Uyoga, S.; Macharia, A.W.; Nyutu, G.; Peshu, N.; Ojal, J.; Shebe, M.; Awuondo, K.O.; Mturi, N.; Tsofa, B.; et al. Human candidate gene polymorphisms and risk of severe malaria in children in Kilifi, Kenya: A case-control association study. *Lancet Haematol.* **2018**, *5*, e333–e345. [\[CrossRef\]](#)
58. Pantaleo, A.; Ferru, E.; Carta, F.; Valente, E.; Pippia, P.; Turrini, F. Effect of heterozygous beta thalassemia on the phosphorylative response to Plasmodium falciparum infection. *J. Proteom.* **2012**, *76*, 251–258. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Zuccala, E.S.; Satchwell, T.J.; Angrisano, F.; Tan, Y.H.; Wilson, M.C.; Heesom, K.J.; Baum, J. Quantitative phospho-proteomics reveals the Plasmodium merozoite triggers pre-invasion host kinase modification of the red cell cytoskeleton. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19766. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Leecharoenkiat, A.; Wannatung, T.; Lithanatudom, P.; Svasti, S.; Fucharoen, S.; Chokchaichamnankit, D.; Srisomsap, C.; Smith, D.R. Increased oxidative metabolism is associated with erythroid precursor expansion in beta0-thalassaemia/Hb E disease. *Blood Cells Mol. Dis.* **2011**, *47*, 143–157. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Wang, Z.; Xi, J.; Hao, X.; Deng, W.; Liu, J.; Wei, C.; Gao, Y.; Zhang, L.; Wang, H. Red blood cells release microparticles containing human argonaute 2 and miRNAs to target genes of Plasmodium falciparum. *Emerg. Microbes Infect.* **2017**, *6*, e75. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Bruncker, P.A.R.; Flegel, W.A. An update on the Scianna blood group system. *Immunohematology* **2019**, *35*, 48–50.
63. Aniweh, Y.; Nyarko, P.B.; Quansah, E.; Thiam, L.G.; Awandare, G.A. SMIM1 at a glance; discovery, genetic basis, recent progress and perspectives. *Parasite Epidemiol. Control* **2019**, *5*, e00101. [\[CrossRef\]](#)
64. Zennadi, R.; Chien, A.; Xu, K.; Batchvarova, M.; Telen, M.J. Sick red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. *Blood* **2008**, *112*, 3474–3483. [\[CrossRef\]](#)

-
65. Kohler, D.; Granja, T.; Volz, J.; Koeppen, M.; Langer, H.F.; Hansmann, G.; Legchenko, E.; Geisler, T.; Bakchoul, T.; Eggstein, C.; et al. Red blood cell-derived semaphorin 7A promotes thrombo-inflammation in myocardial ischemia-reperfusion injury through platelet GPIb. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1315. [[CrossRef](#)]
 66. Cvejic, A.; Haer-Wigman, L.; Stephens, J.C.; Kostadima, M.; Smethurst, P.A.; Frontini, M.; van den Akker, E.; Bertone, P.; Bielczyk-Maczynska, E.; Farrow, S.; et al. SMIM1 underlies the Vel blood group and influences red blood cell traits. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 542–545. [[CrossRef](#)]
 67. Kriebardis, A.G.; Antonelou, M.H.; Stamoulis, K.E.; Economou-Petersen, E.; Margaritis, L.H.; Papassideri, I.S. RBC-derived vesicles during storage: Ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. *Transfusion* **2008**, *48*, 1943–1953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 68. Antonelou, M.H.; Tzounakas, V.L.; Velentzas, A.D.; Stamoulis, K.E.; Kriebardis, A.G.; Papassideri, I.S. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: A time-course evaluation from shape to proteome. *J. Proteom.* **2012**, *76*, 220–238. [[CrossRef](#)]
 69. Tzounakas, V.L.; Gevi, F.; Georgatzakou, H.T.; Zolla, L.; Papassideri, I.S.; Kriebardis, A.G.; Rinalducci, S.; Antonelou, M.H. Redox Status, Procoagulant Activity, and Metabolome of Fresh Frozen Plasma in Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Front. Med. Lausanne* **2018**, *5*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 70. Thomas, T.; Stefanoni, D.; Dzieciatkowska, M.; Issaian, A.; Nemkov, T.; Hill, R.C.; Francis, R.O.; Hudson, K.E.; Buehler, P.W.; Zimring, J.C.; et al. Evidence of Structural Protein Damage and Membrane Lipid Remodeling in Red Blood Cells from COVID-19 Patients. *J. Proteome Res.* **2020**, *19*, 4455–4469. [[CrossRef](#)]