



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**«Σηματοδότηση κυτταρικής γήρανσης και θανάτου στα ερυθρά αιμοσφαίρια**

*in vivo και in vitro»*

**ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Λ. ΤΖΟΥΝΑΚΑΣ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2015**



**NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS**  
**FACULTY OF BIOLOGY**  
**DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY AND BIOPHYSICS**

**PhD Thesis**

**«Red blood cell aging and death signaling *in vivo* and *in vitro*»**

**VASILEIOS L. TZOUNAKAS**

**BIOLOGIST**

**ATHENS 2015**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**ΙΣΙΔΩΡΑ Σ. ΠΑΠΑΣΙΔΕΡΗ:** Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΙΣΙΔΩΡΑ Σ. ΠΑΠΑΣΙΔΕΡΗ:** Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΑΛΕΠΟΡΟΥ-ΜΑΡΙΝΟΥ:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας

**ΙΩΑΝΝΗΣ Π. ΤΡΟΥΓΚΑΚΟΣ:** Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΙΣΙΔΩΡΑ Σ. ΠΑΠΑΣΙΔΕΡΗ:** Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΑΛΕΠΟΡΟΥ-ΜΑΡΙΝΟΥ:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας

**ΙΩΑΝΝΗΣ Π. ΤΡΟΥΓΚΑΚΟΣ:** Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ε. ΒΟΡΓΙΑΣ:** Καθηγητής, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Ι. ΣΤΡΑΒΟΠΟΔΗΣ:** Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Γ. ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ:** Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων, ΤΕΙ Αθήνας

**ΜΑΡΙΑΝΝΑ Χ. ΑΝΤΩΝΕΛΟΥ:** Λέκτορας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα»

**N. 5343/1932, άρθρο 202**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Ισιδώρας Σ. Παπασιδέρη. Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθιές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα της Διδακτορικής μου διατριβής και διευθύντρια του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Καθηγήτρια κ. Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη, τόσο για την εμπιστοσύνη που δείχνει στο πρόσωπό μου τα τελευταία (πολλά) χρόνια, όσο και για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό της. Χωρίς τη βοήθεια και τις συμβουλές της σε κάθε επίπεδο (ερευνητικό και προσωπικό) η παρούσα εργασία δε θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί.

Επίσης ευχαριστίες οφείλω στα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Βασιλική Αλεπόρου και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκο, για τις συμβουλές τους όποτε αυτό χρειάστηκε. Αντίστοιχα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Βοργιά, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτρη Στραβοπόδη, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη και τη Λέκτορα κ. Μαριάννα Αντωνέλου για την τιμή που μου έκαναν με τη συμμετοχή τους στην επταμελή εξεταστική επιτροπή της παρούσας διατριβής. Θα ήθελα επίσης να εκφράσω ειλικρινείς ευχαριστίες στον Ομότιμο Καθηγητή κ. Λουκά Μαργαρίτη ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ ερευνητικά στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής σε προπτυχιακό και μεταπτυχιακό επίπεδο.

Ιδιαίτερος, πολλά ευχαριστώ ανήκουν στη Λέκτορα κ. Μαριάννα Χ. Αντωνέλου για την καταλυτική συμμετοχή της στη διατριβή αυτή. Η καθοδήγηση και οι γνώσεις οι οποίες μου προσέφερε, βοήθησαν να σχηματίσω επιστημονική κρίση και να οργανώσω την πορεία της εργασίας ενώ η άνευ όρων βοήθειά της σε κάθε ζήτημα (ερευνητικό ή μη) υπήρξε ανεκτίμητη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη για τη φιλοξενία στο εργαστήριό του στις εγκαταστάσεις του ΤΕΙ Αθήνας καθώς επίσης και τη βοήθειά του σε ζητήματα αιμοδοσίας και οργάνωσης της μελέτης. Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στην Υποψήφια Διδάκτορα κ. Χαρά Γεωργατζάκου για την άψογη συνεργασία και την πραγματικά πολύτιμη και πολυεπίπεδη βοήθεια που μου προσέφερε απλόχερα καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μου, καθώς επίσης και όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου με τους οποίους συνεργάστηκα.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κ. Λεοντίνη Φουντουλάκη-Παπαρίζου (Διευθύντρια της μονάδας αιμοδοσίας του Γενικού Κρατικού Νοσοκομείου Νίκαιας) και τον κ. Κωνσταντίνο Σταμούλη (Διευθυντή του Εθνικού Κέντρου Αιμοδοσίας) για την πολύτιμη βοήθεια τόσο στο αμιγώς αιματολογικό κομμάτι της ιατρικής των μεταγίσεων όσο και στην στρατολόγηση και τον πλήρη έλεγχο των 26 εθελοντών αιμοδοτών που συμμετείχαν στο *ex vivo* τμήμα της συγκεκριμένης μελέτης. Ο κ. Σταμούλης ήταν αυτός ο οποίος εντόπισε πολύ νωρίς την σημαντική συμβολή του φαινομένου διαφοροποίησης δοτών αίματος στην αποθηκευτική βλάβη του ερυθροκυττάρου και προέτρεψε την ερευνητική μας δραστηριότητα σε αυτήν την κατεύθυνση.

Εξχωριστές ευχαριστίες οφείλω στους μεταδιδασκτορικούς ερευνητές κ. Θανάση Βελέντζα και κ. Πάνο Βελέντζα για τη βοήθεια και τις συμβουλές τους όπου και όποτε χρειάστηκε (και δεν ήταν λίγες αυτές οι φορές). Θα ήταν παράλειψη να μην αναφέρω τις κυρίες Μαρίνα Αρχοντάκη και Δήμητρα Αναγνωστοπούλου, γραμματείς του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, καθώς επίσης και όλα τα μέλη του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής για τη φιλοξενία και την αгаστή συνεργασία καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Θα ήθελα κλείνοντας να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που στάθηκε δίπλα μου όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου. Τέλος (last but not least), πολλά ευχαριστώ στην Αρετή μου για τη βοήθεια και τη στήριξη σε κάθε επίπεδο καθώς και για την πίστη που δείχνει στο πρόσωπο και τις δυνατότητές μου.

Βασίλειος Α. Τζούνακας  
Ιούλιος 2015

## ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

- 2,3 DPG:** 2,3 diphosphoglycerate (2,3 διφωσφογλυκερινικό οξύ)
- ALP:** Alkaline phosphatase (Αλκαλική Φωσφατάση)
- ALT:** Alanine aminotransferase (Αμινοτρανφεράση της αλανίνης)
- AQP-1:** Aquaporin-1 (Υδατοπορίνη-1)
- AST:** Aspartate transaminase (Τρανσαμινάση ασπαρτικού)
- ATP:** Adenosine triphosphate (Τριφωσφορική αδενοσίνη)
- BAS:** Baseophils (Βασεόφιλα)
- Ca:** Calcium (Ασβέστιο)
- CAT:** Catalase (Καταλάση)
- CLU:** Clusterin (Κλαστερίνη)
- EOS:** Eosinophils (Ηωσινόφιλα)
- FA:** Follic acid (Φολικό οξύ)
- FC:** Flow cytometry (Κυτταρομετρία ροής)
- Fe:** Iron (Σίδηρος)
- GAPDH:** Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης)
- GLUT-1:** Glucose transporter-1 (Μεταφορέας γλυκόζης-1)
- GPx:** Glutathione peroxidase (Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης)
- GR:** Glutathione reductase (Αναγωγάση της γλουταθειόνης)
- GSH:** Reduced form of glutathione (Ανηγμένη γλουταθειόνη)
- GSSG:** Oxidized form of glutathione (Οξειδωμένη γλουταθειόνη)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Hydrogen peroxide (Υπεροξείδιο του υδρογόνου)
- Hb:** Hb concentration (Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης)
- HCT:** Hematocrit (Αιματοκρίτης)
- HDL:** High density lipoproteins (Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες)
- HRP:** Horseradish peroxidase (Υπεροξειδάση των αγριοραφανίδων)
- K:** Potassium (Κάλιο)
- LDH:** Lactate dehydrogenase (Γαλακτική αφυδρογονάση)
- LDL:** Low density lipoproteins (Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες)
- LYM:** Lymphocytes (Λεμφοκύτταρα)
- MCF:** Mean corpuscular fragility (Μέση κυτταρική ευθραυστότητα)
- MCH:** Mean cell Hb (Μέση ποσότητα αιμοσφαιρίνης)
- MCHC:** Mean cell Hb concentration (Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης)
- MCV:** Mean cell volume (Μέσος ερυθροκυτταρικός όγκος)
- MFI:** Mechanical fragility index (Δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας)

**MON:** Monocytes (Μονοκύτταρα)  
**MP:** Microparticles (Μικροκυστίδια)  
**MPV:** Mean platelet volume (Μέσος αιμοπεταλιακός όγκος)  
**Na:** Sodium (Νάτριο)  
**NE:** Neutrophils (Ουδετερόφιλα)  
**NR-RBC:** Non reversible red blood cells (Ερυθροκύτταρα μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης)  
**NO:** Nitric oxide (Μονοξείδιο του αζώτου)  
**P:** Phosphorus (Φώσφορος)  
**PCT:** Plateletcrit (Αιμοπεταλιοκρίτης)  
**PDW:** Platelet distribution width (Εύρος κατανομής αιμοπεταλίων)  
**PFK:** Phosphofructokinase (Φωσφοφρουκτοκινάση)  
**PLT:** Platelets (Αιμοπετάλια)  
**PS:** Phosphatidylserine (Φωσφατιδυλοσερίνη)  
**PK:** Pyruvate kinase (Πυροσταφυλική κινάση)  
**RBC:** Red blood cells (Ερυθροκύτταρα)  
**RDW:** Red blood cell distribution width (Εύρος κατανομής ερυθροκυττάρων)  
**RNS:** Reactive nitrogen species (Δραστικές μορφές αζώτου)  
**ROS:** Reactive oxygen species (Δραστικές μορφές οξυγόνου)  
**SOD:** Superoxide dismutase (Δισμουτάση της ρίζας του σουπεροξειδίου)  
**TAC:** Total Antioxidant Capacity (Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα)  
**tBHP:** Tert-butyl-hydroperoxide (Τερτ-βούτυλο-υδροϋπεροξείδιο)  
**TIBC:** Total iron binding capacity (Ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα)  
**UA:** Uric acid (Ουρικό οξύ)  
**UA-AC:** Uric acid antioxidant capacity (Αντιοξειδωτική ικανότητα ουρικού οξέος)  
**VLDL:** Very low density lipoproteins (Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες)  
**WBC:** White blood cells (Λευκοκύτταρα)  
**γGT:** Gamma-glutamyl transferase (γ- γλουταμυλ τρανσφεράση)

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α:ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>13</b>
<b>A1. ΤΟ ΑΙΜΑ.....</b>	<b>14</b>
<b>A2. ΤΟ ΠΛΑΣΜΑ.....</b>	<b>14</b>
A2.1. Γλουταθειόνη Πλάσματος.....	14
A2.2. Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C) .....	15
A2.3. α-Τοκοφερόλη (Βιταμίνη E) .....	15
A2.4. Αλβουμίνη.....	15
A2.5. Χολερυθρίνη .....	16
A2.6. Ουρικό οξύ.....	16
<b>A3. ΤΟ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΟ (RBC) .....</b>	<b>16</b>
A3.1. Γενικά.....	16
A3.2. Αιμοσφαιρίνη .....	17
A3.3. Δομή Της Ερυθροκυτταρικής Μεμβράνης.....	17
A3.3.1 Λιπίδια της Μεμβράνης .....	18
A3.3.2. Πρωτεΐνες της Ερυθροκυτταρικής Μεμβράνης.....	19
A3.3.2.I. Ζώνη 3 ή ανιοντοανταλλάκτης (AE1) .....	20
A3.3.2.II. Σπεκτρίνη.....	22
A3.3.2.III. Αγκυρίνη .....	23
A3.3.2.IV. Πρωτεΐνη 4.1 .....	23
A3.3.2.V. Πρωτεΐνη 4.2 (Παλλιδίνη).....	24
A3.3.2.VI. Γλυκοφορίνες (PAS) .....	24
A3.3.2.VII. Στοματίνη (Ζώνη-7.2b).....	25
A3.3.2.VIII. Υδατοπορίνη CHIP28.....	26
A3.3.2.IX. Ακτίνη (Ζώνη 5).....	27
A3.3.2.X. Μυοσίνη, Τροπομυοσίνη, Τροπομοντουλίνη.....	27
A3.3.2.XI. Δεματίνη (Ζώνη 4.9) .....	27
A3.3.2.XII. Αδουσίνη.....	27
A3.3.2.XIII. Πρωτεΐνη p55.....	28

<i>A3.3.2.XIV. Μεταφορέας της Γλυκόζης (GLUT1)</i> .....	28
<i>A3.3.2.XV. Ca<sup>+2</sup> - ATPάση</i> .....	29
<i>A3.3.2.XVI. Σύστημα Rhesus (Rh)</i> .....	29
<i>A3.3.2.XVII. Πρωτεΐνη CD47</i> .....	30
<b>A3.4. Διευθέτηση Μεμβρανικών και Σκελετικών Πρωτεϊνών</b> .....	30
<b>A3.5. Κυτοσολικές Πρωτεΐνες που Σχετίζονται με τη Μembrάνη</b> .....	33
<b>A3.5.1. Καλπαΐνες</b> .....	33
<b>A3.5.2. Υπεροξειδοζίνες</b> .....	33
<b>A3.5.3. Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ (Hsp)</b> .....	34
<b>A3.5.4. Καθεψίνες</b> .....	34
<b>A3.6. Λιπιδικές Σχεδίες</b> .....	34
<b>A3.6.1. Ρόλος των Λιπιδικών Σχεδίων</b> .....	34
<b>A3.6.2. Σύσταση των Λιπιδικών Σχεδίων</b> .....	35
<i>A3.6.2.I. Φλοτιλίνη-1</i> .....	35
<i>A3.6.2.II. Φλοτιλίνη-2</i> .....	35
<i>A3.6.2.III. Συνεξίνη</i> .....	35
<i>A3.6.2.IV. Σορκίνη</i> .....	35
<i>A3.6.2.V. CD59</i> .....	36
<b>A4. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΟΥ</b> .....	36
<b>A4.1. Γενικά</b> .....	36
<b>A4.2. Ρύθμιση του Μεταβολισμού</b> .....	37
<b>A4.3. Οξειδωτικό Στρες στα Ερυθροκύτταρα</b> .....	38
<b>A4.4. Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί των Ερυθροκυττάρων</b> .....	39
<b>A4.4.1. Μη Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί</b> .....	40
<b>A4.4.2. Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί</b> .....	40
<i>A4.4.2.I. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)</i> .....	40
<i>A4.4.2.II. Καταλάση (CAT)</i> .....	40
<i>A4.4.2.III. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)</i> .....	41
<i>A4.4.2.IV. Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)</i> .....	41
<b>A5. ΓΗΡΑΝΣΗ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ</b> .....	41



<b>A5.1. <i>In vivo</i> Σηματοδοτικά Μονοπάτια και Δείκτες Γήρανσης των RBCs</b> .....	42
A5.1.1. Μικροκυστιδιοποίηση .....	42
A5.1.2. Το Βασιζόμενο στη Ζώνη-3 Μονοπάτι Γήρανσης.....	42
A5.1.3. Ομοιόσταση Ιόντων Ca <sup>+2</sup> .....	43
A5.1.4. Σηματοδότηση Μέσω Κασπασών και Εξωτερίκευση PS .....	44
A5.1.5. Επιπλέον Μηχανισμοί Ερυθροκυτταρικής Γήρανσης <i>In vivo</i> .....	44
A5.1.6. Συσχέτιση με το Οξειδωτικό Στρες .....	45
<b>A6. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ</b> .....	45
A6.1. Μηχανισμός Απόπτωσης στα Ερυθροκύτταρα (Ερυθρόπτωση).....	45
A6.2. Απόπτωση Μέσω Υποδοχέων στα Ερυθρά Αιμοσφαίρια .....	47
<b>A7. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ</b> .....	47
A7.1. Γενικά.....	47
A7.2. Διαλύματα Συντήρησης.....	48
A7.3. Αποθηκευτική Βλάβη των Ερυθροκυττάρων .....	49
A7.4. Σηματοδοτικά Μονοπάτια και Δείκτες Γήρανσης των RBCs σε Συνθήκες Αποθήκευσης.....	51
A7.4.1. Το Βασιζόμενο στη Ζώνη-3 Μονοπάτι Γήρανσης και η Κυστιδιοποίηση <i>Ex vivo</i> .....	51
A7.4.2. Επίδραση Ca <sup>+2</sup> και Μονοπάτια Απόπτωσης <i>Ex vivo</i> .....	52
A7.4.3. Φαγοκυττάρωση Σχετιζόμενη με CD47 σε Αποθηκευμένα RBCs .....	52
A7.4.4. Σχέση του Οξειδωτικού Στρες με την <i>Ex vivo</i> Γήρανση των RBCs.....	53
A7.5. Παράγοντες που Επηρεάζουν την Ποιότητα Αποθηκευμένων RBCs .....	53
A7.5.1 Λευκαφαίρεση .....	53
A7.5.2. Επίδραση Εγγενών Χαρακτηριστικών του Δότη.....	56
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	57
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	58
<b>B1. ΥΛΙΚΑ</b> .....	59
B1.1. Χημικά Αντιδραστήρια .....	59
B1.2. Κιτ Εμπορίου.....	60
B1.3. Χρωστικές.....	60
B1.4. Αντισώματα .....	60
B1.5. Φωτογραφικά Υλικά .....	61
B1.6. Αναλώσιμα.....	61
B1.7. Όργανα – Συσκευές.....	62
<b>B2. ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	62

B2.1. Λευκαφαίρεση .....	62
B2.2. Απομόνωση Ερυθροκυτταρικών Μembrανών από Ολικό Αίμα .....	63
B2.3. Υπολογισμός Ολικής Πρωτεϊνικής Συγκέντρωσης Δείγματος.....	64
B2.4. Προετοιμασία Μembrανών για SDS Ηλεκτροφόρηση.....	64
B2.5. Επίπεδη SDS-PAGE Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών κατά Laemmli.....	64
B2.6. Χρώση Ολικών Πρωτεϊνών σε Πήκτωμα.....	66
B2.7. Τεχνική Ανοσοαποτυπώματος (Western Blotting).....	66
B2.8. Ποσοτική Εκτίμηση των Πρωτεϊνών Πηκτωμάτων και Φιλμ.....	67
B2.9. Ανάλυση Πλάσματος.....	68
B2.9.1. Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη – Αιμόλυση .....	68
B2.9.2. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα Πλάσματος .....	68
B2.9.3. Πειραματικές Διαδικασίες με τη Χρήση της Μεθόδου ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	69
B2.9.3.I. Επίπεδα Μονοξειδίου του Αζώτου (NO) .....	69
B2.9.3.II. Ποσοτικοποίηση Κλαστερίνης.....	69
B2.9.3.III. Έλεγχος Επιπέδων Καρβονυλιωμένων Πρωτεϊνών .....	70
B2.9.3.IV. Μέτρηση Θρομβωτικής Ικανότητας Κυστιδίων.....	70
B2.9.4. Ποσοτικός Προσδιορισμός Κυστιδίων.....	70
B2.9.5. Απομόνωση Κυστιδίων.....	71
B2.10. Ανάλυση Ερυθροκυττάρων .....	71
B2.10.1. Οσμωτική Ευθραυστότητα .....	71
B2.10.2. Μηχανική Ευθραυστότητα .....	71
B2.10.3. Μέτρηση Ανηγμένης Γλουταθειόνης (GSH) .....	72
B2.10.4. Μέτρηση Επιπέδων Ενδοκυττάρων Ενεργών Μορφών Οξυγόνου (ROS) .....	72
B2.10.5. Μέτρηση Επιπέδων Ενδοκυττάρου Ασβεστίου .....	73
B2.10.6. Ανίχνευση Φωσφατιδυλοσερίνης (PS) .....	73
B2.10.7. Παρατήρηση της Μορφολογίας Ερυθροκυττάρων με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης - ΗΜΣ (Scanning Electron Microscope - SEM).....	74
B2.11. Στατιστική Ανάλυση – Ανάλυση Δικτύων.....	74
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>76</b>
<b>Γ1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΛΕΥΚΑΦΑΙΡΕΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΜΟΝΑΔΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗΣ.....</b>	<b>77</b>
Γ1.1. Αιματολογικό Πρότυπο και Βιοχημική Σύσταση του Υπερκειμένου των Μονάδων ..77	
Γ1.2. Επίδραση των Λευκοκυττάρων στη Δομική Ακεραιότητα και στη Διατήρηση της Μembrανικής Επιφάνειας των Ερυθρών Αιμοσφαιρίων .....	78

Γ1.3. Εντοπισμός Διαφορών στα Επίπεδα Ενδοκυτταρικού Ασβεστίου (Ca <sup>2+</sup> ).....	81
Γ1.4. Επίπεδα Ενεργών Ριζών Οξυγόνου (ROS).....	82
Γ1.5. Πρωτεϊνική Ανάλυση.....	83
Γ1.5.1. Αναδιάρθρωση της Μembrάνης – Χρονοεξαρτώμενη μελέτη .....	83
Γ1.5.2. Αναδιάρθρωση της Μembrάνης – Επίδραση της λευκαφαίρεσης.....	84
Γ1.5.3. Πρωτεϊνικές Τροποποιήσεις που Σχετίζονται με το Μονοπάτι Γήρανσης της Ζώνης-3.....	87
Γ1.5.4. Πρωτεϊνικοί Δείκτες Οξειδωτικής Επιβάρυνσης.....	88
Γ1.6. Συγκριτική Ανάλυση Νεαρών (Y) και Γηρασμένων (S) Ερυθροκυττάρων.....	90
<b>Γ2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ ΕΓΓΕΝΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΣΕ ΥΓΙΕΙΣ ΑΙΜΟΔΟΤΕΣ <i>in vivo</i> και <i>ex vivo</i> (Donor Variation) .....</b>	<b>94</b>
Γ2.1. Προ-αποθηκευτική Εικόνα Αιμοδοτών ( <i>in vivo</i> ).....	94
Γ2.1.1. Αιματολογικό Πρότυπο και Βιοχημικά Χαρακτηριστικά.....	94
Γ2.1.2. Βιολογικές Μετρήσεις Ερυθροκυττάρων και Πλάσματος.....	96
Γ2.1.3. Συσχετίσεις Αιματολογικών Παραμέτρων .....	98
Γ2.2. Αποθηκευτική Εικόνα Ερυθροκυττάρων ( <i>ex vivo</i> ) .....	101
Γ2.2.1. Χρονοεξαρτώμενη Ανάλυση.....	101
Γ2.2.2. Διακύμανση Ανάμεσα στους Αιμοδότες.....	104
Γ2.3. Σύνδεση της Αποθηκευτικής Ποιότητας Ερυθροκυττάρων ( <i>ex vivo</i> ) με Ιδιαίτερα Χαρακτηριστικά Αιμοδοτών ( <i>in vivo</i> ).....	106
Γ2.3.1. Διακύμανση Ανάμεσα στους Αιμοδότες.....	106
Γ2.3.2. Επίδραση των Επιπέδων HbF <i>in vivo</i> σε Παραμέτρους Αποθήκευσης.....	109
<b>Γ3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟ-ΑΠΟΘΗΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΟΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΜΟΝΑΔΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗΣ .....</b>	<b>111</b>
Γ3.1. Προ-αποθηκευτικός Έλεγχος Αιμοδοτών ( <i>in vivo</i> ) .....	111
Γ3.1.1. Τρόπος ζωής, Αιματολογικό Πρότυπο και Βιοχημικά Χαρακτηριστικά.....	111
Γ3.1.2. Κατηγοριοποίηση Αιμοδοτών και Ομαδοποίηση Παραμέτρων.....	114
Γ3.2. Αποθηκευτική Μελέτη: Η Επίδραση του Ουρικού Οξέος.....	115
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>121</b>
<b>Δ1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΛΕΥΚΑΦΑΙΡΕΣΗΣ .....</b>	<b>122</b>
Δ1.1. Αιματολογικό Πρότυπο, Δομική Ακεραιότητα και Διατήρηση της Μembrανικής Επιφάνειας των Ερυθρών Αιμοσφαιρίων.....	122
Δ1.2. Ομοιόσταση Ca <sup>2+</sup> .....	124
Δ1.3. Οξειδωτική Επιβάρυνση .....	124
Δ1.4. Αναδιάρθρωση της Μembrάνης.....	126
Δ1.5. Συγκριτική Ανάλυση Νεαρών (Y) και Γηρασμένων (S) Ερυθροκυττάρων.....	128

Δ1.6. Πιθανοί Μηχανισμοί Επίδρασης Λευκοκυττάρων-Αιμοπεταλίων στην Αποθηκευτική Βλάβη σε Μοριακό και Κυτταρικό Επίπεδο .....	129
Δ1.7. Συμπεράσματα.....	130
<b>Δ2. ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗ ΕΓΓΕΝΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΣΕ ΥΓΙΕΙΣ ΑΙΜΟΔΟΤΕΣ.....</b>	<b>132</b>
Δ2.1. Αιματολογική Εικόνα Αιμοδοτών ( <i>in vivo</i> ).....	132
Δ2.1.1. Ετερογένεια Μεταξύ Υγιών Αιμοδοτών.....	132
Δ2.1.2. Βιολογικό Δίκτυο Αλληλεπιδράσεων του Αίματος .....	133
Δ2.2. Αποθηκευτική Βλάβη ( <i>ex vivo</i> ) και Σύνδεση με Εγγενή Χαρακτηριστικά Αιμοδοτών ( <i>in vivo</i> ) .....	134
Δ2.2.1. Διακύμανση Ανάμεσα στους Αιμοδότες Προϊόντος του Χρόνου Αποθήκευσης.....	134
Δ2.2.2. Σύνδεση Εγγενών Χαρακτηριστικών – Αποθηκευτικής Ποιότητας .....	135
Δ2.3. Συμπεράσματα.....	136
<b>Δ3. ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗ ΕΓΓΕΝΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΣΕ ΥΓΙΕΙΣ ΑΙΜΟΔΟΤΕΣ.....</b>	<b>137</b>
Δ3.1. Κατηγοριοποίηση Αιμοδοτών με Βάση τα Επίπεδα Ουρικού Οξέος (UA) <i>in vivo</i> ....	137
Δ3.2. Σύνδεση Επιπέδων UA <i>in vivo</i> και Αποθηκευτικής Βλάβης.....	137
Δ3.3. Μοντέλο Δράσης Ουρικού Οξέος Εντός της Μονάδας Μετάγγισης .....	139
Δ3.4. Συμπεράσματα.....	141
<b>Δ4. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>141</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>143</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>146</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>149</b>
<b>E1. ΑΡΘΡΑ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ .....</b>	<b>150</b>
<b>E2. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>170</b>
<b>E3. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>170</b>
<b>E4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΚΟΝΩΝ .....</b>	<b>171</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>172</b>

***ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α:***  
***ΕΙΣΑΓΩΓΗ***

## **A1. ΤΟ ΑΙΜΑ**

Το αίμα αποτελεί υγρό ιστό (ειδική κατηγορία ερειστικού ιστού) του σώματος, χαρακτηριστικό των πολυκύτταρων οργανισμών. Επιτελεί διάφορες λειτουργίες όπως μεταφορά θρεπτικών ουσιών, ορμονών και βιταμινών, στους ιστούς, απομάκρυνση άχρηστων ουσιών που παράγονται κατά τον μεταβολισμό, ανταλλαγή αερίων (αιμοσφαιρίνη), πήξη (αιμοπετάλια και παράγοντες πήξης του πλάσματος), άμυνα (λευκά αιμοσφαίρια) και θρέψη (πλάσμα). Αποτελείται από κύτταρα και ρευστή μεσοκυττάρια ουσία. Τα κύτταρα του αίματος αποτελούν τα έμμορφα συστατικά του και διακρίνονται σε ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια (*Berne και Levy, 1996*).

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC) είναι τα πλέον πολυάριθμα κύτταρα σε κυκλοφορία καθώς αποτελούν περίπου το 40% του αίματος. Έχουν σχήμα αμφίκιουλου δίσκου, μικρό μέγεθος (διάμετρος 8μm) και εμφανίζουν ιδιαίτερη ελαστικότητα κάτι το οποίο τα καθιστά ικανά να περνούν μέσα από τα τριχοειδή αγγεία. Παράγονται στο μυελό των οστών και στην ώριμη μορφή τους είναι απύρνηνα, ενώ η μέση διάρκεια ζωής τους είναι 120 ημέρες. Κύρια λειτουργία τους είναι η μεταφορά του οξυγόνου που προσλαμβάνεται από τους πνεύμονες και του διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται από τα κύτταρα (*Turgeon, 2011*).

Τα λευκά αιμοσφαίρια (WBC), που παράγονται και αυτά στο μυελό των οστών, συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού και διακρίνονται στους παρακάτω τύπους: πολυμορφοπύρνηνα κοκκιοκύτταρα που είναι τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα. Τα αιμοπετάλια είναι κυτταρικά θραύσματα των μεγακαρυοκυττάρων, μήκους 2 - 4 μm, τα οποία αποτελούν λιγότερο από το 1% του αίματος. Παίζουν καθοριστικό ρόλο στην πήξη του αίματος και την αιμόσταση, δηλαδή στην αναστολή της αιμορραγίας ή της κυκλοφορίας μέσω έκκρισης του ενζύμου της θρομβοκινάσης (*Turgeon, 2011*).

## **A2. ΤΟ ΠΛΑΣΜΑ**

Το πλάσμα είναι η ρευστή μεσοκυττάρια ουσία μέσα στην οποία αιωρούνται τα κύτταρα και αποτελείται από έναν μεγάλο αριθμό οργανικών και ανόργανων υδατοδιαλυτών ουσιών. Αποτελεί ένα πολύπλοκο μίγμα πρωτεϊνών, ενζύμων, θρεπτικών και άχρηστων ουσιών, ορμονών και αερίων. Το 90% του πλάσματος αποτελείται από νερό ενώ οι πρωτεΐνες (αλβουμίνες, σφαιρίνες, ινωδογόνο) είναι το κύριο συστατικό από άποψη βάρους διαδραματίζοντας βασικό ρόλο στη μεταφορά, την άμυνα και τη θρόμβωση (*Saladin, 2004*). Το ανθρώπινο πλάσμα είναι εφοδιασμένο με μια σειρά μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ενώ η αντιοξειδωτική του ικανότητα μπορεί να βελτιωθεί μέσω της διατροφής (πρόσληψη καροτενοειδών, πολυφαινολών και φλαβονοειδών) (*Cimen, 2008*). Τα σημαντικότερα μόρια που εμφανίζουν αντιοξειδωτική ικανότητα είναι μεταξύ άλλων η γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη-C), το ουρικό οξύ, η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη-E), η χολερυθρίνη και η αλβουμίνη (*Frei et al., 1988*).

### **A2.1. Γλουταθειόνη Πλάσματος**

Η γλουταθειόνη (GSH) αποτελεί τον κυριότερο μη ενζυμικό ρυθμιστή της ενδοκυτταρικής αντιοξειδωτικής ομοιόστασης (βλ. παράγραφο A4.4.1). Η GSH μπορεί να εντοπιστεί σε ποικιλία

ιστών και κυττάρων όπως τα ερυθροκύτταρα και τα λευκοκύτταρα καθώς επίσης και στο πλάσμα. Όσον αφορά στο πλάσμα η συγκέντρωση GSH είναι πολύ χαμηλότερη (5μM) σε σχέση με την αντίστοιχη του ολικού αίματος (2mM) καθώς το 99% προέρχεται από τα ερυθροκύτταρα. Επιπλέον η γλουταθειόνη του πλάσματος βρίσκεται περισσότερο στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) σε σχέση με τα ερυθροκύτταρα ενώ η μέτρησή της παρουσιάζει δυσκολίες καθώς ο χρόνος ημίσειας ζωής στο πλάσμα είναι μόλις μερικά λεπτά (Mills και Lang, 1996).

### **A2.2. Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)**

Το ασκορβικό οξύ είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη και το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό στα εξωκυττάρια υγρά συμμετέχοντας στην εκκαθάριση ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο λιπίδια και πρωτεΐνες από οξειδωτική βλάβη. Στα εξωκυττάρια υγρά, έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες όπως υδροξυλίου και υπεροξειδίου ενώ είναι το πρώτο αντιοξειδωτικό που καταναλώνεται στο πλάσμα μετά από δράση εξωγενούς οξειδωτικού ερεθίσματος (Frei et al., 1989). Λειτουργεί επίσης ανάγοντας ιόντα χαλκού και σιδήρου ενώ μπορεί να δρα συνεργιστικά με τη βιταμίνη E βοηθώντας και στην αναγέννηση της τελευταίας (Cimen, 2008). Παραλαμβάνεται με την τροφή καθώς στον άνθρωπο δεν υπάρχει η δυνατότητα παραγωγής του και μεταφέρεται μέσω του πλάσματος – τόσο στην ανηγμένη όσο και στην οξειδωμένη του μορφή (αφυδρο-ασκορβικό οξύ) – σε όλα τα κύτταρα (Troadek και Kaplan, 2008). Τα επίπεδα ασκορβικού *in vivo* είναι παραπλήσια μεταξύ RBCs και πλάσματος ενώ έχει βρεθεί πως τα RBCs μπορούν να μεταφέρουν αφυδρο-ασκορβικό οξύ στο εσωτερικό τους, μέσω του μεταφορέα γλυκόζης που διαθέτουν (Glut1) και ρύθμιση από τη στοματίνη. Εκεί το αφυδρο-ασκορβικό ανάγεται σε ασκορβικό οξύ κι απελευθερώνεται εκ νέου στο πλάσμα (Montel-Hagen et al., 2008).

### **A2.3. α-Τοκοφερόλη (Βιταμίνη E)**

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη που αποτελείται από πολλές ισομορφές, γνωστές ως τοκοφερόλες. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο ενεργή και άφθονη μορφή στη φύση (Fuchs et al., 2003). Αποτελεί ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό τόσο λόγω της αφθονίας της όσο και της ικανότητάς της να αντιδρά ταχύτατα με τις ROS ( $RO_2^{\cdot}$ ) προλαμβάνοντας την οξείδωση των λιπιδίων. Με αυτό τον τρόπο διατηρείται η δομή και η βιολογική δραστηριότητα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Αποτέλεσμα της αρχικής αντίδρασης είναι η παραγωγή μιας ρίζας α-τοκοφερόλης η οποία σταθεροποιείται μέσω συντονισμού και μπορεί να αντιδράσει με επιπλέον μία  $RO_2^{\cdot}$ . Ουσιαστικά ένα μόριο α-τοκοφερόλης μπορεί να σταματήσει δύο αντιδράσεις λιπιδικής υπεοξειδωσης (Traber και Atkinson, 2007). Η βιταμίνη E αλληλεπιδρά με πολυάριθμα αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνη C, GSH, β-καροτένιο ή λιποϊκό οξύ, τα οποία έχουν την ικανότητα να αναγεννούν τη βιταμίνη E από την οξειδωμένη της μορφή (Coombes et al., 2001). Η μοριακή δομή της διευκολύνει την απενεργοποίηση των ROS σε ένα λιπιδικό περιβάλλον, ιδιαίτερα τις ρίζες  $LOO^{\cdot}$  προέρχονται από την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) (Vasankari et al., 1997).

### **A2.4. Αλβουμίνη**

Η αλβουμίνη είναι διαλυτή πρωτεΐνη του πλάσματος και περιέχει μια εκτεθειμένη σουλφυδρυλομάδα συμβάλλοντας σε σημαντικό ποσοστό στα επίπεδα θειολών του πλάσματος. Έχει πολλαπλούς ρόλους, ένας εκ των οποίων είναι η δράση της ως εξωκυττάριο αντιοξειδωτικό. Μεταξύ

των αντιοξειδωτικών της ρόλων, συνδέεται στενά με ιόντα Cu και ασθενώς με ιόντα Fe μειώνοντας τη διαθεσιμότητα των συγκεκριμένων ιόντων για την αντίδραση Fenton. Δεσμεύει επίσης την αίμη σταματώντας την εξαρτώμενη από αίμη οξείδωση των λιποπρωτεϊνών. Η αλβουμίνη έχει τη δυνατότητα να αντιδρά γρήγορα με υποχλωριώδες οξύ και ποικίλες ελεύθερες ρίζες ( $\text{ONOO}^\cdot$ ,  $\text{NO}_2^\cdot$ ,  $\text{RO}_2^\cdot$ ,  $\text{RO}^\cdot$ ) τη στιγμή που η αντίδρασή της με το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) προχωρά αργά (Taverna et al., 2013).

### **A2.5. Χολερυθρίνη**

Η χολερυθρίνη είναι το τελικό προϊόν καταβολισμού της αίμης. Η οξυγενάση της αίμης διασπά τον δακτύλιο της αίμης προς σχηματισμό χολοπρασίνης, η οποία στη συνέχεια ανάγεται από την αναγωγή της χολοπρασίνης σε χολερυθρίνη. Αν και τόσο η χολερυθρίνη όσο και η χολοπρασίνη είναι αναγωγικά είδη, η χολερυθρίνη θεωρείται το καλύτερο φυσιολογικό αντιοξειδωτικό (Baranano et al., 2002). Πράγματι, η χολερυθρίνη κατέχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση απέναντι στις ρίζες  $\text{RO}_2^\cdot$  και προστατεύει από τοξικά επίπεδα του  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Έχει προταθεί πως η σύνδεση της χολερυθρίνης με την αλβουμίνη του πλάσματος μπορεί να προστατέψει τόσο τα λιπαρά οξέα όσο και την ίδια την αλβουμίνη από οξείδωση (Stocker et al., 1987).

### **A2.6. Ουρικό οξύ**

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν μεταβολισμού των πουρινών στους ανθρώπους. Αποτελεί το 60% της αντιοξειδωτικής άμυνας του πλάσματος δρώντας ως δότης ηλεκτρονίων και εκκαθαριστής ελευθέρων ριζών οξυγόνου και αζώτου (Benzie και Strain, 1999). Πιο συγκεκριμένα λαμβάνει μέρος στην εκκαθάριση μοριακού οξυγόνου ( $\text{O}_2$ ), όζοντος ( $\text{O}_3$ ), υποχλωριώδους οξέος, ριζών διοξειδίου του αζώτου ( $\text{NO}_2^\cdot$ ), οξειδωτικών μορφών της αίμης που παράγονται από την οξείδωση της αιμοσφαιρίνης κ.α. (Ames et al., 1981). Μια άλλη σημαντική αντιοξειδωτική ιδιότητα του ουρικού οξέος είναι η ικανότητά του να δρα ως χηλικός παράγοντας σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου. Με αυτό τον τρόπο παρεμποδίζεται η οξειδωτική δράση των ιόντων σιδήρου ( $\text{Fe}^{3+}$ ) μέσω των αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss με αποτέλεσμα την αναστολή αντιδράσεων οξείδωσης που καταλύονται από το σίδηρο (Miura et al., 1993). Έχει βρεθεί πως η οξείδωση των λιπιδίων του πλάσματος και της μεμβράνης, η αιμόλυση που προάγεται από οξείδωση (Becker, 1993) καθώς επίσης και η επαγόμενη από νιτρώδη ιόντα οξείδωση της οξειμοσφαιρίνης (Smith, 1991) μπορούν να ανασταλούν ή να καθυστερήσουν παρουσία ουρικού οξέος.

## **A3. ΤΟ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΟ (RBC)**

### **A3.1. Γενικά**

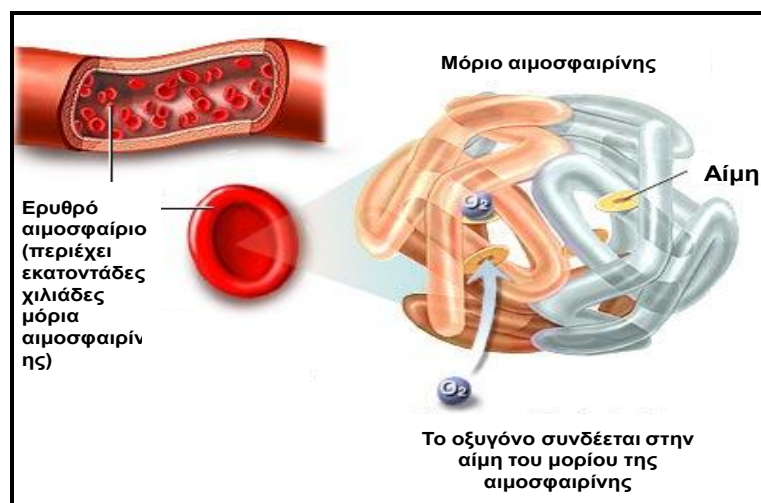
Μετά το τέλος της ερυθροποίησης έχουν πλέον δημιουργηθεί τα απύρνηνα ερυθροκύτταρα τα οποία είναι πλήρως προσαρμοσμένα στη βασική τους λειτουργία, που είναι η μεταφορά των αερίων της αναπνοής προς και από τους ιστούς (οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα αντίστοιχα). Πριν την απελευθέρωσή τους στη γενική κυκλοφορία, και αφού έχει αποβληθεί πλήρως κάθε πυρηνικό κατάλοιπο, τα κυττοσολικά τους οργανίδια εκφυλίζονται. Έτσι τελικά το ώριμο ερυθροκύτταρο αποτελείται ουσιαστικά από μόνο μία κυτταρική μεμβράνη (λιπιδική διπλοστιβάδα) η οποία περικλείει την αιμοσφαιρίνη, καθώς και ένζυμα και πρωτεΐνες απαραίτητα για τη διατήρηση της ακεραιότητάς του. Η περιεκτικότητά σε αιμοσφαιρίνη είναι η υψηλότερη που παρατηρείται στα



κύτταρα της ερυθροειδούς σειράς, κάτι το οποίο είναι φυσιολογικό, αφού όπως έχει ήδη αναφερθεί τα προηγούμενα στάδια διαφοροποίησης χαρακτηρίζονται από συνεχή παραγωγή μορίων αιμοσφαιρίνης κάτω από την επίδραση της ερυθροποιητίνης (Spivak, 2002).

### A3.2. Αιμοσφαιρίνη

Είναι το πρωτεϊνικό μόριο που επιτελεί τη μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς και του διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς στους πνεύμονες. Αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ανά δύο όμοιες, που καλούνται σφαιρίνες, και τέσσερα μόρια αίμης, ένα για κάθε αλυσίδα (εικόνα 1). Σε ένα φυσιολογικό ενήλικο άτομο οι δύο αλυσίδες ανήκουν στην οικογένεια των α-σφαιρινών και οι άλλες δύο στις β-σφαιρίνες. Οι ομάδες της αίμης περιέχουν σίδηρο, ο οποίος εμφανίζει χαλαρή σύνδεση με το οξυγόνο και με το διοξείδιο του άνθρακα κάτι που διευκολύνει τη λειτουργία του μορίου. Η συγγένεια της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του, το pH αλλά και την αλληλεπίδραση με οργανικές ενώσεις όπως το 2,3-διφωσφορογλυκερινικό οξύ (2,3-DPG). Έτσι αιμοσφαιρίνη φορτωμένη με οξυγόνο (οξυαιμοσφαιρίνη), φτάνει με την κυκλοφορία του αίματος στους ιστούς, όπου το pH είναι χαμηλό και η συγκέντρωση CO<sub>2</sub> υψηλή, αποδίδοντας το οξυγόνο και δεσμεύοντας το CO<sub>2</sub> (η αποδέσμευση του O<sub>2</sub> προάγεται και από τη δέσμευση 2,3-DPG στην οξυαιμοσφαιρίνη). Το αίμα που επιστρέφει στους πνεύμονες φέρει αιμοσφαιρίνη συνδεδεμένη με CO<sub>2</sub> (καρβαμινο-αιμοσφαιρίνη). Εκεί το υψηλότερο pH και η αντιστροφή της αναλογίας συγκέντρωσης υπέρ του O<sub>2</sub> οδηγούν σε απελευθέρωση του διοξειδίου και εκκίνηση ενός νέου κύκλου ανταλλαγής αερίων (Fischbach, 2004).



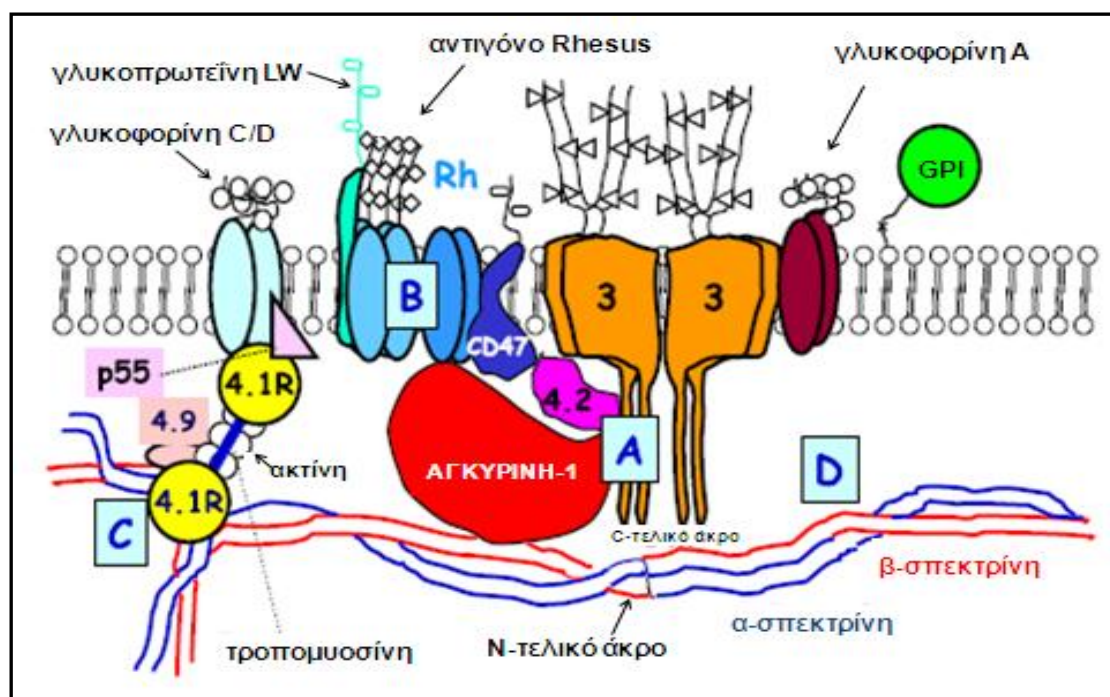
Εικόνα 1: Σχηματικά η δομή της αιμοσφαιρίνης (Ανατύπωση από A.D.A.M., 2008).

### A3.3. Δομή Της Ερυθροκυτταρικής Μεμβράνης

Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη καταλαμβάνει επιφάνεια 163 μm<sup>2</sup>, η οποία είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από την επιφάνεια σφαίρας όγκου ίσου με του ερυθροκυττάρου (85 μm<sup>2</sup>). Με τη στενή έννοια του όρου η μεμβράνη αποτελείται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα, πάχους περίπου 10 nm, μέσα στην οποία απαντώνται οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, που εμφανίζονται ως διαμεμβρανικά σωματίδια στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με την τεχνική του ψυκτοτεμαχισμού και της ψυκτοεξάχνωσης. Με την ευρύτερη όμως έννοια του όρου, περιλαμβάνει και το δίκτυο των

περιφερειακών πρωτεϊνών, πάχους περίπου 10 nm, που βρίσκεται σε επαφή με την κυττοσολική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, συνδεδεμένο μέσω ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων, και αποτελεί τον **υπομεμβρανικό σκελετό** του ερυθροκυττάρου (*Pasini et al, 2010*).

Η δομική οργάνωση της ανθρώπινης ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (*εικόνα 2*) δίνει τη δυνατότητα στα ερυθροκύτταρα να υποστούν μεγάλες αναστρέψιμες παραμορφώσεις, διατηρώντας παράλληλα τη δομική τους ακεραιότητα. Η μεμβράνη είναι εξαιρετικά ελαστική και έχει τη δυνατότητα να ανταποκρίνεται γρήγορα σε εφαρμοσμένο μηχανικό στρες ενώ εμφανίζεται εξαιρετικά ισχυρή όσον αφορά στην αντίσταση σε διαρθρωτικές αλλαγές. Παρόλα αυτά δεν μπορεί να αντέξει αλλαγές στο επιφανειακό της εμβαδό, ακόμα κι αν αυτές είναι της τάξης του 3% - 4%. Όσον αφορά στη χημική της σύσταση 52% της συνολικής μάζας είναι πρωτεΐνες, 40% λιπίδια και 8% πολυσακχαρίτες από τους οποίους 7% φέρονται σε γλυκοσφιγγολιπίδια, ενώ το υπόλοιπο 93% βρίσκεται συνδεδεμένο με τη μορφή ολιγοσακχαρικών αλυσίδων στις γλυκοπρωτεΐνες της μεμβράνης (*Kaushansky et al., 2010*).



Εικόνα 2: Σχηματικά η δομή της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. (A) Το πρώτο σημείο σύνδεσης της μεμβράνης με το σκελετό. (B) Σύμπλοκο Rhesus. (C) Το δεύτερο σημείο σύνδεσης μεμβράνης-σκελετού. (D) Αλληλεπιδράσεις μεταξύ α- και β-σπεκτρίνης (*Ανατύπωση από Delaunay, 2007*).

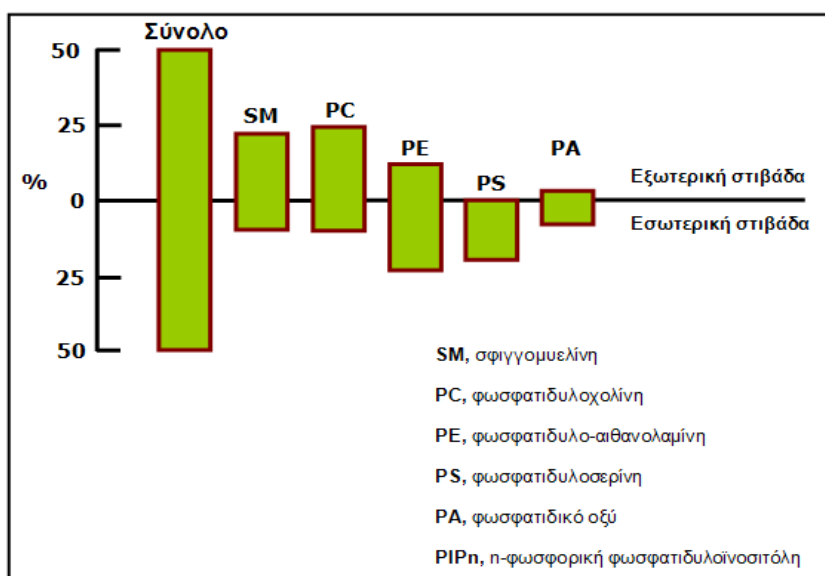
### A3.3.1 Λιπίδια της Μεμβράνης

Η χοληστερόλη και τα φωσφολιπίδια αποτελούν το 95% των ολικών λιπιδίων της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, ενώ το υπόλοιπο 5% κατέχουν τα γλυκοσφιγγολιπίδια. Τέσσερα είναι τα κύρια φωσφολιπίδια: η φωσφατιδυλοχολίνη (PC), η φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη (PE), η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και η σφιγγομυελίνη (SM). Η φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PI) και τα φωσφορυλιωμένα παράγωγά της είναι λιγότερο άφθονα. Τα φωσφολιπίδια είναι ασύμμετρα κατανομημένα (*εικόνα 3*) στα δύο μισά της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Η PC και η SM κυριαρχούν στην εξωτερική μονοστιβάδα, ενώ η PE και η PS είναι αφθονότερες στην εσωτερική (*Mohandas και*

Gallagher, 2008). Τα γλυκοσφιγγολιπίδια καθώς και τα GPIs που χρησιμεύουν ως άγκυρα για τη σύνδεση των GPI-πρωτεϊνών στη μεμβράνη, βρίσκονται στην εξωτερική μονοστιβάδα.

Τα μόρια των φωσφολιπιδίων παρουσιάζουν μικρή τάση να περνούν από τη μια λιπιδική μονοστιβάδα στην άλλη, μια διαδικασία που είναι γνωστή ως «flip-flop». Ωστόσο, μία μικρή τέτοια κατακόρυφη ροή υφίσταται και μπορεί μάλιστα να πάρει μεγαλύτερες διαστάσεις απειλώντας τη φωσφολιπιδική ασυμμετρία. Έτσι, υπάρχει ένας μηχανισμός που μεταφέρει ενεργά τα αμινοφωσφολιπίδια που έχουν περάσει στην εξωτερική μονοστιβάδα πάλι πίσω στην εσωτερική. Το υπεύθυνο για αυτή τη διαδικασία ένζυμο ονομάζεται αμινοφωσφολιπιδική μετατοπάση και είναι μια ATP-εξαρτώμενη πρωτεΐνη. Απενεργοποίηση αυτού του μηχανισμού, είτε λόγω απουσίας ATP είτε από άλλη αιτία όπως η οξείδωση, θα οδηγήσει τελικά, σε απώλεια της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας της μεμβράνης με χαρακτηριστικό παράδειγμα την εξωτερίκευση PS η οποία μπορεί να οδηγήσει σε φαγοκυττάρωση. Εναλλακτικά επίσης, η αλληλεπίδραση των φωσφολιπιδίων με το μεμβρανικό σκελετό θα μπορούσε να περιορίσει την προς τα έξω κίνηση τους, σταθεροποιώντας έτσι τη μεμβράνη και ελαττώνοντας το ποσό του ATP που απαιτείται για τη διατήρηση της ασύμμετρης κατανομής (Yu-Bin Ji et al., 2005).

Η εσωτερική επιφάνεια της στιβάδας των λιπιδίων είναι ένα δίκτυο από πρωτεΐνες που συγκροτούν το σκελετό του ερυθροκυττάρου. Ο σκελετός συνδέεται με τη στιβάδα των λιπιδίων μέσω κάθετων αλληλεπιδράσεων ενώ η σταθεροποίηση της μεμβράνης επιτυγχάνεται και μέσω των οριζόντιων αλληλεπιδράσεων (κυρίαρχο ρόλο παίζει η σπεκτρίνη) (McMullin, 1999).



Εικόνα 3: Κατανομή των φωσφολιπιδίων στο εξωτερικό και το εσωτερικό μέρος της μεμβράνης (Ανατύπωση από Daleke, 2008).

### A3.3.2. Πρωτεΐνες της Ερυθροκυτταρικής Μεμβράνης

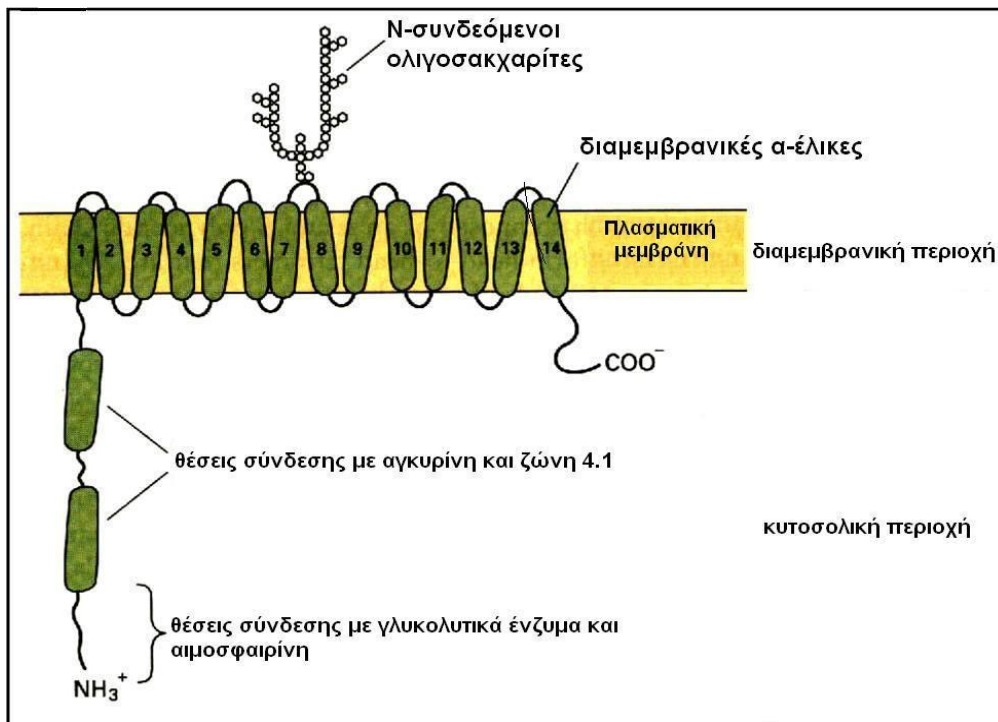
Όταν απομονωμένες ερυθροκυτταρικές μεμβράνες ηλεκτροφορηθούν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS (Laemmli et al., 1970), εμφανίζονται ποικίλες ζώνες, ύστερα από χρώση με coomassie blue. Με τη μέθοδο αυτή δίνεται η δυνατότητα να παρατηρήσουμε ικανοποιητικά όλες τις πρωτεΐνες εκτός από τις αγκυρίνες και τις γλυκοφορίνες. Για να αναλυθούν οι

αγκυρίνες πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση κατά Fairbanks (Fairbanks et al., 1971). Οι ζώνες αριθμούνται αρχίζοντας από την κορυφή του πηκτώματος και αναφέρονται ως ζώνη 1, ζώνη 2 κλπ.

Γενικά οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να διακριθούν σε διαμεμβρανικές και περιφερειακές. Οι διαμεμβρανικές διαπερνούν την λιπιδική διπλοστιβάδα και αλληλεπιδρούν με τον υδρόφοβο λιπιδικό πυρήνα, ενώ οι περιφερειακές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και λιπίδια στη μεμβρανική επιφάνεια αλλά δεν εισχωρούν στο λιπιδικό στρώμα. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες εμφανίζουν λειτουργική ετερογένεια καθώς λειτουργούν ως μεταφορείς, ως μόρια προσκόλλησης, ως υποδοχείς σηματοδότησης και άλλες ακόμα απροσδιόριστες δραστηριότητες. Η συγγένεια με την οποία συνδέονται οι πρωτεΐνες με τη μεμβράνη δεν είναι μια στατική ιδιότητα αλλά επηρεάζεται από το βαθμό φωσφορυλίωσης, γλυκοζυλίωσης, μεθυλίωσής τους ή την τροποποίηση των λιπιδίων (Kaushansky et al., 2010). Εκτός από τις διαμεμβρανικές και περιφερειακές πρωτεΐνες υπάρχουν και οι μεμβρανοσυνδεδεμένες, οι οποίες μπορεί να βρίσκονται ενδοκυτταρικά (στοματίνη, φλοτιλλίνες) (Salzer και Prohaska, 2001) ή να προσαρτώνται στη μεμβράνη εξωκυτταρικά μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης με GPI (Cross, 1990). Παρακάτω αναλύονται οι βασικότερες πρωτεΐνες που απαντώνται σε μια τυπική ερυθροκυτταρική μεμβράνη.

#### **A3.3.2.I. Ζώνη 3 ή ανιοντοανταλλάκτης (AE1)**

Η ζώνη 3 ή ανιοντοανταλλάκτης είναι η κύρια διαμεμβρανική πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων, αντιπροσωπεύοντας περίπου το ένα τρίτο των ολικών μεμβρανικών πρωτεϊνών. Κάθε ερυθροκύτταρο περιέχει  $10^6$  αντίγραφα μονομερών ζώνης 3, με μοριακό βάρος 95 kDa. Διάφορες μορφές της ζώνης 3 συναντώνται στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, όπως ομοδιμερή, τετραμερή ή ολιγομερή (Lu και Liu, 2007). Το γονίδιο της εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 και κωδικοποιεί πρωτεΐνη με 911 αμινοξικά κατάλοιπα. Από αυτά τα 432 ανήκουν στην κυτοσολική της περιοχή ενώ τα υπόλοιπα 479 στη διαμεμβρανική. Το διαμεμβρανικό της τμήμα διασχίζει 14 φορές τη λιπιδική διπλοστιβάδα (εικόνα 4) (Hochmuth και Warren, 2002), ενώ το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό της άκρο βρίσκονται στο κυτοσόλιο. Στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη η ζώνη-3 σχηματίζει διμερή και τετραμερή. Τα διμερή συνδέονται με την πρωτεΐνη 4.1 ή μετακινούνται ελεύθερα στο επίπεδο της μεμβράνης, ενώ τα τετραμερή μέσω της αγκυρίνης και της πρωτεΐνης 4.2 συνδέονται με το σκελετό (Bruce et al., 2003). Στο αμινοτελικό της άκρο προσδένονται αιμοσφαιρίνη, αιμοχρώματα, διάφορα γλυκολυτικά ένζυμα, κινάσες και φωσφατάσες (Ferru et al., 2011) όπως επίσης και αγκυρίνη, πρωτεΐνη 4.1 και πρωτεΐνη 4.2 (Bruce et al., 2003).

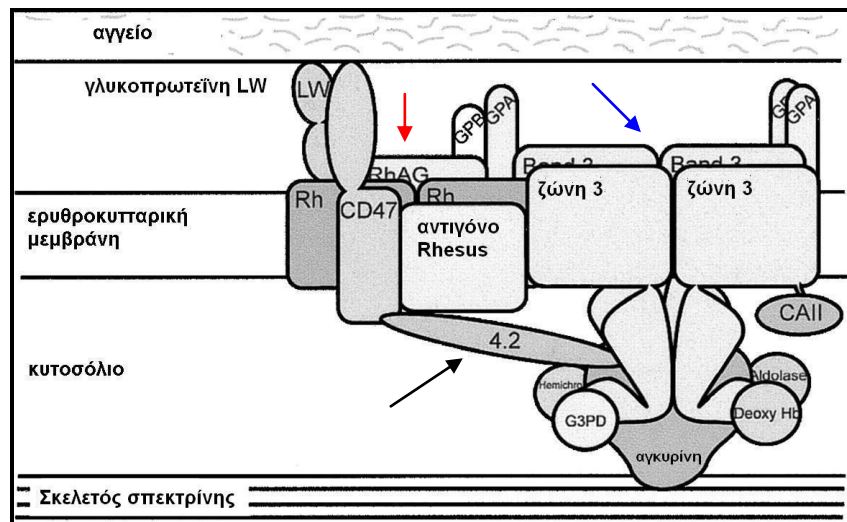


Εικόνα 4: Απεικόνιση της ζώνης 3 όπου φαίνονται και οι θέσεις πρόσδεσης διάφορων πρωτεϊνών στο αμινοτελικό άκρο (Ανατύπωση από Daleke, 2008).

Βασική λειτουργία της ζώνης 3 στους ιστούς είναι η ανταλλαγή ανιόντων με τον εξωκυττάριο χώρο και πιο συγκεκριμένα  $\text{HCO}_3^-$  με τα ανιόντα  $\text{Cl}^-$  του πλάσματος, η οποία επιτελείται από το καρβοξυτελικό της άκρο (Heinrich et al., 2001). Στους πνεύμονες η διαδικασία αντιστρέφεται. Μια δεύτερη λειτουργία της είναι η συμβολή στη διατήρηση της δομής της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και του χαρακτηριστικού σχήματος των ερυθροκυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του συμπλέγματος που σχηματίζει η τετραμερής ζώνη 3 με τη γλυκοφορίνη A, την πρωτεΐνη 4.2 και την αγκυρίνη και τη σύνδεση με το σκελετό σπεκτρίνης. Το σύμπλεγμα της ζώνης 3 μαζί με το σύμπλεγμα Rhesus, συγκροτούν το μακροσύμπλοκο της ζώνης 3 (εικόνα 5) το οποίο ισχυροποιεί ακόμη περισσότερο τη σύνδεση της μεμβράνης με το σκελετό σπεκτρίνης (Bruce et al., 2003). Η διμερής μορφή της ζώνης-3 δεσμεύεται πρωταρχικά με την αδουσίνη και δημιουργεί ένα δεύτερο μακροσύμπλοκο αποτελούμενο από τις εξής πρωτεΐνες: τη γλυκοφορίνη C, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών Rh, την ακτίνη, τη τροπομουσίνη, τη τροπομοντουλίνη, την αδουσίνη, τη δεματίνη, την p55, την πρωτεΐνη 4.1 και 4.2 και μια ποικιλία από γλυκολυτικά ένζυμα (εικόνα 5). Αυτά τα δύο μεγάλα σύμπλοκα πρωτεϊνών καθώς και γέφυρες τους στον σκελετό σπεκτρίνης-ακτίνης είναι υπεύθυνα για τις μορφολογικές και μηχανικές ιδιότητες των ερυθροκυττάρων (Anong et al., 2009). Παράλληλα, οργανώνει και ρυθμίζει ένα άλλο μακροσύμπλοκο γλυκολυτικών ενζύμων (GEs) (Ferru et al., 2011). Συγκεκριμένα, τα ένζυμα GAPDH (γλυκεραλδεϋδη-3-φωσφορική αφυδρογονάση), αλδολάση, PFK (φωσφοφρουκτοκινάση), PK (πυροσταφυλική κινάση) και LDH (γαλακτική αφυδρογονάση) προσδένονται σε μία θέση πυρήνωσης του αμινοτελικού άκρου της ζώνης 3, δημιουργώντας το ενζυμικό σύμπλοκο GE στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης (Puchulu-Campanella et al., 2013). Η ζώνη 3 φαίνεται να σχετίζεται με την απόπτωση των RBCs καθώς το αμινοτελικό της άκρο περιέχει θέσεις διάσπασης από την κασπάση 3 (Mandal et al., 2003). Έτσι η αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη 4.2 αποδυναμώνεται και κατ'επέκταση χάνεται η σύνδεση της μεμβράνης με τον



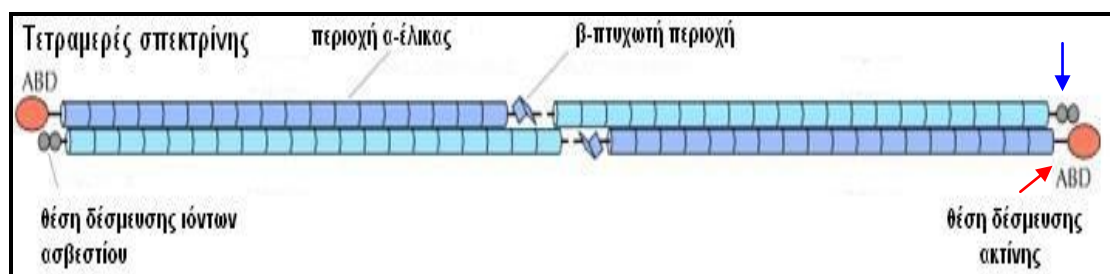
υπομεμβρανικό σκελετό. Τέλος συσσωμάτωση ή πρωτεόλυση της πρωτεΐνης παρατηρείται σε περιπτώσεις κυτταρικής γήρανσης ή οξειδωσης (Arese et al., 2005), δίνοντας γένεση στο επιφανειακό νέο-αντιγόνο γήρανσης (Ando et al., 1993, Arese et al., 2005).



Εικόνα 5: Απεικόνιση του μακροσύμπλοκου της ζώνης 3 όπου διακρίνονται το σύμπλοκο Rhesus (κόκκινο βέλος), το σύμπλοκο της ζώνης 3 (μπλε βέλος) και η σύνδεση μέσω της πρωτεΐνης 4.2 των δύο συμπλόκων μεταξύ τους (μαύρο βέλος) (Ανατύπωση από Bruce et al., 2003).

### Α3.3.2.Π. Σπεκτρίνη

Η σπεκτρίνη παίζει κυρίαρχο ρόλο στο σχηματισμό του υπομεμβρανικού σκελετού, αποτελώντας το 27% του συνόλου των μεμβρανικών πρωτεϊνών (Bennett και Gilligan, 1993). Βρίσκεται υπό τη μορφή ετεροτετραμερών μορίων (εικόνα 6) που σχηματίζονται από δύο α-αλυσίδες και δύο β-αλυσίδες. Τα τετραμερή αποτελούν τη λειτουργική μορφή της σπεκτρίνης και βασική δομική μονάδα του δισδιάστατου σκελετικού δικτύου, καθώς τα διμερή αποικοδομούνται τάχιιστα (Palek και Liu, 1979). Οι α-σπεκτρίνες (MB 240 kDa) αποτελούνται από 22 αυτοτελείς δομικές περιοχές (α1-α22). Οι β-σπεκτρίνες (MB 220 kDa) αποτελούνται από 18 αυτοτελείς δομικές περιοχές, από τις οποίες η πρώτη αποτελεί τη συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης της ακτίνης. Οι θέσεις πρόσδεσης της αγκυρίνης εντοπίζονται στη 14<sup>η</sup> - 15<sup>η</sup> επανάληψη της β1 σπεκτρίνης, στην κεντρική περιοχή του ετεροτετραμερούς (Yasunaga M. et al., 2012).



Εικόνα 6: Απεικόνιση του ετεροτετραμερούς της σπεκτρίνης. Φαίνεται η αντιπαράλληλη διεύθετηση των α- και β- αλυσίδων. Διακρίνονται οι θέσεις πρόσδεσης, της ακτίνης στο αμινοτελικό άκρο της β-αλυσίδας (κόκκινο βέλος) και των ιόντων Ca<sup>+2</sup> στο καρβοξυτελικό άκρο της α-αλυσίδας (μπλε βέλος) (Ανατύπωση από Cooper, 2000).

Οι αλυσίδες της α και β σπεκτρίνης συντίθενται σε περίσσεια. Η έναρξη της σύνδεσης μεταξύ τους, λαμβάνει χώρα στην περιοχή πυρήνωσης που σχηματίζεται από τα επαναλαμβανόμενα τμήματα α19 ως α22 (καρβοξυτελική περιοχή της α-αλυσίδας) και β1 ως β4 (αμινοτελική περιοχή της β-αλυσίδας). Έτσι μία α-αλυσίδα και μία β-αλυσίδα τοποθετούνται σε αντιπαράλληλη διάταξη και συνδέονται μεταξύ τους μη ομοιοπολικά σε πολλά σημεία και στα άκρα τους, σχηματίζοντας ένα ετεροδιμερές μόριο σπεκτρίνης μήκους 100 nm (*Speicher et al., 1992*). Απέναντι από την περιοχή πυρήνωσης, δύο ετεροδιμερή συνδέονται κεφαλή με κεφαλή για να σχηματίσουν ένα ετεροτετραμερές μόριο σπεκτρίνης (*εικόνα 6*) μήκους 200 nm. Αυτή η διαδικασία είναι πολύ σημαντική για τη σταθερότητα της μεμβράνης και λαμβάνει χώρα σε δύο ταυτόσημες θέσεις, οι οποίες συνιστούν την περιοχή αυτοσυγκρότησης ετεροτετραμερούς (*Lux και Palek, 1995*).

Η σπεκτρίνη συνδέεται με μια ποικιλία πρωτεϊνών όπως η ακτίνη, η αγκυρίνη, καλμοντουλίνη, πρωτεΐνη 4.1 κ.α. (*Bennett και Gilligan, 1993*). Η ευκαμψία της πιστεύεται ότι αποτελεί τον πρωταρχικό παράγοντα που επιδρά στην ελαστική παραμόρφωση των ερυθροκυττάρων κατά την κίνησή τους στο κυκλοφορικό σύστημα. Είναι η μεγαλύτερη πρωτεΐνη στον κυτταροσκελετό των ερυθροκυττάρων, συμμετέχει στα **σύμπλοκα ζεύξης** και αποτελεί το κυριότερο συστατικό των οριζόντιων αλληλεπιδράσεων (αυτοσυγκρότηση σπεκτρίνης και σύμπλοκα ζεύξης) στον ερυθροκυτταρικό σκελετό. **Σύμπλοκα ζεύξης** ονομάζονται τα κομβικά σημεία του σκελετού όπου διασταυρώνονται τα τετραμερή της σπεκτρίνης και συνδέονται μεταξύ τους και με τα πρωτονημάτια ακτίνης (*Liu et al., 1989*).

#### **A3.3.2.III. Αγκυρίνη**

Αποτελείται από μία ομάδα πολυπεπτιδίων που καταλαμβάνουν τις ηλεκτροφορητικές ζώνες 2.1, 2.2, 2.3 και 2.6 (*Platt et al., 1993*). Μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις λειτουργικές περιοχές μέσω ήπιας πρωτεόλυσης: μία περιοχή πρόσδεσης της μεμβράνης στο αμινοτελικό άκρο που περιέχει θέσεις σύνδεσης για τη ζώνη 3 και άλλους συνδέτες, μία κεντρική περιοχή που περιέχει θέσεις πρόσδεσης της σπεκτρίνης και ένα καρβοξυτελικό ρυθμιστικό άκρο που επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις αγκυρίνης – πρωτεϊνών (*Bennett και Healy, 2008*).

Η μεμβρανο-συνδεόμενη περιοχή περιέχει 24 διαδοχικές επαναλήψεις, οι οποίες είναι υψηλά συντηρημένες (*Michaely et al., 2002*) και αναδιπλώνονται σε μια σειρά αντιπαράλληλων α-ελίκων συνδεδεμένων με θηλιές, οι οποίες έχουν διάταξη κάθετη στις α-έλικες (*Bennett και Baines, 2001*). Η ρυθμιστική περιοχή απαρτίζεται από πολλαπλές ισομορφές, οι οποίες προκύπτουν με εναλλακτικό μάτισμα (*Gallagher et al., 1997*). Μία από αυτές τις ισομορφές (αγκυρίνη 2.2) ενισχύει την πρόσδεση της αγκυρίνης στη ζώνη 3 και τη σπεκτρίνη. Η αγκυρίνη παρέχει την πρωταρχική διασύνδεση στο μεμβρανικό σκελετό μέσω της πρόσδεσης της σπεκτρίνης, στη λιπιδική διπλοστιβάδα αλληλεπιδρώντας με τη ζώνη 3 και προάγει αλληλεπιδράσεις με το σύμπλεγμα Rh-RhAG. Η παρεμπόδιση οποιασδήποτε από αυτές τις διασυνδέσεις οδηγεί σε σημαντική μείωση της σταθερότητας της μεμβράνης. Η αγκυρίνη επίσης φαίνεται να εμπλέκεται στον τοπικό διαχωρισμό διαμεμβρανικών πρωτεϊνών εντός λειτουργικών περιοχών της μεμβράνης (*Kaushansky et al., 2010*).

#### **A3.3.2.IV. Πρωτεΐνη 4.1**

Η ερυθροκυτταρική πρωτεΐνη 4.1 έχει μοριακό βάρος 79 kDa αποτελείται από 622 αμινοξέα και υπάρχει σε 200.000 αντίγραφα/ερυθροκύτταρο. Διακρίνονται 4 χαρακτηριστικές δομικά και

λειτουργικά ανεξάρτητες περιοχές (domains) στο μόριο: α) 30 kDa (κατάλοιπα 1 μέχρι περίπου 300), β) 16 kDa (κατάλοιπα 300 έως 404), γ) 10 kDa (κατάλοιπα 405 έως 471) και δ) 22/24 kDa (κατάλοιπα 472 έως 622). Η 30 kDa περιοχή είναι υδρόφοβη, πολύ αναδιπλωμένη και μπορεί να περιέχει δισουλφιδικούς δεσμούς. Αλληλεπιδρά *in situ* με τη γλυκοφορίνη C και την p55, καθώς και με τη ζώνη-3 και την καλμοντουλίνη (Baines *et al.*, 2009). Το αμινοτελικό άκρο του μορίου είναι βασικό και περιέχει θέσεις δέσμευσης για ATP, φωσφατιδυλοσερίνη, ζώνη-3 και γλυκοφορίνη. Το καρβοξυτελικό άκρο είναι όξινο. Η ανομοιογένεια στο καρβοξυτελικό άκρο προκαλεί την ύπαρξη δυο ισομορφών 4.1a και 4.1b οι οποίες διαφέρουν κατά 2 kDa. Η διαφορά αυτή στο μοριακό βάρος των δύο ισομορφών της 4.1R είναι αποτέλεσμα μιας μετα-μεταφραστικής τροποποίησης στην ασπαραγίνη, που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της γήρανσης του ερυθροκυττάρου (Inaba *et al.*, 1992). Για το λόγο αυτό άλλωστε η πρωτεΐνη 4.1R αποτελεί πολύ καλό δείκτη της ηλικίας των ερυθροκυττάρων. Ανάμεσα στο αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο υπάρχουν περιοχές που είναι φωσφορυλιωμένες με πρωτεϊνική κινάση C και με μια εξαρτώμενη από c-AMP πρωτεϊνική κινάση. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της 4.1 πιθανόν επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις με τη ζώνη 3, τη γλυκοφορίνη C, τη σπεκτρίνη και την ακτίνη (Diakowski *et al.*, 2006). Στη συντηρημένη περιοχή των 10 kDa βρίσκεται η θέση που προάγει την αλληλεπίδραση μεταξύ σπεκτρίνης και ακτίνης (Lu και Liu, 2007). Μεταλλαγές στο γονίδιο της πρωτεΐνης 4.1 συνδέονται με την κλινική εικόνα της ελλειπτοκυττάρωσης (Delaunay *et al.*, 1996), μείωση της παραμορφωσιμότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων, μηχανική αστάθεια και κυτταρική θραύση. Οι παραπάνω αλλαγές στη φυσιολογία του ερυθροκυττάρου, ενισχύουν την άποψη πως η κλασσική λειτουργία της πρωτεΐνης 4.1 στα ερυθροκύτταρα είναι η συνεισφορά της στις μηχανικές ιδιότητες της μεμβράνης, προωθώντας την αλληλεπίδραση μεταξύ σπεκτρίνης και ακτίνης.

#### **A3.3.2.V. Πρωτεΐνη 4.2 (Παλλιδίνη)**

Είναι ένα περιφερειακό μεμβρανικό πεπτιδίο με μοριακό βάρος 72 kDa, αποτελείται από 691 αμινοξέα και υπάρχει σε αναλογία 200.000 αντίγραφα/ερυθροκύτταρο. Αποτελεί μέρος της οικογένειας των τρανσγλουταμινάσων. Ωστόσο, δεν κατέχει ενεργότητα τρανσγλουταμινάσης διότι της λείπει ένα κρίσιμο κατάλοιπο στην ενεργή θέση τρανσγλουταμινάσης. Βρίσκεται στη μεμβράνη ως τετραμερές, ενώ συνδέεται με την κυτοσολική περιοχή της ζώνης-3, την αγκυρίνη και την πρωτεΐνη 4.1 (Bruce *et al.*, 2003). Επιπλέον η παλλιδίνη φαίνεται να αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα Rhesus (μέσω της CD47) ενώ σταθεροποιεί τη σύνδεση σπεκτρίνης-ακτίνης-αγκυρίνης με τη ζώνη 3. Η παρουσία της κρίνεται απαραίτητη για τη σταθερότητα της μεμβράνης, αφού βλάβες του γονιδίου της οδηγούν σε εύθραυστα ερυθροκύτταρα. Φέρει ομάδες μυριστικού οξέως συνδεδεμένες με N-γλυκοζιδικούς δεσμούς σε κατάλοιπα γλυκίνης, καθώς και ομάδες παλμιτικού οξέως. Σε περιπτώσεις γήρανσης ή ερυθρόπτωσης η σύνδεση της παλλιδίνης με την ζώνη-3 αποδυναμώνεται, αφού στο αμινοτελικό άκρο της τελευταίας υπάρχουν θέσεις διάσπασης για την κασπάση 3 (Mandal *et al.*, 2003), και κατ' επέκταση χάνεται η σύνδεση της μεμβράνης με τον υπομεμβρανικό σκελετό.

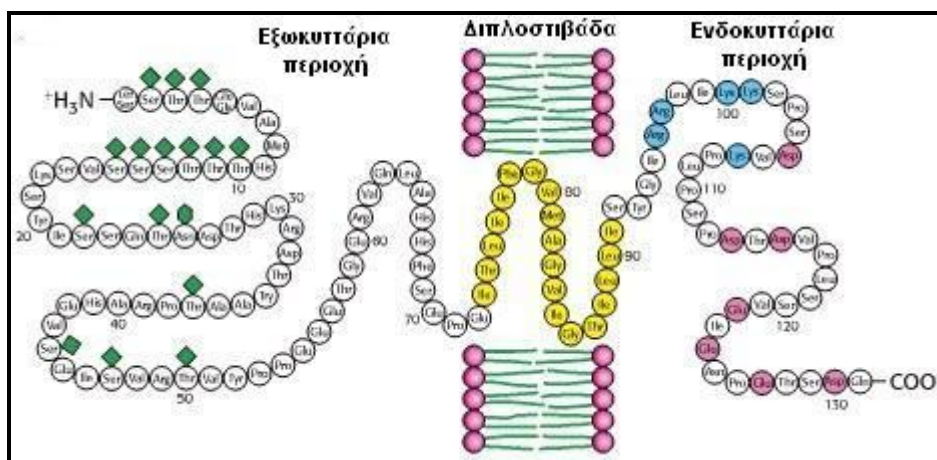
#### **A3.3.2.VI. Γλυκοφορίνες (PAS)**

Οι ζώνες **PAS** (Periodic Acid Schiff) αποτελούνται από μόρια γλυκοφορινών, οι οποίες συνιστούν μία ομάδα πρωτεϊνών πλούσιων σε υδατάνθρακες (σιαλικά οξέα, υψηλός βαθμός γλυκοζυλίωσης). Οι γλυκοφορίνες συνιστούν πάνω από 60% του καθαρού αρνητικού φορτίου στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων. Έτσι, μπορούν να ρυθμίσουν τις αλληλεπιδράσεις των



ερυθροκυττάρων μεταξύ τους (ομοτυπικές) αλλά και με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Συνιστούν το 2% της πρωτεϊνικής μάζας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Delaunay, 1995c). Με διαχωρισμό των ερυθροκυτταρικών μεμβρανικών πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ειδική ανίχνευση με χρώση PAS διακρίνονται 4 κύριες πρωτεΐνες: η A (GrA), η B (GrB), η C (GrC) και η D (GrD). Με μεθόδους μοριακής ανάλυσης ανακαλύφτηκε και ένα πέμπτο μέλος της οικογένειας, η GrE (Colin, 1995). Οι γλυκοφορίνες διακρίνονται σε δυο ομάδες από τις οποίες η πρώτη περιλαμβάνει τις A, B, E που χαρακτηρίζονται ως κύριες, και η δεύτερη τις C, D που χαρακτηρίζονται ως δευτερεύουσες.

Η GrA είναι η κύρια διαμεμβρανική σιαλογλυκοπρωτεΐνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων και ρυθμιστική πρωτεΐνη του συμπληρώματος. Είναι φωσφορυλιωμένη και λειτουργεί ως φορέας του πλασμοδίου της ελονοσίας. Το μόριο της γλυκοφορίνης (GrA) (εικόνα 7), έχει 35 αμινοξικά κατάλοιπα στην κυτοσολική πλευρά, 32 κατάλοιπα που διαπερνούν τη λιπιδική διπλοστιβάδα και 64 αμινοξέα στον εξωκυττάριο χώρο που συνδέονται με σιαλικά οξέα. Μαζί με τη ζώνη-3 συνεισφέρουν στις μηχανικές ιδιότητες της μεμβράνης (Prchal et al., 1987). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη 4.1, τη ζώνη-3 και την παλλιδίνη στη μεμβράνη των ώριμων ερυθρών αιμοσφαιρίων (Heller et al., 1993). Σε αντίθεση με τις κύριες γλυκοφορίνες οι δευτερεύουσες διαδραματίζουν ρόλο στη διατήρηση του σχήματος και στην ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης του ερυθρού αιμοσφαιρίου (Yawata, 1996). Η GrC αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη 4.1 και την p55 για το σχηματισμό του τριαδικού συμπλόκου, που συνιστά ένα κομβικό σημείο στήριξης του υπομεμβρανικού σκελετού (Nunomura et al., 2011).



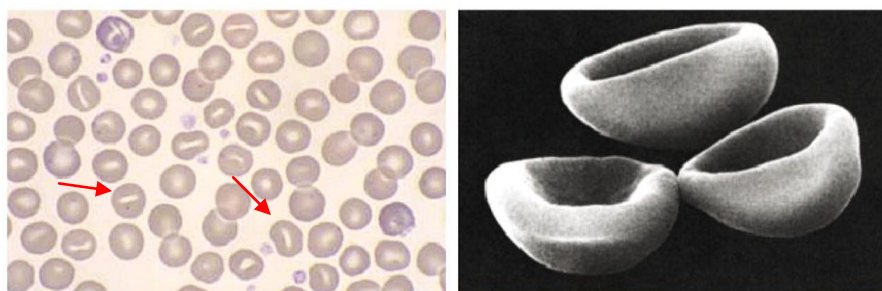
Εικόνα 7: Απεικόνιση του μορίου της γλυκοφορίνης. Οι πράσινοι ρόμβοι στο εξωκυττάριο τμήμα υποδεικνύουν θέσεις πρόσδεσης υδατανθρακικών αλυσίδων (Ανατύπωση από Berg et al., 2002).

### **A3.3.2.VII. Στοματίνη (Ζώνη-7.2b)**

Είναι μία μεμβρανοσυνδεδεμένη πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 31 kDa, αποτελεί μέλος του συμπλέγματος της ζώνης-7 και εμπλέκεται στον έλεγχο της διαπερατότητας των ιοντικών καναλιών και την οργάνωση λιπιδικών περιοχών (Wang και Morrow, 2000). Η στοματίνη φωσφορυλιώνεται, ενώνεται με μόρια παλμιτικού οξέος και στο μόριο της υπάρχουν θέσεις γλυκοζυλίωσης. Θεωρείται η κύρια πρωτεΐνη των λιπιδικών σχεδίων, η οποία αλληλεπιδρά με τις φλοτιλίνες (Salzer et al., 2002). Σε περιπτώσεις αύξησης των επιπέδων ενδοκυτταρικού  $Ca^{+2}$  εντοπίζεται στα μικροκυστίδια (Salzer και Prohaska, 2003). Επίσης, έχει δειχθεί ότι η στοματίνη ανοσοκατακρημνίζεται με το μεταφορέα γλυκόζης (Khan et al., 2008). Η αλληλεπίδραση με το μεταφορέα γλυκόζης, η οποία

περιλαμβάνει την καρβοξυτελική περιοχή του GLUT1, μπορεί να οδηγήσει σε μια δομική αλλαγή, εμποδίζοντας τη διαπερατότητα της γλυκόζης από τον πόρο διευκολύνοντας παράλληλα την εισροή αφυδροασκορβικού οξέος (Montel-Hagen *et al.*, 2008).

Η στοματίνη οφείλει το όνομά της στο γεγονός ότι παρατηρείται ανεπάρκειά της σε μία ομάδα ασθενών με κληρονομική στοματοκυττάρωση. Η κληρονομική στοματοκυττάρωση ή υδροκυττάρωση είναι μία αιμολυτική αναιμία με συνήθως σοβαρή κλινική εικόνα, που αφορά το περιεχόμενο του κυττάρου σε νερό. Το βασικό στοιχείο για τη διάγνωση είναι η εμφάνιση ερυθροκυττάρων με μία καλά καθορισμένη σχισμή αντί της κανονικής συμπίεσης και η ανίχνευση τροποποιημένων συγκεντρώσεων ιόντων στο ερυθροκύτταρο (εικόνα 8). Η οσμωτική σταθερότητα είναι ελαττωμένη, ως αποτέλεσμα της περίσσειας νερού στο κύτταρο. Η σπληνεκτομή είναι συχνά απαραίτητη στα πρώτα στάδια της ζωής των ασθενών. Χαρακτηριστικό εύρημα αποτελεί η απουσία ή η ελάττωση της στοματίνης σε ασθενείς με κληρονομική στοματοκυττάρωση χωρίς όμως οι υπεύθυνες μεταλλάξεις να αφορούν στο γονίδιο της στοματίνης (Delaunay *et al.*, 1999, Delaunay, 1999).



**Εικόνα 8:** **Αριστερά:** Φωτογραφία ερυθροκυττάρων ασθενούς με κληρονομική στοματοκυττάρωση από φωτονικό μικροσκόπιο. Μεγάλο ποσοστό των ερυθροκυττάρων εμφανίζει τη χαρακτηριστική σχισμή στο μέσο (κόκκινα βέλη). **Δεξιά:** Ηλεκτρονιογραφία στοματοκυττάρων από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. (Ανατύπωση από Flatt και Bruce, 2009).

### **A3.3.2.VIII. Υδατοπορίνη CHIP28**

Η υδατοπορίνη (AQP1 ή CHIP28) είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 28 kDa και μπορεί να είναι γλυκοζυλιωμένη. Εντοπίζεται σε αφθονία στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων και τα νεφρικά σωληνάκια, καθώς επίσης και σε επιθήλια με υψηλή διαπερατότητα στο νερό (Nielsen *et al.*, 1993). Αποτελείται από τρεις διαμεμβρανικές περιοχές με δομή  $\alpha$ -έλικας, ενώ και τα δύο της άκρα βρίσκονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης (Murata *et al.*, 2000). Σχηματίζει ομοτετραμερή σύμπλοκα στη μεμβράνη και λειτουργεί ως πρωτεϊνικός διάυλος επιλεκτικός για το νερό (Preston *et al.*, 1994). Ωστόσο κάθε μονομερές λειτουργεί ως ανεξάρτητο κανάλι μορίων νερού. Η φυσιολογία της υδατοπορίνης εξυπηρετεί, επιπλέον, μοριακά και κυτταρικά γεγονότα των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η υψηλή διαπερατότητα νερού ευνοεί ενεργειακά την ερυθροκυτταρική μεμβράνη οδηγώντας την σε κυματισμούς (ή ταλαντώσεις). Οι κινήσεις αυτές, εκτός από το γεγονός ότι καταναλώνουν το ελάχιστο της ενέργειας μετατοπίζοντας νερό, παίζουν σημαντικό ρόλο και στην κίνηση των ερυθροκυττάρων μέσω των τριχοειδών. Τέλος, η υψηλή διαπερατότητα της μεμβράνης επιτρέπει την ταυτόχρονη μετατόπιση των μορίων του νερού με ταχεία είσοδο και έξοδο ιόντων όπως  $\text{Cl}^-$  και  $\text{HCO}_3^-$  και διαλυμένες ουσίες, όπως γλυκόζη, ενώ οι

μοριακοί όγκοι αυτών των ιόντων και των μορίων είναι σημαντικά υψηλότεροι από εκείνον του νερού (Benga, 2012).

#### **A3.3.2.IX. Ακτίνη (Ζώνη 5)**

Υπάρχουν περίπου 500.000 μόρια μονομερούς σφαιρικής G-ακτίνης σε κάθε ερυθροκύτταρο. Αυτά πολυμερίζονται ανά 10-12 μονομερή και σχηματίζουν κοντά νημάτια F-ακτίνης. Η ακτίνη βρίσκεται στο σκελετό με τη μορφή ολιγομερών, που το καθένα έχει 12-17 μόρια G-ακτίνης και 1 μόριο τροπομουσίνης (Lu και Liu, 2007). Στα ερυθρά αιμοσφαίρια παρατηρείται συγκεκριμένη ισομορφή της ακτίνης, η β-ακτίνη. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της είναι ότι τα νημάτιά της είναι πολύ κοντύτερα, σταθερότερα και με πολύ μικρότερο ρυθμό ανακύκλωσης από τα νημάτια της ακτίνης που βρίσκονται σε άλλα κύτταρα (Delaunay et al., 1996). Η β-ακτίνη είναι η καταλληλότερη για το σχηματισμό νηματίων, λόγω της ιδανικής δευτεροταγούς της δομής και της αλληλεπίδρασής της με άλλες πρωτεΐνες συνδέτες (Delaunay, 1995b). Η φυσική θέση της ακτίνης στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων είναι μαζί με τη σπεκτρίνη στα **σύμπλοκα ζεύξης**. Η δημιουργία του συμπλόκου προϋποθέτει όμως και τη συνεργατική δράση της πρωτεΐνης 4.1 και της τροπομουσίνης (Ribeiro et al., 2000).

#### **A3.3.2.X. Μυοσίνη, Τροπομυοσίνη, Τροπομοντουλίνη**

Οι ερυθροκυτταρικές τροπομυοσίνες (29 και 27 kDa) διαφέρουν από τις μυϊκές στο ότι διαθέτουν ασθενέστερη ικανότητα αυτοσυγκρότησης. Με την πρόσδεσή τους στην ακτίνη ισχυροποιούν τα πρωτονημάτια, σταθεροποιούν τον πολυμερισμό τους και έμμεσα ρυθμίζουν τον αριθμό των μορίων σπεκτρίνης που δένονται σε κάθε πρωτονημάτιο (Sung et al., 2000). Η τροπομοντουλίνη έχει MB 40,6 kDa και αναστέλλει τη σύνδεση της τροπομυοσίνης στην ακτίνη, καθώς και με τη δεματίνη (Lorenzo et al., 1994). Η μυοσίνη είναι επίσης παρούσα στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και αλληλεπιδρά με την ακτίνη και πιθανά με την πρωτεΐνη 4.1 (Hardy et al., 1979).

#### **A3.3.2.XI. Δεματίνη (Ζώνη 4.9)**

Η δεματίνη αποτελείται από δύο συγγενικές υπομονάδες 52 και 48 kDa αντίστοιχα. Η πρωτεΐνη 4.9 σχηματίζει τριμερή και πακετάρει την ακτίνη σε δέσμες. Ο βασικός ρόλος της δεματίνης αφορά στη ρύθμιση της λειτουργίας και της μηχανικής σταθερότητας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Αποτελεί υπόστρωμα πολλών πρωτεϊνικών κινασών, αλλά μόνο η φωσφορυλίωση από την εξαρτώμενη από το c-AMP πρωτεϊνική κινάση αναστέλλει την ενεργότητα πακεταρίσματος της ακτίνης (Koshino et al., 2012).

#### **A3.3.2.XII. Αδουσίνη**

Η αδουσίνη προωθεί τη σύνδεση σπεκτρίνης-ακτίνης, ενώ αυτή η σύνδεση αναστέλλεται όταν η καλμοντουλίνη δένεται στην αδουσίνη. Η αδουσίνη αποτελείται από μία α- και μία β-υπομονάδα με MB 103 και 97 kDa αντίστοιχα. Οι δύο υπομονάδες περιέχουν τρεις περιοχές που από το N- στο C-τελικό άκρο, περιλαμβάνουν: τη σφαιρική περιοχή 39 kDa, τη συνδετική περιοχή 9 kDa και την ινώδη περιοχή 33 kDa που περιλαμβάνει κυρίως υδρόφοβα κατάλοιπα. Το καρβοξυτελικό άκρο των δύο υπομονάδων περιλαμβάνει μια πανομοιότυπη δομή 22 αμινοξέων (Joshi et al., 1991). Η αδουσίνη απαντάται σε πολλούς ιστούς και οι υποομάδες της κωδικοποιούνται από διαφορετικά

γονίδια. Στο ερυθρό αιμοσφαίριο υπάρχουν 15.000 τετραμερή αδουσίνης και η φυσική τους θέση εντόπισης είναι στο **σύμπλοκο ζεύξης**. Γενικά, προάγει την αλληλεπίδραση ακτίνης-σπεκτρίνης ανεξάρτητα από την πρωτεΐνη 4.1, βοηθώντας έτσι στη σταθεροποίηση του σκελετού των ερυθροκυττάρων (Minetti και Gana, 2003). Ουσιαστικά, καλύπτει τα άκρα της ακτίνης και έτσι εμποδίζει τη μεταβολή του μήκους των πρωτονηματίων, ευνοώντας την πρόσδεση της σπεκτρίνης. Επιπρόσθετα, συνδέεται με μεγάλη συγγένεια με  $Ca^{+2}$ /καλμοντουλίνη και αποτελεί υπόστρωμα για τις πρωτεϊνικές κινάσες A και C. Η κάλυψη της ακτίνης και η στρατολόγηση της σπεκτρίνης αναστέλλονται με φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση C των περιοχών και πρόσδεση της καλμοδουλίνης. Από την άλλη πλευρά φωσφορυλίωση μέσω της Rho-κινάσης, ενισχύει τις αλληλεπιδράσεις ακτίνης-αδουσίνης και τη στρατολόγηση σπεκτρίνης (Robledo et al., 2008). Τέλος, σχηματίζει μία γέφυρα που συνδέει τα δίκτυα σπεκτρίνης-ακτίνης του κυτταροσκελετού με τη ζώνη 3, την κύρια μεμβρανική πρωτεΐνη της διπλοστιβάδας. Συνεπώς, η αδουσίνη τοποθετείται σε τέτοια θέση ώστε να λειτουργεί αποτελεσματικά σταθεροποιώντας τη μεμβράνη και συμβάλλοντας στη ρευστότητά της (Pariser et al., 2005).

#### **A3.3.2.XIII. Πρωτεΐνη p55**

Η πρωτεΐνη p55 είναι ένα πολυπεπίδιο με μοριακό βάρος 55 kDa που περιλαμβάνει 466 αμινοξέα. Υπάρχουν 40.000 διμερή p55 σε κάθε ερυθροκύτταρο. Στο μόριό της υπάρχουν άφθονα μόρια παλμιτικού οξέος. Αντιπροσωπεύει μια από τις ζώνες της περιοχής 4.5, όπως εμφανίζονται σε πήκτωμα SDS-PAGE. Η καρβοξυτελική περιοχή της παρατηρήθηκε να έχει ενεργότητα γουανυλικής κινάσης (Chishti, 1998). Το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος X. Η πρωτεΐνη αυτή σχηματίζει σύμπλοκο με την 4.1 και την γλυκοφορίνη C, που ρυθμίζει τη σταθερότητα και τις μηχανικές ιδιότητες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Alloisio et al, 1993). Αυτός ο συνεντοπισμός προτάθηκε από την έλλειψη της p55 σε άτομα που στερούνταν ολοκληρωτικά πρωτεΐνη 4.1 (φορείς κληρονομικής ελλειπτοκυττάρωσης) ή γλυκοφορίνη C (Delaunay et al., 1996). Επίσης έχει δειχθεί ότι η p55 των ερυθροκυττάρων διαδραματίζει ρόλο στην πόλωση των ουδετερόφιλων (Quinn et al., 2009).

#### **A3.3.2.XIV. Μεταφορέας της Γλυκόζης (GLUT1)**

Όπως η πρωτεΐνη p55, έτσι και η πρωτεΐνη που μεταφέρει μόρια γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου, εντοπίζεται στην περιοχή των ζωνών 4.5 σε SDS-PAGE πήκτωμα. Ο μεταφορέας γλυκόζης απαντά σε αναλογία 700.000 αντίγραφα/κύτταρο, έχει MB 55 kDa και αποτελείται από 492 αμινοξέα. Το μόριό του περιλαμβάνει 12 μεμβρανοσυνδεδεμένες περιοχές με το καρβοξυτελικό και το αμινοτελικό άκρο να βρίσκονται στο κυτοσόλιο. Δεν είναι ερυθροειδική πρωτεΐνη καθώς εκφράζεται και σε άλλους ιστούς. Μέσω του μεταφορέα επιτυγχάνεται η παθητική διάχυση της γλυκόζης. Από τη μεμβράνη απομονώνεται με τη μορφή διμερών ή τετραμερών, τα τετραμερή είναι όμως η φυσική κατάσταση της πρωτεΐνης *in vivo* (Khan et al., 2008). Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων GLUT1 στις μεμβράνες των κυττάρων αυξάνονται από τα μειωμένα επίπεδα γλυκόζης και μειώνονται με την αύξηση των επιπέδων γλυκόζης (Tanner, 1993). Πρόσφατα βρέθηκε πως ο μεταφορέας γλυκόζης-1 έχει και κρίσιμο δομικό ρόλο στη μεμβράνη συμμετέχοντας σε ειδικό σύμπλοκο. Πιο συγκεκριμένα ο GLUT1 σχηματίζει ένα ειδικό σύμπλοκο στο οποίο συμμετέχουν οι πρωτεΐνες αδουσίνη και δεματίνη. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες μπορούν να συνδέονται με τον GLUT1 (στην περιοχή των **σμπλόκων ζεύξης**) σχηματίζοντας ένα μακροσύμπλοκο που πιθανόν ενισχύει τη

σύνδεση του υπομεμβρανικού σκελετού με τη μεμβράνη (Khan et al., 2008). Επιπλέον η αλληλεπίδραση με τη στοματίνη και άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι πιθανό να επηρεάζει τόσο τη σταθερότητα του συμπλόκου όσο και την ενεργότητα μεταφοράς γλυκόζης (Zhang et al., 2001). Όσον αφορά στην ενεργότητα μεταφοράς γλυκόζης, με δεδομένο πως ο άνθρωπος στερείται της ικανότητας de novo σύνθεσης ασκορβικού οξέος, ο μεταφορέας γλυκόζης των ερυθρών αιμοσφαιρίων αναπληρώνει αυτή την έλλειψη πραγματοποιώντας μεταφορά του αφυδροασκορβικού μέσα στα κύτταρα. Η στοματίνη προσδένεται στο GLUT1 και αλλάζει την προτίμησή του, ως προς το υπόστρωμα που μεταφέρει, από γλυκόζη σε αφυδροασκορβικό. Μέσα στα ερυθρά αιμοσφαίρια το αφυδροασκορβικό ανάγεται σε ασκορβικό οξύ και απελευθερώνεται πίσω στο πλάσμα, αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωση της βιταμίνης C σε αυτό (Montel-Hagen et al., 2008).

#### **A3.3.2.XV. Ca<sup>+2</sup> - ATPάση**

Η αντλία ιόντων ασβεστίου είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη 140 kDa. Μέσω υδρόλυσης ATP συντελείται έξοδος ιόντων ασβεστίου με ταυτόχρονη είσοδο ιόντων υδρογόνου ενώ ταυτόχρονα απαιτείται η παρουσία ιόντων μαγνησίου εντός του ερυθροκυττάρου. Η ενζυμική δραστηριότητα ρυθμίζεται από το σύμπλοκο καλμοντουλίνης/Ca<sup>+2</sup> (Noble και Herchuelz, 2007).

#### **A3.3.2.XVI. Σύστημα Rhesus (Rh)**

Οι πρωτεΐνες του συστήματος Rhesus και συγκεκριμένα οι D, C, c, E και e εκφράζονται στα ερυθροκύτταρα και αλληλεπιδρούν με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες RhAG, LW, CD47 και την GpB (εικόνα 5). Η αλληλεπίδραση του μακροσυμπλόκου των πρωτεϊνών του συστήματος Rh με τον υπομεμβρανικό σκελετό των RBCs επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των πρωτεϊνών 4.2 και αγκυρίνης, υποβοηθώντας τις μηχανικές ιδιότητες της μεμβράνης. Το σύστημα Rh είναι από τα πιο ανοσογενετικά και πολυμορφικά συστήματα στον άνθρωπο όσον αφορά τις ομάδες αίματος (Callaghan et al., 1993). Τα αντιγόνα του συστήματος διαδραματίζουν πολύ σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στη διατήρηση και ρύθμιση της χημικής σταθερότητας της μεμβράνης, καθώς όταν λείπουν (π.χ. σύνδρομο Rh<sub>null</sub>) παρατηρείται οσμωτική ευθραυστότητα και ανωμαλίες στη μορφολογία των ερυθρών αιμοσφαιρίων και την κατανομή των λιπιδίων στη μεμβράνη (Cartron, 1999; Huang et al., 2000).

Όσον αφορά στη δομή του συμπλόκου Rh γνωρίζουμε τα παρακάτω: ο πυρήνας του συμπλόκου (εικόνα 5) είναι ένα τετραμερές αποτελούμενο από δύο Rh και δύο RhAG υπομονάδες (Eyers et al., 1994). Συμπληρωματικά απαντώνται CD47 αλυσίδες και οι πρωτεΐνες LW και GpB οι οποίες συνδέονται στο σύμπλοκο μη ομοιοπολικά (Anstee, 1993). Η σταθεροποίηση του συμπλόκου επιτυγχάνεται με τη σύνδεση στον κυτταροσκελετό, μέσω του καρβοξυτελικού και αμινοτελικού άκρου των πρωτεϊνών Rh και RhAG (Eyers et al., 1994). Οι πρωτεΐνες Rh και RhAG ονομάζονται κύριες πρωτεΐνες του συμπλόκου, ενώ οι CD47, LW και GpB δευτερεύουσες. Απουσία των κύριων πρωτεϊνών οδηγεί σε αδυναμία σταθεροποίησης του συμπλόκου στο εξωτερικό της μεμβράνης. Σ αυτή την αδυναμία οφείλονται και οι ανωμαλίες που εμφανίζονται σε ασθενείς με σύνδρομο Rh<sub>null</sub> (Cartron, 1999; Huang et al., 2000).

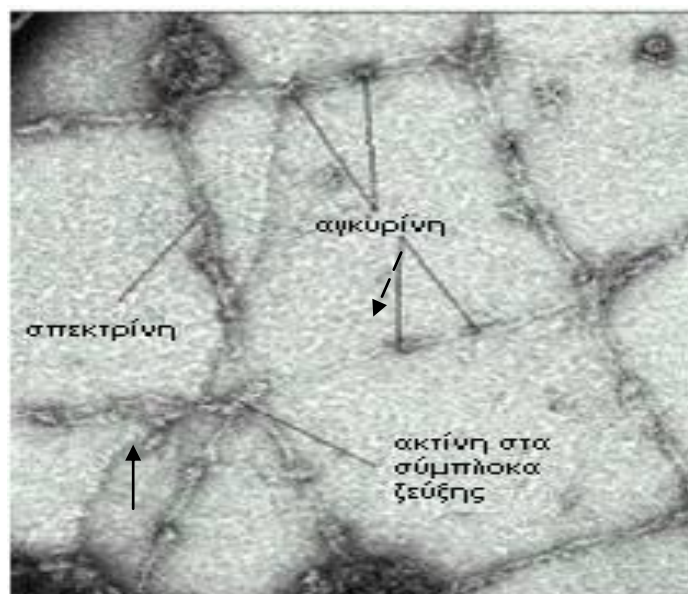
### A3.3.2.XVII. Πρωτεΐνη CD47

Η πρωτεΐνη CD47 ονομάζεται και IAP (Integrin Associated Protein), αντιπροσωπεύει ένα ακόμα μέλος των ανοσοσφαιρινών και είναι εκτενώς κατανεμημένη στο ερυθροκύτταρο. Είναι μια επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη με MB 50 kDa που συμμετέχει στο σύμπλοκο Rhesus. Μόνο η ισομορφή-2 της πρωτεΐνης εκφράζεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ οι άλλες γενικά ισομορφές της εκφράζονται σε πλήθος ιστών. Αλληλεπιδρά λειτουργικά με τις ιντεγκρίνες  $\alpha\beta3$  και  $\alpha2\beta1$ , και το σύμπλοκο που σχηματίζουν αλληλεπιδρά με τη σειρά του με πρωτεΐνες G φτιαχόντας ετεροτριμερή. Το ετεροτριμερές φαίνεται να εμπλέκεται σε μονοπάτια σηματοδότησης όπως στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, την κυτταρική προσκόλληση και τη φαγοκυττάρωση (Brown και Frazier, 2001). Η πρωτεΐνη CD47 επίσης αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη SIRP $\alpha$  (signal regulatory protein  $\alpha$ ) των μακροφάγων, οδηγώντας σε παρεμπόδιση της ενεργοποίησής τους και της ερυθροφαγοκυττάρωσης. Σε περιπτώσεις γήρανσης, τόσο *in vivo* (στα ποντίκια) όσο και *ex vivo* (στον άνθρωπο) έχει παρατηρηθεί μείωση της πρωτεΐνης CD47, με επακόλουθο τη φαγοκυττάρωση των αντίστοιχων ερυθροκυττάρων (Oldenborg, 2004). Ουσιαστικά η παρουσία CD47 στη μεμβράνη αποτελεί δείκτη επιβίωσης για τα ερυθρά αιμοσφαίρια και σήμα “non eat me” απέναντι στα μακροφάγα. Πρόσφατα βρέθηκε πως η CD47 μπορεί να υποστεί αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσής της τόσο σε γηρασμένα ερυθροκύτταρα (*in vitro*) όσο και κάτω από συνθήκες στρες κάτι το οποίο έχει ως αποτέλεσμα η τροποποιημένη μορφή (μετά από σύνδεση με θρομβοσπονδίνη του πλάσματος) να συνδέεται με τον υποδοχέα SIRP $\alpha$  των φαγοκυττάρων λειτουργώντας πλέον ως σήμα εκκαθάρισης από τα φαγοκύτταρα (Burger et al., 2012).

### A3.4. Διευθέτηση Μεμβρανικών και Σκελετικών Πρωτεϊνών

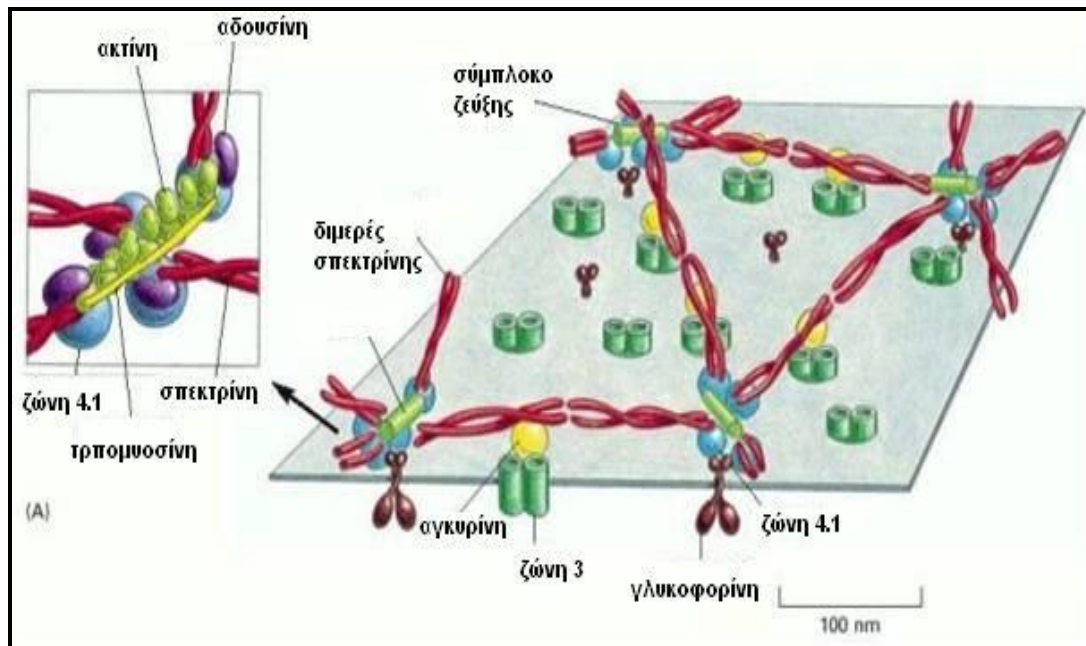
Στα ερυθρά αιμοσφαίρια ο σκελετός ονομάζεται **υπομεμβρανικός**, καθώς αναπτύσσεται ως ένα δισδιάστατο πρωτεϊνικό έλασμα στην εσωτερική πλευρά της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Σε αντίθεση με τον κυτταροσκελετό των εμπύρηνων κυττάρων ο ερυθροκυτταρικός σκελετός περιέχει μόνο πρωτονημάτια ακτίνης (δεν εντοπίζονται μικροσωληνίσκοι ή ενδιάμεσα ινίδια). Είναι ιδιαίτερα αναπτυγμένος και εξασφαλίζει σε μεγάλο ποσοστό τις μηχανικές ιδιότητες της μεμβράνης (μηχανική σταθερότητα, ανθεκτικότητα, ελαστική παραμόρφωση). Υπό φυσιολογικές συνθήκες περίπου το 65% της κυτοσολικής επιφάνειας καλύπτεται από τα σκελετικά δομικά στοιχεία. Ο σκελετός αναλύεται σε ένα πλέγμα πολυγωνικών, κυρίως εξαγωνικών, δομών (Liu et al., 1987). Οι πλευρές καθώς και οι ακτίνες αυτών των πολυγωνικών σχηματισμών, αντιπροσωπεύουν εκτεταμένα τετραμερή σπεκτρίνης. Η σπεκτρίνη αποτελεί το 75% του σκελετού και στο κέντρο περίπου των τετραμερών της διακρίνονται σφαιρικές δομές οι οποίες αποτελούνται από αγκυρίνη και ζώνη-3 (εικόνα 9) (Derick et al., 1992). Τα κομβικά σημεία του σκελετού όπου διασταυρώνονται τα τετραμερή της σπεκτρίνης συνδέονται μεταξύ τους και με τα πρωτονημάτια ακτίνης και ονομάζονται **σύμπλοκα ζεύξης**.





Εικόνα 9: Ηλεκτρονιογραφία μετά από αρνητική χρώση στην οποία φαίνονται οι σφαιρικές δομές που αποτελούνται από αγκυρίνη και ζώνη-3 (μαύρο διακεκομμένο βέλος), καθώς επίσης και τα σύμπλοκα ζεύξης (μαύρο βέλος) (Ανατύπωση από Alberts et al., 2002).

Τα **σύμπλοκα ζεύξης** αντιπροσωπεύουν οριζόντιες διαμεμβρανικές αλληλεπιδράσεις στο επίπεδο του σκελετού (εικόνα 10). Υπάρχουν 30.000 σύμπλοκα ζεύξης στο σκελετό και σε κάθε ένα από αυτά διασταυρώνονται 4-6 τετραμερή σπεκτρίνης. Η σπεκτρίνη έχει θέσεις πρόσδεσης για την ακτίνη, την καλμοντουλίνη και την αγκυρίνη. Τα διμερή της σπεκτρίνης προσδέονται στα πρωτονημάτια ακτίνης αλλά δεν μπορούν να τα συνδέσουν μεταξύ τους, ιδιότητα που έχουν μόνο τα τετραμερή. Η πρωτεΐνη 4.1 σταθεροποιεί την επαφή σπεκτρίνης-ακτίνης. Επίσης η αδουσίνη συνδέεται με τα πρωτονημάτια της ακτίνης ως πρωτεΐνη κάλυψης και ως προαγωγός της συγκρότησης της σπεκτρίνης (Bennett και Baines, 2001). Πλευρικά των πρωτονηματίων της ακτίνης βρίσκεται η τροπομυοσίνη η οποία καθορίζει το μήκος τους, ενώ στο αντίθετο άκρο εντοπίζεται ένα μόριο τροπομοντουλίνης (Sung et al., 2000). Τέλος η πρωτεΐνη 4.1 αλληλεπιδρά και με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως η GrC και η ζώνη-3 κλειδώνοντας ουσιαστικά το σκελετό στη μεμβράνη (Bennett και Baines, 2001).



**Εικόνα 10:** Απεικόνιση των οριζόντιων αλληλεπιδράσεων που οδηγούν στο σχηματισμό των συμπλόκων ζεύξης. Διακρίνονται σχεδόν όλες οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διαδικασία. (A) Αριστερά φαίνεται σε λεπτομέρεια η δομή του συμπλόκου (Ανατίπωση από Alberts et al., 2002).

Λόγω των αλληλεπιδράσεων με τον υπομεμβρανικό σκελετό, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες εμφανίζουν περιορισμένη πλευρική κινητικότητα (Branton et al., 1981). Το δίκτυο της σπεκτρίνης-ακτίνης συνδέεται με τη μεμβρανική διπλοστιβάδα, κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασης της σπεκτρίνης με την αγκυρίνη, η οποία με τη σειρά της προσδένεται στη ζώνη-3. Το δεύτερο σημείο σύνδεσης, μεταξύ σκελετού και μεμβράνης, βρίσκεται στις θέσεις των συμπλόκων ζεύξης και περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός συμπλόκου ανάμεσα στις πρωτεΐνες σπεκτρίνη, ακτίνη, πρωτεΐνη 4.1, γλυκοφορίνη C και πρωτεΐνη p55 (Bennett και Baines, 2001). Το τρίτο σημείο σύνδεσης είναι μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης της σπεκτρίνης και της πρωτεΐνης 4.1 με τη φωσφατιδυλοσερίνη (Delaunay, 1995a). Σύμφωνα με τελευταία μοντέλα υπάρχουν κάποια επιπλέον σημεία αλληλεπίδρασης κυτταροσκελετού και μεμβράνης. Το πρώτο από αυτά δημιουργείται από την αλληλεπίδραση της αγκυρίνης με την πρωτεΐνη RhAG, με αποτέλεσμα τη σύνδεση του συμπλόκου Rhesus με το δίκτυο σπεκτρίνης (Nicolas et al., 2003). Ένα ακόμα σημείο κατακόρυφης σταθεροποίησης αποτελεί το ειδικό σύμπλοκο στο οποίο συμμετέχουν ο GLUT1 και οι πρωτεΐνες αδουσίνη και δεματίνη. Η σύνδεση αυτή φαίνεται να δημιουργεί μία ακόμα «γέφυρα» ενίσχυσης ανάμεσα στο σκελετό και τη λιπιδική διπλοστιβάδα (Khan et al., 2008).

Η αυτοσυγκρότηση του σκελετού φαίνεται να υπόκειται σε ρύθμιση από βοηθητικές πρωτεΐνες και μηχανισμούς, όπως το σύστημα  $Ca^{+2}$ /καλμοντουλίνης και καλπαΐνης, η φωσφορυλίωση και άλλες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (Luna και Hitt, 1992). Οι τελευταίες διακρίνονται σε δομικές και ρυθμιστικές. Στις δομικές ανήκουν η αμινοτελική μυριστιλίωση της παλλιδίνης, η οξειδωση, η μη ενζυματική γλυκοζυλίωση και κάποιοι τύποι πρωτεόλυσης. Οι περισσότερες από αυτές είναι μη αντιστρεπτές και συνήθως οδηγούν στην πλήρη αποικοδόμηση των τροποποιημένων πρωτεϊνών. Στις ρυθμιστικές τροποποιήσεις υπάγονται διαδικασίες όπως η



φωσφορυλίωση ή η ακυλίωση των λιπαρών οξέων, οι οποίες συνήθως διευκολύνουν τη λειτουργία των υποστρωμάτων τους και είναι αντιστρεπτές (Cohen και Gascard, 1992).

### **A3.5. Κυτοσολικές Πρωτεΐνες που Σχετίζονται με τη Μembrάνη**

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν ένα πλήθος κυτοσολικών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διεκπεραίωση των λειτουργιών τους. Μία σειρά από ένζυμα, όπως κινάσες, φωσφατάσες, πρωτεάσες, αντιοξειδωτικά ένζυμα κ.α. αποτελούν αναπόσπαστους μηχανισμούς ρύθμισης, που εγγυώνται την εύρυθμη λειτουργία των ερυθροκυττάρων. Τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε περιπτώσεις στρες (μείωση ATP, αιμολυτικές αναιμίες) και γήρανσης πολλές κυτοσολικές πρωτεΐνες συσσωρεύονται κατά μήκος της εσωτερικής επιφάνειας της μεμβράνης (Kriebardis *et al.*, 2007b).

#### **A3.5.1. Καλπαΐνες**

Οι καλπαΐνες είναι μία ομάδα πρωτεϊνών που αποτελείται από τις πρωτεάσες μ- και m-, την καλπαΐνη 10, τις ιστοειδικές καλπαΐνες και τον αναστολέα τους που λέγεται καλπαστατίνη (Sorimachi *et al.*, 1997). Είναι πρωτεάσες κυστεΐνης εξαρτώμενες από ασβέστιο. Στα ερυθροκύτταρα των θηλαστικών συναντώνται οι καλπαΐνες μ- και m- με MB σχεδόν 75 kDa. Πιο συγκεκριμένα, η καλπαΐνη-μ διαμεσολαβεί στη διάσπαση της μεμβρανο-συνδεδεμένης Ca<sup>2+</sup>/ATPάσης, η οποία ρυθμίζει τη μεταφορά ασβεστίου στα ερυθροκύτταρα. Επιπλέον, μεσολαβεί στη πρωτεόλυση της αιμοσφαιρίνης. Ουσιαστικά, η ενεργοποίηση της καλπαΐνης-μ έχει ως αποτέλεσμα τη ρύθμιση των γεγονότων συρρίκνωσης της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων που προκαλείται από την εισροή του ασβεστίου, ενώ πρόσφατα ευρήματα καταδεικνύουν ότι οι καλπαΐνες φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες, όπως η 4.1R (Wieschhaus *et al.*, 2012). Η ενεργοποίησή τους εμπλέκεται σε φαινόμενα και ασθένειες γήρατος καθώς επίσης και στη γήρανση των ερυθροκυττάρων (Tang *et al.*, 2007; Soldati *et al.*, 1996). Αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα της ερυθρόπτωσης η οποία αποτελεί τη χαρακτηριστική μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που συναντάται στα ερυθροκύτταρα (Lang *et al.*, 2014).

#### **A3.5.2. Υπεροξειδοξίνες**

Οι υπεροξειδοξίνες συνιστούν μια «πανταχού παρούσα» οικογένεια υπεροξειδασών με αντιοξειδωτική λειτουργία. Υπάρχουν 6 τύποι στα θηλαστικά, παρόντες σε διάφορους ιστούς του οργανισμού. Στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα εντοπίζεται η υπεροξειδοξίνη-2 (Prx2) με MB 21,8 kDa που χρησιμοποιεί κατάλοιπα κυστεΐνης για να αποσυνθέσει υπεροξείδια. Ανταγωνίζεται αποτελεσματικά με την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης για την εκκαθάριση χαμηλών επιπέδων υπεροξειδίου του υδρογόνου, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που προκύπτουν από την αυτο-οξειδωση της αιμοσφαιρίνης (Low *et al.*, 2008). Η Prx2 βρίσκεται στο κυτοσόλιο αλλά σε περιπτώσεις έντονου οξειδωτικού στρες και αυξημένου ενδοκυτταρικού Ca<sup>+2</sup> προσδένεται στη μεμβράνη (Biondani *et al.*, 2008). Κατά την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων σε ασκούς μετάγγισης παρατηρείται αύξηση πρόσδεσης της Prx2 στη μεμβράνη, τόσο στη μονομερή όσο και στην ολιγομερισμένη μορφή της, προϊόντος του χρόνου (Bosman *et al.*, 2008a).

### **A3.5.3. Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ (Hsp)**

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, εν συντομία Hsp (Heat Shock Proteins), είναι μοριακές συνοδοί που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου. Επιδρούν σε λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και βοηθούν στη σωστή αναδίπλωσή τους ή την απομάκρυνσή τους από το κύτταρο (*Gething και Sambrook, 1992*). Χαρακτηριστική είναι η οικογένεια των Hsp70 η οποία εντοπίζεται και στα ερυθροκύτταρα. Φυσιολογικά είναι μια κυτοσολική πρωτεΐνη, η οποία σε συνθήκες στρες, γήρανσης και κατά την αποθήκευση μετατοπίζεται και προσδένεται στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη (*Gudi και Gupta, 1993; Antonelou et al., 2010a*).

### **A3.5.4. Καθεσίνες**

Είναι μια μεγάλη οικογένεια πρωτεασών ασπαρτικού, η οποία συναντάται σε πολλούς τύπους κυττάρων. Όσον αφορά τα ερυθροκύτταρα η καθεσίνη E είναι μία μεμβρανο-σχετιζόμενη πρωτεάση. Σε περιπτώσεις *in vivo* γήρανσης, παρατηρείται ενεργοποίηση και απελευθέρωση της εν λόγω πρωτεΐνης από τη μεμβράνη προς το κυτοσόλιο (*Yamamoto et al., 1989*).

### **A3.6. Λιπιδικές Σχεδίες**

Οι λιπιδικές σχεδίες είναι λειτουργικά ανεξάρτητες περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, όπου το φωσφολιπιδικό στρώμα εμπλουτίζεται με μόρια σφιγγολιπιδίων και χοληστερόλης. Αποτελούν αδιάλυτες σε απορρυπαντικά περιοχές με μέγεθος που ποικίλει. Ουσιαστικά είναι οργανωμένες συγκεντρώσεις χοληστερόλης, γλυκοσφιγγολιπιδίων και πρωτεϊνών χωρίς κάποιο συγκεκριμένο σχήμα. Δεν παραμένουν ακίνητες, αλλά μετακινούνται πλευρικά ως μονάδα μαζί με τις αγκυροβολημένες σε αυτές GPI-συνδεδεμένες πρωτεΐνες και τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια στη λειτουργία τους, κάτι το οποίο οφείλεται στη διαφορετική τους σύσταση (*Lai, 2003*). Σε συνθήκες ηρεμίας βρίσκονται διάσπαρτες στην κυτταρική μεμβράνη καλύπτοντας έως και το 40% της επιφάνειάς της, ενώ μετά από διέγερση συσσωρεύονται σε αθροίσματα για ενίσχυση του σήματος (*Sacamoto, 2005*).

Όσον αφορά στις λιπιδικές σχεδίες των ερυθροκυττάρων, αντιπροσωπεύουν και αυτές ετερογενείς δομές των οποίων η σύσταση (σε λιπίδια και πρωτεΐνες) διαφέρει από περιοχή σε περιοχή (*Simons και Ikonen, 1997*). Είναι δομές πλούσιες σε μεμβρανοσυνδεδεμένες πρωτεΐνες όπως στοματίνη, φλοτιλίνες και ακετυλοχοληνεστεράση και σε κυτοσολικές όπως συνεξίνη και σορκίνη. Η στοματίνη και οι φλοτιλίνες φαίνεται πως σχηματίζουν ολιγομερή στις λιπιδικές σχεδίες (*Salzer και Prohaska, 2001*).

#### **A3.6.1. Ρόλος των Λιπιδικών Σχεδίων**

Γενικά, ο ρόλος των λιπιδικών σχεδίων είναι κυρίως σηματοδοτικός, καθώς καθοδηγούν τη συμπίκνωση, τη διαμερισματοποίηση ή τον αποκλεισμό υποδοχέων. Στα ερυθρά αιμοσφαίρια έχει βρεθεί πως οι λιπιδικές σχεδίες είναι υπεύθυνες για τη μικροκυστιδιοποίηση (*Greenwalt, 2006*) και για την είσοδο του παρασίτου *Plasmodium falciparum* (*Murphy et al., 2004*) στο εσωτερικό του κυττάρου. Επιπλέον, μελέτες αποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης λαμβάνει χώρα στις εν λόγω περιοχές (*Mandal et al., 2005*).

### **A3.6.2. Σύσταση των Λιπιδικών Σχεδίων**

Τα λιπίδια που απαντώνται στις λιπιδικές σχεδίες είναι η χοληστερόλη, τα γλυκοσφιγγολιπίδια, η σφιγγομυελίνη και τα κορεσμένα γλυκεροφωσφολιπίδια. Διατηρείται κι εδώ η ασυμμετρία ανάμεσα σε εξωτερική και εσωτερική στιβάδα. Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής πλευράς των λιπιδικών σχεδίων είναι συνδεδεμένες με γλυκοζυλοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (GPI), ενώ στην εσωτερική πλευρά εντοπίζονται ακετυλιωμένες κινάσες τυροσίνης της οικογένειας Src. Η προσθήκη παλμιτικής ομάδας είναι το κύριο σήμα που καθοδηγεί τις πρωτεΐνες στις λιπιδικές σχεδίες (*Magee και Parmryd, 2003*). Στα ερυθροκύτταρα εντοπίζονται σε περιοχές λιπιδικών μικροδομών πρωτεΐνες όπως στοματίνη, φλοτιλίνη-1, φλοτιλίνη-2, συνεξίνη, σορκίνη, υδατοπορίνη και ακετυλοχοληνεστεράση. Δείκτες αποτελούν τα μόρια CD59 και GAS (*Mandal et al., 2005*).

#### **A3.6.2.I. Φλοτιλίνη-1**

Η φλοτιλίνη-1 είναι μία μεμβρανοσυνδεδεμένη πρωτεΐνη με MB 44 kDa που απομονώθηκε με τη βοήθεια του απορρυπαντικού Triton-X 100. Συμμετέχει σε μονοπάτια ενδοκύττωσης και εμφανίζει ομολογία με το αντιγόνο επιδερμικής επιφάνειας. πρόσφατα βρέθηκε ότι η φλοτιλίνη-1 μαζί με άλλες πρωτεΐνες των λιπιδικών σχεδίων σχηματίζει ικρίωμα φτιάχνοντας ολιγομερή στη μεμβράνη (*Langhorst et al., 2008*).

#### **A3.6.2.II. Φλοτιλίνη-2**

Η φλοτιλίνη-2 είναι μία μεμβρανοσυνδεδεμένη πρωτεΐνη με MB 42 kDa που παίζει ρόλο στη διακυτταρική επιδερμική προσκόλληση, παίζοντας κρίσιμο ρόλο στη δομή αλλά και τη διατήρηση της επιδερμίδας. Καταλαμβάνει μεγάλη περιοχή στις λιπιδικές σχεδίες. Στα ερυθροκύτταρα και σε καταστάσεις αύξησης του ενδοκυτταρικού  $Ca^{+2}$  και απώλειας ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, η φλοτιλίνη-2 βρέθηκε σε μικροκυστίδια χωρίς όμως να παρατηρείται εμπλουτισμός τους (*Salzer et al., 2002*). Η φλοτιλίνη-2 έχει την τάση να σχηματίζει ολιγομερή και σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες των λιπιδικών σχεδίων, όπως η φλοτιλίνη-1 (*Langhorst et al., 2008*).

#### **A3.6.2.III. Συνεξίνη**

Η ανεξίνη VII ή συνεξίνη είναι μία κυτοσολική πρωτεΐνη με MB 50 kDa. Ανήκει στην οικογένεια των ανεξινών, είναι φωσφολιπιδιο-συνδεδεμένη πρωτεΐνη και εξαρτάται από το ασβέστιο. Το καρβοξυτελικό άκρο είναι υπεύθυνο για την φωσφολιπιδική σύνδεση, ενώ η αμινοτελική περιοχή φαίνεται να προσδίδει λειτουργική ποικιλομορφία (*Herr et al., 2003*). Αν και γενικά ο φυσιολογικός της ρόλος δεν είναι ακόμα απόλυτα κατανοητός, πιστεύεται πως επηρεάζει και ρυθμίζει γεγονότα που εξαρτώνται από ασβέστιο, όπως η έκκριση ουσιών. Θεωρείται απαραίτητη στη διαδικασία και την πορεία απελευθέρωσης κυστιδίων από τα ερυθροκύτταρα. Σε καταστάσεις έντονου στρες μεταναστεύει από το κυτοσόλιο στη μεμβράνη, λόγω αύξησης του ενδοκυτταρικού  $Ca^{+2}$  (*Salzer και Prohaska, 2001*).

#### **A3.6.2.IV. Σορκίνη**

Η σορκίνη είναι μία κυτοσολική πρωτεΐνη με MB 22 kDa, η οποία παίζει ρόλο στη μεταγωγή σήματος που εξαρτάται από το ασβέστιο. Έχει 4 περιοχές πρόσδεσης ασβεστίου δύο από τις οποίες εκδηλώνουν ισχυρή ομολογία με τα μοτίβα “EF hand” της καλμοντουλίνης. Η σορκίνη υφίσταται

μετατόπιση από το κυτοσόλιο στη μεμβράνη ύστερα από αύξηση της υδροφοβικότητά της (Salzer et al., 2002).

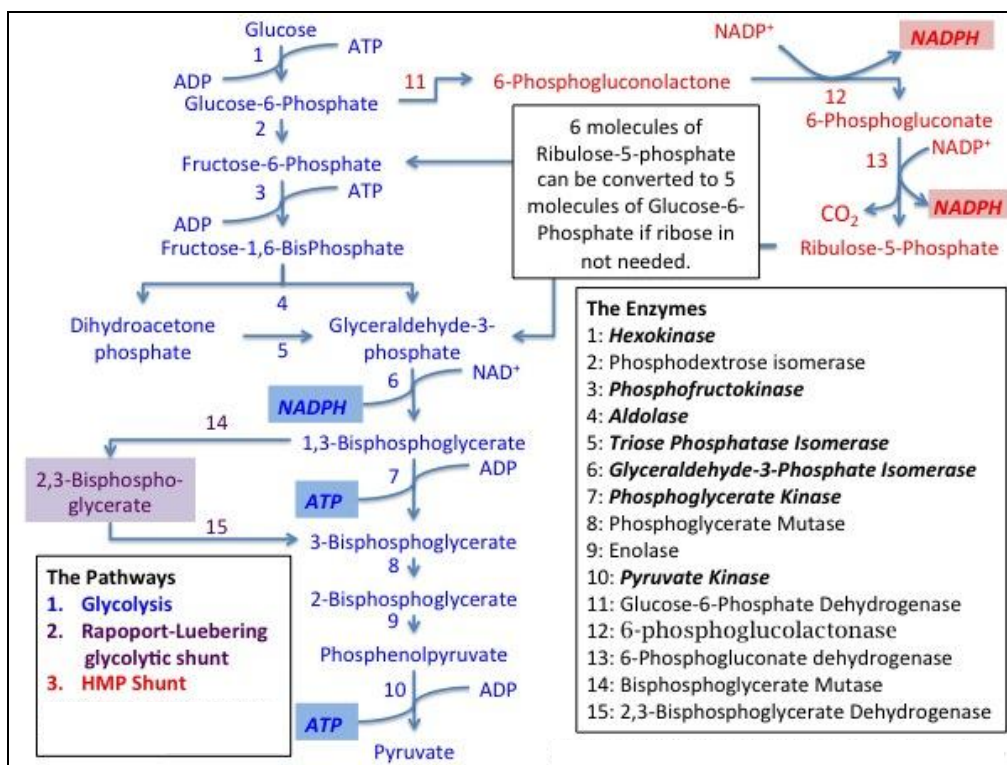
### A3.6.2.V. CD59

Η πρωτεΐνη CD59 είναι μεμβρανοσυνδεδεμένη με MB 18-25 kDa. Συνδέεται στη μεμβράνη και συγκεκριμένα στις λιπιδικές σχεδίες μέσω του αγκυροβολίου GPI που διαθέτει. Είναι ένας ρυθμιστής του συστήματος του συμπληρώματος, ο οποίος αναστέλλει τη δημιουργία του συμπλόκου μεμβρανικής επίθεσης (Huang et al., 2006).

## A4. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΟΥ

### A4.1. Γενικά

Το μοναδικό μόριο που χρησιμοποιείται από τα ερυθροκύτταρα για την παραγωγή ενέργειας είναι η γλυκόζη η οποία εισέρχεται εντός του κυττάρου με υποβοηθούμενη διάχυση. Λόγω της παντελούς έλλειψης οργανιδίων και πυρήνα τα ώριμα ερυθροκύτταρα δεν έχουν τη δυνατότητα παραγωγής ενέργειας μέσω του κύκλου του Krebs υπό αερόβιες συνθήκες. Ως εκ τούτου η παραγωγή ενέργειας βασίζεται στο αναερόβιο μονοπάτι της γλυκόλυσης (Embden-Meyerhof), το αερόβιο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (PPP) και τον κύκλο Rapoport-Luebering (εικόνα 11). Η αναερόβια γλυκόλυση ευθύνεται για το 90% του παραγόμενου ATP με το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών να καταλαμβάνει μόλις το 10%. Κατά τη «διακλάδωση» της γλυκόλυσης που σχετίζεται με την παράκαμψη Rapoport-Luebering πραγματοποιείται μετατροπή μεταξύ 1,3 και 2,3 DPG. Η αντίδραση αυτή συνδέει τη γλυκόλυση με τα επίπεδα συγγένειας μεταξύ αιμοσφαιρίνης και οξυγόνου (D'Alessandro et al., 2014).



Εικόνα 11: Τα βασικά μονοπάτια παραγωγής ενέργειας των ερυθροκυττάρων. (Πηγή [www.allaboutblood.com](http://www.allaboutblood.com)).

Η ίδια η λειτουργία των ερυθροκυττάρων (μεταφορά οξυγόνου) και η τοπολογία τους εντός του ανθρώπινου σώματος (πνεύμονες, περιφερικοί ιστοί) καθορίζουν τη μετάβαση από το ένα μονοπάτι διάσπασης της γλυκόζης στο άλλο. Στους πνεύμονες όπου η μερική πίεση οξυγόνου είναι ιδιαίτερα υψηλή, τα ερυθροκύτταρα εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες το οποίο ελέγχεται μέσω παραγωγής αναγωγικής δύναμης (NADPH) από το μονοπάτι PPP. Αντίθετα σε περιφερικούς ιστούς η μερική πίεση οξυγόνου μειώνεται αισθητά ενώ ταυτόχρονα τα ερυθροκύτταρα υπόκεινται έντονο μηχανικό στρες καθώς ρέουν στα μικρότερης από τη δική τους διαμέτρου τριχοειδή. Το αποτέλεσμα της μηχανικής καταπόνησης είναι η απώλεια κατιόντων και η μετάβαση στη γλυκόλυση καθώς είναι απαραίτητη η παραγωγή μορίων ATP για τη διατήρηση της ενδοκυττάριας ισορροπίας ιόντων (Lewis *et al.*, 2009).

#### **A4.2. Ρύθμιση του Μεταβολισμού**

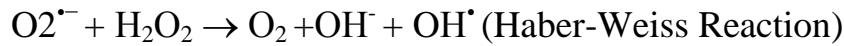
Το ισοζύγιο ανάμεσα στη γλυκόλυση και τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών υπόκειται στην κλασική οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση η οποία εξαρτάται από τα επίπεδα pH, CO<sub>2</sub>, ATP (Jensen, 2004) καθώς επίσης και της αναλογίας συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος/πυροσταφυλικού οξέος και NAD/NADH (Tilton *et al.*, 1991). Ωστόσο, υπάρχουν πειραματικές αποδείξεις ότι η μεταβολική αυτή ρύθμιση μπορεί να συμβαίνει και ανεξάρτητα από την τάση πρόσδεσης του οξυγόνου στην αιμοσφαιρίνη, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη επιπλέον μονοπατιών. Ένας εναλλακτικός μηχανισμός, υποστηρίζει ότι ο μεταβολισμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων ρυθμίζεται μέσω της οξυγονο-εξαρτώμενης πρόσδεσης γλυκολυτικών ενζύμων (GEs) σε αρνητικά φορτισμένες θέσεις του αμινοτελικού άκρου της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης ζώνης-3 (Lewis *et al.*, 2009). Πιο συγκεκριμένα η κυτοσολική πλευρά της ζώνης-3 (CDB3) αποτελεί θέση σύνδεσης γλυκολυτικών ενζύμων όπως GAPDH, αλδολάση, PFK, PK και LDH. Η πρόσδεση προάγεται από την παρουσία οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης και δημιουργεί ένα ενζυμικό σύμπλοκο στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση των εν λόγω ενζύμων και τον καταβολισμό της γλυκόζης μέσω του κύκλου PPP. Αντίθετα η παρουσία μη-οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης οδηγεί σε πρόσδεση της ίδιας στην CDB3 περιοχή με ταυτόχρονη απελευθέρωση των γλυκολυτικών ενζύμων και ενεργοποίηση της γλυκόλυσης (Low *et al.*, 1993). Έχει πρόσφατα παρατηρηθεί ότι η φωσφορυλίωση της ζώνης-3 στα κατάλοιπα τυροσίνης στις θέσεις 8 και 21 επιδρά στη σύνδεση γλυκολυτικών ενζύμων και μη-οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης στην CDB3 περιοχή. Ο υποκείμενος μηχανισμός φαίνεται να περιλαμβάνει την εξαρτώμενη από φωσφορυλίωση αύξηση στον αριθμό των αρνητικών φορτίων του αμινοτελικού άκρου, γεγονός που αυξάνει τη συγγένεια δέσμευσης της μη-οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης εκτοπίζοντας τα γλυκολυτικά ένζυμα. Ως αποτελέσματα το σύστημα οδηγείται σε αύξηση (+45%) της γλυκόλυσης και μείωση (-66%) του καταβολισμού μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών (Rogers *et al.*, 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι, αποξυγόνωση φαίνεται να προωθεί τη φωσφορυλίωση του αμινοτελικού άκρου της ζώνης-3 (Matte *et al.*, 2012).

Σε συνθήκες αποθήκευσης, όπου η θερμοκρασία είναι χαμηλή και το pH συνεχώς φθίνει, οι μεταβολικοί ρυθμοί μειώνονται αισθητά με αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση του ATP και του 2,3 DPG. Η χαμηλή θερμοκρασία και η πτώση του pH επηρεάζουν τόσο την ενεργότητα των ενζύμων όσο και τη συγγένεια πρόσδεσης του οξυγόνου στην αιμοσφαιρίνη (D'Alessandro *et al.*, 2014). Στα αρχικά στάδια (2 πρώτες εβδομάδες) τα αποθηκευμένα RBCs διασπών τη γλυκόζη μέσω γλυκόλυσης κάτι το οποίο υποδεικνύεται και από τη σταθερή αύξηση του γαλακτικού οξέος εντός της μονάδας μετάγγισης (Messana *et al.*, 2000). Το 2,3 DPG βρίσκεται ακόμα σε επίπεδα που

ευνοούν την από-οξυγονομένη μορφή της αιμοσφαιρίνης η οποία προσδένεται στο αμινοτελικό άκρο της ζώνης-3 ευνοώντας τη δράση των γλυκολυτικών ενζύμων. Έτσι τα κύτταρα προσπαθούν να ανταπεξέλθουν στις αυξημένες ενεργειακές ανάγκες της αποθήκευσης προσπαθώντας κυρίως να διατηρήσουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων. Προοδευτικά το pH μειώνεται λόγω της συσσώρευσης γαλακτικού οξέος δρώντας ανασταλτικά για την πορεία της γλυκόλυσης (*D'Alessandro και Zolla, 2013*). Επιπλέον σε αυτή τη χρονική περίοδο το 2,3 DPG εξαντλείται (-98%) με αποτέλεσμα την αύξηση της συγγένειας της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο και τη μείωση της συγκέντρωσης από-οξυγονομένης αιμοσφαιρίνης η οποία πλέον δεν αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την πρόσδεση των γλυκολυτικών ενζύμων (κι επομένως την απενεργοποίησή τους) στη ζώνη-3. Ως εκ τούτου η ισορροπία μετατοπίζεται στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών προς παραγωγή NADPH τόσο για την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης όσο και ως απόκριση στο γενικότερο οξειδωτικό στρες το οποίο εντείνεται εντός της μονάδας μετάγγισης. Προϊόντος του χρόνου τα αποθηκευμένα RBCs συσσωρεύουν βλάβες κυρίως λόγω των ελευθέρων ριζών που παράγονται με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μονοπατιών γήρανσης και απόπτωσης (ενεργοποίηση πρωτεασών). Έτσι μεταξύ άλλων παρατηρείται και θραύση της περιοχής CDB3 της ζώνης-3 με αποτέλεσμα την απώλεια ικανότητας ρύθμισης των μεταβολικών μονοπατιών (*Castagnola et al., 2010*). Τέλος η οξείδωση και η αποδιάταξη της αιμοσφαιρίνης κάτω από συνθήκες έντονου οξειδωτικού στρες ενδέχεται να επηρεάζουν την προαναφερόμενη ρύθμιση καθώς οξειδωμένα και αποδιαταγμένα μόρια αιμοσφαιρίνης εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης στην κυτταροπλασματική περιοχή της ζώνης 3 (*Lion et al., 2010*).

#### **A4.3. Οξειδωτικό Στρες στα Ερυθροκύτταρα**

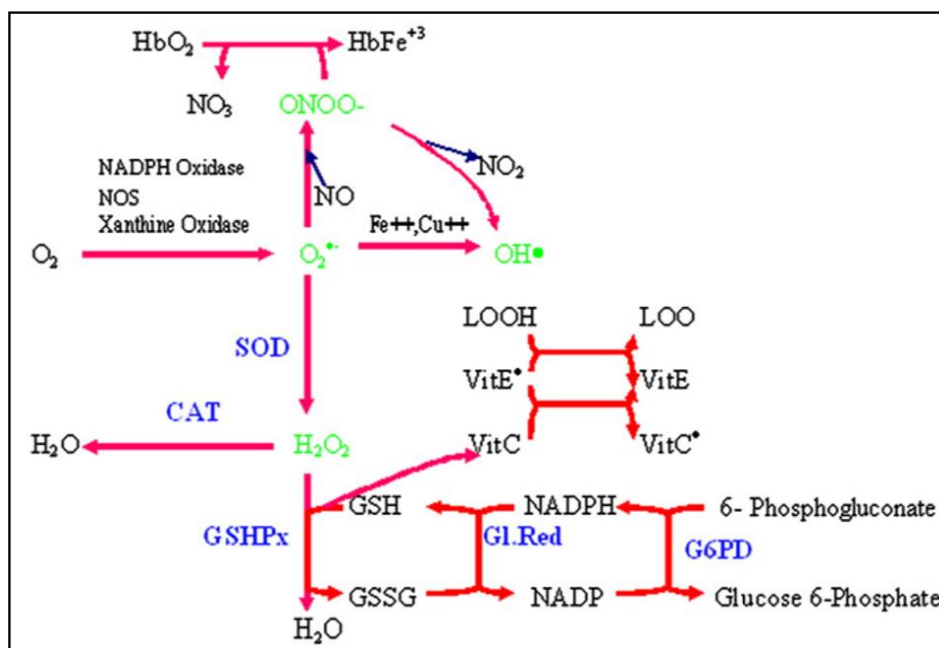
Τα ερυθροκύτταρα είναι επιρρεπή σε οξειδωτική βλάβη λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων του μοριακού οξυγόνου, της ομάδας αίμης, των ελεύθερων ατόμων σιδήρου και της σύστασης της μεμβράνης σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (*Kanias και Acker, 2010*). Η αιμοσφαιρίνη στο φλεβικό αίμα είναι εν μέρει κορεσμένη με οξυγόνο. Το οξυγόνο αφήνει συνεχώς ένα μόριο αιμοσφαιρίνης και συνδέεται με ένα άλλο ενώ περιστασιακά, παρατηρείται αυτο-οξείδωση της οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης σε μεθαιμοσφαιρίνη, που συνήθως ανακυκλώνεται σε λειτουργική αιμοσφαιρίνη από το σύστημα αναγωγής της μεθαιμοσφαιρίνης, που εξαρτάται από NAD/NADH. Η αυτο-οξείδωση της αιμοσφαιρίνης αποτελεί τη βασική πηγή ROS στα ερυθροκύτταρα καθώς παράγονται ρίζες υπεροξειδικών ανιόντων ( $O_2^{\cdot-}$ ) και μεθαιμοσφαιρίνη. Επιπλέον ρίζες  $O_2^{\cdot-}$  παράγονται κατά την οξείδωση του σιδήρου της αίμης στην τρισθενή μορφή του ( $Fe^{3+}$ ). Το πρώτο προϊόν οξείδωσης της αιμοσφαιρίνης ( $O_2^{\cdot-}$ ), είναι ιδιαίτερα δραστικό και ικανό να συμμετέχει σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν στο σχηματισμό των εξαιρετικά τοξικών ROS, καθώς και σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Το  $H_2O_2$  δεν είναι ιδιαίτερα τοξικό, διαθέτει όμως δύο ιδιότητες που το καθιστούν επικίνδυνο: 1) Μπορεί να διαπερνά της μεμβράνες με χαρακτηριστική ευκολία κάτι το οποίο το καθιστά επικίνδυνο στον εξωκυττάριο χώρο όπου οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί είναι λιγότεροι και 2) Έχει τη δυνατότητα να συμμετέχει στις δύο σημαντικότερες αντιδράσεις οξείδωσης που διαθέτουν τα ερυθροκύτταρα δηλαδή τις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss στις οποίες παράγονται τοξικές ρίζες υδροξυλίου και οξειδωμένος σίδηρος (*Cimen, 2008*).



Το δεύτερο προϊόν οξείδωσης της αιμοσφαιρίνης, η μεθαιμοσφαιρίνη, δεν μπορεί να δεσμεύσει οξυγόνο ακόμα και σε φυσιολογικές συνθήκες pO<sub>2</sub>, μειώνοντας ως εκ τούτου την ικανότητα των ερυθροκυττάρων να μεταφέρουν οξυγόνο (Kanias και Acker, 2010). Μόρια μεθαιμοσφαιρίνης μπορούν να συσσωρεύονται στην εσωτερική πλευρά της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, όπου παράγουν περαιτέρω ROS συμμετέχοντας στις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss (Lion et al., 2010), επηρεάζοντας την ανάκτηση των ερυθροκυττάρων (Kanias και Acker, 2010). Η οξειδωτική βλάβη της μεθαιμοσφαιρίνης μπορεί να προκαλέσει τη μετατροπή της σε ασταθείς δομές, όπως τα αιμοχρώματα. Τα αιμοχρώματα συσσωρεύονται στην εσωτερική πλευρά της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και δεσμεύονται ομοιοπολικά με κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες όπως η σπεκτρίνη, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο μεταβολές στην ικανότητα παραμόρφωσης των ερυθροκυττάρων. Επιπλέον, αλληλεπιδρούν με κυτταροπλασματικές περιοχές της ζώνης 3 και οδηγούν στη συσσωμάτωσή της, δημιουργία νέο-αντιγόνου γήρανσης και κυτταρική αναγνώριση-εκκαθάριση (Delobel et al., 2010). Τέλος, προωθούν την αιμόλυση μέσω μηχανισμών οι οποίοι περιλαμβάνουν την υπεροξείδωση λιπιδίων και την οξείδωση των ομάδων θειόλης (Kanias και Acker, 2010).

#### A4.4. Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί των Ερυθροκυττάρων

Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι τόσο η επιβίωση όσο και η σωστή λειτουργία των ερυθροκυττάρων εξαρτάται από την ικανότητά τους να ανταπεξέρχονται σε συνθήκες έντονου οξειδωτικού φορτίου καθόλη τη διάρκεια της ζωής τους. Για το λόγο αυτό διαθέτουν μία σειρά αντιοξειδωτικών μηχανισμών οι οποίοι διακρίνονται σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς (εικόνα 12).



Εικόνα 12: Τα βασικά μονοπάτια μεταβολισμού ελευθέρων ριζών στα ερυθροκύτταρα (Ανατύπωση από Cimen, 2008).

#### **A4.4.1. Μη Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί**

Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο κεφάλαιο του πλάσματος (βλ. παράγραφος A2) οι μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη βιταμίνη C, τη βιταμίνη E, τα φλαβονοειδή, τις θειόλες (GSH), το ουρικό οξύ, τη φερριτίνη, τη χολερυθρίνη και κάποια μικροσυστατικά (σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο) τα οποία λειτουργούν ως ενζυμικοί συμπαράγοντες.

Η γλουταθειόνη αποτελεί το σημαντικότερο μη ενζυμικό ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης σε όλους τους τύπους κυττάρων. Τα ερυθροκύτταρα αποτελούν βασικούς βιολογικούς φορείς GSH παρέχοντας ένα σημαντικό σύστημα αποτοξίνωσης της κυκλοφορίας. Η *de novo* σύνθεση εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των αμινοξέων της και ιδιαίτερα της κυστεΐνης και των δύο συνθετασών που καταλύουν τη σύνθεσή της (*Dumaswala et al., 2001*). Υπάρχει στην ανηγμένη (GSH) και την οξειδωμένη μορφή (GSSG) της ενώ συμμετέχει σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής μέσω της αντιστρεπτής οξείδωσης της ενεργής θειόλης που περιλαμβάνει. Η GSH μπορεί να δεσμεύεται ομοιοπολικά στις πρωτεΐνες μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται γλουταθειονυλίωση και να ενεργεί ως συνένζυμο για διάφορα αμυντικά ένζυμα του κυττάρου (*Pompella et al., 2003*). Δρα λοιπόν άμεσα εκκαθαρίζοντας ελεύθερες ρίζες ή έμμεσα ως υπόστρωμα για τα ένζυμα GST και GPx κατά την αποτοξίνωση από H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων και ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων (*Masella et al., 2005*). Στα ερυθροκύτταρα προστατεύει σημαντικές πρωτεΐνες όπως η σπεκτρίνη, οξείδωση της οποίας οδηγεί σε ακαμψία τα ερυθροκύτταρα. Η GSH δεν υποστηρίζει μόνο την αντιοξειδωτική άμυνα, αλλά είναι επίσης μία σημαντική δεξαμενή σουλφυδρυλίων, διατηρώντας -SH ομάδες στην αιμοσφαιρίνη καθώς επίσης και ένζυμα σε ανηγμένη κατάσταση (*Baynes, 2005*).

#### **A4.4.2. Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί**

Τα σημαντικότερα ενζυμικά αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνουν την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), την καταλάση (CAT), την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και την αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).

##### **A4.4.2.I. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)**

Η υπεροξειδική δισμουτάση είναι η κύρια άμυνα απέναντι στις ρίζες υπεροξειδίου και είναι η πρώτη γραμμή άμυνας απέναντι στο οξειδωτικό στρες. Η SOD καταλύει την αντίδραση μετατροπής του O<sub>2</sub><sup>•-</sup> σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές SOD (SOD1, SOD2, SOD3) και όλες απαιτούν ένα οξειδοαναγωγικό δραστικό μέταλλο μεταπτώσεως στην ενεργή θέση για να πραγματοποιηθεί η καταλυτική διάσπαση του υπεροξειδικού ανιόντος (*Culotta et al., 2006; Suzuki et al., 2000*). Από τις ισομορφές SOD δύο βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου ενώ η τρίτη βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο (*Suzuki et al., 2000*).

##### **A4.4.2.II. Καταλάση (CAT)**

Η καταλάση είναι παρούσα σε κάθε κυτταρικό τύπο και χαρακτηρίζει τα υπεροξεισώματα, κυτταρικά οργανίδια που χρησιμοποιούν οξυγόνο με σκοπό να αποτοξινώσουν τοξικές ουσίες παράγοντας H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει μία ομάδα αίμης στο ενεργό τους κέντρο. Κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH, το



οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Καταλύει την μετατροπή του  $H_2O_2$  σε νερό και οξυγόνο (Antunes et al., 2002).

#### **A4.4.2.III. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)**

Στα θηλαστικά έχουν εντοπιστεί πέντε είδη υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx1-GPx5) (Drevet, 2006). Η GPx καταλύει την αναγωγή του  $H_2O_2$  ή του οργανικού υδροϋπεροξειδίου (ROOH) σε νερό ( $H_2O$ ) και αλκοόλη, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας την GSH ή σε κάποιες περιπτώσεις την θειορεδοξίνη ή την γλουταρεδοξίνη ως δότη ηλεκτρονίων (Callahan et al., 2001). Όταν η GSH είναι ο δότης ηλεκτρονίων, οξειδώνεται σε δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG). Το γεγονός ότι η GPx ανάγει μια μεγάλη ποικιλία υδροϋπεροξειδίων, την καθιστά ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό για την προστασία των λιπιδίων και των πρωτεϊνών από βλάβες προερχόμενες από ROS. Φαίνεται πως η GPx είναι πολύ σημαντική για την αντιμετώπιση του  $H_2O_2$  που προέρχεται από την αυτοοξειδωση της αιμοσφαιρίνης ενώ η καταλάση εμφανίζεται ιδιαίτερα χρήσιμη σε περιπτώσεις έκθεσης των ερυθροκυττάρων σε αυξημένη “ροή”  $H_2O_2$  (Cimen, 2008).

#### **A4.4.2.IV. Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)**

Η αναγωγάση της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε GSH και συνεπώς για τη διατήρηση της φυσιολογικής αναλογίας GSSG/GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Αποτελείται από δύο υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH (Sun, 1990).

### **A5. ΓΗΡΑΝΣΗ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Υπό φυσιολογικές συνθήκες όλα τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα ζουν περίπου 120 μέρες στην κυκλοφορία του αίματος, κάτι που υπονοεί την ύπαρξη αυστηρών ρυθμιστικών μοριακών μηχανισμών, υπεύθυνων για τον προγραμματισμό της διάρκειας ζωής και της μη τυχαίας απομάκρυνσης των RBCs. Τα ερυθροκύτταρα, όντας απύρηντα, στερούνται εντελώς την ικανότητα πρωτεϊνοσύνθεσης. Συνεπώς, η φυσιολογία τους εξαρτάται αποκλειστικά από πρωτεΐνες και ένζυμα που υπάρχουν από το τέλος της ωρίμανσής τους σε δικτυοερυθροκύτταρα. Αυτή η σταθερή μοριακή μηχανή, λοιπόν, είναι υπεύθυνη για την κύρια λειτουργία των ερυθροκυττάρων (μεταφορά οξυγόνου), για τη διάρκεια ζωής τους, τη συντήρηση οσμωτικής ομοιόστασης και ακεραιότητας της μεμβράνης, την παραγωγή ενέργειας και την αντιμετώπιση εξωτερικών καταπονήσεων, όπως οσμωτικό σοκ, έκθεση σε τοξικές ουσίες ή οξειδωτικό στρες. Δεδομένης της στατικής φύσης των πρωτεϊνών και των ενζύμων τους, τα ερυθροκύτταρα υφίστανται μια προοδευτική απώλεια της λειτουργίας τους κατά τη διάρκεια της ζωής τους, που σχετίζεται με αυξημένη ακαμψία του κυτταροσκελετού, μειωμένα ποσοστά γλυκόλυσης και αλλοιώσεις σε λιπίδια, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Lion et al., 2010). Ως εκ τούτου, η διαδικασία γήρανσης των ερυθροκυττάρων, αντιπροσωπεύει ένα σύνολο χρονοεξαρτώμενων αλλά όχι κατ' ανάγκη γραμμικών μοριακών γεγονότων, τα οποία τελικά οδηγούν σε κυτταρική εκκαθάριση (Walsh et al., 2002; Franco, 2009).

### **A5.1. In vivo Σηματοδοτικά Μονοπάτια και Δείκτες Γήρανσης των RBCs**

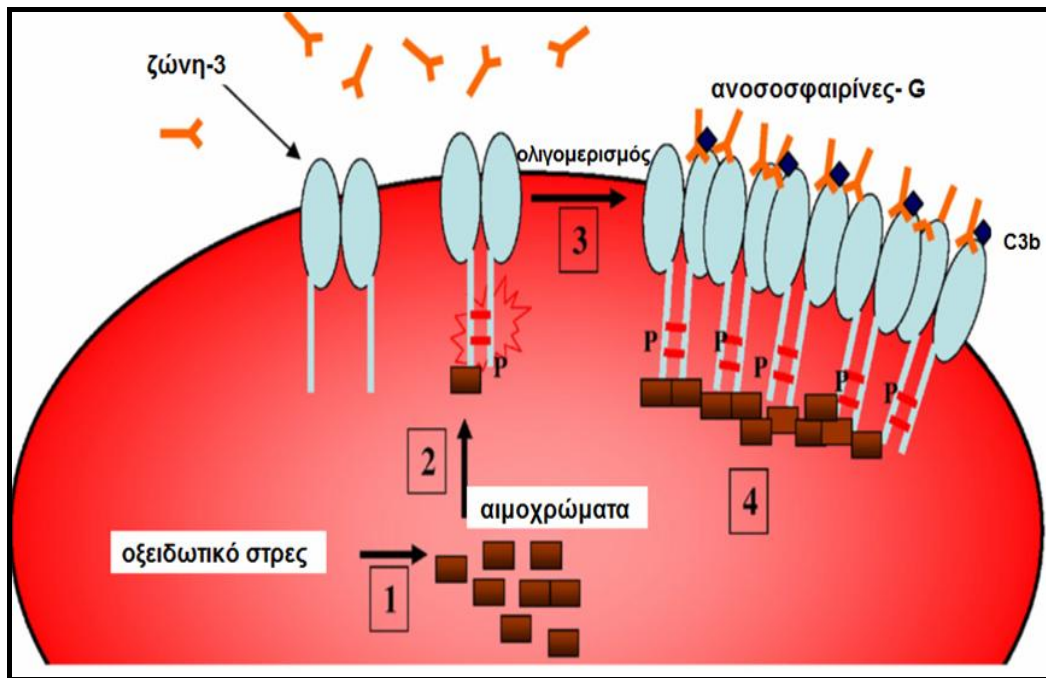
Τα ερυθροκύτταρα υφίστανται ένα πλήθος μεταβολικών και φυσιολογικών αλλαγών καθώς γηράσκουν, όπως η κυστιδιοποίηση (*Willekens et al., 2003*), οι μετατροπές της αιμοσφαιρίνης και υποβάθμιση της ομοιόστασης και της αντιοξειδωτικής άμυνας. Ως δείκτες γήρανσης μπορούν να θεωρηθούν η μη-ενζυματική γλυκοζυλίωση της αιμοσφαιρίνης (*Bosch et al., 1992*), η αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας (*Piomelli και Seaman, 1993*) και η απαμιδίωση της πρωτεΐνης 4.1b σε 4.1a (*Mueller et al, 1987; Lutz et al., 1992*). Λαμβάνοντας υπόψη την έλλειψη πρωτεϊνοσύνθεσης στα ώριμα ερυθροκύτταρα, οι μετρήσιμοι δείκτες γήρανσης προκύπτουν από διαφοροποιήσεις σε ήδη υπάρχοντα μόρια. Ο φαινότυπος των γηρασμένων ερυθροκυττάρων σχετίζεται με μείωση στη μεταβολική ενεργότητα, σταδιακή αλλαγή στο σχήμα των κυττάρων, αναδόμηση της μεμβράνης, οξειδωτική βλάβη στο κύτταρο, μικροκυστιδιοποίηση της μεμβράνης και εξωτερίκευση επιφανειακών δεικτών αναγνώρισης. Όλες οι προαναφερθείσες μετατροπές οδηγούν έμμεσα ή άμεσα σε ερυθροφαγοκυττάρωση (*Bosman et al., 2008b*).

#### **A5.1.1. Μικροκυστιδιοποίηση**

Η μικροκυστιδιοποίηση αποτελεί μέρος της ωρίμανσης των ερυθροκυττάρων. Επιταχύνεται σε γηραιότερα κύτταρα ενώ μπορεί να δράσει είτε κατά των ερυθροκυττάρων, επιφέροντας απώλεια Hb και μεμβράνης, είτε υπέρ αυτών, βοηθώντας στην απομάκρυνση κατεστραμμένων και σηματοδοτικά αποτελεσματικών συστατικών των κυττάρων. Η εξωκύτωση μη λειτουργικών πρωτεϊνών και δεικτών γήρανσης μέσω κυστιδιοποίησης, όχι μόνο προστατεύει τα ερυθροκύτταρα από πρόωρο θάνατο, αλλά και αποδεικνύει ότι τα ίδια σινιάλα αναγνώρισης μεσολαβούν για τη ραγδαία απομάκρυνση των γηρασμένων ερυθροκυττάρων και των κυστιδίων από την κυκλοφορία (*Willekens et al., 2008*). Μέσω της συνεχούς αποβολής κυστιδίων, τα ερυθροκύτταρα, αλλάζουν τη σύσταση και τη δομή της μεμβράνης τους καθώς γηράσκουν, αυξάνουν την πυκνότητά τους, ενώ παράλληλα παρατηρείται μείωση στην ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης της μεμβράνης (*Bosch et al., 1992*). Η πλειονότητα των προερχόμενων από τα ερυθροκύτταρα κυστιδίων που απομονώνονται από το αίμα υγιών δοτών εξωτερικεύουν φωσφατιδυλοσερίνη ενώ περιέχουν IgGs και ένα προϊόν διάσπασης της ζώνης 3, το οποίο αντιδρά με αντισώματα έναντι αλληλουχιών της ζώνης-3 οι οποίες σχετίζονται με γηρασμένα ερυθροκύτταρα (*Willekens et al., 2008*).

#### **A5.1.2. Το Βασιζόμενο στη Ζώνη-3 Μονοπάτι Γήρανσης**

Κεντρικό ρόλο στη γήρανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων διαδραματίζει η δομική ακεραιότητα και η σωστή τοπολογία της ζώνης-3. Η συσσωμάτωση (*Pantaleo et al., 2008*) και ο τεμαχισμός (*Kay, 2005*) της εν λόγω πρωτεΐνης αποτελούν σημαντικό βήμα στη δημιουργία ενός νέο-αντιγόνου γήρανσης το οποίο είναι στόχος ανοσολογικής απόκρισης. Η διαμόρφωση αυτού του σήματος γήρανσης σχετίζεται με την οξειδωση μέσω ενεργών ελεύθερων οξειδωτικών ριζών (*εικόνα 13*). Έτσι κάτω από τέτοιες συνθήκες η αιμοσφαιρίνη τροποποιείται και πολλές φορές μετατρέπεται σε αιμοχρώματα, τα οποία μετατοπίζονται στη μεμβράνη (*Rettig et al., 1999*). Η μετατόπιση της οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης φαίνεται να σταθεροποιεί τα συσσωματώματα της ζώνης-3, με αποτέλεσμα τον οψωνισμό των νέων αυτών αντιγονικών θέσεων από ανοσοσφαιρίνες IgGs (πιθανά συνδέεται και το συστατικό του συμπληρώματος C3), προκαλώντας ερυθροφαγοκυττάρωση (*Kay et al., 1988; Lutz et al., 1993*).



Εικόνα 13: Το βασικό μονοπάτι γήρανσης των ερυθροκυττάρων στο οποίο εμπλέκεται η τροποποίηση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης ζώνης-3. **1.** Οξειδωτική αποδιάταξη της αιμοσφαιρίνης που οδηγεί στο σχηματισμό αιμοχρωμάτων, **2.** Τα αιμοχρώματα που προσδένονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της ζώνης 3 ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται φωσφορυλίωσή της σε συγκεκριμένες θέσεις, **3.** Αποσύνδεση από τον κυτταροσκελετό και ολιγομερισμός της ζώνης 3, **4.** Σχηματισμός συμπλεγμάτων ζώνης 3/αιμοχρωμάτων και οψωνισμός από τα φυσιολογικά αντισώματα του ορού και το συστατικό C3b του συμπληρώματος (Ανατύπωση από *Pantaleo et al., 2008*).

Επιπλέον η ανακατανομή της ζώνης-3 φαίνεται να επηρεάζεται συνεργατικά και από μεταβολές στη φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης (*Pantaleo et al., 2008*). Ιδιαίτερο ρόλο στην κατάσταση φωσφορυλίωσης της ζώνης-3 διαδραματίζει η αύξηση της συγκέντρωσης ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$ . Υπό φυσιολογικές συνθήκες η φωσφατάση τυροσίνης (PTP1B) δεσμεύεται στην κυτταροπλασματική περιοχή της ζώνης-3 και έτσι τα δύο κατάλοιπα τυροσίνης διατηρούνται σε αποφωσφορυλιωμένη κατάσταση. Όταν διαταράσσεται το  $Ca^{2+}$ , η κινάση τυροσίνης syk και στη συνέχεια οι κινάσες Lyn ενεργοποιούνται και έτσι οι τυροσίνες φωσφορυλιώνονται. Ο ρόλος αυτών των καταλοίπων τυροσίνης δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά φαίνεται να αγκυροβολούν τον κυτταροσκελετό με τη ζώνη-3 μέσω της αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες-4.2 και σπεκτρίνες, να συνδέονται με γλυκολυτικά ένζυμα, όπως 3-φωσφογλυκεραλδεΐδη, αφυδρογονάση, φωσφοφρουκτοκινάση, αλδολάση, φωσφατάση τυροσίνης, κινάση τυροσίνης και να δεσμεύονται με αιμοσφαιρίνες (*Lion et al., 2010*).

### A5.1.3. Ομοιόσταση Ιόντων $Ca^{+2}$

Η διαταραχή της ομοιόστασης  $Ca^{+2}$  είναι πιθανώς κομμάτι ενός άλλου μονοπατιού γήρανσης, είτε ως παράγοντας ενεργοποίησης, είτε ως συνέπεια αυτού (*Samaja et al., 1990*). Η εισροή ασβεστίου σχετίζεται σαφώς με την οξειδωτική ζημιά, την κυστιδιοποίηση, την αφυδάτωση και τις μορφολογικές τροποποιήσεις των γηρασμένων ερυθροκυττάρων (*Kiefer και Snyder, 2000*). Επομένως εμφανίζεται ως ένας σαφής δείκτης γήρανσης. Το σύνολο των ασβεστοεξαρτώμενων

μονοπατιών που λειτουργούν στα ερυθροκύτταρα ως απόκριση σε στρες (οξειδωτικό, οσμωτικό κ.α.) ονομάζεται ερυθρόπτωση (βλ. παράγραφο Α6.1.) (Lang et al., 2006). Παρά το γεγονός ότι το ασβέστιο εμφανίζεται ως ένας σαφής δείκτης γήρανσης η σχέση της ερυθρόπτωσης με τη γήρανση *in vivo* δεν έχει ακόμα εδραιωθεί.

#### **A5.1.4. Σηματοδότηση Μέσω Κασπασών και Εξωτερίκευση PS**

Η ερυθροκυτταρική προκασπάση 3 ενεργοποιείται *in vitro* κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες, οδηγώντας σε τροποποιήσεις της ζώνης 3, έκθεση PS και ερυθροφαγοκυττάρωση (Mandal et al., 2002; Miki et al., 2007). Ένας τέτοιος μηχανισμός είναι πολύ πιθανό να έχει *in vivo* έναν φυσιολογικό ρόλο στη γήρανση/απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων, όπως αποδεικνύεται από την ανίχνευση της ενεργού κασπάσης 3 και 8, όπως και από το σχηματισμό του συμπλέγματος Fas (σχετιζόμενο ως βήμα θανάτου) σε περιοχές λιπιδικών σχεδίων της μεμβράνης γηρασμένων κυττάρων (Mandal et al., 2003). Τα γηραιότερα ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν χαμηλότερη ενεργότητα μετατόπισης αμινοφωσφολιπιδίων και υψηλότερα επίπεδα «εκτεθειμένης» PS σε σύγκριση με νεότερα (Mandal et al., 2005). Η ενεργοποίηση της κασπάσης 3 κατά τη γήρανση των ερυθροκυττάρων κάτω από το ερέθισμα οξειδωτικού στρες, θα μπορούσε να «τεμαχίσει» ή να τροποποιήσει τη ζώνη 3 (Ficarra et al., 2009), προκαλώντας ένα καταρράκτη μοριακών γεγονότων που οδηγούν σε απομάκρυνση των κυττάρων. Η ενεργοποίηση των κασπασών σε κατεστραμμένα ή γηρασμένα ερυθροκύτταρα, θα μπορούσε να προκαλέσει τη φαγοκυττάρωσή τους ώστε να αποφευχθεί η αιμόλυση.

Τα περισσότερα κυστίδια που προέρχονται από ερυθροκύτταρα εκθέτουν PS (Willekens et al., 2008). Επίσης πολλές αιματολογικές ασθένειες και η διαχείριση των ερυθροκυττάρων *in vitro* κάτω από συνθήκες στρες οδηγούν σε έκθεση PS (Lang et al., 2006). Παρόλα αυτά, η έκθεση PS σε υγιή, γηρασμένα ερυθροκύτταρα *in vivo* αποτελεί σημείο «διαμάχης», κυρίως λόγω του σκεπτικισμού που επικρατεί απέναντι στις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση αυτών (Connor et al., 1994). Πειραματικά, έχει βρεθεί ενεργή κασπάση και έκθεση PS σε κλάσμα RBCs, απομονωμένων από την κυκλοφορία του αίματος (Bratosin et al., 2009). Είναι πολύ πιθανό, λαμβάνοντας υπόψη την ισχυρή θρομβογενετική επίδραση της εκτεθειμένης PS, αυτή να παίζει ρόλο στη γήρανση και την απομάκρυνση φυσιολογικών ή και στρεσαρισμένων ερυθροκυττάρων υπό ορισμένες συνθήκες, μέσω της ενεργοποίησης των διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών (Antonellou et al., 2010b).

#### **A5.1.5. Επιπλέον Μηχανισμοί Ερυθροκυτταρικής Γήρανσης *In vivo***

Άλλοι μηχανισμοί που έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την επιλεκτική αναγνώριση γηρασμένων ερυθροκυττάρων από τα μακροφάγα, περιλαμβάνουν τη χρονοεξαρτώμενη συσχέτιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών με το σιαλικό οξύ ή παράγωγα αυτού, που οδηγεί σε έκθεση γλυκοπεπτιδίων ως παραγόντων γήρανσης σε γηρασμένα κύτταρα (Aminoff et al., 1992). Εκτός από το μηχανισμό των οψωνινών που δεσμεύονται στα ερυθροκύτταρα, τα σιαλικά οξέα αλλά και μεμβρανικά συστατικά όπως το CD47, τουλάχιστον στα ζωικά μοντέλα, φαίνεται να παίζουν έναν ακόμη ρυθμιστικό ρόλο στην εξάλειψη γηρασμένων κυττάρων αναστέλλοντας την ερυθροφαγοκυττάρωση (Ensinck et al., 2006). Η μεμβρανική τους τοπολογία και στοιχειομετρία, λειτουργεί ως ένα αποτελεσματικό “non-eat-me” σήμα για τα μακροφάγα που φέρουν τους αντίστοιχους υποδοχείς. Ωστόσο, μια τέτοια λειτουργία για το CD47 είναι ειδο-ειδική (Bosman et al., 2005), δεδομένου ότι μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποστηρίζουν ότι ανθρώπινα

Rhesus αρνητικά ερυθροκύτταρα με μειωμένο CD47 παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό φαγοκυττάρωσης (Arndt και Garratty, 2004). Πέραν όμως της μείωσης της CD47 στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη πρόσφατα προτάθηκε ένας επιπλέον μηχανισμός γήρανσης σχετιζόμενος με την εν λόγω πρωτεΐνη που οδηγεί σε φαγοκυττάρωση. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται πως η CD47 μπορεί να υποστεί αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσής της τόσο σε γηρασμένα ερυθροκύτταρα *in vitro* όσο και κάτω από συνθήκες στρες κάτι το οποίο έχει ως αποτέλεσμα η τροποποιημένη μορφή (μετά από σύνδεση με θρομβοσπονδίνη του πλάσματος) να λειτουργεί πλέον ως σήμα εκκαθάρισης από τα φαγοκύτταρα (Burger et al., 2012).

#### **A5.1.6. Συσχέτιση με το Οξειδωτικό Στρες**

Κάποια δεδομένα προτείνουν κεντρική θέση του οξειδωτικού στρες στη σηματοδότηση της γήρανσης των ερυθροκυττάρων. Εκτός από τις επιπτώσεις του στη ζώνη 3 και την ενεργοποίηση των αποπτωτικών παραγόντων, το οξειδωτικό στρες επηρεάζει την αιμοσφαιρίνη και τις αλληλεπιδράσεις της με τα μεμβρανικά στοιχεία (Kiefer και Snyder, 2000), καθώς και την κασπάση 3 (Tellone et al., 2008). Αν και το κύριο χαρακτηριστικό του οξειδωμένου ερυθροκυττάρου είναι η δέσμευση της οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης σε θέσεις της ζώνης 3 με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης, η αμείωτη συμπλοκοποίηση της αιμοσφαιρίνης με τη σπεκτρίνη είναι επίσης ένας σημαντικός και πολύ πιθανός δείκτης της γήρανσης *in vivo*, που σχετίζεται στενά με αυξημένη δυσκαμψία των ερυθροκυττάρων, μειωμένη ικανότητα παραμόρφωσης, εχνοκυττάρωση και ερυθροφαγοκυττάρωση (Snyder et al., 1985; Fortier et al., 1988). Αυτό το σύμπλεγμα μπορεί να προωθήσει διαρθρωτικές αλλαγές στη ζώνη 3, διαταράσσοντας τη σύζευξη του κυτταροσκελετού με τη διπλοστιβάδα. Επιπρόσθετα, ο σχηματισμός του μπορεί να απειλήσει τον κανονικό σχηματισμό του τετραμερούς της σπεκτρίνης, και την οξείδωση των φωσφολιπιδίων μέσω της ενεργότητας της ασβεστοεξαρτώμενης λιποξιγενάσης-quasi της οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης, οδηγώντας σε έκθεση PS και σηματοδοτική αναγνώριση από τον υποδοχέα CD36 των μακροφάγων (Kiefer και Snyder, 2000).

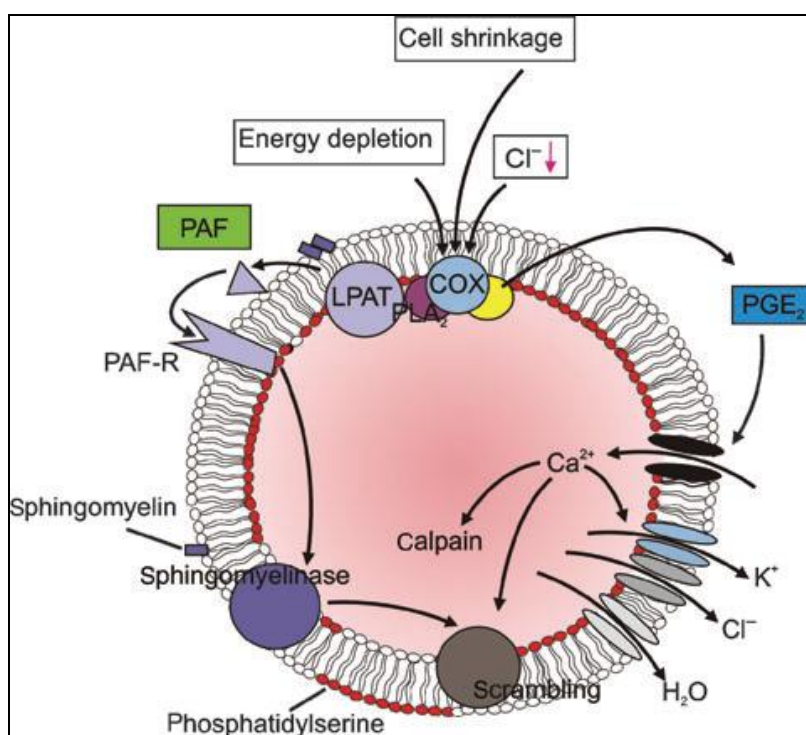
### **A6. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ**

Ο θάνατος των κυττάρων μπορεί να διακριθεί σε δύο τύπους, τη **Νέκρωση** που αποτελεί μία μη ελεγχόμενη μορφή κυτταρικού θανάτου και τον **Προκαθορισμένο Κυτταρικό Θάνατο (ΠΚΘ)**, ο οποίος απαιτεί ενέργεια με τη μορφή ATP για την ολοκλήρωσή του. Η νέκρωση αντιστοιχεί ουσιαστικά στην ενδοαγγειακή αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και αφορά πολύ μικρό ποσοστό της απόσυρσης γηρασμένων ερυθροκυττάρων. Κυρίως οφείλεται σε δυσμενείς ή παθολογικές εξωτερικές συνθήκες όπως οι αιμολυτικές αναιμίες. Σε αυτό τον τύπο θανάτου, πραγματοποιείται λύση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και απελευθέρωση αιμοσφαιρίνης και άλλων κυτταροπλασματικών στοιχείων στο εξωκυττάριο περιβάλλον.

#### **A6.1. Μηχανισμός Απόπτωσης στα Ερυθροκύτταρα (Ερυθρόπτωση)**

Η **ερυθρόπτωση** χαρακτηρίζεται από συρρίκνωση του κυττάρου, φυσαλιδοποίηση της μεμβράνης, ενεργοποίηση πρωτεασών και εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (εικόνα 14). Συνήθως ενεργοποιείται από οσμωτικό σοκ, απώλεια ενέργειας και κυρίως από οξειδωτικό στρες. Εκτός των κασπασών, το οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί επιπλέον δύο μηχανισμούς κυτταρικής εκκαθάρισης. Ο πρώτος σχετίζεται με το σχηματισμό προσταγλανδίνης E2 που οδηγεί σε ενεργοποίηση καναλιών ασβεστίου και ο δεύτερος με τη φωσφολιπάση A2 που ενεργοποιεί την

απελευθέρωση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η σφιγγομυελινάση (η τελευταία οδηγεί στο σχηματισμό κεραμιδίου). Η αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου μαζί με την παρουσία κεραμιδίου οδηγούν σε αναδιάταξη της μεμβράνης και εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης. Επιπλέον το ασβέστιο ενεργοποιεί τα ασβεστοεξαρτώμενα κανάλια καλίου με αποτέλεσμα το κύτταρο να χάσει μεγάλα ποσά KCl (και H<sub>2</sub>O) και να συρρικνωθεί. Το κυττασολικό ασβέστιο διεγείρει την πρωτεάση καλπαΐνη με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του κυτταροσκελετού σπεκτρίνης, ακτίνης και ζώνης 4.1R (Lang et al., 2006). Ερυθρόπτωση παρατηρείται επίσης σε περιπτώσεις ήπιας έλλειψης φωσφορικών. Όσον αφορά στη συρρίκνωση του κυττάρου, αυτή οφείλεται στην ενεργοποίηση ιοντικών καναλιών Gardos (κανάλια καλίου) και Cl<sup>-</sup> τα οποία είναι ασβεστοεξαρτώμενα (Lang et al., 2012). Η εξωτερίκευση της PS φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της σκραμπλάσης ή απενεργοποίησης της αμινοφωσφορικής μετατοπάσης (Dekkers et al., 2002; Seigneuret και Devaux, 1984).



Εικόνα 14: Απεικόνιση των βασικών γεγονότων του φαινομένου της ερυθρόπτωσης. (Ανατύπωση από Lang et al., 2006).

Αναστολείς της ερυθρόπτωσης θεωρούνται ουσίες όπως η ερυθροποιητίνη και οι κατεχολαμίνες, που ρυθμίζουν αρνητικά τα κανάλια ασβεστίου. Η φυσιολογική σημασία του φαινομένου έγκειται στην απομάκρυνση γηρασμένων ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία (δεν έχει δειχθεί *in vivo*), την αποφυγή της αιμόλυσης και την αποτροπή εξάπλωσης παθογόνων (αυξημένος ρυθμός ερυθρόπτωσης σε περιπτώσεις ελονοσίας και ιαιμιών) (Lang et al., 2012). Ωστόσο, είναι γεγονός ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια υφίστανται σε κάποιο βαθμό απόπτωση κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του αίματος. Η διαδικασία της απόπτωσης αφορά μια ποικιλία θεμελιωδών αλλαγών, συμπεριλαμβανομένης της αναδιάταξης της μεμβράνης και της έκθεσης φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων καθώς και την βλάβη κυτταροσκελετικών και άλλων πρωτεϊνών (Dzik, 2003).

## **A6.2. Απόπτωση Μέσω Υποδογέων στα Ερυθρά Αιμοσφαίρια**

Στα εμπύρηνια κύτταρα το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης εξαρτάται από τη σύνδεση υποδογέων θανάτου (FAS/TNF-R) με τους αντίστοιχους συνδέτες (FASL/TNF). Το μονοπάτι αυτό υπάρχει και στα ερυθρά αιμοσφαίρια και πιο συγκεκριμένα εξαρτάται από τον υποδοχέα θανάτου FAS/CD95, ο οποίος περιέχει στο κυτοσολικό του τμήμα μια διακριτή περιοχή απαραίτητη για τη μεταγωγή του αποπτωτικού σήματος (*Mandal et al., 2005*).

Τα ερυθροκύτταρα σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες ή κατά τη γήρανση συσσωματώνουν ολιγομερή FAS/CD95 στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και συγκεκριμένα στις λιπιδικές σχεδίες. Ο ολιγομερισμός αυτός προσελκύει τον FADD (FAS activated death domain) που είναι ειδικός για τον FAS/CD95 πρωτεϊνικός προσαρμοστής. Η εκλεκτική τους σύνδεση προκαλεί τη διαδοχική σύνδεση της πρόδρομης κασπάσης-8 στο σύμπλεγμα του υποδοχέα. Η στρατολόγηση της προκασπάσης-8 στο σύμπλεγμα του ενεργοποιημένου υποδοχέα προκαλεί την αυτοπρωτεόλυσή της σε ενεργό κασπάση-8 (*Mandal et al., 2005*). Η ενεργοποιημένη κασπάση-8 απελευθερώνεται από το σύμπλοκο του υποδοχέα και μετακινείται στο κυτοσόλιο όπου αναγνωρίζει και πρωτεολύει εκλεκτικά την προκασπάση-3 σε ενεργό κασπάση-3. Η κασπάση-3 πρωτεολύει και αυτή με τη σειρά της τις κύριες πρωτεΐνες του ερυθροκυττάρου, όπως είναι η ζώνη-3, η σπεκτρίνη και η ακτίνη, ενώ προκαλεί ταυτόχρονα και εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης, με τελικό αποτέλεσμα τη φαγοκυττάρωση (*Mandal et al., 2003*).

## **A7. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ**

Από τα προηγούμενα συνεπάγεται πως η μελέτη των προαναφερθέντων μονοπατιών και φαινομένων, είναι κομβικής σημασίας για τη κατανόηση της λειτουργίας και της ομοιόστασης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα αποτελούν ένα πρότυπο μοντέλο τόσο για τη μελέτη της οξειδωτικής επιβάρυνσης όσο και των μονοπατιών γήρανσης και προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Πέραν όμως από τη συμβολή στην έρευνα, η κλινική σημασία του προς μετάγγιση αίματος είναι τεράστια. Σε όλο τον κόσμο μεταγγίζονται πάνω από 80 εκατομμύρια μονάδες συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων κάθε χρόνο. Ιδιαίτερα στις αναπτυγμένες χώρες, περίπου το 1% του πληθυσμού λαμβάνει μετάγγιση σε ετήσια βάση (*Hess, 2010*). Κατά συνέπεια, η αποτελεσματική αποθήκευση των ερυθρών αιμοσφαιρίων του αίματος *ex vivo* αποτελεί βασική προτεραιότητα για την ιατρική πρακτική. Η δυνατότητα αποθήκευσης των συστατικών του αίματος που προορίζονται για μετάγγιση επιτρέπει το διαχωρισμό του δότη και του δέκτη στο χώρο και το χρόνο (*Hess, 2009*).

### **A7.1. Γενικά**

Η ποσότητα του αίματος μίας πρότυπης αιμοδοσίας ανέρχεται σε περίπου 450mL χωρίς το αντιπηκτικό. Προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα αντιπηκτικού που ανέρχεται στα 60 mL. Το αίμα που συλλέγεται σε ασκούς μετάγγισης αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C μέχρι να υποστεί επεξεργασία (*Brecher, 2008*). Οι μονάδες μετάγγισης διαχωρίζονται στα συστατικά τους (πλάσμα, αιμοπετάλια και συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια) και εν συνεχεία περνούν τον απαραίτητο εργαστηριακό έλεγχο. Σε πολλές περιπτώσεις προστίθεται επιπλέον συντηρητικό για βελτιστοποίηση των συνθηκών αποθήκευσης των κυττάρων και επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης (*World Health Organization, 2007*). Κάθε μονάδα αίματος που προορίζεται για μετάγγιση είναι υποχρεωτικό να



ελεγχθεί για το σύστημα ομάδων ABO και Rhesus (Rh). Επιπλέον κάθε παράγωγο ελέγχεται για λοιμώδη νοσήματα, όπως το AIDS, η ηπατίτιδα Β, η ηπατίτιδα C, η σύφιλη και ο HTLV. Σε πολλές χώρες ανάλογα και με ασθένειες που ενδημούν στο συγκεκριμένο γεωγραφικό διαμέρισμα είναι αναγκαίο να γίνονται επιπρόσθετοι έλεγχοι (π.χ. χώρες με αυξημένα ποσοστά ελονοσίας) (*Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, 1998*). Ακολουθεί ο ποιοτικός έλεγχος των συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων. Ο όγκος τους πρέπει να κυμαίνεται από 280-330mL. Το εργαστήριο ελέγχου ποιότητας είναι υπεύθυνο να ελέγχει τον αιματοκρίτη (65-75%), την αιμοσφαιρίνη (45g) και την αιμόλυση στο τέλος της αποθήκευσης. Για τους λευκαφαιρεμένους ασκούς πρέπει να γίνεται και μέτρηση λευκών αιμοσφαιρίων, τα οποία δεν πρέπει να ξεπερνούν το  $1,0 \times 10^6$  ανά μονάδα αίματος (*Επιτροπή της Ευρώπης, 2000*). Μετά το τέλος των εργαστηριακών εξετάσεων οι ασκοί σημαίνονται με ειδικές ετικέτες που προσδιορίζουν τα στοιχεία του περιεχόμενου αίματος. Τα συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα αποθηκεύονται αυστηρά στους 4°C, με το χρόνο αποθήκευσης να εξαρτάται από το διάλυμα συντήρησης που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα με το αντιπηκτικό CPDA-1 ο χρόνος αποθήκευσης των συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων είναι 35 μέρες, ενώ με το αντιπηκτικό CPD/SAGM ανέρχεται στις 42 μέρες (*World Health Organization, 2007*).

## **A7.2. Διαλύματα Συντήρησης**

Το αίμα αποθηκεύεται σε διαλύματα και προορίζεται για μετάγγιση πάνω από 90 χρόνια. Τα πρώτα διαλύματα συντήρησης περιείχαν κιτρικό οξύ και γλυκόζη. Κατά την περίοδο του Δεύτερου Παγκοσμίου Πολέμου παρασκευάστηκε κάτω από συνθήκες αποστείρωσης το ACD (Acid Citrate Dextrose) το οποίο μπορούσε να διατηρήσει ερυθροκύτταρα για 21 μέρες (*Loutit και Mollison, 1943*). Το επόμενο βήμα στη σύνθεση τέτοιων διαλυμάτων ήταν η προσθήκη φωσφορικών στο μείγμα. Τα φωσφορικά κατάφεραν να αναπληρώσουν την παρατηρούμενη απώλεια φωσφόρου από τα ερυθροκύτταρα, διατηρώντας ταυτόχρονα το ATP σε πιο αποδεκτά ποσοστά (*Hess et al., 2002*). Έτσι παράχθηκε το CPD (Citrate Phosphate Dextrose) το οποίο αύξησε το χρόνο διατήρησης στις 4 εβδομάδες (αν και τελικά χρησιμοποιήθηκε μόνο για 3 εβδομάδες αποθήκευσης) (*Orlina και Josephson, 1969*).

Η «επανάσταση» στις μεθόδους αποθήκευσης πυροδοτήθηκε από την ανακάλυψη και κατασκευή των πρώτων πλαστικών ασκών μετάγγισης (δεκαετία του '60) που χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα. Πέραν των πρακτικών ευκολιών που προσέφεραν (καταλαμβάνουν λιγότερο χώρο, αεροστεγείς), βοήθησαν και στη επιβίωση των αποθηκευμένων κυττάρων λόγω της σύστασής τους (*Hess, 2006*). Οι ασκοί που κατασκευάζονται από πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC) περιέχουν και τη χημική ένωση DEHP (Diethylhexyl Phthalate). Η πλαστική σύσταση του ασκού όχι μόνο δεν δημιουργεί πρόβλημα στα κύτταρα αλλά λειτουργεί και ευεργετικά. Πιο συγκεκριμένα η διαρροή DEHP που παρατηρείται, οδηγεί σε είσοδο στο εσωτερικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων (*Hill et al., 2001*). Η είσοδος ακολουθείται από μείωση απώλειας της μεμβράνης, της μικροκυστιδιοποίησης και της αιμόλυσης. Τα ερυθροκύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν σε γενικές γραμμές σε PVC ασκούς, για διπλάσιο χρόνο από ότι σε οποιοδήποτε άλλο πλαστικό ή σε γυαλί (*Hess, 2006*).

Πολύ σημαντικό σημείο στην ιστορία της αποθήκευσης αποτέλεσε η παρασκευή του συντηρητικού CPDA-1 (Citrate Phosphate Dextrose Adenine-1) μετά από προσθήκη αδενίνης. Η προσθήκη αδενίνης βοηθά στη διατήρηση του φυσιολογικού κυτταρικού σχήματος, τη συγκέντρωση ATP και γενικά στη βιωσιμότητα, αυξάνοντας ταυτόχρονα την περίοδο αποθήκευσης στις 35 μέρες



(Shields, 1969). Με βάση το CPDA-1 και προσθήκη επιπλέον διαλυμάτων έχουν παρασκευαστεί διάφορα μέσα συντήρησης, ένα εκ των οποίων είναι το **CPD/SAGM (Citrate Phosphate Dextrose/Saline Adenine Glucose Mannitol)** (Hogman et al., 1981). Επιγραμματικά τα συστατικά του εν λόγω διαλύματος λειτουργούν ως εξής α) Τα κιτρικά ως αντιπηκτικά, β) Τα φωσφορικά για αναπλήρωση της απώλειας φωσφορικών λόγω διάσπασης του 2,3 DPG και δημιουργία νέων μορίων ATP, γ) Η γλυκόζη και η δεξτρόζη για ενέργεια, δ) Η αδενίνη για αναπλήρωση των αντίστοιχων απωλειών και ε) Ημανιτόλη για μείωση των οξειδωτικών επιδράσεων (αφού λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό, «καθαρίζοντας» τις ελεύθερες ρίζες) και σταθεροποίηση της μεμβράνης (Beutler και Kuhl, 1988). Με τη χρήση CPD/SAGM ο χρόνος αποθήκευσης έφτασε τις 6 εβδομάδες. Το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία. Πολλά προσθετικά διαλύματα έχουν ήδη παρασκευαστεί και επιτυγχάνουν επιμήκυνση του χρόνου αποθήκευσης στις 7 (CPD/PAGGS-M) και 8 εβδομάδες (CPD/EAS-81). Τέτοια μέσα συντήρησης πιθανά να αποτελούν και το μέλλον της αποθήκευσης (Hess, 2006). Ταυτόχρονα η προσπάθεια της επιστημονικής κοινότητας να ελαχιστοποιήσει τις βλάβες κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και να μεγιστοποιήσει το κλινικό όφελος στο δέκτη της μετάγγισης έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη εναλλακτικών στρατηγικών αποθήκευσης των ερυθροκυττάρων. Τέτοιες στρατηγικές αντιστοιχούν στην κρυστάλλωση των πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων στους  $-20^{\circ}\text{C}$  καθώς επίσης και στην αποθήκευσή τους υπό αναερόβιες συνθήκες.

### **A7.3. Αποθηκευτική Βλάβη των Ερυθροκυττάρων**

Όπως όλα τα κύτταρα που βρίσκονται έξω από το φυσιολογικό τους περιβάλλον έτσι και τα ερυθρά αιμοσφαίρια υπόκεινται σε μία σειρά βλαβών κατά τη διάρκεια της παραμονής του σε ασκούς μετάγγισης. Το σύνολο των βιοχημικών, μηχανικών και μεμβρανικών αλλαγών στη λειτουργία και την ακεραιότητα των ερυθροκυττάρων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, το οποίο επηρεάζει την επιβίωση και λειτουργία *in vivo*, ονομάζεται «Αποθηκευτική Βλάβη των Ερυθροκυττάρων». Η γήρανση γενικά φαίνεται να επιταχύνεται ή να διαταράσσεται λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας (Antonelou et al., 2010b). Οι βλάβες κατά την *ex vivo* αποθήκευση μπορούν να διακριθούν σε: α) Βιοχημικές/Μεταβολικές αλλαγές (πτώση του pH, μείωση 2,3 DPG και ATP, αύξηση ενδοκυτταρικού ασβεστίου, επιδεκτικότητα σε οξειδωτικό στρες κ.α.), β) Μηχανικές αλλαγές (παραμόρφωση, μετασχηματισμός σε εχινοκύτταρα κ.α.) γ) Μεμβρανικές αλλαγές (απώλεια λιπιδίων, εξωτερίκευση PS, μεταβολή σε επιφανειακούς δείκτες, μείωση ελαστικότητας κ.α.) και δ) Οξειδωτικές αλλαγές και βλάβες (Kor et al., 2009).

Οι κυριότερες βιοχημικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά την αποθήκευση αφορούν τη μείωση του 2,3 DPG και του ATP (Raat et al., 2005) καθώς και το μεταβολισμό του μονοξειδίου του αζώτου (NO) (Reynolds et al., 2007). Πιο χαρακτηριστική είναι η ταχεία μείωση του 2,3 DPG το οποίο μέσα σε χρόνο δύο εβδομάδων είναι μη-ανιχνεύσιμο (Almac και Ince, 2007). Το 2,3 DPG είναι ένας αλλοστερικός τροποποιητής της αιμοσφαιρίνης, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση του οξυγόνου στους ιστούς (Kor et al., 2009). Υψηλή συγκέντρωση του 2,3-DPG ευνοεί την απελευθέρωση οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη ενώ χαμηλά επίπεδα αυξάνουν τη συγγένεια μεταξύ τους. Έλλειψη του 2,3-DPG παρεμποδίζει την ικανότητα της αιμοσφαιρίνης για παροχή οξυγόνου (Delobel et al., 2010). Παρά τις αρχικές ανησυχίες για ελλιπή απελευθέρωση οξυγόνου στους ιστούς από τα μεταγγιζόμενα ερυθροκύτταρα, φαίνεται να μην υφίστανται σοβαρές

κλινικές επιπτώσεις (*D'Almeida et al., 2001*) καθώς τα επίπεδα του 2,3 DPG ανακάμπτουν ταχύτατα εντός λίγων ωρών από τη μετάγγιση (*Heaton et al., 1989*).

Επίσης μεγάλης σημασίας είναι η χρονο-εξαρτώμενη μείωση του ενδοκυτταρικού ATP. Η πτώση στα επίπεδα του ATP φαίνεται πιο σημαντική σε αποθήκευση που ξεπερνά τις 5 εβδομάδες. Κατά τη γλυκόλυση, τα ερυθροκύτταρα αποικοδομούν ένα μόριο γλυκόζης προς δύο μόρια γαλακτικού οξέος, δύο πρωτόνια, δύο μόρια ATP και δύο NAD<sup>+</sup> μειώνοντας τα ισοδύναμα NADH. Τα πρωτόνια που παράγονται στη γλυκόλυση καθιστούν το διάλυμα αποθήκευσης και τα ερυθροκύτταρα όλο και πιο οξειδωτικά. Αυτή η οξείδωση με τη σειρά της επιβραδύνει περαιτέρω τη γλυκόλυση, επειδή τα πρωτόνια αναστέλλουν τις κινάσες της εξόζης και τη φωσφοφρουκτοκινάση, ένζυμα ενεργοποίησης της κύριας γλυκολυτικής οδού. Ως αποτέλεσμα, λιγότερα μόρια ATP και μόρια NADH παράγονται με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης. Οι διαταραχές στο μεταβολισμό του ATP επιδρούν στην ενεργότητα της ΑΤΡάσης Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>, τη μεμβρανική σταθερότητα, την κατανομή των φωσφολιπιδίων στη μεμβράνη, τη μεταφορά γλυκόζης και τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (*Raat et al., 2005*). Όπως και στην περίπτωση του 2,3 DPG έτσι κι εδώ το ATP επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα μετά τη μετάγγιση και οι μορφολογικές μεταβολές (εχνοκυττάρωση) που προκαλεί είναι αναστρέψιμες (*Kor et al., 2009*).

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειοδιαστολή, η οποία είναι οξυγονο-εξαρτώμενη. Η παραπάνω διαδικασία διαμεσολαβείται από την αιμοσφαιρίνη η οποία απελευθερώνει τον αγγειοδιασταλτικό παράγοντα SNO (S-nitrosothiol) ανάλογα με την έκταση της περιφερειακής υποξαιμίας. Πιο συγκεκριμένα ένα άτομο θείου συνδέεται με τη β-93 κυστεΐνη της δεόξυ-αιμοσφαιρίνης και έτσι τα ερυθροκύτταρα μεταφέρουν τον αγγειοδιασταλτικό παράγοντα SNO. Όταν η πίεση του οξυγόνου είναι χαμηλή, αυτό ανιχνεύεται από την αιμοσφαιρίνη και μέσα σε δευτερόλεπτα απελευθερώνεται η αναγκαία ποσότητα του παράγοντα από τα ερυθροκύτταρα, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο αγγειοδιαστολή για την ερυθροκυτταρική διέλευση μέσω των αιμοφόρων αγγείων (*Van de Watering και Brand, 2011*). Σε περιπτώσεις αποθήκευσης η ενεργότητα του SNO μειώνεται πολύ γρήγορα (εντός 3 ωρών σε *ex vivo συνθήκες*) και μπορεί να επηρεάζει τη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς μετά από μετάγγιση (*Reynolds et al., 2007*). αφού απαιτούνται αρκετές ώρες για να ενεργοποιηθεί.

Τέλος το pH του αρχικού διαλύματος αποθήκευσης είναι ένας σημαντικός παράγοντας για το μεταβολισμό και την επιβίωση των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων. Σε pH μικρότερο του 7.2, ευνοείται η διάσπαση του 2,3-DPG και αυτό οδηγεί σε μία αρχική αύξηση παραγωγής ATP και σε αυξημένη συγγένεια της αιμοσφαιρίνης για το οξυγόνο (*Hess, 2010*). Η μείωση του pH που παρατηρείται κατά τη διάρκεια αποθήκευσης οφείλεται στην αύξηση συγκέντρωσης των παραγόμενων πρωτονίων καθώς επίσης και τη συσσώρευση γαλακτικού οξέος κάτι το οποίο επηρεάζει ποικίλες λειτουργίες των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων.

Οι μηχανικές αλλαγές που υφίστανται τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα σχετίζονται με μεταβολές στο κυτταρικό σχήμα, παραμόρφωση, οσμωτική ευθραυστότητα, φυσαλιδοποίηση και μεταβολή στο ενδοκυτταρικό ιζώδες (*Almac και Ince, 2007*). Οι αλλαγές αυτές επηρεάζουν τη δίοδο των ερυθρών αιμοσφαιρίων στα τριχοειδή και οδηγούν σε ελάττωση της οξυγόνωσης των ιστών (*Luk et al., 2003*). Η πιο χαρακτηριστική μορφολογική μεταβολή είναι η μετατροπή σε εχνοκύτταρα (αρχικά) και σφαιρο-εχνοκύτταρα (τελικά). Τα τελευταία δεν έχουν τη δυνατότητα να επανέλθουν

στο φυσιολογικό τους σχήμα μετά τη μετάγγιση επειδή έχουν απωλέσει μεγάλο ποσοστό της μεμβράνης και είναι υποψήφια προς εκκαθάριση στο δέκτη (χαρακτηρίζονται ως μη αντιστρεπτής παραμόρφωσης RBCs) (Hess και Greenwalt, 2002).

Όσον αφορά στις μεμβρανικές αλλαγές, κεντρικό ρόλο έχουν: η απώλεια μεμβράνης, η μικροκυστιδιοποίηση (Hess και Greenwalt, 2002), η ανακατανομή των λιπιδίων στη διπλοστιβάδα και οι τροποποιήσεις πρωτεϊνών (Wolfe, 1985). Η ανακατανομή των φωσφολιπιδίων οφείλεται στο αυξημένο οξειδωτικό φορτίο των κυττάρων και πιστεύεται πως προκαλεί ελάττωση της παραμορφωσιμότητας και της επιβίωσης *in vivo* (Brunauer et al., 1994). Επίσης μη αντιστρεπτές αλλαγές της ζώνης-3 φαίνεται να λαμβάνουν χώρα αρκετά νωρίς (ημέρα 12) κατά την αποθήκευση, επιδρώντας στην αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων (Karon et al., 2009).

#### **A7.4. Σηματοδοτικά Μονοπάτια και Δείκτες Γήρανσης των RBCs σε Συνθήκες Αποθήκευσης**

Ερυθρά αιμοσφαίρια σε συνθήκες αποθήκευσης (μονάδες μετάγγισης) εμφανίζουν αρκετές διαφορές όσον αφορά στις διαδικασίες γήρανσης, σε σχέση με τις συνθήκες *in vivo*. Η διατήρηση στους 4°C επιταχύνει τη γήρανση όπως επίσης και η απουσία γειτονικών κυττάρων και πλάσματος, που συνεχώς τροφοδοτούν τα RBCs με παράγοντες επιβίωσης. Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο το οποίο δεν πρέπει να παραβλέπεται είναι η προοδευτική συσσώρευση κυτταρικών αποβλήτων στον ασκό, τα οποία επηρεάζουν δυσμενώς κάθε διεργασία των κυττάρων (Antonelou et al., 2010b).

Εύκολα αναγνωρίσιμες βιοχημικές επιπτώσεις της αποθήκευσης είναι η μείωση του ATP, του 2,3-DPG, του pH και του ποσοστού γλυκόλυσης, η συσσώρευση του γαλακτικού οξέως και η αύξηση του ενδοκυτταρικού  $Ca^{+2}$ . Η κυριότερη βιοφυσική επίδραση της αποθήκευσης είναι πιθανότατα η απώλεια μεμβράνης και αιμοσφαιρίνης, μέσα από την προοδευτική αύξηση της κυστιδιοποίησης (Greenwalt, 2006). Όσον αφορά στα μη λευκαφαιρεμένα δείγματα αρνητική είναι και η επίδραση των λευκών αιμοσφαιρίων τα οποία απελευθερώνουν ένζυμα, κυτταροκίνες και ρίζες οξυγόνου προωθώντας τις βλάβες αποθήκευσης (Annis et al., 2005). Επίσης με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης παρατηρούνται διαφορετικές επιδράσεις εξαρτώμενες από την οξείδωση, κάτι που φαίνεται να σχετίζεται και με τις αλλαγές της ζώνης-3 (Messana et al., 2000). Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις πως μια χρονοεξαρτώμενη οξειδωτική επίθεση στην αιμοσφαιρίνη, τη μεμβράνη και τα συστατικά του κυτταροσκελετού, παίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των αποθηκευμένων RBCs (Antonelou et al., 2010a; Kriebardis et al., 2006; Kriebardis et al., 2008). Τέλος χαρακτηριστική είναι η μετακίνηση στη μεμβράνη, κυτοσολικών πρωτεϊνών όπως μοριακοί συνοδοί, κινάσες, φωσφατάσες κ.α. (Antonelou et al., 2010a; Kriebardis et al., 2007a).

##### **A7.4.1. Το Βασιζόμενο στη Ζώνη-3 Μονοπάτι Γήρανσης και η Κυστιδιοποίηση *Ex vivo***

Όπως ήταν αναμενόμενο υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στη γήρανση *in vivo* και *ex vivo*, όπως η μεταβολή στο μέγεθος, το σχήμα και το περιεχόμενο των κυστιδίων. Ανάλυση των κυστιδίων δείχνει την παρουσία τροποποιημένης ζώνης-3, οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης, IgGs και συστατικών του συμπληρώματος, κάτι που επαληθεύει τον ευεργετικό ρόλο της κυστιδιοποίησης στην επιβίωση των αποθηκευμένων RBCs (Kriebardis et al., 2008; Bosman et al., 2008a; Antonelou et al., 2010a). Επιπλέον, η συγκέντρωση οξειδωμένων πρωτεϊνών σε κυστίδια υποδηλώνει ότι η κυστιδιοποίηση λειτουργεί σαν ένας αποτελεσματικός τρόπος απαλλαγής από τις κατεστραμμένες πρωτεΐνες που παράγονται στις μονάδες μετάγγισης λόγω του οξειδωτικού στρες που σχετίζεται με την

αποθήκευση. Η διαρκής συνύπαρξη των κυστιδίων με τα κύτταρα που τα παρήγαγαν είναι μια καινοτομία που δε συναντάται *in vivo*. Παρά τις διαφορές στη φυσαλιδοποίηση τα κύτταρα που φυλάσσονται σε ασκούς εκφράζουν κάποια από τα τυπικά σημεία γήρανσης και ερυθροφαγοκυττάρωσης (Bosman *et al.*, 2010). Όσον αφορά στο μονοπάτι της ζώνης-3 όλα τα βασικά χαρακτηριστικά του έχουν τεκμηριωθεί σε συνθήκες *ex vivo*. Παραδείγματα αποτελούν: η πρόωμη και σταδιακή αύξηση της συσσώρευσης οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης στη μεμβράνη και τον κυτταροσκελετό, η πρόωμη εμπλοκή της σπεκτρίνης με την αιμοσφαιρίνη, ο ολιγομερισμός της ζώνης-3 στη μεμβράνη και η εναπόθεση IgGs (Kriebardis *et al.*, 2007a; Kriebardis *et al.*, 2007b).

#### **A7.4.2. Επίδραση $Ca^{+2}$ και Μονοπάτια Απόπτωσης *Ex vivo***

Τα κυστίδια που προέρχονται από αποθηκευμένα RBCs εκφράζουν PS στην επιφάνειά τους και γενικά παρατηρείται μια αύξηση στην εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (Bosman *et al.*, 2010). Όσον αφορά στην επίδραση του ασβεστίου είναι γνωστό πως η αναδιοργάνωση της μεμβράνης περιλαμβάνει την πρόσδεση της σορκίνης και της συνεξίνης, δύο πρωτεϊνών που εξαρτώνται από το ασβέστιο, όπως συμβαίνει και στη μεταγωγή σήματος κατά την γήρανση *in vivo* (Kriebardis *et al.*, 2007a). Εξάλλου είναι χαρακτηριστικές οι αποθηκευτικές βλάβες των RBCs λόγω υψηλότατων επιπέδων  $Ca^{+2}$  (μπορεί να ξεπερνά τα 100 $\mu$ mol/L τη στιγμή που *in vivo* τα επίπεδα κυμαίνονται στα 16  $\mu$ mol/L). Επιπροσθέτως, παρατεταμένη αποθήκευση συσχετίζεται με τροποποιήσεις πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον Fas και ενεργοποίηση κασπασών (Antonellou *et al.*, 2010a; Kriebardis *et al.*, 2007a). Όμως μέχρι σήμερα δεν είναι σαφές αν τελικά η ενεργοποίηση αυτή σχετίζεται με την ερυθρόπτωση ή την απόπτωση γενικότερα, σε ερυθροκύτταρα ασκών μετάγγισης. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν παρόλα αυτά ότι η ενεργοποίηση των κασπασών συμπίπτει με αλλαγές της μεμβράνης στα αποθηκευμένα κύτταρα (Antonellou *et al.*, 2010a). Αυτές οι πιθανώς επαγόμενες από την κασπάση μεταβολές της μεμβράνης, μπορεί να παρεμβαίνουν στις μηχανικές της ιδιότητες, την έκταση της κυστιδιοποίησης και τη σηματοδότηση της γήρανσης (Suzuki *et al.*, 2007; Pietraforte *et al.*, 2007).

#### **A7.4.3. Φαγοκυττάρωση Σχετιζόμενη με CD47 σε Αποθηκευμένα RBCs**

Όσον αφορά στα υπόλοιπα μονοπάτια γήρανσης, έχει παρατηρηθεί απώλεια του CD47, ιδιαίτερα στα πιο γηρασμένα κύτταρα (Sparrow *et al.*, 2006), κατά τη διάρκεια της αποθηκευτικής περιόδου. Προφανώς η τροποποίηση αυτή μπορεί να καταστήσει τα ερυθροκύτταρα πιο ευαίσθητα στην εκκαθάριση, αφού μεταγγισθούν. Επιπλέον φαίνεται να υπάρχει μία σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των εναπομεινάντων λευκοκυττάρων στη μονάδα μετάγγισης και των επιπέδων έκφρασης του CD47, καθώς η απομάκρυνση της λευκοκυτταρικής στιβάδας συνάδει με αύξηση στην έκφραση του CD47 (Kamel *et al.*, 2010). Το CD47 έχει ανιχνευθεί επίσης σε ελεύθερα κυστίδια, κάτι το οποίο δείχνει μια διαρκή αλληλεπίδραση μεταξύ των σινιάλων που σχετίζονται με τη φαγοκυττάρωση (Bosman *et al.*, 2008a; Kriebardis *et al.*, 2008). Τέλος σε ερυθρά αιμοσφαίρια που είχαν αποθηκευτεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, η πρωτεΐνη CD47 εμφάνισε αλλαγή στη διαμόρφωσή της που είχε ως αποτέλεσμα την πρόσδεση θρομβοσπονδίνης-1, γεγονός που λειτουργεί ως σήμα για φαγοκυττάρωση (Burger *et al.*, 2012).

#### **A7.4.4. Σχέση του Οξειδωτικού Στρες με την Ex vivo Γήρανση των RBCs**

Με το πέρασμα του χρόνου κατά την αποθήκευση πέφτει η αντιοξειδωτική άμυνα και συσσωρεύονται όλο και περισσότερες οξειδωτικές βλάβες στη μεμβράνη και τον κυτταροσκελετό (Antonelou *et al.*, 2010a; Kriebardis *et al.*, 2007a). Οι οξειδωτικοί μηχανισμοί που αναφέρθηκαν κατά τη γήρανση *in vivo*, είναι παρόντες και σε κύτταρα που φυλάσσονται σε ασκούς μετάγγισης και πιθανώς σχετίζονται με επιτάχυνση των διαδικασιών που εμπλέκονται στη γήρανση (Kaniyas και Acker, 2010). Υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν πως η οξείδωση παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην κυστιδιοποίηση όσο και την υποβάθμιση πρωτεϊνικών συστατικών (ειδικά του κυτταροσκελετού) (D'Amici *et al.*, 2007). Για παράδειγμα κατά την αποθήκευση, το ιόν του υπεροξειδίου μπορεί να αλληλεπιδράσει με σίδηρο και νερό, έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ριζών υδροξυλίου ικανών να επιτεθούν και να καταστρέψουν τόσο πρωτεΐνες, όσο και λιπίδια, οδηγώντας έτσι στη διάσπασή τους και τη δημιουργία συσσωματωμάτων. Χαρακτηριστικότερη μετατροπή αποτελεί εκείνη της αιμοσφαιρίνης σε αιμοχρώματα. Η οξειδωτική κατάσταση της αιμοσφαιρίνης και οι μεμβρανικές βλάβες που προκαλεί, αποτελούν κομβικό σημείο τόσο στη φυσιολογία των ερυθροκυττάρων όσο και στην προαγωγή μη αναστρέψιμων σηματοδοτικών μονοπατιών (Antonelou *et al.*, 2010a; Kriebardis *et al.*, 2008). Όλοι οι παραπάνω παράγοντες μπορεί να συμβάλλουν στη δημιουργία νέο-αντιγόνων γήρανσης. Το διαφορετικό μοτίβο έκφρασης κάποιων δεικτών γήρανσης όταν τα RBCs αποθηκεύονται παρουσία μαννιτόλης (αντιοξειδωτική δράση), ενισχύει τη συσχέτιση οξειδωτικών βλαβών και γήρανσης *ex vivo* (Antonelou *et al.*, 2010a). Αν συνυπολογιστεί και η απουσία μηχανισμών εκκαθάρισης στον ασκό μετάγγισης, γίνεται κατανοητό πως το τελικό αποτέλεσμα των προαναφερθέντων μηχανισμών «πολλαπλασιάζεται», εις βάρος της επιβίωσης των προς μετάγγιση ερυθροκυττάρων (Antonelou *et al.*, 2010b).

#### **A7.5. Παράγοντες που Επηρεάζουν την Ποιότητα Αποθηκευμένων RBCs**

Το βασικό ερώτημα της ιατρικής των μεταγγίσεων, πέραν των πιθανών κλινικών επιπτώσεων μίας μετάγγισης, είναι η αποσαφήνιση των αιτιών που οδηγούν τα ερυθροκύτταρα στις βλάβες αποθήκευσης που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα. Τα τελευταία 30 χρόνια τα συστήματα αποθήκευσης ερυθροκυττάρων τόσο στην Ευρώπη όσο και στις Η.Π.Α αξιολογούνται με βάση την ικανότητα ανάκτησης *in vivo* (μεγαλύτερη από 75%) και των επιπέδων αιμόλυσης εντός του ασκού (μικρότερη από 0,8-1,0% της ολικής αιμοσφαιρίνης). Τα αποτελέσματα από πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι έξι παράγοντες επηρεάζουν την ανάκτηση μετά από αποθήκευση και πιθανόν την αιμόλυση εντός της μονάδας μετάγγισης. Οι παράγοντες αυτοί είναι: 1) η διάρκεια της αποθήκευσης, 2) το είδος πλαστικού που χρησιμοποιείται στον ασκό, 3) η σύνθεση του διαλύματος συντήρησης στον ασκό, 4), ο όγκος του διαλύματος συντήρησης στον ασκό, 5) η ποιότητα της λευκαφαίρεσης, και 6) η έως τώρα ανεπαρκώς κατανοητή διακύμανση των διαφορετικών δοτών όσον αφορά στην ικανότητα αποθήκευσης των ερυθροκυττάρων τους (Hess, 2012). Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν οι δύο τελευταίες παράμετροι λεπτομέρειες των οποίων ακολουθούν στις επόμενες παραγράφους.

##### **A7.5.1 Λευκαφαίρεση**

Η λευκαφαίρεση είναι μία διαδικασία κατά την οποία αφαιρούνται τα λευκά αιμοσφαίρια (και τα αιμοπετάλια) από το αίμα που προορίζεται για μετάγγιση. Η αφαίρεση επιτυγχάνεται με διήθηση σε φίλτρο που κατακρατά τα λευκοκύτταρα. Η λευκαφαίρεση απομακρύνει το 99,9% των λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων του δότη (Grimshaw *et al.*, 2011). Τα λευκαφαιρεμένα



ερυθροκύτταρα, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς καθώς επίσης και σε ασθενείς με ιστορικό πυρετικών μη αιμολυτικών αντιδράσεων καθώς η χρήση τους μειώνει τις πυρετικές και μη αιμολυτικές αντιδράσεις στο δέκτη (*World Health Organization, 2007*). Μία μονάδα μετάγγισης για να θεωρηθεί λευκαφαιρεμένη πρέπει να φέρει αριθμό λευκοκυττάρων μικρότερο του  $1 \times 10^6$ .

Η σημασία της λευκαφαίρεσης είναι εμφανής αν αναλογιστεί κανείς την αρνητική επίδραση που μπορεί να προκαλέσει η παρουσία των λευκοκυττάρων στο αίμα που προορίζεται για μετάγγιση, τόσο σε κλινικό όσο και μοριακό επίπεδο. Όσον αφορά στην κλινική πράξη, τα μη λευκαφαιρεμένα δείγματα σε πολλές περιπτώσεις προκαλούν την ανοσοβιολογική απόκριση του δέκτη. Ειδικά σε περιπτώσεις πολυμεταγγιζόμενων ασθενών η αντίδραση των αμυντικών μηχανισμών είναι εκτεταμένη (πέραν του πυρετού που εμφανίζεται συχνά και σε απλές περιπτώσεις μετάγγισης) και αναιρεί κάθε όφελος από τη μετάγγιση (*Blumberg και Heal, 1998*). Αυτό συμβαίνει λόγω της έκθεσης των αντιγόνων HLA τάξης I και τάξης II στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων. Επιπλέον κάποιοι ιοί όπως ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV) (*Bowden et al., 1995*) και ασθένειες όπως η Creutzfeldt-Jacob (*Klein et al., 1998*), μπορούν να μεταδοθούν λόγω της παρουσίας λευκοκυττάρων. Επιπλέον ανεπιθύμητες επιπλοκές που σχετίζονται με την παρουσία λευκοκυττάρων σε μονάδες μετάγγισης αποτελούν οι μη αιμολυτικές εμπύρετες αντιδράσεις μετάγγισης (NHFTRs), η οξεία πνευμονική βλάβη (TRALI), οι βακτηριακές λοιμώξεις, η πολυοργανική ανεπάρκεια και οι θρομβωτικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις (*Grimshaw et al., 2011*). Κάποια από τα δυσμενή κλινικά αποτελέσματα που αναφέρθηκαν όπως οι (NHFTRs), η ανοσοκαταστολή και η ενεργοποίηση του φλεγμονώδους συστήματος του δέκτη οφείλονται στις παραγόμενες από λευκοκύτταρα κυτοκίνες, IL-1β, IL-6, IL-8 και TNFα (*Tinmouth και Chin-Yee, 2001*). Τέλος, μία λιγότερο επιβεβαιωμένη θεωρία υποστηρίζει πως η μετάγγιση μη λευκαφαιρεμένου αίματος, επηρεάζει την ανοσορρύθμιση στο δέκτη, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της ικανότητας απόκρισης σε μόλυνση ή σε επανεμφάνιση καρκίνου (*Vamvakas, 1996*).

Σε μοριακό επίπεδο, η λευκαφαίρεση επηρεάζει και τις συνθήκες συντήρησης των συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων. Αυτό συμβαίνει γιατί τα λευκά αιμοσφαίρια στους 4°C και κάτω από τις όξινες συνθήκες της αποθήκευσης καταστρέφονται πολύ γρήγορα, απελευθερώνοντας πρωτεάσες και λιπάσες που τραυματίζουν τα ερυθροκύτταρα (*Hess, 2006*). Η αφαίρεση βοηθά στη μείωση της αιμόλυσης και την καλύτερη ανάκτηση των μεταγγιζόμενων ερυθροκυττάρων στο δέκτη (*Heaton et al., 1994*). Η λευκαφαίρεση είναι καλό να πραγματοποιείται πριν την αποθήκευση του αίματος και όχι πριν τη μετάγγιση, λόγω του ότι έτσι αποφεύγονται προβλήματα που προκύπτουν από τη δράση των λευκοκυττάρων και των προϊόντων τους. Κάτι τέτοιο συμβαίνει γιατί οι δραστικές ουσίες που παράγουν τα λευκοκύτταρα (και τα αιμοπετάλια) *ex vivo* μπορούν και διαπερνούν τα φίλτρα λευκαφαίρεσης (*Canadian Coordinating Office for Health Technology Assessment, 1998*).

Πιο συγκεκριμένα, τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια έχουν ενοχοποιηθεί για επιτάχυνση του ρυθμού της αποθηκευτικής βλάβης των ερυθροκυττάρων και ευθύνονται για αυξημένη αιμόλυση, διαρροή  $K^+$  και για μικροκυστιδιοποίηση (*Tinmouth και Chin-Yee, 2001*). Αποπτωτικά ή εκφυλισμένα λευκοκύτταρα απελευθερώνουν στο διάλυμα ποικίλους βιοενεργούς παράγοντες όπως κυτοκίνες, ισταμίνες, λιπίδια, (*Tinmouth και Chin-Yee, 2001*) πρωτεάσες, λιπάσες, γλυκοζιδάσες και άλλα ενδοκυτταρικά ένζυμα (*Hess, 2010*). Όσον αφορά στα αιμοπετάλια λειτουργούν φυσιολογικά ως φυσικά ανοσοποιητικά και φλεγμονώδη κύτταρα, που συμμετέχουν στην αιμόσταση και σε

θρομβωτικές καταστάσεις. Όμως, κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των ερυθροκυττάρων απελευθερώνουν παράγοντες, όπως ο φλεγμονώδης CD40 και βιοενεργές υπεροξειδάσες λιπιδίων (*Van de Watering και Brand, 2011*).

Παράλληλα, οι λιπάσες που παράγονται από τα λευκοκύτταρα μπορεί να διασπάσουν φωσφολιπίδια. Πιο συγκεκριμένα, η φωσφολιπάση-A2 αποακυλιώνει τριαλκυλογλυκερόλες των ερυθροκυττάρων, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο λυσοφωσφολιπίδια (*Zimrin και Hess, 2009*). Τα λυσοφωσφολιπίδια μπορούν να προκαλέσουν οξεία πνευμονική βλάβη (TRALI) στο μεταγγιζόμενο (*Hess, 2010*). Η αφαίρεση λευκοκυττάρων φαίνεται να εμποδίζει σε μεγάλο βαθμό την ασθένεια TRALI και μειώνει σημαντικά τις συγκεντρώσεις των λυσοφωσφολιπιδίων. Επιπλέον, η έκθεση της PS στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη σχετίζεται με τα λευκά αιμοσφαίρια. Πιο συγκεκριμένα, τα λευκαφαιρεμένα ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν μικρή αύξηση στην έκφραση PS, ενώ σε μη λευκαφαιρεμένο αίμα από τη 2<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσης παρατηρείται σημαντική αύξηση (*Van de Watering και Brand, 2011*). Όσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια αποθήκευσης των ερυθροκυττάρων, τόσο περισσότερα από αυτά τα βιολογικά δραστικά λιπίδια παράγονται. Η έκφραση της PS στα ερυθροκύτταρα επιδρά στην αυξημένη προσκόλλησή τους στο ενδοθήλιο. Η λευκαφαίρεση μειώνει τις αλλαγές που προκαλούνται στα αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια και κατ' επέκταση διευκολύνει τη ροή του αίματος διαμέσου των τριχοειδών αγγείων του μεταγγιζόμενου (*Zimrin και Hess, 2009*). Οι γλυκοσιδάσες απομακρύνουν σάκχαρα από γλυκολιπίδια, γλυκοπρωτεΐνες, αλλά και σιαλικό οξύ και διάφορα τελικά σάκχαρα από τις ερυθροκυτταρικές μεμβράνες. Η απώλεια αυτών των σακχάρων από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη μπορεί να εκθέσει υποκείμενες δομές με αποτέλεσμα την αύξηση της δέσμευσης των ερυθροκυττάρων σε ενδοθηλιακά κύτταρα του μεταγγιζόμενου (*Hess, 2010*).

Ο αριθμός μικροκυστιδίων αυξάνει σταθερά με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης. Η παρουσία λευκοκυττάρων, επιβαρύνει τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα και προωθεί την παραγωγή κυστιδίων. Τα μικροκυστιδία σχετίζονται με ανοσοαποκρίσεις, θρομβώσεις και φλεγμονές στους μεταγγιζόμενους. Παρόλα αυτά η λευκαφαίρεση δεν εξαλείφει τα μικροκυστιδία που παρουσιάζονται στο υπερκείμενο (*Grimshaw et al., 2011*). Γι αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η βελτιστοποίηση της ποιότητας των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων. Η αυξημένη απώλεια K<sup>+</sup> παρουσία λευκών αιμοσφαιρίων συνδέεται με το λευκοκυτταρικό ένζυμο χυμοθρυψίνη, μια κατιονική πρωτεΐνη (*Hogman και Meryman, 1999*). Τέλος, η παραγωγή των ελευθέρων ριζών οξυγόνου επιδρά γενικότερα στα ερυθροκύτταρα προάγοντας το οξειδωτικό στρες και την αποθηκευτική βλάβη.

Συμπερασματικά, η προαποθηκευτική διήθηση λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων παρουσιάζει ευεργετική επίδραση στην αποθηκευτική βλάβη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, μειώνοντας την ενζυμική βλάβη, τη μικροκυστιδιοποίηση, την αιμόλυση των ερυθροκυττάρων στο τέλος της αποθήκευσης κατά περίπου 50% και αυξάνοντας την μεταμεταγγισιακή ανάκτηση των ερυθροκυττάρων κατά 2% (*Hess, 2010*). Κατά συνέπεια, προσφέρει σημαντική βελτίωση στην ποιότητα των ερυθροκυττάρων και κατ' επέκταση στις μεταγγίσεις, μειώνοντας τη συχνότητα μετάδοσης ιών και τα έμμεσα, αλλά σοβαρά, επιβλαβή κλινικά αποτελέσματα. Ωστόσο, η προαποθηκευτική λευκαφαίρεση δεν εξαλείφει όλα τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Υπολείμματα τους συνυπάρχουν με τα συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια και είναι σε θέση να παράγουν δυνητικά βιοδραστικές ουσίες επιφέροντας πιθανόν ανεπιθύμητες επιδράσεις. Επίσης έχει

παρατηρηθεί πως ερυθροκύτταρα από διαφορετικούς δότες εμφανίζουν διαφορετική επιδεκτικότητα σε αιμόλυση (Hess, 2009). Ως εκ τούτου, εξακολουθεί να υπάρχει ανάγκη αποσαφήνισης των πιθανών επιπτώσεων της λευκαφαίρεσης στην εξέλιξη της αποθηκευτικής βλάβης καθώς επίσης και στην αποτελεσματικότητα *in vivo* και στις δυσμενείς επιπτώσεις της μετάγγισης.

#### **A7.5.2. Επίδραση Εγγενών Χαρακτηριστικών του Δότη**

Το γεγονός ότι μία μονάδα μετάγγισης παρασκευάζεται σήμερα από μία ατομική αιμοδοσία, σε συνδυασμό με την ευρεία διακύμανση ποικίλων παραμέτρων στον πληθυσμό των δοτών αίματος μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές διαφορές ως προς το περιεχόμενο των επιμέρους μονάδων RBCs, όσον αφορά στον όγκο και την περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης. Πράγματι, έχει παρατηρηθεί μια τεράστια μεταβλητότητα στις ιδιότητες αποθήκευσης και ανάκτησης μετά την αποθήκευση αίματος από διαφορετικούς δότες. Για άγνωστους λόγους τα ερυθροκύτταρα κάποιων δοτών εμφανίζουν κακή αποθηκευτική ικανότητα, κάτι το οποίο είναι γνωστό από το 1966 (Dern *et al.*, 1966).

Η εκτίμηση του χρόνου αποθήκευσης ως μοναδική συνάρτηση της έκτασης της αποθηκευτικής βλάβης, οδήγησε την έρευνα της επίδρασης των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του δότη στην αφάνεια. Ως αποτέλεσμα, η μεταβλητότητα στις ιδιότητες αποθήκευσης του αίματος από διαφορετικούς δότες έχει αποτελέσει σημαντικό άλυτο πρόβλημα στην εκατονταετή ιστορία ανάπτυξης των τεχνικών αποθήκευσης αίματος. Είναι γνωστό πλέον πως ερυθροκύτταρα από συγκεκριμένους δότες εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα αιμόλυσης (Hess *et al.*, 2009) και χαμηλότερα επίπεδα ανάκτησης 24 ώρες μετά τη μετάγγιση (Dumont και AuBuchon, 2008). Ακόμη και στα πλέον σύγχρονα αποθηκευτικά μέσα, διαφορετικοί αιμοδότες εμφανίζουν διαφορετικές δυνατότητες αποθήκευσης με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους να αναδεικνύονται ως ο πιο σημαντικός παράγοντας που οδηγεί σε αιμόλυση εντός του ασκού ακόμη και όταν λαμβάνονται υπόψη όλοι οι υπόλοιποι παράγοντες που προαναφέρθηκαν (λευκαφαίρεση, διάρκεια αποθήκευσης, είδος και όγκος συντηρητικού διαλύματος κλπ). Ωστόσο, εκτός από τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης του δότη, δεν έχουν εξεταστεί μέχρι στιγμής άλλα εγγενή χαρακτηριστικά των ερυθρών αιμοσφαιρίων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ποιότητα του προς μετάγγιση αίματος και πιθανότατα την αποτελεσματικότητα της ίδιας της μετάγγισης.

Τελευταία, όλο και μεγαλύτερος αριθμός μελετών εστιάζει στο φαινόμενο της διακύμανσης αποθηκευτικών χαρακτηριστικών εντός της μονάδας μετάγγισης συναρτήσει της προ-αποθηκευτικής εικόνας του αιμοδότη. Φυσιολογικές παράμετροι των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων όπως η κυτταρική ευθραυστότητα (Tarasev *et al.*, 2014), η αιμόλυση (Dumont και AuBuchon, 2008), η συγκέντρωση ποικίλων μεταβολιτών (Roback, 2011), η κυστιδιοποίηση της μεμβράνης (Bosman *et al.*, 2008a) καθώς επίσης και δείκτες οξειδωτικού στρες και αντιοξειδωτικής ικανότητας (Bosman *et al.*, 2010; Rinalducci *et al.*, 2011; Antonelou *et al.*, 2012) φαίνεται πλέον πως εμφανίζουν σαφείς διαφορές ανάμεσα σε διαφορετικούς υγιείς αιμοδότες. Όσον αφορά στη σύνδεση *in vivo* χαρακτηριστικών του αιμοδότη με αποθηκευτικές παραμέτρους εντός της μονάδας μετάγγισης, ο Dinkla και οι συνεργάτες του έδειξαν πρόσφατα πως υπάρχει μία θετική συσχέτιση ανάμεσα στα προ-αποθηκευτικά επίπεδα εξωτερίκευσης PS και την αιμόλυση εντός της μονάδας αποθήκευσης (Dinkla *et al.*, 2014). Επιπλέον τόσο η ολική συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (Agnihotri *et al.*, 2014) όσο και τα κυτοσολικά επίπεδα GSH/GSSG (Van't Erve *et al.*, 2014) φαίνεται πως εμφανίζουν υψηλά και άμεσα εξαρτώμενα από το δότη ποσοστά διακύμανσης. Παράμετροι όπως οι παραπάνω



πιθανόν να μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες πρόβλεψης της ποιότητας των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων.

Προφανώς, ένα μέρος της παρατηρούμενης ετερογένειας σε αποθηκευτικές παραμέτρους των RBCs ανάμεσα σε υγιείς αιμοδότες θα μπορούσε να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες. Είναι λογικό ένα γενετικό πλαίσιο που επιβάλλει εγγενείς τροποποιήσεις στις ιδιότητες των RBCs *in vivo* να καθορίζει σε κάποιο βαθμό την ικανότητα αποθήκευσης τους ή/και την αποτελεσματικότητα της μετάγγισης. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι η μέση ηλικία των RBCs τη στιγμή της αιμοδοσίας μπορεί να εκτείνεται από 38 έως 60 ημέρες (Cohen *et al.*, 2008). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ηλικία των RBCs συνδέεται με το μέγεθος της αποθηκευτικής βλάβης (Sparrow *et al.*, 2006), μπορεί κανείς να θεωρήσει πως γενετικές παράμετροι που σχετίζονται με την επιτάχυνση της γήρανσης των RBCs ή το οξειδωτικό στρες θα μπορούσαν να επηρεάζουν και την ικανότητα αποθήκευσης. Επίσης γενετικοί παράγοντες που οδηγούν σε αύξηση της μηχανικής ευθραυστότητας μπορεί να επιδρούν στη δομική ακεραιότητα των ερυθροκυττάρων κατά τη διάρκεια της λευκαφαίρεσης. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί ότι το 40% της αιμόλυσης που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της λευκαφαίρεσης αποδίδεται σε δότες ετερόζυγους για δρεπανοκυτταρική αναιμία (Hess, 2010). Επιπρόσθετα έχει παρατηρηθεί ήπια αιμόλυση μετά από μετάγγιση σε αποδέκτες μονάδων πακεταρισμένων RBCs οι οποίες προέρχονται από δότες με έλλειψη του ενζύμου G6PDH (Shalev *et al.*, 1993). Πιθανώς η παρατηρούμενη αιμόλυση να είναι αποτέλεσμα των αποθηκευτικών αλλοιώσεων οι οποίες επιδεινώθηκαν από το συγκεκριμένο γενετικό χαρακτηριστικό του δότη. Πέραν των γενετικών ιδιαιτεροτήτων (ετεροζυγώτες για μεσογειακή ή δρεπανοκυτταρική αναιμία, έλλειψη G6PDH κλπ.) οι βλάβες κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης φαίνεται να σχετίζονται με το φύλο, την ηλικία, τον τρόπο ζωής του αιμοδότη (κάπνισμα) και τα επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης τη στιγμή της αιμοδοσίας (Norton και Rand, 1981; Raval *et al.*, 2011; Antonelou *et al.*, 2011a; Wenk *et al.*, 2011).

## ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της σηματοδότησης κυτταρικής γήρανσης και θανάτου *in vitro* σε ποικίλες συνθήκες που χρησιμοποιούνται εξίσου για μεταγγίσεις και η πιθανή συσχέτιση αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών με χαρακτηριστικά των επιλεγμένων δοτών *in vivo*. Απώτερος στόχος είναι η εκτίμηση της επίδρασης των λευκών αιμοσφαιρίων και άρα της διαδικασίας της **λευκαφαίρεσης** στην επιβίωση και τη δομική/λειτουργική επάρκεια των ερυθροκυττάρων που προορίζονται για μετάγγιση καθώς επίσης και η διαλεύκανση των **εγγενών αιματολογικών χαρακτηριστικών** του δότη τα οποία επηρεάζουν πιθανώς την ικανότητα αποθήκευσης των προς μετάγγιση παραγώγων αίματος.

***ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β:***  
***ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ***

## **B1. ΥΛΙΚΑ**

### **B1.1. Χημικά Αντιδραστήρια**

- Οξικό οξύ
- Οξικό νάτριο
- Ασκορβικό οξύ
- 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), SIGMA
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Ουρική οξύ, SIGMA
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoic acid (DTNB), SIGMA
- Σουλφοσαλυλικικό οξύ
- $\beta$ -NADPH, SIGMA
- Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), SIGMA
- Αναγωγή γλουταθειόνης (GSH), SIGMA
- Αντιδραστήριο Drabkin's, SIGMA
- Brij 35, SIGMA
- Αντιδραστήριο Bradford, BIO-RAD
- Ακρυλαμίδα
- Annexin-V Fluos, ROCHE
- Fluo-4 AM, (Invitrogen)
- Υπερθειικό αμμώνιο (APS)
- $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη
- $\alpha$ -κυτταρίνη
- Κυτταρίνη τύπου 50
- bis-sulfosuccinimidyl-suberate (BS3) crosslinker, Thermo scientific
- sodium orthovanadate, Calbiochem
- N-ethyl maleimide (NEM) (Sigma)
- CM- H<sub>2</sub>DCFDA, INVITROGEN
- Φθορίζοντα σφαιρίδια, Megamix – Biocytex
- Δοκιμαστικοί σωλήνες με σφαιρίδια TruCount™, BD Biosciences
- tert-Butyl hydroperoxide (tBHP), SIGMA
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Απόλυτη αιθανόλη, MERK, BDH
- Ethyleno-diamino-tetraacetic acid disodium salt (EDTA), RESEARCH ORGANICS
- Γλουταρική αλδεΐδη
- Γλυκερόλη
- Γλυκίνη
- Γλυκόζη
- Υδροχλωρικό οξύ

- Ισοπροπανόλη
- Μεθανόλη
- Γάλα σε σκόνη (άπαχο)
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl)
- Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl<sub>2</sub>)
- Υδροξείδιο νάτριο (NaOH)
- Hepes
- Πυροσταφυλικό νάτριο
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O
- N, N, N', N' – Tetramethylethyldiamin (TEMED), SERVA
- Τετροξείδιο του οσμίου, OsO<sub>4</sub>
- Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), SERVA
- Phosphate Buffer Saline tablets (PBS)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- Κακοδυλικό νάτριο
- Σουκρόζη
- Tris
- Tween-20
- Percoll

### **B1.2. Κιτ Εμπορίου**

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

### **B1.3. Χρωστικές**

- Coomassie Brilliant Blue G-250, (SERVA)
- Bradford dye reagent concentrate, (BIO-RAD)
- Μπλε της βρωμοφαινόλης, (SIGMA)

### **B1.4. Αντισώματα**

- anti-4.1R (rabbit)
- anti-4.2 (rabbit)
- anti-stomatin (mouse)

- anti-cathepsin E (rabbit), Santa-Cruz Biotechnology
- anti-CD59 (goat), Santa-Cruz Biotechnology
- anti-Hsp70 (rabbit), Santa-Cruz Biotechnology
- anti-flotillin2 (mouse), BD Transduction Laboratories
- anti-synexin (mouse), BD Transduction Laboratories
- anti-a-adducin (rabbit), Acris
- anti-glycophorin A (rabbit), Santa-Cruz Biotechnology
- anti-glycophorin C (rabbit), Santa-Cruz Biotechnology
- anti-aqp1 (rat), Cell Signaling Technology
- anti-band 3 (mouse), Santa-Cruz Biotechnology
- anti-calpain-1 (rabbit), Santa-Cruz Biotechnology
- anti-CD47 (rabbit), Santa-Cruz Biotechnology
- anti-GAPDH (mouse), Abnova
- anti-Glut-1 (rabbit), Acris GmbH
- anti-Hb (goat), Europa Bioproducts
- anti-human-IgGs-HRP, SIGMA-ALDRICH
- anti-phosphorylated tyrosine (mouse), Millipore
- anti-prx2 (rabbit), Acris GmbH
- anti-sCLU (goat), Santa-Cruz Biotechnology
- anti-spectrin (rabbit), SIGMA-ALDRICH
- Annexin-V-FITC, BD Pharmingen
- anti-glycophorin A-PE (CD235) (rabbit), BD Pharmingen
- anti-human CD47 (clone 2D3) (για κυτταρομετρία ροής), eBioscience
- HRP-conjugated anti-mouse IgG, DakoCytomation
- HRP-conjugated anti-rabbit IgG, R&D Systems
- HRP-conjugated anti-goat IgG, SIGMA-ALDRICH

### **B1.5. Φωτογραφικά Υλικά**

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

### **B1.6. Αναλώσιμα**

- Διηθητικό χαρτί Whatman 3MM, (SCHLEICHER & SCHUELL)
- Eppendorfs διαφόρων όγκων
- Κυβέτες φασματοφωτομέτρου (SIGMA)
- Κυβέτες φθορισμόμετρου
- Νιτροκυτταρίνη 0.45 μm (BIO-RAD)
- Πιπέτες μιας χρήσης διαφόρων όγκων
- Αλουμινόχαρτο

- Αντικειμενοφόροι (stubs) για ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης
- Καλυπτρίδες
- Αντικειμενοφόροι για φωτονικό μικροσκόπιο
- Σύριγγες
- Βελόνες αιμοληψίας (19G)
- Μεταλλικά σφαιρίδια
- Χαρτί πεχαμέτρησης
- Ταινία διπλής όψης
- Ακροφύσια για πιπέτες τύπου Gilson

### **B1.7. Όργανα – Συσκευές**

- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraus, κεφαλή #3344
- Φωτόμετρο (ZEISS)
- Φθορισμόμετρο (BIO-RAD)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (BIO-RAD)
- Κλίβανος
- Ηλεκτρονικός ζυγός (KERN PRS 320-3)
- Ηλεκτρονικό πεχάμετρο
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf, 5410
- Transblot – SDI Semidry Transfer Gel, (BIO-RAD)
- Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM 515, PHILIPS)
- Μικροσκόπιο Φθορισμού (Nikon TE 2005)
- Πιπέτες τύπου Gilson
- Κυτταρόμετρο (BD FACsCan)
- Αιματολογικός αναλυτής, Sysmex K-4500 (ROCHE)
- Βιοχημικός αναλυτής ηλεκτρολυτών, Elecsys Systems Analyzer (ROCHE)
- Φωτόμετρο ELISA (ASYS Jupiter)
- Βιοχημικός αναλυτής, (HITACHI 902)
- Υπερφυγόκεντρος Sorvall, Κεφαλή Ti-70

## **B2. ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **B2.1. Λευκαφαίρεση**

Πριν από κάθε πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθεί τα δείγματα (με εξαίρεση τα δείγματα που προέρχονται από ήδη λευκαφαιρεμένες με φίλτρο μονάδες μετάγγισης) λευκαφαιρούνται. Η λευκαφαίρεση γίνεται σε κολώνες διαφόρων όγκων που αποτελούνται από δύο τύπους κυτταρίνης σε μορφή σκόνης (*Beutler E et al, 1976*). Οι δύο τύποι κυτταρίνης δημιουργούν «πόρους» από τους οποίους περνούν μόνο τα ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ ταυτόχρονα κατακρατούνται τα λευκά και τα αιμοπετάλια. Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

- Ανάμιξη των δύο τύπων κυτταρίνης
- Εμποτισμός της κολώνας με διάλυμα PBS
- Μετάγγιση του προς εξέταση αίματος στην κολώνα
- Συλλογή του αίματος σε PBS (με ή χωρίς εφαρμογή αρνητικής πίεσης)

## **B2.2. Απομόνωση Ερυθροκυτταρικών Μεμβρανών από Ολικό Αίμα**

Για την απομόνωση ερυθροκυτταρικών μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε αίμα τόσο πριν όσο και μετά την αποθήκευση σε μονάδες μετάγγισης. Από τη στιγμή της αιμοληψίας και έπειτα, και αφού ολοκληρωθούν οι εργαστηριακοί έλεγχοι, το αίμα διατηρείται μονίμως σε χαμηλή θερμοκρασία +4°C. Η χαμηλή θερμοκρασία είναι απαραίτητη, σε όλη τη διαδικασία της απομόνωσης, για τον περιορισμό της δράσης πρωτεολυτικών ενζύμων. Η απομόνωση των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών ελεύθερων αιμοσφαιρίνης γίνεται με τη μέθοδο της υποτονικής αιμόλυσης (*Dodge et al., 1963*), η οποία βασίζεται στο φαινόμενο της όσμωσης, ελαφρά τροποποιημένη με την προσθήκη αναστολέων πρωτεασών (PMSF) για την αναστολή της πρωτεόλυσης (*Advani et al., 1992*). Για την απομάκρυνση του μεγαλύτερου δυνατού ποσού της αιμοσφαιρίνης καθώς και για την αποφυγή αλλοιώσεων στη μεμβράνη επιλέγονται κατάλληλες συνθήκες ιοντικής ισχύος και pH (20mOsm και pH 7,4, αντίστοιχα).

### **Πειραματική Διαδικασία**

Για την απομόνωση ερυθροκυτταρικών μεμβρανών, αρχικά πραγματοποιείται φυγοκέντρηση ολικού αίματος (1000xg), για 10 λεπτά και αναρρόφηση του πλάσματος. Ακολουθεί διαχωρισμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων από τα υπόλοιπα έμμορφα συστατικά του αίματος με πλύσιμο σε ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (5mM διάλυμα φωσφορικών Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, με προσθήκη 150mM NaCl, pH 8,0) και φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (1000xg) για 10 λεπτά. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται τρεις φορές, με απομάκρυνση της υπερκείμενης στιβάδας του πλάσματος και της μεσόφασης των λευκοκυττάρων, ύστερα από κάθε φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια πραγματοποιείται λύση των ερυθροκυττάρων με προσθήκη υπότονου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (5mM, pH 8.0) στο οποίο έχουν προστεθεί 0,3mM PMSF. Το αιμόλυμα επωάζεται στον πάγο για 45 λεπτά, με ανάδευση ανά 5 λεπτά με ήπιες κινήσεις (διαδικασία απαραίτητη για τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες). Ακολουθεί φυγοκέντρηση (19000xg) για 20 λεπτά και μετά αναρρόφηση του υπερκείμενου με την αιμοσφαιρίνη καθώς και του δεύτερου ιζήματος στο οποίο περιέχονται τα λευκοκύτταρα, τα άσπαστα ερυθροκύτταρα και οι πρωτεάσες. Τέλος, γίνονται πλύσεις με υπότονο διάλυμα ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα της αιμοσφαιρίνης και να μείνουν αποκλειστικά οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων (ghosts). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται όσες φορές χρειαστεί ώσπου να αποχρωματιστούν το ίζημα και το υπερκείμενο.

Για τον έλεγχο ολιγομερισμού της ζώνης-3 τα δείγματα επωάζονται πριν τη λύση των ερυθροκυττάρων για 30 λεπτά με το αντιδραστήριο BS3 (bis-sulfosuccinimidyl-suberate) το οποίο σταθεροποιεί τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε πρωτεϊνικά μόρια. Αντίστοιχα τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της ζώνης-3 σε κατάλοιπα τυροσίνης ελέγχθηκαν μετά από επώαση των δειγμάτων (πριν τη λύση για 1 ώρα) με τον αναστολέα φωσφατασών ortho-vanadate (o-van). Τέλος για τον εντοπισμό διμερών της υπεροξειδοξίνης-2 (Prx2) και την αποφυγή οξείδωσης της πρωτεΐνης κατά τη



διάρκεια της διαδικασίας απομόνωσης, προηγείται επώαση (πριν τη λύση για 15 λεπτά) με το αντιδραστήριο NEM (N-Ethylmaleimide) το οποίο αντιδρά με ομάδες θειολών. Για τη μελέτη μεμβρανών σε διαφορετικούς πληθυσμούς ερυθροκυττάρων ανάλογα με την «ηλικία» τους ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία αφού προηγηθεί απομόνωση νεαρών και γηρασμένων ερυθροκυττάρων με κριτήριο την κυτταρική τους πυκνότητα ύστερα από κλασμάτωση σε ασυνεχή κλίση συγκέντρωσης περκόλης (από 1,087 έως 1,098 g/mL).

### **B2.3. Υπολογισμός Ολικής Πρωτεϊνικής Συγκέντρωσης Δείγματος**

Αφού απομονωθούν οι ερυθροκυτταρικές μεμβράνες, ακολουθεί η μέτρηση της ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα δείγματα. Αυτό γίνεται με τη μέθοδο Bradford, η οποία βασίζεται στη δημιουργία σταθερού συμπλόκου κυανού χρώματος, της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue με τις πρωτεΐνες, το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 595nm (*Bradford, 1976*). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίζεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς, πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης. Ο όγκος που φωτομετρείται για το κάθε δείγμα είναι 1 mL, στο οποίο περιέχονται 790 λ υπότονου διαλύματος φωσφορικών, 200 λ διαλύματος Bradford και 10 λ δείγματος ερυθροκυτταρικών μεμβρανών. Το τυφλό που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 800 λ υπότονου διαλύματος και 200 λ διαλύματος Bradford.

### **B2.4. Προετοιμασία Μεμβρανών για SDS Ηλεκτροφόρηση**

Οι απομονωμένες μεμβράνες πριν την ηλεκτροφόρηση, επεξεργάζονται με διάλυμα 20% SDS-10mM EDTA που περιέχει γλυκερόλη 10%, β-μερκαπτοαιθανόλη και 1% μπλε της βρωμοφαινόλης. Η ποσότητα της κάθε ουσίας εξαρτάται από τον τελικό όγκο του διαλύματος χρώσης που χρειαζόμαστε, με την αναλογία του όγκου των παραπάνω διαλυμάτων να είναι πάντα 10:10:5:1, αντίστοιχα. Το βαμμένο δείγμα, στη συνέχεια, τοποθετείται σε νερό που βράζει για 3 λεπτά και στη συνέχεια γίνεται αποθήκευση στους -80°C.

Στην περίπτωση υπολογισμού της μη αναστρέψιμης καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη τα δείγματα επωάζονται, πριν την ηλεκτροφόρησή τους και χωρίς να βαφτούν με την παραπάνω διαδικασία, με το αντιδραστήριο DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) το οποίο αντιδρά με καρβονυλικές ομάδες δημιουργώντας το σταθερό παράγωγο DNP (2,4-dinitrophenyl). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί από οξειδωτικές επιδράσεις. Συνοπτικά: 1) Οι μεμβράνες (12-15μg πρωτεϊνών) διαλυτοποιούνται σε διάλυμα 12% SDS, 2) Στη συνέχεια προστίθεται διπλάσια ποσότητα αντιδραστηρίου DNPH και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, 3) Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη διαλύματος ουδετεροποίησης και 4) το μίγμα ανάγεται με β-μερκαπτοαιθανόλη (5% τελική συγκέντρωση).

### **B2.5. Επίπεδη SDS-PAGE Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών κατά Laemmli**

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού φορτισμένων μακρομορίων σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος, το ισοηλεκτρικό τους σημείο ή το φορτίο τους, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Πραγματοποιήθηκε επίπεδη SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα κλίσης πολυακρυλαμίδιου κατά Laemmli (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) (*Laemmli 1970*). Το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα αυτές να φορτίζονται αρνητικά και να έχουν



παρόμοιες αναλογίες φορτίου/βάρους. Επομένως, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται αποκλειστικά από το μέγεθος και το σχήμα τους.

Κατά την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

- Ακρυλαμίδιο – bis-ακρυλαμίδιο (30:0,8 w/v)
- Stacking Gel Buffer: 0,4% SDS (w/v) σε 0,5M Tris HCl, pH 6,8
- Resolving Gel Buffer: 0,4% SDS (w/v) σε 3M Tris HCl, pH 8,8
- 10% Ammonium Persulfate (w/v)
- TEMED

Πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού (*resolving gel*) επιστιβάζεται ένα πήκτωμα χαμηλότερης συγκέντρωσης ακρυλαμίδης και με χαμηλότερο pH (*stacking gel* – πήκτωμα πακεταρίσματος). Η διαφορετική κινητικότητα χλωρίου και γλυκίνης και ο χαμηλός ρυθμός εισόδου των μορίων στο πήκτωμα διαχωρισμού βοηθούν έτσι ώστε όλες οι πρωτεΐνες να συγκεντρώνονται σε μία γραμμική ζώνη ανάμεσα στα δύο πήκτωμα. Αυτό επιτρέπει, παρά τη φόρτωση δειγμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων και όγκων, την εκκίνηση όλων των πρωτεϊνών από το ίδιο σημείο. Τα δύο διαφορετικά πήκτωμα παρασκευάζονται ως εξής:

	Πήκτωμα διαχωρισμού	Πήκτωμα πακεταρίσματος
Ακρυλαμίδιο – bis-ακρυλαμίδιο	10% ακρυλαμίδη	3,05% ακρυλαμίδη
Buffer	0,375M Tris/HCl pH 8,8	0,127M Tris/HCl pH 6,8
SDS	0,1% SDS	0,1% SDS
APS	0,025% APS	0,05% APS
TEMED	0,083% TEMED	0,17% TEMED

Παρασκευάζεται αρχικά το πήκτωμα διαχωρισμού, το οποίο τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στο πήκτωμα είναι αυτή που καθορίζει και τη διακριτική του ικανότητα, καθώς μεγάλη συγκέντρωση ακρυλαμίδης έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη ανάλυση πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους ενώ χαμηλή συγκέντρωση ακρυλαμίδης βοηθά στην ανάλυση πρωτεϊνών υψηλού μοριακού βάρους. Προστίθεται μικρή ποσότητα dH<sub>2</sub>O στην επιφάνεια του πηκτώματος διαχωρισμού (πριν αυτό πήξει) ώστε να ομαλοποιηθεί. Αφού πολυμεριστεί το πήκτωμα διαχωρισμού και απομακρυνθεί το νερό, προστίθεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και το πήκτωμα πακεταρίσματος με το ειδικό χτενάκι για τη δημιουργία των θέσεων φόρτωσης δείγματος. Εκτός από τα δείγματα, τοποθετούμε σε μία θέση 5λ δείκτη μοριακού βάρους.

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται διάλυμα ηλεκτροδίων (Running buffer) που βοηθά στην επίδραση του ρεύματος πάνω στις πρωτεΐνες. Το διάλυμα ηλεκτροδίων που χρησιμοποιείται περιέχει 17,7 mM Tris, 192 mM γλυκίνη και 0,1% SDS pH 8,3. Απαιτείται ιδιαίτερη

προσοχή στη ρύθμιση του pH, η οποία δεν πρέπει να γίνεται με υδροχλωρικό οξύ διότι τα ιόντα χλωρίου μειώνουν την αναλυτική ικανότητα της μεθόδου. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης κλείνει και τα δύο ηλεκτρόδια συνδέονται με ειδική συσκευή εφαρμογής τάσης. Έτσι, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών υπό σταθερό ρεύμα  $I=20 \text{ mA}$ , για κάθε πήκτωμα πακεταρίσματος και υπό σταθερό ρεύμα  $I=35 \text{ mA}$ , για κάθε πήκτωμα διαχωρισμού.

### **B2.6. Χρώση Ολικών Πρωτεϊνών σε Πήκτωμα**

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης και τη μεταφορά των πρωτεϊνών του πηκτώματος σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, μια διαδικασία η οποία περιγράφεται παρακάτω, τα πηκτώματα υφίστανται χρώση ώστε να γίνονται ορατές οι διαχωρισμένες σε αυτά πρωτεΐνες. Για τη χρώση χρησιμοποιείται η χρωστική Coomassie Blue-R250. Τα στάδια που ακολουθούνται είναι τα εξής:

- Επώαση των πηκτωμάτων σε διάλυμα 25% ισοπροπανόλη-10% v/v οξικό οξύ (Fixer).
- Προσθήκη χρωστικής 0,05% w/v σε διάλυμα 10% οξικού οξέος. Επώαση σε κλίβανο για 1 ώρα και 30 λεπτά στους  $60^\circ\text{C}$ .
- Προσθήκη διαλύματος Fixer. Επώαση για 2 ώρες υπό ανάδευση.
- Προσθήκη διαλύματος 5% v/v ισοπροπανόλης σε 10% v/v οξικό οξύ. Επώαση για δύο ώρες υπό ανάδευση.
- Αφαίρεση του προηγούμενου διαλύματος και επώαση σε 10% v/v οξικό οξύ.
- Αφαίρεση του οξικού οξέος και προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι να γίνει πλαστικοποίηση του πηκτώματος.

Μετά από την πλαστικοποίηση, γίνεται σάρωση του πηκτώματος και αποθήκευση της εικόνας του, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνών.

### **B2.7. Τεχνική Ανοσοαποτυπώματος (Western Blotting)**

Η τεχνική του ανοσοαποτυπώματος των πρωτεϊνών είναι μια αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών, που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά, από το πήκτωμα σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης (νιτροκυτταρίνη) καθώς και την ανίχνευσή τους με αντισώματα. Αυτή η διαδικασία είναι χρήσιμη για την ευκολότερη ανίχνευση των πρωτεϊνών από τα αντισώματα καθώς οι πρωτεΐνες προσδένονται επιφανειακά στις μεμβράνες της νιτροκυτταρίνης.

Πιο συγκεκριμένα, μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης αφαιρούνται προσεκτικά τα πηκτώματα στα οποία έχει γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται με τη χρήση ειδικής συσκευής της Transblot-SDI Semidry Transfer Gel. Αρχικά, τοποθετούνται 6 φύλλα χαρτιών Whatmann τα οποία έχουν εμποτιστεί προηγουμένως σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer). Στη συνέχεια τοποθετείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης η οποία προηγουμένως έχει εμποτιστεί σε απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί η τοποθέτηση του πηκτώματος πάνω στην νιτροκυτταρίνη με το σωστό προσανατολισμό και τέλος τοποθετούνται άλλα 6 φύλλα χαρτιών Whatmann εμποτισμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Η συσκευή ενώνεται με τροφοδοτικό μέσω ηλεκτροδίων και ακολουθεί η μεταφορά πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη για περίπου 1 ώρα και 10 λεπτά σε σταθερή τάση 20 V. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς είναι:

- Tris 50mM
- Γλυκίνη 40mM
- SDS 0,04%
- Μεθανόλη 20% , pH ~8.3

Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στο φύλλο νιτροκυτταρίνης ακολουθεί ανίχνευση πρωτεϊνών με αντισώματα. Το πρώτο βήμα είναι η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος. Η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων στην επιφάνεια της μεμβράνης γίνεται με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος δέσμευσης (blocking) για 1 ώρα υπό ανάδευση. Το διάλυμα δέσμευσης (άπαχο γάλα), είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες που καταλαμβάνουν ελεύθερες θέσεις πρόσδεσης στη μεμβράνη, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η μη ειδική δέσμευση του πρωτογενούς αντισώματος. Εν συνεχεία η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται για 1 ώρα υπό ανάδευση, με πρωτογενές αντίσωμα (αραιωμένο στο διάλυμα blocking) που δεσμεύεται στην προς ανίχνευση πρωτεΐνη. Η μεμβράνη ξεπλένεται με PBS-T (Tween-20 0,1% σε PBS). Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα με δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση (HRP – horseradish peroxidase) στις ίδιες ακριβώς συνθήκες. Η νιτροκυτταρίνη ξεπλένεται με PBS-T.

Το τελικό βήμα στην ανάλυση κατά Western είναι η ανίχνευση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Συγκεκριμένα, γίνεται ανίχνευση του σήματος με το σύστημα ECL (Enhanced Chemi-Luminescence) που βασίζεται στη **χημειοφωταύγεια**. Η νιτροκυτταρίνη επωάζεται με το υπόστρωμα του ενζύμου HRP, τη luminol, η οποία οξειδώνεται και διεγείρεται. Επιστρέφοντας στην κατάσταση ηρεμίας παράγει φως το οποίο προσβάλλει φωτοευαίσθητα φιλμ αυτοραδιογραφίας. Η ανίχνευση του σήματος γίνεται σε σκοτεινό θάλαμο, λόγω της φωτοευαισθησίας των φιλμ. Πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με ECL και ακολουθεί τοποθέτησή της σε ειδική κασέτα μαζί με το κομμάτι του φιλμ. Στη συνέχεια γίνεται εμφάνιση των ζωνών με το διάλυμα D19. Το φιλμ ξεπλένεται σε νερό και ακολουθεί «στερέωση» με φωτογραφικό διάλυμα Fixer.

Μετά το τέλος της ανοσοεντόπισης, είναι δυνατή η επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία, για τον εντοπισμό και άλλων πρωτεϊνών που πιθανόν υπάρχουν στο ίδιο δείγμα. Για την πραγματοποίηση ενός νέου κύκλου ανοσοεντόπισης, είναι αναγκαία η αποκόλληση (stripping) των προηγούμενων ιχνηθετών που τοποθετήθηκαν στη μεμβράνη, κατά τον πρώτο κύκλο. Αυτό επιτυγχάνεται με επώαση της μεμβράνης για 45 λεπτά στους 60°C σε ρυθμιστικό διάλυμα αποκόλλησης (Stripping buffer) που περιέχει Tris-HCl 62,5mM, pH 7,6 και 2% SDS, στο οποίο προστίθεται διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης (0,7%).

### **B2.8. Ποσοτική Εκτίμηση των Πρωτεϊνών Πηκτωμάτων και Φιλμ**

Τα πηκτώματα καθώς και τα φιλμ σαρώνονται και πυκνομετρούνται με τη βοήθεια του προγράμματος επεξεργασίας εικόνων Gel Analyser. Ο χρήστης ορίζει την περιοχή του υποβάθρου της ζώνης και στη συνέχεια το περίγραμμα της ζώνης. Μετά την αφαίρεση του υποβάθρου υπολογίζεται το άθροισμα της φωτεινότητας όλων των εικονοστοιχείων (pixels) που περιέχονται στη ζώνη και οι τιμές που προκύπτουν επεξεργάζονται με τη βοήθεια του προγράμματος Excel. Για κάθε δείγμα, υπολογίζεται η τιμή της κάθε πρωτεϊνικής ζώνης, το άθροισμα των τιμών όλων των πρωτεϊνών καθώς και η τιμή του λόγου της κάθε πρωτεΐνης προς το άθροισμα αυτό ή προς μια πρωτεΐνη αναφοράς η οποία εμφανίζει σταθερές τιμές ανάμεσα στα δείγματα.

## **B2.9. Ανάλυση Πλάσματος**

### **B2.9.1. Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη – Αιμόλυση**

Τα επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης υπολογίζονται φωτομετρικά μέσω της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε πρώτα από τον Harboe (*Harboe, 1969*). Η μέθοδος μετρά τα επίπεδα οξυ-αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα ή στο υπερκείμενο της μονάδας μετάγγισης (μέγιστο απορρόφησης 415nm). Στο ίδιο μήκος κύματος απορροφούν και άλλες ουσίες όπως η χολερυθρίνη και η αλβουμίνη κ.α.). Για το λόγο αυτό το πλάσμα απομονώνεται μετά από φυγοκέντρηση (1000xg) και η απορρόφηση μετράται σε τρία μήκη κύματος (415, 380 and 450 nm). Η ακριβής μετατροπή σε συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης πραγματοποιείται με τον ακόλουθο τύπο (διόρθωση κατά Allen) (*Han et al., 2010*):

$$\text{Hb (mg/100ml)} = [(167.2 \times A_{415}) - (83.6 \times A_{380}) - (83.6 \times A_{450})] \times 1/1000 \times \text{αραιώση (in dH}_2\text{O)} \times 100$$

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

Το ποσοστό της αιμόλυσης προσδιορίζεται από τη μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης που απελευθερώνεται στο πλάσμα ή στο υπερκείμενο της μονάδας μετάγγισης. Η μέτρηση αυτή γίνεται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της κυανομεθαιμοσφαιρίνης, κατά την οποία το δείγμα αναμιγνύεται με το αντιδραστήριο του Drabkin, το οποίο περιέχει σιδηροκυανιούχα και κυανιούχα άλατα. Το σιδηροκυανιούχο ιόν οξειδώνει το σίδηρο της αιμοσφαιρίνης, μετατρέποντας την αιμοσφαιρίνη σε μεθαιμοσφαιρίνη. Η μεθαιμοσφαιρίνη ενώνεται με το κυανιούχο ιόν παράγοντας κυανομεθαιμοσφαιρίνη, η οποία δίνει ένα χρώμα το οποίο μετράται φωτομετρικά και η έντασή του σχετίζεται με τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στο δείγμα. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να υπολογιστεί το σύνολο της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλην της ελάχιστα παρούσας σουλφο-αιμοσφαιρίνης η οποία δεν οξειδώνεται από το αντιδραστήριο (*Zwart et al., 1996*). Το ποσοστό της αιμόλυσης προκύπτει από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Αιμόλυση (\%)} = \text{Hb υπερκειμένου (g/L)} \times [100 - \text{αιματοκρίτης (\%)}] / \text{Ολική Hb (g/L)}$$

### **B2.9.2. Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα Πλάσματος**

Η μέτρηση των επιπέδων συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) η οποία υπολογίζει την ικανότητα αναγωγής του  $\text{Fe}^{3+}$  σε  $\text{Fe}^{2+}$  από μικρά μόρια του πλάσματος όπως το ουρικό ή το ασκορβικό οξύ (*Benzie και Strain, 1999*). Σε χαμηλό pH, η αναγωγή του συμπλόκου τρισθενούς σιδήρου-τριπυριδυλοτριαζίνη ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) σε σύμπλοκο δισθενούς σιδήρου-TPTZ ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) οδηγεί σε έντονο μπλε χρώμα το οποίο μετράται σε μήκος κύματος 593nm. Για τη μέτρηση του ποσοστού συμμετοχής του ουρικού οξέος και των υπολοίπων αντιοξειδωτικών συστατικών, στην αναγωγική ικανότητα του πλάσματος, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο ουρικήάση το οποίο υδρολύει το ουρικό οξύ (*Duplancic et al., 2011*). Συνοπτικά ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- Προσθήκη πλάσματος (με ή χωρίς ουρικήάση) στο αντιδραστήριο FRAP
- Επώση στους 37°C για 4 λεπτά
- Φωτομέτρηση στα 593 nm

- Υπολογισμός της συγκέντρωσης ( $\mu\text{M}$ )  $\text{Fe}^{2+}$  με αντιστοίχιση της τιμής της απορρόφησης σε πρότυπη καμπύλη

Το αντιδραστήριο FRAP περιέχει σε αναλογία 10:1:1, ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος – οξικού νατρίου (300mM), διάλυμα TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) (10 mM) σε HCl (40mM) και διάλυμα  $\text{FeCl}_3$  (20 mM) αντίστοιχα.

### **B2.9.3. Πειραματικές Διαδικασίες με τη Χρήση της Μεθόδου ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)**

Η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της παρουσίας ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα και βασίζεται στην ειδικότητα που εμφανίζει η πρόσδεση αντιγόνου-αντισώματος. Χρησιμοποιείται τόσο για ποιοτική όσο και ποσοτική ανάλυση. Στην περίπτωση ποσοτικής ανάλυσης η επισήμανση του προς μελέτη μορίου μπορεί να πραγματοποιηθεί με ραδιενέργεια, ένζυμα ή φθορίζουσες ουσίες. Στην παρούσα εργασία η ανίχνευση έγινε φωτομετρικά μετά από αντίδραση με χρωμογόνο.

#### **B2.9.3.I. Επίπεδα Μονοξειδίου του Αζώτου (NO)**

Η μέτρηση μονοξειδίου του αζώτου πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά με κατάλληλο κιτ ELISA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Cusabio). Χρησιμοποιήθηκε μικροπλάκα 96 θέσεων επικαλυμμένη με ειδικό αντίσωμα έναντι NO στην οποία προστέθηκαν αρχικά τα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα (για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης). Εν συνεχεία προστέθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι NO σημασμένο με βιοτίνη ακολουθούμενο από προσθήκη αβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση (HRP). Τέλος εισήχθη στις θέσεις της μικροπλάκας το κατάλληλο υπόστρωμα TMB (3,3',5,5' tetramethyl-benzidine) για την πραγματοποίηση ενζυμικής αντίδρασης. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από προσθήκη θεικού οξέος και η οπτική πυκνότητα προσδιορίστηκε στα 450nm. Η συγκέντρωση NO ( $\text{ng/mL}$ ) υπολογίστηκε μετά από σύγκριση των τιμών απορρόφησης με τις αντίστοιχες της πρότυπης καμπύλης που κατασκευάζεται παράλληλα.

#### **B2.9.3.II. Ποσοτικοποίηση Κλαστερίνης**

Η μέτρηση κλαστερίνης πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά με κατάλληλο κιτ ELISA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (BioVendor). Χρησιμοποιήθηκε μικροπλάκα 96 θέσεων επικαλυμμένη με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι κλαστερίνης στην οποία προστέθηκαν αρχικά τα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα (για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης). Ακολούθησε προσθήκη δευτερογενούς μονοκλωνικού αντισώματος σημασμένου με βιοτίνη και προσθήκη στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση (HRP). Τέλος εισήχθη στις θέσεις της μικροπλάκας το κατάλληλο υπόστρωμα TMB (3,3',5,5' tetramethyl-benzidine) για την πραγματοποίηση ενζυμικής αντίδρασης. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από προσθήκη οξικού οξέος και η απορρόφηση προσδιορίστηκε στα 450nm. Η συγκέντρωση κλαστερίνης ( $\text{ng/mL}$ ) υπολογίστηκε μετά από σύγκριση των τιμών απορρόφησης με τις αντίστοιχες της πρότυπης καμπύλης που κατασκευάζεται παράλληλα.



### **B2.9.3.III. Έλεγχος Επιπέδων Καρβονυλιωμένων Πρωτεϊνών**

Τα επίπεδα καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών μετρήθηκαν φωτομετρικά με κατάλληλο κιτ ELISA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (BioCell Corp). Χρησιμοποιήθηκε μικροπλάκα 96 θέσεων στην οποία προστέθηκαν αρχικά τα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα (για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης) μετά την αντίδρασή τους με δινιτροφαινυλδραζίνη (DNP). Ακολούθησε αφαίρεση της περίσσειας DNP και προσθήκη βιοτινυλιωμένου αντισώματος έναντι της DNP. Εν συνεχεία προστέθηκε στρεπταβιδίνη συζευγμένη με υπεροξειδάση (HRP) και κατάλληλο υπόστρωμα TMB (3,3',5,5' tetramethyl-benzidine) για την πραγματοποίηση ενζυμικής αντίδρασης. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη τριχλωροξικού οξέος και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450nm. Η ποσότητα καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών (nmol/mg) υπολογίστηκε μετά από σύγκριση των τιμών απορρόφησης με τις αντίστοιχες πρότυπης καμπύλης που κατασκευάζεται παράλληλα.

### **B2.9.3.IV. Μέτρηση Θρομβωτικής Ικανότητας Κυστιδίων**

Τα επίπεδα θρομβωτικής ικανότητας των κυστιδίων μετρήθηκαν φωτομετρικά με το Zymuphen MP-activity ELISA κιτ σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (HYPHEN BioMed). Χρησιμοποιήθηκε μικροπλάκα 96 θέσεων επικαλυμμένη με στρεπταβιδίνη και βιοτινυλιωμένη αννεξίνη V στην οποία προστέθηκαν αρχικά τα δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα (για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης) αραιωμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιείχε αναστολείς ασβεστίου, παράγοντα Xa και θρομβίνης. Εν συνεχεία προστέθηκε ποσότητα παράγοντα Xa που περιείχε ασβέστιο και προθρομβίνη. Τα δείγματα που περιείχαν μικροκυτίδια με εξωτερικευμένη φωσφατιδυλοσερίνη (PS) προσδέθηκαν στην αννεξίνη V επιτρέποντας στον παράγοντα Xa (παρουσία ασβεστίου) να μετατρέψει την προθρομβίνη σε θρομβίνη. Μετά από προσθήκη του υποστρώματος της θρομβίνης και ολοκλήρωσης της αντίδρασης με κιτρικό οξύ η απορρόφηση μετρήθηκε στα 405nm. Η μετατροπή σε θρομβίνη είναι ευθέως ανάλογη της περιεκτικότητας του δείγματος σε PS επομένως χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη η συγκέντρωση μικροκυστιδίων εκφράζεται σε nM PS.

### **B2.9.4. Ποσοτικός Προσδιορισμός Κυστιδίων**

Η μέτρηση του συνολικού αριθμού κυστιδίων και ο έλεγχος εξωτερίκευσης PS σε αυτά πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής (flow cytometry, FC). Τα κυτίδια ταυτοποιήθηκαν με βάση το μέγεθός τους (σωματίδια <1 μm) και την εξωτερίκευση PS (AnnexinV+). Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν μικροκυτίδια που δεν εκθέτουν PS στην επιφάνειά τους, η μέτρηση του υποπληθυσμού μικροκυστιδίων τα οποία εξωτερικεύουν PS είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς η θρομβωτική ικανότητά τους εξαρτάται από την παρουσία ή όχι PS (Connor, 2010). Για το λόγο αυτό, εντός 15 λεπτών από την αιμοληψία το αίμα φυγοκεντρήθηκε (1000xg) δύο φορές σε θερμοκρασία δωματίου. Μικρή ποσότητα απομονωμένου πλάσματος επωάστηκε με αντισώματα έναντι αννεξίνης V και γλυκοφορίνης A (CD235), σημασμένα με διαφορετικά φθορισμοχρώματα. Το αντίσωμα CD235 χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό ερυθροκυτταρικών μικροκυστιδίων. Μετά την πάροδο 20 λεπτών η αντίδραση σταμάτησε και τα δείγματα ελέγχθηκαν με τη βοήθεια κυτταρόμετρου για την παρουσία διπλά θετικών μικροκυστιδίων (αννεξίνη V/CD235) μεγέθους μικρότερου του 1μm. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των σωματιδίων τα οποία ορίστηκαν ως κυτίδια χρησιμοποιήθηκαν φθορίζοντα σφαιρίδια σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (BD

Biosciences) και της Διεθνούς Εταιρείας Θρόμβωσης και Αιμόστασης (*Lacroix, 2010*). Για τον προσδιορισμό του απόλυτου αριθμού μικροκυστιδίων ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες γνωστής συγκέντρωσης σε φθορίζοντα σφαιρίδια (TruCount™).

### **B2.9.5. Απομόνωση Κυστιδίων**

Η απομόνωση κυστιδίων από το υπερκείμενο των μονάδων μετάγγισης πραγματοποιήθηκε στο μέσο (ημέρα 17) και στο τέλος (ημέρα 42) της αποθηκευτικής περιόδου. Αρχικά, μετά από φυγοκέντρηση (2000xg) πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων απομονώθηκε το υπερκείμενο και καθαρίστηκε με αποστειρωμένα φίλτρα νιτροκυτταρίνης (μέγεθος πόρων 0,8 $\mu\text{m}$ ). Ακολούθησε υπερφυγοκέντρηση (37000xg) του φιλτραρισμένου υπερκειμένου για 1 ώρα. Τέλος το ίζημα των κυστιδίων επαναδιαλυτοποιήθηκε σε PBS και ακολούθησαν δύο φυγοκεντρήσεις στις προαναφερθείσες συνθήκες. Μετά το πέρας της διαδικασίας η πρωτεϊνική συγκέντρωση των απομονωμένων κυστιδίων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford.

### **B2.10. Ανάλυση Ερυθροκυττάρων**

#### **B2.10.1. Οσμωτική Ευθραυστότητα**

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι υπάρχει ένας συγκεκριμένος όγκος μέχρι τον οποίο ένα ερυθροκύτταρο μπορεί να απορροφήσει νερό χωρίς να προκληθεί διάσπαση της μεμβράνης. Σε ένα δείγμα ερυθρών αιμοσφαιρίων κάθε κύτταρο έχει τα δικά του όρια μέγιστης ανεκτής μεταβολής όγκου (οριακός όγκος), επομένως η οσμωτική ευθραυστότητα του συνόλου ακολουθεί μία κανονική κατανομή. Τα ερυθροκύτταρα όταν τοποθετούνται σε υποτονικά διαλύματα με αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl, απορροφούν νερό λόγω διαφοράς στην οσμωτική πίεση μέχρι να φτάσουν σε αυτόν τον οριακό όγκο και μετά ακολουθεί διάρρηξη του κυττάρου. Η προοδευτική μείωση της περιεκτικότητας του διαλύματος σε NaCl, από 0,9% σε 0%, οδηγεί σε αιμόλυση καθώς το διάλυμα 0,9% NaCl είναι ισότονο για τα ερυθροκύτταρα (310mOsm). Αφού παρασκευαστούν διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης NaCl (0% - 0,9%) ακολουθεί προσθήκη ολικού αίματος σε αναλογία 1/100 και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται και το υπερκείμενο φωτομετρείται στα 540 nm. Τέλος μετά από αντιστοίχιση των απορροφήσεων με τις συγκεντρώσεις NaCl και τη δημιουργία της καμπύλης οσμωτικής ευθραυστότητας, υπολογίζεται ο δείκτης MCF (Mean Corpuscular Fragility) που αντιστοιχεί σε εκείνη τη συγκέντρωση NaCl η οποία προκαλεί 50% λύση των ερυθροκυττάρων.

#### **B2.10.2. Μηχανική Ευθραυστότητα**

Η μέθοδος αυτή ελέγχει την ικανότητα των ερυθροκυττάρων να αντέχουν στη μηχανική καταπόνηση. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται μεταλλικά σφαιρίδια (beads) τα οποία, μετά από ανάμειξη με το δείγμα και ανάδευση, ασκούν μηχανικό στρες στα ερυθροκύτταρα. Παράλληλα με τα δείγματα που έχουν υποστεί μηχανική καταπόνηση ελέγχονται και δείγματα-μάρτυρες του ίδιου δότη στα οποία δεν έχουν προστεθεί beads. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται (1000xg) και τα ερυθροκύτταρα αραιώνονται με ισότονο διάλυμα PBS σε αιματοκρίτη 20%. Ακολουθεί ανάμειξη με μεταλλικά σφαιρίδια και ανάδευση για 1 ώρα στους 4°C. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται (2750xg) και το υπερκείμενο χρησιμοποιείται (μετά από νέα φυγοκέντρηση – 20800xg) για τη μέτρηση της αιμοσφαιρίνης που έχει απελευθερωθεί κατά τη διαδικασία. Τόσο η ενδοκυττάρια αιμοσφαιρίνη όσο

και η αιμοσφαιρίνη που απελευθερώνεται στο υπερκείμενο υπολογίζονται με χρήση της μεθόδου Harboe. Ο δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας (MFI) υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{MFI}(\%) = [(\text{Ελεύτερη Hb}_{(\text{με σφαιρίδια})} - \text{Ελεύτερη Hb}_{(\text{μάρτυρας})}) / (\text{Hb} - \text{Ελεύτερη Hb}_{(\text{μάρτυρας})})] \times 100$$

Όπου «Hb» η ενδοκυττάρια αιμοσφαιρίνη σε αιματοκρίτη 20%.

### **B2.10.3. Μέτρηση Ανηγμένης Γλουταθειόνης (GSH)**

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση της GSH με το αντιδραστήριο του Ellman (5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoic acid – DTNB). Η GSH οξειδώνεται από το DTNB με αποτέλεσμα τη δημιουργία του χρωμοφόρου TNB (GS-TNB). Το προϊόν της αντίδρασης (GS-TNB) ανάγεται σε GSH παρουσία του ενζύμου αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και NADPH. Ο ρυθμός της παραγωγής TNB είναι ανάλογος του συνόλου της GSH που υπάρχει στο δείγμα και μετράται σε μήκος κύματος 412nm. Αρχικά το αίμα φυγοκεντρείται (1000xg) για 5 λεπτά και το ίζημα των ερυθροκυττάρων αναμειγνύεται με 10% σουλφοσαλυλικικό οξύ σε αναλογία όγκων 1:4. Το μείγμα επωάζεται και φυγοκεντρείται (10000xg) για 10 λεπτά. Ακολούθως μικρός όγκος υπερκειμένου προστίθεται σε δοκιμαστικό σωλήνα ο οποίος περιέχει 1mL ρυθμιστικού διαλύματος KPE (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M – EDTA 5mM) στο οποίο έχει προστεθεί DTNB (0,6mM). Τελευταία προστίθεται η αναγωγή της γλουταθειόνης και η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά στα 412nm για 2 λεπτά. Προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν τα αποτελέσματα (μM), ο ρυθμός μεταβολής της οπτικής πυκνότητας συγκρίνεται με πρότυπη καμπύλη κατασκευασμένη με διαλύματα GSH γνωστής συγκέντρωσης.

### **B2.10.4. Μέτρηση Επιπέδων Ενδοκυττάρων Ενεργών Μορφών Οξυγόνου (ROS)**

Για τη μέτρηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ROS χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο CMH<sub>2</sub>DCFDA. Πρόκειται για ένα λιπόφιλο μη φθορίζοντα εστέρα ο οποίος μπορεί να διαπερνά την πλασματική μεμβράνη και να εισέρχεται στο κύτταρο. Εκεί κόβεται από εστεράσες, οξειδώνεται από τα ενδοκυττάρια ROS και φθορίζει. Έτσι, τα παραγόμενα επίπεδα φθορισμού είναι ανάλογα της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των ROS. Αρχικά το αίμα φυγοκεντρείται (1000xg) για 5 λεπτά και αφαιρείται το υπερκείμενο και η μεσόφαση των λευκοκυττάρων. Στα ερυθροκύτταρα προστίθεται ισότονο διάλυμα PBS και εστέρας CMH<sub>2</sub>DCFDA (2μM) και ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στο σκοτάδι. Μετά από φυγοκέντρωση (1000xg) η περίσσεια του εστέρα αφαιρείται, προστίθεται ισότονο PBS και τα ερυθροκύτταρα επωάζονται για 12 λεπτά σε σκοτάδι. Τέλος τα κύτταρα λύνονται με απεσταγμένο νερό και τα επίπεδα των ROS μετρώνται σε φθορισμόμετρο (μήκος κύματος διέγερσης: 490nm, μήκος κύματος εκπομπής: 520nm). Για τον έλεγχο των επιπέδων ROS λόγω της επιδεκτικότητας των ερυθροκυττάρων σε εξωγενές οξειδωτικό ερέθισμα τα κύτταρα επωάστηκαν για 20 λεπτά με 100μM του οξειδωτικού αντιδραστηρίου tert-Butyl hydroperoxide (tBHP) πριν την προσθήκη του εστέρα.



### **B2.10.5. Μέτρηση Επιπέδων Ενδοκυττάριου Ασβεστίου**

Η μέτρηση των ενδοκυττάριων επιπέδων ασβεστίου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Fluo 4-AM. Πρόκειται για ένα λιπόφιλο, μη φθορίζοντα εστέρα ο οποίος μπορεί να διαπερνά την πλασματική μεμβράνη και να εισέρχεται στο κύτταρο. Εκεί κόβεται από εστεράσες, αντιδρά με ιόντα ασβεστίου και φθορίζει με τα παραγόμενα επίπεδα φθορισμού να είναι ανάλογα της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου. Το αίμα φυγοκεντρείται (1000xg) για 5 λεπτά και αφαιρείται το υπερκείμενο και η μεσόφαση των λευκοκυττάρων. Τα ερυθροκύτταρα τοποθετούνται σε ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα ασβεστίου (NaCl 145mM – KCl 7,5mM – CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM – Γλυκόζη 10mM – HEPES/NaOH 10mM – πυροσταφυλικό νάτριο 10mM), προστίθεται εστέρας Fluo4-AM (5μM) και ακολουθεί επώαση για 40 λεπτά στο σκοτάδι. Η περίσσεια του εστέρα αφαιρείται με φυγοκέντρηση, προστίθεται διάλυμα ασβεστίου και τα ερυθροκύτταρα επωάζονται εκ νέου για 30 λεπτά σε σκοτάδι. Τέλος τα κύτταρα λύνονται με απεσταγμένο νερό και τα επίπεδα ενδοκυττάρια ασβεστίου μετρώνται σε φθορισμόμετρο (μήκος κύματος διέγερσης: 485nm, μήκος κύματος εκπομπής: 520nm).

### **B2.10.6. Ανίχνευση Φωσφατιδυλοσερίνης (PS)**

Μία από τις αλλαγές που συμβαίνουν τόσο κατά τη διάρκεια της απόπτωσης όσο και κατά την εξέλιξη της γήρανσης των ερυθροκυττάρων είναι η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS). Ο εντοπισμός της PS στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης πραγματοποιήθηκε με Συνεστιακό Σαρωτικό Μικροσκόπιο Laser (CLSM) και κυτταρομετρία ροής.

Όσον αφορά στο CLSM μία δέσμη laser σαρώνει το παρασκεύασμα είτε κινούμενη η ίδια (beam scanning) είτε με μετακίνηση του παρασκευάσματος (object scanning). Η σάρωση του αντικειμένου από τη δέσμη laser γίνεται με τη βοήθεια περιστρεφόμενων καθρεπτών (σχηματισμός εικόνας σε 0,1 sec), αφού η απόκλιση δέσμης φωτός δεν είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί με διαφορετικό τρόπο. Το μικροσκόπιο αυτό χαρακτηρίζεται από δύο σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι του κλασικού οπτικού μικροσκοπίου: α) τη βελτιωμένη οριζόντια διακριτική ικανότητά του και β) τη μοναδική δυνατότητα για ανάλυση του βάθους του δείγματος, κάτι το οποίο περιγράφεται με τον όρο «οπτική μικροτομία» (Wilson και Carlini, 1987). Ο εντοπισμός της PS στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της φθορίζουσας ουσίας Annexin-V-Fluos, σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία, όπως ορίζεται από τον κατασκευαστή:

- 10<sup>6</sup> κύτταρα πλένονται με PBS και φυγοκεντρώνονται (200xg) για 5 λεπτά.
- Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυτοποιείται σε διάλυμα Annexin-V-Fluos.
- Ακολουθεί ανάδευση στο σκοτάδι για 15 λεπτά.
- Επίστρωση μικρής ποσότητας σε αντικειμενοφόρο πλάκα.
- Παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο Laser (CLSM)

Ο έλεγχος εξωτερίκευσης PS μέσω κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση μικρής ποσότητας ερυθροκυττάρων με αντισώματα έναντι αννεξίνης V και γλυκοφορίνης A (CD235). Το αντίσωμα CD235 χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των ερυθροκυττάρων καθώς η γλυκοφορίνη A αποτελεί χαρακτηριστική τους πρωτεΐνη. Μετά την πάροδο 20 λεπτών η αντίδραση σταμάτησε και τα δείγματα ελέγχθηκαν με τη βοήθεια κυτταρομέτρου για την παρουσία διπλά

θετικών κυττάρων (αννεξίνη V/CD235). Για τον προσδιορισμό του απόλυτου αριθμού κυττάρων που εξωτερικεύουν PS ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες με γνωστής συγκέντρωσης φθορίζοντα σφαιρίδια (TruCount™).

### **B2.10.7. Παρατήρηση της Μορφολογίας Ερυθροκυττάρων με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης - ΗΜΣ (Scanning Electron Microscope - SEM)**

Το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης στηρίζεται στην αρχή λειτουργίας ενός καθοδικού σωλήνα και περιέχει πηνία για την απόκλιση δέσμης των ηλεκτρονίων, η οποία «σαρώνει» την επιφάνεια του παρασκευάσματος. Η αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων με το παρασκεύασμα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα: α) την ανάκλαση των ηλεκτρονίων (οπισθοσκεδαζόμενα), β) την έξοδο των ηλεκτρονίων από την επιφάνεια του παρασκευάσματος (δευτερογενή), γ) την ελευθέρωση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Ανάλογα τις πληροφορίες που θέλουμε να πάρουμε οι ανιχνευτές χρησιμοποιούν και τα αντίστοιχα ηλεκτρόνια. Για παράδειγμα, για την παρατήρηση της ακρότατης επιφανειακής μορφολογίας, χρησιμοποιούνται μόνο τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, ενώ για την παρατήρηση της βαθύτερης μορφολογίας, τα οπισθοσκεδαζόμενα. Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε παρατήρηση της επιφανειακής μορφολογίας των ερυθροκυττάρων. Για την παραγωγή των δευτερογενών ηλεκτρονίων από την επιφάνεια του δείγματος πραγματοποιείται κάλυψη με στρώμα Χρυσού-Παλλαδίου (Au-Pd) ώστε το δείγμα να γίνει αγωγίμο.

#### **Πειραματική Διαδικασία**

1. Φυγοκέντρηση κυτταρικού εναιωρήματος σε χαμηλές στροφές για το διαχωρισμό των ερυθροκυττάρων από το διάλυμα συντήρησης.
2. Προσθήκη διαλύματος 2% γλουταραλδεύδης/0,1 mM κακοδυλικό νάτριο pH 7,4 σε μικρό όγκο κυττάρων και επώαση για 1 ώρα.
3. Ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα 4% σουκρόζης σε 0,1 mM κακοδυλικό νάτριο pH 7,4.
4. Προσθήκη 1% OsO<sub>4</sub> σε 0,1 mM κακοδυλικό νάτριο pH 7,4 και επώαση στους 4°C.
5. Ξέπλυμα με διάλυμα 4% σουκρόζης σε 0,1 mM κακοδυλικό νάτριο pH 7,4.
6. Διαδοχική αφυδάτωση των κυττάρων σε διαλύματα αιθανόλης συγκεντρώσεων 30, 50, 70, 85, 95 και 100%.
7. Επίστρωση μικροποσότητας ερυθροκυττάρων σε καλυπτρίδα.
8. Κάλυψη με Χρυσό-Παλλάδιο.
9. Παρατήρηση στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης.

### **B2.11. Στατιστική Ανάλυση – Ανάλυση Δικτύων**

Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις για τη διασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. 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 χρονοεξαρτώμενες διαφορές εντοπίστηκαν με ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (repeated measures ANOVA). Η κατηγοριοποίηση αιμοδοτών και παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση παραγόντων (factor analysis) και συστάδων (cluster analysis) αντίστοιχα. Περαιτέρω

στατιστικά μοντέλα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, περιλαμβάνουν πολυπαραμετρικές αναλύσεις για την εύρεση ταυτόχρονων μεταβολών και αλληλεπίδρασης παραγόντων στα προς εξέταση δείγματα (πολυπαραμετρική-multivariate ANOVA, μεικτά μοντέλα πολυπαραμετρικής-mixed model multivariate ANOVA κ.α.). Η πρόβλεψη παραμέτρων ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκε μέσω απλής και πολλαπλής ανάλυσης παλινδρόμησης (simple and multiple regression analysis). Για τον εντοπισμό πιθανών συσχετίσεων ανάμεσα σε διαφορετικές παραμέτρους πραγματοποιήθηκαν οι έλεγχοι Pearson and Spearman ανάλογα με την κατανομή των προς εξέταση παραμέτρων. Σε κάθε ανάλυση που αναφέρθηκε πραγματοποιήθηκαν όλοι οι απαραίτητοι έλεγχοι όσον αφορά στις προϋποθέσεις χρήσης του επιλεγμένου μοντέλου. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά για  $P < 0,05$  ή  $P < 0,01$ .

Η ανάλυση δικτύων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Cytoscape (έκδοση 3.2.0) το οποίο ενδείκνυται για την οπτικοποίηση και την ανάλυση βιολογικών δικτύων συσχετίσεων και αλληλεπιδράσεων (Assenov, 2008). Ως δεδομένα εισόδου χρησιμοποιήθηκαν αιματολογικές, βιοχημικές και βιολογικές παράμετροι ανάμεσα στις οποίες παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις. Οι τιμές του δείκτη συσχέτισης  $r$  καθόρισε το μήκος των συνδέσεων μεταξύ των παραμέτρων (μεγαλύτερη τιμή  $r$  – μικρότερη απόσταση παραμέτρων). Για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα ενσωμάτωσης ψευδώς θετικών (πλην στατιστικά σημαντικών) συσχετίσεων στα δίκτυα, απορρίφθηκαν περιπτώσεις συνδέσεων με συντελεστή συσχέτισης μικρότερο του 0,25 ( $r < 0,25$ ).

***ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ:  
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ***

## **Γ1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΛΕΥΚΑΦΑΙΡΕΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΜΟΝΑΔΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗΣ**

Χρησιμοποιήθηκε φλεβικό αίμα από **8 άρρενες υγιείς αιμοδότες** (4 λευκαφαιρεμένα δείγματα L – 4 μη λευκαφαιρεμένα δείγματα N). Τα πακεταρισμένα ερυθροκύτταρα αποθηκεύτηκαν σε μονάδες μετάγγισης που περιείχαν αντιπηκτικό διάλυμα CPD (citrate-phosphate-dextrose) και πρόσθετο διάλυμα συντήρησης SAGM (saline-adenine-glucose-mannitol) για μία περίοδο 42 ημερών σε θερμοκρασία 4°C. Για τη μελέτη της γήρανσης και του κυτταρικού θανάτου εντός της μονάδας μετάγγισης, τόσο προϊόντος του χρόνου όσο και ανάμεσα σε λευκαφαιρεμένα (**L-RBCs**) και μη (**N-RBCs**) δείγματα πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε εβδομαδιαία βάση κάτω από άσηπτες συνθήκες. Για την αφαίρεση πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων από τις μονάδες μετάγγισης χρησιμοποιήθηκαν βελόνες μεγάλης διαμέτρου (19G) έτσι ώστε να αποφευχθεί πιθανός τραυματισμός ή λύση των κυττάρων.

### **Γ1.1. Αιματολογικό Πρότυπο και Βιοχημική Σύσταση του Υπερκειμένου των Μονάδων**

Από τη μελέτη της χρονοεξαρτώμενης διακύμανσης των αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων που εξετάστηκαν, προέκυψε στατιστικά σημαντική ( $P<0,05$ ) αύξηση της αιμόλυσης, του δείκτη MCV (μέσος ερυθροκυτταρικός όγκος), του δείκτη ανισοκυττάρωσης RDW και της συγκέντρωσης καλίου στο υπερκείμενο (με ταυτόχρονη μείωση της συγκέντρωσης νατρίου) προϊόντος του χρόνου αποθήκευσης και στις δύο ομάδες (πίνακας 1). Παρόλα αυτά δείκτες όπως το RDW και η εξωκυττάρια συγκέντρωση καλίου εμφάνισαν σταθερά χαμηλότερα επίπεδα στις L-μονάδες σε μεγάλο μέρος της αποθηκευτικής περιόδου. Επιπλέον τα επίπεδα υπολειπόμενων λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων στις L-μονάδες βρίσκονται εντός των επιτρεπτών ορίων επιβεβαιώνοντας την επιτυχή διαδικασία λευκαφαίρεσης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως τόσο τα επίπεδα εξωκυττάρια καλίου όσο και της αιμόλυσης εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα στις L-μονάδες τη στιγμή της αιμοδοσίας (ημέρα 0) με την εικόνα να αντιστρέφεται με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης ( $P<0,05$ ).

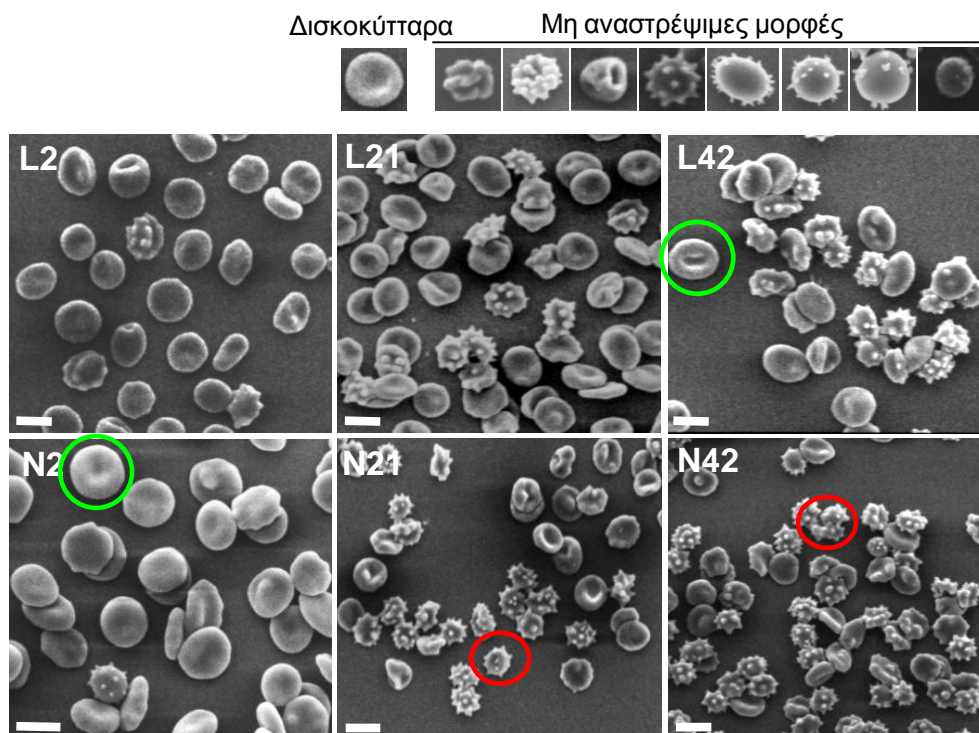
	<b>ΜΗ ΛΕΥΚΑΦΑΙΡΕΜΕΝΑ RBCs (N)</b>				<b>ΛΕΥΚΑΦΑΙΡΕΜΕΝΑ RBCs (L)</b>			
	<b>ΗΜΕΡΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ</b>							
	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>42</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>42</b>
<b>Λευκοκύτταρα (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	8,1 $\pm$ 0,0*	7,7 $\pm$ 0,0*	5,1 $\pm$ 0,5*	4,4 $\pm$ 1,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	<b>Nd</b>
<b>Ερυθροκύτταρα (<math>\times 10^6/\mu\text{L}</math>)</b>	8,4 $\pm$ 0,8	8,5 $\pm$ 1,3	8,6 $\pm$ 1,1	8,6 $\pm$ 1,1	8,3 $\pm$ 0,1	8,2 $\pm$ 0,1	8,1 $\pm$ 0,0	8,1 $\pm$ 0,0
<b>Αιμοπετάλια (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	283 $\pm$ 10	203 $\pm$ 2	179 $\pm$ 81	151 $\pm$ 71	<b>Nd</b>			
<b>Αιμοσφαιρίνη (g/dL)</b>	22,7 $\pm$ 0,4	23,0 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 1,1	23,4 $\pm$ 1,2	22,4 $\pm$ 1,5	23,0 $\pm$ 2,5	22,8 $\pm$ 2,0	22,7 $\pm$ 2,3
<b>Αιματοκρίτης (%)</b>	80,0 $\pm$ 11,5	80,0 $\pm$ 11,2	83,3 $\pm$ 9,8	83,2 $\pm$ 10,0	75,6 $\pm$ 1,8	76,7 $\pm$ 0,6	77,5 $\pm$ 2,0	77,0 $\pm$ 1,6
<b>MCV (fL)</b>	90,0 $\pm$ 2,4	94,8 $\pm$ 1,6	97,1 $\pm$ 1,0	98,2 $\pm$ 1,0	88,9 $\pm$ 2,5	93,1 $\pm$ 2,1	95,6 $\pm$ 2,7	96,5 $\pm$ 3,0
<b>MCH (pg)</b>	30,8 $\pm$ 2,0	31,5 $\pm$ 1,0	31,5 $\pm$ 0,6*	32,1 $\pm$ 0,4	30,3 $\pm$ 0,1	30,1 $\pm$ 0,6	30,1 $\pm$ 0,4	31,3 $\pm$ 1,5
<b>MCHC (g/dL)</b>	31,3 $\pm$ 0,3	31,7 $\pm$ 0,4	31,8 $\pm$ 0,1	32,3 $\pm$ 0,3	30,8 $\pm$ 0,8	31,5 $\pm$ 1,3	31,1 $\pm$ 1,0	32,0 $\pm$ 0,4
<b>RDW (%)</b>	12,7 $\pm$ 0,7	14,6 $\pm$ 0,2	15,8 $\pm$ 0,8	16,7 $\pm$ 0,6*	11,7 $\pm$ 0,6	14,1 $\pm$ 0,4	14,6 $\pm$ 0,4	15,6 $\pm$ 0,4
<b>Na<sup>+</sup> (πλάσμα) (mmol/L)</b>	139,5 $\pm$ 0,7*	84,0 $\pm$ 1,4*	79,5 $\pm$ 2,1	67,5 $\pm$ 0,7	142,5 $\pm$ 0,7	89,0 $\pm$ 2,8	81,5 $\pm$ 2,1	62,5 $\pm$ 2,1*
<b>K<sup>+</sup> (πλάσμα) (mmol/L)</b>	4,4 $\pm$ 0,3	16,9 $\pm$ 0,8*	24,3 $\pm$ 3,6	35,8 $\pm$ 1,5*	6,0 $\pm$ 0,1*	15,1 $\pm$ 0,3	21,0 $\pm$ 0,4	26,3 $\pm$ 0,6
<b>Αιμόλυση (%)</b>	0,13 $\pm$ 0,06	0,59 $\pm$ 0,21*	0,72 $\pm$ 0,24*	1,48 $\pm$ 0,33*	0,33 $\pm$ 0,01*	0,24 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,11

**Πίνακας 1:** Συγκενρωτικός πίνακας διακυμάνσεων αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων (πλάσμα-υπερκείμενο). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση. (\*): Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε L- και N- RBCs, Nd: μη ανιχνεύσιμα επίπεδα.

## Γ1.2. Επίδραση των Λευκοκυττάρων στη Δομική Ακεραιότητα και στη Διατήρηση της Μembrανικής Επιφάνειας των Ερυθρών Αιμοσφαιρίων

### *Μορφολογικές τροποποιήσεις*

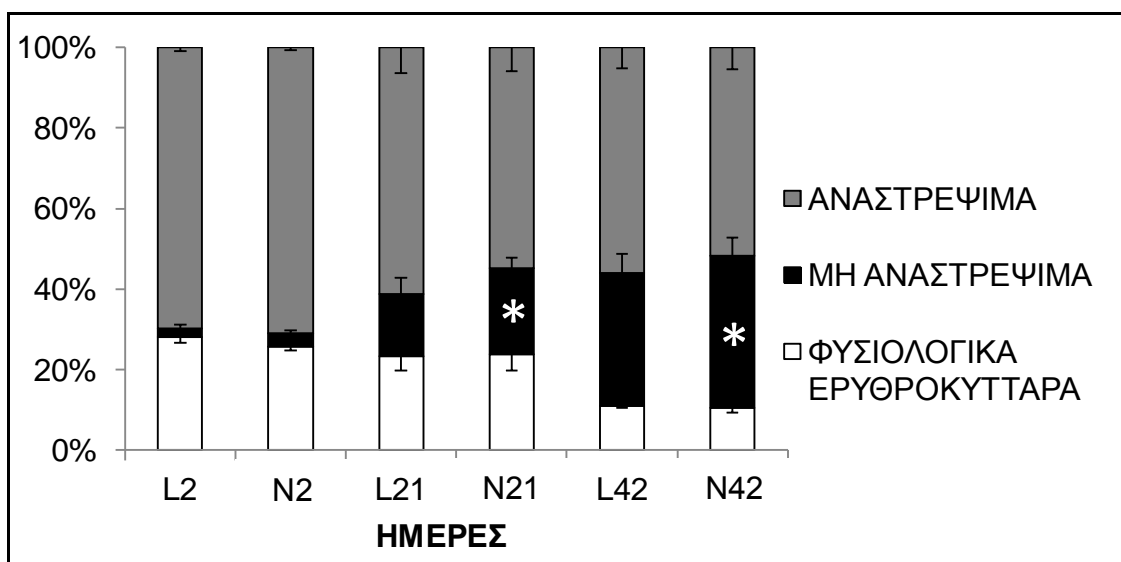
Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, τα ερυθροκύτταρα υφίστανται σταδιακή αλλαγή στο σχήμα, από δισκοκύτταρα σε εχινοκύτταρα και τελικά σε σφαιροκύτταρα και ακανόνιστου σχήματος κύτταρα, η οποία συνδέεται στενά με απώλεια της μεμβράνης υπό τη μορφή μικροκυστιδίων. Παρά το γεγονός ότι το μέσο ερυθροκύτταρο φαίνεται να είναι σε θέση να αντισταθμίσει μια μέτρια απώλεια μεμβράνης, το τελικό σφαιροεχινοκυτταρικό στάδιο είναι μία μη αναστρέψιμη τροποποίηση. Μετά από την κατάλληλη προετοιμασία κάθε δείγματος, ακολούθησε παρατήρηση σε ΗΜΣ και εντοπίστηκαν χαρακτηριστικές μεταβολές στη μορφολογία των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων (εικόνα 15). Αντιπροσωπευτικές μορφές των διαφορετικών τύπων ερυθροκυττάρων αποτελούν τα στοματοκύτταρα, τα λεπτοκύτταρα, τα εχινοκύτταρα και τα κνιζοκύτταρα. Πιο συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη δόθηκε έμφαση στις μη αναστρέψιμες τροποποιήσεις των ερυθροκυττάρων οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν το ποσοστό ανάκτησης μετά από μετάγγιση. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε στην αρχή (2<sup>η</sup> ημέρα), το μέσο (21<sup>η</sup> ημέρα) και το τέλος (42<sup>η</sup> ημέρα) της αποθήκευσης.



Εικόνα 15: Ηλεκτρονιογραφίες λευκαφαιρεμένων (L) και μη (N) δειγμάτων από ΗΜΣ (μεγέθυνση x1000). Διακρίνονται φυσιολογικά ερυθροκύτταρα (πράσινοι κύκλοι) και μη αναστρέψιμες εχινοκυτταρικές μορφές (κόκκινοι κύκλοι). Στο πάνω μέρος της εικόνας παρατίθεται υπόμνημα με την κατηγοριοποίηση των κυττάρων ανάλογα με τις μορφολογικές τους τροποποιήσεις. Μπάρες μεγέθυνσης: 10μm.

Τα ερυθροκύτταρα των δύο ομάδων εμφάνισαν έντονες μορφολογικές τροποποιήσεις προϊόντος του χρόνου αποθήκευσης με τα κύτταρα μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης να φτάνουν στο 30 – 35% επί του συνόλου στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε

μείωση των φυσιολογικών δισκοκυτταρικών μορφών και στις δύο ομάδες ασκών μετάγγισης. Εντούτοις, αν και τη δεύτερη ημέρα αποθήκευσης δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα μη αναστρέψιμης εχινοκυττάρωσης ανάμεσα στις L- και τις N- μονάδες, από το μέσο της αποθηκευτικής περιόδου οι N-μονάδες εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά σφαιροεχινοκυττάρων (διάγραμμα 1).



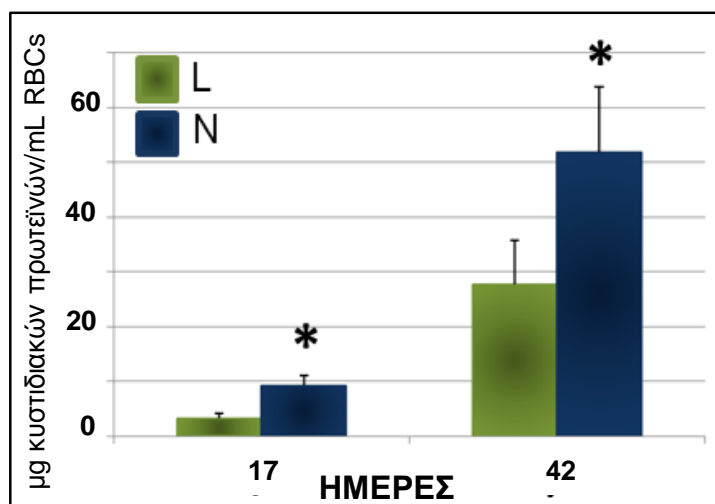
ΜΗ ΑΝΑΣΤΡΕΨΙΜΑ	2,9±1,2	3,7±0,8	13,2±3,9	24,1±5,2	31,5±3,2	38,7±3,2
ΑΝΑΣΤΡΕΨΙΜΑ	73,3±6,3	73,6±4,5	67,1±12,2	57,1±7,2	59,1±5,8	52,7±4,2
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	23,9±7,5	23,0±5,1	18,7±8,7	18,8±9,5	9,4±2,9	8,7±3,5

**Διάγραμμα 1:** Ποσοστά φυσιολογικών ερυθροκυττάρων καθώς επίσης και αναστρέψιμων και μη αναστρέψιμων μορφολογικών τροποποιήσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. (\*): Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε L- και N- RBCs, γραμμές σφάλματος: τυπική απόκλιση.

### Κυστιδιοποίηση

Τα επίπεδα κυστιδιοποίησης μετρήθηκαν υπολογίζοντας την συνολική ποσότητα πρωτεΐνης που περιέχεται σε απομονωμένα κυστίδια ανά μονάδα όγκου του ασκού μετάγγισης (μg/mL). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση και στις δύο ομάδες προϊόντος του χρόνου ( $P < 0,01$ ). Ωστόσο, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά κυστιδιακών πρωτεϊνών στις N μονάδες σε σύγκριση με τις L από το μέσο της αποθήκευσης κι έπειτα ( $P < 0,01$ ). Πιο συγκεκριμένα τη 17<sup>η</sup> ημέρα τα επίπεδα ήταν 3,3 έναντι 9,2 μg/ml στις L- και N- μονάδες αντίστοιχα με τη διαφορά να μεγιστοποιείται στο τέλος της αποθήκευσης (27,7 έναντι 51,8 μg/ml για τις L- και N- μονάδες αντίστοιχα) (διάγραμμα 2).

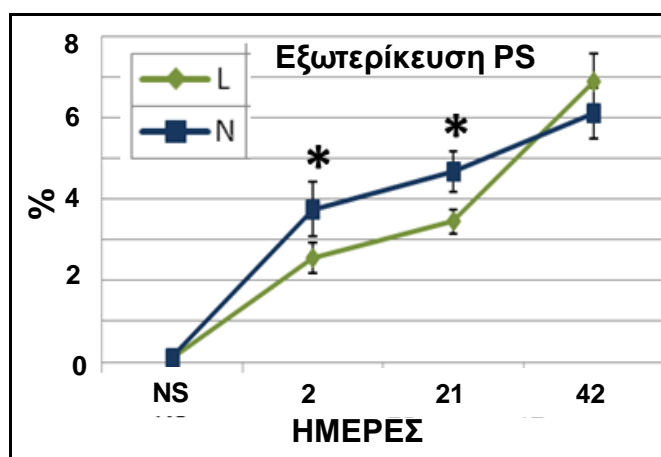




Διάγραμμα 2: Απεικόνιση της ποσότητας κυστιδίων στο μέσο και το τέλος της αποθήκευσης. (\*): Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε L- και N- RBCs, γραμμές σφάλματος: τυπική απόκλιση.

### *Εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης (PS)*

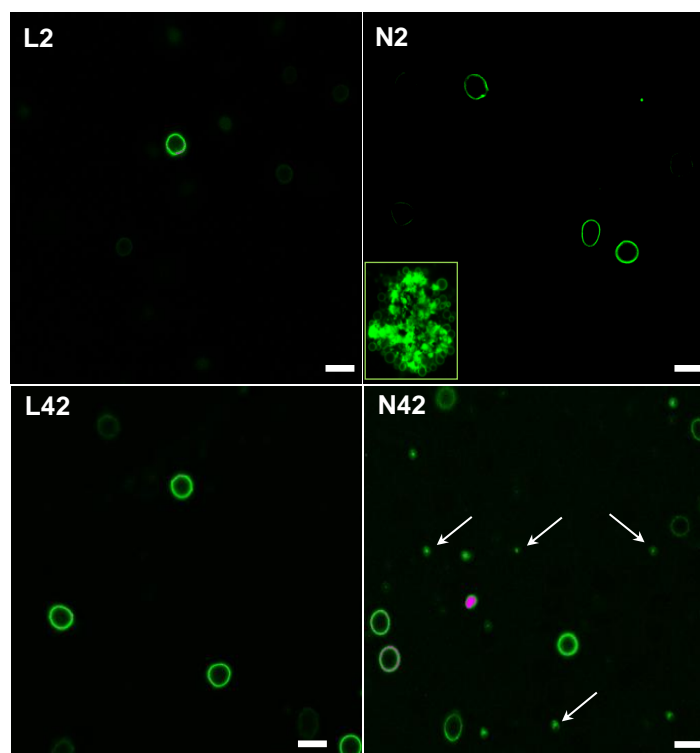
Ορισμένες από τις τροποποιήσεις που εμφανίζονται σε αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα, όπως η σηματοδότηση κυτταρικής εκκαθάρισης (εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης (**PS**)) σχετίζονται με μειωμένη επιβίωση των μεταγγιζόμενων ερυθροκυττάρων μετά τη μετάγγιση και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κλινικών παρενεργειών στους δέκτες. Και οι δύο ομάδες ερυθροκυττάρων παρουσίασαν μια μικρή αλλά στατιστικά σημαντική και προοδευτική αύξηση της εξωτερίκευσης PS από την πρώτη κιόλας ημέρα της αποθήκευσης ( $P < 0.05$ ) (διάγραμμα 3). Ενώ τα μη αποθηκευμένα δείγματα (**NS**) εκθέτουν PS σε πολύ μικρό ποσοστό (L-  $0,09 \pm 0,01\%$  και N-  $0,11 \pm 0,01\%$ ), εντός των πρώτων ημερών αποθήκευσης το ποσοστό αυτό παύει να είναι αμελητέο (L-  $2,56 \pm 0,38\%$  και N-  $3,75 \pm 0,67\%$ ) με την αύξηση να συνεχίζεται ως το τέλος της αποθήκευσης. Επιπρόσθετα, τόσο τις πρώτες ημέρες όσο και στο μέσο της περιόδου αποθήκευσης οι N-μονάδες περιέχουν περισσότερα  $PS^+$ -RBCs έναντι των L- μονάδων ( $4,69 \pm 0,50\%$  έναντι  $3,45 \pm 0,29\%$ ,  $P < 0,05$ ) με τις διαφορές να εξισώνονται την 42<sup>η</sup> ημέρα παραμονής στον ασκό μετάγγισης (L-  $6,90 \pm 0,70\%$  έναντι N-  $6,13 \pm 0,63\%$ ).



Διάγραμμα 3: Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού των ερυθροκυττάρων τα οποία εκθέτουν φωσφατιδυλοσερίνη πριν (NS) και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. (\*): Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε L- και N- RBCs, γραμμές σφάλματος: τυπική απόκλιση.



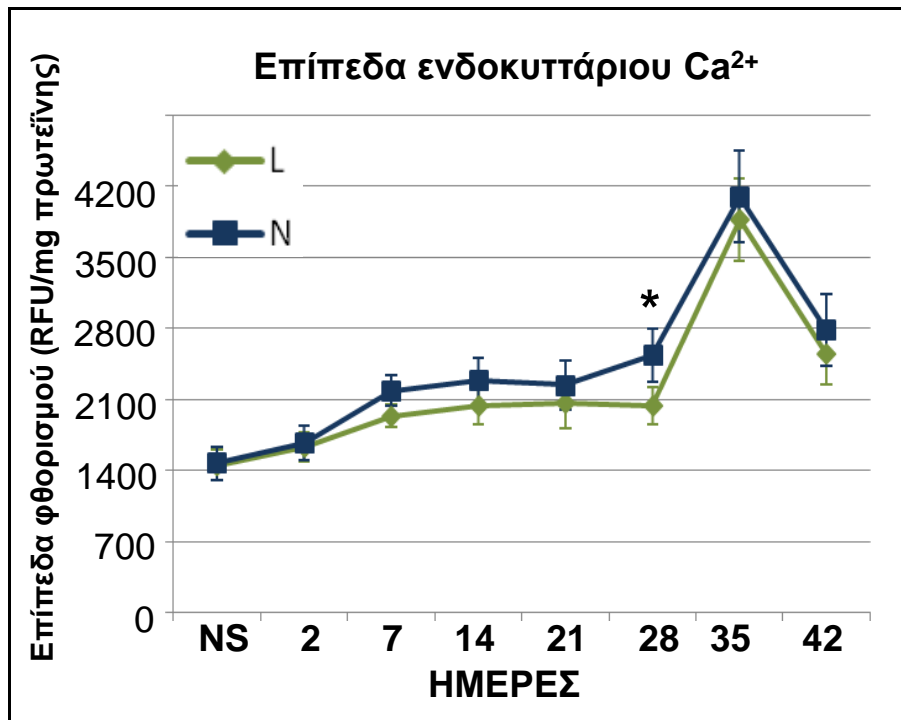
Τέλος μετά από παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο LASER (CLSM), πέραν της χρονοεξαρτώμενης αύξησης στην εξωτερικήυση PS, εντοπίστηκαν (μόνο) στις N- μονάδες αποπίπτοντα λευκοκύτταρα (αρχή αποθήκευσης) και κυστίδια μεγέθους <math><1\mu\text{m}</math> τα οποία εκφράζουν φωσφατιδυλοσερίνη (τελευταία ημέρα της αποθήκευσης) (λευκά βέλη εικόνα 16). Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση κυστιδιακής πρωτεΐνης που μετρήθηκε στις N- μονάδες μετά από απομόνωση κυστιδίων με υπερφυγοκέντρωση.



Εικόνα 16: Φωτογραφίες ερυθροκυττάρων θετικών για εξωτερικήυση PS από CLSM (μεγέθυνση x600). Ένθετο εικόνας N2: λευκοκύτταρο που αποπίπτει, μπάρες μεγέθυνσης: 10 $\mu\text{m}$ , λευκά βέλη: κυστίδια θετικά για PS.

### Γ1.3. Εντοπισμός Διαφορών στα Επίπεδα Ενδοκυτταρικού Ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}$ )

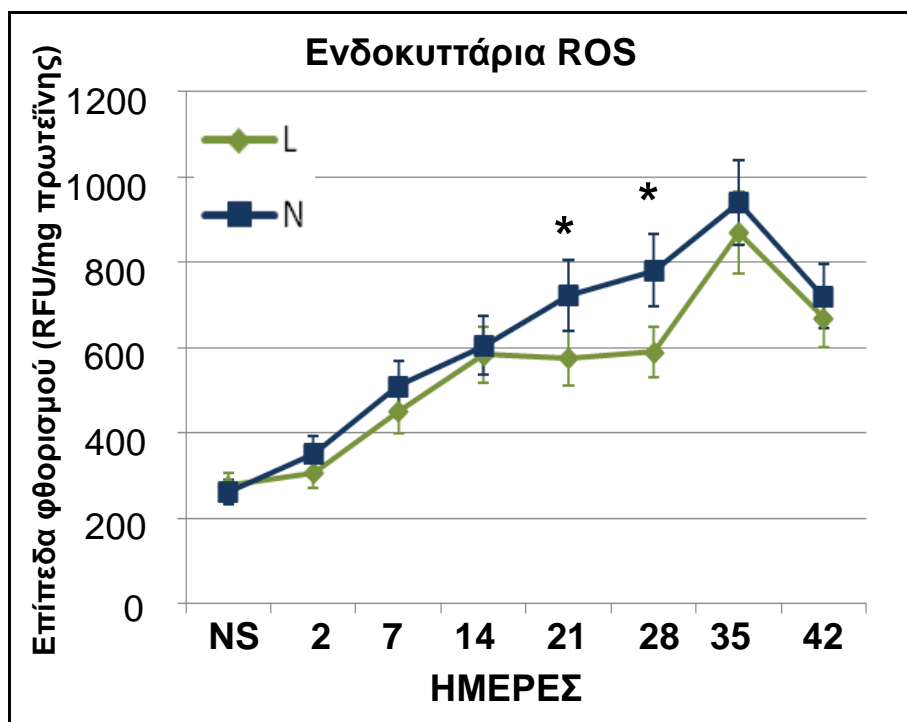
Υπάρχουν ενδείξεις ότι η συσσώρευση ασβεστίου, που συνοδεύει είτε τη γήρανση των ερυθροκυττάρων είτε την *in vitro* επιβολή στρεσογόνων ερεθισμάτων, προκαλεί άμεσα ή προωθεί έμμεσα ένα καταρράκτη γεγονότων συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής συρρίκνωσης, της απώλειας παραμορφωσιμότητας και της εχινοκυττάρωσης. Σύμφωνα με τον φθορισμομετρικό προσδιορισμό ανιχνεύθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου μετά την 7<sup>η</sup> ημέρα της αποθήκευσης σε σχέση με τα προ-αποθηκευτικά επίπεδα και στις δύο σειρές δειγμάτων ( $P<0,05$ ). Τα N-RBCs παρουσιάζουν σταθερά υψηλότερα επίπεδα ασβεστίου σε σχέση με τα L-RBCs καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης με τη διαφορά όμως να αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική μόνο την 29<sup>η</sup> ημέρα της αποθήκευσης ( $P<0,05$ ). Τα επίπεδα κορυφώνονται την 38<sup>η</sup> ημέρα ενώ ακολουθεί πτώση την τελευταία ημέρα και στις δύο ομάδες. Παρά το γεγονός ότι η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε λευκαφαιρεμένα και μη δείγματα εντοπίστηκε την 29<sup>η</sup> ημέρα αποθήκευσης, τα N-RBCs εμφανίζουν ξεκάθαρη τάση για υψηλότερα επίπεδα ενδοκυτταρίου  $\text{Ca}^{2+}$  (με ό,τι αυτό συνεπάγεται) σε κάθε χρονικό σημείο στο οποίο πραγματοποιήθηκε μέτρηση (διάγραμμα 4).



**Διάγραμμα 4:** Διαγραμματική απεικόνιση της χρονοεξαρτώμενης διακύμανσης των επιπέδων ενδοκυττάρου ασβεστίου σε λευκαφαιρεμένες και μη μονάδες μετάγγισης. (\*): Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε L- και N- RBCs, γραμμές σφάλματος: τυπική απόκλιση.

#### **Γ1.4. Επίπεδα Ενεργών Ριζών Οξυγόνου (ROS)**

Με δεδομένο ότι το οξειδωτικό στρες φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στα αρχικά στάδια της ερυθρόπτωσης όσο και στην εξέλιξη της γήρανσης, τα δείγματα ελέγχθηκαν όσον αφορά στα επίπεδα ενεργών ριζών οξυγόνου πριν (NS) και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (διάγραμμα 5). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των ROS, σε σχέση με τα NS δείγματα, από την πρώτη κιάλας μέρα της αποθήκευσης στα N-RBCs ( $P < 0,05$ ) σε αντίθεση με τα L-RBCs στα οποία η αύξηση αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική μετά την πρώτη εβδομάδα αποθήκευσης ( $P < 0,01$ ). Η αύξηση συνεχίστηκε μέχρι και την 38<sup>η</sup> ημέρα με τα επίπεδα να μειώνονται την τελευταία ημέρα, κάτι το οποίο συμβαδίζει με την αντίστοιχη εικόνα ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$ . Η πτώση αυτή πιθανά οφείλεται στην αδυναμία του αντιδραστηρίου να παραμείνει εντός των ερυθροκυττάρων λόγω υψηλών επιπέδων αιμόλυσης καθώς επίσης και στη χαμηλή ενεργότητα των εστερασών των γηρασμένων ερυθροκυττάρων (Gottlieb *et al.*, 2012). Μία ακόμη χρονοεξαρτώμενη διαφορά ανάμεσα σε N- και L- RBCs αποτελεί η σταθεροποίηση των επιπέδων ROS στα δεύτερα κατά το μέσο της αποθηκευτικής περιόδου (ημέρες 21 και 28). Την περίοδο αυτή (3<sup>η</sup> – 4<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσης) αναδεικνύονται και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο σειρές δειγμάτων με τα N-RBCs να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές ( $P < 0,05$ ). Εντούτοις οι διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες ασκών μετάγγισης παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με την αντίστοιχη διακύμανση των επιπέδων ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$  καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης καθώς οι N- μονάδες χαρακτηρίζονται από σταθερά αυξημένα ενδοκυττάρια ROS (είτε στατιστικά σημαντικά είτε όχι).



Διάγραμμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της χρονοεξαρτώμενης διακύμανσης των επιπέδων ROS σε λευκαφαιρέμενες και μη μονάδες μετάγγισης. (\*): Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε L- και N-RBCs, γραμμές σφάλματος: τυπική απόκλιση.

## **Γ1.5. Πρωτεϊνική Ανάλυση**

### **Γ1.5.1. Αναδιάρθρωση της Μembrάνης – Χρονοεξαρτώμενη μελέτη**

Όσον αφορά στη χρονοεξαρτώμενη διακύμανση, η πλειονότητα των πρωτεϊνών εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές προϊόντος του χρόνου ανεξαρτήτως λευκαφαίρεσης (πίνακας 2, εικόνα 17). Παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση ( $P < 0,05$ ) σε ποικίλες πρωτεΐνες και μεμβρανικούς υποδοχείς όπως η σπεκτρίνη, η 4.1R, η παλλιδίνη, η ζώνη-3, οι κύριες γλυκοφορίνες (GrA, GrC) ο υποδοχέας CD47 και ο υποδοχέας CD59, με τη μείωση να κυμαίνεται μεταξύ 20 και 35% επί της αρχικής τιμής. Επιπλέον εντοπίστηκαν αυξημένα επίπεδα θραυσμάτων σκελετικών πρωτεϊνών (σπεκτρίνη και 4.1R) της τάξεως του 55 έως 85% επί της αρχικής τιμής την τελευταία εβδομάδα της αποθήκευσης. Η στατιστικά σημαντική ( $P < 0,05$ ) εμφάνιση θραυσμάτων ξεκινά από το μέσο της αποθήκευσης και κορυφώνεται την 35<sup>η</sup> ημέρα της αποθήκευσης. Η συμπλοκοποίηση σπεκτρίνης – αιμοσφαιρίνης, που αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη γήρανσης (Snyder *et al.*, 1983), αυξάνεται κατακόρυφα προϊόντος του χρόνου αποθήκευσης με το φαινόμενο να ξεκινά πολύ νωρίς (10<sup>η</sup> ημέρα) εντός της μονάδας μετάγγισης. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η πρόσδεση και η στρατολόγηση στη μεμβράνη κυτοσολικών πρωτεϊνών και ενζύμων αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση των επιπέδων πρόσδεσης οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης (5,6 φορές αύξηση σε σχέση με την αρχή της αποθήκευσης) και IgGs (2,6 φορές αύξηση σε σχέση με την αρχή της αποθήκευσης) στη μεμβράνη με τα αποτελέσματα να είναι στατιστικά σημαντικά από τη 10<sup>η</sup> ημέρα ή το μέσο της αποθήκευσης αντίστοιχα. Αντίστοιχα η πρωτεάση καλπαΐνη (δείκτης ερυθρόπτωσης) και η μοριακή συνοδός Hsp70 προσδένονται στη μεμβράνη από το μέσο της

αποθήκευσης ενώ αντίθετα η μοριακή συνοδός κλαστερίνη εμφανίζει στατιστικά σημαντική μείωση τις τελευταίες εβδομάδες (ημέρες 25 έως 42) της αποθηκευτικής περιόδου.

### **Γ1.5.2. Αναδιάρθρωση της Μembrάνης – Επίδραση της λευκαφαίρεσης**

Πέραν της επίδρασης του χρόνου αποθήκευσης στη δομική ακεραιότητα και την αναδιάρθρωση της μεμβράνης εντοπίστηκαν και σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες ασκών μετάγγισης. Χαρακτηριστικά, τα επίπεδα κάποιων δεικτών που σχετίζονται με τη γήρανση και το οξειδωτικό στρες όπως η καλπαΐνη, τα ολιγομερή Hb, η συμπλοκοποίηση σπεκτρίνης-Hb, η πρόσδεση IgGs και η Hsp70, παρουσιάζονται μειωμένα σε δότες στους οποίους έχει προηγηθεί λευκαφαίρεση (L) (πίνακας 2 και εικόνα 17). Κλασσικοί βιοδείκτες γήρανσης όπως η συμπλοκοποίηση σπεκτρίνης-Hb, η πρόσδεση οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης και IgGs στη μεμβράνη και η μείωση των κύριων γλυκοπρωτεϊνών εμφανίζουν στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής τους στις N-μονάδες σε όλες σχεδόν τις χρονικές περιόδους μέτρησης. Για παράδειγμα η πρόσδεση ολιγομερών αιμοσφαιρίνης στη μεμβράνη εντοπίζεται σε διπλάσια σχεδόν ποσοστά από την 4<sup>η</sup> ημέρα της αποθήκευσης. Επιπλέον τα επίπεδα πρωτεόλυσης της σπεκτρίνης και της 4.1R είναι σταθερά υψηλότερα στις N-μονάδες καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης ενώ τα θραύσματα εμφανίζονται δύο εβδομάδες νωρίτερα σε σχέση με τις L-μονάδες.

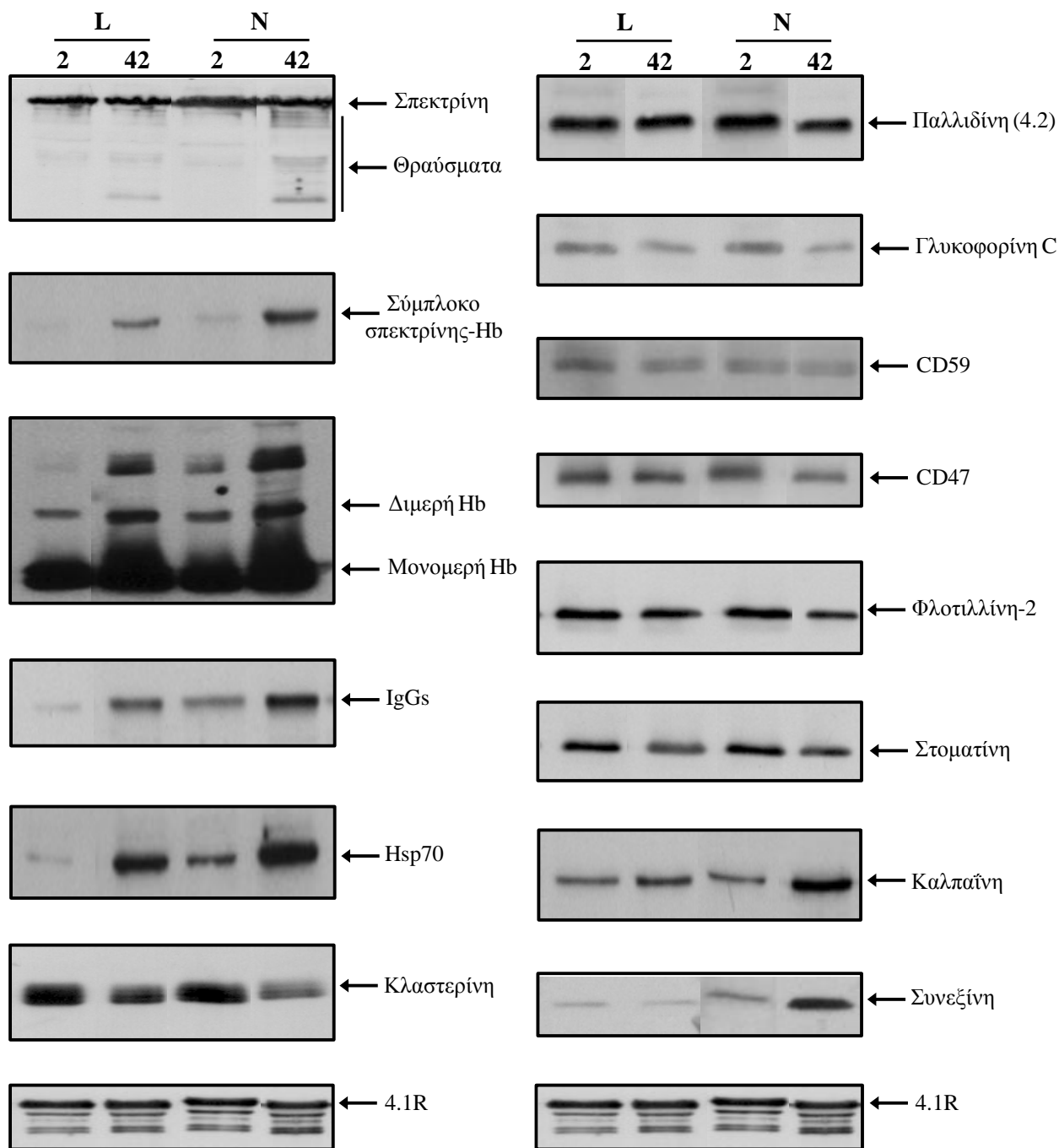
Μία ακόμα σαφής διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες δειγμάτων αφορά τα επίπεδα των ασβεστοεξαρτώμενων πρωτεϊνών καλπαΐνη (πίνακας 2) και συνεξίνη (εικόνα 17), οι οποίες σχετίζονται με την ερυθρόπωση και την κυστιδιοποίηση αντίστοιχα. Και οι δύο πρωτεΐνες μετατοπίζονται στη μεμβράνη σε σταθερά υψηλότερο ποσοστό στις μη λευκαφαιρεμένες μονάδες υποδεικνύοντας προώθηση των διαδικασιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και απώλειας μεμβρανικής επιφάνειας μέσω κυστιδιοποίησης. Επιπρόσθετα πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίζονται σε κυστίδια όπως η ζώνη-3, η στοματίνη, η φλοτιλλίνη-2, η κλαστερίνη, η CD47 και η CD59 παρουσιάζουν μία σταθερή τάση (ακόμα κι όταν οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές) για αυξημένη απώλεια στα N-δείγματα. Η μειωμένη έκφραση του δείκτη CD47, ο οποίος αποτρέπει τη φαγοκυττάρωση, και του υποδοχέα CD59, ο οποίος είναι ρυθμιστής του συμπληρώματος, είναι αρκετά σημαντική καθώς επηρεάζει το ποσοστό των προς μετάγγιση ερυθροκυττάρων κάθε μονάδας τα οποία θα εκκαθαριστούν στον οργανισμό του δέκτη.

Τέλος ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διακύμανση της πρωτεϊνικής έκφρασης ανάμεσα στους δότες (σε ποικίλα χρονικά σημεία) ακόμα κι όταν ανήκουν στην ίδια εξεταζόμενη ομάδα (πίνακας 2). Δείκτες όπως η πρόσδεση οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης, καλπαΐνης και IgGs του πλάσματος στη μεμβράνη εμφανίζουν ποικιλομορφία ανάμεσα στους αιμοδότες με τα επίπεδα διακύμανσης να φτάνουν μέχρι και το 20% της μέσης τιμής. Επιπλέον παράμετροι με παρόμοια επίπεδα διακύμανσης είναι η συμπλοκοποίηση σπεκτρίνης-Hb και η πρωτεόλυση σκελετικών πρωτεϊνών. Αξίζει να σημειωθεί πως τα επίπεδα διακύμανσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ανάμεσα σε L- και N- μονάδες με τα ποσοστά να αναδεικνύονται παραπλήσια σχεδόν σε κάθε χρονική περίοδο μέτρησης με ελάχιστες πρωτεΐνες να διαφοροποιούνται από αυτό το πρότυπο (σύμπλοκο σπεκτρίνης-Hb τις ημέρες 12, 19 και 25 όπου υπάρχει μεγαλύτερη διακύμανση στις N-μονάδες). Μία τέτοια παρατήρηση υποδεικνύει την ύπαρξη επιπλέον παραγόντων οι οποίοι επηρεάζουν την πρωτεϊνική έκφραση κατά τη διάρκεια της αποθηκευτικής περιόδου πέραν του πληθυσμού υπολειπόμενων λευκοκυττάρων.

<b>ΗΜΕΡΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ</b>						
<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>19</b>	<b>25</b>	<b>33</b>	<b>42</b>
<b>Σπεκτρίνη</b>	<b>1,00±0,05</b>	<b>1,01±0,06</b>	<b>0,97±0,09</b>	<b>0,92±0,05<sup>§</sup></b>	<b>0,83±0,06</b>	<b>0,80±0,04*</b>
	1,00±0,09	0,98±0,11	0,93±0,12	0,85±0,10 <sup>§</sup>	0,74±0,05	0,69±0,05
<b>Ζώνη 3</b>	<b>1,00±0,03</b>	<b>0,97±0,11</b>	<b>0,94±0,05<sup>§</sup></b>	<b>0,87±0,04*</b>	<b>0,76±0,05</b>	<b>0,77±0,04*</b>
	1,00±0,04	0,99±0,06	0,90±0,07 <sup>§</sup>	0,76±0,05	0,71±0,06	0,66±0,06
<b>4.1R</b>	<b>1,00±0,03</b>	<b>0,94±0,04<sup>§</sup></b>	<b>0,90±0,03</b>	<b>0,85±0,04</b>	<b>0,87±0,05*</b>	<b>0,82±0,08*</b>
	0,99±0,04	0,87±0,06 <sup>§</sup>	0,83±0,04	0,79±0,07	0,75±0,05	0,66±0,06
<b>Παλλιδίνη (Ζώνη 4.2)</b>	<b>1,00±0,06</b>	<b>0,95±0,08</b>	<b>0,98±0,07</b>	<b>0,85±0,06<sup>§</sup></b>	<b>0,80±0,07</b>	<b>0,76±0,08</b>
	1,00±0,05	1,13±0,08	0,95±0,05	0,86±0,07 <sup>§</sup>	0,77±0,06	0,72±0,09
<b>Κύριες γλυκοφορίνες</b>	<b>1,00±0,08</b>	<b>1,09±0,05</b>	<b>0,96±0,07</b>	<b>0,88±0,07<sup>§</sup></b>	<b>0,81±0,06</b>	<b>0,83±0,08*</b>
	1,00±0,05	1,05±0,06	0,99±0,05	0,88±0,05 <sup>§</sup>	0,72±0,07	0,62±0,07
<b>Στοματίνη</b>	<b>1,00±0,03</b>	<b>1,10±0,04</b>	<b>0,95±0,08</b>	<b>0,88±0,04<sup>§*</sup></b>	<b>0,89±0,08*</b>	<b>0,86±0,07</b>
	1,00±0,05	0,97±0,05	1,00±0,09	0,73±0,06 <sup>§</sup>	0,63±0,09	0,76±0,05
<b>Φλοτιλλίνη-2</b>	<b>1,00±0,03</b>	<b>0,98±0,05</b>	<b>1,01±0,07*</b>	<b>0,95±0,05*</b>	<b>0,83±0,06<sup>§</sup></b>	<b>0,65±0,08</b>
	1,01±0,06	0,87±0,06 <sup>§</sup>	0,83±0,05	0,79±0,06	0,75±0,07	0,72±0,07
<b>Προτεκτίνη (CD59)</b>	<b>1,00±0,06</b>	<b>1,18±0,12*</b>	<b>0,99±0,09</b>	<b>0,89±0,08</b>	<b>0,92±0,09</b>	<b>0,82±0,06<sup>§</sup></b>
	0,87±0,07	0,91±0,12	0,85±0,08	0,80±0,11	0,85±0,09	0,75±0,08 <sup>§</sup>
<b>CD47</b>	<b>1,00±0,06</b>	<b>0,95±0,05</b>	<b>0,92±0,06</b>	<b>0,81±0,05<sup>§</sup></b>	<b>0,86±0,04*</b>	<b>0,79±0,06</b>
	1,00±0,04	0,98±0,06	0,85±0,07 <sup>§</sup>	0,77±0,07	0,72±0,07	0,69±0,05
<b>IgGs</b>	<b>1,00±0,09</b>	<b>0,91±0,09*</b>	<b>1,60±0,17<sup>§</sup></b>	<b>2,48±0,36*</b>	<b>3,12±0,28*</b>	<b>2,63±0,34*</b>
	1,05±0,11	1,20±0,13	2,07±0,32 <sup>§</sup>	4,67±0,62	3,86±0,43	3,40±0,41
<b>Θραύσματα σκελετικών πρωτεϊνών</b>	<b>1,00±0,12*</b>	<b>0,95±0,19*</b>	<b>1,23±0,19<sup>§*</sup></b>	<b>1,32±0,21*</b>	<b>1,85±0,32*</b>	<b>1,55±0,32*</b>
	1,60±0,28	1,89±0,39	2,00±0,43	2,25±0,46	3,16±0,53 <sup>§</sup>	2,69±0,59
<b>Σύνπλοκο σπεκτρίνης-Hb</b>	<b>1,00±0,13</b>	<b>1,49±0,27<sup>§*</sup></b>	<b>2,73±0,42*</b>	<b>2,29±0,53*</b>	<b>2,55±0,41*</b>	<b>4,94±0,89*</b>
	1,00±0,15	4,11±0,94 <sup>§</sup>	4,85±1,10	5,86±1,34	7,61±1,42	12,24±2,12
<b>Μονομερή Hb</b>	<b>1,00±0,07</b>	<b>1,21±0,22</b>	<b>1,12±0,19</b>	<b>1,32±0,19<sup>§</sup></b>	<b>1,15±0,17</b>	<b>1,59±0,22</b>
	1,00±0,09	1,03±0,18	0,87±0,12	1,03±0,16	0,94±0,15	1,30±0,18 <sup>§</sup>
<b>Ολιγομερή Hb</b>	<b>1,00±0,18*</b>	<b>1,81±0,36<sup>§*</sup></b>	<b>1,57±0,37*</b>	<b>2,57±0,56*</b>	<b>3,08±0,56*</b>	<b>5,62±1,26*</b>
	1,94±0,38	2,97±0,61 <sup>§</sup>	3,61±0,77	5,22±1,24	7,35±1,62	9,44±1,79
<b>Καλπαΐνη</b>	<b>1,00±0,15*</b>	<b>1,06±0,19*</b>	<b>1,73±0,31<sup>§*</sup></b>	<b>1,45±0,24*</b>	<b>2,31±0,47*</b>	<b>2,64±0,43*</b>
	1,38±0,17	2,22±0,38 <sup>§</sup>	3,96±0,73	2,63±0,45	4,31±0,79	4,65±0,83
<b>Hsp70</b>	<b>1,00±0,18*</b>	<b>1,06±0,23</b>	<b>1,36±0,23</b>	<b>1,96±0,32<sup>§*</sup></b>	<b>2,52±0,34</b>	<b>3,08±0,58*</b>
	1,54±0,28	1,62±0,34	1,92±0,37	2,38±0,36 <sup>§</sup>	3,13±0,43	5,20±1,13
<b>Κλαστερίνη</b>	<b>1,00±0,08</b>	<b>1,07±0,10</b>	<b>0,93±0,08</b>	<b>0,85±0,06<sup>§*</sup></b>	<b>0,87±0,06</b>	<b>0,78±0,08*</b>
	1,00±0,10	0,94±0,08	0,85±0,11	0,68±0,08 <sup>§</sup>	0,72±0,09	0,58±0,09

**Πίνακας 2:** Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών μεταβολών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε μονάδες μετάγγισης. Έντονοι χαρακτήρες: Λευκαφαιρεμένα ερυθροκύτταρα L-RBCs, (\*) p<0,05 L-RBCs έναντι N-RBCs, (°) p<0,05 έναντι ημέρας 4 των L- ή N-δειγμάτων (Η ένδειξη § εμφανίζεται μόνο στο πρώτο χρονικό σημείο στο οποίο παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση προϊόντος του χρόνου, υποδεικνύοντας πως όλες οι διαφορές μετά τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο είναι στατιστικά σημαντικές). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση μετά από κανονικοποίηση των τιμών στα επίπεδα της 4<sup>ης</sup> ημέρας.

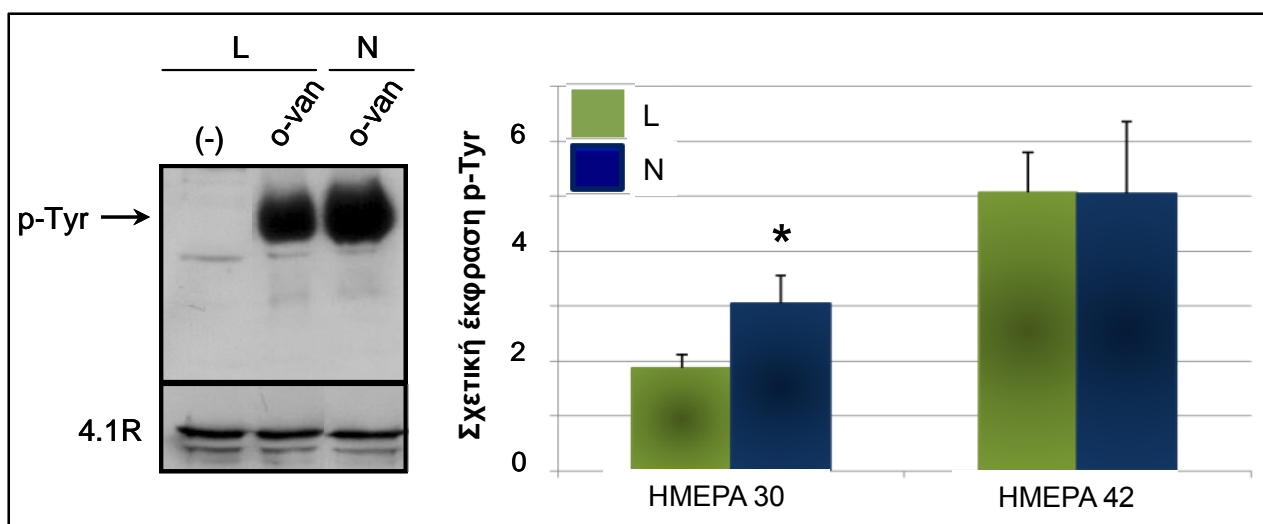
## ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ



**Εικόνα 17:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοεντόπισης μετά από διαδικασία Western για τις πρωτεΐνες που αναφέρονται στον πίνακα 2. Παρουσιάζονται ζώνες για την αρχή (ημέρα 2) και το τέλος (ημέρα 42) της αποθηκευτικής περιόδου τόσο στα L- όσο και στα N- δείγματα. Η πρωτεΐνη 4.1R που βρίσκεται στη βάση της εικόνας χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας του πειράματος ανοσοεντόπισης για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

### Γ1.5.3. Πρωτεϊνικές Τροποποιήσεις που Σχετίζονται με το Μονοπάτι Γήρανσης της Ζώνης-3

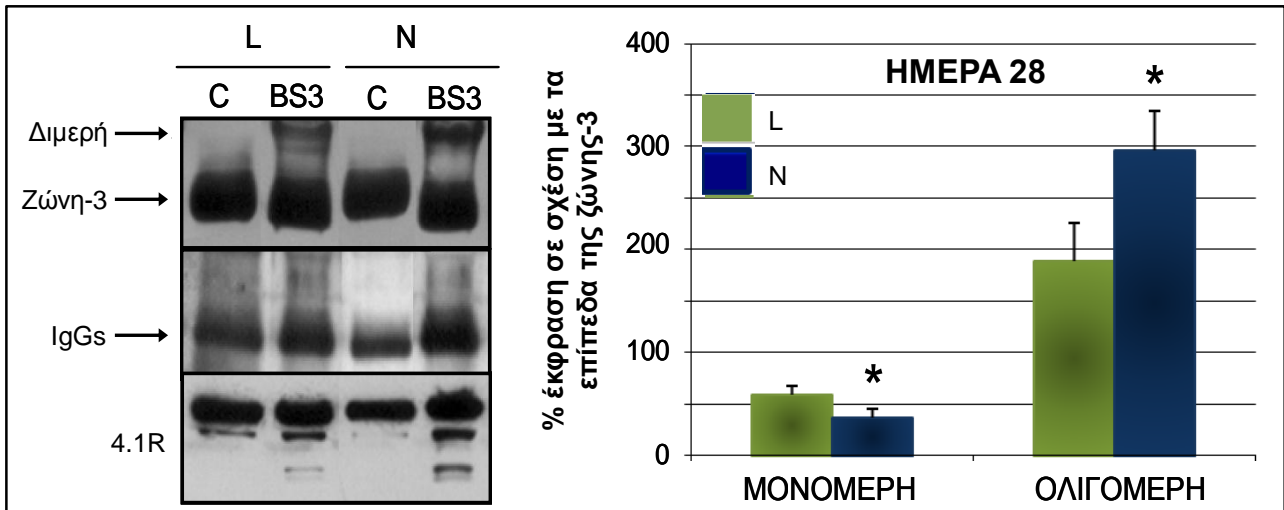
Όσον αφορά στις τροποποιήσεις που σχετίζονται με το μονοπάτι γήρανσης της ζώνης-3, τα N-RBCs εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της εν λόγω πρωτεΐνης σε κατάλοιπα τυροσίνης (κυρίως στο μέσο της αποθήκευσης) (εικόνα 18). Ουσιαστικά οι ημέρες 30 και 42 είναι οι μόνες στις οποίες εμφανίζεται στατιστικά σημαντική ( $P<0,05$ ) αύξηση φωσφορυλίωσης της ζώνης-3 και στις δύο ομάδες δειγμάτων. Οι διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στα N- και τα L- δείγματα την 4<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσης εξομαλύνονται την τελευταία ημέρα.



Εικόνα 18: Επίπεδα φωσφορυλίωσης της ζώνης-3 μετά από χρήση του αναστολέα φωσφατασών orthovanadate (o-van). **Αριστερά:** εικόνα ανοσοσεντόπισης με αντίσωμα έναντι φωσφορυλιωμένης τυροσίνης (p-Tyr) για την 30<sup>η</sup> ημέρα της αποθήκευσης. Η πρωτεΐνη 4.1R χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας του πειράματος ανοσοσεντόπισης για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. **Δεξιά:** διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων p-Tyr στις δύο εξεταζόμενες ομάδες για τις τελευταίες εβδομάδες της αποθήκευσης. (\*): Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε L- και N- RBCs, γραμμές σφάλματος: τυπική απόκλιση.

Η επόμενη τροποποίηση μείζονος σημασίας για το μονοπάτι γήρανσης της ζώνης-3 που ελέγχθηκε ήταν η ικανότητα διμερισμού-ολιγομερισμού της εν λόγω πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό τα ερυθροκύτταρα επωάστηκαν με ειδικό αντιδραστήριο (BS3) το οποίο επάγει τη συσσωμάτωση της ζώνης-3. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επίπεδα σχετικής έκφρασης μετά από κανονικοποίηση στα αρχικά επίπεδα της πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε αυξημένη ικανότητα συσσωμάτωσης της ζώνης-3 στα N- σε σχέση με τα L- δείγματα την 28<sup>η</sup> ημέρα της αποθήκευσης (εικόνα 19). Μετά από ποσοτικοποίηση τα επίπεδα ολιγομερισμού ανήλθαν στο  $297 \pm 38\%$  έναντι  $188 \pm 37\%$ , σε N- και L- δείγματα αντίστοιχα ( $P<0,05$ ). Επιπρόσθετα τα επίπεδα εναπομεινουσας μονομερούς ζώνης-3 ήταν  $37 \pm 8\%$  έναντι  $59 \pm 8\%$ , σε N- και L- δείγματα αντίστοιχα ( $P<0,05$ ). Τέλος η αύξηση συσσωματωμένης ζώνης-3 στα μη λευκαφαιρεμένα δείγματα φαίνεται να οδηγεί σε ταυτόχρονη και ανάλογη αύξηση πρόσδεσης IgGs ( $P<0,05$ ).

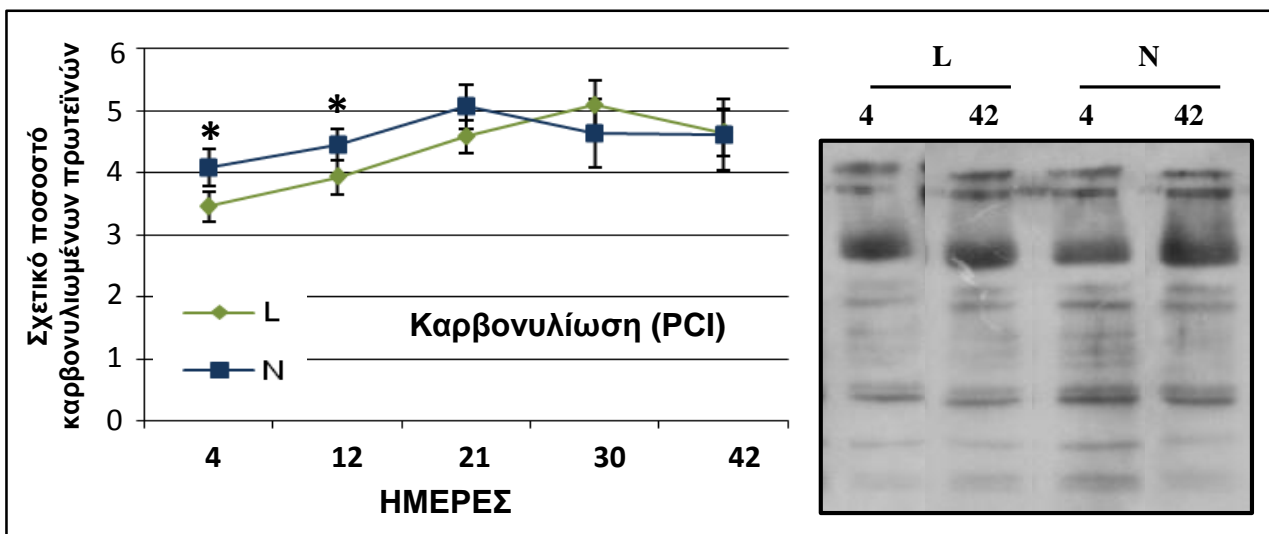




**Εικόνα 19:** Επίπεδα συσσωμάτωσης της ζώνης-3 μετά από χρήση του επαγωγέα συσσωμάτωσης BS3. **Αριστερά:** εικόνα ανοσοσεντόπισης με αντισώματα έναντι ζώνης-3 και IgGs για την 30<sup>η</sup> ημέρα της αποθήκευσης. Η πρωτεΐνη 4.1R χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας του πειράματος ανοσοσεντόπισης για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. **Δεξιά:** διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων συσσωματωμένης και μονομερούς ζώνης-3 στις δύο εξεταζόμενες ομάδες. (\*): Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε L- και N- RBCs, γραμμές σφάλματος: τυπική απόκλιση.

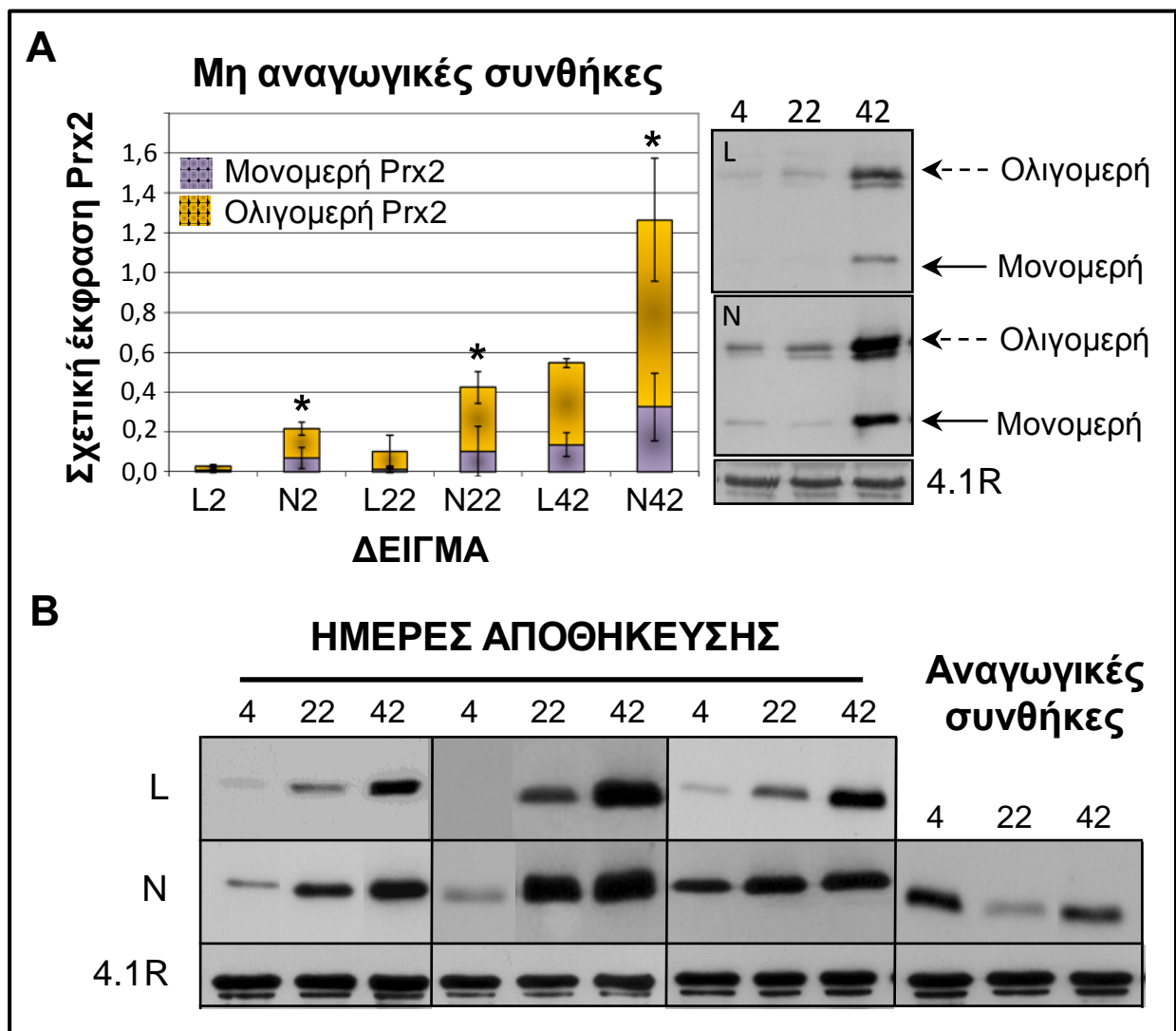
#### **Γ1.5.4. Πρωτεϊνικοί Δείκτες Οξειδωτικής Επιβάρυνσης**

Ο δείκτης καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών της μεμβράνης (PCI) εμφάνισε αύξηση προϊόντος του χρόνου αποθήκευσης και στις δύο ομάδες δειγμάτων (εικόνα 20). Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε μέχρι την 21<sup>η</sup> (N-RBCs) και την 30<sup>η</sup> (L-RBCs) ημέρα αποθήκευσης με τα επίπεδα να σταθεροποιούνται σε ελαφρώς χαμηλότερα επίπεδα τις τελευταίες ημέρες. Ανάμεσα στις δύο ομάδες εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική ( $P < 0,05$ ) διαφορά μόνο στο πρώτο μισό της αποθηκευτικής περιόδου με τα N-δείγματα να διαθέτουν μεγαλύτερο ποσοστό καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών. Από την 21<sup>η</sup> ημέρα κι έπειτα οι διαφορές εξισορροπούνται.



**Εικόνα 20:** Επίπεδα καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών. (\*): Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε L- και N- RBCs, γραμμές σφάλματος: τυπική απόκλιση.

Επιπλέον η μελέτη του αντιοξειδωτικού ενζύμου υπεροξειδοξίνη-2 (Prx2), πρόσδεση του οποίου στη μεμβράνη τόσο στη μονομερή όσο και στην ολιγομερισμένη μορφή του αποτελεί δείκτη οξειδωτικής επιβάρυνσης, έδειξε υψηλότερα επίπεδα στα N-RBCs (εικόνα 21A). Τα επίπεδα είναι αυξημένα στα μη λευκαφαιρεμένα δείγματα τόσο σε αναγωγικές (μονομερής μορφή) όσο και σε μη αναγωγικές (ολιγομερισμένη μορφή) συνθήκες. Παρά το ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό διακύμανσης (σε κάποιες περιπτώσεις μεγαλύτερο του 50%) της Prx2 ακόμα και σε δότες της ίδιας ομάδας (εικόνα 21B) οι διαφορές αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης.



**Εικόνα 21:** Επίπεδα πρόσδεσης της υπεροξειδοξίνης-2 στη μεμβράνη σε αναγωγικές και μη αναγωγικές συνθήκες. **A.** Διαγραμματική απεικόνιση και εικόνες ανοσοεντόπισης με αντίσωμα έναντι της Prx2 σε μη αναγωγικές συνθήκες. Η πρωτεΐνη 4.1R χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας του πειράματος ανοσοεντόπισης για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. (\*): Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε L- και N- RBCs, γραμμές σφάλματος: τυπική απόκλιση. **B.** Ενδεικτικές εικόνες ανοσοεντόπισης σε αναγωγικές συνθήκες για την πρωτεΐνη Prx2 στις οποίες φαίνεται το υψηλό ποσοστό διακύμανσης ανάμεσα στους εξεταζόμενους αιμοδότες καθόλη τη διάρκεια της αποθηκευτικής περιόδου.

## **Γ1.6. Συγκριτική Ανάλυση Νεαρών (Y) και Γηρασμένων (S) Ερυθροκυττάρων**

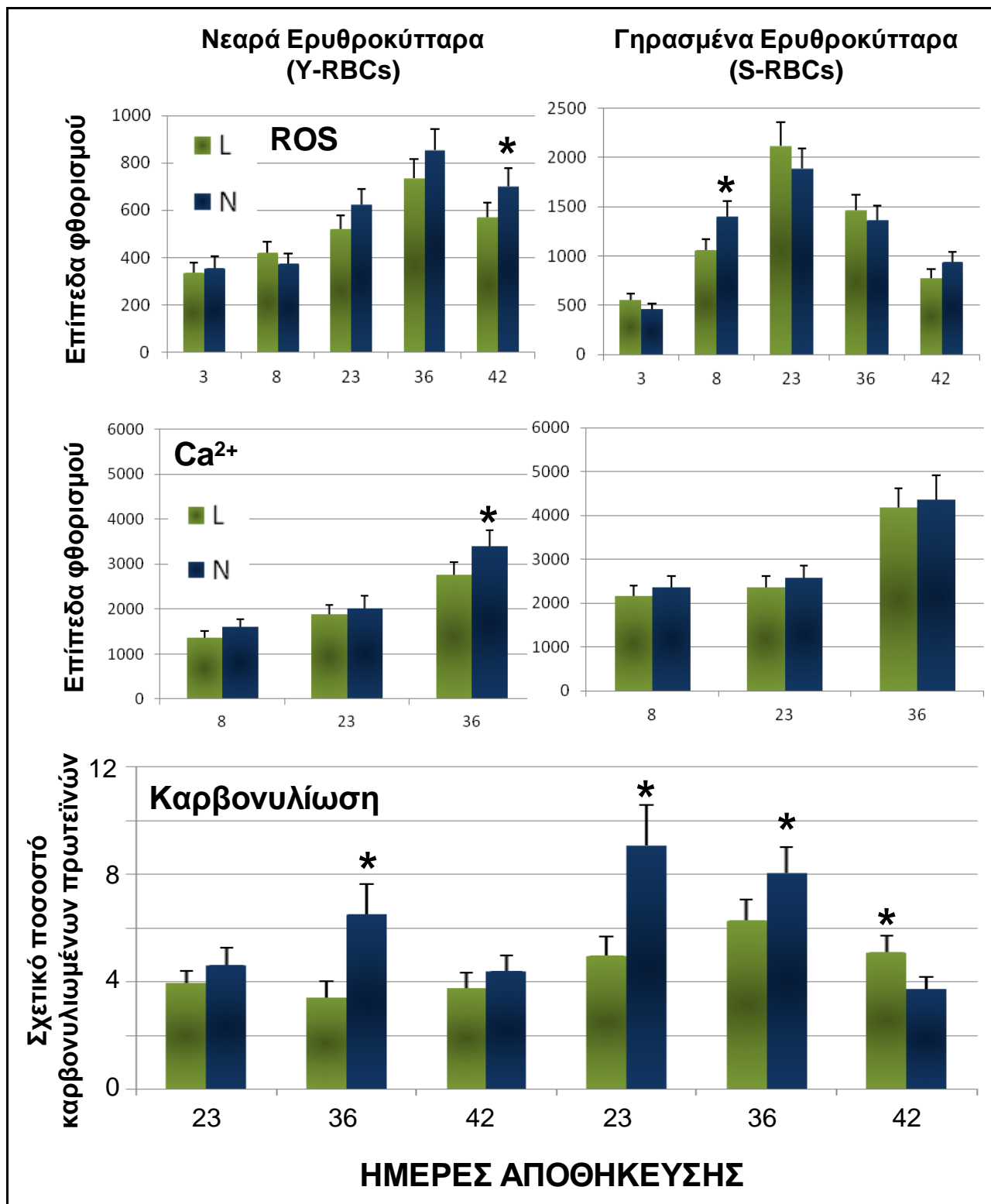
Η μελέτη της εξέλιξης της κυτταρικής γήρανσης πραγματοποιήθηκε μετά από κλασμάτωση ερυθροκυττάρων σε κλίση συγκέντρωσης περκόλης και απομόνωση υποπληθυσμών εμπλουτισμένων σε νεαρά (Y) και γηρασμένα (S) κύτταρα με κριτήριο την κυτταρική πυκνότητα. Καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης και ανεξαρτήτως ομάδας ασκών (λευκαφαιρεμένοι ή μη) τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα χαρακτηρίζονταν από μειωμένα επίπεδα MCV και αυξημένα MCHC (P<0,01) (πίνακας 3). Επιπρόσθετα ο υποπληθυσμός των γηρασμένων ερυθροκυττάρων εμφανίζει στατιστικά σημαντικά (P<0,05) αυξημένα επίπεδα δεικτών γήρανσης όπως το σύμπλοκο σπεκτρίνης-Hb, η οξειδωμένη Hb και οι τροποποιήσεις της ζώνης-3. Τελος και όσον αφορά στη σύγκριση μεταξύ L- και N-μονάδων η παρουσία λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων φαίνεται να επιβαρύνει την εικόνα των ερυθροκυττάρων και κυρίως του υποπληθυσμού νεαρών RBCs όπως φαίνεται στον πίνακα 3 (P<0,05).

<b>ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ</b>								
	<b>L-RBCs ΗΜΕΡΑ 8</b>		<b>N-RBCs ΗΜΕΡΑ 8</b>		<b>L-RBCs ΗΜΕΡΑ 36</b>		<b>N-RBCs ΗΜΕΡΑ 36</b>	
	<b>Y-RBCs</b>	<b>S-RBCs</b>	<b>Y-RBCs</b>	<b>S-RBCs</b>	<b>Y-RBCs</b>	<b>S-RBCs</b>	<b>Y-RBCs</b>	<b>S-RBCs</b>
<b>Λευκοκύτταρα (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	n.d.	n.d.	0,1±0,0	0,1±0,1	0,1±0,0
<b>MCV (fL)</b>	98,6±2,2 <sup>§*</sup>	82,1±1,8 <sup>§</sup>	94,3±1,7 <sup>§*</sup>	82,1±2,5 <sup>§</sup>	96,8±2,3 <sup>§*</sup>	85,9±1,7 <sup>§</sup>	91,5±2,8 <sup>§*</sup>	83,2±1,3 <sup>§</sup>
<b>MCH (pg)</b>	29,4±0,5 <sup>§*</sup>	31,3±0,3 <sup>§*</sup>	27,9±0,8*	29,7±1,1*	30,3±0,3 <sup>§*</sup>	32,1±0,5 <sup>§*</sup>	26,8±1,4 <sup>§*</sup>	30,3±0,9 <sup>§*</sup>
<b>MCHC (g/dL)</b>	29,8±0,4 <sup>§</sup>	38,1±0,5 <sup>§*</sup>	29,5±0,3 <sup>§</sup>	36,2±0,6 <sup>§*</sup>	31,3±0,6 <sup>§*</sup>	37,2±0,7 <sup>§</sup>	29,3±0,5 <sup>§*</sup>	36,4±0,6 <sup>§</sup>
<b>RDW-CV (%)</b>	13,3±0,6	14,5±0,7	13,1±0,5	14,1±0,5	12,3±0,7	13,1±0,6	11,7±0,6	12,5±0,4
<b>Σύμπλοκο σπεκτρίνης-Hb<sup>b</sup></b>	1,0±0,2 <sup>§*</sup>	17±1,8 <sup>§</sup>	9,6±2,3 <sup>§*</sup>	19,4±3,5 <sup>§</sup>	64,8±9,2 <sup>§*</sup>	103,5±16,7 <sup>§*</sup>	97,8±12,3 <sup>§*</sup>	188±25,6 <sup>§*</sup>
<b>Οξειδωμένη Hb<sup>b</sup></b>	1,0±0,2 <sup>§*</sup>	2,4±0,4*	2,4±0,4 <sup>§*</sup>	3,9±0,5*	5,6±0,8 <sup>§*</sup>	8,9±1,1*	10,0±2,1 <sup>§*</sup>	14,5±1,9*
<b>Τροποποιήσεις ζώνης-3<sup>b</sup></b>	1,0±0,2 <sup>§</sup>	3,3±0,5*	1,0±0,3 <sup>§</sup>	2,3±0,4*	4,9±0,9 <sup>§*</sup>	11,9±1,8	9,7±1,5 <sup>§*</sup>	15,8±2,5

**Πίνακας 3:** Ανάλυση των υποπληθυσμών νεαρών και γηρασμένων ερυθροκυττάρων σε L- και N- μονάδες. Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών μεταβολών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε μονάδες μετάγγισης. (\*): p<0,05 L-RBCs έναντι N-RBCs, (°) p<0,05 Y-RBCs έναντι S-RBCs, (nd): μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, (b): κανονικοποίηση ως προς τις τιμές της ημέρας 8 των L-RBCs. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση.

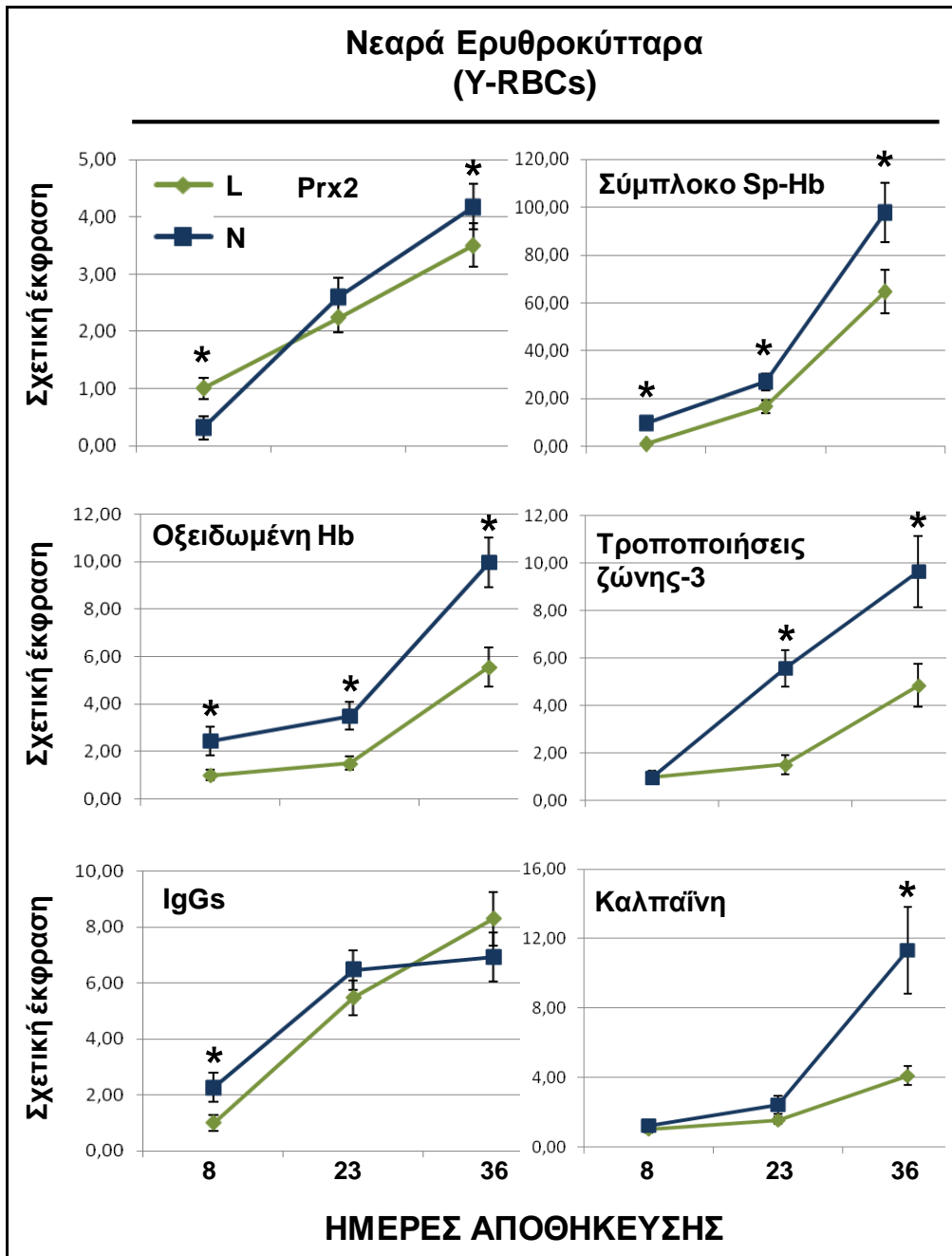
Ακολουθώντας τα δείγματα ελέγχθηκαν για δείκτες οξειδωτικής επιβάρυνσης, ομοιόστασης ασβεστίου και πρωτεϊνικού στρες. Σχεδόν σε κάθε χρονική περίοδο της αποθήκευσης τα γηρασμένα RBCs εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ROS, ενδοκυττάρου ασβεστίου και καρβονυλίωσης μεμβρανικών πρωτεϊνών (διάγραμμα 6). Εντούτοις πολύ συγκεκριμένες διαφορές αναδεικνύονται στατιστικά σημαντικές ανάμεσα σε N- και L- δείγματα (είτε συγκρίνονται γηρασμένα είτε νεαρά RBCs). Πιο συγκεκριμένα οι ενεργές ρίζες οξυγόνου παρουσιάζουν μία σχετικά σταθερή τάση για αυξημένα επίπεδα στα N-δείγματα και στους δύο υποπληθυσμούς ερυθροκυττάρων (γηρασμένα-νεαρά) με τις διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές (P<0,05) στο τέλος (Y-RBCs) ή την αρχή της αποθήκευσης (S-RBCs). Παρόμοια είναι και η εικόνα των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου καθώς N-δείγματα καταλήγουν με σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στα νεαρά ερυθροκύτταρα την ημέρα 42. Αντίθετα ο δείκτης καρβονυλίωσης ήταν αυξημένος (ιδιαίτερα στο γηρασμένο υποπληθυσμό) στα μη λευκαφαιρεμένα δείγματα σε ποικίλες

χρονικές περιόδους από το μέσο της αποθήκευσης και μετά με την εικόνα να αντιστρέφεται την 42<sup>η</sup> ημέρα.



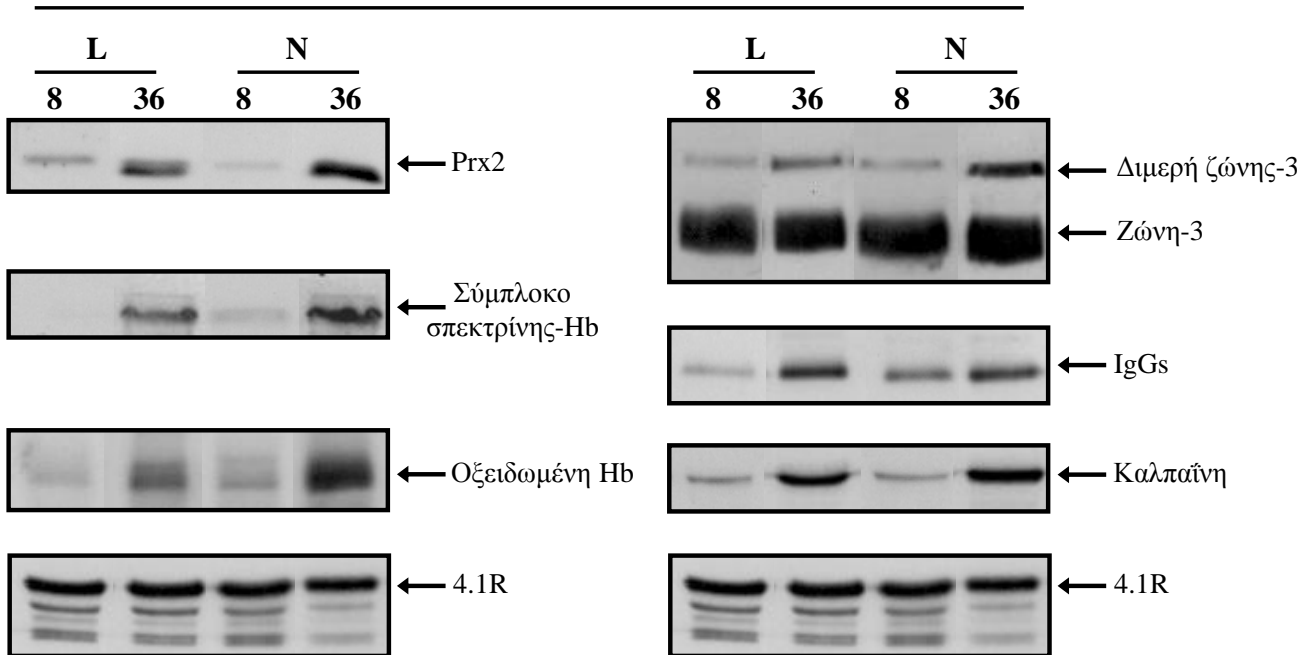
Διάγραμμα 6: Απεικόνιση των επιπέδων ROS, ενδοκυττάριου ασβεστίου και καρβονυλίωσης πρωτεϊνών της μεμβράνης για τις δύο ομάδες ασκών μετάγγισης (L- και N-) και τους δύο υποπληθυσμούς κυττάρων (Y- και S- RBCs). (\*): Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε L- και N- RBCs, γραμμές σφάλματος: τυπική απόκλιση.

Τέλος, εστιάζοντας μόνο στον υποπληθυσμό των νεαρών RBCs, πέραν της τάσης για αυξημένα επίπεδα ROS, Ca<sup>2+</sup> και καρβονυλίωσης στα N-δείγματα εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές σε δείκτες πρωτεϊνικού στρες όπως οι τροποποιήσεις της ζώνης-3, η καλπαΐνη, τα ολιγομερή Hb, η συμπλοκοποίηση σπεκτρίνης-Hb, η πρόσδεση IgGs και η υπεροξειδοζίνη (διάγραμμα 7 και εικόνα 22). Όλοι οι προαναφερθέντες δείκτες εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά (P<0,05) αυξημένα επίπεδα στις N-μονάδες είτε καθόλη (οξειδωμένη Hb) την αποθήκευση είτε σε μέρος αυτής (καλπαΐνη, Prx2).



**Διάγραμμα 7:** Γραφική απεικόνιση των επιπέδων επιλεγμένων δεικτών πρωτεϊνικού στρες για τις δύο ομάδες ασκών μετάγγισης (L- και N-) μόνο στον υποπληθυσμό των νεαρών ερυθροκυττάρων (Y- και S- RBCs). (\*): Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε L- και N- RBCs, γραμμές σφάλματος: τυπική απόκλιση. Τα αποτελέσματα έχουν κανονικοποιηθεί ως προς την τιμή των L-δειγμάτων της 8<sup>ης</sup> ημέρας.

## ΝΕΑΡΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ



Εικόνα 22: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοεντόπισης μετά από διαδικασία Western για τις πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν στον υποπληθυσμό των νεαρών ερυθροκυττάρων. Παρουσιάζονται ζώνες για την αρχή (ημέρα 8) και το τέλος (ημέρα 36) της αποθηκευτικής περιόδου τόσο στα L- όσο και στα N- δείγματα. Η πρωτεΐνη 4.1R που βρίσκεται στη βάση της εικόνας χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας του πειράματος ανοσοεντόπισης για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

## **Γ2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ ΕΓΓΕΝΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΣΕ ΥΓΙΕΙΣ ΑΙΜΟΔΟΤΕΣ *in vivo* και *ex vivo* (Donor Variation)**

Για τη μελέτη σε προ-αποθηκευτικό επίπεδο (*in vivo*) χρησιμοποιήθηκε φλεβικό αίμα από **137 άρρενες υγιείς αιμοδότες** ηλικίας 18-25 ετών οι οποίοι πληρούσαν τα κριτήρια αιμοδοσίας (Hb>13,5 g/dL). Αντίστοιχα για την *ex vivo* ανάλυση και τη σύνδεση προ-αποθηκευτικής και αποθηκευτικής εικόνας των ερυθροκυττάρων του αιμοδότη χρησιμοποιήθηκαν **10 λευκαφαιρεμένες μονάδες μετάγγισης** (υγιείς μη καπνιστές αιμοδότες ηλικίας 20-27 ετών, Hb>13,5 g/dL). Τα πακεταρισμένα ερυθροκύτταρα αποθηκεύτηκαν σε μονάδες μετάγγισης που περιείχαν αντιπηκτικό διάλυμα CPD και πρόσθετο διάλυμα συντήρησης SAGM για μία περίοδο 42 ημερών σε θερμοκρασία 4°C. Όσον αφορά στον έλεγχο της αποθηκευτικής βλάβης εντός της μονάδας μετάγγισης προϊόντος του χρόνου πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε εβδομαδιαία βάση κάτω από άσηπτες συνθήκες. Για την αφαίρεση πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων από τις μονάδες μετάγγισης χρησιμοποιήθηκαν βελόνες μεγάλης διαμέτρου (19G) έτσι ώστε να αποφευχθεί πιθανός τραυματισμός ή λύση των κυττάρων.

### **Γ2.1. Προ-αποθηκευτική Εικόνα Αιμοδοτών (*in vivo*)**

#### **Γ2.1.1. Αιματολογικό Πρότυπο και Βιοχημικά Χαρακτηριστικά**

Όπως αναμενόταν, η πλειονότητα των υγιών αιμοδοτών εμφανίζει φυσιολογικές τιμές στις περισσότερες από τις αιματολογικές παραμέτρους που εξετάστηκαν. Ωστόσο, το 29% των ατόμων που ελέγχθηκαν παρουσιάζει μη φυσιολογικές τιμές MCH, ενώ το 14% και το 18% είχαν αυξημένα επίπεδα λευκών και ερυθρών αιμοσφαιρίων αντίστοιχα (πίνακας 4). Στα υπόλοιπα αιματολογικά χαρακτηριστικά το ποσοστό εθελοντών με τιμές εκτός ορίων δεν ξεπέρασε το 10%.

<b>ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ (N=137)</b>					
	<b>ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ</b>	<b>ΔΟΤΕΣ**</b>	<b>ΕΥΡΟΣ</b>	<b>%↑*</b>	<b>%↓*</b>
<b>Λευκοκύτταρα (10<sup>3</sup>/μL )</b>	4,0-9,0	6,07 ± 1,6	3,7-13,0	14	2
<b>Ερυθροκύτταρα (10<sup>6</sup>/μL )</b>	3,8-5,3	4,8 ± 0,6	4,1-6,4	18	0
<b>Αιμοσφαιρίνη (g/dL)</b>	12-18	15,4 ± 1,6	11,8-17,4	0	1
<b>Αιματοκρίτης (%)</b>	36-56	43,6 ± 2,2	37,3-52,6	0	0
<b>MCV (fL)</b>	80-100	91 ± 8	60-102	1	7
<b>MCH (pg)</b>	27-32	29,6 ± 2,7	19,6-35,7	16	13
<b>MCHC (g/dL)</b>	32-36	33,2 ± 0,9	29,9-36,2	2	5
<b>RDW (%)</b>	10,0-16,5	13,5 ± 1,3	11,2-14,8	0	0
<b>Αιμοπετάλια (10<sup>3</sup>/μL )</b>	120-380	227 ± 37	151-467	1	0

Πίνακας 4: Αιματολογικά χαρακτηριστικά υγιών αιμοδοτών. (\*): ποσοστό αιμοδοτών με τιμές εκτός φυσιολογικών ορίων (αυξημένη ή μειωμένα). (\*\*): τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση.



Για τη βιοχημική ανάλυση του ορού μετρήθηκαν είκοσι πέντε παράμετροι. Με την εξαίρεση της χοληστερόλης, του ουρικού οξέως, της LDL, του σιδήρου και των τριγλυκεριδίων, το βιοχημικό πρότυπο των δοτών ήταν εντός του φυσιολογικού εύρους (πίνακας 5). Πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα χοληστερόλης, LDL και τριγλυκεριδίων βρέθηκαν αυξημένα σε σημαντικό ποσοστό επί του συνόλου του εξεταζόμενου δείγματος (37%, 26% και 10% αντίστοιχα). Επιπλέον, αρκετά υψηλά ποσοστά τόσο ουρικού οξέως όσο και σιδήρου ανιχνεύθηκαν σε ένα σημαντικό ποσοστό του εξεταζόμενου πληθυσμού (35% και 25%, αντίστοιχα). Πολύ μικρός αριθμός ατόμων (<5%) χαρακτηρίστηκε από παθολογικές τιμές σε αρκετές από τις υπόλοιπες παραμέτρους που εξετάστηκαν.

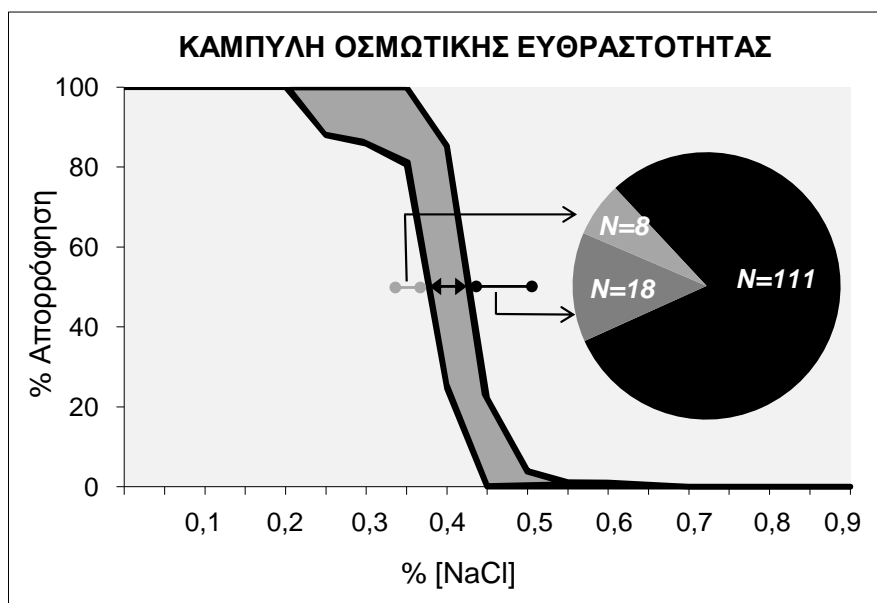
<b>ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ (N=137)</b>					
	<b>ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ</b>	<b>ΔΟΤΕΣ**</b>	<b>ΕΥΡΟΣ</b>	<b>%↑*</b>	<b>%↓*</b>
Χοληστερόλη(mg/dL)	140-199	182 ± 29	113-281	37	3
Ουρικό οξύ (mg/dL)	3,5-7,2	6,6 ± 0,9	4,2-9,3	35	0
LDL (mg/dL)	<130	108 ± 25	42-169	26	0
Σίδηρος (mg/dL)	35-150	132 ± 19	50-189	25	0
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	10-150	102 ± 23	41-434	10	0
VLDL (mg/dL)	8-40	26 ± 11	8-87	7	0
AST/SGOT (U/L)	5-40	24 ± 14	14-144	7	0
Ασβέστιο (mg/dL)	8,6-10,0	9,3 ± 0,5	9,0-11,2	5	0
Νάτριο (mmol/L)	135-145	139 ± 2	135-148	4	0
Κάλιο (mmol/L)	3,6-5,1	4,5 ± 0,5	3,6-5,3	3	0
HDL (mg/dL)	37-70	58 ± 12	36-79	3	1
HDL/LDL	1,00	0,42 ± 0,11	0,25-1,08	3	0
γGT (U/L)	5-85	33 ± 16	6-78	2	0
Κρεατινίνη (mg/dL)	0,31-1,11	0,68 ± 0,13	0,02-1,40	1	1
ALT/SGPT (U/L)	7-56	22 ± 9	7-63	1	0
Ολικές πρωτεΐνες (mg/dL)	6,4-8,2	7,4 ± 0,7	5,8-9,0	1	5
Αλβουμίνη (mg/dL)	3,5-5,5	4,5 ± 0,2	4,2-5,6	1	0
Κορεσμός τρανσφερίνης (%)	20-50	36 ± 7	19-58	1	2
Τρανσφερίνη (mg/dL)	200-400	297 ± 41	214-398	0	0
Φεριτίνη (ng/mL)	18-270	103 ± 39	35-232	0	0
TIBC (mg/dL)	260-390	317 ± 26	256-387	0	0
Γλυκόζη (mg/dL)	65-110	86 ± 8	59-107	0	1
Ουρία (mg/dL)	10-50	27 ± 9	10-39	0	0
ALP (U/L)	17-142	67 ± 14	33-86	0	0
Φώσφορος (mg/dL)	2,5-4,9	3,1 ± 0,6	2,4-4,4	0	2

Πίνακας 5: Βιοχημική ανάλυση του ορού υγιών αιμοδοτών. (\*): ποσοστό αιμοδοτών με τιμές εκτός φυσιολογικών ορίων (αυξημένη ή μειωμένα). (\*\*): τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση.

### Γ2.1.2. Βιολογικές Μετρήσεις Ερυθροκυττάρων και Πλάσματος

Εκτός των κλαστικών αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων οι αιμοδοτές ελέγχθηκαν για βιολογικούς δείκτες οι οποίοι πιθανόν σχετίζονται με αποθηκευτική βλάβη σε περίπτωση αιμοδότησης σε ασκούς μετάγγισης. Μετρήθηκαν τα επίπεδα οσμωτικής ευθραυστότητας, ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Total Antioxidant Capacity – TAC), μονοξειδίου του αζώτου (NO), ελεύθερης Hb (αυτοαιμόλυση), κλαστερίνης και καρβονυλίωσης πρωτεϊνών του πλάσματος.

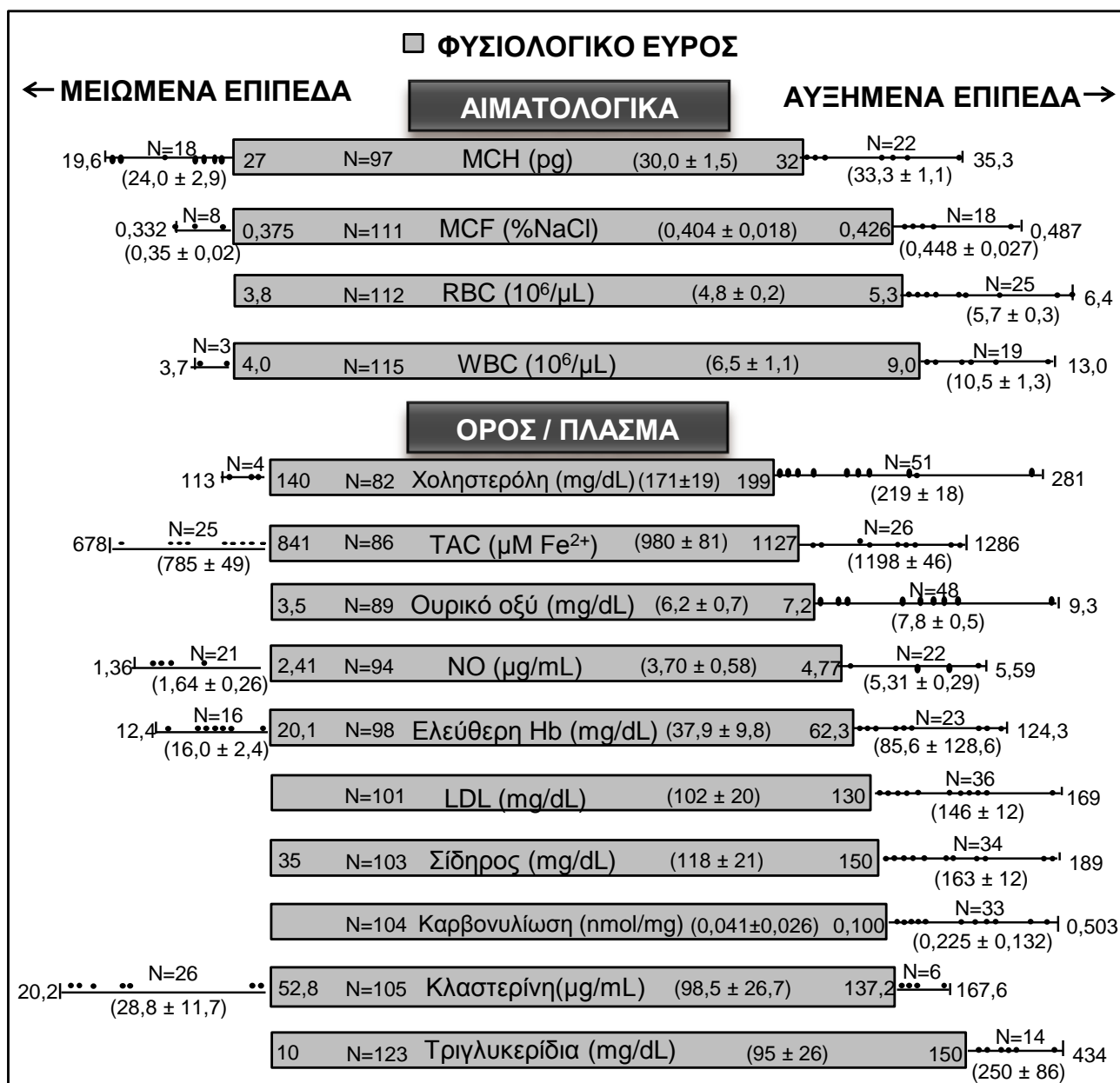
Η δοκιμασία οσμωτικής ευθραυστότητας αποτελεί ένα μέτρο της αντίστασης των ερυθροκυττάρων στην αιμόλυση που προκαλείται λόγω οσμωτικής πίεσης που ασκείται από υποτονικά διαλύματα επώασης. Με βάση το σύνολο των μετρήσεων σχηματίστηκε πρότυπη καμπύλη οσμωτικής ευθραυστότητας η οποία απεικονίζει το ποσοστό θραύσης των ερυθροκυττάρων σε αυξανόμενες τιμές οσμωτικής πίεσης (συγκεντρώσεις NaCl 0–0,9%, υπότονο-ισότονο) (εικόνα 23). Η αιμόλυση φαίνεται να ξεκινά περίπου στο 0,55% [NaCl] και φτάνει σε μέγιστα επίπεδα στο 0,27% [NaCl]. Όσον αφορά στο δείκτη μέσης ερυθροκυτταρικής ευθραυστότητας (Mean Corpuscular Fragility – MCF), που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου που προκαλεί 50% λύση, οι φυσιολογικές τιμές κυμαίνονται μεταξύ 0,375 και 0,426% [NaCl] ενώ το εύρος διακύμανσης αντιστοιχεί σε 0,332 με 0,487% [NaCl]. Αξίζει να σημειωθεί ότι, το 19% των δοτών είτε παρουσίασε υψηλή (N=18) είτε χαμηλή οσμωτική ευθραυστότητα (N=8), σύμφωνα με την εκτίμηση της παραμέτρου MCF.



Εικόνα 23: Καμπύλη οσμωτικής ευθραυστότητας (Osmotic Fragility). Η γκρι περιοχή του γραφήματος υποδεικνύει το εύρος αποδεκτών τιμών ενώ το διπλό βέλος τη φυσιολογική διακύμανση του δείκτη MCF. Μαύρο: αυξημένο MCF – γκρι: μειωμένο MCF).

Αντίστοιχα υψηλά ποσοστά παθολογικών τιμών παρατηρήθηκαν και στις υπόλοιπες βιολογικές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, όπως φαίνεται αναλυτικά στη διαγραμματική παρουσίαση του συνόλου των παραμέτρων με τα μεγαλύτερα ποσοστά τιμών εκτός ορίων που ακολουθεί (εικόνα 24). Πιο συγκεκριμένα εντοπίστηκαν άτομα με διακύμανση εκτός φυσιολογικού

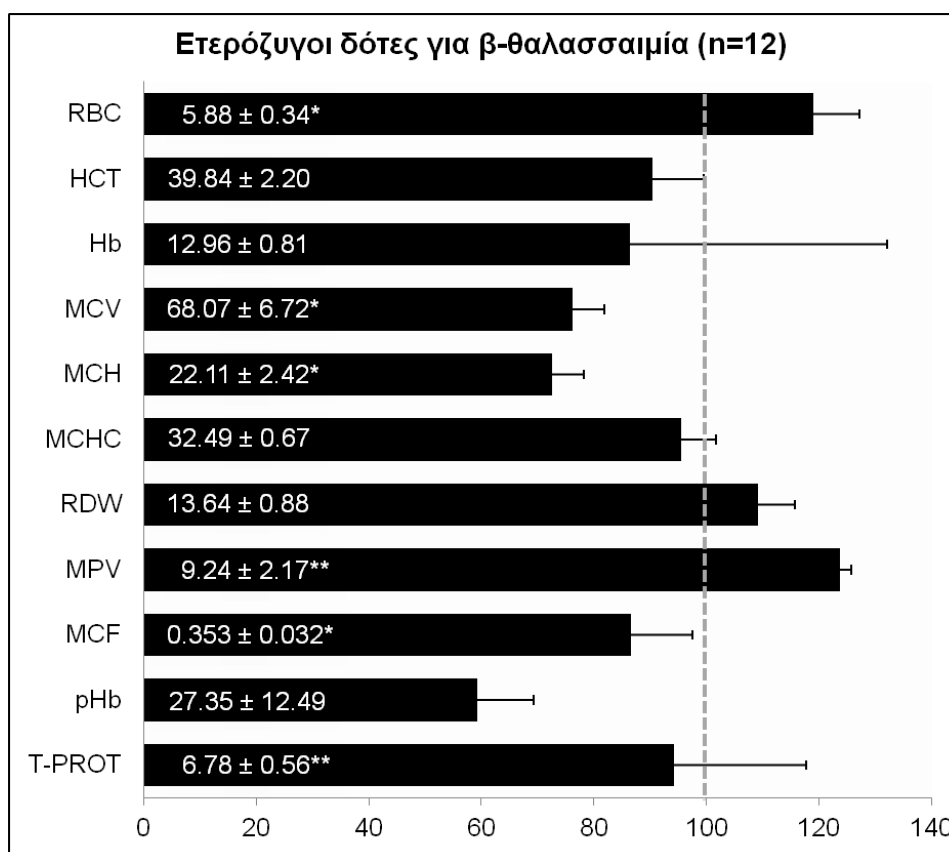
εύρους τιμών σε ποσοστά που κυμάνθηκαν μεταξύ 24 και 37% για τους δείκτες TAC (37%), NO (31%), ελεύθερη Hb (29%), καρβονυλίωση πλάσματος (24%) και κλαστερίνη πλάσματος (23%). Αναλυτική παρουσίαση των μετρήσεων περιλαμβάνεται στην εικόνα 24.



Εικόνα 24: Γραφική απεικόνιση της κατανομής των αιμοδοτών όσον αφορά στις αιματολογικές, βιοχημικές και βιολογικές παραμέτρους στις οποίες εντοπίστηκαν μη φυσιολογικές τιμές (αυξημένες ή μειωμένες κατά 10% σε σχέση με τις ανώτερες ή κατώτερες φυσιολογικές τιμές) σε ποσοστό ατόμων μεγαλύτερο του 10%. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. Γκρι πλαίσια: αριθμός δοτών με φυσιολογικές τιμές, στα άκρα των πλαισίων αναγράφονται οι κατώτερες και ανώτερες φυσιολογικές τιμές, κουκίδες: σχετική κατανομή δοτών με παθολογικές τιμές, στα άκρα των πλευρικών γραμμών δίνονται οι ακρότατες τιμές που ανιχνεύθηκαν στον εξεταζόμενο πληθυσμό.

Ένα μικρό μέρος του πληθυσμού των αιμοδοτών (9%) αντιστοιχούσε σε άτομα ετερόζυγα για β μεσογειακή αναιμία. Οι δότες αυτοί βρέθηκε πως διέφεραν από τον υπόλοιπο εξεταζόμενο

πληθυσμό σε πληθώρα αιματολογικών (κυρίως), βιοχημικών και βιολογικών παραμέτρων (διάγραμμα 8). Οι ετερόζυγοι δότες χαρακτηρίζονταν από στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα απόλυτου αριθμού ερυθροκυττάρων, δείκτη ανισοκυττάρωσης RDW και μέσου όγκου αιμοπεταλίων (MPV) καθώς επίσης και χαμηλότερες τιμές αιματοκρίτη (Hct), μέσου ερυθροκυτταρικού όγκου (MCV), μέσης ποσότητας Hb (MCH), MCF και ελεύθερης Hb (P<0,05). Από τις προαναφερθείσες τιμές αυτές που αντιστοιχούσαν στα RBC, MCV, MCH και MCF κυμαίνονταν σε παθολογικά επίπεδα ενώ τα επίπεδα των MPV και ολικών πρωτεϊνών ορού (T-PROT) ήταν οριακά φυσιολογικά.

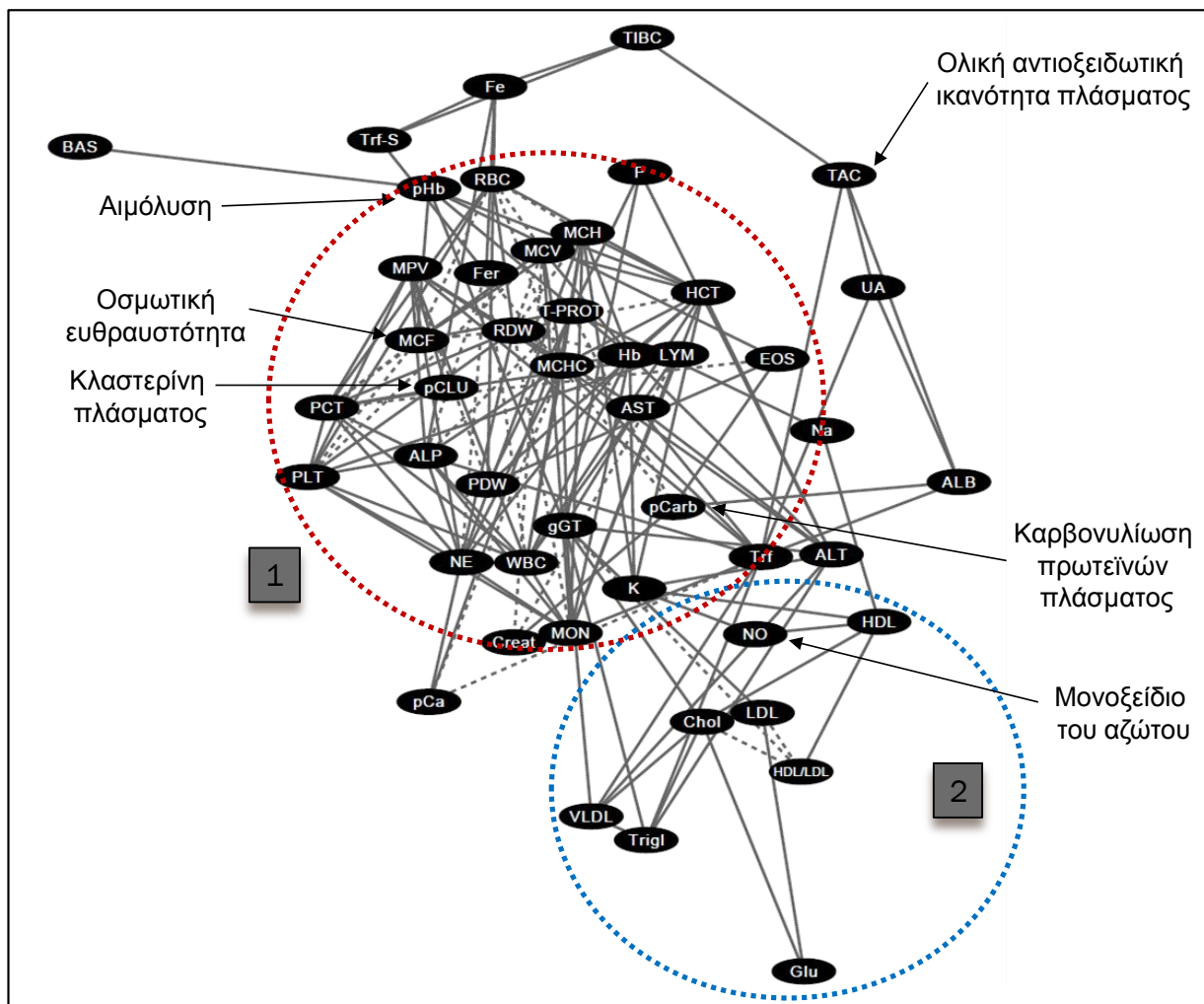


**Διάγραμμα 8:** Παράμετροι με σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε ετερόζυγους και μη δότες για β μεσογειακή αναιμία. Οι μαύρες ράβδοι αντιστοιχούν σε κανονικοποιημένες ως προς τους φυσιολογικούς δότες τιμές (γκρι διάστικτη γραμμή 100%). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. (\*): παθολογικές τιμές, (\*\*): οριακά φυσιολογικές τιμές. Γραμμές σφάλματος: τυπική απόκλιση.

### **Γ2.1.3. Συσχετίσεις Αιματολογικών Παραμέτρων**

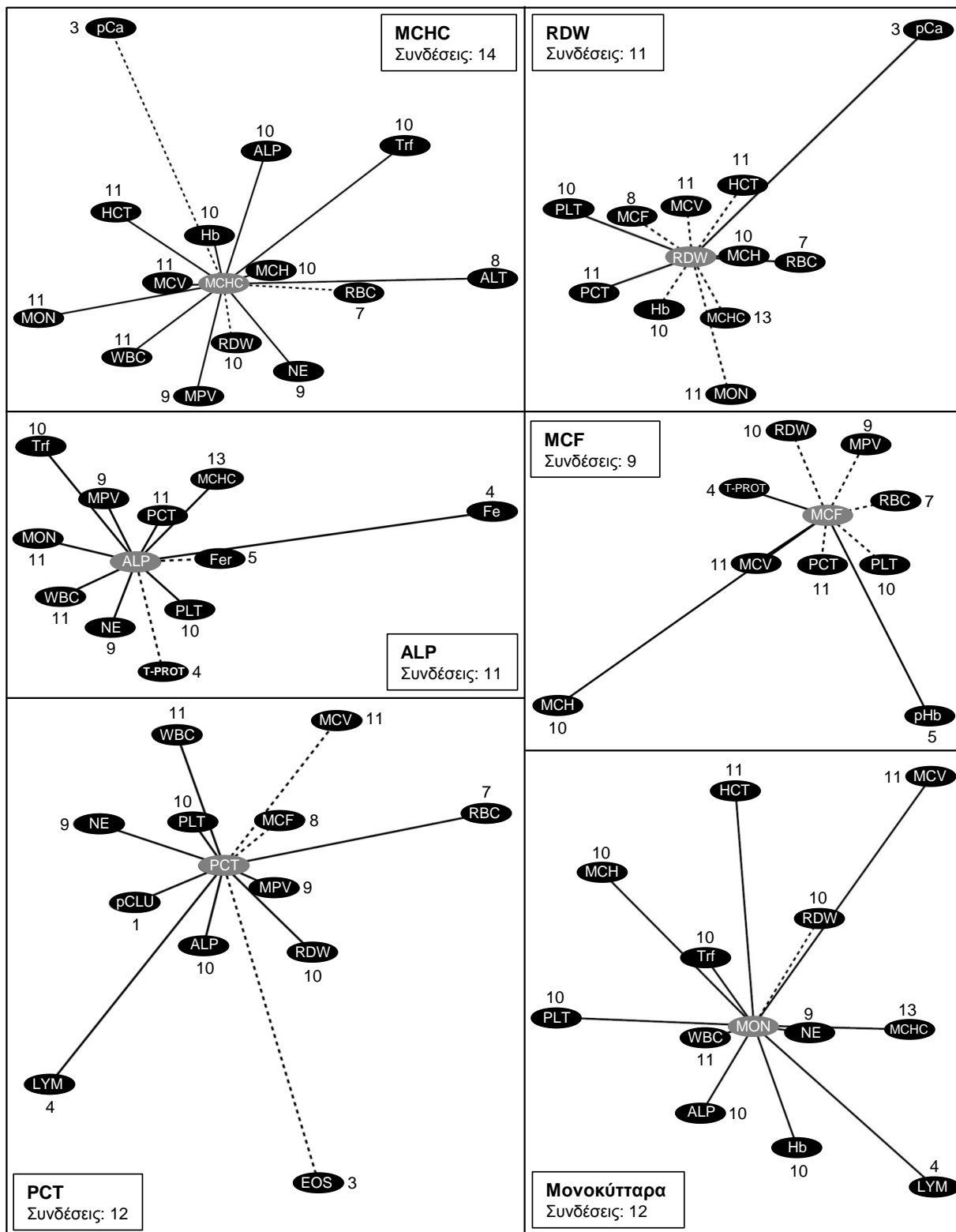
Αφού ολοκληρώθηκαν οι πειραματικές διαδικασίες, και στην προσπάθεια να γίνει κατανοητή η ομολογουμένως πολύπλοκη εικόνα των αιμοδοτών *in vivo*, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για πιθανά στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (βαθμός συσχέτισης κατά Pearson και Spearman για κανονική και μη κατανομή αντίστοιχα) μεταξύ των μεταβλητών που εξετάστηκαν. Οι συσχετίσεις αυτές, με συντελεστή *r* που κυμαίνονταν από 0,252 μέχρι 0,959 (P<0,05), εισήχθησαν στο πρόγραμμα κατασκευής βιολογικών (και όχι μόνο) δικτύων Cytoscape με αποτέλεσμα την τοπολογική απεικόνιση του συνόλου των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις εξεταζόμενες παραμέτρους *in vivo* (εικόνα 25). Για λόγους αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων και για να μειωθεί η πιθανότητα να συμπεριληφθούν στο δίκτυο ψευδώς θετικές συσχετίσεις οι οποίες δεν υπάρχουν *in vivo*

αποκλείστηκαν τιμές  $r < 0,250$ . Κάθε συσχέτιση αντιστοιχεί σε μία γραμμή του αλληλεπιδροσώματος (interactome) με το μήκος της να είναι αντιστρόφως ανάλογο του συντελεστή συσχέτισης. Το δίκτυο είναι μη κεντροποιημένο, με χαμηλή πυκνότητα και παρουσία μεταβλητών με μεγάλο αριθμό συνδέσεων (πολυσυνδέτες) καθώς επίσης και μέσο όρο συνδέσεων ανά μεταβλητή 6,638. Αποτελείται από συστάδες παραμέτρων και μεταβλητές που εντοπίζονται στην περιφέρεια ενώ χαρακτηρίζεται από δύο βασικές περιοχές, εκ των οποίων η πρώτη (κόκκινος κύκλος εικόνα 25) αντιστοιχεί στον πυρήνα του δικτύου στον οποίο περιέχονται οι βασικές αιματολογικές παράμετροι και η δεύτερη (μπλε κύκλος εικόνα 25) στην ομάδα των λιποπρωτεϊνών. Οι 6 βιολογικές παράμετροι κατατάσσονται σε περιφερειακές (TAC, NO) και κεντρικές (MCF, αιμόλυση, κλαστερίνη πλάσματος, καρβονυλίωση πρωτεϊνών πλάσματος). Από τις περιφερειακές το NO συνδέεται μόνο με δύο παραμέτρους ( $K^+$  και HDL) και εντοπίζεται στην περιοχή των λιποπρωτεϊνών ενώ το TAC με δείκτες ομοιόστασης σιδήρου και το ουρικό οξύ). Οι τέσσερις υπόλοιπες μεταβλητές ανήκουν στον πυρήνα του δικτύου και αλληλεπιδρούν με βασικές αιματολογικές και βιοχημικές παραμέτρους.



**Εικόνα 25:** Δίκτυο αλληλοσυσχέτισης αιματολογικών παραμέτρων *in vivo*. Κάθε σύνδεση απεικονίζει μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $r > 0,250$ ,  $P < 0,05$ ). Συνεχείς και διάστικτες γραμμές: θετικές και αρνητικές συσχετίσεις αντίστοιχα. Κόκκινος κύκλος υπ' αριθμόν 1: πυρήνας δικτύου, μπλε κύκλος υπ' αριθμόν 2: ομάδα λιποπρωτεϊνών. p: πλάσμα, Trig1: τριγλυκερίδια, Col: χοληστερόλη, Glu: γλυκόζη, Creat: κρεατινίνη, pCarb: καρβονυλίωση πρωτεϊνών πλάσματος, T-PROT: ολικές πρωτεΐνες ορού, ALB: αλβουμίνη, Trf: τρανσφερίνη, Trf-S: κορεσμός τρανσφερίνης, Fer: φερριτίνη.

Ένα άλλο βασικό χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου αλληλεπιδροσώματος είναι το γεγονός ότι περιέχει πολλές μεταβλητές με χαμηλή συνδεσιμότητα (NO: 2 συνδέσεις, λεμφοκύτταρα: 5 συνδέσεις) αλλά και αρκετές με μεγάλο αριθμό συνδέσεων (>9) (εικόνα 26).



Εικόνα 26: Παράμετροι με μεγάλο αριθμό συνδέσεων (πολυσυνδέτες – γκρι χρώμα). Συνεχείς και διάστικτες συνδέσεις: θετικές και αρνητικές συσχετίσεις αντίστοιχα. Οι αριθμοί που συνοδεύουν κάθε παράμετρο αντιστοιχούν στις περαιτέρω συνδέσεις της συγκεκριμένης μεταβλητής στο αρχικό δίκτυο *in vivo*.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα πολυσυνδεδετών αποτελούν οι μεταβλητές MCHC (14 συνδέσεις), Hct (12), PCT (12), τα μονοκύτταρα (12), WBC (12), Hb (11), MCH (11), MCV (11), RDW (11), PLT (11), MPV (11), ALP (11), η τρανσφερίνη (11), τα ουδετερόφιλα (10), MCF (9), ALT (9) και  $\gamma$ GT (9). Κύριος συνδέτης αναδεικνύεται ο MCHC ο οποίος σχετίζεται (όπως ήταν αναμενόμενο) με ερυθροκυτταρικούς δείκτες (Hb, MCV, κ.α.) καθώς επίσης και δείκτες των υπόλοιπων κυτταρικών πληθυσμών του αίματος (WBC και PLT). Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και για το δείκτη RDW ο οποίος συνδέεται με τόσο με τα ερυθροκύτταρα όσο και με τα μονοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Από τις βιολογικές παραμέτρους, το MCF δημιουργεί ομάδα με τα RBC, MCV, MCH και RDW καθώς επίσης και με την αιμόλυση και αιμοπεταλιακούς δείκτες. Το 30 με 50% των συνδέσεων των μεταβλητών PCT και μονοκύτταρα αντίστοιχα σχετίζεται με ερυθροκυτταρικούς δείκτες. Τέλος μεταξύ των βιοχημικών παραμέτρων η ALP εμφάνισε τις περισσότερες συσχετίσεις (ομοιόσταση σιδήρου – δείκτες όλων των κυτταρικών πληθυσμών).

## **Γ2.2. Αποθηκευτική Εικόνα Ερυθροκυττάρων (*ex vivo*)**

### **Γ2.2.1. Χρονοεξαρτώμενη Ανάλυση**

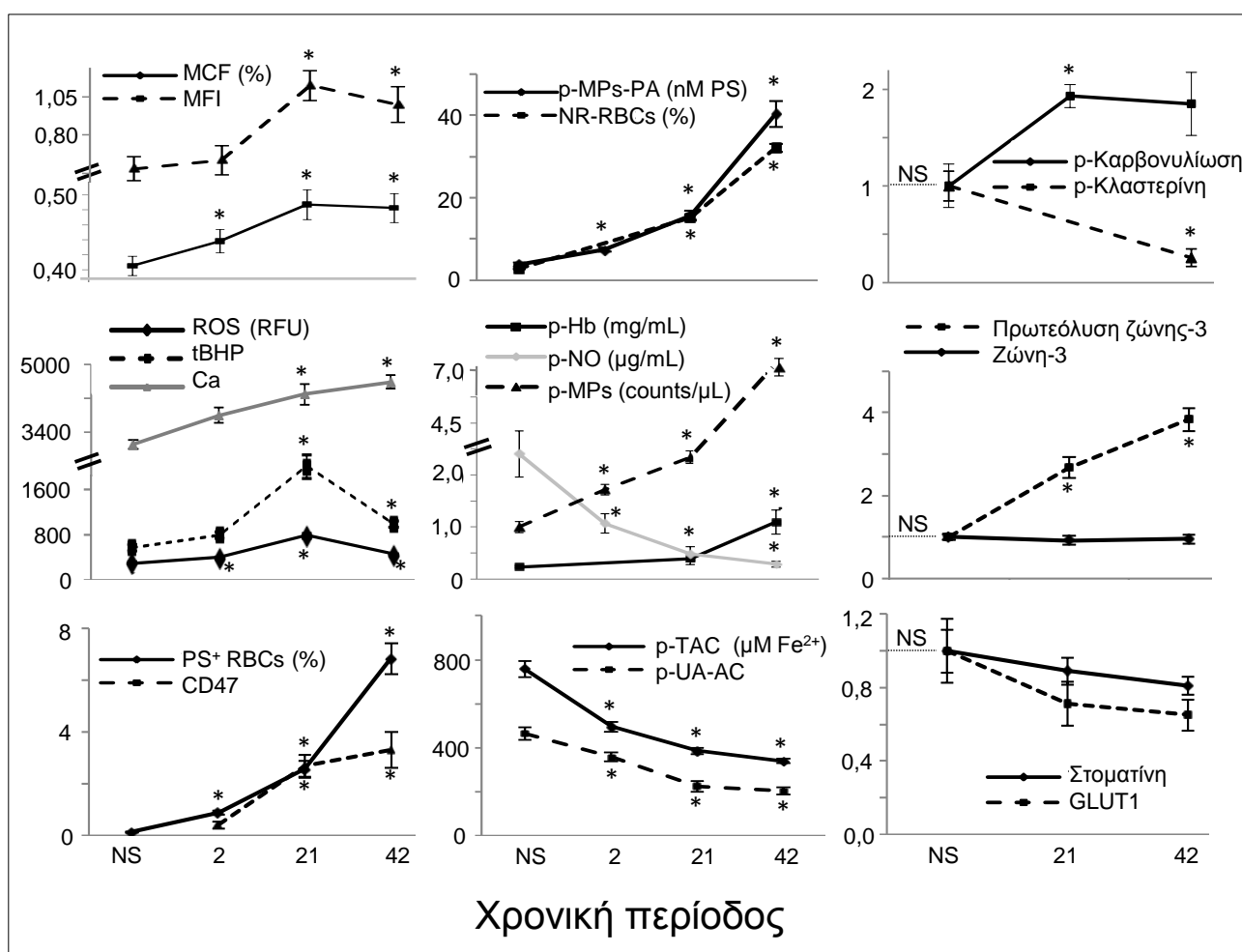
Με δεδομένο ότι η διάρκεια της αποθήκευσης θεωρείται ένας από τους βασικότερους παράγοντες που επηρεάζει την δομική και λειτουργική ακεραιότητα των ερυθροκυττάρων επηρεάζοντας τα επίπεδα αποθηκευτικής βλάβης, οι αιμοδοτές ελέγχθηκαν για μία πληθώρα βιολογικών παραμέτρων τόσο πριν (NS) όσο και κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε ασκούς μετάγγισης. Όσον αφορά στο υπερκείμενο των μονάδων (αντίστοιχα πλάσμα στην NS συνθήκη) παρατηρήθηκε σταδιακή χρονοεξαρτώμενη αύξηση της αιμόλυσης, των παραγόμενων μικροκυστιδίων και των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών καθώς επίσης και μείωση των επιπέδων μονοξειδίου του αζώτου, της κλαστερίνης και της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε σύγκριση τόσο με τα προ-αποθηκευτικά επίπεδα όσο και με τα πρώιμα στάδια της αποθηκευτικής περιόδου ( $P < 0,05$ ) (πίνακας 6). Πιο συγκεκριμένα την 42<sup>η</sup> ημέρα της αποθήκευσης οι τιμές των παραπάνω παραμέτρων είχαν μεταβληθεί σε σχέση με τα NS επίπεδα με βάση το ακόλουθο πρότυπο: ελεύθερη Hb (αύξηση 4,7 φορές), μικροκυστιδία (αύξηση 10 φορές), καρβονυλίωση (διπλασιασμός), NO (90% μείωση), κλαστερίνη (75% μείωση) και αντιοξειδωτική ικανότητα (υποδιπλασιασμός). Σημαντικές ερυθροκυτταρικές παράμετροι όπως η οσμωτική και μηχανική ευθραυστότητα καθώς επίσης και η σφαιροεχينوκυττάρωση (αύξηση 11 φορές) εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σύγκριση με τα *in vivo* επίπεδα από το μέσο της αποθήκευσης και μετά ( $P < 0,05$ ). Η ενδοκυττάρια συσσώρευση ROS και  $Ca^{2+}$  παρουσίασε μεγάλη αύξηση έως το μέσο της αποθήκευσης ενώ η GSH μειώθηκε στο 60% της αρχικής της τιμής. Επιπλέον ανιχνεύθηκε ιδιαίτερα μεγάλη αύξηση (56 φορές) εξωτερίκευσης PS στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων. Τέλος η πρωτεϊνική ανάλυση της μεμβράνης επιβεβαίωσε την αναδιάρθρωση που πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Τα ερυθροκύτταρα χαρακτηρίζονται από στατιστικά σημαντική ( $P < 0,05$ ) συσσώρευση (σε σχέση με τα NS δείγματα) δεικτών οξειδωτικού (πρόσδεση Prx2, αύξηση 17 φορές), μεταβολικού (πρόσδεση GAPDH, αύξηση 6 φορές) και πρωτεϊνικού στρες (πρόσδεση Hsp70, αύξηση 2 φορές και τροποποίηση ζώνης-3, αύξηση 4 φορές). Επιπλέον εντοπίστηκαν αυξημένοι δείκτες στρες ασβεστίου (καλπαΐνη, αύξηση 4 φορές) και γήρανσης (σύμπλοκο σπεκτρίνης-Hb, αύξηση 7 φορές). Αντίθετα υπήρξε τάση μείωσης για το μεταφορέα γλυκόζης (GLUT1), τη φλοτιλλίνη και τη στοματίνη. Φτάνοντας στο τέλος της αποθήκευσης η πλειονότητα των δεικτών που εξετάστηκαν εμφάνισε παθολογικές τιμές.



ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ	ΗΜΕΡΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ			
	NS	ΗΜΕΡΑ 2	ΗΜΕΡΑ 21	ΗΜΕΡΑ 42
<b>Πλάσμα/Υπερκείμενο</b>				
Ελεύθερη Hb (mg/mL)	0,17 ± 0,03	N/D	0,29 ± 0,04*	0,94 ± 0,50* <sup>†</sup>
Αιμόλυση (%)	N/D	N/D	0,096 ± 0,016	0,391 ± 0,210 <sup>†</sup>
Μονοξειδίο αζώτου (μg/mL)	2,55 ± 1,22	1,10 ± 0,54*	<b>0,52 ± 0,40*<sup>†</sup></b>	<b>0,31 ± 0,15*</b>
Αντιοξειδωτική ικανότητα (μM Fe <sup>2+</sup> )	758 ± 98	495 ± 64*	<b>385 ± 36*<sup>†</sup></b>	<b>340 ± 27*<sup>†</sup></b>
Ενεργότητα ουρικού (μM Fe <sup>2+</sup> )	465 ± 78	358 ± 53*	<b>224 ± 60*<sup>†</sup></b>	<b>203 ± 42*</b>
Καρβονυλίωση (nmol/mg)	0,087 ± 0,039	N/D	<b>0,182 ± 0,033*</b>	<b>0,178 ± 0,053*</b>
Κλαστερίνη (μg/mL)	62645 ± 27856	N/D	N/D	<b>12536 ± 8635*</b>
Κυστίδια (counts/μL)	6762 ± 2125	9349 ± 1318*	13484 ± 2157* <sup>†</sup>	37293 ± 6507* <sup>†</sup>
Θρομβωτική ικανότητα κυστιδίων (nM PS)	4,25 ± 1,51	7,39 ± 1,06*	<b>15,76 ± 3,02*<sup>†</sup></b>	<b>40,33 ± 8,38*<sup>†</sup></b>
<b>Ερυθροκύτταρα</b>				
Οσμωτική ευθραυστότητα (%NaCl)	0,414 ± 0,038	0,449 ± 0,045*	<b>0,495 ± 0,058*<sup>†</sup></b>	<b>0,490 ± 0,056*</b>
Μηχανική ευθραυστότητα	0,540 ± 0,153	0,650 ± 0,201	<b>0,986 ± 0,217*<sup>†</sup></b>	0,893 ± 0,262*
Ενεργές ρίζες O <sub>2</sub> (RFU)	278 ± 35	<b>361 ± 42*</b>	<b>703 ± 80*<sup>†</sup> (D14)</b>	<b>409 ± 51*<sup>†</sup></b>
Εξογενώς επαγόμενα ROS (RFU)	515 ± 123	720 ± 144	<b>1782 ± 497*<sup>†</sup></b>	<b>881 ± 133*<sup>†</sup></b>
Γλουταθειόνη (μM)	605 ± 43	N/D	485 ± 61	<b>366 ± 41*<sup>†</sup></b>
Ασβέστιο (RFU)	3070 ± 320	3850 ± 551*	<b>4423 ± 752* (D14)</b>	<b>4759 ± 497*</b>
Σφαιροεχινοκύτταρα (%)	2,8 ± 0,3	N/D	15,2 ± 1,8*	<b>32,1 ± 2,3*<sup>†</sup></b>
Έκθεση PS (%)	0,14 ± 0,04	0,69 ± 0,22*	3,27 ± 1,17* <sup>†</sup>	<b>7,82 ± 1,85*<sup>†</sup></b>
Τροποποιημένη CD47 (%)	2,10 ± 0,62	N/D	2,69 ± 1,08	3,31 ± 1,83
<b>Πρωτεϊνική ανάλυση</b>				
Πρωτεόλυση 4.1	1,00 ± 0,15	N/D	1,45 ± 0,07*	<b>1,67 ± 0,08*<sup>†</sup></b>
Τροποποιήσεις ζώνης-3	1,00 ± 0,19	N/D	<b>3,02 ± 0,75*</b>	<b>4,12 ± 0,90*</b>
Καλπαΐνη	1,00 ± 0,47	N/D	<b>2,05 ± 0,63</b>	<b>4,10 ± 1,88*<sup>†</sup></b>
Κλαστερίνη	1,00 ± 0,34	N/D	1,53 ± 0,46*	1,36 ± 0,45
Φλοτυλλίνη-2	1,00 ± 0,18	N/D	0,90 ± 0,09	<b>0,68 ± 0,12*<sup>†</sup></b>
GAPDH	1,00 ± 0,26	N/D	<b>2,11 ± 0,55*</b>	<b>5,94 ± 1,01*<sup>†</sup></b>
Μεταφορέας γλυκόζης-1	1,00 ± 0,46	N/D	0,71 ± 0,32	0,65 ± 0,22
Hsp70	1,00 ± 0,44	N/D	1,52 ± 0,69	<b>2,24 ± 0,38*<sup>†</sup></b>
Υπεροξειδοξίνη-2	1,00 ± 0,36	N/D	<b>3,31 ± 1,62*</b>	<b>16,75 ± 11,05*<sup>†</sup></b>
Σπεκτρίνη	1,00 ± 0,06	N/D	1,02 ± 0,13	1,15 ± 0,30
Σύμπλοκο σπεκτρίνης-Hb	1,00 ± 0,42	N/D	<b>2,75 ± 1,21*</b>	<b>6,66 ± 2,62*<sup>†</sup></b>
Στοματίνη	1,00 ± 0,31	N/D	0,89 ± 0,20	0,81 ± 0,13

Πίνακας 6: Χρονοεξαρτώμενη ανάλυση πριν και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ασκούς μετάγγισης. (NS): μη αποθηκευμένα δείγματα. (\*): P<0,05 αποθηκευμένα έναντι μη αποθηκευμένων δειγμάτων. (†): P<0,05 έναντι προηγούμενης χρονικής περιόδου αποθήκευσης. N/D: δεν προσδιορίστηκε. Έντονη γραφή: παθολογικές τιμές. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση ενώ οι τιμές της πρωτεϊνικής ανάλυσης έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τα προ-αποθηκευτικά επίπεδα κάθε πρωτεΐνης.

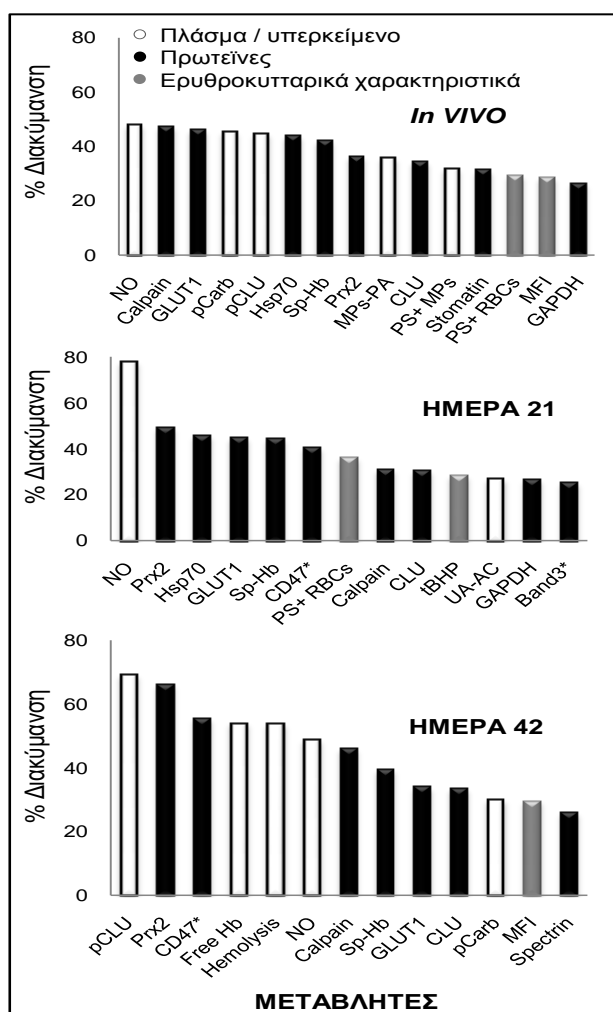
Ομαδοποιώντας τα παραπάνω αποτελέσματα με βάση τη βιολογική τους συνάφεια παρατηρείται πως εντός της μονάδας μετάγγισης τόσο η οσμωτική όσο και η μηχανική ευθραυστότητα ακολουθούν παρόμοιο πρότυπο διακύμανσης (εικόνα 27). Επιπρόσθετα η μεγάλη πτώση μονοξειδίου του αζώτου είναι αντιστρόφως ανάλογη της αύξησης των επιπέδων αιμόλυσης και παραγωγής κυστιδίων ενώ η κατακόρυφη πτώση της κλαστερίνης στο υπερκείμενο συνδυάζεται με αύξηση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών. Αντίστοιχα η πτώση στην ενεργότητα του ουρικού οξέος συμβαδίζει με τη μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του υπερκειμένου ενώ οι τροποποιήσεις στην επιφάνεια της μεμβράνης (εξωτερίκευση PS και τροποποίηση στερεοδιαμόρφωσης της CD47) φαίνεται να μην ακολουθούν κοινό χρονοεξαρτώμενο πρότυπο. Τέλος η θρομβωτική ικανότητα των κυστιδίων (MPs-PA) είναι ευθέως ανάλογη της παρουσίας μη αναστρέψιμων κυττάρων (NR-RBCs).



**Εικόνα 27:** Συγκριτική απεικόνιση βιολογικά συναφών παραμέτρων προϊόντος του χρόνου αποθήκευσης. (p): πλάσμα ή υπερκείμενο. (\*): P<0,05 έναντι μη αποθηκευμένων δειγμάτων. (tBHP): εξωγενώς επαγόμενες ROS. (NR-RBCs): κύτταρα μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης, κυρίως σφαιροεχινοκύτταρα. (MPs-PA): θρομβωτική ικανότητα κυστιδίων. (UA-AC): αντιοξειδωτική ικανότητα ουρικού οξέος. (CD47): τροποποιημένη στερεοδιαμόρφωση. (MFI): δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας ερυθροκυττάρων. Γραμμές σφάλματος: τυπικό σφάλμα.

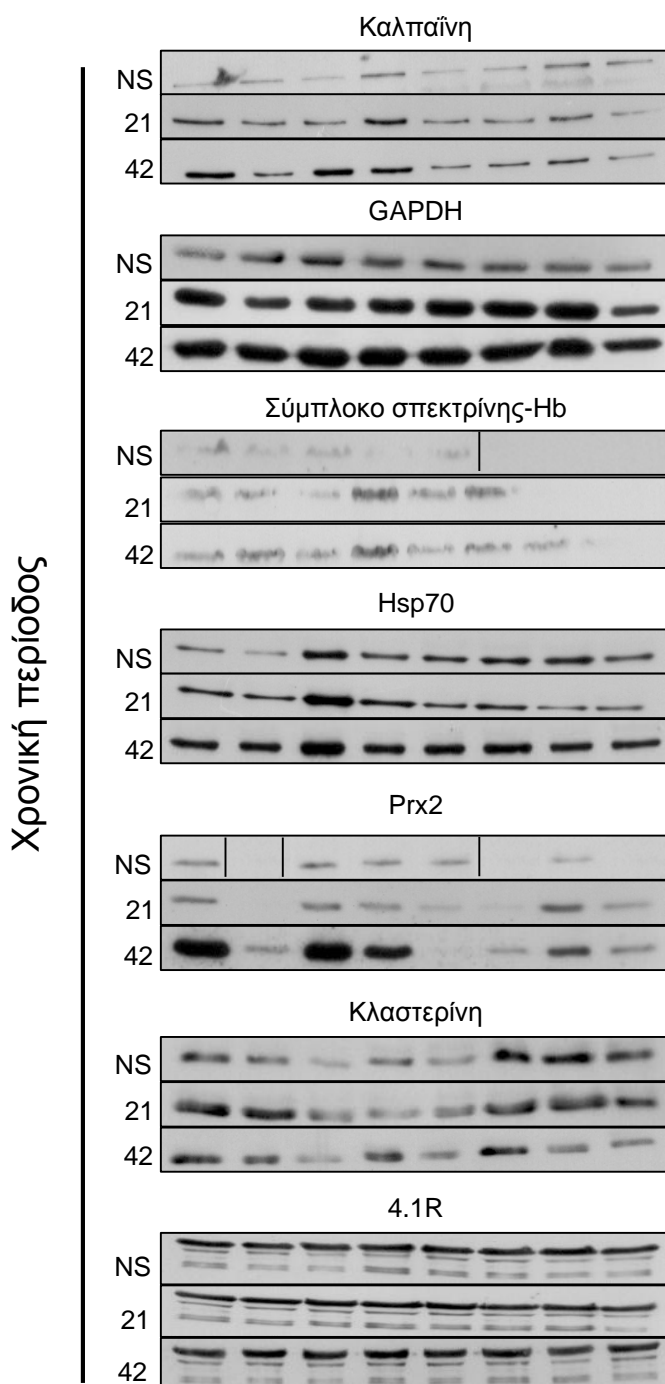
## Γ2.2.2. Διακύμανση Ανάμεσα στους Αιμοδότες

Ένα ιδιαίτερα σημαντικό στοιχείο για την αποσαφήνιση της επίδρασης των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του δότη στην αποθηκευτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων είναι η διακύμανση των εξεταζόμενων παραμέτρων ανάμεσα στους υγιείς αιμοδότες. Σε προαποθηκευτικό επίπεδο, τα υψηλότερα ποσοστά διακύμανσης εντοπίστηκαν σε παραμέτρους του πλάσματος (NO, καρβονυλίωση, κλαστερίνη και θρομβωτική ικανότητα κυστιδίων) καθώς επίσης και σε ερυθροκυτταρικές πρωτεΐνες όπως η καλπαΐνη, η Hsp70, το σύμπλοκο σπεκτρίνης-Hb και ο μεταφορέας GLUT-1 (διάγραμμα 9). Η διακύμανση στην αιμόλυση, το μονοξείδιο του αζώτου, την κλαστερίνη του υπερκειμένου και την πρόσδεση Ptx2 στη μεμβράνη αυξήθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Τα επίπεδα τροποποιήσεων της ζώνης-3 (ολιγομερισμός και πρωτεόλυση) παρουσίασαν υψηλά ποσοστά διακύμανσης μόνο εντός της μονάδας μετάγγισης ενώ στον αντίποδα, η παραγωγή κυστιδίων διαφέρει έντονα μεταξύ των δοτών κυρίως *in vivo*. Την τελευταία ημέρα της αποθήκευσης η Ptx2 και η τροποποιημένη CD47 εμφάνισαν την εντονότερη διακύμανση ανάμεσα στους δότες (>60%). Τέλος οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες εμφανίζουν τη μικρότερη διακύμανση τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης.



Διάγραμμα 9: Γραφική αναπαράσταση των παραμέτρων που εμφανίζουν το μεγαλύτερο ποσοστό διακύμανσης ανάμεσα σε υγιείς αιμοδότες *in vivo* και *ex vivo*. (Band3\*): τροποποιήσεις ζώνης-3. (CD47\*): τροποποιημένη στερεοδιαμόρφωση. (pCLU): κλαστερίνη πλάσματος.

Ενδιαφέρον παρουσίασε επίσης το πρότυπο διακύμανσης πρωτεϊνικών δεικτών των ερυθροκυττάρων μεταξύ των αιμοδοτών (εικόνα 28). Χαρακτηριστική είναι η απουσία μεγάλων διαφορών στα επίπεδα σκελετικών και μεμβρανικών πρωτεϊνών. Αντίθετα τα μόρια με τα μεγαλύτερα ποσοστά διακύμανσης αντιστοιχούν σε μεμβρανοσυνδεόμενες – μεμβρανοσχετιζόμενες πρωτεΐνες όπως η καλπαΐνη, η Prx2 ή η Hsp70.



**Εικόνα 28:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοεντόπισης μετά από διαδικασία Western για τις πρωτεΐνες με τα μεγαλύτερα ποσοστά διακύμανσης μεταξύ των αιμοδοτών (παρουσιάζονται 8 διαφορετικοί δότες πριν την αποθήκευση, στο μέσο και το τέλος αυτής). Η πρωτεΐνη 4.1R που βρίσκεται στη βάση της εικόνας χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας του πειράματος ανοσοεντόπισης για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων.

## Γ2.3. Σύνδεση της Αποθηκευτικής Ποιότητας Ερυθροκυττάρων (*ex vivo*) με Ιδιαίτερα Χαρακτηριστικά Αιμοδοτών (*in vivo*)

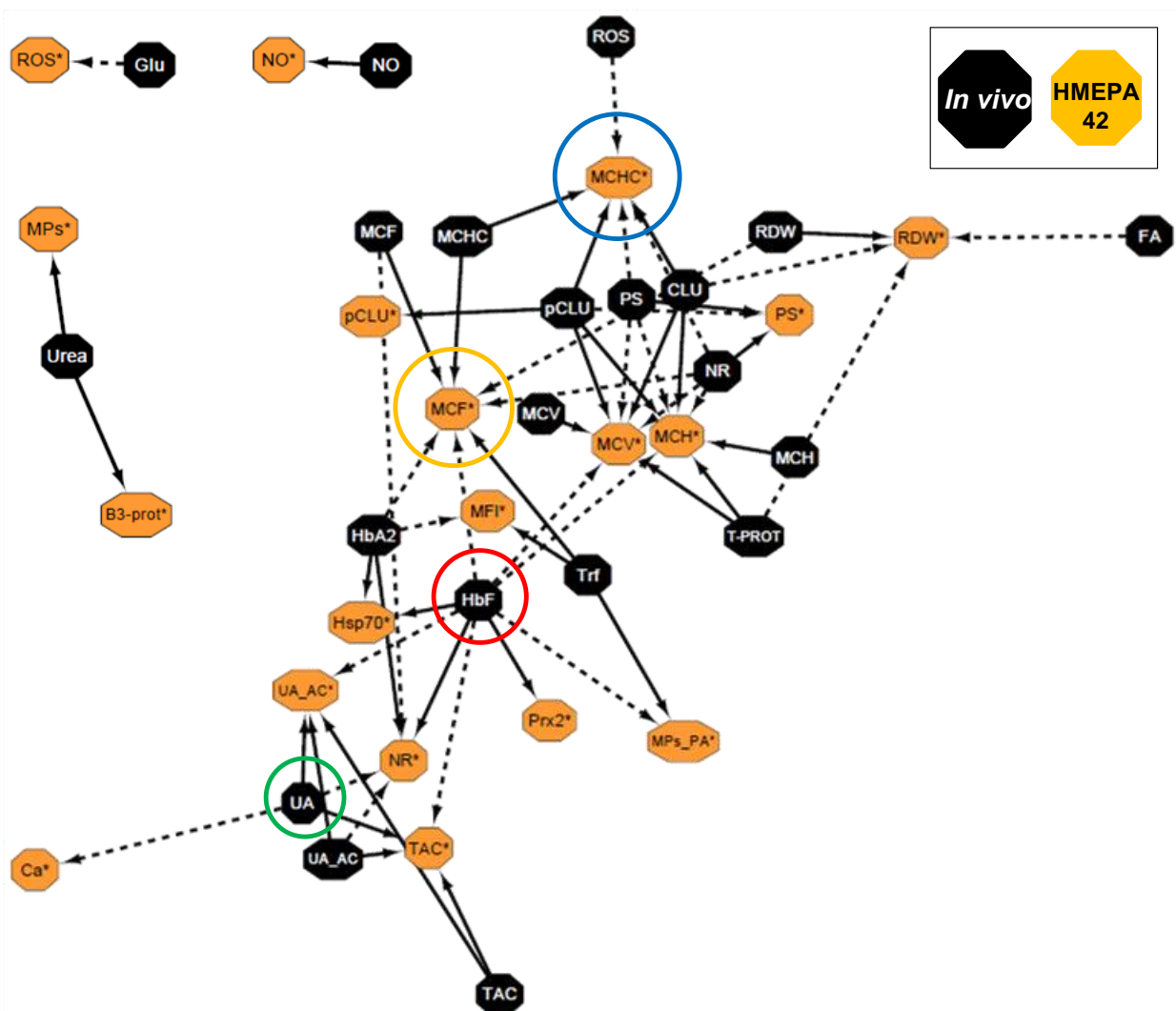
### Γ2.3.1. Διακύμανση Ανάμεσα στους Αιμοδότες

Παρά την πολυπλοκότητα στη διακύμανση των παραμέτρων και την ετερογένεια ανάμεσα στους αιμοδότες τόσο *in vivo* όσο και *ex vivo*, εντοπίστηκαν αρκετές μεταβλητές με διακύμανση εντός της μονάδας αποθήκευσης ευθέως ανάλογη των προαποθηκευτικών τους επιπέδων (πίνακας 7). Η αναλογία αυτή επιβεβαιώθηκε μέσω των ισχυρών και επαναλαμβανόμενων σε κάθε χρονικό σημείο της αποθήκευσης στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων ( $P < 0,05$  και  $P < 0,01$ ) ανάμεσα στα επίπεδα *in vivo* (κυρίως) και *ex vivo* του ίδιου δείκτη. Όσον αφορά στο υπερκείμενο των ασκών μετάγγισης τέτοιες μεταβλητές είναι το μονοξειδίο του αζώτου, η κλαστερίνη και η ενεργότητα του ουρικού οξέος, οι οποίες διατηρούν το πρότυπο διακύμανσης που υπήρχε μεταξύ των δοτών και στο πλάσμα πριν την αποθήκευση. Επιπλέον εντοπίστηκαν και δύο δείκτες (ολική αντιοξειδωτική ικανότητα υπερκείμενου και ποσότητα κυστιδίων) οι οποίοι εμφάνισαν διακύμανση ανάλογη των τιμών της 2<sup>ης</sup> ημέρας της αποθήκευσης και δυσανάλογη των αντίστοιχων *in vivo*. Κλασσικές αιματολογικές παράμετροι όπως οι MCV, MCH, MCHC και RDW παρουσιάζουν υψηλότατο βαθμό συσχέτισης με τα προαποθηκευτικά τους επίπεδα καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης. Παράλληλα από τις βιολογικές παραμέτρους που εξετάστηκαν παρόμοιο πρότυπο ακολούθησαν η οσμωτική ευθραυστότητα, η έκθεση PS και το ενδοκυττάριο ασβέστιο. Σχεδόν όλες οι προαναφερθείσες μεταβλητές (εκτός των PS και  $Ca^{2+}$ ) μπορούν να προβλεφθούν σε επίπεδο αποθήκευσης με χρήση στατιστικά σημαντικών ( $P < 0,05$ ) μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης τα οποία χρησιμοποιούν τις *in vivo* τιμές ως ανεξάρτητες παραμέτρους (προσαρμοσμένο  $R^2$  μεταξύ 61 και 99%).

<b>ΧΡΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ</b>					
<b>NS</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>21</b>	<b>30</b>	<b>42</b>
<b>Πλάσμα / Υπερκείμενο</b>					
<b>Μονοξειδίο αζώτου</b>	0,974 <sup>†</sup>	N/D	0,812*	N/D	0,928 <sup>†</sup>
<b>Κλαστερίνη</b>	N/D	N/D	N/D	N/D	0,880*
<b>Ενεργότητα ουρικού</b>	0,950 <sup>†</sup>	0,844*	0,938 <sup>†</sup>	0,830*	0,807*
<b>Αντιοξειδωτική ικανότητα <u>ημέρας 2</u></b>		0,913 <sup>†</sup>	0,947 <sup>†</sup>	0,826*	0,808*
<b>Κυστίδια <u>ημέρας 2</u></b>		N/D	0,962 <sup>†</sup>	0,812*	0,916 <sup>†</sup>
<b>Ερυθροκύτταρα</b>					
<b>MCV</b>	1,000 <sup>†</sup>	0,999 <sup>†</sup>	0,999 <sup>†</sup>	0,995 <sup>†</sup>	0,995 <sup>†</sup>
<b>MCH</b>	0,993 <sup>†</sup>	0,997 <sup>†</sup>	0,996 <sup>†</sup>	0,994 <sup>†</sup>	0,994 <sup>†</sup>
<b>MCHC</b>	0,845*	0,957 <sup>†</sup>	0,885 <sup>†</sup>	0,808*	0,808*
<b>RDW</b>	0,817*	0,894 <sup>†</sup>	0,959 <sup>†</sup>	0,907 <sup>†</sup>	0,907 <sup>†</sup>
<b>Οσμωτική ευθραυστότητα</b>	0,979 <sup>†</sup>	0,990 <sup>†</sup>	0,985 <sup>†</sup>	0,997 <sup>†</sup>	0,969 <sup>†</sup>
<b>Έκθεση PS</b>	0,763*	0,807*	0,758*	N/D	0,821*
<b>Ασβέστιο</b>	0,517	0,836*	0,838*	0,807*	0,827*

Πίνακας 7: Ισχυρές και επαναλαμβανόμενες στατιστικά σημαντικές συσχέτισης ανάμεσα στα επίπεδα *in vivo* και *ex vivo* της ίδιας παραμέτρου. Χρονοεξαρτώμενη ανάλυση πριν και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ασκούς μετάγγισης. (NS): μη αποθηκευμένα δείγματα. (\*):  $P < 0,05$ . (†):  $P < 0,01$ . N/D: δεν προσδιορίστηκε. Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στο συντελεστή συσχέτισης  $r$  (συσχετίσεις Pearson ή Spearman ανάλογα με την κατανομή των παραμέτρων).

Αντίστοιχα παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ( $P < 0,05$ ) ανάμεσα σε ποικίλες προαποθηκευτικές μεταβλητές και διαφορετικούς αποθηκευτικούς δείκτες καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης. Για παράδειγμα η διακύμανση στην τρανσφερίνη του ορού *in vivo* εμφάνισε θετική συσχέτιση με τους δείκτες κυτταρικής ευθραυστότητας MCF και MFI καθώς επίσης και με τη θρομβωτική ικανότητα των παραγόμενων κυστιδίων. Παρομοίως η συσσώρευση ROS και το ποσοστό ερυθροκυττάρων που εκθέτουν PS *in vivo* σχετίστηκε αρνητικά με το δείκτη MCHC των αποθηκευμένων RBCs. Το σύνολο των στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων ανάμεσα στην *in vivo* και την *ex vivo* συνθήκη χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ενός βιολογικού δικτύου που συνδέει την αποθήκευση με ιδιαίτερα προαποθηκευτικά χαρακτηριστικά του αιμοδότη (εικόνα 29). Για λόγους αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων και για να μειωθεί η πιθανότητα να συμπεριληφθούν στο δίκτυο ψευδώς θετικές συσχετίσεις, επιλέχθηκαν μόνο συσχετίσεις οι οποίες εντοπίζονται σε κάθε χρονικό σημείο της αποθήκευσης (ημέρες 2, 10, 21, 30, 42).



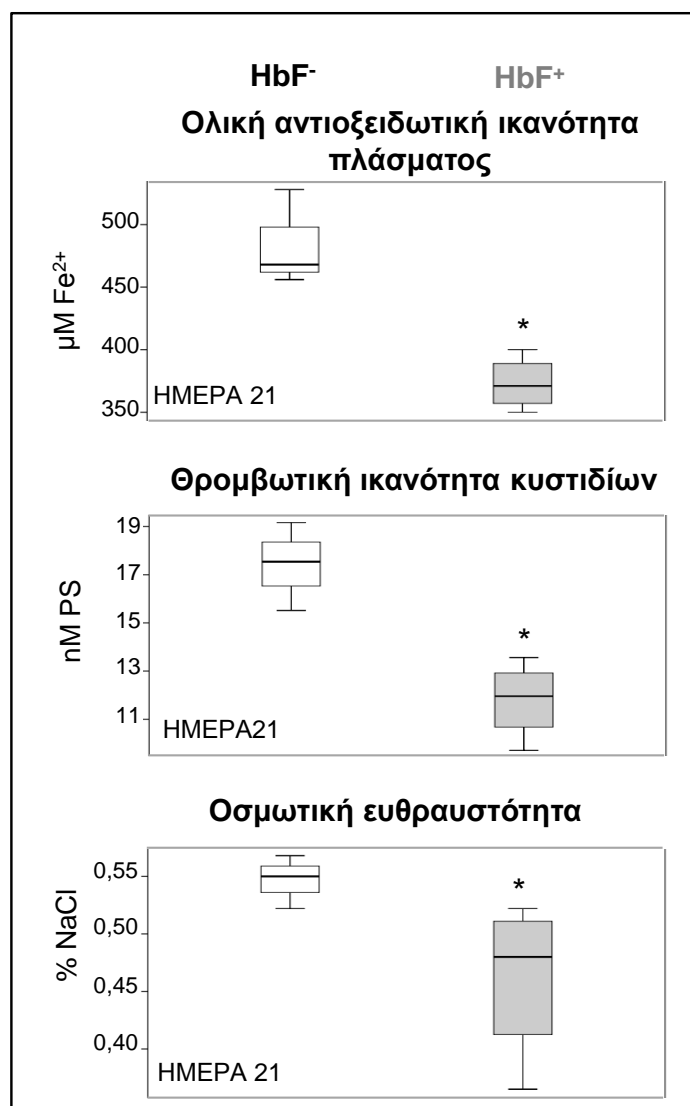
Εικόνα 29: Βιολογικό δίκτυο αλληλοσυσχέτισης προαποθηκευτικών χαρακτηριστικών και δεικτών αποθήκευσης (ημέρα 42). Αντίστοιχης μορφής δίκτυα αντιστοιχούν και στις υπόλοιπες ημέρες της αποθήκευσης. Κάθε σύνδεση απεικονίζει μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $P < 0,05$ ). Συνεχείς και διάστικτες γραμμές: θετικές και αρνητικές συσχετίσεις αντίστοιχα. Έγχρωμοι κύκλοι: παράμετροι (nodes) υψηλής συνδεσιμότητας. B3-prot: πρωτεόλυση ζώνης-3, MP<sub>s</sub>-PA: θρομβωτική ικανότητα κυστιδίων. UA<sub>AC</sub>: αντιοξειδωτική ικανότητα ουρικού οξέος.





### Γ2.3.2. Επίδραση των Επιπέδων HbF *in vivo* σε Παραμέτρους Αποθήκευσης

Με δεδομένη την κεντρική θέση που καταλαμβάνει η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF) στο δίκτυο (*in vivo* – αποθήκευση) καθώς επίσης και το γεγονός ότι αποτελεί τον πολυσυνδέτη του εν λόγω δικτύου (συνδέσεις με MCF, TAC, Hsp70, Prx2 κ.α.) ελέγχθηκε η πιθανότητα κατηγοριοποίησης των αιμοδοτών με βάση τα επίπεδα HbF *in vivo* (διάγραμμα 10). Ο έλεγχος των αιμοδοτών ανέδειξε δύο ομάδες με βάση την HbF *in vivo*: 5 άτομα με παντελή απουσία HbF και 5 άτομα με παρουσία HbF σε φυσιολογικά επίπεδα ( $0.76 \pm 0.31\%$ ) εκ των οποίων ένας δότης ετερόζυγος για β μεσογειακή αναιμία (HbF 2.1%). Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση έδειξε πως δότες με φυσιολογικά επίπεδα HbF εμφανίζουν ταυτόχρονα χαμηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικής ικανότητας υπερκευμένου (TAC), οσμωτικής ευθραυστότητας (MCF) και θρομβωτικής ικανότητας κυστιδίων (MPs-PA) καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης εν συγκρίσει με δότες που χαρακτηρίζονται από απουσία HbF ( $P < 0.05$ , power=0.906). Επιπλέον ο δείκτης MCF των αποθηκευμένων RBCs μπορεί να προβλεφθεί από τα επίπεδα HbF *in vivo* μέσω ανάλυσης παλινδρόμησης σε κάθε χρονικό σημείο της αποθηκευτικής περιόδου ( $P < 0,05$ ) (εικόνα 31).



Διάγραμμα 10: Γραφική απεικόνιση των διαφορών ανάμεσα σε δότες με (+) και χωρίς (-) HbF μετά από πολυπαραμετρική ανάλυση για το μέσο της αποθήκευσης. (\*):  $P < 0,05$ .

Ανάλυση παλινδρόμησης  
(Regression analysis)

<u><i>In vivo:</i></u>	MCF = 0,449 - (0,51 * HbF) Adjusted R <sup>2</sup> = 0,817 P = 0,003
<u>HΜΕΡΑ 2:</u>	MCF = 0,485 - (0,59 * HbF) Adjusted R <sup>2</sup> = 0,782 P = 0,005
<u>HΜΕΡΑ 21:</u>	MCF = 0,544 - (0,75 * HbF) Adjusted R <sup>2</sup> = 0,850 P = 0,002
<u>HΜΕΡΑ 42:</u>	MCF = 0,539 - (0,75 * HbF) Adjusted R <sup>2</sup> = 0,887 P = 0,001

Εικόνα 31: Εξισώσεις πρόβλεψης των επιπέδων MCF τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Τα προαποθηκευτικά επίπεδα HbF χρησιμοποιούνται ως ανεξάρτητη μεταβλητή σε κάθε περίπτωση. Δίνονται επίσης τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας P καθώς επίσης και ο προσαρμοσμένος δείκτης R<sup>2</sup> ο οποίος αντιστοιχεί στο ποσοστό διακύμανσης της εξαρτημένης μεταβλητής (MCF) το οποίο μπορεί να εξηγηθεί από τη διακύμανση στα επίπεδα της ανεξάρτητης μεταβλητής (HbF). Χρησιμοποιείται ο προσαρμοσμένος δείκτης R<sup>2</sup> καθώς μετά τους απαραίτητους στατιστικούς ελέγχους προσφέρει τη δυνατότητα γενίκευσης του μοντέλου στον πληθυσμό.

### **Γ3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟ-ΑΠΟΘΗΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΟΥΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΜΟΝΑΔΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗΣ**

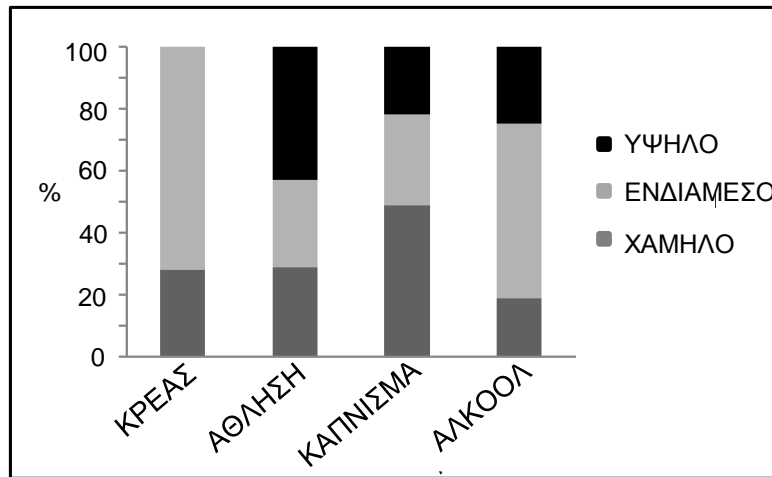
Για τη μελέτη σε προ-αποθηκευτικό επίπεδο (*in vivo*) χρησιμοποιήθηκε φλεβικό αίμα από 78 άρρενες υγιείς αιμοδότες ηλικίας 21-27 ετών οι οποίοι πληρούσαν τα κριτήρια αιμοδοσίας (Hb>13,5 g/dL). Πριν την αιμοδοσία κάθε αιμοδότης συμπλήρωσε ειδικά διαμορφωμένο ερωτηματολόγιο σχετικό με τις συνήθειες του τρόπου ζωής του (κάπνισμα, διατροφικές συνήθειες, κατανάλωση αλκοόλ κ.α.).

#### **Γ3.1. Προ-αποθηκευτικός Έλεγχος Αιμοδοτών (*in vivo*)**

##### **Γ3.1.1. Τρόπος ζωής, Αιματολογικό Πρότυπο και Βιοχημικά Χαρακτηριστικά**

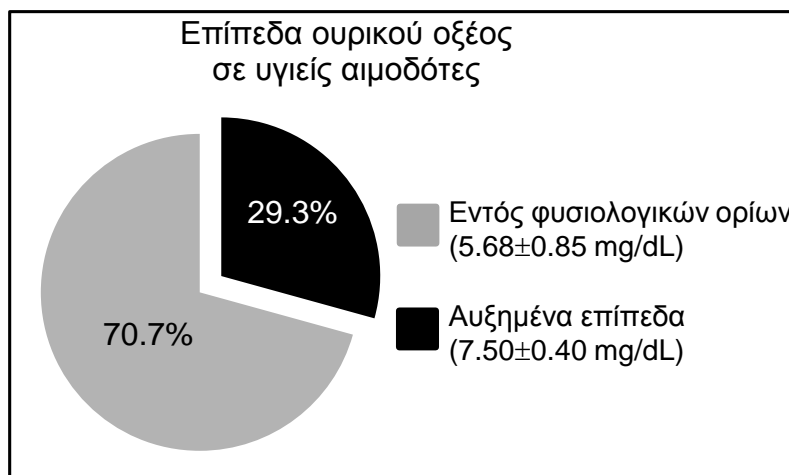
Σε σχέση με το προηγούμενο σκέλος της παρούσας διατριβής (Donor variation) η προαποθηκευτική μελέτη περιελάμβανε 78 επιπλέον δότες. Οι λόγοι για τους οποίους επιλέχθηκε η συγκεκριμένη στρατηγική είναι οι ακόλουθοι: 1) Επιβεβαίωση των προηγούμενων αποτελεσμάτων καθώς ποικίλες παράμετροι (χοληστερόλη, LDL, τριγλυκερίδια, ουρικό οξύ κ.α.) εμφάνισαν παθολογικές τιμές σε αυξημένο ποσοστό αιμοδοτών, 2) Μετατόπιση του ηλικιακού εύρους των αιμοδοτών έτσι ώστε να μειωθεί ο αριθμός των ατόμων που αιμοδότησαν πρώτη φορά και ο εξεταζόμενος πληθυσμός να προσομοιάζει ακόμα περισσότερο στο σύνολο των τακτικών αιμοδοτών, 3) Έχοντας εντοπίσει την ενδιαφέρουσα θέση κάποιων παραμέτρων (MCHC, MCF, RDW, ουρικό οξύ κ.α.) τόσο στο δίκτυο αλληλεπιδράσεων *in vivo* όσο και στο αντίστοιχο *ex vivo*, έπρεπε να ελεγχθεί η πιθανότητα κατηγοριοποίησης των υγιών αιμοδοτών με βάση κάποια από τις μεταβλητές ενδιαφέροντος.

Με δεδομένο ότι τα επίπεδα λιποπρωτεϊνών, σιδήρου και αντιοξειδωτικής άμυνας του αίματος μπορεί να σχετίζονται με τον τρόπο ζωής των αιμοδοτών ελέγχθηκαν πιθανές διαφορές στη διατροφή, την άθληση, το κάπνισμα, την κατανάλωση αλκοόλ και άλλες καθημερινές συνήθειες. Μετά από αξιολόγηση του ερωτηματολογίου που συμπληρώθηκε πριν την αιμοδοσία δεν παρατηρήθηκαν αποκλίσεις σε σύγκριση με τα αναμενόμενα ποσοστά όσον αφορά τις καθημερινές συνήθειες των αιμοδοτών (διάγραμμα 11). Πιο συγκεκριμένα σχεδόν οι μισοί εθελοντές αιμοδότες ήταν καπνιστές ενώ μόλις ένας στους τέσσερις κατανάλωνε περισσότερα του ενός ποτά σε εβδομαδιαία βάση. Η άθληση αποτελούσε κομμάτι του εβδομαδιαίου προγράμματος των μισών ατόμων (με μεγάλη ή ενδιάμεση συχνότητα), τη στιγμή που το 27% των εξεταζόμενων κατανάλωναν κρέας μία φορά την εβδομάδα. Η συντριπτική πλειοψηφία δήλωσε πως δε χρησιμοποιούσε συμπληρώματα διατροφής και κατανάλωνε κυρίως σπιτικό φαγητό.



Διάγραμμα 11: Διαφορές στον τρόπο ζωής μεταξύ υγιών αιμοδοτών (N=78). Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν σε τρεις διακριτές κατηγορίες, υψηλών, ενδιάμεσων και χαμηλών επιπέδων.

Όσον αφορά στο αιματολογικό και βιοχημικό πρότυπο των αιμοδοτών παρατηρήθηκε και πάλι υψηλό ποσοστό ατόμων με τιμές εκτός των φυσιολογικών ορίων σε παραμέτρους όπως η χοληστερόλη, η LDL, η κλαστερίνη και η καρβονυλίωση του πλάσματος, το ουρικό οξύ και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Εντούτοις τα ποσοστά στο συγκεκριμένο δείγμα δεν ξεπερνούσαν το 30%. Ουσιαστικά μόνο το ουρικό οξύ εμφάνισε επίπεδα εκτός ορίων ( $7.5 \pm 0.4$  mg/dL) σε ποσοστό που άγγιζε το 30%, αποτέλεσμα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφενός γιατί το ουρικό οξύ επηρεάζει σε σημαντικό ποσοστό την ολική αντιοξειδωτική άμυνα του πλάσματος αφετέρου γιατί επιβεβαίωσε το πρότυπο διακύμανσης που παρατηρήθηκε στην προηγούμενη ομάδα υγιών δοτών (N=137) (διάγραμμα 12).



Διάγραμμα 12: Επίπεδα ουρικού οξέος υγιών αιμοδοτών (N=78). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση.

Επιπρόσθετα βιολογικές παράμετροι του πλάσματος όπως η καρβονυλίωση πρωτεϊνών και η κλαστερίνη παρουσίασαν μεγάλο εύρος διακύμανσης ανάμεσα στους δότες (75 και 60% αντίστοιχα) τη στιγμή που οι αντίστοιχες τιμές για την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και το μονοξειδίο του αζώτου ήταν 50 και 30% αντίστοιχως. Η συνολική εικόνα του εξεταζόμενου δείγματος παρουσιάζεται στη σελίδα που ακολουθεί (πίνακας 8)

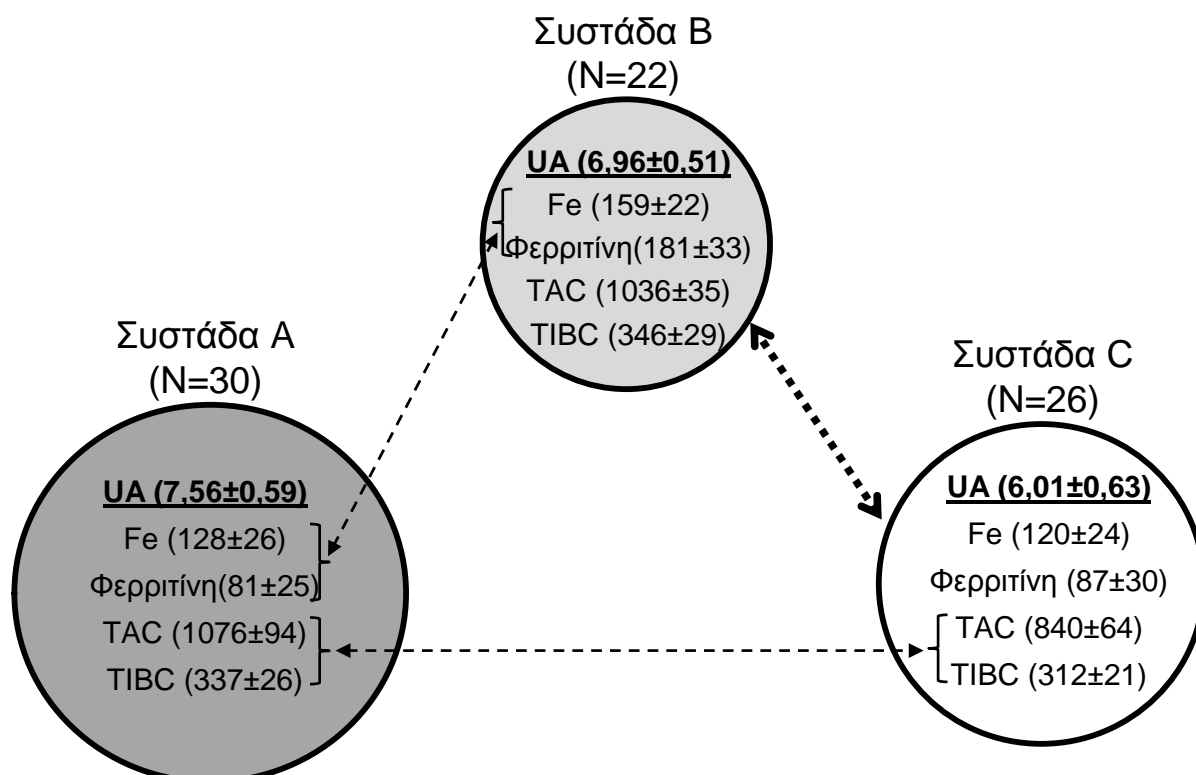
**ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ – ΒΙΟΧΗΜΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ (N=78)**

Παράμετρος	Φυσιολογικές τιμές	Δότες
Αιμοσφαιρίνη (g/dL)	12-18	15,0 ± 1,2
Ερυθροκύτταρα (10 <sup>6</sup> /μL)	3,8-5,3	5,0 ± 0,4
Αιματοκρίτης (%)	36-56	44,0 ± 2,8
MCV (fL)	80-100	88 ± 7
MCH (pg)	27-32	30 ± 3
MCHC (g/dL)	32-36	34,0 ± 1,1
RDW (%)	10,0-16,5	12,5 ± 0,7
Λευκοκύτταρα (10 <sup>3</sup> /μL)	4,0-9,0	7,0 ± 1,8
Αιμοπετάλια (10 <sup>3</sup> /μL)	120-380	245 ± 51
Γλυκόζη (mg/dL)	65-110	89 ± 9
Χοληστερόλη (mg/dL)	140-199	188 ± 31
LDL (mg/dL)	<130	113 ± 27
HDL (mg/dL)	37-70	52 ± 9
HDL/LDL ratio	1,00	0,49 ± 0,15
VLDL (mg/dL)	8-40	22 ± 12
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	10-150	111 ± 29
Σίδηρος (mg/dL)	35-150	129 ± 27
TIBC (mg/dL)	260-390	328 ± 33
Φερριτίνη (ng/mL)	18-270	96 ± 43
Τρανσφερίνη (mg/dL)	200-400	306 ± 44
Κορεσμός τρανσφερίνης (%)	20-50	39 ± 6
Ουρία (mg/dL)	10-50	21 ± 6
Κρεατινίνη (mg/dL)	0,31-1,11	0,79 ± 0,20
Ουρικό οξύ (mg/dL)	3,5-7,2	6,9 ± 1,1
Ασβέστιο (mg/dL)	8,6-10,0	9,5 ± 0,4
Νάτριο (mmol/L)	135-145	140 ± 3
Κάλιο (mmol/L)	3,6-5,1	4,3 ± 0,4
Φώσφορος (mg/dL)	2,5-4,9	3,3 ± 0,4
Ολικές πρωτεΐνες (mg/dL)	6,4-8,2	7,2 ± 0,5
Αλβουμίνη (mg/dL)	3,5-5,5	4,8 ± 0,3
AST (U/L)	5-40	27 ± 18
ALT (U/L)	7-56	18 ± 10
γGT (U/L)	5-85	24 ± 12
ALP (U/L)	17-142	59 ± 11
<b>Πλάσμα</b>		
Ελεύθερη Hb (mg/dL)	NA	41 ± 21
Μονοξειδίου αζώτου (μg/mL)	NA	3,59 ± 1,18
TAC (μM Fe <sup>2+</sup> )	NA	984 ± 143
Κλαστερίνη (μg/ml)	52,8-137,2	86,4 ± 51,9
Καρβονυλίωση πρωτεϊνών (nmol/mg)	<0,1	0,084 ± 0,063

Πίνακας 8: Αιματολογικές, βιοχημικές και βιολογικές παράμετροι υγιών αιμοδοτών *in vivo*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. NA: μη διαθέσιμη τιμή.

### Γ3.1.2. Κατηγοριοποίηση Αιμοδοτών και Ομαδοποίηση Παραμέτρων

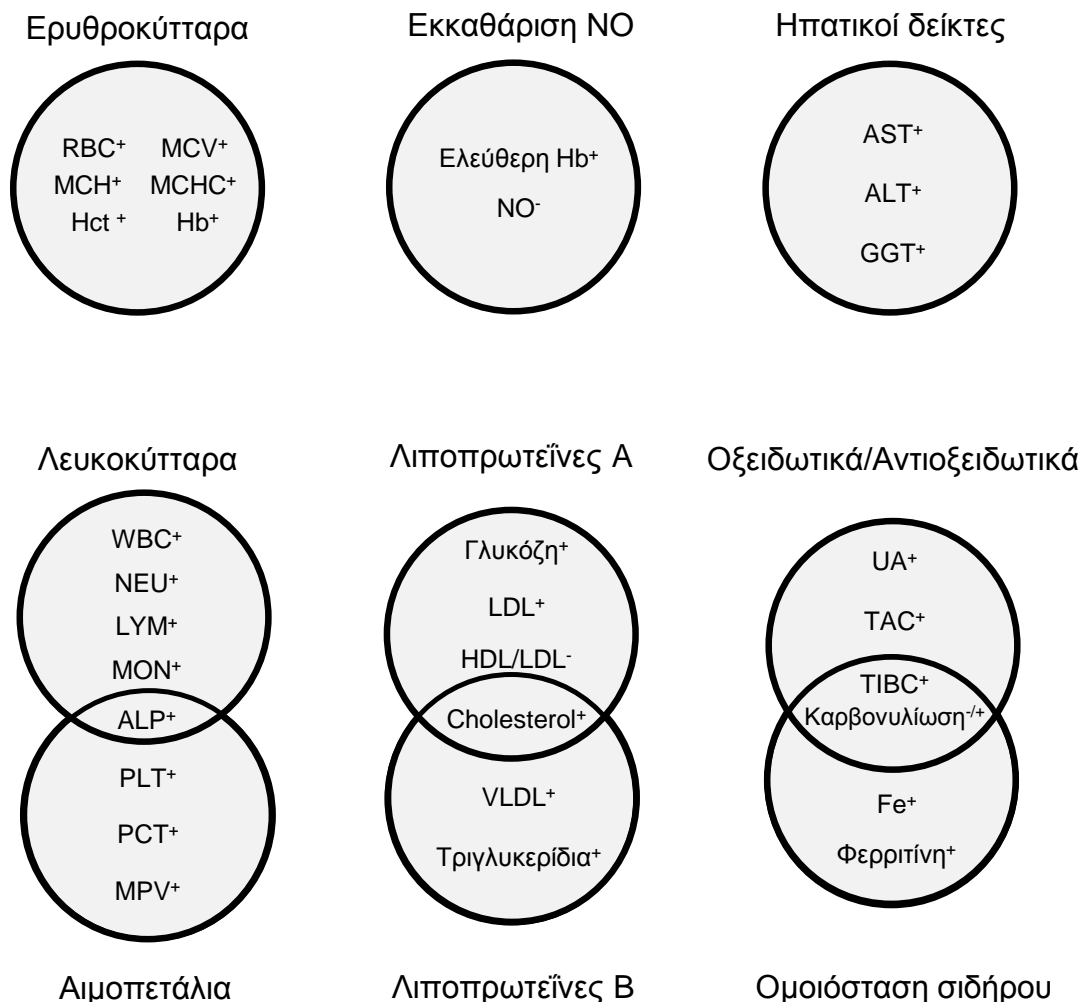
Εν συνεχεία και με τη χρήση ανάλυσης συστάδων (cluster analysis) ελέγχθηκε αν οι αιμοδοτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε διακριτές ομάδες. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης υπέδειξαν την ύπαρξη τριών ομάδων ( $P < 0,05$ ): Ομάδα Α υψηλού ουρικού οξέος (UA) ( $7.56 \pm 0.59$  mg/dL), Ομάδα Β φυσιολογικών επιπέδων με μετατόπιση στα ανώτερα επιτρεπτά όρια ( $6.96 \pm 0.51$  mg/dL) και Ομάδα Γ φυσιολογικών επιπέδων ( $6.01 \pm 0.63$  mg/dL) (εικόνα 32). Οι συστάδες διέφεραν επιπλέον μεταξύ τους (μερικώς) ως προς τα επίπεδα σιδήρου, φερριτίνης, ολικής σιδηροδεσμευτικής ικανότητας (TIBC) και TAC ( $P < 0,05$ ).



Εικόνα 32: Ανάλυση συστάδων σύμφωνα με την οποία οι δότες κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες που διαφέρουν κυρίως στα επίπεδα ουρικού οξέος. Οι ομάδες διαφέρουν σημαντικά επιπλέον και στις παραμέτρους που υποδεικνύονται από τα διακεκομμένα βέλη ( $P < 0,05$ ). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση. Τα επίπεδα των παραμέτρων έχουν μετρηθεί σε mg/dL με εξαίρεση εκείνα του TAC ( $\mu\text{M Fe}^{2+}$ ) και της φερριτίνης (ng/mL).

Η συνύπαρξη των παραμέτρων TAC, UA, TIBC, φερριτίνη και σιδήρου στις συστάδες προϋποθέτει για μεταξύ τους συσχέτιση. Γι αυτό ακολούθησε ανάλυση παραγόντων (factor analysis) για το σύνολο των παραμέτρων οι οποίες μετρήθηκαν, έτσι ώστε να εξακριβωθούν ομάδες σχετιζόμενων μεταξύ τους μεταβλητών. Το αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία 9 υπο-ομάδων μεταβλητών στενά συσχετισμένων μεταξύ τους (εικόνα 33). Πιο συγκεκριμένα εκτός των αναμενόμενων παραγόντων όπως τα ερυθροκύτταρα, τα λευκοκύτταρα, οι ηπατικοί δείκτες και οι λιποπρωτεΐνες, επιβεβαιώθηκε η σύνδεση του ουρικού οξέος με παραμέτρους οξειδωσης και αντιοξειδωτικής ικανότητας καθώς επίσης και με δείκτες ομοιόστασης σιδήρου (φερριτίνη, σίδηρος, TIBC) που υπήρχαν και στις αντίστοιχες συστάδες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αλληλεπίδραση

ανάμεσα στην υπο-ομάδα του ουρικού οξέος κι εκείνη των δεικτών ομοιόστασης σιδήρου μέσω των κοινών παραμέτρων TIBC και καρβονυλίωσης. Τέλος η καρβονυλίωση που μοιράζεται σε δύο υπο-ομάδες είναι αντιστρόφως ανάλογη των επιπέδων UA και ανάλογη των δεικτών που σχετίζονται με το σίδηρο.



**Εικόνα 33:** Ανάλυση παραγόντων σύμφωνα με την οποία οι παράμετροι κατηγοριοποιούνται σε 9 υπο-ομάδες ανάλογα με τη μεταξύ τους συσχέτιση (θετική ή αρνητική, + ή - αντίστοιχα,  $P < 0,05$ ). Οι μεταβλητές ALP, χοληστερόλη, TIBC και καρβονυλίωση ανήκουν σε περισσότερες της μίας ομάδες. (-/+): δείχνει πως η καρβονυλίωση σχετίζεται αρνητικά με τον οξειδωτικό/αντιοξειδωτικό παράγοντα και θετικά με αυτόν της ομοιόστασης σιδήρου.

### **Γ3.2. Αποθηκευτική Μελέτη: Η Επίδραση του Ουρικού Οξέος**

Για να ελεγχθεί η υπόθεση ότι η διακύμανση των επιπέδων ουρικού οξέος *in vivo* σχετίζεται με την αποθηκευτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων επιλέχθηκαν για αιμοδοσία 8 υγιείς τακτικοί αιμοδότες (μη καπνιστές, ηλικίας 22-29 ετών,  $Hb > 13,5$  g/dL) οι οποίοι χαρακτηρίζονταν από χαμηλά ( $4.73 \pm 0.25$  mg/dL, φυσιολογικές τιμές) ή υψηλά ( $7.52 \pm 0.5$  mg/dL, ελαφρώς άνω των φυσιολογικών ορίων) επίπεδα UA. Τα πακεταρισμένα ερυθροκύτταρα αποθηκεύτηκαν σε μονάδες μετάγγισης που περιείχαν αντιπηκτικό διάλυμα CPD και πρόσθετο διάλυμα συντήρησης SAGM για μία περίοδο 42 ημερών σε θερμοκρασία 4°C. Η ανάλυση ποικίλων παραμέτρων αποθηκευτικής

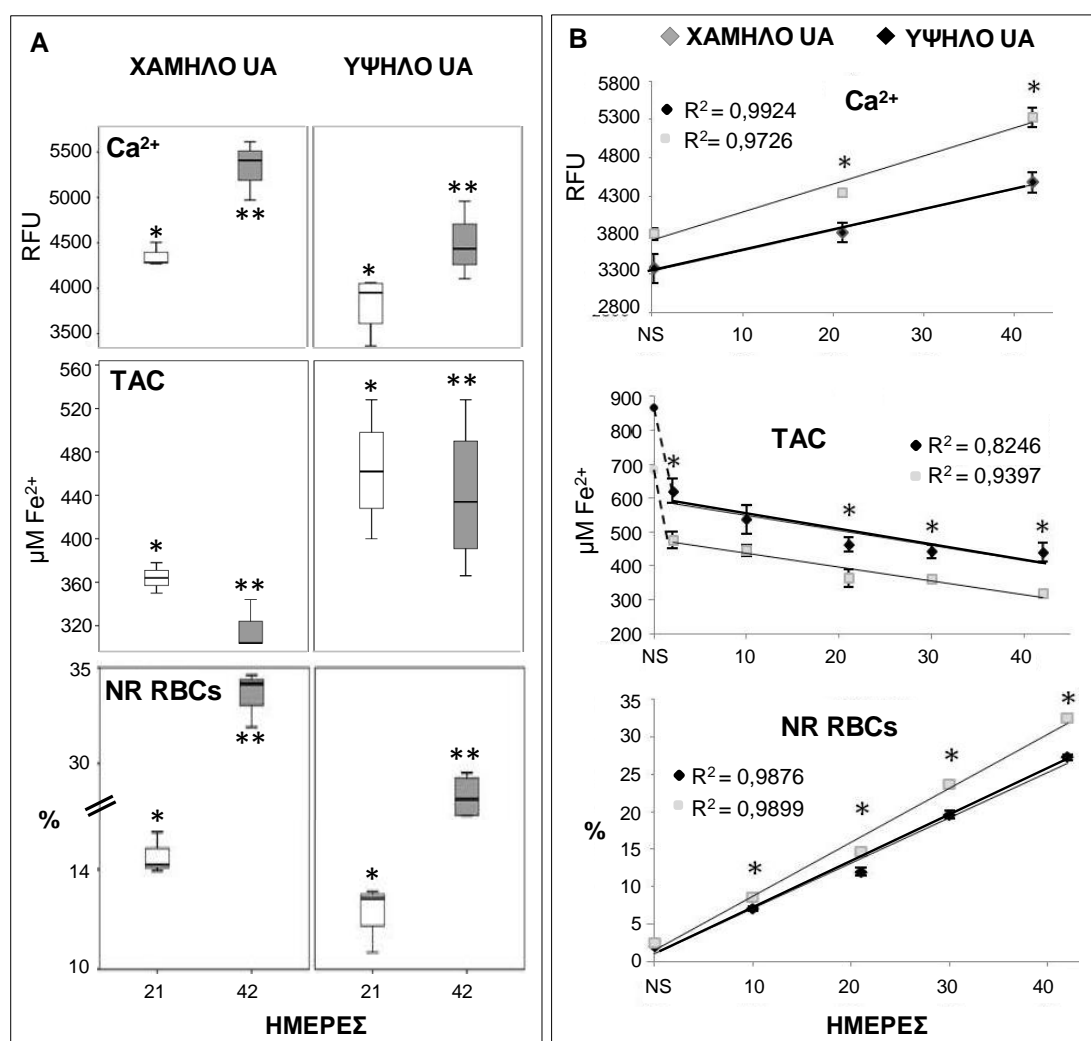


βλάβης και οξειδωτικής επιβάρυνσης, ανέδειξε ως σημαντικότερες τις διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες (καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης) που αφορούν τα επίπεδα ενδοκυττάριου ασβεστίου, μη αναστρέψιμων RBCs (NR-RBCs), ενεργότητας ουρικού οξέος και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος/υπερκειμένου (TAC) ( $P < 0,05$ ) (πίνακας 9). Το συγκριτικό πρότυπο διακύμανσης πριν και κατά τη διάρκεια της αποθηκευτικής περιόδου παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 9).

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΤΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ					
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΟΜΑΔΑ (N=8)	ΧΡΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ			
		NS	2	21	42
p-TAC ( $\mu\text{M Fe}^{2+}$ )	ΧΑΜΗΛΟ	690 ± 64*	469 ± 44*†	364 ± 14*‡	317 ± 23*†
	ΥΨΗΛΟ	866 ± 96	618 ± 107†	463 ± 52†	440 ± 68†
p-Ενεργότητα ουρικού ( $\mu\text{M Fe}^{2+}$ )	ΧΑΜΗΛΟ	377 ± 34*	337 ± 38*	184 ± 24*‡	174 ± 47*†
	ΥΨΗΛΟ	483 ± 64	497 ± 103	292 ± 33‡	278 ± 36†
p-TAC (χωρίς ουρικό) ( $\mu\text{M Fe}^{2+}$ )	ΧΑΜΗΛΟ	313 ± 40	132 ± 14†	180 ± 20‡	143 ± 27†
	ΥΨΗΛΟ	383 ± 44	121 ± 13†	171 ± 21‡	162 ± 31†
Ασβέστιο (RFU)	ΧΑΜΗΛΟ	3813 ± 218	ND	4353 ± 131*†	5331 ± 327*‡
	ΥΨΗΛΟ	3365 ± 493	ND	3834 ± 320†	4413 ± 353†
Μη αναστρέψιμα RBCs (NR) (%)	ΧΑΜΗΛΟ	2,37 ± 0,90	ND	14,68 ± 1,04*†	32,55 ± 1,45*‡
	ΥΨΗΛΟ	1,90 ± 0,23	ND	11,95 ± 1,42†	27,26 ± 1,15‡
Ολιγομερή ζώνης-3	ΧΑΜΗΛΟ	1,00 ± 0,14	ND	4,35 ± 0,81*†	4,48 ± 0,98†
	ΥΨΗΛΟ	1,26 ± 0,19	ND	2,96 ± 0,52†	4,27 ± 1,12†
Φλοτιλλίνη-2	ΧΑΜΗΛΟ	1,00 ± 0,18	ND	0,99 ± 0,14	0,66 ± 0,07*‡
	ΥΨΗΛΟ	1,00 ± 0,24	ND	0,98 ± 0,11	0,80 ± 0,06
ROS (RFU)	ΧΑΜΗΛΟ	233 ± 25	321 ± 12*†	563 ± 16†	284 ± 16‡
	ΥΨΗΛΟ	222 ± 23	288 ± 21†	551 ± 32‡	265 ± 40‡
p-Ελεύθερη Hb (mg/mL)	ΧΑΜΗΛΟ	0,246 ± 0,029	ND	0,269 ± 0,028	0,897 ± 0,177*‡
	ΥΨΗΛΟ	0,215 ± 0,046	ND	0,476 ± 0,363	1,090 ± 0,816
GSH ( $\mu\text{M}$ )	ΧΑΜΗΛΟ	628 ± 16	ND	558 ± 73	434 ± 102†
	ΥΨΗΛΟ	712 ± 163	ND	520 ± 84	385 ± 72†
p-Καρβονυλίωση (nmol/mg)	ΧΑΜΗΛΟ	0,108 ± 0,058	ND	0,173 ± 0,024	0,195 ± 0,066
	ΥΨΗΛΟ	0,057 ± 0,052	ND	0,151 ± 0,042	0,132 ± 0,076
Πρωτεόλυση ζώνης-3	ΧΑΜΗΛΟ	1,00 ± 0,22	ND	2,80 ± 0,18†	4,18 ± 0,75*‡
	ΥΨΗΛΟ	1,16 ± 0,46	ND	2,13 ± 0,14†	3,49 ± 0,70‡
Καλπαΐνη	ΧΑΜΗΛΟ	1,00 ± 0,53	ND	2,12 ± 0,82†	4,47 ± 2,12†
	ΥΨΗΛΟ	1,06 ± 0,41	ND	1,59 ± 0,47	3,24 ± 1,82†
Υπεροξειδοζίνη-2 (Prx2)	ΧΑΜΗΛΟ	1,00 ± 0,20	ND	2,5 ± 1,3†	15,7 ± 10,7*‡
	ΥΨΗΛΟ	0,80 ± 0,30	ND	1,8 ± 0,9	10,8 ± 6,9‡
p-Κλαστερίνη ( $\mu\text{g/mL}$ )	ΧΑΜΗΛΟ	59169 ± 44401	ND	N/D	10920 ± 9915†
	ΥΨΗΛΟ	78195 ± 10536	ND	N/D	23292 ± 15760†
Στοματίνη	ΧΑΜΗΛΟ	1,00 ± 0,37	ND	0,97 ± 0,27	0,91 ± 0,28
	ΥΨΗΛΟ	1,15 ± 0,26	ND	1,00 ± 0,15	1,02 ± 0,18
Μεταφορέας γλυκόζης-1	ΧΑΜΗΛΟ	1,00 ± 0,34	ND	0,51 ± 0,35	0,61 ± 0,19
	ΥΨΗΛΟ	0,69 ± 0,32	ND	0,51 ± 0,15	0,61 ± 0,17

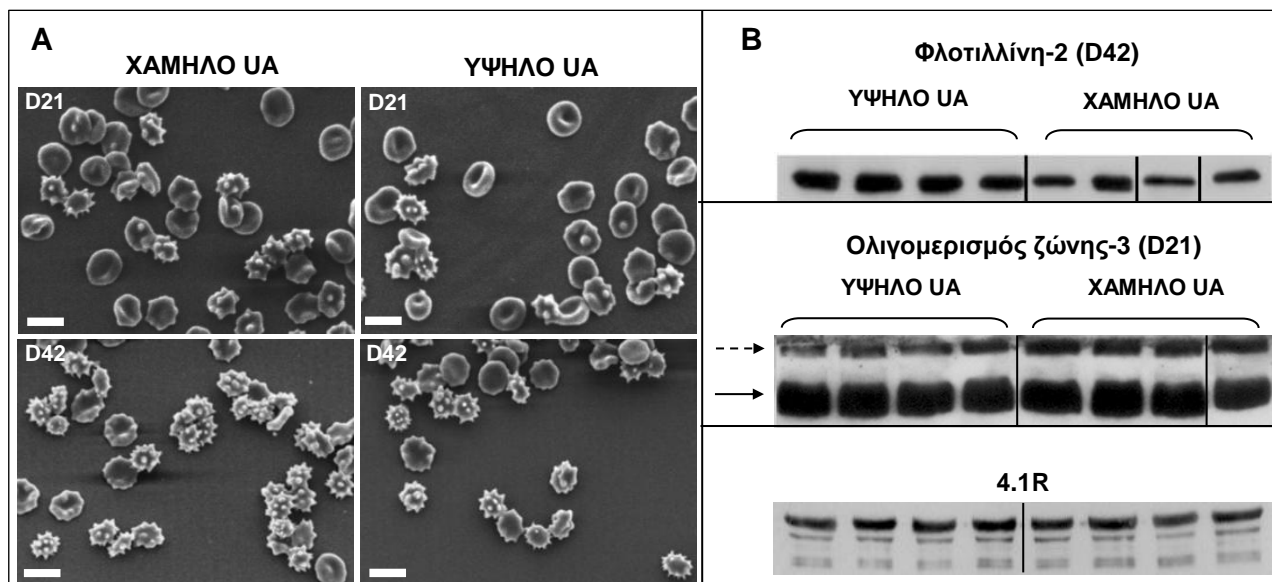
Πίνακας 9: Σύγκριση παραμέτρων ενδιαφέροντος πριν και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ανάμεσα στις δύο ομάδες δοτών (N=4 για κάθε ομάδα). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. Τα αποτελέσματα πυκνομέτρησης πρωτεϊνών έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τα *in vivo* (NS) επίπεδα των δοτών χαμηλού UA. (NS): μη αποθηκευμένα δείγματα. ND: μη διαθέσιμη τιμή. (\*)  $P < 0,05$  ανάμεσα στις δύο ομάδες. (†)  $P < 0,05$  αποθηκευμένα δείγματα έναντι τιμών *in vivo*. (‡)  $P < 0,05$  έναντι προηγούμενης χρονικής περιόδου. (p-): παράμετρος του πλάσματος/υπερκειμένου.

Αναλυτικότερα, η διαφορά στα επίπεδα ουρικού οξέος *in vivo* φαίνεται να διατηρείται και εντός της μονάδας μετάγγισης όπως γίνεται κατανοητό από τις διαφορές που εντοπίζονται στην αντιοξειδωτική ενεργότητα του ουρικού οξέος (πριν και καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης). Το ίδιο ακριβώς πρότυπο ακολουθείται και στην περίπτωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (διάγραμμα 13). Αντίθετα οι διαφορές στα επίπεδα μη αναστρέψιμης εχινοκυττάρωσης και ενδοκυττάρου ασβεστίου αναδεικνύονται μόνο εντός της μονάδας μετάγγισης. Έτσι, δότες υψηλών προ-αποθηκευτικών επιπέδων UA χαρακτηρίζονται από αυξημένη TAC υπερκειμένου της μονάδας καθώς επίσης και λιγότερα σφαιροεχινοκύτταρα και ενδοκυττάριο ασβέστιο ( $P < 0,05$ ). Επιπλέον η μεταβολή των συγκεκριμένων παραμέτρων φαίνεται να είναι γραμμική συνάρτηση του χρόνου αποθήκευσης με τη στατιστική ανάλυση (επίπεδα  $R^2$ ) να υποδεικνύει αυξημένη πιθανότητα πρόβλεψης κάθε μεταβλητής σε κάθε σημείο της αποθήκευσης γνωρίζοντας την τιμή της σε οποιοδήποτε προηγούμενο χρονικό σημείο.



**Διάγραμμα 13:** **A.** Γραφική απεικόνιση των διαφορών για την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), το ενδοκυττάριο ασβέστιο και τα κύτταρα μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης (NR-RBCs) ανάμεσα σε δότες υψηλού και χαμηλού ουρικού οξέος (UA) στο μέσο και το τέλος της αποθήκευσης. (\*),(\*\*): χαμηλό έναντι υψηλό UA για το μέσο και το τέλος της αποθήκευσης αντίστοιχα,  $P < 0,01$ . **B.** Η διακύμανση των ιδίων παραμέτρων είναι γραμμική συνάρτηση του αποθηκευτικού χρόνου. (\*): χαμηλό έναντι υψηλό UA,  $P < 0,05$ . Οι διάστικτες γραμμές στο γράφημα της TAC αντιστοιχούν στη μεγάλη πτώση που παρατηρείται ανάμεσα στην *in vivo* συνθήκη και τις πρώτες μέρες της αποθήκευσης.

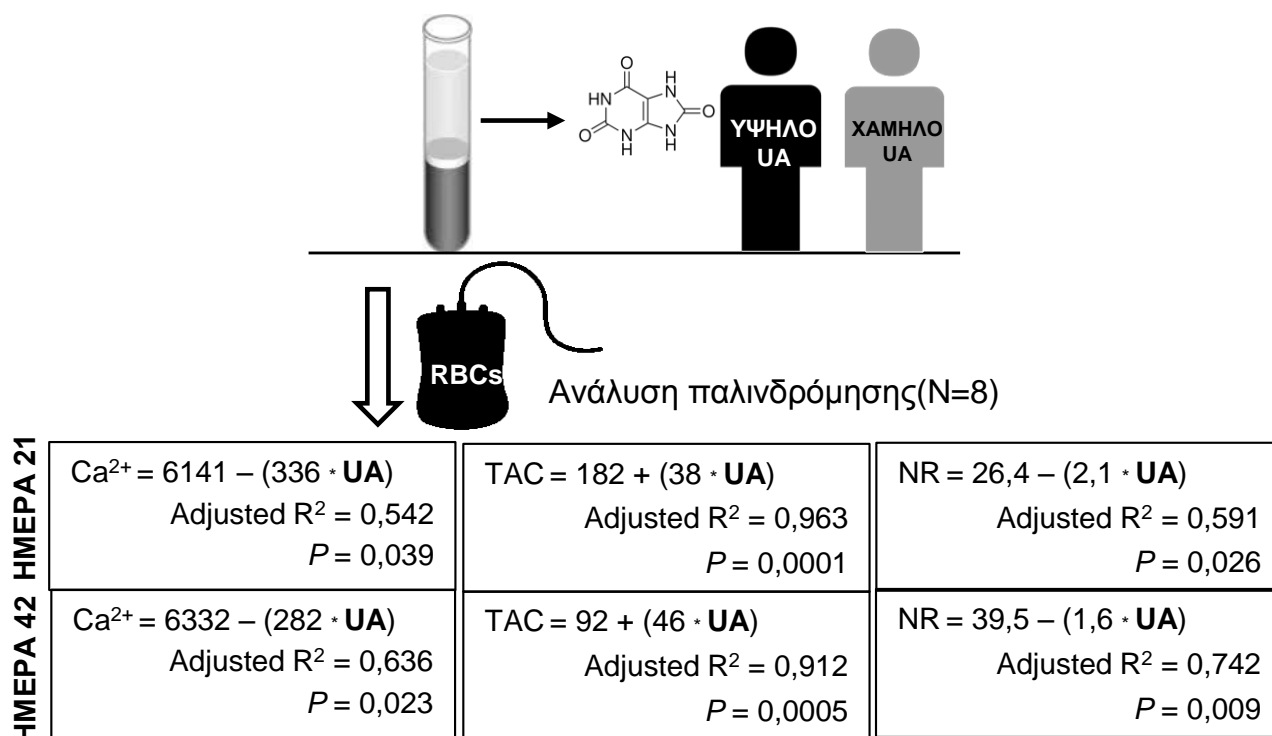
Επιπλέον εντοπίστηκαν μεταβλητές (αναλυτικά στον πίνακα 8) οι οποίες διαφέρουν ανάμεσα στις δύο ομάδες δότων μόνο σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία της αποθήκευσης. Για παράδειγμα οι δότες υψηλού UA παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα ROS τη 2<sup>η</sup> ημέρα της αποθηκευτικής περιόδου ( $P < 0,05$ ). Αντίστοιχα σε πρωτεϊνικό επίπεδο παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές ( $P < 0,05$ ) διαφορές στον ολιγομερισμό της ζώνης-3 (21<sup>η</sup> ημέρα) και τη φλοτιλλίνη-2 (42<sup>η</sup> ημέρα) με τους δότες υψηλού UA να υπερέχουν και στις δύο περιπτώσεις (χαμηλότερα επίπεδα ολιγομερισμού και καλύτερη διατήρηση φλοτιλλίνης στη μεμβράνη) (εικόνα 34).



**Εικόνα 34:** **A.** Αντιπροσωπευτικές ηλεκτρονιογραφίες (μεγέθυνση  $\times 1000$ ) στις οποίες αποτυπώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές κυττάρων μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης ανάμεσα στις δύο ομάδες. Μπάρες μεγέθυνσης:  $10\mu\text{m}$ . **B.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοεντόπισης μετά από διαδικασία Western στις οποίες είναι εμφανείς οι διαφορές στα επίπεδα ολιγομερισμού της ζώνης-3 και της φλοτιλλίνης-2. Η πρωτεΐνη 4.1R που βρίσκεται στη βάση της εικόνας χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας του πειράματος ανοσοεντόπισης για τον έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων. Συνεχή και διάστικτα βέλη: ζώνη-3 και ολιγομερή αντίστοιχα. D21 – D42: ημέρες 21 και 42 αντίστοιχα.

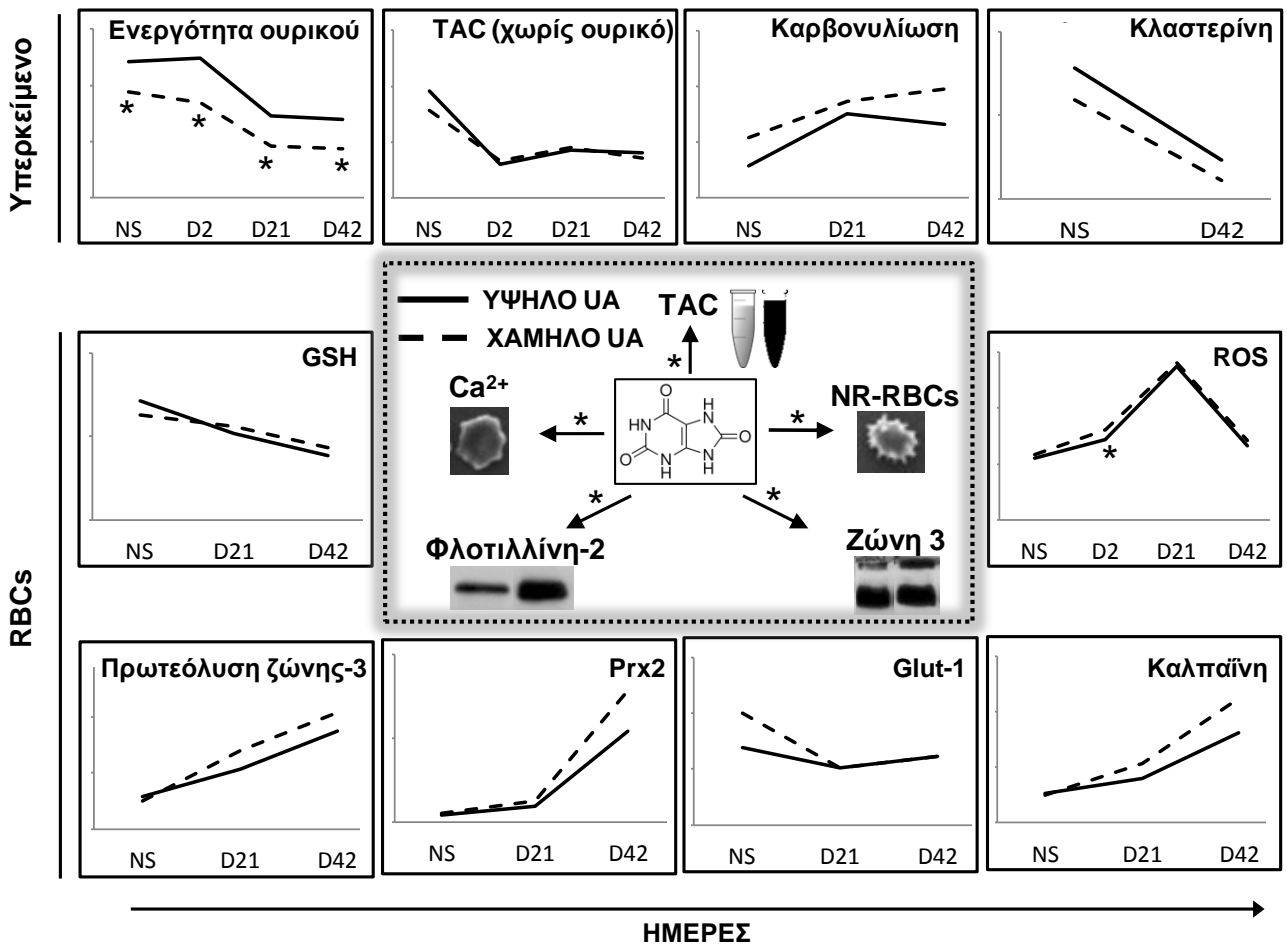
Ακολούθησε πολυπαραμετρική ανάλυση (multivariate analysis) για να εξακριβωθεί ποιές μεταβλητές χαρακτηρίζουν τις μονάδες μετάγγισης που προέρχονται από δότες υψηλού UA. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως ανεξάρτητη μεταβλητή η συγκέντρωση UA *in vivo* και ως εξαρτημένες μεταβλητές όλες οι εξεταζόμενες παράμετροι σε κάθε χρονικό σημείο της αποθήκευσης. Η ανάλυση έδειξε πως οι δύο ομάδες διαφέρουν ταυτόχρονα στις παραμέτρους: α) ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου, β) ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του υπερκειμένου, γ) ποσοστό σφαιροεχνοκυττάρων, δ) ολιγομερή ζώνης-3 (μόνο την ημέρα 21) και ε) φλοτιλλίνη-2 (μόνο ημέρα 42). Οι διαφορές ισχύουν τόσο στο μέσο όσο και στο τέλος της αποθήκευσης (εκτός των περιπτώσεων που αναγράφεται) με τα μοντέλα να είναι αρκετά ισχυρά από στατιστικής άποψης:  $F(4,3) = 56,119$ ,  $P = 0,024$ , μερικό  $\eta^2 = 0,942$ , ισχύς =  $0,836$  για την 21<sup>η</sup> ημέρα και  $F(4,3) = 89,564$ ,  $P = 0,011$ , μερικό  $\eta^2 = 0,994$  και ισχύς =  $0,990$  για την 42<sup>η</sup> ημέρα. Επιπλέον πολυπαραμετρική ανάλυση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (repeated measures multivariate analysis) επιβεβαίωσε τα παραπάνω μοντέλα δείχνοντας πως ισχύουν ταυτόχρονα τόσο για το μέσο όσο και για το τέλος της αποθηκευτικής περιόδου.

Αφού επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα κατηγοριοποίησης των αιμοδοτών με βάση τα επίπεδα UA *in vivo*, πραγματοποιήθηκε ανάλυση παλινδρόμησης για να ελεγχθεί και η πιθανότητα πρόβλεψης κάποιας εκ των παραπάνω παραμέτρων. Χρησιμοποιώντας ως ανεξάρτητη μεταβλητή τη συγκέντρωση UA *in vivo* παρήχθησαν στατιστικά σημαντικά μοντέλα πρόβλεψης για τις παραμέτρους Ca<sup>2+</sup>, TAC και NR-RBCs στο μέσο και το τέλος της αποθήκευσης (εικόνα 35). Τα αρχικά επίπεδα ουρικού οξέος λοιπόν μπορούν να προβλέψουν με σχετική ακρίβεια (54 – 96%) τη διακύμανση της αντιοξειδωτικής ικανότητας υπερκειμένου, του ενδοκυττάριου ασβεστίου και του ποσοστού σφαιροεχينوκυττάρων στον ασκό μετάγγισης.



Εικόνα 35: Ανάλυση παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας ως παράγοντα πρόβλεψης τα επίπεδα UA *in vivo*. Η διακύμανση των προβλεπόμενων παραμέτρων μπορεί να εξηγηθεί, σε ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ 54 και 96%, από τη διακύμανση ουρικού οξέος *in vivo*.

Τέλος, παρά το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις υπόλοιπες παραμέτρους που μετρήθηκαν, παρατηρήθηκε τάση για καλύτερη διακύμανση στην πλειονότητα των δεικτών αποθηκευτικής βλάβης στους δότες υψηλού UA (εικόνα 36). Πράγματι όσον αφορά μετρήσεις στο υπερκείμενο των ασκών, οι δότες με υψηλά προαποθηκευτικά επίπεδα ουρικού οξέος εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα καρβονυλίωσης και υψηλότερα κλαστερίνης. Περνώντας σε ερυθροκυτταρικές παραμέτρους η τάση για καλύτερα αποθηκευτικά επίπεδα σε δείκτες ομοιόστασης ασβεστίου και αντιοξειδωτικών μηχανισμών είναι εμφανής στους δότες υψηλού UA. Χαρακτηριστικά είναι τα σταθερά χαμηλότερα επίπεδα πρωτεόλυσης της ζώνης-3 και των ROS καθώς επίσης και της πρόσδεσης καλπαΐνης και Ptx2 στη μεμβράνη. Επιπλέον τόσο η πρωτεόλυση της ζώνης-3 όσο και η πρόσδεση καλπαΐνης στη μεμβράνη φαίνεται να συμβαίνουν ελαφρώς νωρίτερα στη μονάδα μετάγγισης. Αντίθετα, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμμία διαφορά στην έκφραση του μεταφορέα γλυκόζης (GLUT1) στη μεμβράνη κατά την αποθήκευση, οι δότες χαμηλού UA είχαν χαμηλότερα επίπεδα *in vivo*. Τέλος δεν υπήρξαν διαφορές όσον αφορά στην ενεργότητα GSH.



Εικόνα 36: Διακύμανση βιολογικών παραμέτρων που δεν περιέχονται στο πολυπαραμετρικό μοντέλο (στο κέντρο της εικόνας). (NS): μη αποθηκευμένα δείγματα. (\*): $P < 0,05$ , δότες υψηλού έναντι χαμηλού UA.

***ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ:***  
***ΣΥΖΗΤΗΣΗ***

## **Δ1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΛΕΥΚΑΦΑΙΡΕΣΗΣ**

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης τα ερυθροκύτταρα υφίστανται μία πληθώρα αλλαγών, ορισμένες από τις οποίες είναι μη αναστρέψιμες μετά τη μετάγγιση, επιβαρύνοντας ποικιλοτρόπως το δέκτη (*Berezina et al., 2002*). Κάποια από τα αρνητικά αποτελέσματα της μετάγγισης ερυθρών αιμοσφαιρίων σχετίζονται με τα εμπεριέχοντα λευκοκύτταρα, καθώς και τα παράγωγά τους που εκλύονται εντός της μονάδας μετάγγισης (κυτοκίνες, πρωτεάσες κ.α.) (*Frabetti et al., 1998*). Έχει δειχθεί πως η αποθήκευση, ιδιαίτερα σε μη λευκαφαιρεμένους ασκούς επιδρά τόσο στη φυσιολογία των ερυθροκυττάρων (*Annis και Sparrow, 2006*) όσο και στην ποιότητα της μετάγγισης (*Greenwalt et al., 1990*). Σε αυτό το κεφάλαιο συνοψίζονται τα κυριότερα συμπεράσματα της συγκεκριμένης εργασίας, όσον αφορά στην επίδραση της λευκαφαίρεσης στη μορφολογία, τη δομική και λειτουργική επάρκεια των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων, την ομοιόσταση οξειδωτικών/αντιοξειδωτικών μηχανισμών και το πρωτέωμα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και του κυτοσολίου.

### **Δ1.1. Αιματολογικό Πρότυπο, Δομική Ακεραιότητα και Διατήρηση της Μembrανικής Επιφάνειας των Ερυθρών Αιμοσφαιρίων**

#### *Αιματολογικά*

Η αυξημένη αιμόλυση που παρατηρήθηκε στις λευκαφαιρεμένες μονάδες στην αρχή της αποθήκευσης πιθανόν σχετίζεται με διαφορετική συμπεριφορά διαφορετικών δοτών όσον αφορά στη διαδικασία λευκαφαίρεσης. Πράγματι, όπως έχει αναφερθεί, ερυθροκύτταρα κάποιων υγιών αιμοδοτών εμφανίζουν μεγαλύτερη τάση για αιμόλυση κατά τη διάρκεια της λευκαφαίρεσης (*Hess et al., 2009*). Αντίθετα δείκτες όπως το RDW και η εξωκυττάρια συγκέντρωση καλίου εμφάνισαν σταθερά υψηλότερα επίπεδα στις μη λευκαφαιρεμένες μονάδες σε μεγάλη διάρκεια της αποθηκευτικής περιόδου, κάτι το οποίο υποδεικνύει συσχέτιση με την αυξημένη εχينوκυττάρωση και πρωτεόλυση που παρατηρήθηκαν στα συγκεκριμένα δείγματα. Χαρακτηριστικά, σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου παθολογικές τιμές RDW σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα ROS και εχينوκυττάρωσης (*Antonellou et al., 2011b*).

#### *Μη αναστρέψιμη παραμόρφωση – Κυστιδιοποίηση*

Τόσο η μορφολογία των ερυθρών αιμοσφαιρίων όσο και η απώλεια μεμβράνης με τη μορφή κυστιδίων επιδεινώνονται προϊόντος του χρόνου αποθήκευσης και στις δύο ομάδες. Ωστόσο, μετά το μέσο της αποθηκευτικής περιόδου υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση ερυθροκυττάρων μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης και κυστιδιοποίησης παρουσία λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων, σε σύγκριση με τα λευκαφαιρεμένα δείγματα. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, τα ερυθροκύτταρα υφίστανται μια σταδιακή αλλαγή στο σχήμα, από δισκοκύτταρα σε εχिनοκύτταρα και τελικά σε σφαιροκύτταρα και ακανόνιστου σχήματος κύτταρα, η οποία συνδέεται στενά με απώλεια της μεμβράνης υπό τη μορφή μικροκυστιδίων. Παρά το γεγονός ότι το μέσο ερυθροκύτταρο φαίνεται να είναι σε θέση να αντισταθμίσει μια μέτρια απώλεια μεμβράνης, το τελικό σφαιροεχينوκυτταρικό στάδιο είναι ένα μη αναστρέψιμο αποτέλεσμα (*Hess, 2010*). Ουσιαστικά τα σφαιροεχينوκύτταρα είναι τα πρώτα υποψήφια προς εκκαθάριση κύτταρα μετά από μετάγγιση (*Haradin et al., 1969*) με τον Greenwalt και τους συνεργάτες του να εντοπίζουν αυξημένα ποσοστά σε μη λευκαφαιρεμένες μονάδες (*Greenwalt et al., 1990*). Επιπλέον, και με δεδομένο ότι τα παρατηρούμενα κυστίδια είναι

κυρίως ερυθροκυτταρικής προέλευσης (Kriebardis et al., 2008) γίνεται εμφανής η αρνητική επίδραση της παρουσίας λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων στην αρτιότητα και την ακεραιότητα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Η μικροκυστιδιοποίηση είναι μία διαδικασία αποβολής οξειδωμένων και κατεστραμμένων συστατικών των ερυθροκυττάρων και μαζί με τη σφαιροεχينوκυττάρωση αποτελούν βασικά χαρακτηριστικά του φαινοτύπου κυτταρικής γήρανσης *in vivo* και *in vitro*. Τα δύο αυτά φαινόμενα έχουν συσχετιστεί με ρεολογικές αλλαγές, μείωση της ικανότητας ελαστικής παραμόρφωσης (Hess, 2010) και μειωμένη ανάκτηση των RBCs μετά από μετάγγιση (Berezina et al., 2002). Ως εκ τούτου αυτές οι αλλαγές χρησιμοποιούνται ως μέτρο της ποιότητας των αποθηκευμένων RBCs (Dumaswala et al., 1996) με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας να υποδεικνύουν την αρνητική επίδραση των εναπομεινάντων λευκοκυττάρων.

Η συρρίκνωση του κυττάρου, η αλλαγή στο φυσιολογικό σχήμα και η κυστιδιοποίηση φαίνεται να συσχετίζονται με απώλεια ιόντων καλίου και μείωση στα επίπεδα του *ATP in vitro* (van de Watering και Brand, 2008). Όσον αφορά στη μείωση του *ATP*, το φαινόμενο είναι αναστρέψιμο, όχι όμως από το μέσο της αποθηκευτικής περιόδου και μετά, όπου τα σχηματιζόμενα σφαιροεχινोकύτταρα δεν μπορούν να επανέλθουν (Hess και Greenwalt, 2002). Η περίοδος αυτή συμπίπτει με το χρονικό σημείο της αύξησης των ποσοστών σφαιροεχινोकυττάρων, κυστιδιοποίησης και ιόντων καλίου στους μη λευκαφαιρεμένους ασκούς, υποδεικνύοντας την κλινική σημασία του ευρήματος καθώς έχει αναφερθεί πως η υπερκαλιαιμία μετά από μετάγγιση σχετίζεται με σοβαρές καρδιακές δυσλειτουργίες και σε κάποιες περιπτώσεις αυξημένη θνησιμότητα (Vraets et al., 2011). Επιπρόσθετα, κάποιες μελέτες υποστηρίζουν πως η απώλεια σε ιόντα καλίου, που οδηγεί σε συρρίκνωση και παραμόρφωση των ερυθροκυττάρων, μειώνεται σε περιπτώσεις όπου έχει γίνει λευκαφαίρεση των δειγμάτων (Greenwalt et al., 1990; Heaton et al., 1994). Η παρουσία λευκοκυττάρων συνδέεται με αυξημένα επίπεδα φωσφολιπάσης A2 και κυτοκινών με προφλεγμονώδεις δράσεις, καθώς μελέτες έχουν δείξει πως το πλάσμα αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων ενεργοποιεί πολυμορφοπύρηνα κύτταρα (Zallen et al., 2000). Συνδυάζοντας τα παραπάνω δεδομένα γίνεται εμφανής η επίδραση των λευκοκυττάρων στην πυροδότηση της ερυθρόπτωσης και πιθανά στην επίσπευση της γήρανσης *ex vivo*, βασικό χαρακτηριστικό της οποίας αποτελεί η παραμόρφωση των ερυθροκυττάρων και η κυστιδιοποίηση. Εντούτοις αν ληφθεί υπόψη πως ο συσχετισμός ανάμεσα σε εχينوκυττάρωση, κυστιδιοποίηση, απώλεια  $K^+$  και μείωση *ATP* δεν είναι ιδιαίτερα ισχυρός κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Tinnmouth και Chin-Yee, 2001) οι προαναφερθείσες αλλαγές ενδέχεται να οφείλονται στην κακή διατήρηση σκελετικών πρωτεϊνών που αναλύεται παρακάτω.

### **Εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης**

Τέλος, η εξωτερίκευση της PS αποτελεί σημαντικό σήμα για κυτταρική εκκαθάριση μέσω φαγοκυττάρωσης καθώς επίσης και παράγοντα κινδύνου για θρομβωτικά φαινόμενα (Lu et al., 2011) και προσκόλληση στο ενδοθήλιο (Luk et al., 2003). Παρατηρήθηκε αύξηση από τις πρώτες ημέρες της αποθήκευσης με αυξημένα ποσοστά στις μη λευκαφαιρεμένες μονάδες κατά το μέσο της αποθηκευτικής περιόδου. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα συμβαδίζουν με πρόσφατες μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες η PS αυξάνει ανεξαρτήτως λευκαφαίρεσης, κυρίως όμως όταν υπάρχουν εναπομεινάντα λευκοκύτταρα (Kamel et al., 2010). Επιπλέον η έκθεση της PS σε N-μονάδες φαίνεται να ξεκινά από τις πρώτες κιόλας εβδομάδες της αποθήκευσης (Bennett-Guerrero et al., 2007). Η εξισορρόπηση επιπέδων ανάμεσα στις δύο ομάδες την 42<sup>η</sup> ημέρα είναι πιθανό να οφείλεται



στα μεγαλύτερα ποσοστά κυστιδιοποίησης και αιμόλυσης που παρατηρούνται στα μη λευκαφαιρεμένα δείγματα, σε συμφωνία με παλαιότερες έρευνες (Greenwalt et al., 1990). Η αλλαγή στην τοπολογία της PS φαίνεται να σχετίζεται με ενεργοποίηση της σκραμπλάσης ή απενεργοποίηση της αμινοφωσφορικής μετατοπάσης (Dekkers et al., 2002; Seigneuret και Devaux, 1984) λόγω μείωσης pH και ATP στη μονάδα μετάγγισης (Verhoeven et al., 2006). Σίγουρα τα παρόντα λευκοκύτταρα-αιμοπετάλια δεν είναι η αιτία της παρατηρούμενης έκθεσης PS, φαίνεται όμως να εντείνουν το φαινόμενο επηρεάζοντας τόσο τα ερυθροκύτταρα όσο και το υπερκείμενο του ασκού (Sparrow et al., 2006; Cardo et al., 2008). Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου και την απελευθέρωση νευραμινιδασών από τα λευκοκύτταρα (Bratosin et al., 2001). Επιπλέον δε μπορεί να αποκλειστεί η απευθείας μεταφορά PS στα RBCs μέσω σύντηξης με κυστίδια προερχόμενα από λευκοκύτταρα τα οποία αποπίπτουν, κυστιδιοποιούνται ή λύνονται λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας αποθήκευσης (Frabetti et al., 1998).

### **Δ1.2. Ομοιόσταση $Ca^{2+}$**

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η συσσώρευση ασβεστίου, που συνοδεύει είτε τη γήρανση των ερυθροκυττάρων είτε την *in vitro* επιβολή στρεσογόνων ερεθισμάτων, προκαλεί άμεσα ή προωθεί έμμεσα ένα καταρράκτη γεγονότων συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής συρρίκνωσης, της απώλειας παραμορφωσιμότητας, της εχνοκυττάρωσης, της ερυθρόπτωσης και της πρωτεϊνικής αναδιαμόρφωσης (πρωτεόλυση – συμπλοκοποίηση) (Antonelou et al., 2010b). Η στατιστικά σημαντική αύξηση ενδοκυτταρικού ασβεστίου που παρατηρήθηκε μετά την 7<sup>η</sup> ημέρα της αποθήκευσης και στις δύο σειρές δειγμάτων συνάδει με παλαιότερες μελέτες (Wolfe, 1985). Αντίστοιχα η παρατηρούμενη τάση για σταθερά αυξημένα επίπεδα  $Ca^{2+}$  στα μη λευκαφαιρεμένα RBCs (παρά το γεγονός ότι οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές) σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα έκθεσης PS, κυστιδιοποίησης και εχνοκυττάρωσης ανάμεσα στις δύο ομάδες υποδεικνύουν διαφορές στο φαινότυπο γήρανσης σχετιζόμενες με το πλήθος των λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων της μονάδας. Εντούτοις ο χρόνος αποθήκευσης φαίνεται να αποτελεί ισχυρότερο στρεσογόνο παράγοντα εν συγκρίσει με τη λευκαφαίρεση. Η μικρή αύξηση τις πρώτες ημέρες που ακολουθείται από στατιστικά σημαντική άνοδο την 4<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσης συνάδει με το πρότυπο ενδοκυττάριας μετατόπισης ασβεστοεξαρτώμενων πρωτεϊνών όπως η καλπαΐνη και η συνεξίνη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ο συσχετισμός ανάμεσα σε επίπεδα  $Ca^{2+}$  και καλπαΐνης καθώς έχει προταθεί διπλός τρόπος επίδρασης στην αντλία ασβεστίου (Salamino et al., 1994). Πιο συγκεκριμένα για σύντομες περιόδους αποθήκευσης και χαμηλά επίπεδα  $Ca^{2+}$  η καλπαΐνη αυξάνει την υδρόλυση του ATP και την ενεργότητα της αντλίας, ενώ σε αντίθετες συνθήκες προκαλεί την αποδόμηση ποικίλων πρωτεϊνών μεταξύ των οποίων και η αντλία  $Ca^{2+}$ .

### **Δ1.3. Οξειδωτική Επιβάρυνση**

#### ***Ενδοκυττάρια επίπεδα ROS***

Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες παρατηρήθηκε συσσώρευση των ROS εντός των μονάδων μετάγγισης με το φαινόμενο να ξεκινά αργότερα στα λευκαφαιρεμένα δείγματα (Kaniyas και Acker, 2010) και τα επίπεδα ROS να σταθεροποιούνται σε χαμηλότερες τιμές στις λευκαφαιρεμένες μονάδες στο μέσο της αποθήκευσης (D'Alessandro et al., 2012). Επιπλέον τα μη λευκαφαιρεμένα δείγματα εμφανίζουν τάση για σταθερά υψηλότερα επίπεδα ROS παρόμοια με την αντίστοιχη εικόνα

των ιόντων ασβεστίου. Η δημιουργία ROS μπορεί να αποδοθεί σε διαδικασίες που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση, την οξειδωση της αιμοσφαιρίνης, την αποδόμηση μεμβρανικών λιπιδίων και αλλαγές στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σχετιζόμενες με τροποποιημένη μεταβολική ρύθμιση (Lion *et al.*, 2010; Kanias και Acker, 2010; Jozwik *et al.*, 1997; Messana *et al.*, 2010). Οι προαναφερθείσες μεταβολές δύναται να οδηγούν σε μειωμένη επιβίωση των RBCs μετά από μετάγγιση (Lachant *et al.*, 1984). Τα λευκοκύτταρα πιστεύεται πως επιταχύνουν την αποθηκευτική βλάβη μέσω τουλάχιστον δύο τρόπων: πριν την καταστροφή τους μέσω κατανάλωσης της διαθέσιμης γλυκόζης και δημιουργίας παραπροϊόντων του μεταβολισμού και μετά την καταστροφή τους μέσω απελευθέρωσης ενζύμων και τοξικών και βιολογικά ενεργών ουσιών που μπορούν να τραυματίσουν τα ερυθροκύτταρα (Hess και Greenwalt, 2002). Όντως, ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από λευκοκύτταρα μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική καταπόνηση και αιμόλυση (Racek *et al.*, 2001; Weiss, 1980) σε αποθηκευμένα RBCs τη στιγμή που έχει καταγραφεί υψηλότερος ρυθμός κατανάλωσης γλυκόζης σε μη λευκαφαιρεμένες μονάδες (Pietersz *et al.* 1989). Παρόλα αυτά στην παρούσα μελέτη μετά την 28<sup>η</sup> ημέρα της αποθήκευσης τα επίπεδα ROS ήταν παρόμοια ανάμεσα στις δύο ομάδες, προϋποθέτοντας για την ύπαρξη επιπλέον μηχανισμών οξειδωτικής επιβάρυνσης (στο τέλος της αποθήκευσης) ανεξάρτητων της παρουσίας λευκοκυττάρων. Το εύρημα αυτό συμβαδίζει με προηγούμενες μελέτες κατά τις οποίες η ενεργοποίηση ουδετερόφιλων από υπερκείμενο αποθηκευμένων RBCs δεν επηρεάστηκε από τη διαδικασία λευκαφαίρεσης (Chin-Yee *et al.*, 1998). Εντέλει όποιες κι αν είναι οι πιθανές πηγές ενδοκυττάρων ROS, η παρουσία λευκοκυττάρων-αιμοπεταλίων αναμένεται να σχετίζεται με αυξημένο οξειδωτικό στρες στα αποθηκευμένα RBCs το οποίο ενδέχεται να οδηγεί σε σηματοδότηση γήρανσης και κυτταρικού θανάτου, αλλαγμένη μορφολογία και κυστιδιοποίηση (Wagner *et al.*, 1987) καθώς επίσης και οξειδωτική βλάβη πρωτεϊνών και λιπιδίων (Racek *et al.*, 2001).

### ***Καρβονυλίωση πρωτεϊνών της μεμβράνης***

Παρόμοια εικόνα με τις ROS εμφάνισε η καρβονυλίωση πρωτεϊνών της μεμβράνης καθώς εμφανίζονται σταθερά υψηλότερα ποσοστά καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών στα N-RBCs μέχρι το μέσο της αποθήκευσης ενώ τα επίπεδα και στις δύο ομάδες σταθεροποιούνται προς το τέλος της αποθήκευσης επιβεβαιώνοντας παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου (Kriebardis *et al.*, 2006). Ο δείκτης καρβονυλίωσης χρησιμοποιείται ευρέως για τη μέτρηση πρωτεϊνικών βλαβών κατά την αποθήκευση με τις μελέτες να δείχνουν πως σχετίζεται τόσο με το χρόνο αποθήκευσης (Kriebardis *et al.*, 2006), όσο και με το διάλυμα συντήρησης (Antonelou *et al.*, 2010a). Η σταθεροποίηση που παρατηρείται προς το τέλος της αποθήκευσης ενδέχεται να σχετίζεται με την αυξημένη κυστιδιοποίηση (εκκαθάριση καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών) (Kriebardis *et al.*, 2008), την αιμόλυση (Antonelou *et al.*, 2010a) καθώς επίσης και με την πρόσδεση ενζύμων και μοριακών συνοδών στη μεμβράνη (Bosman *et al.*, 2008a).

### ***Μετατόπιση υπεροξειδοζίνης-2 (Prx2) στη μεμβράνη***

Τέλος η μελέτη του αντιοξειδωτικού ενζύμου Prx2, η πρόσδεση του οποίου στη μεμβράνη καθώς και ο ολιγομερισμός του αποτελούν δείκτες οξειδωτικής επιβάρυνσης, έδειξε υψηλότερα επίπεδα στα μη λευκαφαιρεμένα RBCs. Επιπλέον παρατηρήθηκε αύξηση προϊόντος του χρόνου αποθήκευσης καθώς επίσης και συσχετισμός με δείκτες οξειδωτικής επιβάρυνσης και γήρανσης όπως η πρόσδεση IgGs και η συμπλοκοποίηση σπεκτρίνης-Hb σε πλήρη συμφωνία με προγενέστερες

μελέτες (Rocha et al., 2008). Η Prx2 βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα στα ερυθροκύτταρα και λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό ένζυμο (Low et al., 2008) και μοριακή συνοδός (Stuhlmeier et al., 2003) με τη στρατολόγησή της στη μεμβράνη να σχετίζεται με αυξημένο ενδοκυττάριο ασβέστιο (Moore et al. 1997) και καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Rocha et al., 2008) συμπεριλαμβανομένης της αποθήκευσης (Bosman et al., 2008a). Με δεδομένο το γεγονός πως η οξείδωση των πρωτεϊνών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποθηκευτική βλάβη των μη λευκαφαιρεμένων RBCs (D'Amici et al., 2007) γίνεται εμφανές πως η αυξημένη πρόσδεση στις εν λόγω μονάδες καθρεφτίζει και το έντονα οξειδωτικό περιβάλλον που δημιουργείται εντός τους.

#### **Α1.4. Αναδιάρθρωση της Μembrάνης**

##### ***Μονοπάτι γήρανσης της ζώνης-3***

Παρατηρήθηκε επιβάρυνση των μη λευκαφαιρεμένων RBCs όσον αφορά στο συγκεκριμένο μονοπάτι γήρανσης καθώς οι εν λόγω μονάδες εμφανίζουν μετά από 4 εβδομάδες αποθήκευσης αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης ζώνης-3 σε κατάλοιπα τυροσίνης (εξισορρόπηση επιπέδων την 42<sup>η</sup> ημέρα), καθώς επίσης και υψηλότερα ποσοστά ολιγομερισμού της και προσδεδωμένων σε αυτή IgGs. Η ζώνη-3 κατέχει κεντρικό ρόλο στη γήρανση και τη σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου των RBCs. Δομικές και λειτουργικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης όπως η πρωτεόλυση, ο ολιγομερισμός και η φωσφορυλίωσή της σε κατάλοιπα τυροσίνης διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στα μέχρι στιγμής αποδεκτά μοντέλα γήρανσης (Antonellou et al., 2010b; Low et al., 1985; Minetti et al., 1996). Πέραν της γήρανσης όμως η φωσφορυλίωση της ζώνης-3 επάγεται από ερεθίσματα όπως το οξειδωτικό στρες και τα επίπεδα ασβεστίου (Lion et al., 2010; Terra et al., 1998;) και προάγει την πλευρική κινητικότητα της πρωτεΐνης καθώς επίσης και τον ολιγομερισμό της (Ferru et al., 2011; Pantaleo et al., 2009). Από τη στιγμή που μόνο η οξειδωμένη ζώνη-3 φωσφορυλιώνεται και διαχωρίζεται από τον κυτταροσκελετό λόγω οξειδωτικού στρες (Pantaleo et al., 2009), τα υψηλότερα επίπεδα των μη λευκαφαιρεμένων RBCs ενδέχεται να σχετίζονται με τα αντίστοιχα αυξημένα επίπεδα κυστιδιοποίησης που παρατηρούνται στις ίδιες μονάδες (Ferru et al., 2011). Αντίθετα μετά την 5<sup>η</sup> εβδομάδα της αποθήκευσης που τα επίπεδα οξειδωτικής επιβάρυνσης δε διαφέρουν ανάμεσα σε L- και N-μονάδες δεν εμφανίζονται και διαφορές στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης. Οι παρατηρούμενες τροποποιήσεις της ζώνης-3 εμφανίζουν σημαντική συσχέτιση με τη μορφολογία των ερυθροκυττάρων και την κυστιδιοποίηση μέσω των αλλαγών που προκαλούν στις αλληλεπιδράσεις μεμβράνης-υπομεμβρανικού σκελετού (Ferru et al., 2011). Σε απόλυτη ταύτιση με προηγούμενες μελέτες η παρούσα εργασία έδειξε πως η πρόσδεση αυτόλογων IgGs εξαρτάται τόσο από την κατάσταση οξείδωσης/ολιγομερισμού της ζώνης-3 (Turrini et al., 1991) όσο και από τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της σε κατάλοιπα τυροσίνης (Pantaleo et al., 2009).

##### ***Συγκριτικό πρότυπο πρωτεϊνικών μεταβολών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης***

Η παρουσία λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων εντός του ασκού μετάγγισης φαίνεται να προκαλεί επιπλέον πρωτεϊνικό στρες στη μεμβράνη καθώς παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στη έκφραση ποικίλων πρωτεϊνικών δεικτών στρες. Κοινοί δείκτες γήρανσης όπως η συμπλοκοποίηση σπεκτρίνης-Hb, η πρόσδεση οξειδωμένης Hb και IgGs στη μεμβράνη και η απώλεια κύριων γλυκοφορινών εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα στις μη λευκαφαιρεμένες μονάδες. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με προηγούμενες μελέτες (Bratosin et al., 2001) και περαιτέρω προτείνουν

συσχέτιση του φαινοτύπου γήρανσης με τα επίπεδα ενδοκυττάρων ROS και εχινοκυττάρων όπως έχει δείχθει *in vitro* (Snyder et al., 1985). Η πρωτεόλυση σκελετικών πρωτεϊνών όπως η σπεκτρίνη και η 4.1R εμφανίζει υψηλότερα ποσοστά στις περισσότερο οξειδωτικά επιβαρυνμένες μη λευκαφαιρεμένες μονάδες καθώς επίσης και παρόμοιο χρονοεξαρτώμενο πρότυπο με τις ROS υποδεικνύοντας την ύπαρξη σχέσης αιτίας-αιτιατού (D'Amici et al., 2007). Όποιο κι αν είναι το αίτιο, η πρωτεόλυση κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών αποτελεί βασικό παράγοντα κυστιδιοποίησης μέσω της εξασθένησης των συνδέσεων μεμβράνης-υπομεμβρανικού σκελετού κάτι το οποίο υποστηρίζεται από την αύξηση εχινοκυττάρων στα μη λευκαφαιρεμένα RBCs.

Όσον αφορά στις ασβεστοεξαρτώμενες πρωτεΐνες καλπαΐνη και συνεξίνη (Salzer et al., 2002; Glaser et al., 1994), τα αυξημένα επίπεδα που εντοπίστηκαν στις μη λευκαφαιρεμένες μονάδες λογικά οφείλονται στα αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάρου ασβεστίου. Αυξημένα επίπεδα ασβεστίου μπορούν να ενεργοποιήσουν ένζυμα όπως η καλπαΐνη και διαδικασίες όπως η πρωτεόλυση οδηγώντας σε κυτταρική αφυδάτωση και πρωτεϊνική αποδόμηση. Η πρόσδεση της καλπαΐνης οδηγεί σε κυτταροσκελετικά θραύσματα ενώ η δράση ενεργοποιημένης τρανσγλουταμίνωσης 2 επάγει τη συμπλοκοποίηση πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού (Lion et al., 2010). Και τα δύο φαινόμενα επηρεάζουν την πλαστικότητα του κυτταροσκελετού και την ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης των RBCs. Επιπρόσθετα τα υψηλότερα επίπεδα μεμβρανικών τροποποιήσεων σχετιζόμενων με το στρες ασβεστίου στα μη λευκαφαιρεμένα δείγματα συμφωνούν με την αυξημένη εχινοκυττάρωση και την απώλεια ελαστικής παραμόρφωσης (Hess, 2010) εν συγκρίσει με τα λιγότερο επηρεασμένα λευκαφαιρεμένα δείγματα (Henkelman et al., 2010).

Η συγκριτικά μεγαλύτερη απώλεια πρωτεϊνών που εντοπίζονται στα κυστίδια (Kriebardis et al., 2008; Willekens et al., 2008) όπως η ζώνη-3, η στοματίνη, η φλοτιλλίνη, η CD47 και η CD49 σχετίζεται ξεκάθαρα με την εντονότερη κυστιδιοποίηση των μη λευκαφαιρεμένων μονάδων. Πιο συγκεκριμένα προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει μεγάλη απώλεια CD47 παρουσία λευκοκυττάρων (Sparrow et al., 2006) λόγω απελευθέρωσης της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο (Annis et al., 2002). Επίσης η μειωμένη έκφραση CD59 στις N-μονάδες συνάδει με την απώλεια GPI-συνδεδεμένων γλυκοπρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ιδιαίτερα όταν τα ερυθροκύτταρα αποθηκεύονται χωρίς λευκαφαίρεση (Long et al., 1993). Δεδομένου του ρόλου της CD59 ως ρυθμιστή του συμπληρώματος που λειτουργεί προστατεύοντας τα ερυθροκύτταρα μέσω αναστολής δημιουργίας του συμπλόκου μεμβρανικής επίθεσης (Huang et al., 2006), πιθανόν το παραπάνω αποτέλεσμα να επηρεάζει τα ποσοστά επιβίωσης των RBCs μετά από μετάγγιση. Επιπλέον το γεγονός ότι τα μη λευκαφαιρεμένα RBCs φαίνεται να συσσωρεύουν περισσότερες προβληματικές πρωτεΐνες, μπορεί να σχετίζεται με αυξημένη δράση του πρωτεασώματος έναντι των μη λειτουργικών μορίων (Goodman et al., 2007). Εξάλλου η αυξημένη μετατόπιση στη μεμβράνη κυττοσολικών μοριακών συνοδών όπως η Prx2 και η Hsp70 που παρατηρείται στα μη λευκαφαιρεμένα RBCs ως απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα (Antonelou et al. 2010a; D'Alessandro et al., 2012) υποδεικνύει την παρουσία τροποποιημένων πρωτεϊνικών μορφών. Βέβαια ο βαθμός στον οποίο οι δύο αυτές πρωτεΐνες καταφέρνουν να προστατεύσουν και να σταθεροποιήσουν τις προβληματικές πρωτεΐνες σχετίζεται και με τον εκάστοτε βαθμό κυστιδιοποίησης καθώς τόσο η Prx2 όσο και η Hsp70 εντοπίζονται στα κυστίδια (Bosman et al., 2008a).



### **Δ1.5. Συγκριτική Ανάλυση Νεαρών (Y) και Γηρασμένων (S) Ερυθροκυττάρων**

Η παρουσία λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων φαίνεται να επιβαρύνει την εικόνα των ερυθροκυττάρων, καθώς προϊόντος του χρόνου τόσο τα νεαρά (κυρίως) όσο και τα γηρασμένα N-RBCs εμφανίζουν αισθητά υψηλότερα επίπεδα στην πλειονότητα των εξεταζόμενων δεικτών αποθηκευτικής βλάβης. Όσον αφορά στο γηρασμένο υποπληθυσμό, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες στα επίπεδα καρβονυλίωσης. Τα επίπεδα του εν λόγω δείκτη ήταν αυξημένα στα μη λευκαφαιρεμένα RBCs σε όλη την αποθήκευση με την εικόνα να αντιστρέφεται την τελευταία ημέρα της αποθήκευσης πιθανόν λόγω της ιδιαίτερα αυξημένης αιμόλυσης και κυστιδιοποίησης των μη λευκαφαιρεμένων μονάδων. Περνώντας στον υποπληθυσμό των νεαρών ερυθροκυττάρων η σαφώς χειρότερη εικόνα των μη λευκαφαιρεμένων RBCs σε όλους σχεδόν τους πρωτεϊνικούς δείκτες στρες και γήρανσης υποδεικνύει επιτάχυνση του φαινοτύπου γήρανσης παρουσία λευκοκυττάρων.

Η γήρανση είναι μία πολύπλοκη μοριακή διαδικασία που περιλαμβάνει ισχυρές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα κύτταρα και το περιβάλλον τους. Γι αυτό το λόγο διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης (παρουσία ή όχι λευκοκυττάρων) μπορεί να οδηγούν σε διαφορετικό πρότυπο δεικτών οξειδωτικής επιβάρυνσης και κυτταρικής γήρανσης (Antonelou *et al.*, 2010a). Οι έντονες διαφορές σε πρωτεΐνες της μεμβράνης επιβεβαιώνουν τη λειτουργία της μεμβράνης ως ευαίσθητο δείκτη κυτταρικού στρες. Σε αντίθεση λοιπόν με τις μετρήσεις ROS και  $Ca^{2+}$  σε άθικτα κύτταρα, η ανάλυση πρωτεϊνών της μεμβράνης είναι περισσότερο στοχευμένη και πιθανόν αναδεικνύει συγκεκριμένα αποτελέσματα των διαταραχών στα επίπεδα ελευθέρων ριζών και ενδοκυττάρου ασβεστίου. Έτσι ο χαρακτηριστικότερος δείκτης οξειδωτικής επιβάρυνσης είναι η πρόσδεση οξειδωμένης Hb στη μεμβράνη με τα μη λευκαφαιρεμένα RBCs να εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά. Η πρόσδεση σε μεμβρανικές και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες όπως η ζώνη-3 και η σπεκτρίνη (Kriebardis *et al.*, 2007b) δίνει το έναυσμα για έναν καταρράκτη γεγονότων που επηρεάζουν τη δομική ακεραιότητα, τη μορφολογία, την προσκόλληση στο ενδοθήλιο, την ερυθροφαγοκυττάρωση καθώς επίσης και την επιβίωση των RBCs μετά από μετάγγιση (Lion *et al.*, 2010; Lachant *et al.*, 1984; Snyder *et al.*, 1985). Σε αντίθεση με τις ROS του κυττοσολίου, οι ROS που σχηματίζονται κοντά στη μεμβράνη μετά την πρόσδεση Hb δεν είναι επαρκώς προσβάσιμες στα αντιοξειδωτικά του κυττοσολίου και γι αυτό το λόγο μπορεί να είναι ιδιαίτερα δραστικές τόσο τοπικά όσο και σε παρακείμενους ιστούς μετά την απελευθέρωσή τους από τα RBCs (Nagababu *et al.*, 2010). Έχοντας ως δεδομένο ότι τα γηρασμένα κύτταρα δεν απομακρύνονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, ο αυξημένος πληθυσμός τους στις μη λευκαφαιρεμένες μονάδες μπορεί να επιταχύνει την *in vitro* διαδικασία γήρανσης των αποθηκευμένων RBCs (Bratosin *et al.*, 2001). Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν αυξημένη φαγοκυττάρωση μη λευκαφαιρεμένων RBCs *in vitro* (Bratosin *et al.*, 2001) παρατηρήθηκε ότι η γεινίαση με λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια καθιστά τα νεαρά N-RBCs κατά κάποιον τρόπο γηραιότερα σε σύγκριση με τα νεαρά L-RBCs. Μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η έκθεση σε εντονότερο στρες ή/και εντονότερη πτώση στους διαθέσιμους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Lion *et al.* 2010; Jozwik *et al.*, 1997). Όντως, ένζυμα λευκοκυτταρικής και αιμοπεταλιακής προέλευσης καθώς επίσης και αυξημένα επίπεδα ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου ενδέχεται να επιδρούν στη μηχανική σταθερότητα και την ερυθροφαγοκυττάρωση μέσω επιβλαβών αλληλεπιδράσεων με ποικίλα ερυθροκυτταρικά συστατικά (Racek *et al.*, 2001; Greenwalt *et al.*, 1990; Hogman και Meryman,

1999; Weiss, 1980). Ακόμα κι ένα μικρό μέρος της αποθηκευτικής βλάβης των λευκαφαιρεμένων RBCs θα μπορούσε να οφείλεται σε θραύσματα και βιοενεργές ουσίες που απελευθερώνονται από κοκκιοκύτταρα (τα οποία καταστρέφονται εντός των πρώτων 24 ωρών) (Humbert et al., 1991) και μπορούν να περνούν τα φίλτρα λευκαφαίρεσης. Παρόλα αυτά σε γενικές γραμμές τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δείχνουν πως η λευκαφαίρεση καθυστερεί την εξέλιξη της γήρανσης σε αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα πιθανόν μέσω ελάττωσης του οξειδωτικού στρες και βελτίωσης της ομοιόστασης ασβεστίου.

#### **Δ1.6. Πιθανοί Μηχανισμοί Επίδρασης Λευκοκυττάρων-Αιμοπεταλίων στην Αποθηκευτική Βλάβη σε Μοριακό και Κυτταρικό Επίπεδο**

Τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό ποσοστό του συνόλου του κυτταρικού πληθυσμού εντός της μονάδας μετάγγισης. Παρόλα αυτά η συναποθήκευσή τους με τα ερυθροκύτταρα για 42 ημέρες στους 4°C θα μπορούσε να επιδεινώσει τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των RBCs μέσω μίας σειράς βλαβερών διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων. Επιπλέον θα πρέπει να ληφθεί υπόψη πως η πλειονότητα των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων έχουν μικρότερο χρόνο ζωής σε σχέση με τα ερυθροκύτταρα. Για παράδειγμα, τα αιμοπετάλια που προορίζονται για μετάγγιση αποθηκεύονται για 5 ημέρες στους 22°C τη στιγμή που τα ουδετερόφιλα δεν δύναται να αποθηκευθούν. Με δεδομένο το γεγονός ότι ο ασκός μετάγγισης αποτελεί ένα κλειστό σύστημα χωρίς μηχανισμούς εκκαθάρισης, γίνεται εύκολα κατανοητό πως τα κύτταρα επιβιώνουν σε ένα περιβάλλον που χαρακτηρίζεται από συνεχή συσσώρευση επιβλαβών παραπροϊόντων. Τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια επιδρούν στην ακεραιότητα των αποθηκευμένων RBCs μέσω του μεταβολισμού τους, της κατανάλωσης της διαθέσιμης γλυκόζης και της απελευθέρωσης βιοενεργών ουσιών (ελεύθερες ρίζες, ένζυμα, κυτταροκίνες, εξωκυτίδια κ.α.) που παράγονται μετά την απόπτωση ή τη νέκρωσή τους. Η παρατηρούμενη μείωση του αριθμού των λευκοκυττάρων προϊόντος του χρόνου αποθήκευσης οφείλεται στην απόπτωση που υφίστανται αρχικά τα κοκκιοκύτταρα και σε δεύτερο χρόνο τα λεμφοκύτταρα τις πρώτες 2-3 ημέρες αποθήκευσης. Με αυτό τον τρόπο από τις πρώτες μέρες της αποθηκευτικής περιόδου τα RBCs επιβαρύνονται από τη δράση βιοενεργών ουσιών και κυτταρικών θραυσμάτων που μπορούν να αλληλεπιδρούν με αυτά και να πυροδοτούν μονοπάτια κυτταρικής εκκαθάρισης (Frabetti et al., 1998). Είναι γνωστό πως οι παραγόμενες κυτταροκίνες εμπλέκονται στον αποπτωτικό θάνατο τη στιγμή που τα ουδετερόφιλα, μέσω έκκρισης Fas-L, μπορούν να διαμεσολαβούν τη σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου στα λεμφοκύτταρα και στα RBCs. Χαρακτηριστικά, τόσο οι τροποποιήσεις της ζώνης-3 και του κυτταροσκελετού όσο και η έκθεση PS που ακολουθεί το μεμβρανικό μονοπάτι απόπτωσης εντοπίζονται και σε γηρασμένα (*in vivo*) και σε αποθηκευμένα RBCs (Kriebardis et al., 2007a; Antonelou et al., 2010a; Mandal et al., 2003; Mandal et al., 2005).

Τα λευκοκύτταρα και τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αποτελούν σημαντικές πηγές ελευθέρων ριζών και βιολογικά δραστικών ουσιών όσον αφορά την εξέλιξη της γήρανσης και της αποθηκευτικής βλάβης. Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου και αζώτου καθώς επίσης και διαλυτά ένζυμα πλήττουν άμεσα τις ευαίσθητες ερυθροκυτταρικές πρωτεΐνες και τα λιπίδια τη στιγμή που σημαντικές ποσότητες εξωκυστιδίων (λευκοκυτταρικής και αιμοπεταλιακής προέλευσης) εντείνουν την τοξικότητα του υπερκειμένου. Έχει δειχθεί πως οι παραγόμενες από τα ουδετερόφιλα ROS είναι κυτταροτοξικές έναντι των RBCs μέσω ενός μηχανισμού οξείδωσης της Hb (Weiss, 1980) ο οποίος αποδεικνύεται κομβικός για κάποια κύρια μονοπάτια γήρανσης. Επιπρόσθετα, οι προερχόμενες από

λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια πρωτεάσες αναμένεται να προκαλούν σημαντικότερα προβλήματα εντός της μονάδας μετάγγισης εν συγκρίσει με την *in vivo* συνθήκη καθώς τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα στερούνται προστασίας από αναστολείς πρωτεασών του πλάσματος (Bocci et al., 1981). Όσον αφορά τα αιμοπετάλια παρατηρείται έντονη αποθηκευτική βλάβη σε χαμηλές θερμοκρασίες η οποία οδηγεί σε μειωμένη επιβίωση μετά από μετάγγιση, διατήρηση σε κατάσταση ενεργοποίησης και σηματοδότηση μέσω πλασματικής μεμβράνης. Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα: μη αναστρέψιμη παραμόρφωση, αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάρου ασβεστίου και φωσφορυλίωση ζώνης-3 σε κατάλοιπα τυροσίνης, συσσωμάτωση λιπιδικών σχεδίων, έκκριση λυσοσωμικών περιεχομένων, αναδιάρθρωση της επιφανειακής γλυκοπρωτεΐνης Ib, ενεργοποίηση των P38MAPK και φωσφολιπάσης A2, έκκριση αραχιδονικού οξέος, απόπτωση, έκθεση PS και εξωκυστιδιοποίηση (Egidi et al., 2010; Kaufman, 2005; van derWal et al., 2012; Bode και Knupp, 1994). Όντως, βάσει μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν σε μη λευκαφαιρεμένες μονάδες, τα αιμοπεταλιακά κυστίδια συσσωρεύονται στη μονάδα μετάγγισης από την πρώτη ημέρα της αποθήκευσης (ανώτερα επίπεδα την 20<sup>η</sup> ημέρα) σε αντίθεση με τα λευκοκυτταρικά τα οποία εμφανίζουν σημαντική αύξηση μετά την 30<sup>η</sup> ημέρα (Jy et al., 2011). Έχει βρεθεί πως η προ-αποθηκευτική λευκαφαίρεση μειώνει την κυστιδιοποίηση των αποθηκευμένων RBCs και τα επίπεδα μικροκυστιδίων μετά από μετάγγιση (Sugawara et al., 2010). Επιπρόσθετα ο εμπλουτισμός μίας μη λευκαφαιρεμένης μονάδας μετάγγισης σε κυστίδια οδηγεί σε αύξηση του δυναμικού διακυτταρικής επικοινωνίας καθώς τα κυστίδια είναι φορείς ποικίλων σηματοδοτικών ουσιών (μεγάλης συγκέντρωσης) όπως οι κασπάσες και η PS. Ως εκ τούτου μπορούν να εμφανίζουν πλειοτροπισμό στη δράση τους μέσω αλληλεπίδρασης με υποδοχείς ή άμεσης μεταφοράς λιπιδίων και πρωτεϊνών μέσω σύντηξης με την πλασματική μεμβράνη των ερυθροκυττάρων (Mause και Weber, 2010) κάτι το οποίο έχει αναφερθεί *in vivo* (Sloand et al., 2004). Τελικά η μεγάλη ποικιλία εξωκυστιδίων που παρατηρείται στις μη λευκαφαιρεμένες μονάδες αναμένεται να τροποποιεί τους μηχανισμούς σηματοδότησης των αποθηκευμένων RBCs.

### **Δ1.7. Συμπεράσματα**

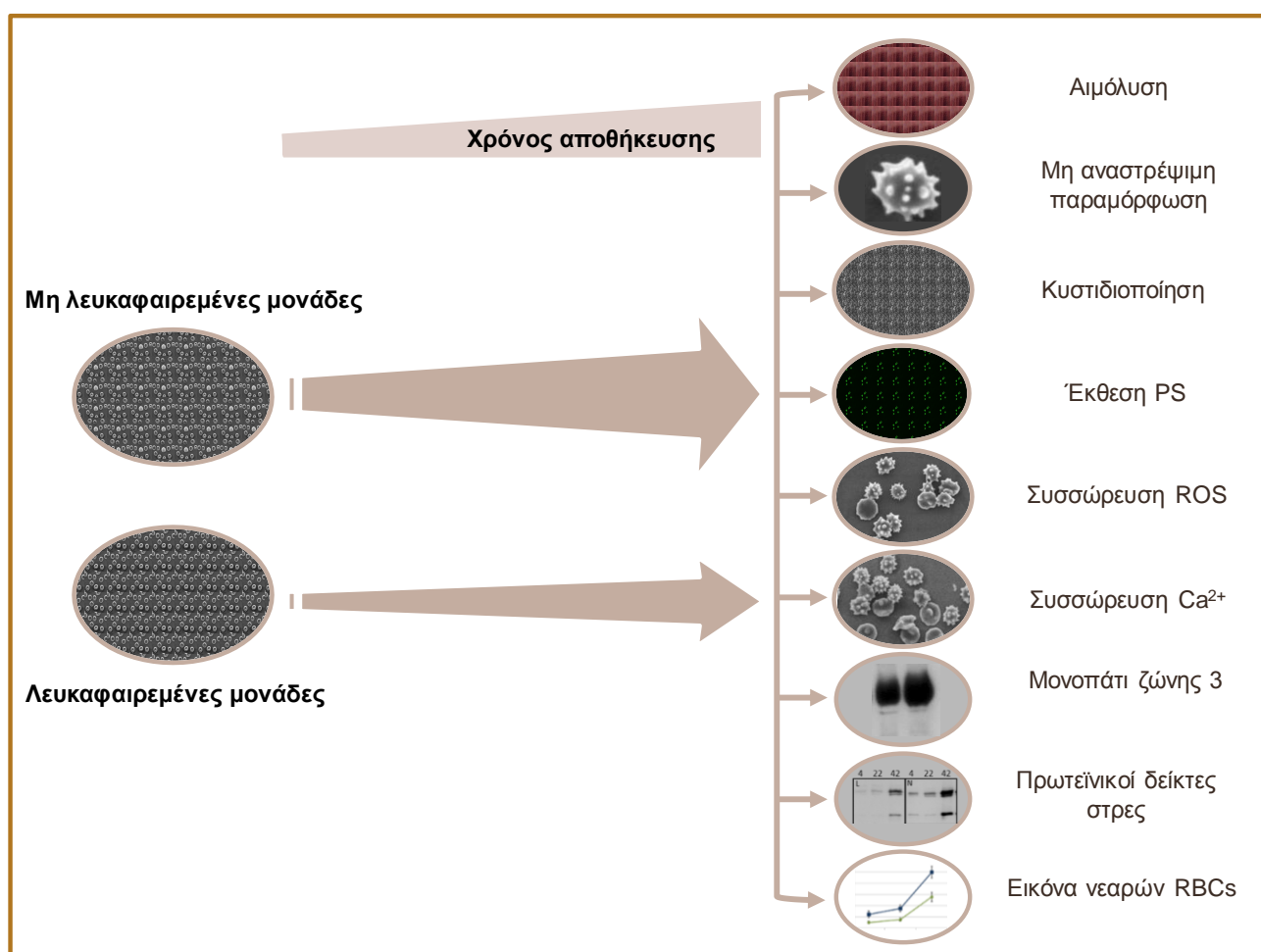
Εστιάζοντας στην εκτίμηση των επιδράσεων της λευκαφαίρεσης σε μοριακό επίπεδο και πιο συγκεκριμένα στους τομείς της αποθηκευτικής βλάβης, κυτταρικής γήρανσης και θανάτου των ερυθρών αιμοσφαιρίων συνοψίζεται πως η λευκαφαίρεση μονάδων μετάγγισης πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων σχετίζεται με τις επιδράσεις που συγκεντρώνονται στην *εικόνα 37*.

Αναλυτικότερα ο συνδυασμός των επιπέδων των παραπάνω παραμέτρων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης αναμένεται να οδηγήσει σε βελτιωμένη *εικόνα* των λευκαφαιρεμένων μονάδων σε σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια σύμφωνα με το ακόλουθο πρότυπο:

- ✓ Η μείωση των κυττάρων μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης από το μέσο της αποθήκευσης και μετά, σε συνδυασμό με τη μειωμένη εξωτερική έκθεση της PS την ίδια περίοδο, τη σταθερότερη παρουσία CD47 στη μεμβράνη και τη βελτιωμένη *εικόνα* του υποπληθυσμού των νεαρών ερυθροκυττάρων ενδέχεται να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα σε κυτταρική εκκαθάριση και αυξημένα επίπεδα βιωσιμότητας μετά από μετάγγιση.
- ✓ Η ελάττωση πρωτεολυτικών θραυσμάτων και διμερών ζώνης-3, σε συνδυασμό με τα μειωμένα επίπεδα φωσφορυλίωσης και οψωνισμού της ζώνης-3 από αυτόλογα IgGs υποδεικνύει καθυστέρηση του σημαντικότερου μονοπατιού γήρανσης των ερυθροκυττάρων.

Σε συνδυασμό με τα χαμηλά επίπεδα Hsp70 τα αποτελέσματα αυτά προδιαθέτουν για καλύτερη πρωτεόσταση λόγω μειωμένης συσσώρευσης προβληματικών πρωτεϊνών στις λευκαφαιρεμένες μονάδες.

- ✓ Τα χαμηλότερα επίπεδα ενδοκυττάριου ασβεστίου καθώς επίσης και ασβεστοεξαρτώμενων πρωτεϊνών όπως η καλπαΐνη και η συνεξίνη αντιστοιχούν σε καθυστέρηση της ερυθρόπτωσης και της κυστιδιοποίησης. Έτσι τα λευκαφαιρεμένα ερυθροκύτταρα διατηρούν σε μεγάλο βαθμό την ακεραιότητα της μεμβράνης τους, τη σηματοδότηση ασβεστίου και την περιεκτικότητά τους σε «ζωτικά» συστατικά.
- ✓ Τα χαμηλότερα επίπεδα ROS, Ptx2 και καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης ή σε μέρος αυτής δείχνουν απουσία έντονου οξειδωτικού περιβάλλοντος εντός των λευκαφαιρεμένων μονάδων.
- ✓ Τέλος, τα σαφώς χαμηλότερα επίπεδα αιμόλυσης και κυστιδιοποίησης των λευκαφαιρεμένων μονάδων ενδέχεται να ελαχιστοποιούν την πιθανότητα κλινικών επιπλοκών στο δέκτη της μετάγγισης.



**Εικόνα 37:** Γραφική απεικόνιση του συνόλου των διαφορών ανάμεσα σε λευκαφαιρεμένες και μη μονάδες. Το μεγαλύτερο βέλος αντιστοιχεί και στην εντονότερη αποθηκευτική βλάβη.



## **Δ2. ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗ ΕΓΓΕΝΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΣΕ ΥΓΙΕΙΣ ΑΙΜΟΔΟΤΕΣ**

Η μεταβλητότητα στις ιδιότητες αποθήκευσης του αίματος από διαφορετικούς δότες έχει αποτελέσει σημαντικό πρόβλημα στην εκατονταετή ιστορία ανάπτυξης των τεχνικών αποθήκευσης αίματος. Είναι γνωστό πλέον πως ερυθροκύτταρα από συγκεκριμένους δότες εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα αιμόλυσης (*Hess et al., 2009*) και χαμηλότερα επίπεδα ανάκτησης *in vivo* 24 ώρες μετά τη μετάγγιση (*Dumont and AuBuchon, 2008*). Ακόμη και στα πλέον σύγχρονα αποθηκευτικά μέσα, διαφορετικοί αιμοδότες εμφανίζουν διαφορετικές δυνατότητες αποθήκευσης με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους να αναδεικνύονται ως ο πιο σημαντικός παράγοντας που οδηγεί σε αιμόλυση εντός του ασκού. Ωστόσο, εκτός από τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης του δότη, δεν έχουν εξεταστεί μέχρι στιγμής άλλα εγγενή χαρακτηριστικά των ερυθρών αιμοσφαιρίων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ποιότητα του προς μετάγγιση αίματος και πιθανότατα την αποτελεσματικότητα της ίδιας της μετάγγισης. Στο παρόν κεφάλαιο συνοψίζονται τα κυριότερα συμπεράσματα, όσον αφορά στην έκταση της ποικιλομορφίας ανάμεσα σε υγιείς αιμοδότες και την επίδραση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του αιμοδότη στην ποιότητα αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων του.

### **Δ2.1. Αιματολογική Εικόνα Αιμοδοτών (*in vivo*)**

#### **Δ2.1.1. Ετερογένεια Μεταξύ Υγιών Αιμοδοτών**

Παρά το γεγονός πως η εξεταζόμενη ομάδα αιμοδοτών δεν παρουσίαζε διαφορές όσον αφορά στην ηλικία (*Rizvi και Maurya, 2007*) και το φύλο, παρατηρήθηκε μεγάλη ετερογένεια σε ποικίλες αιματολογικές και βιοχημικές παραμέτρους. Ένα μέρος αυτής της ποικιλομορφίας οφείλεται στην παρουσία ατόμων ετερόζυγων για β μεσογειακή αναιμία, μία κατάσταση πολύ συχνή ανάμεσα σε Έλληνες (και γενικά Μεσόγειους) αιμοδότες (*Tiwari et al., 2010*). Όπως έχει δειχθεί, η ετεροζυγωτία αυτή επηρεάζει ερυθροκυτταρικούς και αιμοπεταλιακούς δείκτες καθώς επίσης την οσμωτική ευθραυστότητα των RBCs (*Vaya et al., 2014*). Η γεωμετρία των θαλασσαιμικών ερυθροκυττάρων και το πρότυπο διαπερατότητας της μεμβράνης τους σε κατιόντα, είναι οι παράγοντες που τα καθιστούν ανθεκτικά σε αυξημένη οσμωτική πίεση εν συγκρίσει με τα μη θαλασσαιμικά κύτταρα (*Gunn et al., 1972; Schrier et al., 1989*). Αυτό το χαρακτηριστικό σε συνδυασμό με τα χαμηλότερα επίπεδα αιμόλυσης *in vivo* που εμφάνισαν οι συγκεκριμένοι αιμοδότες, ήταν ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένης της επιβαρυντικής δράσης της αποθήκευσης και στις δύο παραμέτρους (*Almizraq et al., 2013*). Ωστόσο η πλειονότητα των αιμοδοτών δεν εμφάνισε ετεροζυγωτία για β μεσογειακή αναιμία και αποτελούνταν από άρρενες εθελοντές χωρίς σιδηροπενική αναιμία (*Booth et al., 2014; Skikne et al., 1984*) καθώς 34% των αιμοδοτών εμφάνιζε αυξημένα επίπεδα σιδήρου στον ορό. Ουσιαστικά η παρατηρούμενη διακύμανση στο αιματολογικό πρότυπο των δοτών δεν μπορεί να αποδοθεί σε παραμέτρους όπως η ηλικία, το φύλο, η παρουσία γενετικών παραγόντων ή η διαταραχή σε παράγοντες ομοιόστασης σιδήρου.

Ανεξαρτήτως προέλευσης, η ετερογένεια μεταξύ των αιμοδοτών *in vivo* ενδέχεται να οδηγεί σε διαφορετικό σημείο έναρξης για την εξέλιξη της αποθηκευτικής βλάβης σε μονάδες μετάγγισης. Όντως, αποκλίνουσες τιμές σε εγγενή χαρακτηριστικά τα οποία επιβαρύνονται από την αποθήκευση, όπως η οσμωτική ευθραυστότητα ή η αιμόλυση (*Almizraq et al., 2013*), αναμένεται να υποσκάπτουν την αποθηκευτική ικανότητα των εν λόγω κυττάρων. Είναι χαρακτηριστική άλλωστε η μεγάλη διακύμανση στην οσμωτική ευθραυστότητα ανάμεσα σε υγιείς αιμοδότες διαφόρων εθνικοτήτων (*Eber et al., 1992*). Παρομοίως, αυξημένα αρχικά επίπεδα σιδήρου και οξειδωτικού στρες σε ένα

σημαντικό ποσοστό ατόμων (25-35%), όπως γίνεται εμφανές από τα επίπεδα καρβονυλίωσης πρωτεϊνών (Dalle-Donne et al., 2003), κλαστερίνης πλάσματος (Trougakos, 2013; Antonelou et al., 2011a), ουρικού οξέος (Ames et al., 1981; Itahana et al., 2014) και ολικής αντιοξειδωτική ικανότητας πλάσματος, αναμένεται να πυροδοτούν οξειδωτικά και γηραντικά μονοπάτια εντός της μονάδας μετάγγισης (Antonelou et al., 2010a; Bosman et al., 2008b). Ακόμα πιο σημαντικό είναι το γεγονός πως ερυθροκύτταρα που προορίζονται για μετάγγιση αλλά χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα σιδήρου και καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών καθώς επίσης και μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα, μπορεί να δημιουργήσουν πρόβλημα σε θαλασσαιμικούς δέκτες οι οποίοι ταλαιπωρούνται από υπερφόρτωση σιδήρου και έντονο οξειδωτικό στρες (Livrea et al., 1996). Τέλος τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης, LDL και τριγλυκεριδίων μπορεί να είναι ενδεικτικά για τροποποιήσεις στην οξειδωση των ερυθροκυττάρων, τη μορφολογία, την ελαστικότητα, τη διαπερατότητα ανιόντων καθώς επίσης και τα επίπεδα αιμόλυσης (Mazzulla et al., 2014). Ως εκ τούτου θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον να μελετηθεί η ικανότητα αποθήκευσης ερυθροκυττάρων που εμφανίζουν τα εν λόγω χαρακτηριστικά *in vivo*.

### **Δ2.1.2. Βιολογικό Δίκτυο Αλληλεπιδράσεων του Αίματος**

Τα δίκτυα χρησιμοποιούνται στη βιολογία για την αναπαράσταση και την ανάλυση σημαντικών διαδικασιών, καθώς επίσης και για την απεικόνιση αλληλεπιδράσεων μεταξύ βιολογικά σχετικών παραγόντων (Yeung et al., 2008; Cline et al., 2007). Αναλόγως το αιματολογικό δίκτυο που κατασκευάστηκε βασίστηκε σε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στις παραμέτρους που μετρήθηκαν. Ουσιαστικά το τελικό αλληλεπιδρόσωμα αποδείχθηκε πολύ κοντά στο πραγματικό δίκτυο *in vivo* καθώς περιελάμβανε τις περισσότερες αναμενόμενες συσχετίσεις. Για παράδειγμα παρατηρήθηκαν συνδέσεις ανάμεσα σε λιποπρωτεΐνες (χοληστερόλη, τριγλυκερίδια κλπ), δείκτες ομοιόστασης σιδήρου (τρανσφερίνη, TIBC κλπ.) και αιματολογικές παραμέτρους (RBC, MCV, MCH κλπ.). Η καρβονυλίωση πρωτεϊνών του πλάσματος λογικά σχετίζεται με την αντιοξειδωτικά ενεργή αλβουμίνη (Quinlan et al., 2005) και τη φερριτίνη (Orino et al., 2001). Επιπλέον, εντοπίστηκαν και κάποιες όχι τόσο προφανείς συσχετίσεις όπως η τοποθέτηση του μονοξειδίου του αζώτου εντός της ομάδας των λιπιδίων του ορού που επιβεβαιώνει την παραγωγή NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από διέγερση από την HDL (Kypreos et al., 2014). Αντίστοιχα η στενή σύνδεση της κλαστερίνης του πλάσματος με αιμοπεταλιακούς δείκτες συνάδει με την αυξημένη επιφανειακή έκφραση της εν λόγω πρωτεΐνης στα αιμοπετάλια (Gnatenko et al., 2003) και την εξωκύττωσή της (Pienimaeki-Roemer et al., 2013), τουλάχιστον κατά την αποθήκευση αιμοπεταλίων. Τέλος ο συνεντοπισμός ασβεστίου και RDW πιθανόν καθρεφτίζει την επίδραση του ασβεστίου στην ικανότητα παραμόρφωσης των ερυθροκυττάρων (Bogdanova et al., 2013), η οποία εμφανίζει μεγάλη διακύμανση σε κυκλοφορούντα κύτταρα που χαρακτηρίζονται από ετερογένεια στο μέγεθος (Patel et al., 2013).

Οι συχνές δια-κυτταρικές συσχετίσεις (π.χ. μονοκύτταρα με αιμοπετάλια και ερυθροκυτταρικούς δείκτες) αντιστοιχούν στις πολύπλοκες αμφίδρομες αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών που παρατηρούνται *in vivo*. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις διαμεσολαβούνται είτε μέσω μηχανισμών δια-κυτταρικής επαφής είτε μέσω διαλυτών παραγόντων (κυτταροκίνες, σίδηρος, κλπ) και μικροκυστιδίων (Mause και Weber, 2010). Το αποτέλεσμα αυτής της επικοινωνίας είναι η ρύθμιση της λειτουργίας (π.χ. αιμόσταση), του κύκλου ζωής (απόπτωση, ερυθροφαγοκυττάρωση) και της κατάστασης ενεργοποίησης (π.χ. φλεγμονώδεις αντιδράσεις) των

ουδετερόφιλων, των μονοκύτταρων, των αιμοπεταλίων και άλλων κυτταρικών τύπων (Scapini και Cassatella, 2014; Pawelski et al., 2014; Antunes et al., 2011; Mebius και Kraal, 2005). Σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, οι προαναφερθείσες συσχετίσεις εξαρτώνται από την παρουσία οξειδωτικού στρες, όπως στην περίπτωση οξειδωμένων/γηρασμένων ερυθροκυττάρων που εμφανίζουν ανοσορυθμιστικές και φλεγμονώδεις δραστηριότητες ζωτικής σημασίας για την εξέλιξη της αθηροσκλήρυνσης (Profumo et al., 2011).

Η παρουσία πολυσυνδετών έδειξε πως το πρότυπο οργάνωσης των αλληλεπιδράσεων δεν είναι τυχαίο αλλά προσομοιάζει με το αντίστοιχο πρωτεϊνικών, μεταβολικών και γενετικών βιολογικών δικτύων (Zhu et al., 2007). Οι δείκτες MCHC, ALP και MCF αποτελούν τους ισχυρότερους αιματολογικούς, βιοχημικούς και βιολογικούς πολυσυνδέτες αντίστοιχα. Η οσμωτική ευθραυστότητα σχετίζεται με όλους τους ερυθροκυτταρικούς δείκτες, συμπεριλαμβανομένης της αιμόλυσης (τυπική συσχέτιση στους ετερόζυγους για β θαλασσαιμία δότες), εκτός του δείκτη MCHC, γεγονός που υποδεικνύει απουσία σφαιροκυττάρωσης ανάμεσα στους δότες (Godal και Heisto, 1981). Η ALP σχηματίζει υποδίκτυο με τα λευκοκύτταρα και παράγοντες μεταβολισμού σιδήρου. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με μελέτες σε επίπεδο γονιδιώματος που δείχνουν πως η ενεργότητα αλκαλικής φωσφατάσης υγιών ατόμων μπορεί να επηρεάζεται από ποικιλία γονιδίων, όπως τα γονίδια των ομάδων αίματος ABO (εκφράζονται σε πολλά κύτταρα πλην των RBCs), και πρωτεΐνη σχετιζόμενη με αποσφαιρίνη (Chambers et al., 2011). Επιπλέον η ALP έχει συσχετιστεί με την τρανσφερίνη του ορού υγιών εφήβων (Misaki et al., 1991) καθώς επίσης και με μη δεσμευμένο σε τρανσφερίνη σίδηρο σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιάλυση (Malyszko et al., 2014).

## **Α2.2. Αποθηκευτική Βλάβη (ex vivo) και Σύνδεση με Εγγενή Χαρακτηριστικά Αιμοδοτών (in vivo)**

### **Α2.2.1. Διακύμανση Ανάμεσα στους Αιμοδότες Προϊόντος του Χρόνου Αποθήκευσης**

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης η ποιότητα των ερυθροκυττάρων υποβαθμίζεται προϊόντος του χρόνου μέσω μίας πληθώρας μηχανισμών κυτταρικής επιβάρυνσης (Antonelou et al., 2012). Οι περισσότερες παράμετροι που εξετάστηκαν εμφάνισαν σημαντική χρονοεξαρτώμενη διαφοροποίηση των επιπέδων τους. Το αντιοξειδωτικό δυναμικό των μονάδων, όπως εκτιμάται από τα επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του υπερκειμένου, καρβονυλίωσης πρωτεϊνών, κλαστερίνης, GSH και ROS, φθίνει σταδιακά (Jozwik et al., 1997). Αντίστοιχα η προοδευτική αύξηση εκκαθαριστών του μονοξειδίου του αζώτου, όπως η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και τα μικροκυστίδια (Donadee et al., 2011), οδηγούν σε κατακόρυφη πτώση του NO εντός της μονάδας. Τέλος, όπως και στο προηγούμενο σκέλος της παρούσας διατριβής, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα μη αναστρέψιμης εχινοκυττάρωσης (D'Alessandro et al., 2012), εξωτερίκευση PS, τροποποιήσεις της ζώνης-3 καθώς επίσης και τροποποιημένης CD47 που λειτουργεί ως σήμα εκκαθάρισης και εντοπίζεται σε περιπτώσεις γήρανσης και οξειδωτικής βλάβης *in vitro* (Burger et al., 2012).

Όσον αφορά στη διακύμανση ανάμεσα στους δότες ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι οι δείκτες οξειδωτικού στρες του πλάσματος εμφάνισαν υψηλά ποσοστά τόσο *in vivo* όσο και *ex vivo*. Η παρατηρούμενη διακύμανση στα επίπεδα NO, κλαστερίνης και προσδεδεμένης στη μεμβράνη Prx2 (Rinalducci et al., 2011) αυξάνεται εντός της μονάδας υποδεικνύοντας διαφορές στην

αντιμετώπιση του οξειδωτικού και αιμολυτικού περιβάλλοντος της μονάδας μετάγγισης μεταξύ των δοτών. Στον αντίποδα, τα κυκλοφορούντα μικροκυστίδια παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές ανάμεσα σε υγιείς αιμοδότες *in vivo*, επιβεβαιώνοντας προηγούμενες μελέτες (Bastos-Amador et al., 2012), και πολύ μικρότερες *ex vivo*. Το αντίστροφο πρότυπο ακολουθείται για τα επίπεδα αιμόλυσης καθώς το περιβάλλον του ασκού επηρεάζει δυσμενώς αλλά με πολύ διαφορετικό τρόπο ερυθροκύτταρα που προέρχονται από διαφορετικούς αιμοδότες (Hess et al., 2009). Επιπρόσθετα τόσο η οσμωτική όσο και η μηχανική ευθραυστότητα παρουσίασαν την αναμενόμενη διακύμανση τόσο προϊόντος του χρόνου όσο και μεταξύ των δοτών (Almizraq et al., 2013; Raval et al., 2010). Εντούτοις ο δείκτης MFI εμφάνισε τριπλάσια διακύμανση σε σχέση με τον αντίστοιχο MCF πριν και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Πιθανόν η ικανότητα των ερυθροκυττάρων να ανταπεξέρχονται στο μηχανικό στρες ρυθμίζεται από περισσότερους και πιο πολύπλοκους μηχανισμούς (π.χ. σύνδεση μεμβράνης – υπομεμβρανικού σκελετού) σε σχέση με τους αντίστοιχους έναντι οσμωτικής καταπόνησης. Τέλος οι πρωτεΐνες με την εντονότερη διακύμανση είναι δείκτες στρες και αντιμετώπισης στρεσογόνων ερεθισμάτων, με χαρακτηριστικότερα παραδείγματα την Prg2, την καλπαΐνη και την Hsp70 ενώ δομικές πρωτεΐνες όπως η σπεκτρίνη εμφανίζουν σχετικά σταθερό πρότυπο. Μία τέτοια διαφορά δείχνει πως η σημαντικότερη διαφορά ανάμεσα σε υγιείς αιμοδότες πιθανόν είναι η ικανότητα προσαρμογής σε συνθήκες μεταβολικού, οξειδωτικού και φυσιολογικού στρες όπως ακριβώς συμβαίνει στο περιβάλλον μίας μονάδας μετάγγισης.

#### **Δ2.2.2. Σύνδεση Εγγενών Χαρακτηριστικών – Αποθηκευτικής Ποιότητας**

Βρέθηκε πως μία σειρά αιματολογικών και βιολογικών παραμέτρων διατηρεί τα ίδια επίπεδα διακύμανσης ανάμεσα στους αιμοδότες τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της αποθηκευτικής περιόδου. Η αναλογία αυτή μπορεί να είναι πολύ χρήσιμη για το χαρακτηρισμό και την κατηγοριοποίηση μονάδων μετάγγισης από τη στιγμή κιόλας της αιμοδοσίας. Έχει προταθεί πως η ολική συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (Agnihotri et al., 2014) και η ποσότητα GSH/GSSG (van't Erve et al., 2014) κατά την αποθήκευση είναι ευθέως ανάλογες των προαποθηκευτικών τους επιπέδων. Αντίστοιχα στην παρούσα μελέτη πέραν των αναμενόμενων αιματολογικών παραμέτρων (MCV, RDW κ.α.) αναδείχθηκαν δείκτες όπως η οσμωτική ευθραυστότητα, η έκθεση PS και η συγκέντρωση NO των οποίων η διακύμανση είναι γραμμική συνάρτηση των επιπέδων του *in vivo*. Αντίθετα, στην περίπτωση της συσσώρευσης κυστιδίων στο υπερκείμενο παρατηρείται αναλογία ανάμεσα στη 2<sup>η</sup> ημέρα και την υπόλοιπη αποθήκευση, πιθανόν λόγω διαφορετικής συμπεριφοράς των ερυθροκυττάρων κατά τη διαδικασία παραγωγής της μονάδας μετάγγισης (π.χ. λευκαφαίρεση). Έχει αναφερθεί πως το 40% σχεδόν της αιμόλυσης που παρατηρείται κατά τη λευκαφαίρεση αντιστοιχεί σε άτομα ετερόζυγα για δρεπανοκυτταρική αναιμία (Hess, 2010).

Επιπρόσθετα εντοπίστηκαν πολλές παράμετροι *in vivo* που παρουσιάζουν επαναλαμβανόμενες συσχετίσεις με άλλες παραμέτρους κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Η τοποθέτηση όλων των επαναλαμβανόμενων συσχετίσεων σε ένα βιολογικό δίκτυο που συνδέει τις *in vivo* και *ex vivo* συνθήκες επιβεβαίωσε τον κομβικό ρόλο παραμέτρων όπως τα MCF, MCHC και RDW (που κατείχαν κεντρική θέση *in vivo*) στην ερυθροκυτταρική ομοίωση. Πρόσφατα προτάθηκε πως τα επίπεδα PS<sup>+</sup> ερυθροκυττάρων *in vivo* σχετίζονται με την αιμόλυση εντός της μονάδας μετάγγισης (Dinkla et al., 2014). Παρομοίως παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στα PS<sup>+</sup> RBCs *in vivo* και το δείκτη MCHC εντός της μονάδας. Παρά το γεγονός ότι οι παρατηρούμενες συσχετίσεις (που δείχνονται για πρώτη φορά σε αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα) δεν



υποκρύπτουν σχέση αιτίας-αιτιατού ανάμεσα στις εμπλεκόμενες μεταβλητές, δε στερούνται βιολογικής λογικής και εξήγησης. Για παράδειγμα, τα μη αναστρέψιμα εχινοκύτταρα *in vivo* σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα έκθεσης PS στα αποθηκευμένα RBCs επιβεβαιώνοντας τη λειτουργική σχέση μεταξύ μορφολογικών αλλοιώσεων και σηματοδότησης κυτταρικής εκκαθάρισης στα ερυθροκύτταρα. Επιπλέον, τα προαποθηκευτικά επίπεδα κλαστερίνης (στο πλάσμα και στα RBCs) εμφανίζουν θετική συσχέτιση με ερυθροκυτταρικούς δείκτες και έκθεση PS στα πακεταρισμένα RBCs υπογραμμίζοντας το ρόλο της στην ερυθροκυτταρική ομοιοστάση και την κυστιδιοποίηση της μεμβράνης (Antonelou *et al.*, 2011a). Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες συσχετίσεις παρατηρήθηκαν όσον αφορά τα επίπεδα HbF *in vivo*. Η εμβρυική αιμοσφαιρίνη κατέχει κεντρική θέση στο δίκτυο και σχετίζεται με δείκτες ευθραυστότητας (αρνητικά) και οξειδωτικής επιβάρυνσης (θετικά) τόσο των RBCs όσο και του υπερκειμένου. Έχει αναφερθεί πως ερυθροκύτταρα πλούσια σε HbF όπως αυτά των νεογνών είναι ανθεκτικά σε οσμωτική καταπόνηση (Gunn *et al.*, 1972) αλλά επιδεκτικά σε ερυθρόπωση μετά από οξειδωτικό στρες (Lang και Lang, 2015). Τα επίπεδα HbF και F-κυττάρων ποικίλουν ευρέως (10-15 φορές) μεταξύ υγιών ενήλικων, υπό την επίδραση μέχρις στιγμής άγνωστων γενετικών παραγόντων. Εν συγκρίσει με την HbA, η HbF έχει μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης με το οξυγόνο και αυξημένο ποσοστό απελευθέρωσης σιδήρου κάτι το οποίο ενδέχεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οξείδωση ερυθροκυτταρικών συστατικών που μπορούν να οδηγήσουν σε νεο-αντιγόνα γήρανσης και ακόλουθη απομάκρυνση από την κυκλοφορία (Comporti *et al.*, 2002). Παρόμοια συσχέτιση υφίσταται και στο δίκτυο ανάμεσα στην αρχή και το τέλος της αποθήκευσης όπου επίδραση με εξωγενές οξειδωτικό ερέθισμα σχετίζεται με πρωτεόλυση της ζώνης-3 και συμπλοκοποίηση σπεκτρίνης-Hb. Τέλος τα επίπεδα του πιο άφθονου αντιοξειδωτικού του πλάσματος, του ουρικού οξέος (Ames *et al.*, 1981) σχετίζονται ισχυρά με την αντιοξειδωτική ικανότητα του υπερκειμένου και άλλες αποθηκευτικές παραμέτρους.

### **Δ2.3. Συμπεράσματα**

Εστιάζοντας στην εκτίμηση της επίδρασης των εγγενών χαρακτηριστικών του αιμοδότη στην ποιότητα των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων και την εξέλιξη αποθηκευτικής βλάβης, της κυτταρικής γήρανσης και θανάτου των ερυθρών αιμοσφαιρίων συνοψίζεται πως:

- ✓ Οι υγιείς αιμοδότες *in vivo* παρά το γεγονός ότι πληρούν τα κριτήρια της αιμοδοσίας δεν αποτελούν έναν ομοιογενή πληθυσμό καθώς μεγάλο ποσοστό αποκλίνει από το φυσιολογικό εύρος διακύμανσης πολλών παραμέτρων όπως είναι η κυτταρική ευθραυστότητα, η αιμόλυση και η αντιοξειδωτική ικανότητα. Η ποικιλομορφία αυτή, τόσο στα ερυθρά αιμοσφαίρια όσο και στο πλάσμα, ενδέχεται να οδηγεί σε διαφορετικό σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη της αποθηκευτικής βλάβης των ερυθροκυττάρων και να σχετίζεται με διαφορετική αποθηκευτική ικανότητα των παραγώγων αίματος.
- ✓ Η προ-αποθηκευτική εικόνα ενός αιμοδότη συνδέεται άμεσα με την ποιότητα αποθήκευσης ερυθροκυττάρων του σε μονάδες μετάγγισης με παραμέτρους όπως οι HbF, MCF, MCHC, RDW κ.α. να αποτελούν κομβικούς δείκτες της ομοιοστάσης του ερυθροκυττάρου τόσο *in vivo* όσο και *ex vivo* όπως γίνεται αντιληπτό μέσω της ανάλυσης δικτύων.

- ✓ Συγκεκριμένοι δείκτες εμφανίζουν μεγαλύτερη διακύμανση εντός της μονάδας μετάγγισης. Τέτοιοι δείκτες αντιστοιχούν κυρίως σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεμβράνη και δείχνουν παρουσία στρεσογόνων παραγόντων ή αντίσταση σε αυτούς, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τη καλπαΐνη, την Ptx2 και την Hsp70 καθώς επίσης και μη πρωτεϊνικοί δείκτες στρες όπως τα επίπεδα μονοξειδίου του αζώτου.
- ✓ Παράμετροι όπως οι PS<sup>+</sup> RBCs, MCV, MCH, MCHC, RDW, MCF, NO και κλαστερίνη πλάσματος φαίνεται πως χαρακτηρίζουν τη μονάδα αποθήκευσης από τη στιγμή της αιμοδοσίας, καθώς η διακύμανσή τους εντός της μονάδας μετάγγισης εξαρτάται άμεσα από τα προαποθηκευτικά τους επίπεδα.
- ✓ Η παρουσία HbF σε φυσιολογικά επίπεδα σχετίζεται κυρίως με την αντιοξειδωτική ικανότητα του υπερκειμένου, την οσμωτική ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων και τη θρομβωτική ικανότητα των ερυθροκυτταρικών κυστιδίων καθώς επίσης και με ποικίλους παράγοντες αποθηκευτική βλάβης (Ptx2, σφαιροεχينوκυττάρωση κ.α.).

### **Δ3. ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗ ΕΓΓΕΝΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΣΕ ΥΓΙΕΙΣ ΑΙΜΟΔΟΤΕΣ**

#### **Δ3.1. Κατηγοριοποίηση Αιμοδοτών με Βάση τα Επίπεδα Ουρικού Οξέος (UA) *in vivo***

Με βάση την ανάλυση συστάδων που πραγματοποιήθηκε το ουρικό οξύ κατηγοριοποιεί την επιλεγμένη ομάδα αιμοδοτών. Επιπλέον αυτή η κατηγοριοποίηση ακολουθείται και από δείκτες ομοιόστασης σιδήρου και οξειδωτικού/αντιοξειδωτικού δυναμικού, όπως επιβεβαιώθηκε μέσω ανάλυσης παραγόντων, δείχνοντας πως η διακύμανση του ουρικού οξέος εντός φυσιολογικών ορίων μπορεί να επηρεάζει τα εγγενή επίπεδα αντιοξειδωτικής άμυνας. Ο παράγοντας που περιέχει το ουρικό οξύ (*Benzie και Strain, 1996*) φαίνεται να αλληλεπιδρά με τον αντίστοιχο των δεικτών σιδήρου (*Cook et al., 1986*) μέσω της καρβονυλίωσης πρωτεϊνών του πλάσματος και του δείκτη TIBC. Όσον αφορά στην καρβονυλίωση, η αρνητική της συσχέτιση με το UA μπορεί να οφείλεται στην ισχυρή αντιοξειδωτική δραστηριότητα του δεύτερου στο πλάσμα (*Ames et al., 1981*). Αν και δεν έχει αναφερθεί σύνδεση ανάμεσα στα επίπεδα σιδήρου και καρβονυλίωσης του πλάσματος, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών σε αιμοκαθαρόμενους ασθενείς που λαμβάνουν σίδηρο ενδοφλέβια (*Michelis et al., 2003*). Αντίστοιχα ο δείκτης TIBC εμφανίζει αναλογία με το ουρικό οξύ, αποτέλεσμα που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που συνδέουν την παραγωγή UA με την ομοιόσταση σιδήρου (*Ghio et al., 2005*). Εξάλλου το UA, μέσω της δράσης του ως χηλικός παράγοντας, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε χημικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει ο σίδηρος με χαρακτηριστικότερη την αναστολή της αντίδρασης Fenton κατά την οποία παράγονται ROS (*Glantzounis et al., 2005*).

#### **Δ3.2. Σύνδεση Επιπέδων UA *in vivo* και Αποθηκευτικής Βλάβης**

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα προαποθηκευτικά επίπεδα ουρικού οξέος σχετίζονται ισχυρά με ιδιαίτερα σημαντικούς δείκτες αποθηκευτικής βλάβης όπως η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του υπερκειμένου, το ενδοκυττάριο ασβέστιο και η μη αναστρέψιμη εχينوκυττάρωση. Η ανάλυση παλινδρόμησης επιβεβαίωσε τη σημασία των επιπέδων UA *in vivo* στη διακύμανση των παραπάνω παραμέτρων εντός της μονάδας μετάγγισης, καθώς 91%, 64% και 74% της μεταβλητότητάς τους αντίστοιχα μπορεί να αποδοθεί στην αντίστοιχη διακύμανση του ουρικού

οξέος. Οι μεταβλητές αυτές αποτελούν παράγοντες κλειδιά της ποιότητας των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων: η TAC του υπερκειμένου αντιπροσωπεύει μία συνολική εκτίμηση του αντιοξειδωτικού δυναμικού, τα σφαιροεχينوκύτταρα (*Blasi et al., 2012; D'Alessandro et al., 2012*) υποσκάπτουν την επιβίωση των RBCs μετά από μετάγγιση (*Grenwalt et al., 1990*) και το ενδοκυττάριο ασβέστιο μπορεί άμεσα ή έμμεσα να προκαλέσει ένα καταρράκτη αντιδράσεων με τελικό αποτέλεσμα την κυτταρική αφυδάτωση, την ερυθρόπτωση, τη εχينوκυττάρωση, τη αποδόμηση πρωτεϊνών κ.α. (*Antonelou et al., 2012; Palek et al., 1974; Bogdanova et al., 2013*). Πρακτικά το εναπομείναν ουρικό οξύ του δότη μπορεί να μειώσει τα επίπεδα ROS/RNS ελαττώνοντας την οξειδωτική επίθεση σε λιπίδια και πρωτεΐνες. Πιθανόν γι αυτό παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση με την καρβονυλίωση πρωτεϊνών του πλάσματος καθώς επίσης και υψηλότερα επίπεδα καρβονυλίωσης *in vivo* στους δότες χαμηλού UA. Επιπλέον τα καλύτερα επίπεδα αντιοξειδωτικής ικανότητας του υπερκειμένου ενδέχεται να ελαχιστοποιούν την οξειδωτική επιβάρυνση των καναλιών  $Ca^{2+}$  βοηθώντας σε καλύτερη ρύθμιση μεταφοράς ιόντων στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα (*Bogdanova et al., 2013*). Έτσι, θεωρητικά τουλάχιστον, δεν παρατηρείται απώλεια  $K^+$  από τα κανάλια Gardos και αποφεύγεται η κυτταρική συρρίκνωση (*Bogdanova et al., 2013*), η κυστιδιοποίηση και η σφαιροεχينوκυττάρωση (*Kiefer και Snyder, 2000*). Το σύνολο των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων, που αφορούν χαμηλότερα επίπεδα εχينوκυττάρων και ενδοκυτταρίου ασβεστίου, καθυστερημένη πρόσδεση καλπαΐνης και Prx2 στη μεμβράνη και καλύτερη διατήρηση της φλοτιλλίνης-2 των λιπιδικών σχεδίων (*Kriebardis et al., 2007a*) συνάδει με την παραπάνω υπόθεση.

Επιπρόσθετα το ουρικό οξύ μπορεί να δρα και ενδοκυττάρια. Έχει αναφερθεί πως το UA μπορεί να εισέρχεται σε οξειδωμένα ή καρκινικά κύτταρα για να αντιμετωπιστεί η οξειδωτική βλάβη (*Itahana et al., 2014*). Στα ερυθροκύτταρα συγκεκριμένα το UA του πλάσματος εισέρχεται είτε μέσω παθητικής διάχυσης είτε μέσω ATP εξαρτώμενου υποδοχέα (*Lucas-Heron και Fontenaille, 1979*). Η διαπερατότητα της μεμβράνης σε UA αυξάνεται σε χαμηλές τιμές pH (*Lucas-Heron και Fontenaille, 1979*), παρόμοιες με αυτές που συναντώνται σε μονάδες μετάγγισης (*Pallotta et al., 2014*) με αποτέλεσμα τη σταδιακή αύξηση του ρυθμού εισόδου προϊόντος του χρόνου αποθήκευσης (*Buzdygon και Zydney, 1989*). Στην παρούσα μελέτη η σημαντική μείωση της ενεργότητας UA που παρατηρήθηκε την 21<sup>η</sup> ημέρα συμπίπτει με την απότομη αύξηση ενδοκυτταρίων ROS και τη δεδομένη πτώση στο pH (*Hess και Greenwalt, 2002*), δύο συνθήκες που ευνοούν την είσοδο εντός των αποθηκευμένων RBCs.

Η παραγωγή ριζών υδροξυλίου, ως αποτέλεσμα της αυξημένης συγκέντρωσης σιδήρου και οξυγόνου, αποτελεί πρωταρχικό μηχανισμό οξειδωτικής βλάβης των ερυθροκυττάρων (*Jozwik et al., 1997*). Έχοντας ως δεδομένο τον προστατευτικό ρόλο των ηλικικών παραγόντων έναντι των προϊόντων των αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss που πραγματοποιούνται κατά κόρον στα ερυθροκύτταρα, πιθανόν ο πιο σημαντικός ρόλος του UA να είναι ο σχηματισμός συμπλόκων με ιόντα  $Fe^{3+}$  κι επομένως η αναστολή των σχετιζόμενων με σίδηρο οξειδωτικών αντιδράσεων (*Miura et al., 1993*). Έχει δειχθεί πως παρουσία UA η υπεροξειδωση των λιπιδίων του πλάσματος και της μεμβράνης, η αιμόλυση που προάγεται από υπεροξειδία (*Becker, 1993*) και η διαμεσολαβούμενη από νιτρώδη ιόντα οξείδωση της αιμοσφαιρίνης (*Smith et al., 1991*) σταματούν ή καθυστερούν. Επιπλέον, εντός των RBCs το ουρικό οξύ αποτρέπει την οξείδωση της αιμοσφαιρίνης σε μεθαιμοσφαιρίνη και αιμοχρώματα και πιθανόν τον ακόλουθο ολιγομερισμό της ζώνης-3 (*Low et al.,*

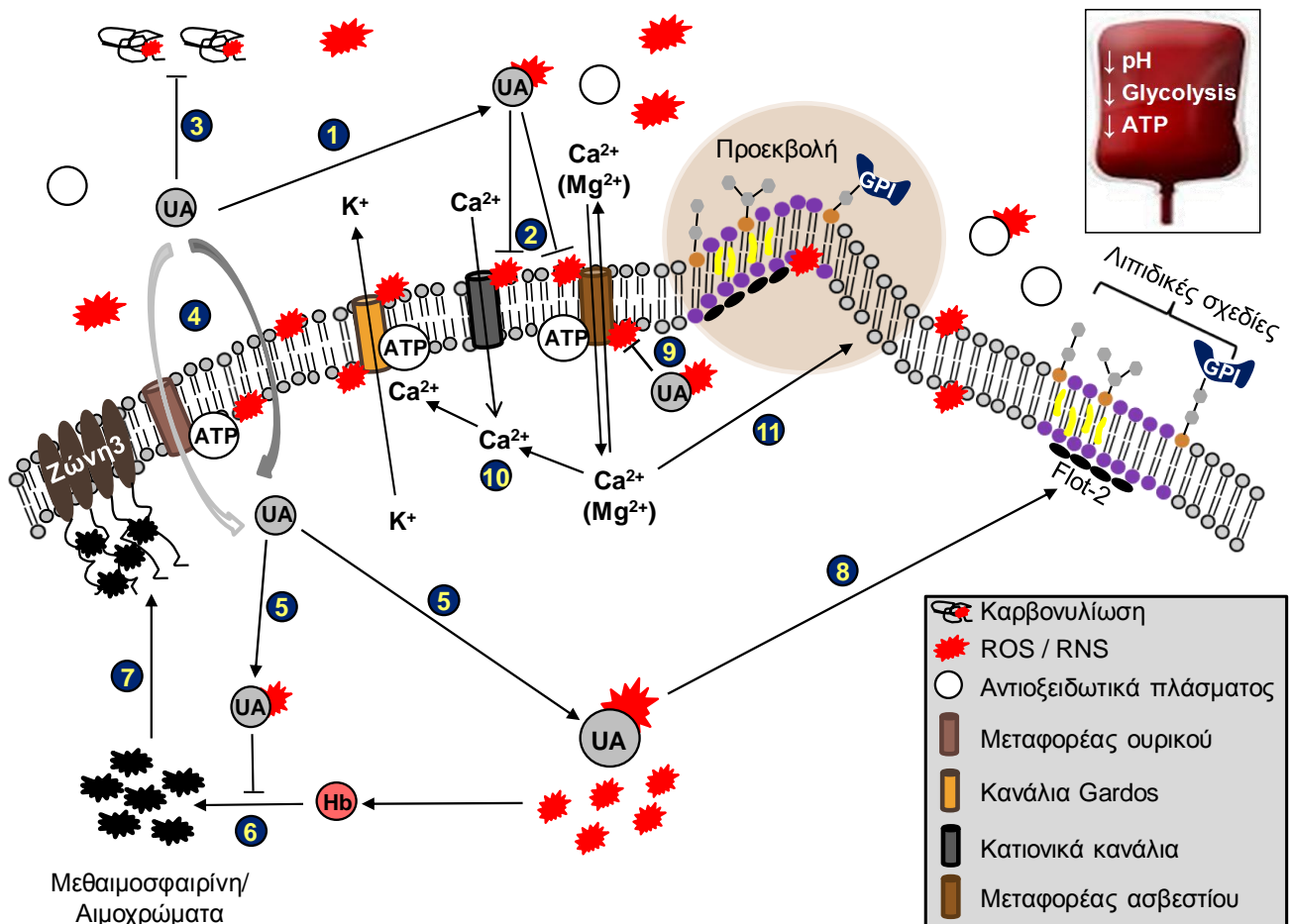
1985; Bosman et al., 2008a; Kriebardis et al., 2007b) όπως δείχθηκε και στην παρούσα μελέτη στους δότες υψηλού UA.

Όπως κάθε αντιοξειδωτική ουσία, έτσι και το UA μπορεί να δρα οξειδωτικά με τη ρίζα ουρικού και την αλλαντοΐνη να αποτελούν τα συνήθη προϊόντα οξείδωσής του. Εντούτοις η ρίζα ουρικού μπορεί να αντιδρά με το ασκορβικό οξύ προς παραγωγή της πιο ακίνδυνης ρίζας ασκορβικού (Becker, 1993). Ταυτόχρονα είναι γνωστό πως ο μεταφορέας GLUT-1 σε συνεργασία με τη στοματίνη διαμεσολαβούν στη μεταφορά αφυδρο-ασκορβικού εντός των RBCs όπου και ανάγεται σε ασκορβικό οξύ (Montel-Hagen et al., 2008). Ο συνδυασμός των παραπάνω δεδομένων με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης που δείχνουν τάση για υψηλότερα επίπεδα GLUT-1 στους δότες χαμηλού UA *in vivo* υποδεικνύει πιθανή αλληλεπίδραση ανάμεσα σε ουρικό και ασκορβικό οξύ. Προς επιβεβαίωση, έχει προταθεί πως η οξείδωση του ασκορβικού προχωρά πολύ πιο αργά από την αντίστοιχη του ουρικού σε περιπτώσεις όπως η ουραιμία (Bakaev et al., 1999). Προφανώς όμως οι αντιδράσεις αυτές είναι αμφίδρομες και η δυναμική ισορροπία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών πολύπλοκη με αποτέλεσμα το UA να μπορεί κάλλιστα να λειτουργεί και ως οξειδωτικό.

### **Δ3.3. Μοντέλο Δράσης Ουρικού Οξέος Εντός της Μονάδας Μετάγγισης**

Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν σε συνδυασμό με: α) την ισχύ των στατιστικών μοντέλων (πολυπαραμετρική ανάλυση και ανάλυση παλινδρόμησης) που παρήχθησαν κατά την ανάλυση, β) την κινητική του ουρικού οξέος και γ) την αντιοξειδωτική του δράση, οδήγησαν στην πρόταση του μοντέλου δράσης που ακολουθεί (εικόνα 38). Ακολουθώντας τη σειρά των γεγονότων που αναπαρίστανται στην εικόνα 38 προτείνεται ότι: 1) Το UA αρχικά δρα εξωκυττάρια ως εκκαθαριστής ROS (Ames et al., 1981) μειώνοντας τις οξειδωτικές επιθέσεις σε μεμβρανικά κανάλια και μεταφορείς. 2) Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται καλύτερη ρύθμιση των καναλιών που σχετίζονται με το ασβέστιο καθώς επίσης και της αντλίας  $Ca^{2+}$  (Bogdanova et al., 2013). 3) Επιπρόσθετα, η ελάττωση των εξωκυττάρια ROS μπορεί να αναστείλει εν μέρει την καρβονυλίωση πρωτεϊνών του υπερκειμένου. 4) Η προοδευτική μείωση του pH στο υπερκείμενο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού εισόδου του UA στο ερυθροκύτταρο με το φαινόμενο να είναι ανάλογο του χρόνου αποθήκευσης (Buzdygon και Zydney, 1989). Η είσοδος του UA γίνεται είτε με παθητική διάχυση είτε με ενεργητική μεταφορά (Lucas-Heron και Fontenaille, 1979). 5) Στο εσωτερικό των ερυθροκυττάρων το UA εκκαθαρίζει ROS και RNS (Itahana et al., 2014), 6) περιορίζοντας τη μετατροπή της αιμοσφαιρίνης σε μεθαιμοσφαιρίνη και αιμοχρώματα (Smith et al., 1991), 7) επομένως και τον ολιγομερισμό της ζώνης-3 στη μεμβράνη. 8) Ένα άλλο σημαντικό όφελος της ενδοκυττάριας δράσης του UA είναι η καλύτερη διατήρηση των λιπιδικών σχεδίων (όπως γίνεται εμφανές από τα υψηλότερα επίπεδα φλοτιλλίνης-2 στους δότες υψηλού ουρικού) και 9) η εκ των έσω βελτιωμένη ρύθμιση κατιονικών καναλιών που εξασφαλίζει την ισορροπημένη είσοδο/έξοδο ιόντων ασβεστίου αποτρέποντας τη συσσώρευση εντός των RBCs. 10) Ως εκ τούτου τα χαμηλά επίπεδα ενδοκυττάριας ασβεστίου ελαχιστοποιούν την ενεργοποίηση των καναλιών Gardos και τις απώλειες ιόντων  $K^+$ . 11) Τελικά φαίνεται πως αποτρέπεται η κυτταρική συρρίκνωση (Bogdanova et al., 2013), η κυστιδιοποίηση της μεμβράνης και μειώνονται τα επίπεδα κυττάρων μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης (Kiefer και Snyder, 2000) εντός της μονάδας μετάγγισης.





**Εικόνα 38:** Προτεινόμενο μοντέλο για την άμεση δράση του ουρικού οξέος κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε μονάδες μετάγγισης. Οι δύο ομάδες δοτών διαφέρουν καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης στα επίπεδα ενεργότητας του ουρικού οξέος, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει και τις διαφορές μεταξύ τους σε ποικίλους παράγοντες.

Παρόλα αυτά δεν αποκλείεται η συσχέτιση του ουρικού οξέος να είναι έμμεση και να μην οφείλεται σε απευθείας δράση του εντός της μονάδας μετάγγισης. Πιθανόν τα ερυθροκύτταρα δοτών χαμηλού UA να αντιπροσωπεύουν περιπτώσεις χειρότερων βασικών επιπέδων (τη στιγμή της αιμοδοσίας) οξειδωτικής επιβάρυνσης και αντιοξειδωτικού δυναμικού, ως αποτέλεσμα της χρόνιας επαφής με ένα φτωχό σε ουρικό οξύ περιβάλλον. Όντως, οι δότες χαμηλού UA χαρακτηρίζονται από χαμηλότερα επίπεδα TAC και ταυτόχρονα παθολογικές τιμές καρβονυλίωσης πρωτεϊνών του πλάσματος *in vivo*. Επιπλέον παρατηρείται τάση για χειρότερα επίπεδα κλαστερίνης του πλάσματος, και ενδοκυττάρων επιπέδων GSH και Prx2 με τα επίπεδα κλαστερίνης να αναδεικνύονται παθολογικά (*in vivo*) μόνο στους δότες χαμηλού ουρικού οξέος. Με δεδομένο ότι η κλαστερίνη εμπλέκεται σε ποικίλες φυσιολογικές διαδικασίες (γήρανση, απόπτωση, κυστιδιοποίηση, φλεγμονή κ.α.) (Trougakos και Gonos, 2009; Antonelou et al., 2011a) και σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα UA σε υγιείς ενήλικες το αποτέλεσμα αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον (Won et al., 2014).

### **Δ3.4. Συμπεράσματα**

Σε κάθε περίπτωση, είτε μέσω άμεσης δράσης εντός της μονάδας μετάγγισης είτε μέσω επίδρασης στα βασικά επίπεδα οξειδωτικού/αντιοξειδωτικού δυναμικού των δοτών, η διακύμανση του ουρικού οξέος *in vivo* φαίνεται να μην είναι ουδέτερη όσον αφορά στην αποθηκευτική βλάβη των ερυθροκυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής ο ρόλος του ουρικού οξέος συνοψίζεται στα ακόλουθα:

- ✓ Το ουρικό οξύ *in vivo* αναδεικνύεται σε σημαντικό παράγοντα κατηγοριοποίησης υγιών τακτικών αιμοδοτών καθώς τα επίπεδά του ομαδοποιούν αποτελεσματικά ένα τυχαίο δείγμα 78 ατόμων. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερης σημασίας αν ληφθεί υπόψη ότι η ανάλυση συστάδων περιελάμβανε το σύνολο των εξεταζόμενων παραμέτρων (N=48). Επιπλέον το ουρικό οξύ κατατάσσεται στην ίδια ομάδα συγγένειας παραμέτρων με τις μεταβλητές TAC και TIBC, οι οποίες διαφέρουν μερικώς ανάμεσα στις διαφορετικές ομάδες ουρικού οξέος, αλληλεπιδρώντας με σημαντικούς παράγοντες της ομοιόστασης σιδήρου.
- ✓ Δότες υψηλού ουρικού οξέος εμφανίζουν τάση για καλύτερη διακύμανση σε όλες σχεδόν τις αποθηκευτικές παραμέτρους που εξετάστηκαν και σχετίζονται με την οξειδωση και την κυτταρική γήρανση.
- ✓ Το ουρικό οξύ του αιμοδότη *in vivo* (εντός των φυσιολογικών ορίων) μπορεί να κατηγοριοποιήσει το προς μετάγγιση προϊόν όσον αφορά σε βαρύνουσας σημασίας παραμέτρους οξειδωτικής επιβάρυνσης, ομοιόστασης ασβεστίου και μη αναστρέψιμων μεταβολών και να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης πρόβλεψης (με επαρκή ακρίβεια) των εν λόγω χαρακτηριστικών. Ως εκ τούτου το ουρικό οξύ μπορεί να λειτουργήσει ως ένας εύχρηστος, προσβάσιμος και οικονομικός βιοδείκτης αποθηκευτικών βλαβών.

### **Δ4. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Παρά το γεγονός ότι η παρούσα διατριβή εστίασε στην επίδραση της διαδικασίας της λευκαφαίρεσης και των εγγενών χαρακτηριστικών του δότη (donor variation) στην αποθηκευτική βλάβη, ελέγχθηκε μία πληθώρα παραμέτρων που ξεχωριστά ή στο σύνολό τους ενδέχεται να επιδρούν στην ποιότητα των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων. Ως εκ τούτου τα βασικά συγκεντρωτικά συμπεράσματα της συγκεκριμένης μελέτης συνοψίζονται στα εξής:

- ✓ Η αποθηκευτική βλάβη δεν σχετίζεται μόνο με τη διάρκεια αποθήκευσης. Ενδέχεται άλλοι παράγοντες όπως ο χειρισμός των μονάδων μετάγγισης (λευκαφαίρεση) και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του δότη να διαδραματίζουν σημαντικότερο ρόλο.
- ✓ Κρίνοντας με αμιγώς *ex vivo* δεδομένα (είναι απαραίτητες και μετα-μεταγγισιακές μελέτες) προτείνεται η χρήση της προ-αποθηκευτικής λευκαφαίρεσης στην κλινική πράξη.
- ✓ Ποικίλες παράμετροι εμφανίζουν ιδιαίτερα αυξημένα ποσοστά διακύμανσης ανάμεσα σε υγιείς αιμοδότες τόσο *in vivo* όσο και *ex vivo* με τη διακύμανση αυτή να αποδεικνύεται πως δεν είναι ουδέτερη όσον αφορά στην αποθηκευτική βλάβη.

- ✓ Τη στιγμή της αιμοδοσίας υπάρχει η δυνατότητα χαρακτηρισμού της μονάδας μετάγγισης και πρόβλεψης της αποθηκευτικής βλάβης για ποικίλες παραμέτρους συμπεριλαμβανομένων τόσο αιματολογικών όσο και βιολογικών παραμέτρων.
- ✓ Για πρώτη φορά προτείνεται ένας εύκολος, γρήγορος και οικονομικός δείκτης αποθηκευτικής βλάβης όπως το ουρικό οξύ, ο οποίος χαρακτηρίζει ένα καλό ασκό.
- ✓ Η γεφύρωση της προ-αποθηκευτικής εικόνας του αιμοδότη με την αποθηκευτική βλάβη και η εύρεση εύχρηστων βιοδεικτών που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη, μπορούν να αποτελέσουν το αναγκαίο πρώτο βήμα για τη σωστότερη διαχείριση των πολύτιμων αποθεμάτων αίματος και την εξέλιξη των συστημάτων αποθήκευσης προς όφελος του μεταγγιζόμενου οδηγώντας την ιατρική των μεταγγίσεων στην πολυπόθητη εξατομίκευση της μετάγγισης αίματος.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Όπως όλα τα κύτταρα που βρίσκονται έξω από το φυσιολογικό τους περιβάλλον έτσι και τα ερυθρά αιμοσφαίρια υπόκεινται σε μία σειρά βλαβών κατά τη διάρκεια της παραμονής τους σε μονάδες μετάγγισης. Το σύνολο των μεταβολικών, μηχανικών και μεμβρανικών αλλαγών στη λειτουργία και την ακεραιότητα των ερυθροκυττάρων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, το οποίο ενδέχεται να επηρεάζει την επιβίωση και λειτουργία *in vivo* (μετά τη μετάγγιση δηλαδή), ονομάζεται «Αποθηκευτική Βλάβη των Ερυθροκυττάρων». Οι βλάβες κατά την αποθήκευση *ex vivo* μπορούν να διακριθούν σε: α) Βιοχημικές αλλαγές (πτώση του pH, μείωση 2,3 DPG και ATP, αύξηση ενδοκυτταρικού ασβεστίου, επιδεκτικότητα σε οξειδωτικό στρες κ.α.), β) Μηχανικές αλλαγές (ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης, μετασχηματισμός σε σφαιροεχινοκύτταρα κ.α.) και γ) Μεμβρανικές αλλαγές (απώλεια λιπιδίων, εξωτερίκευση PS, μεταβολή σε επιφανειακούς δείκτες, αλλαγές στην πρωτεϊνική σύσταση της μεμβράνης κ.α.).

Η πλειονότητα των παραπάνω βλαβών οδηγεί σε φαινότυπο παθολογικών ή/και γηρασμένων ερυθροκυττάρων (μείωση στη μεταβολική ενεργότητα, αλλαγή στο σχήμα των κυττάρων, αναδόμηση της μεμβράνης, οξειδωτικές βλάβες στο κύτταρο, μικροκυστιδιοποίηση και εξωτερίκευση επιφανειακών δεικτών αναγνώρισης και απομάκρυνσης). Η γήρανση με τις αλλαγές που επιφέρει, αποτελεί έναν από τους παράγοντες που θα οδηγήσουν τα ερυθροκύτταρα σε εκκαθάριση κυρίως μέσω φαγοκυττάρωσης. Πέραν όμως της απομάκρυνσης μέσω φαγοκυττάρωσης, τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι δυνατό να οδηγηθούν σε Προγραμματισμένο Κυτταρικό Θάνατο (ΠΚΘ) και πιο συγκεκριμένα με απόπτωση μέσω μεμβρανικών υποδοχέων ή με ερυθρόπτωση. Σε κάθε περίπτωση ένα ποσοστό των προς μετάγγιση ερυθροκυττάρων θα καταστραφεί οδηγώντας σε μείωση της αποτελεσματικότητας της μετάγγισης.

Έχει δειχθεί πως έξι παράγοντες επηρεάζουν το ποσοστό ανάκτησης των ερυθροκυττάρων μετά από αποθήκευση. Οι παράγοντες αυτοί είναι: 1) η διάρκεια της αποθήκευσης, 2) το είδος πλαστικοποιητή που χρησιμοποιείται στη μονάδα, 3) η σύνθεση του διαλύματος συντήρησης, 4), ο όγκος του διαλύματος συντήρησης, 5) η ποιότητα της λευκαφαίρεσης, και 6) η έως τώρα δυσερμήνευτη διακύμανση των διαφορετικών δοτών όσον αφορά στην ικανότητα αποθήκευσης των ερυθροκυττάρων τους. Είναι γνωστό πλέον πως ερυθροκύτταρα από συγκεκριμένους δότες εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα αιμόλυσης και χαμηλότερα επίπεδα ανάκτησης 24 ώρες μετά τη μετάγγιση. Ακόμη και στα πλέον σύγχρονα αποθηκευτικά μέσα, διαφορετικοί αιμοδότες εμφανίζουν διαφορετικές δυνατότητες αποθήκευσης με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους να αναδεικνύονται ως ο πιο σημαντικός παράγοντας που οδηγεί σε αιμόλυση εντός του ασκού ακόμη και όταν λαμβάνονται υπόψη όλοι οι υπόλοιποι παράγοντες που προαναφέρθηκαν (λευκαφαίρεση, διάρκεια αποθήκευσης, είδος και όγκος συντηρητικού διαλύματος κλπ). Ωστόσο, εκτός από τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης του δότη, δεν έχουν εξεταστεί μέχρι στιγμής άλλα εγγενή χαρακτηριστικά των ερυθρών αιμοσφαιρίων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ποιότητα του προς μετάγγιση αίματος και πιθανότατα την αποτελεσματικότητα της ίδιας της μετάγγισης.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της σηματοδότησης κυτταρικής γήρανσης και θανάτου *in vitro* σε ποικίλες συνθήκες (όπως η λευκαφαίρεση) που χρησιμοποιούνται εξίσου για μεταγγίσεις και η πιθανή συσχέτιση αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών με εγγενή φυσιολογικά χαρακτηριστικά των επιλεγμένων δοτών *in vivo*.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε φλεβικό αίμα από 215 άρρενες υγιείς αιμοδότες οι οποίοι πληρούσαν τα κριτήρια της αιμοδοσίας καθώς επίσης και αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα από 26 μονάδες μετάγγισης. Τα δείγματα ελέγχθηκαν για ποικίλες αιματολογικές, βιοχημικές και βιολογικές παραμέτρους. Μεταξύ άλλων πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής για τον έλεγχο τροποποίησης επιφανειακών δεικτών, παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης για μελέτη της μορφολογίας καθώς επίσης και φωτομετρικές και φθορισμομετρικές μέθοδοι ελέγχου βιοχημικών και φυσιολογικών παραμέτρων των ερυθροκυττάρων.

Τα αποτελέσματα της μελέτης επίδρασης της **λευκαφαίρεσης** έδειξαν πως η απομάκρυνση λευκών αιμοσφαιρίων από τη μονάδα μετάγγισης οδηγεί σε:

1. Καλύτερη διατήρηση της ακεραιότητας της μεμβράνης λόγω μειωμένων επιπέδων κυττάρων μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης (σφαιροεχινοκύτταρα), εξωκυστιδιοποίησης, αιμόλυσης και εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης στις λευκαφαιρεμένες μονάδες σε σχέση με τις μη λευκαφαιρεμένες.
2. Χαμηλότερα επίπεδα δεικτών οξειδωτικής επιβάρυνσης όπως ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, καρβονυλίωση πρωτεϊνών της μεμβράνης και πρόσδεση υπεροξειδοξίνης-2 στη μεμβράνη των λευκαφαιρεμένων δειγμάτων.
3. Καθυστέρηση της ερυθρόπτωσης μέσω μειωμένων επιπέδων ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$  και πρόσδεσης της ασβεστοεξαρτώμενης πρωτεΐνης στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη.
4. Χαμηλότερα επίπεδα τροποποιήσεων (φωσφορυλίωση, ολιγομερισμός, πρόσδεση IgGs) της ζώνης-3 που σχετίζονται με το βασικό μονοπάτι γήρανσης του ερυθροκυττάρου.
5. Βελτιωμένη εικόνα νεαρών ερυθροκυττάρων στις λευκαφαιρεμένες μονάδες.

Τα αποτελέσματα της μελέτης επίδρασης των **εγγενών χαρακτηριστικών του αιμοδότη** έδειξαν πως:

1. Οι υγιείς αιμοδότες *in vivo* παρά το γεγονός ότι πληρούν τα κριτήρια της αιμοδοσίας δεν αποτελούν έναν ομοιογενή πληθυσμό καθώς μεγάλο ποσοστό αποκλίνει από το φυσιολογικό εύρος διακύμανσης πολλών παραμέτρων όπως είναι η κυτταρική ευθραυστότητα, η αιμόλυση και η αντιοξειδωτική ικανότητα.
2. Η προ-αποθηκευτική εικόνα ενός αιμοδότη συνδέεται άμεσα με την ποιότητα αποθήκευσης ερυθροκυττάρων του σε μονάδες μετάγγισης.
3. Παράμετροι όπως οι HbF, MCF, MCHC, RDW κ.α. διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ομοιόσταση του ερυθροκυττάρου τόσο *in vivo* όσο και *ex vivo*, όπως γίνεται αντιληπτό μέσω της ανάλυσης δικτύων.
4. Δείκτες με μεγαλύτερη διακύμανση εντός της μονάδας μετάγγισης αποτελούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεμβράνη (καλπαΐνη, Hsp70 κ.α.) και μη πρωτεϊνικοί δείκτες στρες (κλαστερίνη και μονοξειδίο του αζώτου στο πλάσμα).
5. Πέραν των αιματολογικών χαρακτηριστικών (MCV, MCH, MCHC, RDW) παράμετροι όπως η εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, η οσμωτική ευθραυστότητα και η κλαστερίνη πλάσματος εμφανίζουν διακύμανση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης η οποία είναι ανάλογη των επιπέδων τους *in vivo*, χαρακτηρίζοντας τη μονάδα μετάγγισης.
6. Η παρουσία HbF *in vivo* σε φυσιολογικά επίπεδα φαίνεται να κατηγοριοποιεί τις παραγόμενες μονάδες μετάγγισης όσον αφορά σε παραμέτρους όπως η αντιοξειδωτική ικανότητα

του υπερκειμένου, η οσμωτική ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων και η θρομβωτική ικανότητα των ερυθροκυτταρικών κυστιδίων.

7. Δότες φυσιολογικά αυξημένων επιπέδων ουρικού οξέος *in vivo* εμφανίζουν καλύτερο πρότυπο εξέλιξης της αποθηκευτικής βλάβης ερυθροκυττάρων (σφαιροεχινοκύτταρα, ενδοκυττάρια ασβέστιο, αντιοξειδωτικοί δείκτες, επίπεδα πρωτεϊνών της μεμβράνης ή σχετιζόμενων με αυτή κ.α.)

8. Το ουρικό οξύ του αιμοδότη *in vivo* (εντός των φυσιολογικών ορίων) μπορεί να κατηγοριοποιήσει το προς μετάγγιση προϊόν όσον αφορά σε βαρύνουσας σημασίας παραμέτρους οξειδωτικής επιβάρυνσης, ομοιοστάσης ασβεστίου και μη αναστρέψιμων μεταβολών και να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης πρόβλεψης των εν λόγω χαρακτηριστικών.

Συμπερασματικά η αποθηκευτική βλάβη δε σχετίζεται μόνο με τη διάρκεια της αποθήκευσης. Ενδέχεται άλλοι παράγοντες, όπως ο χειρισμός των μονάδων μετάγγισης (λευκαφαίρεση) και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του δότη να διαδραματίζουν σημαντικότερο ρόλο. Πιο συγκεκριμένα και κρίνοντας με αμιγώς *ex vivo* δεδομένα η απομάκρυνση των λευκοκυττάρων φαίνεται να βελτιώνει αισθητά την ποιότητα των προς μετάγγιση ερυθροκυττάρων και πιθανώς να μειώνει τις κλινικές επιπλοκές μετά από μετάγγιση.

Επιπλέον, το εύρος της διακύμανσης σε πολλά αιματολογικά/βιολογικά χαρακτηριστικά δεν είναι ουδέτερο όσον αφορά στην επιδεκτικότητα των ερυθροκυττάρων στην αποθηκευτική βλάβη. Παράμετροι του αιμοδότη *in vivo* όπως η οσμωτική ευθραυστότητα και η εξωτερικευση φωσφατιδυλοσερίνης χαρακτηρίζουν και τη παραγόμενη μονάδα μετάγγισης από τη στιγμή της αιμοδοσίας μέχρι το τέλος της αποθηκευτικής περιόδου. Τέλος το ουρικό οξύ του αιμοδότη *in vivo* επιδεικνύει καλά χαρακτηριστικά υποψήφιου βιοδείκτη αποθηκευτικής ικανότητας ερυθροκυττάρων καθώς κατηγοριοποιεί και προβλέπει σημαντικές παραμέτρους αποθηκευτικής βλάβης, όπως τα επίπεδα ενδοκυττάρια ασβεστίου, το ποσοστό μη αναστρέψιμων εχινοκυττάρων και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του υπερκειμένου της μονάδας μετάγγισης (τόσο ενδοκυττάρια όσο και εξωκυττάρια δράση του ουρικού οξέος). Το ουρικό οξύ φαίνεται να δρα και εντός της μονάδας μετάγγισης. Αν η δράση του οφείλεται σε καλύτερα αρχικά επίπεδα οξειδωτικού/αντιοξειδωτικού ισοζυγίου του δότη ή σε αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος εντός της μονάδας αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω μελέτης.

Η γεφύρωση της προ-αποθηκευτικής εικόνας του αιμοδότη με την αποθηκευτική βλάβη και η εύρεση εύχρηστων βιοδεικτών που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη μπορούν να αποτελέσουν το αναγκαίο πρώτο βήμα για τη σωστότερη διαχείριση των πολύτιμων αποθεμάτων αίματος προς όφελος του μεταγγιζόμενου (εξατομίκευση ιατρικής των μεταγγίσεων).

## **ABSTRACT**

Like every cell removed from its natural environment, red blood cells (RBCs) stored in blood banks undergo a series of physiologic alterations that collectively called "Storage Lesion". These *ex vivo* alterations are classified into three broad categories: A. Biochemical changes (drop of pH, 2,3 DPG and ATP depletion, increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels, susceptibility to oxidative stress, *etc.*), B. Mechanical changes (reduced deformability, transformation into non-reversible spherocytocytes, *etc.*) and C. Membrane changes: lipid loss, PS externalisation, alteration in surface markers and membrane's protein content, *etc.*).

Most of these changes result in abnormal phenotype and/or premature senescent erythrocytes (decrease in metabolic activity, change in cell shape, membrane rearrangement, oxidative cell damage, microvesicles formation and externalization of surface markers for recognition and clearance). The impairments, caused by aging, are among the factors, which lead to erythrocytic clearance mainly through macrophage recognition. Apart from phagocytosis, RBCs can also die through programmed cell death (PCD) and more particularly via membrane receptors-mediated apoptosis or eryptosis. In any case, a part of the transfused RBCs is going to be destroyed in the recipient leading eventually to inefficient transfusion.

It has been shown that six factors affect the recovery rate of the erythrocytes *in vivo*: 1) the storage period, 2) the type of unit's plasticizer, 3) the composition of the additive solution, 4) the volume of the suspending solution, 5) the quality of leukoreduction, and 6) the so far – imperfectly understood variability among different donors in respect to the storage capacity of their erythrocytes. It is now well accepted that certain donors' erythrocytes exhibit higher levels of hemolysis and lower *in vivo* recovery 24 hours post – transfusion. Even in the most contemporary storage solutions, when all the above mentioned factors have been taken into consideration (leukoreduction, storage period, type and volume of preservative, *etc.*), different donors exhibit quite different RBC storage capacity. Thus, certain donor-associated characteristics are correlated with factors affecting the in-bag hemolysis. However, apart from donor's hemoglobin, other inherent characteristics, which can affect blood transfusion quality and effectiveness, have not yet been examined.

The scope of this thesis was to clarify how the RBC aging and death signaling proceeds during the storage period in various conditions (such as leukoreduction) used in transfusion practice , as well as the possible relevance of these signaling events with intrinsic physiological characteristics of eligible blood donors *in vivo*.

For that purpose, venous blood (N=215) and *ex vivo* stored RBCs (N=26 blood units) from healthy male donors who met blood donation criteria were used. Samples were tested for a variety of hematological, biochemical and biological parameters and various approaches were followed. Among them, flow cytometry was performed to monitor modifications in cell surface markers, Scanning Electron Microscopy was used to study cell morphology and finally photometric and fluorometric methods were held in order to examine biochemical and physiological parameters of RBCs.

The results of the leukoreduction project illustrated that the removal of the majority of the white blood cells from the packed RBCs unit leads to:



1. Better preservation of the membrane integrity observed through the decreased levels of irreversible cell transformation (spherocytosis), vesiculation, hemolysis and externalization of phosphatidylserine at the leukoreduced units compared to the non leukoreduced ones.
2. Lower levels of oxidative stress indexes, namely reactive oxygen species, carbonylated membrane proteins and binding of peroxiredoxin-2 (Prx-2) at the cell membrane of leukoreduced samples.
3. Delay of erythrosis through reduced levels of intracellular  $Ca^{2+}$  and binding of the calcium-dependent protease, calpain, to the erythrocyte membrane.
4. Lower levels of band-3 modifications (phosphorylation, oligomerization, binding of IgGs) functionally associated with the main erythrocytic aging pathway.
5. Improved homeostasis of the young RBCs at the leukoreduced units.

The results of the donor-variation effect on RBC storage capacity showed that:

1. Regular blood donors, despite meeting the established criteria for blood donation, do not represent a haematologically homogeneous population. In fact, a large proportion of them exhibited aberrant values in RBC osmotic fragility, hemolysis, antioxidant capacity and other factors probably associated with the RBC storability.
2. The prestorage hematologic profile of each donor is correlated with the quality of stored erythrocytes in the transfusion units, in many ways.
3. Parameters such as the HbF and the MCF, MCHC and RDW indexes play a central role in the homeostasis of erythrocytes, both *in vivo* and *ex vivo*, as perceived through network analysis.
4. Parameters presenting the greater variation among the stored RBC units are membrane-associated proteins (calpain, Hsp70, *etc.*) and non-protein stress markers (clusterin and nitric oxide in the plasma).
5. Apart from the classic hematologic parameters i.e. MCV, MCH, MCHC, RDW, phosphatidylserine externalization, osmotic fragility and plasma clusterin varied during storage in proportion to their levels *in vivo* and as such, they characterize the blood unit.
6. Normal levels of HbF *in vivo* seem to classify the transfusion units with respect to parameters such as the antioxidant capacity of the supernatant, the osmotic fragility of the erythrocytes and the microparticles-related pro-coagulant activity.
7. Donors exhibiting within normal range- elevated levels of uric acid *in vivo* are characterized by a better RBC storage lesion profile (spherocytosis, intracellular calcium levels, antioxidant markers, levels of membrane proteins or membrane associated proteins, *etc.*)
8. Uric acid levels *in vivo* may classify the transfusion unit with regard to oxidative stress parameters, calcium homeostasis and irreversible changes and thus may be used as a predictor of those storage lesion-indicative characteristics.

To summarize, the storage lesion phenomenon is not only a parameter of the storage duration. Other factors such as the processing of the transfusion units (leukoreduction) and donor's inherent

characteristics may play a greater role than the *ex vivo* preservation time. More specifically, and based exclusively on *ex vivo* data, removal of the residual leukocytes appears to significantly improve the quality of the transfused red cells and possibly reduce the post-transfusion clinical complications.

Moreover, the variation observed in several hematologic/biological characteristics is associated with the erythrocytes' susceptibility to storage lesion. Donor-specific osmotic fragility and externalization of phosphatidylserine characterize the transfusion unit from the beginning to the end of the storage period. Finally, donor's uric acid levels *in vivo* might be a good candidate biomarker of erythrocytes' storage capacity because it seems to effectively categorize and predict important parameters of storage lesion, such as intracellular calcium levels, irreversible echinocytosis and total antioxidant capacity of the supernatant. It remains unclear if the differences observed can be attributed to the increased levels of uric acid inherent by the high-UA donors to the blood unit or to the better baseline (*in vivo*) redox status of these donors compared to the low-UA ones.

In conclusion, bridging the *in vivo* hematologic with the storage lesion profile and finding, in parallel, handy biomarkers of the storage lesion, like those presented in this PhD thesis, may be the necessary first steps to the effective management of the precious blood stocks in respect to each donor specificities and to the recipient clinical needs (personalized transfusions).

***ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε:  
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ***

## E1. ΑΡΘΡΑ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- **Advani R, Sorenson S, Shinar E, Lande W, Rachmilewitz E, Schrier SL (1992):** Characterization and comparison of the red blood cell membrane damage in severe human  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia. *Blood* 1992;79:1058-63
- **Agnihotri N, Pal L, Thakur M, 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.* 2014;12(4):520-526
- **Alloisio N, Dalla Venezia N, Rana A, Andrabi K, Texier P, Gilsanz F, Cartron JP, Delaunay J, Chishti AH (1993):** Evidence that the red blood protein p55 may participate in the skeleton membrane linkage that involves protein 4.1 and glycophorin C. *Blood* 1993;82(4):1323-7
- **Almac E, Ince C (2007):** The impact of storage on red cell function in blood transfusion. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2007;21:195-208
- **Almizraq R, Tchir JD, Holovati JL, Acker JP (2013):** Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and *in vitro* quality. *Transfusion* 2013;53:2258-67
- **Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P (1981):** Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 Nov;78(11):6858-62
- **Aminoff D, Rolfes-Curl A, Supina E (1992):** Molecular biomarkers of aging: the red cell as a model. *Arch Gerontol Geriatr* 1992;15(1):7-15
- **Ando K, Beppu M, Kikugawa K, Hamasaki N (1993):** Increased susceptibility of stored erythrocytes to anti-band 3 IgG autoantibody binding. *Biochim et Biophys Acta* 1993;1178:127-34
- **Annis AM, Glenister KM, Killian JJ, Sparrow RL (2005):** Proteomic analysis of supernatants of stored red blood cell products. *Transfusion* 2005;45:1426-33
- **Annis AM, Sparrow RL (2002):** Expression of CD47 (integrin associated protein) decreases on red blood cells during storage. *Transfus Apher Sci* 2002;27:233-8
- **Annis AM, Sparrow RL (2006):** Storage duration and white blood cell content of red blood cell (RBC) products increases adhesion of stored RBCs to endothelium under flow conditions. *Transfusion* 2006; 46:1561-7
- **Anong WA, Franco T, Chu H, Weis TL, Devlin EE, Bodine DM, An X, Mohandas N, Low PS (2009):** Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion. *Blood.* 2009 Aug 27; 114(9):1904-1912
- **Anstee DJ (1993):** Minor red cell surface proteins associated with red cell dysfunction. *Baillieres Clin Haematol* 1993;6(2):445-63
- **Antonelou MH, Kriebardis AG, Papassideri IS (2010b):** Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood Transfus* 2010;8(3):39-47
- **Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS (2010a):** Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. *Transfusion* 2010;50:376-89
- **Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Trougakos IP, Papassideri IS (2011a):** Apolipoprotein J/clusterin in human erythrocytes is involved in the molecular process of defected material disposal during vesiculation. *PLoS One* 2011;6: e26033
- **Antonelou MH, Kriebardis AG, Velentzas AD, Kokkalis AC, Georgakopoulou SC, Papassideri IS (2011b):** Oxidative stress-associated shape transformation and membrane

proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. *J Proteomics* 2011;74:2441–52

- **Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS (2012):** Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. *J Proteomics* 2012 Dec 5;76 Spec No.:220-38
- **Antunes F, Han D, Cadenas E (2002):** Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. *Free Radic. Biol. Med.* 2002;33:1260-1267
- **Antunes RF, Brandao C, Maia M, Arosa FA (2011):** Red blood cells release factors with growth and survival bioactivities for normal and leukemic T cells. *Immunol Cell Biol* 2011;89:111-21
- **Arese P, Turrini F, Schwarzer E (2005):** Band 3/complement mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2005;16:133-46
- **Arndt PA, Garratty G (2004):** Rh null red blood cells with reduced CD47 do not show increased interactions with peripheral blood monocytes. *Brit J Haematol* 2004;125:412-4
- **Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn SE, Lengauer T, Albrecht M (2008):** Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics* 2008 Jan 15;24(2):282-4
- **Baines AJ, Bennett PM, Carter EW, Terracciano C (2009):** Protein 4.1 and the control of ion channels. *Blood Cells Mol Dis.* 2009;42(3):211-5
- **Bakaev VV, Efremov AV, Tityaev, II (1999):** Low levels of dehydroascorbic acid in uraemic serum and the partial correction of dehydroascorbic acid deficiency by haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1472-4
- **Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH (2002):** Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002;99:16093–16098
- **Bastos-Amador P, Royo F, Gonzalez E, Conde-Vancells J, Palomo-Diez L, Borrás FE, Falcon-Perez JM (2012):** Proteomic analysis of microvesicles from plasma of healthy donors reveals high individual variability. *J Proteomics* 2012 Jun 27;75(12):3574-84
- **Baynes JW (2005):** Oxygen and life. In: *Baynes JW, Domoniczak MH, editors. Medical Biochemistry. Philadelphia: Elsevier* 2005;497–506
- **Becker BF (1993):** Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* 1993;14: 615-31
- **Benga G (2012):** The first discovered water channel protein, later called aquaporin 1: Molecular characteristics, functions and medical implications. *Molecular Aspects of Medicine* 2012;33:518–534
- **Bennett V, Baines AJ (2001):** Spectrin and Ankyrin-Based Pathways: Metazoan Inventions for Integrating Cells Into Tissues. *Physiol Rev* 2001;81:1353–1392
- **Bennett V, Gilligan DM (1993):** The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu Rev Cell Biol.* 1993;9:27-66
- **Bennett V, Healy J (2008):** Organizing the fluid membrane bilayer: Diseases linked to spectrin and ankyrin. *Trends Mol Med* 2008;14:28
- **Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A, Telen MJ, Ortel TL, Reid TS, Mulherin MA, Zhu H, Buck RD, McMahon TJ (2007):** Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:17063–8

- **Benzie IF, Strain JJ (1996):** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996 July 15;239(1):70-6
- **Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, Deitch EA, Machiedo GW (2002):** Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J Surg Res* 2002;102:6-12
- **Beutler E, Kuhl W (1988):** Volume control of erythrocytes during storage. The role of mannitol. *Transfusion* 1988;28:353–357
- **Beutler E, West C, Blume KG (1976):** The removal of leukocytes and platelets from whole blood. *J Lab Clin Med* 1976;88(2):328-333
- **Biondani A, Turrini F, Carta F, Matte A, Filippini A, Siciliano A, Beuzard Y, De Franceschi L (2008):** Heat-shock protein 27, -70 and peroxiredoxin-II show molecular chaperone function in sickle red cells: evidence from transgenic sickle cell mouse model. *Proteomics Clin Appl* 2008;2:706-19
- **Blasi B, D'Alessandro A, Ramundo N, Zolla L (2012):** Red blood cell storage and cell morphology. *Transfus Med* 2012;22:90-6
- **Blumberg N, Heal JM (1998):** Blood transfusion immunomodulation: the silent epidemic. *Arch. Pathol Lab Med* 1998;122:117-119
- **Bocci V, Pessina GP, Paulesu L (1981):** Studies of factors regulating the ageing of human erythrocytes-IV Influence of physiological proteinase inhibitors. *Int J Biochem* 1981;13:1257–60
- **Bode AP, Knupp CL (1994):** Effect of cold storage on platelet glycoprotein Ib and vesiculation. *Transfusion* 1994;34:690–6
- **Bogdanova A, Makhro A, Wang J, Lipp P, Kaestner L (2013):** Calcium in red blood cells- a perilous balance. *Int J Mol Sci* 2013;14:9848-72
- **Booth AO, Lim K, Capper H, Irving D, Fisher J, McNaughton SA, Riddell L, Keller A, Nowson CA (2014):** Iron status and dietary iron intake of female blood donors. *Transfusion* 2014;54:770-4
- **Bosch FH, Werre JM, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Huls TH, Willekens FL, Halie MR (1992):** Characteristics of red blood cell populations fractionated with a combination of counterflow centrifugation and Percoll separation. *Blood* 1992;79:254-60
- **Bosman GJ, Lasonder E, Groenen-Döpp YA, Willekens FL, Werre JM, Novotny VM (2010):** Comparative proteomics of erythrocyte aging *in vivo* and *in vitro*. *J Proteomics* 2010;73(3):396-402
- **Bosman GJ, Lasonder E, Luten M, Roerdinkholder- Stoelwinder B, Novotný VM, Bos H, De Grip WJ (2008a):** The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions. *Transfusion* 2008;48: 827-35
- **Bosman GJ, Werre JM, Willekens FLA, Novotný VMJ (2008b):** Erythrocyte ageing *in vivo* and *in vitro*: structural aspects and implications for transfusion. *Transfus Med* 2008;18:335-47
- **Bosman GJ, Willekens FLA, Were JM (2005):** Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell Physiol Biochem* 2005;16:1-8
- **Bowden RA, Slichter SJ, Sayers M, Weisdorf D, Cays M, Schoch G, Banaji M, Haake R, Welk K, Fisher L, McCullough J, Miller W (1995):** A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV infection after marrow transplant. *Blood* 1995;86:3598-3603

- **Bradford MM (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54
- **Branton D, Cohen CM, Tyler J (1981):** Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell* 1981;24:24-32
- **Bratosin D, Leszczynski S, Sartiaux C, Fontaine O, Descamps J, Huart JJ, Poplineau J, Goudaliez F, Aminoff D, Montreuil J (2001):** Improved storage of erythrocytes by prior leukodepletion: flow cytometric evaluation of stored erythrocytes. *Cytometry* 2001;46:351-6
- **Bratosin D, Tcacenco L, Sidoroff M, Cotoraci C, Slomianny C, Estaquier J, Montreuil J (2009):** Active Caspases-8 and -3 in Circulating Human Erythrocytes Purified on Immobilized Annexin-V: A Cytometric Demonstration. *Cytometry A* 2009;75A:236-44
- **Brown EJ, Frazier WA (2001):** Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 2001;11(3):130-5
- **Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, Peters LL, Chasis JA, Delaunay J, Mohandas N, Anstee DJ, Tanner DJ (2003):** A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood* 2003;101:4180-8
- **Brunauer LS, Moxness MS, Huestis WH (1994):** Hydrogen peroxide oxidation induces the transfer of phospholipids from the membrane into the cytosol of human erythrocytes. *Biochemistry* 4527-4532
- **Burger P, Hilarius-Stokman P, deKorte D, vandenBerg TK, vanBruggen R (2012):** CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood* 2012;119:5512-5521
- **Buzdygon KJ, Zydney AL (1989):** Effect of storage time on red blood cell membrane permeability to creatinine and uric acid. *ASAIO Trans* 1989;35:693-6
- **Callaghan TA, Fleetwood P, Contreras M, Mollison PL, Scherrmann JM (1993):** Human monoclonal anti-D with a normal half-life. *Transfusion* 1993;33(9):784-5
- **Callahan LA, Nethery D, Stofan D, DiMarco A, Supinski G (2001):** Free radical-induced contractile protein dysfunction in endotoxin-induced sepsis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001;24:210-217
- **Cardo LJ, Hmel P, Wilder D (2008):** Stored packed red blood cells contain a procoagulant phospholipid reducible by leukodepletion filters and washing. *Transfus Apher Sci* 2008;38:141-7
- **Cartron JP (1999):** RH blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999;12:655-89
- **Castagnola M, Messana I, Sanna MT, Giardina B (2010):** Oxygen-linked modulation of erythrocyte metabolism: state of the art. *Blood Transfus.* 2010;8(3): 53-58
- **Chambers JC, Zhang W, Sehmi J, Li X, Wass MN, Van der Harst P, Holm H, Sanna S, Kavousi M, Baumeister SE, Coin LJ, Deng G, Gieger C, Heard-Costa NL, Hottenga JJ, Kühnel B, Kumar V, Lagou V, Liang L, Luan J, Vidal PM, Mateo Leach I, O'Reilly PF, Peden JF, Rahmioglu N, Soininen P, Speliotes EK, Yuan X, Thorleifsson G, Alizadeh BZ, Atwood LD, Borecki IB, Brown MJ, Charoen P, Cucca F, Das D, de Geus EJ, Dixon AL, Döring A, Ehret G, Eyjolfsson GI, Farrall M, Forouhi NG, Friedrich N, Goessling W, Gudbjartsson DF, Harris TB, Hartikainen AL, Heath S, Hirschfield GM, Hofman A, Homuth G, Hyppönen E, Janssen HL, Johnson T, Kangas AJ, Kema IP, Kühn JP, Lai S, Lathrop M, Lerch MM, Li Y, Liang TJ, Lin JP, Loos RJ, Martin NG, Moffatt MF, Montgomery GW, Munroe PB, Musunuru K, Nakamura Y, O'Donnell CJ, Olafsson I,**



- Penninx BW, Pouta A, Prins BP, Prokopenko I, Puls R, Ruukonen A, Savolainen MJ, Schlessinger D, Schouten JN, Seedorf U, Sen-Chowdhry S, Siminovitch KA, Smit JH, Spector TD, Tan W, Teslovich TM, Tukiainen T, Uitterlinden AG, Van der Klauw MM, Vasani RS, Wallace C, Wallaschofski H, Wichmann HE, Willemsen G, Würtz P, Xu C, Yerges-Armstrong LM; Alcohol Genome-wide Association (AlcGen) Consortium; Diabetes Genetics Replication and Meta-analyses (DIAGRAM+) Study; Genetic Investigation of Anthropometric Traits (GIANT) Consortium; Global Lipids Genetics Consortium; Genetics of Liver Disease (GOLD) Consortium; International Consortium for Blood Pressure (ICBP-GWAS); Meta-analyses of Glucose and Insulin-Related Traits Consortium (MAGIC), Abecasis GR, Ahmadi KR, Boomsma DI, Caulfield M, Cookson WO, van Duijn CM, Froguel P, Matsuda K, McCarthy MI, Meisinger C, Mooser V, Pietiläinen KH, Schumann G, Snieder H, Sternberg MJ, Stolk RP, Thomas HC, Thorsteinsdottir U, Uda M, Waeber G, Wareham NJ, Waterworth DM, Watkins H, Whitfield JB, Witteman JC, Wolffenbuttel BH, Fox CS, Ala-Korpela M, Stefansson K, Vollenweider P, Völzke H, Schadt EE, Scott J, Järvelin MR, Elliott P, Kooner JS (2011): Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma. *Nat Genet* 2011;43:1131-8
- **Chin-Yee I, Keeney M, Krueger L, Dietz G, Moses G (1998):** Supernatant from stored red cells activates neutrophils. *Transfus Med* 1998;8:49–56
  - **Chishti AH (1998):** Function of p55 and its nonerythroid homologues. *Curr. Opin. Hematol* 1998;592:116–121
  - **Cimen M.Y.B (2008):** Free radical metabolism in human erythrocytes. *Chin. Chim. Acta* 2008; 390:1-11
  - **Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, Christmas R, Avila-Campilo I, Creech M, Gross B, Hanspers K, Isserlin R, Kelley R, Killcoyne S, Lotia S, Maere S, Morris J, Ono K, Pavlovic V, Pico AR, Vailaya A, Wang PL, Adler A, Conklin BR, Hood L, Kuiper M, Sander C, Schmulevich I, Schwikowski B, Warner GJ, Ideker T, Bader GD (2007):** Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc* 2007;2:2366-82
  - **Cohen CM, Gascard P (1992):** Regulation and post-translational modification of erythrocyte membrane and membrane-skeletal proteins. *Semin Hematol* 1992;29(4):244-92
  - **Cohen RM, Franco RS, Khera PK, Smith EP, Lindsell CJ, Ciralo PJ, Palascak MB, Joiner CH (2008):** Red cell life span heterogeneity in hematologically normal people is sufficient to alter HbA1c. *Blood* 2008;112:4284-91
  - **Colin Y (1995):** Gerbich blood groups and minor glycoforins of human erythrocytes. *TransfusClin Biol* 1995;2(4):259-68
  - **Comporti M, Signorini C, Buonocore G, Ciccoli L (2002):** Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radic Biol Med.* 2002 Apr 1;32(7):568-76
  - **Connor DE, Exner T, Ma DD, Joseph JE (2010):** The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost.* 2010 May;103(5):1044-52
  - **Connor J, Pak CC, Schroit AJ (1994):** Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. *J Biol Chem* 1994;269:2399-404
  - **Cook JD, Skikne BS, Lynch SR, Reusser ME (1986):** Estimates of iron sufficiency in the US population. *Blood* 1986;68:726-31

- **Coombes JS, Powers SK, Rowell B, Hamilton KL, Dodd SL, Shanely RA, Sen CK, Packer L (2001):** Effects of vitamin E and alpha-lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. *J. Appl. Physiol.* 2001;90:1424-1430
- **Cross GAM (1990):** Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1990;6:1-39
- **Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV (2006):** Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 747–758
- **D'Alessandro A, Zolla L (2013):** Biochemistry of red cell aging in vivo and storage lesions. *European Haematology Association - EHA 18 Educational Book; Haematologica* 2013;98(1):389-396
- **D'Almeida MS, Gray D, Martin C, Ellis CG, Chin-Yee IH (2001):** Effect of prophylactic transfusion of stored RBCs on oxygen reserve in response to acute isovolemic hemorrhage in a rodent model. *Transfusion* 2001;41:950-956
- **D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L (2012):** Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red blood cell concentrates: from metabolism to proteomics. *Haematologica* 2012;97:107–15
- **D'Alessandro A, Kriebardis AG, Rinalducci S, Antonelou MH, Hansen KC, Papassideri IS, Zolla L (2014):** An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. *Transfusion* 2014;55: 205-19
- **Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003):** Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003;329:23-38
- **D'Amici, Rinalducci S, Zolla L (2007):** Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage. *J Proteome Res* 2007;6:3242-55
- **Dekkers DW, Comfurius P, Bevers EM, Zwaal RF (2002):** Comparison between Ca<sup>2+</sup>-induced scrambling of various fluorescently labeled lipid analogues in red blood cells. *Biochem J* 2002;362(3):741-7
- **Delaunay J (1995a):** Red cell membrane structure and function. Molecular basis of Major Human Blood Group Antigens, Jean-Pierre Cartron and Philippe Rouger Ed, Plenum Press, New York. *Blood Cell Biochem Vol 6*
- **Delaunay J (1995b):** Genetic disorders of the red cell membrane. *FEBS Lett* 1995;369:34-7
- **Delaunay J (1995c):** Red cell membrane polypeptides under normal conditions and in genetic disorders. *Transfus Clin Biol* 1995;2(4):207-16
- **Delaunay J (1999):** Les maladies genetiques de la permeabilite de la membrane erythrocytaire. *Ann Biol Clin* 1999;57:383-91
- **Delaunay J, Alloisio N, Morle L, Baklouti P, Dalla Venezia N, Maillet P (1996):** Molecular genetics in hereditary elliptocytosis and hereditary spherocytosis. *Ann Genet* 1996;39(4):209-11
- **Delaunay J, Stewart G, Iolacson A (1999):** Hereditary dehydrated and over hydrated stomatocytosis: recent advances. *Curr Opin Hematol* 1999;6(2):110-4
- **Delobel J, Rubin Ol, Prudent M, Crettaz D, Tissot JD, Lion N (2010):** Biomarker Analysis of Stored Blood Products: Emphasis on Pre-Analytical Issues. *Int. J. Mol. Sci.* 2010;11:4601-4617
- **Derick LH, Liu SC, Chishti AH, Palek J (1992):** Protein immunolocalization in the spread erythrocyte membrane skeleton. *Eur J Cell Biol* 1992;57:317-20

- **Dern RJ, Gwinn RP, Wiorkowski JJ (1966):** Studies on the preservation of human blood. I. Variability in erythrocyte storage characteristics among healthy donors. *J Lab Clin Med.* 1966 Jun;67(6):955-65
- **Diakowski W, Grzybek M, Sikorski AF (2006):** Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44(4):231-48
- **Dinkla S, Peppelman M, Van Der Raadt J, Atsma F, Novotny VM, Van Kraaij MG, Joosten I, Bosman GJ (2014):** Phosphatidylserine exposure on stored red blood cells as a parameter for donor-dependent variation in product quality. *Blood Transfus.* 2014;12(2):204-209
- **Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ (1963):** The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human RBCs. *Arch Biochem Biophys* 1963;100:119-130
- **Donadee C, Raat NJ, Kaniyas T, Tejero J, Lee JS, Kelley EE, Ejero J, Lee JS, Kelley EE, Zhao X, Liu C, Reynolds H, Azarov I, Frizzell S, Meyer EM, Donnenberg AD, Qu L, Triulzi D, Kim-Shapiro DB, Gladwin MT (2011):** Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation* 2011 Jul 26;124(4):465-76
- **Drevet JR (2006):** The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol. Cell Endocrinol.* 2006;250:70–79
- **Dumaswala UJ, Dumaswala RU, Levin DS, Greenwalt TJ (1996):** Improved red blood cell preservation correlates with decreased loss of bands 3, 4.1, acetylcholinesterase, and lipids in microvesicles. *Blood* 1996;87:1612–6
- **Dumaswala UJ, Zhuo L, Mahajan S, Nair PN, Shertzer HG, Dibello P, Jacobsen DW (2001):** Glutathione protects chemokinescavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:867–73
- **Dumont LJ, AuBuchon JP (2008):** Evaluation of proposed FDA criteria for the evaluation of radiolabeled red cell recovery trials. *Transfusion.* 2008;48(6):1053-1060
- **Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N (2011):** Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. *Molecules* 2011;16(8):7058-68
- **Dzik W. H. (2003):** Apoptosis, TGFb and transfusion-related immunosuppression: Biologic versus clinical effects. *Transfusion and Apheresis Science* 2003;29:127–129
- **Eber SW, Pekrun A, Neufeldt A, Schröter W (1992):** Prevalence of increased osmotic fragility of erythrocytes in German blood donors: screening using a modified glycerol lysis test. *Ann Hematol* 1992;64:88-92
- **Egidi MG, D'Alessandro A, Mandarello G, Zolla L (2010):** Troubleshooting in platelet storage temperature and new perspectives through proteomics. *Blood Transfus* 2010;8(Suppl. 3):s73–81
- **Ensinck A, Biondi CS, Marini A, Garcia Borrás S, Racca LL, Cotorruelo CM, Racca AL (2006):** Effect of membrane-bound IgG and desialylation in the interaction of monocytes with senescent erythrocytes. *Clin Exp Med* 2006;(6)138-42
- **Eyers SA, Ridgwell K, Mawby WJ, Tanner MJ (1994):** Topology and organization of human Rh (rhesus) blood group-related polypeptides. *J Biol Chem* 1994;269(9):6417-23
- **Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH (1971):** Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochem.* 1971;10:2606-2617

- **Ferru E, Giger K, Pantaleo A, Campanella E, Grey J, Ritchie K, Vono R, Turrini F, Low PS (2011):** Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood* 2011;117(22):5998-6006
- **Ficarra S, Tellone E, Giardina B, Scatena R, Russo A, Misiti F, Clementi ME, Colucci D, Bellocco E, Lagana G, Barreca D, Galitieri A (2009):** Derangement of erythrocytic AE1 in beta-thalassemia by caspase 3: pathogenic mechanisms and implications in red blood cell senescence. *J Membr Biol* 2009;22843-9
- **Fortier N, Snyder LM, Garver F, Kiefer C, McKenney J, Mohandas N (1988):** The relationship between in vivo generated haemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane rigidity. *Blood* 1988;71:1427-31
- **Frabetti F, Musiani D, Marini M, Fanelli C, Coppola S, Ghibelli L, Tazzari PC, Bontadini A, Tassi C, Conte R (1998):** White cell apoptosis in packed red cells. *Transfusion* 1998;38:1082-9
- **Franco RS (2009):** The measurement and importance of red cell survival. *Am J Hematol* 2009;84:109-14
- **Frei B, England L, Ames BN (1989):** Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989;86:6377-6381
- **Frei B, Stocker R, Ames BN (1988):** Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; Dec 85(24):9748-52
- **Fuchs J, Weber S, Podda M, Groth N, Herrling T, Packer L, Kaufmann R (2003):** HPLC analysis of vitamin E isoforms in human epidermis: correlation with minimal erythema dose and free radical scavenging activity. *Free Radic. Biol. Med.* 2003;34:330-336
- **Gallagher PG, Tse WT, Scarpa AL, Lux SE, Forget BG (1997):** Structure and organization of the human ankyrin-1 gene. Basis for complexity of pre-mRNA processing. *J Biol Chem* 1997;272:19220
- **Gething MJ, Sambrook J (1992):** Protein folding in the cell. *Nature* 1992;355:33-45
- **Ghio AJ, Ford ES, Kennedy TP, Hoidal JR (2005):** The association between serum ferritin and uric acid in humans. *Free Radic Res* 2005;39:337-42
- **Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA (2005):** Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des* 2005;11:4145-51
- **Glaser T, Schwarz-Benmeir N, Barnoy S, Barak S, Eshhar Z, Kosower NS (1994):** Calpain (Ca(2+)-dependent thiol protease) in erythrocytes of young and old individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7879-83
- **Gnatenko DV, Dunn JJ, McCorkle SR, Weissmann D, Perrotta PL, Bahou WF (2003):** Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood* 2003;101:2285-93
- **Godal HC, Heisto H (1981):** High prevalence of increased osmotic fragility of red blood cells among Norwegian blood donors. *Scand J Haematol* 1981;27:30-4
- **Goodman SR, Kurdia A, Ammann L, Kakhniashvili D, Daescu O (2007):** The human red blood cell proteome and interactome. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232:1391-408
- **Gottlieb Y, Topaz O, Cohen LA, Yakov LD, Haber T, Morgenstern A (2012):** Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis *in vivo* but not *in vitro*. *Haematologica* 2012;97:994-1035
- **Greenwalt TJ (2006):** The how and why of exocytic vesicles. *Transfusion* 2006;46:143-52

- **Greenwalt TJ, Sostok CZ, Dumaswala UJ (1990):** Studies in red blood cell preservation: 2. Comparison of vesicle formation, morphology, and membrane lipids during storage in AS-1 and CPDA-1. *Vox Sang* 1990;58:85–9
- **Greenwalt TJ, Zehner Sostok C, Dumaswala UJ (1990):** Studies in red blood cell preservation. 1. Effect of the other formed elements. *Vox Sang* 1990;58:85–9
- **Grimshaw K, Sahler J, Spinelli SL, Phipps RP, Blumberg N (2011):** New frontiers in transfusion biology: identification and significance of mediators of morbidity and mortality in stored red blood cells. *Transfusion* 2011;51:874-880
- **Gudi T, Gupta CM (1993):** Hsp 70-like protein in rhesus erythrocyte cytosol and its interactions with membrane skeleton under heat and pathologic stress. *J Biol Chem* 1993;268:21344-50
- **Gunn RB, Silvers DN, Rosse WF (1972):** Potassium permeability in b-thalassemia minor red blood cells. *J Clin Invest* 1972;51:1043-50
- **Han V, Serrano K, Devine DV (2010):** A comparative study of common techniques used to measure haemolysis in stored red cell concentrates. *Vox Sang.* 2010 Feb;98(2):116-23
- **Haradin AR, Weed RI, Reed CF (1969):** Changes in physical properties of stored erythrocytes relationship to survival *in vivo*. *Transfusion* 1969;9:229–37
- **Harboe M (1959):** A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. *Scand J Clin Lab Invest.* 1959;11:66-70
- **Hardy B, Bensch KG, Schrier SL (1979):** Spectrin rearrangement early in erythrocyte ghost endocytosis. *Cell Biol* 1979;82:654-63
- **Heaton A, Keegan T, Holme S (1989):** In vivo regeneration of red cell 2,3-diphosphoglycerate following transfusion of DPG-depleted AS-1, AS-3 and CPDA-1 red cells. *Br J Haematol* 1989;71:131-136
- **Heaton WAL, Holme S, Smith K, Brecher ME, Pineda A, AuBuchon JP, Nelson E (1994):** Effects of 3–5 log<sub>10</sub> pre-storage leucocyte depletion on red cell storage and metabolism. *Br J Haematol* 1994;87:363–368
- **Heinrich V, Ritchie K, Mohandas N, Evans E (2001):** Elastic thickness compressibility of the red cell membrane. *Biophys J* 2001;81(3):1452-63
- **Heller H, Schaefer M, Schulten K (1993):** Lipid Bilayer Membrane. *J Phys Chem* 1993;97:8342-6
- **Henkelman S, Dijkstra-Tiekstra MJ, de Wildt-Eggen J, Graaff R, Rakhorst G, van Oeveren W (2010):** Is red blood cell rheology preserved during routine blood bank storage? *Transfusion* 2010;50:941–8
- **Herr C, Clemen CS, Lehnert G, Kutschkow R, Picker SM, Gathof BS, Zamparelli C, Schleicher M, Noegel AA (2003):** Function, expression and localization of annexin A7 in platelets and red blood cells: insights derived from an annexin A7 mutant mouse. *BMC Biochemistry* 2003;4:8
- **Hess JR (2006):** An update on solutions for red cell storage. *Vox Sanguinis* 2006;91:13–19
- **Hess JR (2009):** Red cell storage. *Journal of Proteomics.* 2009 Jan 3;73(3):368-73
- **Hess JR (2010):** Red cell changes during storage. *Transfusion and Apheresis Science* 2010;43:51–59
- **Hess JR (2012):** Scientific problems in the regulation of red blood cell products *Transfusion.* 2012 Aug;52(8):1827-35

- **Hess JR, Greenwalt TG (2002):** Storage of red blood cells: new approaches. *Transfus Med Rev* 2002;16:283-295
- **Hess JR, Hill HR, Oliver CK, Lippert LE, Greenwalt TJ (2002):** Alkaline CPD and the preservation of red blood cell 2,3 DPG. *Transfusion* 2002;42:747-752
- **Hess JR, Sparrow RL, van der Meer PF, Acker JP, Cardigan RA, Devine DV (2009):** Red blood cell hemolysis during blood bank storage: using national quality management data to answer basic scientific questions. *Transfusion* 2009 Dec;49(12):2599-2603
- **Hill HR, Oliver CK, Lippert LE, Greenwalt TJ, Hess JR (2001):** The effects of polyvinyl chloride and polyolefin bags on red blood cells stored in a new additive solution. *Vox Sang* 2001;81:161-166
- **Hochmuth MR, Warren DM (2002):** Membrane tethers formed blood cells with available area and determination of their adhesion energy. *Biophys J* 2002;82(6):2946-9
- **Hogman CF, Hedlund K, Sahlestrom Y (1981):** Red cell preservation in protein-poor media III. Protection against *in vitro* hemolysis. *Vox Sang* 1981;41:274-281
- **Hogman CF, Meryman HT (1999):** Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion. *Transfusion Medicine Reviews* 1999;13:275-296
- **Huang CH, Liu PZ, Cheng JG (2000):** Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. *Semin Hematol.* 2000 Apr;37(2):150-65
- **Huang Y, Qiao F, Abagyan R, Hazard S, Tomlinson S (2006):** Defining the CD59-C9 binding interaction. *J Biol Chem* 2006;281(37):27398-27404
- **Humbert JR, Fermin CD, Winsor EL (1991):** Early damage to granulocytes during storage. *Semin Hematol* 1991;28:10-3
- **Inaba M, Gupta KC, Kuwabara M, Takahashi T, Benz EJ Jr, Maede Y (1992):** Deamidation of human erythrocyte protein 4.1: possible role in aging. *Blood* 1992;79:3355-3361
- **Itahana Y, Han R, Barbier S, Lei Z, Rozen S, Itahana K (2014):** The uric acid transporter SLC2A9 is a direct target gene of the tumor suppressor p53 contributing to antioxidant defense. *Oncogene* 2015 Apr 2;34(14):1799-810
- **Jensen FB (2004):** Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> transport. *Acta Physiol Scand.* 2004;182:215-227
- **Joshi R, Gilligan DM, Otto E, McLaughlin T, Bennett V (1991):** Primary structure and domain organization of human  $\alpha$  and  $\beta$  adducin. *J Cell Biol* 1991;115(3):665-675
- **Jozwik M, Szczypka M, Gajewska J, Laskowska-Klita T (1997):** Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clin Chim Acta* 1997;267:129-42
- **Jy W, Ricci M, Shariatmadar S, Gomez-Marin O, Horstman LH, Ahn YS (2011):** Microparticles in stored red blood cells as potential mediators of transfusion complications. *Transfusion* 2011;51:886-93
- **Kamel N, Goubran F, Ramsis N, Ahmed AS (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* 2010;8:260-6
- **Kanias T, Acker JP (2010):** Biopreservation of red blood cells the struggle with haemoglobin oxidation. *FEBS J* 2010;277:343-56
- **Karon BS, Hoyer JD, Stubbs JR, Thomas DD (2009):** Changes in Band 3 oligomeric state precede cell membrane phospholipid loss during blood bank storage of red blood cells. *Transfusion* 2009;49(7):1435-1442



- **Kaufman RM (2005):** Uncommon cold: could 4 degrees C storage improve platelet function? *Transfusion* 2005;45:1407–12
- **Kay MM (2005):** Immunoregulation of cellular life span. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1057:85–111
- **Kay MM, Bosman GJ, Johnson GJ, Beth AH (1988):** Band-3 polymers and aggregates, and hemoglobin precipitates in red cell aging. *Blood Cells* 1988;14:275–95
- **Khan AA, Hanada T, Mohseni M, Jeong JJ, Zeng L, Gaetani M, Li D, Reed BC, Speicher DW, Chishti AH (2008):** Dematin and Adducin Provide a Novel Link between the Spectrin Cytoskeleton and Human Erythrocyte Membrane by Directly Interacting with Glucose Transporter-1. *Jl Biol Chem* 2008 vol.283, no.21:14600–14609
- **Kiefer CR, Snyder LM (2000):** Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol* 2000;7:113–6
- **Klein MA, Frigg R, Raeber AJ, Flechsig E, Hegyi I, Zinkernagel RN, Weissmann C, Aguzzi A (1998):** PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat Med* 1998;4:1429–33
- **Kor DJ, Van Buskirk CM, Gajic O (2009):** Red Blood Cell Storage Lesion. *Bosnian Journal of basic Medical Sciences* 2009;9(1):21–27
- **Koshino I, Mohandas N, Takakuwa Y (2012):** Identification of a novel role for dematin in regulating red cell membrane function by modulating spectrin-actin interaction. *J Biol Chem.* 2012 Oct 12;287(42):35244–5
- **Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS (2007a):** Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulin G binding, lipid raft rearrangement, and caspase activation. *Transfusion* 2007;47:1212–20
- **Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS (2007b):** Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *J Cell Mol Med* 2007;11:148–55
- **Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS (2006):** Membrane protein carbonylation in nonleukodepleted CPDA-preserved red blood cells. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36:279–82
- **Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS (2008):** RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. *Transfusion* 2008;48:1943–53
- **Kypreos KE, Zafirovic S, Petropoulou PI, Bjelogrljic P, Resanovic I, Traish A, Isenovic ER (2014):** Regulation of endothelial nitric oxide synthase and high-density lipoprotein quality by estradiol in cardiovascular pathology. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2014;19:256–68
- **Lachant NA, Noble NA, Myrhe BA, Tanaka KR (1984):** Antioxidant metabolism during blood storage and its relationship to posttransfusion red cell survival. *Am J Hematol* 1984;17:237–49
- **Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Kasthuri RS, Key NS, Dignat-George F (2010):** Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost.* 2010 Nov;8(11):2571–4
- **Laemmli UK (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685



- **Lai CE (2003):** Lipid Rafts mke for slippery platforms. *J Cell Biol* 2003;162(3):365-70
- **Lang E, Lang F (2002):** Triggers, Inhibitors, Mechanisms, and Significance of Eryptosis: The Suicidal Erythrocyte Death. *Biomed Res Int.* 2015;2015:513-518
- **Lang E, Qadri SM, Lang F (2012):** Killing me softly - suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(8):1236-1243
- **Lang F, Abed M, Lang E, Föller M (2014):** Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Jul 1;21(1):138-53
- **Lang F, Lang KS, Lang PA, Huber SM, Wieder T (2006):** Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1183-92
- **Langhorst MF, Reuter A, Jaeger FA, Wippich FM, Luxenhofer G, Plattner H, Stuermer CA (2008):** Trafficking of the microdomain scaffolding protein reggie-1/flotillin-2. *Eur J Cell Biol* 2008;87(4):211-26
- **Lewis IA, Campanella ME, Markley JL, Low PS (2009):** Role of band 3 in regulating metabolic flux of red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(44):18515–20
- **Lion N, Crettaz D, Rubin O, Tissot JD (2010):** Stored red blood cells: A changing universe waiting for its map(s). *Journal Of Proteomics* 2010;73:374-385
- **Liu SC, Derick LH, Palek J (1987):** Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *J Cell Biol* 1987;104:527-36
- **Liu SC, Derick LH, Palek J (1989):** Separation of the lipid layer from the membrane skeleton during discocyte-echinocyte transformation on human erythrocyte ghosts. *Eur J Cell Biol* 1989;49:358-66
- **Livrea MA, Tesoriere L, Piantaudi AM, Calabrese A, Maggio A, Freisleben HJ, D'Arpa D, D'Anna R, Bongiorno A (1996):** Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. *Blood* 1996; 88: 3608-14
- **Long KE, Yomtovian R, Kida M, Knez JJ, Medof ME (1993):** Time-dependent loss of surface complement regulatory activity during storage of donor blood. *Transfusion.* 1993;33(4):294-300
- **Lorenzo F, Dalla Venezia N, Morle L, Baklouti F, Alloisio N, Ducluzeau MT, Roda L, Lefrancois P (1994):** Protein 4.1 deficiency associated with an altered binding to the spectrin-actin complex of the red cell membrane skeleton. *J Clin Invest* 1994;94:1651-6
- **Loutit JF, Mollison PL (1943):** Advantages of a disodium-citrate-glucose mixture as a blood preservative. *Br Med J* 1943;2:744–745
- **Low FM, Hampton MB, Winterbourn CC (2008):** Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(9):1621-30
- **Low PS, Rathinavelu P, Harrison ML (1993):** Regulation of glycolysis via reversible enzyme binding to the membrane protein, band 3. *J Biol Chem* 1993;268:14627–14631
- **Low PS, Waugh SM, Zinke K, Drenckhahn D (1985):** The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science* 1985;227:531–3
- **Lu C, Shi J, Yu H, Hou J, Zhou J (2011):** Procoagulant activity of long-term stored red blood cells due to phosphatidylserine exposure. *Transfus Med* 2011;21:150–7
- **Lu Yiqin, Liu Junfan (2007):** Erythrocyte membrane proteins and membrane skeleton. *Front. Biol. China* 2007;2(3):247–255
- **Lucas-Heron B, Fontenaille C (1979):** Urate transport in human red blood cells. Activation by ATP. *Biochim Biophys Acta* 1979;553:284-94

- **Luk CS, Gray-Statchuk LA, Cepinkas G, Chin-Yee IH (2003):** WBC reduction reduces storage-associated RBC adhesion to human vascular endothelial cells under conditions of continuous flow *in vitro*. *Transfusion* 2003;43:151-156
- **Luna EJ, Hitt AL (1992):** Cytoskeleton plasma membrane interaction. *Science* 1992;258(5084):955-64
- **Lutz HU, Stammler P, Fasler S (1993):** Preferential formation of C3b-IgG complexes in vitro and in vivo from nascent C3b and naturally occurring anti-band 3 antibodies. *J Biol Chem* 1993;268:17418-26
- **Lutz HU, Stammler P, Fasler S, Ingold M, Fehr J (1992):** Density separation of human red blood cells on self forming Percoll gradients: correlation with cell age. *Biochim Biophys Acta* 1992;1116:1-10
- **Lux SE, Palek J (1995):** Blood : principles and practice of hematology.
- **Magee A, Parmryd I (2003):** Detergent resistant membranes and the protein composition of lipid rafts. *Genome Biology* 2003;4:234-7
- **Malyszko J, Koc-Zorawska E, Levin-Iaina N, Slotki I, Matuszkiewicz-Rowinska J, Glowinska I, Malyszko JS (2014):** Iron metabolism in hemodialyzed patients - a story half told? *Arch Med Sci* 2014;10:1117-22
- **Mandal D, Baudin-Creuz V, Bhattacharyya A, Pathak S, Delaunay J, Kundu M, 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* 2003;278:52551-8
- **Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J (2005):** Fas-, caspase 8- and caspase 3-dependent signaling regulate the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem* 2005;280:39460-7
- **Mandal D, Moitra PK, Saha S, Basu J (2002):** Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytes is of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBSLett* 2002;513:184-8
- **Masella R, Benedetto R, Vary R, Filesi C, Giovannini C (2005):** Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005;16:577-86
- **Matte A, Bertoldi M, Mohandas N, An X, Bugatti A, Brunati AM, Rusnati M, Tibaldi E, Siciliano A, Turrini F, Perrotta S, De Franceschi L (2012):** Membrane association of peroxiredoxin-2 in red cells is mediated by the N-terminal cytoplasmic domain of band 3. *Free Radic Biol Med.* 2012;55C:27-35
- **Mause SF, Weber C (2010):** Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010;107:1047-57
- **Mazzulla S, Schella A, Gabriele D, Baldino N, Sesti S, Perrotta E, Costabile A, de Cindio B (2014):** Oxidation of human red blood cells by a free radical initiator: Effects on rheological properties. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014 May 19
- **McMullin FM (1999):** The molecular basis of disorders of red cell membrane. *J Clin Pathol* 1999;52:245-8
- **Mebius RE, Kraal G (2005):** Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 2005;5:606-16
- **Messana I, Ferroni L, Misiti F, Girelli G, Pupella S, Castagnola M, Zappacosta B, Giardina B (2000):** Blood bank conditions and RBCs: the progressive loss of metabolic modulation. *Transfusion* 2000;40:353-60

- **Michaely P, Tomchick DR, Machius M, Anderson RG (2002):** Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrin-R. *EMBO J*. 2002 Dec 2;21(23):6387-96
- **Michelis R, Gery R, Sela S, Shurtz-Swirski R, Grinberg N, Snitkovski T, Shasha SM, Kristal B (2003):** Carbonyl stress induced by intravenous iron during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:924-30
- **Miki Y, Tazawa T, Hirano K, Matsushima H, Kumamoto S, Hamasaki N, Yamaguchi T, Beppu M (2007):** Clearance of oxidized erythrocytes by macrophages: Involvement of caspases in the generation of clearance signal at band 3 glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363:57-62
- **Mills BJ, Lang CA (1996):** Differential distribution of free and bound glutathione and cyst(e)ine in human blood. *Biochem Pharmacol* 1996 Aug 9;52(3):401-6
- **Minetti G, Gana A (2003):** New and integral proteins of the human erythrocyte membrane. *Blood* 2003;101(9):3751-6
- **Minetti G, Piccinini G, Balduini C, Seppi C, Brovelli A (1996):** Tyrosine phosphorylation of band 3 protein in Ca<sup>2+</sup>/A23187-treated human erythrocytes. *Biochem J* 1996;320(Pt 2):445-50
- **Misaki M, Shima T, Yano Y, Okazaki T (1991):** Serum transferrin as a marker of bone growth in boys: correlation with serum alkaline phosphatase activity, plasma insulin-like growth factor 1 and rate of growth in height. *Horm Metab Res* 1991;23:230-2
- **Miura T, Muraoka S, Ogiso T (1993):** Inhibitory effect of urate on oxidative damage induced by adriamycin-Fe<sup>3+</sup> in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993;79: 75-85
- **Mohandas N, Gallagher PG (2008):** Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 2008;112:3939-3948
- **Montel-Hagen A, Kinet S, Manel N, Mongellaz C, Prohaska R, Battini JL, Delaunay J, Sitbon M, Taylor N (2008):** Erythrocyte Glut1 Triggers Dehydroascorbic Acid Uptake in Mammals Unable to Synthesize Vitamin C. *Cell* 2008 Mar 21;132(6):1039-48
- **Moore RB, Shriver SK (1997):** Protein 7.2b of human erythrocyte membranes binds to calpromotin. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:294-7
- **Mueller TJ, Jackson CW, Dockter ME, Morrison M (1987):** Membrane skeletal alterations during in vivo mouse red cell aging. *J Clin Invest* 1987;79:492-9
- **Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y (2000):** Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 2000;407(6804):599-605
- **Murphy CS, Samuel UB, Harrison T, Speicher KD, Speicher DW, Reid ME, Prohaska R, Low PS, Tanner MJ, Mohandas N, Haldar K (2004):** Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malaria infection. *Blood* 2004;103:1920-8
- **Nagababu E, Mohanty JG, Bhamidipaty S, Osters GR, Rifkind JM (2010):** Role of the membrane in the formation of heme degradation products in red blood cells. *Life Sci* 2010;86:133-8
- **Nicolas V, Le Van Kim C, Gane P, Birkenmeier C, Cartron JP, Colin Y, Mouro-Chanteloup I (2003):** Rh-RhAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation. *J Biol Chem* 2003;278:25526-33

- **Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Knepper MA, Agre P (1993):** CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol.* 1993;120(2):371-83
- **Noble D, Herchuelz A (2007):** Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase in cell function. Conference on Na/Ca Exchange. *EMBO Rep.* 8, 2007:228–232
- **Norton JM, Rand PW (1981):** Decreased deformability of erythrocytes from smokers. *Blood* 1981;57:671-4
- **Nunomura W, Gascard P, Takakuwa Y (2011):** Insights into the Function of the Unstructured N-Terminal Domain of Proteins 4.1R and 4.1G in Erythropoiesis. *Int J Cell Biol.* 2011; 2011: 943272
- **Oldenburg PA, Gresham HD, Izui S, Lindberg FP (2004):** Lethal autoimmune hemolytic anemia in CD47-deficient nonobese diabetic (NOD) mice. *Blood* 2004;99(10):3500-4
- **Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM (2001):** Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J* 2001;357:241-7
- **Orlina AR, Josephson AM (1969):** Comparative viability of RBC stored in ACD and CPD. *Transfusion* 1969;9:62–69
- **Palek J, Liu S (1979):** Dependence of spectrin organization in red blood cell membranes on cell metabolism: Implications for control of red cell shape, deformability and surface area. *Semin Hematol* 1979;16:75-93
- **Palek J, Stewart G, Lionetti FJ (1974):** The dependence of shape of human erythrocyte ghosts on calcium, magnesium, and adenosine triphosphate. *Blood* 1974;44:583-97
- **Pallotta V, Gevi F, D'Alessandro A, Zolla L (2014):** Storing red blood cells with vitamin C and N-acetylcysteine prevents oxidative stress-related lesions: a metabolomics overview. *Blood Transfus* 2014;12:376-87
- **Pantaleo A, Ferru E, Giribaldi G, Mannu F, Carta F, Matte A, de Franceschi L, Turrini F (2009):** Oxidized and poorly glycosylated band 3 is selectively phosphorylated by Syk kinase to form large membrane clusters in normal and G6PD-deficient red blood cells. *Biochem J* 2009;418:359–67
- **Pantaleo A, Giribaldi G, Mannu F, Arese P, Turrini F (2008):** Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Autoimmun Rev* 2008;7:457-62
- **Pariser H, Herradon G, Ezquerra L, Perez-Pinera P, Deuel TF (2005):** Pleiotrophin regulates serine phosphorylation and the cellular distribution of beta-adducin through activation of protein kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2005;102:12407–12412
- **Pasini EM, Lutz HU, Mann M, Thomas AW (2010):** Red blood cell (RBC) membrane proteomics - Part I: Proteomics and RBC physiology. *J Proteomics* 2010;73:403-20
- **Patel KV, Mohanty JG, Kanapuru B, Hesdorffer C, Ershler WB, Rifkind JM (2013):** Association of the red cell distribution width with red blood cell deformability. *Adv Exp Med Biol* 2013;765:211-6
- **Pawelski H, Lang D, Reuter S (2014):** Interactions of monocytes and platelets: implication for life. *Front Biosci (Schol Ed)* 2014;6:75-91
- **Pienimaeki-Roemer A, Ruebsaamen K, Boettcher A, Orsó E, Scherer M, Liebisch G, Kilalic D, Ahrens N, Schmitz G (2013):** Stored platelets alter glycerophospholipid and sphingolipid species, which are differentially transferred to newly released extracellular vesicles. *Transfusion* 2013;53:612-26

- **Pietersz RN, Reesink HW, de Korte D, Dekker WJ, van den Ende A, Loos JA (1989):** Storage of leukocyte-poor red cell concentrates: filtration in a closed system using a sterile connection device. *Vox Sang* 1989;57:29–36
- **Pietraforte D, Matarrese P, Straface E, Gambardella L, Metere A, Scorza G, Leto TL, Malorni W, Minetti M (2007):** Two different pathways are involved in peroxynitrite-induced senescence and apoptosis of human erythrocytes. *Free Radic Biol Med* 2007;42:202-14
- **Piomelli S, Seaman C (1993):** Mechanism of red blood cell aging: relationship of cell density and cell age. *Am J Hematol* 1993;42:46-52
- **Platt OS, Falcone JF, Lux SE (1993):** A highly conserved region of human erythrocyte ankyrin contains the capacity to bind spectrin. *J Biol Chem* 1993;268(32):24421-6
- **Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF (2003):** The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1499–503
- **Prchal TJ, Morley JB, Yoon SH, Coetzer LT, Palek J, Conboy GJ, Wai Kan Y (1987):** Isolation and characterization of cDNA clones for human erythrocyte  $\beta$ -spectrin. *Proc Natl Acad Sc* 1987;84:7468-72
- **Preston GM, Smith BL, Zeidel ML, Moulds JJ, Agre P (1994):** Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels. *Science* 1994;265:1585-7
- **Profumo E, Buttari B, Petrone L, Straface E, Gambardella L, Pietraforte D, Genuini I, Capoano R, Salvati B, Malorni W, Riganò R (2011):** Redox imbalance of red blood cells impacts T lymphocyte homeostasis: implication in carotid atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2011;106:1117-26
- **Puchulu-Campanella E, Chu H, Anstee DJ, Galan JA, Tao WA, Low PS (2013):** Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane. *J Biol Chem*. 2013 Jan 11;288(2):848-58
- **Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW (2005):** Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* 2005;41:1211-9
- **Quinn BJ, Welch EJ, Kim AC, Lokuta MA, Huttenlocher A, Khan AA, Kuchay SM, Chishti AH (2009):** Erythrocyte scaffolding protein p55/MPP1 functions as an essential regulator of neutrophil polarity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 Nov 24;106(47):19842-7
- **Raat NJ, Verhoeven AJ, Mik EG, Gouwerok CW, Verhaar R, Goedhart PT, De Korte D, Ince C (2005):** The effect of storage time of human red cells on intestinal microcirculatory oxygenation in a rat isovolemic exchange model. *Crit. Care Med*. 2005;33:39-45; discussion:238-239
- **Racek J., Herynková R., Holeček V., Faltysová J., Krejčová I (2001):** What is the source of free radicals causing hemolysis in stored blood? *Physiol. Res*. 50, 2001: 383–388
- **Raval JS, Waters JH, Seltsam A, Scharberg EA, Richter E, Daly AR, Kameneva MV, Yazer MH (2010):** The use of the mechanical fragility test in evaluating sublethal RBC injury during storage. *Vox Sang*. 2010 Nov;99(4):325-31
- **Raval JS, Waters JH, Seltsam A, Scharberg EA, Richter E, Kameneva MV, Yazer MH (2011):** Menopausal status affects the susceptibility of stored RBCs to mechanical stress. *Vox Sang*. 2011; 100:418-21
- **Rettig MP, Low PS, Gimm JA, Mohandas N, Wang L, Christian JA (1999):** Evaluation of biochemical changes during in vivo erythrocyte senescence in the dog. *Blood* 1999;93:376-84

- **Reynolds JD, Ahearn GS, Angelo M, Zhang J, Cobb F, Stamler JS (2007):** S-nitrosohemoglobin deficiency: a mechanism for loss of physiological activity in banked blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:17058-17062
- **Ribeiro MM, Dalla Venezia N, Deguillien M, Maillet P, Cynober T, Delhommeau F, Almeida H, Tamagnini, Delaunay J, Baklouti F (2000):** Elliptocytosis in patients with C-terminal domain mutation of protein 4.1 correlates with encoded messenger RNA levels rather with alterations in primary protein structure. *Blood* 2000;95(5):1834-41
- **Rinalducci S, D'Amici GM, Blasi B, Vaglio S, Grazzini G, Zolla L (2011):** Peroxiredoxin-2 as a candidate biomarker to test oxidative stress levels of stored red blood cells under blood bank conditions. *Transfusion*. 2011;51(7):1439-1449
- **Rizvi SI, Maurya PK (2007):** Markers of oxidative stress in erythrocytes during aging in humans. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1100:373-82
- **Roback JD (2011):** Vascular effects of the red blood cell storage lesion. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:475-479
- **Robledo RF, Ciciotte SL, Gwynn B, Sahr KE, Gilligan DM, Mohandas N, Peters LL (2008):** Targeted deletion of  $\alpha$ -adducin results in absent  $\beta$ - and  $\gamma$ -adducin, compensated hemolytic anemia, and lethal hydrocephalus in mice. *Blood* 2008;112(10):4298-30
- **Rocha S, Vitorino RM, Lemos-Amado FM, Castro EB, Rocha-Pereira P, Barbot J, Cleto E, Ferreira F, Quintanilha A, Belo L, Santos-Silva A (2008):** Presence of cytosolic peroxiredoxin 2 in the erythrocyte membrane of patients with hereditary spherocytosis. *Blood Cells Mol Dis* 2008;41:5-9
- **Rogers SC, Said A, Corcuera D, McLaughlin D, Kell P, Doctor A (2009):** Hypoxia limits antioxidant capacity in red blood cells by altering glycolytic pathway dominance. *FASEB J*. 2009;23(9):3159-70
- **Sacamoto H (2005):** Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol* 2005;1(6):333-7
- **Salamino F, Sparatore B, Melloni E, Michetti M, Viotti PL, Pontremoli S, Carafoli E (1994):** The plasma membrane calcium pump is the preferred calpain substrate within the erythrocyte. *Cell Calcium* 1994;15:28-35
- **Salzer U, Hinterdorfer P, Hunger U, Borken C, Prohaska R (2002):**  $\text{Ca}^{++}$ -dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood* 2002;99:2569-77
- **Salzer U, Prohaska R (2001):** Stomatin, flotillin-1 and flotillin-2 are the major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood* 2001;97:1141-3
- **Salzer U, Prohaska R (2003):** Segregation of lipid rafts proteins during calcium-induced vesiculation of erythrocytes. *Blood* 2003;101(9):3751-2
- **Samaja M, Rubinacci A, Motterlini R, De Ponti A, Portinaro N (1990):** Red cell aging and active calcium transport. *Exp Gerontol* 1990;25:279-86
- **Scapini P, Cassatella MA (2014):** Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood* 2014;124:710-9
- **Schrier SL, Rachmilewitz E, Mohandas N (1989):** Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemic erythrocytes are different: implication for differences in clinical manifestations. *Blood* 1989;74:2194-202
- **Seigneuret M, Devaux PF (1984):** ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Nat Acad Sci* 1984;81(12):3751-5

- **Shalev O, Manny N, Sharon R (1993):** Posttransfusional hemolysis in recipients of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. *Vox Sang* 1993;64:94-8
- **Shields CE (1969):** Effect of adenine on stored erythrocytes evaluated by autologous and homologous transfusions. *Transfusion* 1969;9:115-119
- **Simons K, Ikonen E (1997):** Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997;387:569-72
- **Skikne B, Lynch S, Borek D, Cook J (1984):** Iron and blood donation. *Clin Haematol* 1984;13:271-87
- **Sloand EM, Mainwaring L, Keyvanfar K, Chen J, Maciejewski J, Klein HG, Young NS (2004):** Transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to deficient cells after erythrocyte transfusion in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2004;104:3782-8
- **Smith RC, Gore JZ, Doyle MP (1991):** Degradation of uric acid during autocatalytic oxidation of oxyhemoglobin induced by sodium nitrite. *Free Radic Biol Med* 1991;11: 373-7
- **Snyder LM, Fortier NL, Trainor J (1985):** Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *J Clin Invest* 1985;76:1971-7
- **Snyder LM, Leb L, Piotrowski J, Sauberman N, Liu SC, Fortier NL (1983):** Irreversible spectrin-haemoglobin crosslinking *in vivo*: a marker for red cell senescence. *Br J Haematol* 1983;53:379-84
- **Soldati L, Alberoni M, Bianchi G, Canal N, Franceschi M (1996):** Erythrocytic calpain-calpastatin system in Alzheimer's disease. *Aging* 1996;8(2):106-8
- **Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K (1997):** Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* 1997;328(3):721-32
- **Sparrow RL, Healey G, Patton KA, Veale MF (2006):** Red blood cell age determines the impact of storage and leukocyte burden on cell adhesion molecules, glycophorin A and the release of annexin V. *Transfus and Apher Sci* 2006;34:15-23
- **Speicher DW, Weglarz L, DeSilva TM (1992):** Properties of human red cell spectrin heterodimer (side-to-side) assembly and identification of an essential nucleation site. *J Biol Chem.* 1992 Jul 25;267(21):14775-82
- **Spivak JL (2002):** Anemia and erythropoiesis in cancer. *Adv Stud Med* 2002;2:612-619
- **Stocker R, Glazer AN, Ames BN (1987):** Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 Aug;84(16):5918-22
- **Stuhlmeier KM, Kao JJ, Wallbrandt P, Lindberg M, Hammarstrom B, Broell H, Paigen B (2003):** Antioxidant protein 2 prevents methemoglobin formation in erythrocyte hemolysates. *Eur J Biochem* 2003;270:334-41
- **Sugawara A, Nollet KE, Yajima K, Saito S, Ohto H (2010):** Preventing platelet-derived microparticle formation—and possible side effects—with prestorage leukofiltration of whole blood. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:771-5
- **Sun Y (1990):** Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1990;8(6):583-99
- **Sung LA, Gao KM, Yee LJ, Temm-Grove CJ, Helfman DM, Lin JJ, Mehropouryan M (2000):** Tropomyosin isoform 5b is expressed in human erythrocytes: implications of tropomodulin-TM5 or tropomodulin-TM5b complexes in the protofilament and hexagonal organization of membrane skeletons. *Blood* 2000;95:1473-80
- **Suzuki K, Ohno H, Oh-ishi S, Kizaki T, Ookawara T, Fukii J, Radak A, Taniguchi N (2000):** Superoxide dismutases in exercise and disease. *In: Handbook of Oxidants and*



*Antioxidants and Exercise*, edited by Sen CK, Packer L, Hanninen O. Amsterdam: Elsevier, 2000;243–295

- **Suzuki Y, Ohkubo N, Aoto M, Maeda N, Cicha I, Miki T, Mitsuda N (2007)**: Participation of caspase-3-like protease in oxidation-induced impairment of erythrocyte membrane properties. *Biorheology* 2007;44(3):179-90
- **Tang Y, Liu X, Zoltoski RK, Novak LA, Herrera RA, Richard I, Kuszak JR, Kumar NM (2007)**: Age-related cataracts in alpha3Cx46-knockout mice are dependent on a calpain 3 isoform. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(6):2685-94
- **Tanner MJA (1993)**: The major integral proteins of human red cell. *Bail Clin Hematol* 1993;6(2):333-56
- **Tarasev M, Alfano K, Chakraborty S, Light L, Doeden K, Gorlin JB (2014)**: Similar donors-similar blood? *Transfusion* 2014;54(3 Pt 2):933-941
- **Taverna M, Marie AL, Mira JP, Guidet B (2013)**: Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care*. 2013 Feb 15;3(1):4
- **Tellone E, Ficarra S, Giardina B, Scatena R, Russo A, Clementi ME, Misiti F, Bellocco E, Galitieri A (2008)**: Oxidative effects of gemfibrozil on anion influx and metabolism in normal and beta-thalassemic erythrocytes: physiological implications. *J Membr Biol* 2008;224:1-8
- **Terra HT, Saad MJ, Carvalho CR, Vicentin DL, Costa FF, Saad ST (1998)**: Increased tyrosine phosphorylation of band 3 in hemoglobinopathies. *Am J Hematol* 1998;58:224–30
- **Tilton WM, Seaman C, Carriero D, Piomelli S (1991)**: Regulation of glycolysis in the erythrocyte: role of the lactate/pyruvate and NAD/NADH ratios. *J Lab Clin Med*. 1991 Aug;118(2):146-52
- **Tinmouth A, Chin-Yee I (2001)**: The clinical consequences of the red cell storage lesion. *Transfus Med Rev* 2001;15:91-107
- **Tiwari AK, Chandola I, Ahuja A (2010)**: Approach to blood donors with microcytosis. *Transfus Med* 2010;20:88-94
- **Traber MG, Atkinson J (2007)**: Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007 Jul 1;43(1):4-15
- **Troadec MB, Kaplan J (2008)**: Some Vertebrates Go with the GLO. *Cell* 2008;Mar 21;132(6):921-2
- **Trougakos IP (2013)**: The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches – a mini-review. *Gerontology* 2013;59:514-23
- **Trougakos IP, Gonos ES (2009)**: Chapter 9: Oxidative stress in malignant progression: The role of Clusterin, a sensitive cellular biosensor of free radicals. *Adv Cancer Res* 2009;104:171-210
- **Turrini F, Arese P, Yuan J, Low PS (1991)**: Clustering of integral membrane proteins of the human erythrocyte membrane stimulates autologous IgG binding, complement deposition, and phagocytosis. *J Biol Chem* 1991;266:23611–7
- **Vamvakas EC (1996)**: Transfusion-associated cancer recurrence and post-operative infection: meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Transfusion* 1996;36:175-186
- **van de Watering LMG, Brand A (2008)**: Effects of Storage of Red Cells. *Transfus Med Hemother* 2008;35:359–367

- **van derWal DE, Gitz E, Du VX, Lo KS, Koekman CA, Versteeg S, Akkerman JW (2012):** Arachidonic acid depletion extends survival of cold stored platelets by interfering with [Glycoprotein Ibalpha - 14-3-3zeta] association. *Haematologica* 2012 Oct;97(10):1514-22
- **van 't Erve TJ, Doskey CM, Wagner BA, Hess JR, Darbro BW, Ryckman KK, Murray JC, Raife TJ, Buettner GR (2014):** Heritability of glutathione and related metabolites in stored red blood cells. *Free Radic Biol Med.* 2014;76:107-113
- **Vasankari TJ, Kujal UM, Vasankari TM, Vuorimaa T, Ahotupa M (1997):** Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defences. *Free Radic. Biol. Med.* 1997;22:509-513
- **Vaya A, Alis R, Suescun M, Rivera L, Murado J, Romagnoli M, Solá E, Hernandez-Mijares A (2014):** Association of erythrocyte deformability with red blood cell distribution width in metabolic diseases and thalassemia trait. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014 July 25
- **Verhoeven AJ, Hilarius PM, Dekkers DW, Lagerberg JW, de Korte D (2006):** Prolonged storage of red blood cells affects aminophospholipid translocase activity. *Vox Sang* 2006;91:244-51
- **Vraets A, Lin Y, Callum JL (2011):** Transfusion-associated hyperkalemia. *Transfus Med Rev.* 2011 Jul;25(3):184-96
- **Wagner GM, Chiu DT, Qju JH, Heath RH, Lubin BH (1987):** Spectrin oxidation correlates with membrane vesiculation in stored RBCs. *Blood* 1987;69:1777-81
- **Walsh M, Lutz RJ, Cotter TG, O'Connor R (2002):** Erythrocyte survival is promoted by plasma and suppressed by a Bak-derived BH3 peptide that interacts with membrane associated Bcl-XL. *Blood* 2002;99:3439-48
- **Wang Y, Morrow JS (2000):** Identification and Characterization of Human SLP-2, a Novel Homologue of Stomatin (Band 7.2b) Present in Erythrocytes and Other Tissues. *Journal of Biological Chemistry* 2000 March 17;275(11):8062-8071
- **Weiss SJ (1980):** The role of superoxide in the destruction of erythrocyte targets by human neutrophils. *J Biol Chem* 1980;255:9912-7
- **Wenk RE, McGann H, Gibble J (2011):** Haemoglobin A1c in donor erythrocytes. *Transfusion Medicine* 2011;21:349-350
- **Wieschhaus A, Khan A, Zaidi A, Rogalin H, Hanada T, Liu F, Franceschi L, Brugnara C, Rivera A, Chishti AH (2012):** Calpain-1 knockout reveals broad effects on erythrocyte deformability and physiology. *Biochem. J.* 2012;448:141-152
- **Willekens FLA, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Döpp YAM, Bos HJ, Bosman GJ, van den Bos AG, Verkleij AJ, Were JM (2003):** Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation. *Blood* 2003;101:747-51
- **Willekens FLA, Werre JM, Groenen-Dopp YA, Roerdinkholder-Stoelwinder B, De Pauw B, Bosman GJ (2008):** Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Br J Haematol* 2008;141:549-56
- **Wilson T, Carlin AR (1987):** Size of the detector in confocal imaging systems. *Opt Lett* 1987;12(4):227-9
- **Wolfe LC (1985):** The membrane and the lesions of storage in preserved red cells. *Transfusion* 1985;25:185-203
- **Won JC, Park CY, Oh SW, Lee ES, Youn BS, Kim MS (2014):** Plasma clusterin (ApoJ) levels are associated with adiposity and systemic inflammation. *PLoS One* 2014;9:e103351

- **Yamamoto K, Yamada M, Kato Y (1989):** Age-related and phenylhydrazine-induced activation of the membrane associated cathepsin E in human erythrocytes. *J Biochem* 1989;105:114-9
- **Yasunaga M, Ipsaro JJ, Mondragón A (2012):** Structurally similar but functionally diverse ZU5 domains in human erythrocyte ankyrin. *J Mol Biol.* 2012 Apr 6; 417(4):336–350
- **Yawata Y (1996):** Integral proteins of red cell membranes: their genetic and phenotypic expressions. *Nippon Rinsho* 1996;54(9):2348-63
- **Yeung N, Cline MS, Kuchinsky A, Smoot ME, Bader GD (2008):** Exploring biological networks with Cytoscape software. *Curr Protoc Bioinformatics* 2008; Chapter 8: Unit 8 13
- **Yu-Bin Ji, Shi-Yong Gao, Wel-Ping Cheng (2005):** Effect of Haiminding on the functioning of red cell membrane of FC and H22 tumor-bearing. *World J Gastroent* 2005;11(6):823-30
- **Zallen G, Moore EE, Ciesla DJ, Brown M, Biffl WL, Silliman CC (2000):** Stored red blood cells selectively activate human neutrophils to release IL-8 and secretory PLA2. *Shock* 2000 Jan;13(1):29-33
- **Zhang JZ, Abbud W, Prohaska R, Ismail-Beigi F (2001):** Overexpression of stomatin depresses GLUT-1 glucose transporter activity. *Am J Physiol* 2001;280:C1277–C1283
- **Zhu X, Gerstein M, Snyder M (2007):** Getting connected: analysis and principles of biological networks. *Genes Dev* 2007;21:1010-24
- **Zimrin AB, Hess JR (2009):** Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells. *Vox Sang.* 2009 Feb;96(2):93-103
- **Zwart A, van Assendelft OW, Bull BS, England JM, Lewis SM, Zijlstra WG (1996):** Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition). *J Clin Pathol.* 1996 Apr;49(4):271-4

## E2. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Berne RM, Levy MN (1996):** Principles of Physiology. 2<sup>nd</sup> edition, Mosby-Year Book, Inc
- **Brecher ME (2008):** Advancing Transfusion and cellular therapies worldwide. *American Association of blood banks, Technical Manual* 2008;1(15):1-853
- **Canadian Coordinating Office for Health Technology Assessment (1998):** Leukoreduction: the techniques used, their effectiveness and costs. *CCOHTA Report* 1998:6
- **Kaushansky K, Lichtman M, Beutler E, Kipps T, Prchal J, Seligsohn UW (2010):** Hematology 8<sup>th</sup> edition
- **Saladin, KS (2004):** Anatomy and Physiology - The unity of form and function. 3<sup>rd</sup> edition
- **Turgeon, Mary Louise (2011):** Clinical Hematology: Theory and Procedures. 5<sup>th</sup> edition
- **World Health Organization (2007):** Specifications for Pharmaceutical Preparations 2007;94(3):1-77

## E3. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Fischbach F (2004):** Εγχειρίδιο Εργαστηριακών Εξετάσεων. Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα 2004

- **Επιτροπή της Ευρώπης (2000):** Θέσπιση προτύπων ποιότητας και ασφάλειας για τη συλλογή, τον έλεγχο, την επεξεργασία, την αποθήκευση και τη διανομή ανθρώπινου αίματος και συστατικών του. *Βρυξέλλες 2000*
- **Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (1998):** Σύσταση του συμβουλίου για την καταλληλότητα των δοτών αίματος και πλάσματος και τον έλεγχο της αιμοδοσίας στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα. *Βρυξέλλες 1998*

#### **E4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΚΟΝΩΝ**

1. <http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=213> (A.D.A.M. 2008)
2. **Delaunay J (2007):** The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood Rev* 2006;21(1):1-20
3. **Daleke DL (2008):** Regulation of phospholipids assymetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol* 2008;15(3):191-5
4. **Daleke DL (2008):** Regulation of phospholipids assymetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol* 2008;15(3):191-5
5. **Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, Peters LL, Chasis JA, Delaunay J, Mohandas N, Anstee DJ, Tanner DJ (2003):** A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood* 2003;101:4180-8
6. **Cooper GM (2000):** The Cell: A Molecular Approach. *Sunderland (MA) Sinauer Associates Inc. 2000*
7. **Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002):** *Biochemistry. 5th edition. New York: WH Freeman; 2002*
8. **Flatt JF και Bruce LJ (2009):** The hereditary stomatocytoses. *Haematologica* 2009 Aug;94(8):1039-1041
9. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002):** Molecular Biology of the cell. 4<sup>th</sup> Edition, *Garland Science*
10. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002):** Molecular Biology of the cell. 4<sup>th</sup> Edition, *Garland Science*
11. <http://www.allaboutblood.com>
12. **Cimen M.Y.B (2008):** Free radical metabolism in human erythrocytes. *Chin. Chim. Acta* 2008; 390:1-11
13. **Pantaleo A, Giribaldi G, Mannu F, Arese P, Turrini F (2008):** Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Autoimmun Rev* 2008;7:457-62
14. **Lang F, Lang KS, Lang PA, Huber SM, Wieder T (2006):** Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1183-92

# ***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ***

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. 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. *Journal of Proteomics*, 76, 220-238, 2012
2. **Vassilis L. Tzounakas**, Hara T. Georgatzakou, Anastasios G. Kriebardis, Effie G. Papageorgiou, Konstantinos E. Stamoulis, Leontini E. Foudoulaki-Paparizos, Marianna H. Antonelou, Issidora S. Papassideri. Uric acid variation among regular blood donors is indicative of red blood cells susceptibility to storage lesion markers: a new hypothesis tested. (Accepted Manuscript)
3. **V. L. Tzounakas**, H. T. Georgatzakou, A. G. Kriebardis, A. I. Voulgaridou, K. E. Stamoulis, L.E. Foudoulaki-Paparizos, M. H. Antonelou & I. S. Papassideri. Donor-variation effect on red blood cell storage lesion: a multi-parameter however consistent story. (Under Revision)

## ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. The physiological, pre-storage variability in the donated blood among men eligible donors. Antonelou M, **Tzounakas V**, Tsoumpeli M-T, Tsolou I, Stamoulis K, Kriebardis A, Papassideri I. *ISBT 23<sup>rd</sup> Regional Congress Amsterdam 2013*
2. Red cell storage lesion in the light of uric acid variation among regular blood donors. **Tzounakas V**, Georgatzakou H, Kriebardis A, Papageorgiou E, Stamoulis K, Foudoulaki-Paparizos L, Antonelou M, Papassideri I. *ISBT 25<sup>th</sup> Regional Congress London 2015*
3. Donor-variation effect on red cell storage lesion. **Tzounakas V**, Georgatzakou H, Kriebardis A, Voulgaridou A, Stamoulis K, Foudoulaki-Paparizos L, Antonelou M, Papassideri I. *ISBT 25<sup>th</sup> Regional Congress London 2015*

## ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Κυτταρική γήρανση και πρωτεομικό στρες της μεμβράνης αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων: Χρονοεξαρτώμενη αξιολόγηση της αποθηκευτικής βλάβης και της επίδρασης των λευκοκυττάρων. **Τζούνακας Β.**, Αντωνέλου Μ., Σταμούλης Κ., Κριεμπάρδης Α., Παπασιδέρη Ι. *34<sup>ο</sup> Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ) Τρίκαλα 2012*
2. Μορφολογικές αλλοιώσεις και επίπεδα ασβεστίου αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων πριν τη μετάγγιση. Κολλάρου Α., Αντωνέλου Μ., **Τζούνακας Β.**, Βελέντζας Α., Σταμούλης Κ., Κριεμπάρδης Α., Παπασιδέρη Ι. *34<sup>ο</sup> Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ) Τρίκαλα 2012*
3. Απώλεια μεμβρανικής επιφάνειας και σηματοδότηση εκκαθάρισης σε αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα πριν τη μετάγγιση. Τάιχερτ Μ., Αντωνέλου Μ., **Τζούνακας Β.**, Βελέντζας Α., Σταμούλης Κ., Κριεμπάρδης Α., Παπασιδέρη Ι. *34<sup>ο</sup> Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ) Τρίκαλα 2012*
4. Η επίδραση της προ-αποθηκευτικής λευκαφαίρεσης στην ποιότητα των αποθηκευμένων συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων. Μ. Αντωνέλου, **Β. Τζούνακας**, Α. Βελέντζας, Κ. Σταμούλης, Α. Κριεμπάρδης, Ι. Παπασιδέρη. *23<sup>ο</sup> Πανελλήνιο αιματολογικό συνέδριο (Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία – ΕΑΕ) Θεσσαλονίκη 2012*
5. Εγγενή αιματολογικά χαρακτηριστικά αιμοδοτών και συσχετίσή τους με την αποθηκευτική βλάβη. **Β. Τζούνακας**, Α. Κριεμπάρδης, Ε. Τσολού, Μ. Τσουμπελή, Χ. Γεωργατζάκου, Κ. Σταμούλης, Μ. Αντωνέλου, Ι. Παπασιδέρη. *24<sup>ο</sup> Πανελλήνιο αιματολογικό συνέδριο (Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία – ΕΑΕ) Αθήνα 2013*
6. Διακύμανση αιματολογικών και κυτταρικών παραμέτρων σε αιμοδότες που πληρούν τα κριτήρια αιμοδοσίας, πριν την αποθήκευση σε τράπεζες αίματος. **Τζούνακας Β.**, Τσολού Ε, Τσουμπελή Μ, Γεωργατζάκου Χ, Σταμούλης Κ, Κριεμπάρδης Α, Αντωνέλου Μ, Παπασιδέρη Ι. *35<sup>ο</sup> Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ) Ναύπλιο 2013*
7. Επίδραση εγγενών, φυσιολογικών χαρακτηριστικών αιμοδοτών στην αποθηκευτική ικανότητα ερυθροκυττάρων σε λευκαφαιρεμένες μονάδες μετάγγισης. **Β. Τζούνακας**, Χ. Γεωργατζάκου, Α. Βελέντζας, Ε. Παπαγεωργίου, Κ. Σταμούλης, Λ. Φουντουλάκη-Παπαρίζου, Α. Κριεμπάρδης, Μ. Αντωνέλου, Ι. Παπασιδέρη. *25<sup>ο</sup> Πανελλήνιο αιματολογικό συνέδριο (Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία – ΕΑΕ) Θεσσαλονίκη 2014*
8. Η διακύμανση αιματολογικών χαρακτηριστικών στους τακτικούς αιμοδότες σχετίζεται με την αποθηκευτική βλάβη των ερυθροκυττάρων στις τράπεζες αίματος. **Β. Τζούνακας**, Χ. Γεωργατζάκου, Α. Βελέντζας, Α. Βουλγαρίδου, Ε. Παπαγεωργίου, Κ. Σταμούλης, Λ. Φουντουλάκη-Παπαρίζου<sup>5</sup> Α. Κριεμπάρδης, Μ. Αντωνέλου, Ι. Παπασιδέρη. *37<sup>ο</sup> Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ) Βόλος 2015*



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

[www.elsevier.com/locate/jprot](http://www.elsevier.com/locate/jprot)

## Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: A time-course evaluation from shape to proteome<sup>☆</sup>

Marianna H. Antonelou<sup>a</sup>, Vassilis L. Tzounakas<sup>a</sup>, Athanassios D. Velentzas<sup>a</sup>,  
Konstantinos E. Stamoulis<sup>b</sup>, Anastasios G. Kriebardis<sup>c</sup>, Issidora S. Papassideri<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, NKUA, Greece

<sup>b</sup>Blood Transfusion Center, Nikea, Piraeus, Greece

<sup>c</sup>Laboratory of Hematology and Transfusion Medicine, Department of Medical Laboratories, Faculty of Health and Caring Professions, Technological and Educational Institute of Athens, Greece

### ARTICLE INFO

Available online 13 July 2012

#### Keywords:

Storage lesion  
Red cell aging  
Pre-storage leukoreduction  
Membrane proteome  
Oxidative stress  
Calcium accumulation

### ABSTRACT

The introduction of pre-storage leukoreduction in the preparation of standard RBCs intended for transfusion provided significant improvement in the quality of labile products and their post transfusion viability and effects, although the literature data are controversial. To elucidate the issue of the probable leukoreduction effects on RBCs storage lesion, we evaluated various storage quality measures in RBCs stored in either leukoreduced (L) or non-leukoreduced (N) units, with emphasis to senescence and oxidative stress associated modifications. Our data suggest that the residual leukocytes/platelets of the labile products represent a stressful storage factor, countering the structural and functional integrity of stored RBCs. Hemolysis, irreversible echinocytosis, microvesiculation, removal signaling, ROS/calcium accumulation, band 3-related senescence modifications, membrane proteome stress biomarkers as well as emergence of a senescence phenotype in young RBCs that is disproportionate to their age, are all encountered more or mostly in N-RBCs compared to the L-RBCs, either for a part or for the whole of the storage period. The partial, yet significant, alleviation of so many storage-related manifestations in the L-RBCs compared to the N-RBCs, is presented for the first time and provides a rational mechanistic interpretation of the improved storage quality and transfusions observed by the introduction of pre-storage leukoreduction.

This article is part of a Special Issue entitled: Integrated omics.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** BS3, bis-sulfosuccinimidyl-suberate; CSLM, confocal laser scanning microscopy; CPD, citrate-phosphate-dextrose; CMH2DCFDA, 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, acetyl ester; DCF, dichlorofluorescein; Fluo-4AM, fluorescent calcium indicator Fluo-4; Hb, hemoglobin; HCT, hematocrit; L, leukoreduced; MCH, mean cell Hb; MCHC, mean cell Hb concentration; MCV, mean cell volume; N, non-leukoreduced; NEM, N-ethylmaleimide; NS, non-stored; PCI, proteome carbonylation index; PS, phosphatidylserine; Prx2, peroxiredoxin 2; RBCs, red blood cells; RDW, red cell distribution width; SAGM, saline-adenine-glucose-mannitol; S-RBCs, high-density fractions of RBCs enriched in senescent-RBCs; t-BHP, tert-butyl hydroperoxide; Y-RBCs, low-density fractions of RBCs enriched in young RBCs.

<sup>☆</sup> This article is part of a Special Issue entitled: Integrated omics.

\* Corresponding author at: Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, NKUA, Panepistimiopolis, Athens 15784, Greece. Tel.: +30 210 7274546; fax: +30 210 7274742.

E-mail address: [ipapasid@biol.uoa.gr](mailto:ipapasid@biol.uoa.gr) (I.S. Papassideri).

1874-3919/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.jprot.2012.06.032

## 1. Introduction

Effective *ex vivo* storage of red blood cells (RBCs) is an essential requirement for medical practice. Stored RBCs undergo a series of time-dependent – yet early enough recognizable – physiological, structural and biochemical alterations, which are only reversible to some extent [1]. In the RBC storage lesion context, physiologically important disturbances in energy metabolism, rheological properties (shape, deformability, aggregability, intracellular viscosity), oxidation/carbonylation stress and finally, in cellular aging process have been widely characterized [1,2]. Altered membrane surface and cytoskeleton contribute to the RBCs damage and clearance [3,4]. Although the clinical importance of the RBCs storage lesion is poorly understood, some of the irreversible deteriorations of the stored RBCs, like hemolysis, potassium release and microvesicles accumulation, are associated with reduced post-transfusion survival/efficacy and increased risk of adverse reactions in the recipients [5,6].

The currently used techniques for the preparation of standard RBCs products include the pre-storage filtration of blood to remove the contaminating donor leukocytes and platelets. Despite controversy among the randomized clinical trials on the beneficial or neutral effects of filtration [7,8], the introduction of pre-storage leukoreduction has provided significant improvement in transfusions by lowering the incidence of viruses transmission and the circumstantial, yet severe, untoward clinical effects (alloimmunization, immunosuppression, inflammatory responses etc.) that have been related to increased morbidity/mortality liability [5,9]. Moreover, the leukoreduction exhibits a beneficial effect on RBCs storage lesion, by improving both the hemolysis and the post-transfusion recovery of leukoreduced RBCs [9,10]. Activated, apoptotic or degenerated leukocytes could equally trigger adverse transfusion reactions and storage-associated damage, since they represent a source for bioactive factors, like oxygen free radicals, cytokines and enzymes [10,11]. However, pre-storage leukocyte reduction has not eliminated all the leukocyte-related responses [12] nor the biochemical and morphological changes that occur to RBCs as a consequence of aging and storage [13]. As a matter of fact, some authors claimed that there is but a modest improvement in post-infusion viability of leukoreduced RBCs vs. the non-leukoreduced ones [14]. Further on, a recent study suggested that the pre-storage filtration may aggravate blood storage lesions [15]. Finally, although leukoreduction has been assigned as a standard in the labile products making, today, approximately 20% of the transfusions in the United States [16] and much higher percentage of those performed in several European countries are still conservative, namely non-leukoreduced. Therefore, there is still a need for clarifying the probable effects of leukoreduction on storage lesion progression as well as on *in vivo* efficacy and adverse transfusion effects. Adequate inventory and understanding of RBCs storage lesion in relation to various storage strategies currently followed in clinical practice is probably the only way to mitigate the disturbances that render RBC transfusions dangerous or less effective.

This study aims at reporting experimental facts touching the effect of residual leukocytes in the progression of RBCs storage lesion under standard blood banking conditions, with

emphasis to the senescence and oxidative stress associated molecular and cellular modifications. To this purpose, we evaluated a series of storage quality measures in RBCs stored in either leukoreduced (L) or non-leukoreduced (N) units. A careful standardization of sample harvesting, process and storage was set up in order to minimize the pre-analytical variations. Our hematological, structural, biochemical and proteomic data suggest that the residual leukocytes and platelets represent an additional stressful factor for the stored RBCs, affecting almost all RBCs removal signaling mechanisms and thus their structural and functional integrity. The partial, yet significant, alleviation of so many storage-related manifestations in L-RBCs compared to N-RBCs is presented for the first time and provides a rational mechanistic interpretation of the improved storage quality and transfusions observed after the introduction of pre-storage leukoreduction.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Material supplies

Antibodies against band 3, spectrin, human IgGs and HRP-conjugated antibodies to goat IgGs, as well as protease inhibitor cocktails, phosphatase inhibitor cocktail 2, t-butyl hydroperoxide (t-BHP) alpha-cellulose, microcrystalline cellulose (type 50), N-ethylmaleimide (NEM), Percoll medium (d=1.13 g/ml), Drabkin's reagent components and common chemicals and buffers were all obtained from Sigma–Aldrich (Munich, Germany). Electron microscopy grade glutaraldehyde solution was from Serva (Heidelberg, Germany). Antibodies against hemoglobin (Hb) and peroxiredoxin 2 (Prx2) were obtained from Europa Bioproducts (UK) and from Acris GmbH (Herford, Germany), respectively. Antibodies against CD47, clusterin, HSP70, calpain-1 ( $\mu$ -calpain), cathepsin E and band 3 were from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Anti-human CD59 and HRP-conjugated anti-rabbit IgG were from R&D Systems (MN, USA). mAbs against synexin (annexin VII) and flotillin-2 were obtained from BD Transduction Laboratories (CA, USA). Sodium orthovanadate and Syk inhibitors II and IV were from Calbiochem (Darmstadt, Germany). bis-sulfosuccinimidyl-suberate (BS3) crosslinker was from Thermo Scientific (Rockford, IL). Anti-phosphotyrosine (pTyr, clone PY20) mAb, MF membrane syringe driven filters and the Oxyblot® detection kit were obtained from Millipore (Temecula, CA). A-23187 ionophore and annexin-V-Fluos solution were from Roche Diagnostics (Burgdorf, Switzerland). 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, acetyl ester (CMH2DCFDA) and fluorescent calcium indicator Fluo-4 (Fluo-4 AM) were from Invitrogen, Molecular Probes (Eugene, OR). HRP-conjugated antibodies to rabbit IgGs, ECL Western blot detection kit and Percoll solution (d=1.131 g/ml) were from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). HRP-conjugated antibodies to mouse IgGs were from DakoCytomation (Glostrup, Denmark). Rabbit anti-human CD235a was from AbD Serotec (Oxford, UK). Bradford protein assay was obtained from Bio-Rad (Hercules, CA). Western lighting Plus ECL was from Perkin Elmer (CA, USA). mAb against stomatin and antisera against proteins 4.1R and pallidin (band 4.2) 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.

## 2.2. Study planning, subjects and RBCs storage in blood bank conditions

Venous blood of 12 eligible, young (22–42 years old) blood donors was used in the present study. Initially, packed RBCs from 8 different donors stored in citrate-phosphate-dextrose (CPD) (CPD)/saline-adenine-glucose-mannitol (SAGM) units with (L, n=4) or without (N, n=4) filter leukoreduction were studied. By preliminary hematological analysis any aberrations from the average hematological profile were excluded. In order to examine the influence of donor variation to the diversification observed between stored L- and N-RBCs, we prepared L-RBCs preparations from 4 additional donors (n=4) under the same storage conditions. After a rational period of time, the same donors donated blood to prepare N-RBCs units (n=4). That approach was considered more reliable compared to the usually engaged division of a unit into filtered and non-filtered components, because it allows analysis of cell components under original volume and blood banking conditions. The hematological and blood biochemical analysis performed after the second donation verified the presence of a stable, normal hematologic profile, while a strict standardization of all procedures, analytical protocols and methodologies followed (blood collection conditions, type of anticoagulant and additive solutions, time/temperature before processing, working and storage duration and temperature, sampling volumes and timing, needle-to-analysis time, freeze-thaw cycles for frozen membranes etc.) ensured minimal levels of pre-analytical and analytical variations among the different measurements. The study has been submitted and approved by the Research Bioethics and BioSecure Committee of the Faculty of Biology/NKUA. Investigations were carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all blood donors participating in this study.

Collection and processing of blood, as well as isolation, storage and sampling of packed RBCs under various conditions were performed as previously described [17]. Briefly, whole blood was collected in a CPD/SAGM triple blood bag system (Baxter, Rome, Italy), anticoagulated with 63 ml of CPD (2.63 g sodium citrate dihydrate, 0.30 g citric acid monohydrate, 2.55 g dextrose monohydrate, 0.222 g monobasic sodium biphosphate monohydrate) and passed through leukoreduction filters (only for the L-preparations) according to the manufacturer's instructions. In order to prepare fresh frozen plasma from the same donations (for transfusion purposes) the blood units were filter leukodepleted after 8 h hold-up time at room temperature. RBCs concentrates were prepared by centrifugation in an automated blood processing device (Compomat G4, Fresenius HemoCare) before 100 ml of SAGM solution (0.9 g dextrose monohydrate, 0.877 g sodium chloride, 0.0169 g adenine, 0.525 g D-mannitol) was added. Then RBCs were stored for 7 weeks at 2 to 6 °C. From the first 2–4 days of storage and weekly thereafter, a sample was collected from the stored units (5–20 µl for the microscopy and fluorometry experiments, 2.5–

3.5 ml for the RBCs fractionation and membrane preparations and 60 ml for the vesicles preparation on day 17 of storage) by a sterile sampling device, after gentle mixing of the unit content. As controls, donor RBCs collected before the banking procedure as well as stored RBCs of days 0–4 were used. Differential leukocyte and RBC counts, hematocrit (HCT), Hb concentration and RBCs indexes (mean cell volume, MCV; mean cell Hb, MCH; mean cell Hb concentration, MCHC; RBC distribution width, RDW) were performed using an automatic blood cell counter (Sysmex K-4500, Roche). Residual leukocytes measurement post-filtration was performed manually by the Türk's solution method. Percentage hemolysis was determined by comparing the supernatant Hb to total Hb concentrations, using Drabkin's method [18,19]. The HCT of each sample was measured before assay using microhematocrit centrifuge.

## 2.3. Electron microscopy

For the morphological evaluation of RBCs by scanning electron microscopy, purified RBCs were fixed with 2% glutaraldehyde and post-fixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 mol/L sodium cacodylate buffer, pH 7.4. Fixed cells were successively dehydrated in ascending ethanol series and allowed to settle on standard microscopic cover glasses. Finally, RBCs were coated with gold-palladium (Tousimis Samsputter-2a, Rockville, Maryland) before being examined in a microscope (Philips SEM515). Classification of cell transformations was achieved by using the standard criteria with minor modifications as previously described [20,21]. All spherocytic modifications of the stored cells (spherocytes, spherocinocytes and spherostomatocytes) along with RBCs presented with degenerative shapes were assorted to the "irreversibly" transformed cells group, as previously suggested [22,23]. The percentage of discocytes and that of irreversible (see above) or reversible (all the other types of minor to severe shape modifications, e.g. echinocytes type III) was estimated by 3 independent individuals in "blind" electron micrographs containing at least 2000 cells from randomly chosen fields. Only the perfectly shaped discocytes have been included in the category "normal RBCs". Discocytes with even minor alterations in volume, surface or contour were characterized as reversibly changed cells.

## 2.4. PS externalization in stored RBCs

Detection of phosphatidylserine (PS) exposure was performed by confocal laser scanning microscopy (CSLM) analysis of RBCs labeled with annexin V that is a calcium-dependent, sensitive PS probe.  $10^6$  L- and N-RBCs stored for various periods in CPD-SAGM were incubated in a calcium-containing buffer (10 mmol/L Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ) and labeled with the fluorescent Annexin-V-Fluos solution for 15 min at 20 °C in the dark, according to the manufacturer's recommendations. Examination was performed with CLSM (Digital Eclipse C1, Nikon, NY) using an excitation wavelength of 488 nm and detection in the range of 515–565 nm (green), with recordings at the same exposure times. As positive controls, we used N-ethylmaleimide- (inhibitor of aminophospholipid translocase) pre-treated cells, *in vitro* oxidized cells or cells loaded with calcium/ionophore A23187. As negative controls, non-stored RBCs from each donor as well as freshly donated blood were

used and were either free of signaling or they presented with extremely low percentage of PS-positive cells (<0.06%). The percentage of PS-positive RBCs in each sample was evaluated in triplicate assays, by counting 800 RBCs at least in randomly chosen fields.

### 2.5. Determination of intracellular ROS and calcium

ROS accumulation in stored RBCs was detected with the membrane-permeable, non-fluorescent and redox-sensitive probe 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) according to the manufacturer's guidelines with minor modifications as previously described [21]. CM-H<sub>2</sub>DCFDA is de-esterified inside the cell. Oxidation of the de-esterified product by intracellular ROS yields the fluorescent DCF (dichlorofluorescein) product that can be quantified by fluorometry or flow cytometry. More specifically, isolated, leukocyte-depleted (by cellulose columns, see below) and thoroughly washed RBCs at 1% HCT (each sample in triplets) were loaded with 10 μmol/L CM-H<sub>2</sub>DCFDA in PBS buffer for 30 min at 25 °C. Afterwards, the CM-H<sub>2</sub>DCFDA-loaded RBCs were washed once with PBS and incubated for a short recovery time of 10–15 min in order to render the dye responsive to oxidation. Fluorescent DCF production was measured using the VersaFluor™ Fluorometer System (Bio-Rad) at 490 nm excitation and 520 nm emission wavelengths. Intensity records were normalized to the protein level (~1.0–2.0 mg/ml). CM-H<sub>2</sub>DCFDA sensitivity to ROS detection was verified in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- or t-BHP-treated stored RBCs suspensions. The following negative controls were used: (1) unstained RBCs incubated with only PBS buffer to detect auto-fluorescence, and, (2) cell-free mixtures of dye and buffers.

For the intracellular calcium measurement, L- and N-RBCs were resuspended (final HCT 0.32–0.64%) in a buffer containing 145 mmol/L NaCl, 7.5 mmol/L KCl, 10 mmol/L Hepes/NaOH, 1.8 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L glucose and 10 mmol/L sodium pyruvate (pH 7.4). The cells were loaded with the membrane-permeable acetoxymethyl ester derivative of the fluorescent calcium indicator Fluo-4 (Fluo-4 AM) at 2 μmol/L final concentration for 40 min at 37 °C, in the dark [24]. Following wash in dye-free buffer, the cells were incubated for a further 30 min at room temperature. The fluorescence intensity of Fluo-4 AM after the binding of intracellular calcium was measured in the VersaFluor™ Fluorometer System at 485 nm excitation and 520 nm emission wavelengths. The possible degradation of the AM ester aliquots and the responsiveness of the dye to the RBCs cellular environment (use of A-23187 ionophore in a control experiment) were checked before each assay, according to the manufacturer's guidelines. Each sample was measured in triplicate.

### 2.6. Treatment of RBCs

In order to evaluate the tyrosine phosphorylation of band 3, we treated L- and N-RBCs with ortho-vanadate that is a protein tyrosine phosphatase inhibitor. Tyrosine phosphorylation state of a protein is the result of the competing activities of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases. In human RBCs tyrosine phosphatases activity

is very high in relation to that of tyrosine kinases, resulting in a low basal phosphotyrosine level. As a result, tyrosine phosphorylation of band 3, constituting the major site of phosphorylation, cannot be detected in untreated RBCs [25,26]. However, upon treatment with protein tyrosine phosphatases inhibitors a large increase in erythrocyte protein tyrosine phosphorylation is observed. Ortho-vanadate induces hyper-phosphorylation of band 3 on tyrosine residues probably by inhibition of RBCs tyrosine phosphatases. The mechanism underlying the activation of tyrosine phosphorylation is thought to involve the sequential action of two protein tyrosine kinases, Syk (p72syk) and Lyn (p53/56lyn) and probably some type of protein conformational change in the membrane skeleton that generate a new or more accessible binding site that is otherwise occluded or inaccessible in non-stimulated cells [27]. To detect tyrosine phosphorylation, stored L- and N-RBCs were diluted (at 30% HCT) in PBS containing 5 mmol/L glucose (PBS-glucose) and incubated with 2.0–2.5 mmol/L ortho-vanadate for 2 h at 37 °C. For controls, RBCs were either left untreated or pretreated (before addition of o-vanadate) with 1 μM Syk inhibitors II and IV for 1 h at 37 °C in the dark. Each reaction was stopped by washing with PBS-glucose. For membrane preparation phosphatase inhibitors were included to the cell lysis buffer.

The ability of chemical cross-linkers to cross-link band 3 in stored RBCs was assessed by incubating RBCs (~25 × 10<sup>6</sup> cells/ml) with 1.0–2.5 mmol/L bis-sulfosuccinimidyl-suberate (BS3) in non-amine-containing conjugation buffer (20 mmol/L sodium phosphate, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0) for 30 min at 20 °C. RBCs were then washed in quenching buffer (150 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Tris pH 7.4), to inactivate residual cross-linking agent. After both treatments, membranes were prepared and analyzed as described below.

### 2.7. Density fractionation of RBCs

RBCs' fractionation according to density was performed by means of a Percoll discontinuous gradient as previously described [28,29]. Briefly, the gradient was built up in five layers of Percoll medium varied between 1.087 and 1.098 g/ml. RBCs suspensions (40% HCT) were layered on the top of the gradients and the fractions were collected by low speed centrifugation (2700 ×g) for 40 min at 20 °C. Cells were excessively washed to remove Percoll and a range of age-dependent RBCs parameters were recorded in each fraction (MCV, MCHC etc.).

### 2.8. Isolation of vesicles and RBCs-membrane preparation

Vesicles were isolated from the supernatant of L- and N-RBCs units (n=4) on days 17 and 42 of storage by high-speed centrifugation at 4 °C as previously described [30,31]. Briefly, RBCs aliquots were centrifuged at 2000 ×g and the supernatants filtered through sterile 0.8 μm nitrocellulose filters. The filtrate was ultracentrifuged at 37,000 ×g for 1 h and the pellet of vesicles was resuspended in PBS and ultracentrifuged twice under the same conditions. After the addition of protease inhibitors mix, the protein concentration was determined using the Bradford protein assay. Quantification of the extent of



vesiculation was based on the total protein content of the vesicle suspensions in relation to the volume of the RBCs as previously described [31]. To our knowledge, this method along with that of centrifugable Hb estimation, have an advantage over the less laborious and cell-specific flow cytometry approach in that they allow the analysis of smaller (less than 200–300 nm) microvesicles.

RBCs were isolated by the method of Beutler [32]. Briefly, leukocytes and platelets were removed from the RBCs samples by filtering through columns of alpha-cellulose and microcrystalline cellulose mixture in isotonic saline, PBS or Hepes-buffered isotonic saline (133 mmol/L NaCl, 4.5 mmol/L KCl and 10 mmol/L Hepes, pH 7.4) supplemented with protease inhibitors. RBCs were extensively washed and diluted to an appropriate HCT. Purified RBCs were lysed with hypotonic (5 mmol/L) sodium phosphate buffer (pH 8.0) containing a cocktail of protease inhibitors and membrane fractions were prepared as previously described [17].

### 2.9. Immunoblotting analysis and estimation of membrane proteome carbonylation index

Equal amount (12–25 µg) of RBCs total membrane protein was loaded in Laemmli gels, blotted to nitrocellulose membranes and probed with primary and HRP-conjugated secondary antibodies. Immunoblots were developed using an ECL reagent kit and quantified by scanning densitometry (Gel Analyzer v.1.0 image-processing program, Athens, Greece). Purified RBCs plasma membrane proteins were processed for the detection of carbonyl groups using the Oxyblot detection kit as per manufacturer's specifications. For quantification purposes, the proteome carbonylation index (PCI) was calculated [21].

### 2.10. Statistical analysis

Presented experiments have been repeated at least two times, unless otherwise stated. Data points correspond to the mean value; error bars denote SD. Individual protein levels were quantified against a reference membrane protein or against the

sum of the normal proteins, occasionally further normalized to the respective corresponding controls (untreated, non-stored, L-RBCs, or young cells). For statistical analysis the MS Excel and the Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS; version 19.0 for Windows; administrated by NKUA) were used. Significance was evaluated using the one-way ANOVA. Comparisons between different groups were performed by the independent t-test or the chi-squared test. Spearman's correlation test (two-sided) was used to assess the relationship between variables (correlation coefficient *r*). Significance was accepted at  $p < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Supernatant composition and hematological profile differences between L- and N-units

Storage resulted in increased hemolysis and potassium release in both groups throughout the entire storage period (Table 1). L-units were characterized by substantially higher hemolysis and supernatant potassium compared to the N-units ( $p < 0.05$ ) on the day of donation. However, afterwards and until the end of the storage period both parameters were significantly higher in N-RBCs ( $p < 0.05$ ) as expected [9,10]. Storage of both groups was also associated with a significant elevation of MCV after the first week as previously reported [33], equally processed for L- and N-RBCs until the last day. After prolonged storage the RDW index of N-RBCs was also substantially higher compared to the L-RBCs.

The increased hemolysis seen in L-units on the day of donation probably relates to donor variations regarding the leukoreduction procedure. Indeed, as previously observed [9], the RBCs from some healthy individuals are more susceptible to hemolysis during the filtering than other. On the other hand, the RDW index variation probably reflects the N-RBCs-related increase in spherocytosis and cellular fragmentation. Notably, in renal disease patients the aberrant RDW was found positive correlated to the degree of echinocytosis and intracellular ROS accumulation [21].

**Table 1 – Hematological analysis and supernatant biochemical data for L-RBCs and N-RBCs units (n=8).**

	Non-leucodepleted units (N)				Leucodepleted units (L)			
	Day 0	Day 20	Day 30	Day 42	Day 0	Day 20	Day 30	Day 42
WBCs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8.1±0.0*	7.7±0.0*	5.1±0.5*	4.4±1.0	0.3±0.0	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
RBCs ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.4±0.8	8.5±1.3	8.6±1.1	8.6±1.1	8.3±0.1	8.2±0.1	8.1±0.0	8.1±0.0
PLTs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	283±10	203±2	179±81	151±71	nd <sup>a</sup>			
Hb (g/dL)	22.7±0.4	23.0±0.1	23.4±1.1	23.4±1.2	22.4±1.5	23.0±2.5	22.8±2.0	22.7±2.3
Hct (%)	80.0±11.5	80.0±11.2	83.3±9.8	83.2±10.0	75.6±1.8	76.7±0.6	77.5±2.0	77.0±1.6
MCV (fL)	90.0±2.4	94.8±1.6	97.1±1.0	98.2±1.0	88.9±2.5	93.1±2.1	95.6±2.7	96.5±3.0
MCH (pg)	30.8±2.0	31.5±1.0	31.5±0.6*	32.1±0.4	30.3±0.1	30.1±0.6	30.1±0.4	31.3±1.5
MCHC (g/dL)	31.3±0.3	31.7±0.4	31.8±0.1	32.3±0.3	30.8±0.8	31.5±1.3	31.1±1.0	32.0±0.4
RDW-CV (%)	12.7±0.7	14.6±0.2	15.8±0.8	16.7±0.6*	11.7±0.6	14.1±0.4	14.6±0.4	15.6±0.4
Supernatant Na <sup>+</sup> (mmol/L)	139.5±0.7*	84.0±1.4*	79.5±2.1	67.5±0.7	142.5±0.7	89.0±2.8	81.5±2.1	62.5±2.1*
Supernatant K <sup>+</sup> (mmol/L)	4.4±0.3	16.9±0.8*	24.3±3.6	35.8±1.5*	6.0±0.1*	15.1±0.3	21.0±0.4	26.3±0.6
Hemolysis (%)	0.13±0.06	0.59±0.21*	0.72±0.24*	1.48±0.33*	0.33±0.01*	0.24±0.05	0.30±0.02	0.70±0.11

Results are presented as mean±SD.

<sup>a</sup> Non-detected (less than detection limit).

\*  $p < 0.05$  L-RBCs vs. N-RBCs.

3.2. Effect of residual leukocytes on RBCs structural integrity and membrane preservation

We analyzed the morphology of L- and N-RBCs by means of scanning electron microscopy at three time points of the storage period (n=8). We used the previously established criteria for the classification of the irreversibly shaped RBCs (all spherocytic cells and that of degenerated shapes, see index in Fig. 1A) but more strict criteria for the category of normal discocytes, by classifying as such only the perfectly shaped cells (see Materials and methods). RBC morphology was deteriorating with increasing storage time in both groups (Fig. 1A). However, while at the beginning of the storage the two groups exhibited an equal percentage of shape changes (Fig. 1B), on day 21 and afterwards there was a significant increase (p<0.050) in the irreversible transformations in N-RBCs compared to the L-RBCs. This finding

is probably associated with the extent of vesiculation and membrane loss observed in N-RBCs after the second week of storage (see below). Towards the end of the storage period, the gap divergence in the percentage of irreversible transformations between the two units was narrowed (still however significant), probably in relation to the N-RBCs hemolysis (Table 1).

We next estimated the degree of vesiculation, expressed as the total protein of the collected vesicles per volume unit of RBCs (µg/ml). The vesiculation was increased in both groups (n=4) over storage time (Fig. 2), as previously reported [1,31]. Nevertheless, there was a statistically significant increase in the amount of vesicular protein collected from the N-RBC supernatants compared to the L-RBC ones on the 17th day, which was maximized at the end of the storage period (p<0.010, 3.3–27.7 µg/ml and 9.2–51.8 µg/ml for the L- and N-units, respectively).

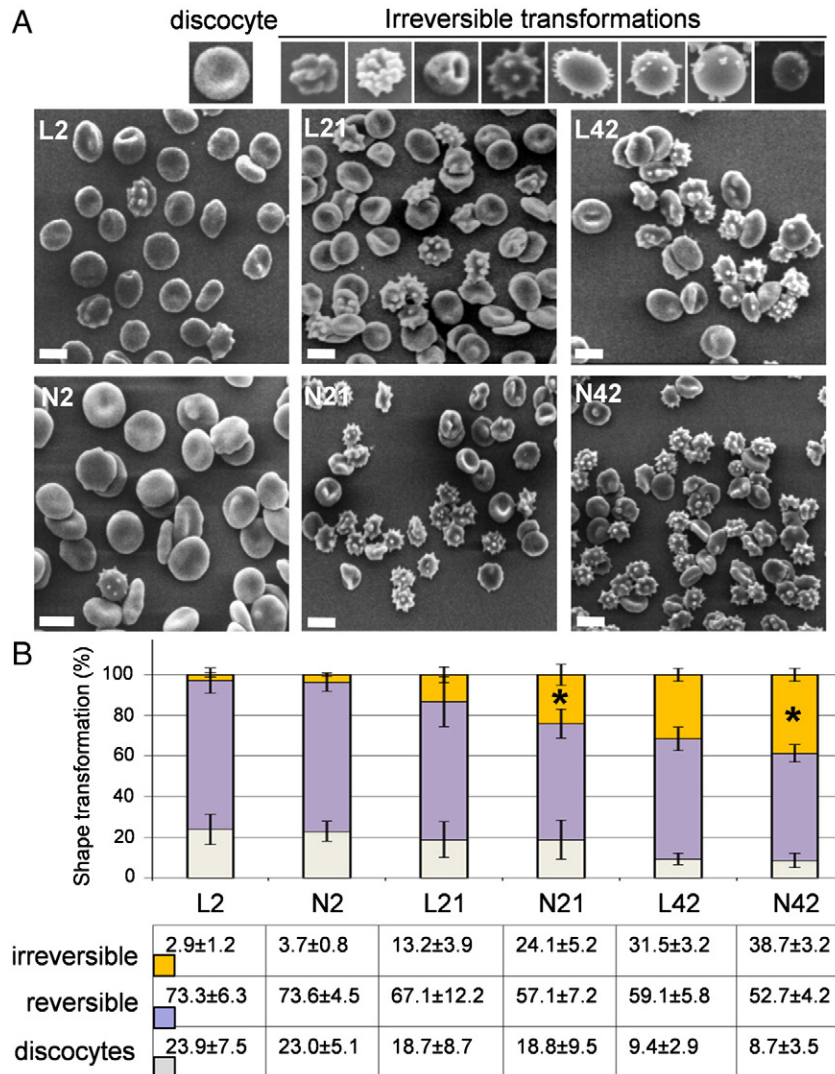
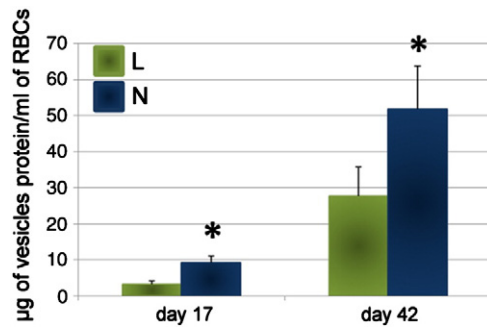


Fig. 1 – Morphologic evaluation of L- and N-RBCs by scanning electron microscopy during the storage in CPD-SAGM. (A) Index of “irreversible” RBCs transformations and representative electron micrographs from a donor’s RBCs stored in either L- or N-units for 2, 21 or 42 days. Scale bars, 10 µm. (B) Average percentage of discocytes, reversibly and irreversibly (see Materials and methods) changed stored RBCs for the indicated storage time-points. Error bars indicate SD (n=8); (\*) L- vs. N-RBCs p<0.01 and <0.05 for the days 21 and 42, respectively.



**Fig. 2 – Vesiculation degree of L- and N-RBCs. Comparative estimation of the averaged total vesicular protein content per volume of packed RBCs, collected from the supernatant of both groups on days 17 and 42 of storage. Error bars indicate SD (n=4); (\*) p<0.01 L- vs. N-RBCs.**

During storage, RBCs undergo a progressive change in shape, from discocytes to echinocytes and finally to spherical and degenerative shaped cells, closely associated with membrane loss in the form of microvesicles [34]. Although the average stored cells appear to be able to compensate for a moderate membrane loss following the replacement of the echinocytogenic medium (reversibly modified cells), the final spherocytocyte stage is an irreversible outcome [34]. Indeed, spherocytocytes are dying or about to die cells, with very short life expectancy and post-transfusion viability [35]. Greenwalt et al., [36] has found improved RBCs morphology and microvesiculation in L-units compared to the non-leukoreduced ones using phase microscopy, while the opposite finding was recently reported at confocal laser scanning microscopy level [15].

The membrane vesiculation results evidenced the clinically significant accumulation of more microvesicles inside the N-RBCs units compared to the L-ones. Undoubtedly, in the case of L-units those vesicles are released almost exclusively from the stored RBCs, representing a direct measure of the membrane surface loss. In the case of N-units however, the precipitable material inevitably contains vesicles released from the contaminant leukocytes and platelets as well. Although the cellular origin of the vesicles collected from the N-units is outside the scope of our study, it is expected that the great majority of them was produced by RBCs membrane vesiculation. In view of (i) the high ratio of RBCs to leukocytes and platelets (1 leukocyte per 2000 RBCs at the end of the storage period, see Table 1), (ii) previous studies showing that the majority of the vesicles collected from N-units of packed RBCs contain Hb [31] and (iii) the significantly increased echinocytosis of N-RBCs compared to the L-RBCs (Fig. 1), it is unlikely that the two- or three-fold increase in vesicular protein detected in N-units compared to the L-units is attributed to the vesiculation of the contaminant cells. Instead of that, it probably reflects the detrimental effect of residual leukocytes and platelets on N-RBCs membrane preservation.

Microvesiculation of the membrane contributes to the elimination of oxidized, damaged and signaling effective components from RBCs [37]. At the same time, vesiculation and

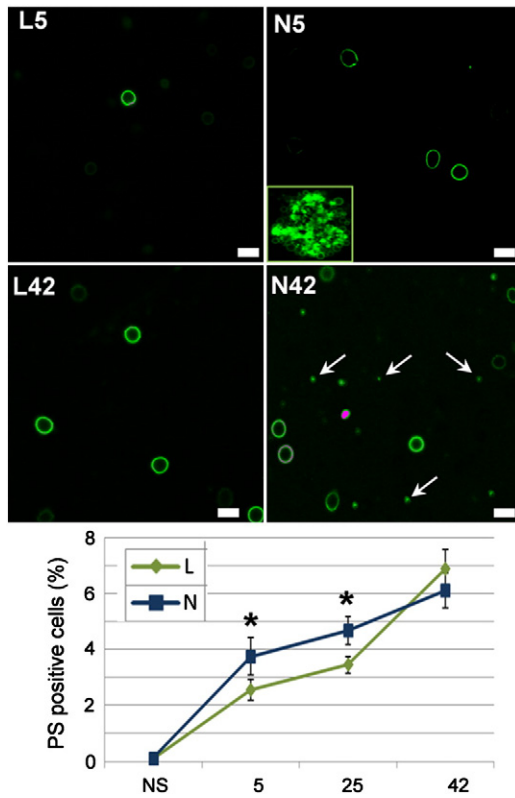
irreversible transformation is part of the RBCs aging phenotype, both *in vitro* and *in vivo* [38]. The shape modifications of stored cells are associated with rheologic changes, increased viscosity and reduced flow in capillary systems [34]. Degenerative shape modifications and loss of membrane surface contribute to deformability defects that threaten post-transfusion viability of stored RBCs [6,22]. They also result in the release of vesicles that are rich in oxidized material, death signaling mediators and PS. The specific composition of the vesicles renders them highly pro-inflammatory and pro-thrombotic, increasing thus the risk of adverse post-transfusion reactions. As a result, the degree of vesiculation and irreversible transformation of stored RBCs have been used as measures of storage quality [39]. Despite that, the identity of the storage parameters that slow or promote vesiculation, is still elusive. *In vitro*, both echinocytosis and microvesiculation are promoted by intracellular calcium elevation and ATP depletion but during routine storage this correlation is poor [40]. According to our results (see below) the poor preservation of proteins that contribute to the effective adhesion of cytoskeleton to the lipid bilayer, seems a plausible alternative explanation. In support, the effect of cytoskeleton protein damage to the vesiculation susceptibility of stored cells has been previously reported [41]. In conclusion, the comparative analysis of L- and N-groups showed that the residual leukocytes and platelets militate against the structural integrity and membrane preservation of stored RBCs.

### 3.3. The contaminant cells exacerbate PS exposure on N-RBCs

Annexin V binding by RBCs was assessed over storage time by means of fluorescent microscopy. In view of the very low presentation of other cell types in the samples (Table 1) and their effective discrimination by size and morphology criteria, only the RBCs of the units were included in the measurements. Our approach revealed a small but significant and progressive increase in PS externalization of both groups' RBCs (n=8) during the storage (Fig. 3). In agreement with previous studies documenting PS exposure on RBCs already after the first day of storage [42], we detected a significant increase (p=0.028) in PS-positive cells on day 5 (L 2.56±0.38% and N 3.75±0.67%) compared to the scanty percentage observed in the non-stored blood of the same donors (L 0.09±0.01% and N 0.11±0.01%). Likewise, the N-units contained on average more PS-positive RBCs compared to the L-units in the middle of the storage period (4.69±0.50% vs. 3.45±0.29%, p=0.019), however near the last days the differences were flattened following a trend for greater PS exposure in L-RBCs (6.90±0.70% vs. 6.13±0.63% in N-RBCs). Probably, the higher vesiculation (Fig. 2) and hemolysis (Table 1) levels result in a smaller subpopulation of PS-positive aged RBCs in N-units [43,44]. On the last day of storage an obvious difference between the two groups appeared at the fluorescence microscopy level, where the N-RBCs of all donors examined were surrounded by a dense "cloud" of PS-positive particles of 1 µm or less in size (arrows in Fig. 3, photo N42) which probably represent RBCs-derived microvesicles [34].

Since PS externalization is a potent removal signal, it might menace *in vivo* viability of stored RBCs [45]. In overall, PS exposure in both L- and N-RBCs is rather low, reflecting the previously





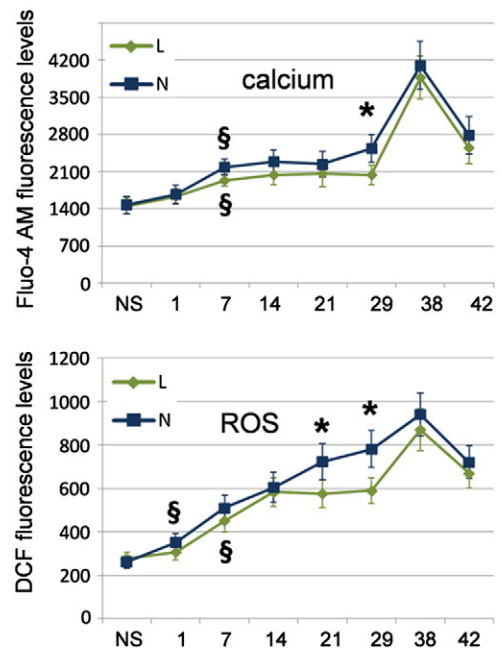
**Fig. 3 – PS exposure on stored RBCs. L- and N-RBCs were stored for various days in CPD-SAGM and their PS exposure was determined by CLSM using fluorescently labeled annexin V. Representative CLSM images from a donor and the average percentage of PS-positive RBCs in both groups during the storage are shown. Scale bars, 10  $\mu$ m. Insert in image N5: apoptotic leukocyte. Arrows in image N42: Small (less than 1  $\mu$ m) PS-positive particles seen after prolonged storage. NS: non-stored RBCs of the same donors. Error bars indicate SD (n=8); (\*) p<0.05 L- vs. N-RBCs.**

documented intrinsic capability of stored RBCs in preserving membrane phospholipid asymmetry [46]. This finding has been associated with the very low levels of scrambling activity during storage in spite of a reversible decrease in ATP, pH and flippase activity levels [46,47]. Although there is no clear consensus whether a fraction of stored erythrocytes expose PS [48,49], according to our results the prolonged storage seems to overcome the physiological competence of the cells, even of the leukoreduced ones, confirming earlier data [44,46]. Residual leukocytes and platelets are definitely not the cause of increased PS exposure, but they seem to exacerbate it in both RBCs and supernatants, as previously reported by others [49–51]. Several mechanisms have been proposed to interpret this effect, like the increase in intracellular calcium and the release of leukocyte-derived neuraminidases [50]. The transfer of PS to RBCs by fusion of vesicles shed by contaminant cells undergoing apoptosis, vesiculation and lysis [52,53] during refrigerated storage (see insert in Fig. 3 photo N5) cannot be excluded. This finding is of clinical importance in light of studies showing that PS expressing N-RBCs exerts procoagulant effects [43] and increased adherence to the endothelium [54].

### 3.4. Differences in the calcium and ROS accumulation between L- and N-RBCs

We next asked whether RBCs storage in the presence or absence of contaminant cells would have any effect in the intracellular calcium levels. For that purpose, stored L- or N-RBCs (n=8), without any stimulation *in vitro*, were loaded with the fluorescent calcium reporter Fluo-4 and the fluorescence intensity was measured by fluorometry. Although there is a probable effect of SAGM-induced MCV modifications to the Ca<sup>2+</sup> measurement performed, this is expected to affect equally the two groups (L and N) of SAGM-stored RBCs. Our results (Fig. 4) show that intracellular calcium increased slowly, but gradually on day 7 onwards in both groups (p<0.05, NS vs. day 7), with the N-RBCs exhibiting constantly higher levels of calcium compared to the L-RBCs in all donors and time-points (n=8) examined. The fluorescence intensity was peaked on day 38, followed by a drop on the last day of storage in both groups (Fig. 4). Although the only significant difference in calcium accumulation between the L- and N-RBCs was detected on day 29 of storage (p<0.01), the total storage-induced calcium accumulation in N-RBCs was higher compared to that of L-RBCs in paired comparisons (p<0.05).

There is evidence that free calcium content of human RBCs is a parameter of cell aging *in vivo* and *in vitro* [2,55]. The increase in intracellular calcium, accompanying either RBCs senescence or *in vitro* imposed stressful stimuli, directly induces or indirectly promotes a cascade of molecular and cellular events like potassium leakage, cellular dehydration and shrinkage, loss of deformability, echinocytosis, protein degradation/crosslinking,



**Fig. 4 – Graphs showing the averaged intracellular calcium and ROS accumulation in L- and N-RBCs throughout the storage. Data represents the mean  $\pm$  SD (error bars, n=8) of Fluo-4AM (for calcium) or DCF (for ROS) fluorescence levels estimated by independent experiments done in triplicates. NS: non-stored RBCs of the same donors. (\*) p<0.05 L- vs. N-RBCs. (\$)p<0.05 vs. NS RBCs.**

recognition signaling and eryptosis [2,56,57]. Calcium accumulation has been characterized as a probable secondary mediator of injury in stored RBCs in the past [58]. Indirect manifest of calcium activity in stored RBCs came by the finding that the storage-dependent remodeling of the RBCs membrane includes the calcium-promoted binding of sorcin and synexin [3]. However, other studies reported that there is not significant rise in intracellular calcium levels during storage, especially in L-RBCs [40,59].

Our results suggest that the residual leukocytes and platelets aggravate to an extent the calcium accumulation in stored RBCs. In addition, according to our measurements, short storage in CPD-SAGM stimulates a little calcium increase in stored RBCs but after the 4th or 5th week for the N- and L-units respectively, the storage effect is more stressful, irrespectively of the leukoreduction. This storage-related profile of calcium variation is especially interesting in light of reports showing the dual action of calcium-activated calpain on the calcium pump. At low calcium levels and short exposure times, calpain markedly increases ATP hydrolysis and pump activity while at high calcium concentrations or long exposure times, calpain action results in a progressive pump degradation, loss of pumping activity and membrane protein degradation [60]. Since our study did not involve an absolute measurement of intracellular calcium concentration, the question of whether the distortions observed have the potential to trigger calcium signaling activity, cannot be answered in direct. Despite that, in combination with the structural, PS and vesiculation data they pointed out a differentiation in the RBCs aging phenotype that might be partially associated with the calcium homeostasis under conditions implicated or no pre-storage leukoreduction.

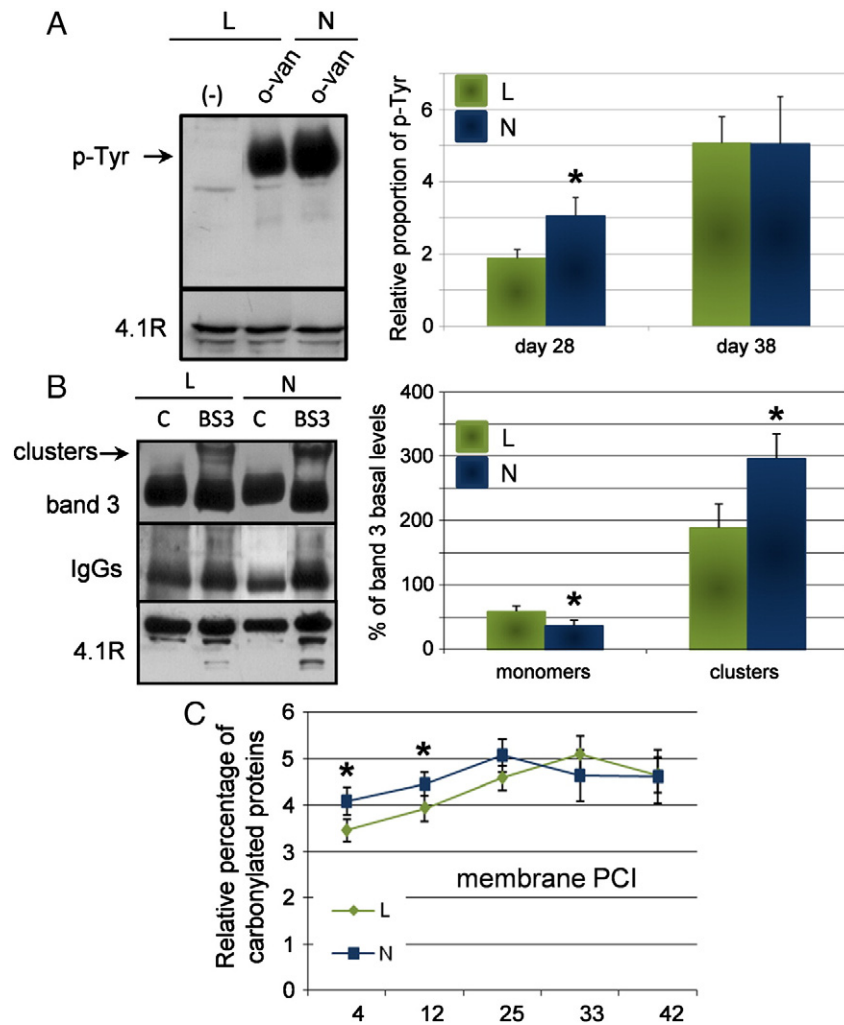
In order to estimate the ROS accumulation in stored L- and N-RBCs ( $n=8$ ), we used the redox-sensitive dye CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Compared to the non-stored cells of the donors (Fig. 4), in N-RBCs there was a gradual increase in ROS levels already from day 1 onwards ( $p<0.05$ , NS vs. day1). In L-units increase in ROS levels begun later on, after the first week ( $p<0.01$ , NS or day 1 vs. day 7), in line with previous data showing that 7 days of storage of L-RBCs double the levels of baseline ROS [61]. Moreover, unlike N-RBCs, ROS accumulation in L-RBCs reached a plateau in significantly lower levels than N-RBCs ( $p<0.05$ ) during the middle of the storage period (Fig. 4). This finding was consistent with the recently reported study of Zolla's group in L-RBCs [23]. The fluorescence intensity was peaked on day 38 and significantly reduced on the last day of storage in both groups (Fig. 4), similarly to both intracellular calcium levels and membrane PCI fluctuation (see below). The reduction in ROS levels shown on the last days of storage might be attributed to the leakage of the probe from the leaky, hemolyzed RBCs, to the lower concentration of Hb and to the lower activity of cellular esterases in senescent RBCs, as previously reported [61,62]. As a result, statistically significant difference in ROS levels between the L- and N-RBCs was observed from the 3rd to the 4th week of storage ( $p<0.05$ ). In summary, our analysis revealed that ROS accumulation is a very early manifestation in stored RBCs in the presence of contaminant cells while pre-storage leukoreduction can alleviate the impact of storage on cellular oxidative stress. Furthermore, our study defines the fifth week of storage in CPD-SAGM as a critical period regarding the levels of intracellular ROS.

Intracellular oxidative injury has been demonstrated during both RBCs *in vivo* and *ex vivo* aging [1,2,4,17]. According to our results the duration of storage accentuate the intracellular ROS accumulation in greater extent than the calcium accumulation in both groups (Fig. 4). ROS origin could be ascribed to cell senescence, Hb oxidation, decomposition of membrane lipids and finally, to metabolism-associated changes in cellular antioxidant defenses [1,63–65], that contribute to reduced post-transfusion survival [66]. Leukocytes are thought to accelerate the rate of storage lesion by at least two ways: before their breakdown, they consume glucose supplies and create waste products while after their breakdown they release enzymes, toxic and biologically active compounds that can hurt RBCs [10]. Indeed, leukocyte-derived free radicals are capable of evoking oxidative damage and hemolysis to stored RBCs [11,67], while significantly higher glucose consumption has been reported in N-units [68]. In our samples, pre-storage leukocyte/platelets removal reduced the levels of intracellular ROS only before the 4th week of storage, but afterwards both groups showed similar levels of ROS (Fig. 4), suggesting that mechanisms independent of the contaminant cells effect contribute to RBCs oxidative stress in the later period of storage. These findings support previous reports showing that oxidative burst/potential of neutrophils by stored RBCs supernatants was not significantly reduced by leukoreduction [69]. Whatever the possible sources of intracellular ROS might be, the leukoreduction is expected to be connected to lower oxidative stress in stored RBCs, which according to the literature, might be reflected in aging and death signaling, membrane deformability and vesiculation [41] as well as in lipid/protein oxidative damage profiles [11].

### 3.5. Membrane proteome remodeling in L- and N-RBCs

Significant increase in tyrosine phosphorylation of band 3 was observed between the 4th and 5th week of storage in both units (Fig. 5A), at the same time when the peak in intracellular ROS and calcium levels was evident (Fig. 4). Band 3 tyrosine phosphorylation predominated in N-RBCs compared to the L-RBCs on day 28 measurements ( $n=8$ ), while towards the end of the storage period the two groups contained practically equal levels of phosphorylated band 3 (Fig. 5A). This happened in striking timing correlation with the observed kinetics of ROS and calcium measurements (compare Figs. 4 and 5A). Since only the oxidized fraction of band 3 is phosphorylated – and thus dissociated from the underlying cytoskeleton – under the trigger of oxidative stress [70], the higher levels of phosphorylated band 3 in N-RBCs might also be associated with the greater vesiculation of the same group vs. L-group (Fig. 2), as previously observed in ortho-vanadate-treated non-stored RBCs [26]. By the same way, the compensated levels of tyrosine phosphorylation between the two groups after the 5th week of storage (Fig. 5A) could reflect the average effect of increased oxidative stress and vesiculation in N-RBCs.

To estimate the cross-linking potential of band 3 in L- and N-RBCs stored for 4 weeks in CPD-SAGM, we treated RBCs suspensions with BS3, a membrane impermeable cross-linking agent known to cross-link band 3, and examined the relative percentage of the resulting high molecular weight band 3 aggregates. According to our results (Fig. 5B), the N-RBCs were more susceptible to the BS3-induced cross-linking of band 3



**Fig. 5 – Band 3-associated signaling modifications and membrane proteome carbonylation index (PCI) in stored RBCs. (A) Tyrosine phosphorylation (p-Tyr) of band 3 in ortho-vanadate-treated (o-van) L- and N-RBCs stored for 28 or 38 days. Representative immunoblot analysis [(-): control, see Materials and methods] and bar graph representing the averaged (n=8) relative proportion of p-Tyr band 3 (normalization to the endogenous 4.1R protein levels) in L- and N-RBCs, are shown. (B) Cross-linking potential of band 3 and IgGs binding in BS3-treated RBCs stored for 4 weeks in CPD-SAGM. Representative immunoblots and bar graph representing the mean (n=8) percentage of band 3 clusters as well as of monomeric band 3 left in BS3-treated cells (normalization to the basal band 3 levels), are shown. (C) Graph showing the collective densitometric analysis of membrane PCI levels variation in stored RBCs in relation to the leukoreduction. Error bars: SD; (\*):  $p < 0.05$  L- vs. N-RBCs.**

compared to the L-RBCs. That finding was established by measuring both the relative percentage of band 3 clusters ( $297\% \pm 38\%$  vs.  $188 \pm 37\%$ , respectively,  $p < 0.05$ ) as well as the concomitant depletion of monomeric band 3 ( $37 \pm 8\%$  vs.  $59 \pm 8\%$ , respectively), after normalization to the basal levels (untreated RBCs,  $n=8$ ). Moreover, as shown in Fig. 5B (left panel), there was increased membrane binding of IgGs in the N-RBCs compared to the L-RBCs, roughly analogous to the levels of band 3 oligomerization.

Band 3 possesses a core position in RBCs senescence and death signaling mechanisms. Structural and functional modifications of this protein, like proteolysis, clustering and increased tyrosine phosphorylation, are major senescence-associated changes in the currently established models [2,71]. Apart from senescence, tyrosine phosphorylation of band 3 is induced by various stimuli including oxidative and calcium stress [1,25,70,72]

and it enhances the lateral mobility of the protein and its cross-linkability [26,70]. All these band 3-associated modifications are correlated with significant changes in RBCs morphology and vesiculation through changes in the membrane-cytoskeletal interactions [26]. Our findings are totally consistent with previous reports showing that naturally occurring IgGs binding to the RBCs surface depends on the band 3 oxidation/oligomerization state [73] and that the band 3 tyrosine phosphorylation-induced clustering is associated with IgGs binding [70].

We next estimated the membrane proteome carbonylation index (PCI) of the L- and N-RBCs by means of immunoblotting. As expected, prolonged storage aggravated the membrane protein carbonylation in both groups ( $n=8$ , Fig. 5C). The PCI increased constantly from day 4 to day 25 (N-RBCs) or day 33 (L-RBCs) where the peak of ROS levels was also observed, while afterwards there was a trend for stabilization to lower levels, as



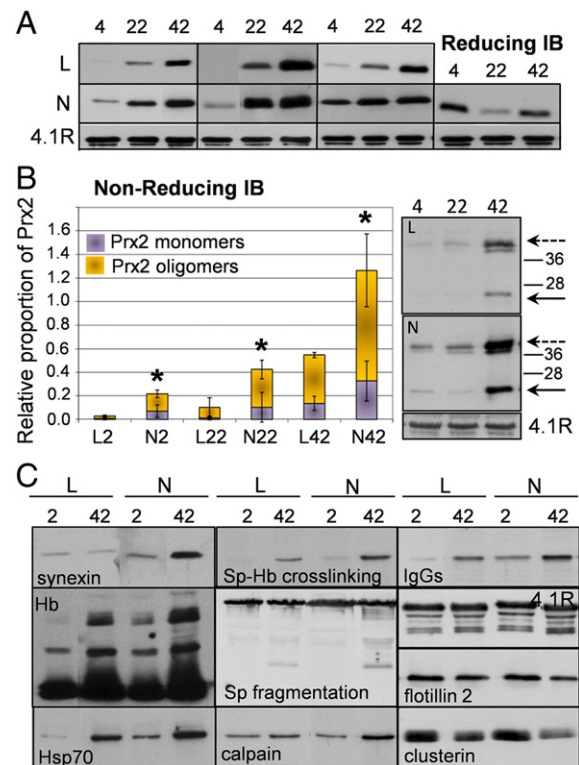
previously reported [17,23,74]. By the same manner, the N-RBCs were characterized by higher values of PCI compared to the L-RBCs until the middle of the storage period ( $p < 0.05$ ), but afterwards there was no significant differences between the two groups (Fig. 5C).

The PCI has been widely used as a measure of membrane and plasma protein injury in storage, where it has been found distorted, in correlation to both the storage length (days) [74] as well as the preservation medium [17]. In our study, the pattern of PCI variation seen after prolong storage in L- and N-RBCs (plateau formation and balancing between the groups, Fig. 5C) might be associated with the extent of vesiculation that leads to the clearance of the carbonylated material [31], the hemolysis of the severely damaged RBCs [17] as well as with storage-related changes in the membrane binding of enzymatic, proteolytic and chaperone components [75].

Further on, we tested our samples for another potential oxidative stress biomarker [76], the membrane-bound Prx2. We detected gradually increased membrane association of Prx2, under both reducing (Fig. 6A) and non-reducing (Fig. 6B) conditions in L- and N-RBCs ( $n=8$ ). Although there was an obvious donor variability regarding the Prx2 membrane levels (reflected in the high SD values), probably associated with the RBCs antioxidant capacity of each donor [76], the monomeric and dimeric forms of membrane Prx2 exhibited not only positive correlation to the duration of storage (correlation coefficient  $r=0.852$ ) but also significant ( $p < 0.05$ ) increase in the case of N-RBCs compared to the L-RBCs (Fig. 6B). In some cases, the N-RBCs were characterized by a transient increase in Prx2 levels on the first days of storage that was afterwards normalized to the anticipated storage variation pattern (see right panel in Fig. 6A). Membrane-bound Prx2 was further proportional to the expression of a wide array of senescence and oxidative stress markers on RBCs membrane, including autologous IgGs binding and cross-linkings of Hb (see below Fig. 6C and Table 2), as previously shown in both storage and hereditary spherocytosis [17,77].

The highly abundant erythrocytic Prx2 is a 2-cys peroxidorexin that functions as an antioxidant enzyme in the disposal of endogenous  $H_2O_2$  and also as a chaperone [78,79]. Its recruitment to the membrane has been described in the presence of increased intracellular calcium levels [80] as well as under various oxidative stress conditions [21,77], including prolonged storage [17,23,75]. According to previous reports, protein oxidation is the main contributor to the storage lesion seen in SAGM-stored N-RBCs [81]. The oxidative stress-associated progressive linkage of cytosolic proteins to the membrane has been repeatedly reported in RBCs stored under various conditions and mediums.

Table 2 presents the averaged variation ( $n=8$ ) in the expression profile and Fig. 6C some representative cases of membrane protein variations observed during the storage of L- and N-RBCs. The overall membrane remodeling in both groups is a panel of protein modifications that have long been described in stored cells: significant loss of proteins and surface receptors (Table 2: spectrin, band 3, 4.1R, pallidin, CD47, protectin etc.), cytoskeleton proteins (spectrin and 4.1R) fragmentation, inter-protein conjugation (e.g. spectrin-Hb cross-linking) and recruitment of cytosolic proteins (oxidized/denatured Hb oligomers, HSP70) and plasma IgGs. Some of them are currently assessed as molecular



**Fig. 6 – Membrane proteome remodeling during the storage of L- and N-RBCs. (A) Representative comparative immunoblot (IB) analysis under reducing conditions, for the presentation of donor variability in the membrane-bound Prx2. Four different donors are shown. (B) The same Prx2 analysis under non-reducing conditions, for the detection and quantitative analysis of membrane-bound Prx2 monomers and oligomers (indicated by solid and discontinuous arrows, respectively in Prx2 IB). Error bars: SD ( $n=8$ ); (\*)  $p < 0.05$  L- vs. N-RBCs. (C) Representative cases of membrane protein variations observed in L- and N-RBCs by immunoblot analysis. Membrane preparations of only day 2 and 42 are compared.**

markers of senescence, vesiculation and cellular stress, including oxidative stress that may lead to the increased clearance of transfused cells [2,29,82].

In a comparative aspect, the presence of residual leukocytes and platelets in the labile product seemed to inflict extra proteome stress in the membrane, as documented by the significant diversification in the protein expression between the two groups examined (shown by asterisks in the Table 2). Indeed, common senescence biomarkers like the cross-linkage of spectrin with hemoglobin [83], the binding of oxidized/denatured Hb and IgGs as well as the loss of major sialoglycoproteins, exhibited higher expression in N-RBCs compared to the L-RBCs (Table 2, Fig. 6C). Towards the end of the storage period there was a greater deficiency in the CD47 protein, an erythrocyte marker of self, in N-RBCs (Table 2). Previous studies have reported that without prior leukodepletion, the stored units exhibit an increased population of senescent RBCs and increased *in vitro* phagocytosis [50]. Our findings hold with those conclusions and further suggest a probable correlation of the senescence phenotype with the intracellular ROS levels and the degree of

**Table 2 – Membrane protein analysis in L-RBCs and N-RBCs during storage in CPD-SAGM.**

Protein	Days of storage					
	4	12	19	25	33	42
Spectrin	1.00±0.05	1.01±0.06	0.97±0.09	0.92±0.05 <sup>b</sup>	0.83±0.06	0.80±0.04 <sup>a</sup>
	1.00±0.09	0.98±0.11	0.93±0.12	0.85±0.10 <sup>b</sup>	0.74±0.05	0.69±0.05
Band 3	1.00±0.03	0.97±0.11	0.94±0.05 <sup>b</sup>	0.87±0.04 <sup>a</sup>	0.76±0.05	0.77±0.04 <sup>a</sup>
	1.00±0.04	0.99±0.06	0.90±0.07 <sup>b</sup>	0.76±0.05	0.71±0.06	0.66±0.06
4.1R	1.00±0.03	0.94±0.04 <sup>b</sup>	0.90±0.03	0.85±0.04	0.87±0.05 <sup>a</sup>	0.82±0.08 <sup>a</sup>
	0.99±0.04	0.87±0.06 <sup>b</sup>	0.83±0.04	0.79±0.07	0.75±0.05	0.66±0.06
Pallidin (protein 4.2)	1.00±0.06	0.95±0.08	0.98±0.07	0.85±0.06 <sup>b</sup>	0.80±0.07	0.76±0.08
	1.00±0.05	1.13±0.08	0.95±0.05	0.86±0.07 <sup>b</sup>	0.77±0.06	0.72±0.09
Major glycoporphins	1.00±0.08	1.09±0.05	0.96±0.07	0.88±0.07 <sup>b</sup>	0.81±0.06	0.83±0.08 <sup>a</sup>
	1.00±0.05	1.05±0.06	0.99±0.05	0.88±0.05 <sup>b</sup>	0.72±0.07	0.62±0.07
Stomatin	1.00±0.03	1.10±0.04	0.95±0.08	0.88±0.04 <sup>ba</sup>	0.89±0.08 <sup>a</sup>	0.86±0.07
	1.00±0.05	0.97±0.05	1.00±0.09	0.73±0.06 <sup>b</sup>	0.63±0.09	0.76±0.05
Flotillin2	1.00±0.03	0.98±0.05	1.01±0.07 <sup>a</sup>	0.95±0.05 <sup>a</sup>	0.83±0.06 <sup>b</sup>	0.65±0.08
	1.01±0.06	0.87±0.06 <sup>b</sup>	0.83±0.05	0.79±0.06	0.75±0.07	0.72±0.07
Protectin (CD59)	1.00±0.06	1.18±0.12 <sup>a</sup>	0.99±0.09	0.89±0.08	0.92±0.09	0.82±0.06 <sup>b</sup>
	0.87±0.07	0.91±0.12	0.85±0.08	0.80±0.11	0.85±0.09	0.75±0.08 <sup>b</sup>
CD47	1.00±0.06	0.95±0.05	0.92±0.06	0.81±0.05 <sup>b</sup>	0.86±0.04 <sup>a</sup>	0.79±0.06
	1.00±0.04	0.98±0.06	0.85±0.07 <sup>b</sup>	0.77±0.07	0.72±0.07	0.69±0.05
IgGs	1.00±0.09	0.91±0.09 <sup>a</sup>	1.60±0.17 <sup>ab</sup>	2.48±0.36 <sup>a</sup>	3.12±0.28 <sup>a</sup>	2.63±0.34 <sup>a</sup>
	1.05±0.11	1.20±0.13	2.07±0.32 <sup>b</sup>	4.67±0.62	3.86±0.43	3.40±0.41
Spectrin, 4.1R	1.00±0.12 <sup>a</sup>	0.95±0.19 <sup>a</sup>	1.23±0.19 <sup>ba</sup>	1.32±0.21 <sup>a</sup>	1.85±0.32 <sup>a</sup>	1.55±0.32 <sup>a</sup>
	1.60±0.28	1.89±0.39	2.00±0.43	2.25±0.46	3.16±0.53 <sup>b</sup>	2.69±0.59
Fragmentation	1.00±0.13	1.49±0.27 <sup>ba</sup>	2.73±0.42 <sup>a</sup>	2.29±0.53 <sup>a</sup>	2.55±0.41 <sup>a</sup>	4.94±0.89 <sup>a</sup>
	1.00±0.15	4.11±0.94 <sup>b</sup>	4.85±1.10	5.86±1.34	7.61±1.42	12.24±2.12
Cross-linking	1.00±0.07	1.21±0.22	1.12±0.19	1.32±0.19 <sup>b</sup>	1.15±0.17	1.59±0.22
	1.00±0.09	1.03±0.18	0.87±0.12	1.03±0.16	0.94±0.15	1.30±0.18 <sup>b</sup>
Hb monomers	1.00±0.18 <sup>a</sup>	1.81±0.36 <sup>ba</sup>	1.57±0.37 <sup>a</sup>	2.57±0.56 <sup>a</sup>	3.08±0.56 <sup>a</sup>	5.62±1.26 <sup>a</sup>
	1.94±0.38	2.97±0.61 <sup>b</sup>	3.61±0.77	5.22±1.24	7.35±1.62	9.44±1.79
Calpain	1.00±0.15 <sup>a</sup>	1.06±0.19 <sup>a</sup>	1.73±0.31 <sup>ba</sup>	1.45±0.24 <sup>a</sup>	2.31±0.47 <sup>a</sup>	2.64±0.43 <sup>a</sup>
	1.38±0.17	2.22±0.38 <sup>b</sup>	3.96±0.73	2.63±0.45	4.31±0.79	4.65±0.83
Hsp70	1.00±0.18 <sup>a</sup>	1.06±0.23	1.36±0.23	1.96±0.32 <sup>ba</sup>	2.52±0.34	3.08±0.58 <sup>a</sup>
	1.54±0.28	1.62±0.34	1.92±0.37	2.38±0.36 <sup>b</sup>	3.13±0.43	5.20±1.13
Clusterin	1.00±0.08	1.07±0.10	0.93±0.08	0.85±0.06 <sup>ba</sup>	0.87±0.06	0.78±0.08 <sup>a</sup>
	1.00±0.10	0.94±0.08	0.85±0.11	0.68±0.08 <sup>b</sup>	0.72±0.09	0.58±0.09

Bold characters: L-RBCs.

Results are presented as mean±SD after normalization to the day 4 values of L-RBCs (n=8).

<sup>a</sup> p<0.05 L-RBCs vs. N-RBCs.

<sup>b</sup> p<0.05 vs. day 4 of L- or N-group.

echinocytosis in stored RBCs, as previously reported in *in vitro* studies [84].

Spectrin and 4.1R proteolysis is increased after the 2nd week of storage to day 33 in L-RBCs (Table 2), in line with recent reports [23], while in N-RBCs it is detected earlier (Table 2). Notably, in both groups the cytoskeleton proteins fragmentation maximized on day 35 (Table 2), concomitantly with the peaking in the intracellular ROS and calcium levels (Fig. 4), substantiating a causative effect, as previously suggested [81]. Whatever its origin might be, proteolysis of cytoskeletal components is a triggering factor for membrane vesiculation by weakening the cohesion of the skeleton to the lipid bilayer, as further supported by the significantly increased number of echinocytes in N-RBCs.

Another prominent difference between the two groups examined, was the increased membrane binding of synexin (Fig. 6C) and calpain (Fig. 6C and Table 2) in N-RBCs. This is probably correlated to the variation in intracellular calcium levels, since the migration of both proteins to the membrane is a calcium-dependent procedure [85,86]. Increased calcium

levels might up-regulate a number of enzymes (e.g. calpains) and processes (e.g. proteolysis) that lead to cellular dehydration and protein degradation. Membrane-bound calpain in calcium-stressed RBCs challenges cytoskeleton fragmentation, while under the influence of activated transglutaminase 2, cytoskeletal proteins crosslinkings are observed [1]. Both actions obviously affect cytoskeleton plasticity and cellular deformability. The higher levels of calcium stress-associated modifications in the membrane proteome of N-RBCs might correspond to the higher degree of spherocytosis and the significant loss of cellular deformability [34] compared to the minimally affected L-RBCs [33].

The comparative higher loss of vesicle-associated components [31,37,75,87], like band 3, stomatin, flotillin-2, clusterin, CD59 and CD47 (Table 2 and Fig. 6C) might be associated with the intent vesiculation of the RBCs membrane in the non-leukoreduced units. Previous studies have reported significantly higher CD47 loss from the stored RBCs membrane in the presence of leukocytes [49] that is largely due to the release of

the protein in the supernatant [88]. The significantly decreased expression of CD59 (protectin) in N-RBCs reported here is consistent with the loss of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked glycoproteins during the storage, especially in the presence of leukocytes [89]. Since CD59 is a complement regulatory protein that functions to protect blood cells from autologous complement attack (assembly of membrane attack complex), it may potentially play a role in the *in vivo* survival of transfused RBCs. In addition, considering that the N-RBCs accumulate more senescent defects, the observed protein loss might also be associated with the triggered activity of RBCs proteasomes in order to effectively remove the non-functional components [90]. In support, the more prominent stress-responding [17,21,23] migration of the cytosolic chaperones HSP70 (Table 2 and Fig. 6C) and Prx2 (Fig. 6A, B) to the membrane of N-RBCs suggests that the storage in the presence of contaminant cells triggers the generation of modified proteins that need assistance by the repairing molecular machinery of the cell. Whether or not and to what extent this cellular defense mechanism is effective in protecting and stabilizing the damaged components, is apparently a function of the membrane vesiculation degree, since both proteins are sorted for vesiculation in stored RBCs [17,75].

### 3.6. The residual leukocytes and platelets promote a premature senescence phenotype expression in N-RBCs compared to their age-mate L-RBCs

Fractions enriched in RBCs of various ages can be obtained by Percoll gradient fractionation based on cellular density [91]. Therefore, we separated fractions enriched in young (low density, Y-RBCs) and senescent (high density, S-RBCs) RBCs of various storage periods from both groups (n=4) according to cell density and we compared the intracellular ROS and calcium accumulation, as well as the membrane PCI between cells of comparable density. Furthermore, the variation in a series of cellular aging and stress protein markers has been evaluated in the low-density RBCs fractions collected at three time points of storage.

In RBCs of all storage periods, increased cell density was associated with a decreased MCV ( $p < 0.01$ ) and a proportionally

increased MCHC ( $p < 0.01$ ) (Table 3). To further validate the fractionation, the derived lower and higher density subpopulations were examined for the presence of well-established RBCs membrane proteome aging markers, such as cross-linking between spectrin and Hb [83], binding of oxidized/denatured Hb and structural modifications (proteolysis/clusterization) of band 3 [38,57,71]. Indeed, compared to the low-density cells, the densest RBCs fractions exhibited significantly increased ( $p < 0.05$ ) expression of all those markers (Table 3), verifying the predominance of senescent cells.

Almost all the high-density preparations examined (n=4) were characterized by an average increase in ROS and calcium intracellular accumulation as well as in the membrane PCI compared to the low-density ones (Fig. 7A–C). Calcium and oxidative damage accumulation, PS externalization and loss of deformability have been previously reported in senescent RBCs [44,55,57,92,93]. Notably, data have shown that upon calcium-loading the Y-RBCs restore their cell volume and deformability, while the S-RBCs become dehydrated and less deformable [93]. With the exception of calcium levels that were maximized in S-RBCs on day 36 of storage (Fig. 7B), both ROS levels (Fig. 7A) and PCI (Fig. 7C) were either stable or decreased compared to the day 23. This is probably related to the senescence and death progression, as reflected by changes in the membrane vesiculation, Hb concentration and esterase activity in S-RBCs [62,63]. No significant difference was observed in the ROS/calcium levels of S-RBCs between the L- and N-groups (Fig. 7A, B), except for the ROS levels on day 8 ( $p < 0.05$  L- vs. N-RBCs). Although not important, higher ROS accumulation was measured in the leukoreduced S-RBCs during the middle of the storage period in almost all the donors examined (n=4). On the opposite, significant higher membrane PCI was found in non-leukoreduced S-RBCs on days 23 and 36 of storage, vs. L-ones (Fig. 7C). This ratio was totally reversed towards the end of the period, probably as a result of the comparatively higher vesiculation and hemolysis seen in N-RBCs (Fig. 2, Table 1).

The comparative monitoring of the above mentioned storage-associated variations in the every time “younger” L- and N-RBCs of lower density outlines the storage lesion course in relation to the aging and cellular stress phenotype. As shown in

**Table 3 – Leukocyte (WBCs) content, RBCs Indexes and membrane protein senescence markers in cell density fractions enriched in young (Y) and senescent (S) RBCs separated from L- and N-RBCs units (n=4) during the storage.**

	L-RBCs day 8		N-RBCs day8		L-RBCs day 36		N-RBCs day 36	
	Y-RBCs	S-RBCs	Y-RBCs	S-RBCs	Y-RBCs	S-RBCs	Y-RBCs	S-RBCs
WBCs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	0.1±0.0	0.1±0.1	0.1±0.0
MCV (fL)	98.6±2.2 <sup>§*</sup>	82.1±1.8 <sup>§</sup>	94.3±1.7 <sup>§*</sup>	82.1±2.5 <sup>§</sup>	96.8±2.3 <sup>§*</sup>	85.9±1.7 <sup>§</sup>	91.5±2.8 <sup>§*</sup>	83.2±1.3 <sup>§</sup>
MCH (pg)	29.4±0.5 <sup>§*</sup>	31.3±0.3 <sup>§*</sup>	27.9±0.8 <sup>*</sup>	29.7±1.1 <sup>*</sup>	30.3±0.3 <sup>§*</sup>	32.1±0.5 <sup>§*</sup>	26.8±1.4 <sup>§*</sup>	30.3±0.9 <sup>§*</sup>
MCHC (g/dL)	29.8±0.4 <sup>§</sup>	38.1±0.5 <sup>§*</sup>	29.5±0.3 <sup>§</sup>	36.2±0.6 <sup>§*</sup>	31.3±0.6 <sup>§*</sup>	37.2±0.7 <sup>§</sup>	29.3±0.5 <sup>§*</sup>	36.4±0.6 <sup>§</sup>
RDW-CV (%)	13.3±0.6	14.5±0.7	13.1±0.5	14.1±0.5	12.3±0.7	13.1±0.6	11.7±0.6	12.5±0.4
Spectrin-Hb complex <sup>b</sup>	1.0±0.2 <sup>§*</sup>	17±1.8 <sup>§</sup>	9.6±2.3 <sup>§*</sup>	19.4±3.5 <sup>§</sup>	64.8±9.2 <sup>§*</sup>	103.5±16.7 <sup>§*</sup>	97.8±12.3 <sup>§*</sup>	188±25.6 <sup>§*</sup>
Oxidized Hb <sup>b</sup>	1.0±0.2 <sup>§*</sup>	2.4±0.4 <sup>*</sup>	2.4±0.4 <sup>§*</sup>	3.9±0.5 <sup>*</sup>	5.6±0.8 <sup>§*</sup>	8.9±1.1 <sup>*</sup>	10.0±2.1 <sup>§*</sup>	14.5±1.9 <sup>*</sup>
Band 3 modifications <sup>b</sup>	1.0±0.2 <sup>§</sup>	3.3±0.5 <sup>*</sup>	1.0±0.3 <sup>§</sup>	2.3±0.4 <sup>*</sup>	4.9±0.9 <sup>§*</sup>	11.9±1.8	9.7±1.5 <sup>§*</sup>	15.8±2.5

Results are presented as mean±SD.

<sup>a</sup> Non-detected (less than detection limit).

<sup>b</sup> Normalization to the day 8 levels of L-RBCs.

\*  $p < 0.05$  L-RBCs vs. N-RBCs.

§  $p < 0.05$  Y-RBCs vs. S-RBCs.

Fig. 7A–C, there was a constant trend for higher distortions levels in the non-leukoreduced Y-RBCs compared to the L-ones, that reached statistic significance on days 36 (calcium and PCI) or 42 (ROS) of storage. The stress phenotype was even more intently manifested at the membrane proteome level, namely in the variation of a range of aging and oxidative/calcium-associated markers, as those shown in Fig. 7D. Indeed, either during some period (band 3 modifications as well as membrane bound IgGs, calpain and Prx2), or during the whole storage time (spectrin-Hb cross-linking and binding of oxidized/denatured Hb to the membrane), the non-leukoreduced Y-RBCs were characterized by substantially higher expression of stress markers compared to the pre-storage leukoreduced Y-RBCs (Fig. 7D). The molecular chaperone HSP70 was also found significantly increased in the Y-RBCs of the non-leukoreduced units vs. the L-ones after prolonged storage (data not shown).

Aging is a complicated molecular process that involves strong interrelationships between the cells and their cellular and biochemical environment. *Ex vivo* storage of RBCs under various conditions is a model system for studying those effects. For instance, differential pattern of cellular senescence and response to oxidative stress has been found in RBCs stored with or without mannitol [17]. In the same context, RBCs aging-related events are expected to be differently influenced by the presence of contaminant leukocytes and platelets during the storage.

The excessive manifestation of aging and stress markers on membrane proteome is not a surprising finding, considering that the RBCs membrane is an unusually dynamic structure and a sensitive biosensor of cellular stress. Unlike the ROS and calcium measurements that performed on whole cell preparations, the membrane proteome analysis is more focused and as such, it probably reveals the targeted effect of ROS and calcium disturbances. For instance, the main, directly visible feature of the oxidatively altered RBCs is the accumulation of membrane-bound oxidized/denatured Hb that was found significantly elevated in the low-density N-RBCs. The cross linked Hb species bind to membrane and cytoskeleton targets such as band 3 and spectrin [4] to trigger a cascade of events affecting RBCs rigidity, echinocytosis, adherence, erythrophagocytosis as well as post transfusion survival of damaged RBCs [1,66,84]. Unlike cytosolic ROS, ROS generated in close proximity to the membrane after Hb binding, are not fully accessible to the cytosolic antioxidants and as such they might be especially active not only against local targets but also against nearby tissues and cells after their release from RBCs [94]. Considering that S-RBCs are not removed during the storage, their increased population in N-units [50] may therefore accelerate the *in vitro* aging process of stored RBCs.

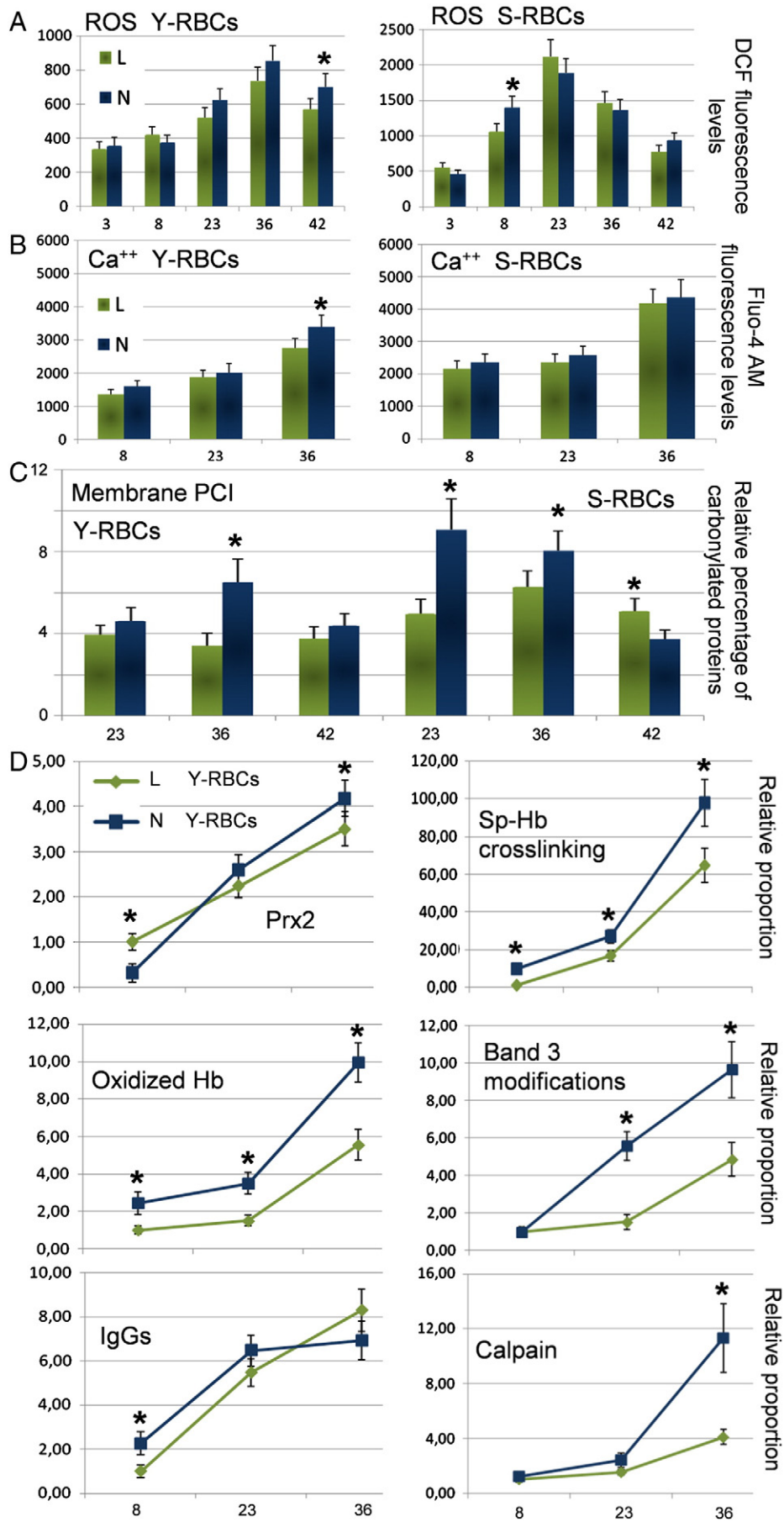
In accordance with previous studies reporting increased *in vitro* phagocytosis of RBCs without prior leukodepletion [50], our findings imply that the vicinity with contaminant cells renders the young N-RBCs of the lower density fraction somehow older, injured and more stressed than their age-mate L-RBCs. This effect might be related to either higher stress imposition and/or to more severe diminution in RBCs antioxidant defense capacity [1,64]. Indeed, leukocytes- and platelets-derived enzymes, toxic reactive oxygen and nitrogen species might affect RBCs mechanical integrity and erythrophagocytosis by

performing detrimental interactions with numerous RBCs components [11,36,53,67]. Considering that granulocytes disintegrate after 24 h [95], their fragments and released material may pass the filter and still contribute to secondary RBCs storage damage. Therefore, a proportion of the storage lesion seen in the L-RBCs might also be related to the donor leukocyte effects. Despite that, our results provide new evidence to support the notion that pre-storage leukoreduction effectively reduces RBCs damage caused by the residual leukocytes and platelets. Leukoreduction slows down the progression of the senescence process in stored RBCs, probably by alleviating the oxidative and calcium stress.

### 3.7. The possible molecular and cellular effects of contaminant donor's cells on stored RBCs

Although the donor's contaminant cells represent a scant minority compared to the predominant population of RBCs, their co-storage for 42 days in the cold might aggravate the RBCs structural and functional integrity through an array of detrimental intercellular interactions. We have to take into consideration that the majority of the leukocytes and platelets have significantly shorter lifespan compared to that of RBCs. Furthermore, platelets produced from whole blood donations are effectively stored for transfusion purposes for five days at 22 °C while neutrophils are not stored at all. Moreover, the storage unit represents a close system. In the absence of a clearance mechanism, the cells have to put up with their own and other cells wastes and by-products. The contaminant cells might affect RBCs through their metabolism, glucose consumption and release of a great variety of biologically active compounds (free radicals, extracellular vesicles, enzymes, cytokines etc.) that are restively produced after cellular activation, apoptosis or breakdown. Table 1 depicts a decrease in the absolute leukocytes and platelets number over storage time. Leukocytes apoptosis, first of granulocytes and then of lymphocytes, starts from the first 2–3 days of storage and results in the formation of biologic response modifiers and membrane fragments that can be adhered to stored RBCs initiating removal signaling cascades [52]. Cytokines are known to be involved in apoptosis, while neutrophils, by Fas ligand shedding, might mediate death signaling in the Fas-bearing lymphocytes and RBCs. Notably, cytoskeleton and band 3 modifications as well as PS externalization following the activation of the membrane-based apoptotic pathway have been reported in the past in both senescent and stored RBCs [3,17,96,97]. Leukocytes and activated platelets are important sources of free radicals and biologically effective molecules that are simply accumulated in the supernatants probably not as innocent bystanders but rather as effective mediators of RBCs senescence and cold storage stress. Reactive oxygen and nitrogen species as well as soluble enzymes hit directly the sensitive RBCs proteins, glyco-conjugates and membrane lipids while significant amounts of platelet- and leukocyte-derived extracellular membrane vesicles enhanced the toxicity of the storage supernatant. It has been reported that the ROS generated by human neutrophils are cytotoxic for RBCs via an Hb oxidation mechanism [67] that is the initiating event in some major RBCs senescent pathways. Moreover, the contaminant cells-derived proteases are expected to be more effective toward stored RBCs compared to the *in vivo* conditions because stored RBCs lack the protective effect of the protease





inhibitors-containing plasma [98]. In addition, the residual platelets experience a kind of “cold storage lesion” at the low temperature of the RBCs units, which apart from poor survival in the circulation, includes a type of activation state and relevant signaling via the plasma membrane: irreversible transformation, increase in intracellular calcium and protein tyrosine phosphorylation, lipid rafts aggregation, secretion of alpha granule and lysosomal contents, rearrangement of the surface glycoprotein Ib, P38MAPK and cytosolic phospholipase A2 activation, arachidonic acid release, apoptosis, PS externalization and accelerated membrane vesiculation [99–102]. Indeed, it has been reported that platelet-derived microparticles accumulate from day 0 and peak on day 20 of storage, while the leukocyte-derived vesicles are increased after the day 30 in stored non-leukoreduced RBCs units [103]. Pre-storage leukofiltration not only substantially reduces RBCs membrane vesiculation but also post-storage platelet-derived microparticles count [104]. The enrichment of supernatant in microvesicles under non-leukoreduction conditions leads to a sharp increase in the inter-cellular communication potential of the unit. The extracellular vesicles are potent packages of information since they contain numerous and highly concentrated signaling materials, including activated caspases and PS. As a result, they might exhibit pleiotropic stimulatory effects on cells via receptor interactions or direct transfer of their protein and lipid components by fusion with the cellular membrane [105], as previously reported for the RBCs-derived vesicles *in vivo* [106]. Consequently, the greater variability in extracellular vesicles released in N-RBCs is expected to effectively modify the signaling machinery of RBCs targets.

### 3.8. Conclusions

The present study provides further insight into the mechanisms of the RBC storage lesion in relation to the effect of pre-storage leukoreduction. Although storage lesion is usually enhanced in both L- and N-RBCs by prolonged storage, it is partially alleviated by filtering removal of the donor's contaminant leukocytes and platelets. Substantiated evidence comes from a series of different yet physiologically interlinked experimental data. L-RBCs excel N-RBCs at almost all the storage quality measurements examined, either for a part or for the whole of the storage period. Indeed, hemolysis, irreversible echinocytosis, microvesiculation, removal signaling, ROS and calcium accumulation, band 3-related senescence modifications, membrane proteome stress biomarkers as well as emergence of a senescence phenotype in the lower density RBCs that is disproportionate to their age, are all encountered more or mostly in N-RBCs compared to the L-ones. It seems that the residual leukocytes and platelets impose a great burden of oxidative and calcium-associated stress on RBCs that is reflected in the accumulation of more senescent defects. Although a direct connection between the

elevated ROS and calcium levels with their triggering potential towards senescence and death signaling is missing in our study, the different storage lesion profile in relation to the presence or no of contaminant cells implies a significant degree of correlation. Probably through the early events of cellular activation, apoptosis and degeneration of the donor's leukocytes and platelets, a considerable fraction of the N-RBCs that are not yet physiologically senescent become damaged and more susceptible to the noxious effects of storage. The currently reported molecular and cellular data provide a mechanistic basis for the improved storage and post transfusion recovery seen in the case of pre-storage leukoreduction. Based on these results it will be interesting to evaluate the contaminant cells “cold storage lesion” in parallel to the RBCs defects during the storage period in order to assign specific roles in every participant of this clinically important cellular fellowship.

### Acknowledgements

The authors wish to thank all blood donors that have participated in the present study, and especially the four friends that donated twice, for their prompt, volunteer response, and exceptional collaboration; the PhD student Georgatzakou H. and the pre-graduate students Taihert M. and Kollarou A. (Dept. of Cell Biology & Biophysics, Faculty of Biology, NKUA) for their assistance in the performance of a part of the immunoblotting experiments; and finally, Assistant Prof. I.P. Trougakos (Dept. of Cell Biology & Biophysics, Faculty of Biology, NKUA) for the kind disposal of fluorometer device. This study was partly supported by the “Special Account for Research Grants of the NKUA” to Associate Prof. I.S. Papassideri.

### REFERENCES

- [1] Lion N, Crettaz D, Rubin O, Tissot JD. Stored red blood cells: a changing universe waiting for its map(s). *J Proteomics* 2010;73:374–85.
- [2] Antonelou MH, Kriebardis AG, Papassideri IS. Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood Transfus* 2010;8(Suppl. 3):s39–47.
- [3] Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulin G binding, lipid raft rearrangement, and caspase activation. *Transfusion* 2007;47:1212–20.
- [4] Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *J Cell Mol Med* 2007;11:148–55.

**Fig. 7 – Comparative analysis of young (Y) and senescent (S) RBCs of various storage periods separated from L- and N-units by Percoll density gradient fractionation. Averaged (n=8) intracellular ROS (A) and calcium (B) accumulation as well as membrane PCI (C) analysis revealed a different variation profile not only between Y- and S-RBCs but also between L- and N-groups. (D) Graphs showing the averaged variation in a series of cellular aging and stress protein markers in low-density L- and N-RBCs collected at the indicated three time-points of storage. Error bars: SD; (\*) p < 0.05 of L- vs. N-RBCs.**

- [5] Zimrin AB, Hess JR. Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells. *Vox Sang* 2009;96:93–103.
- [6] Card RT, Mohandas N, Mollison PL. Relationship of post-transfusion viability to deformability of stored red cells. *Br J Haematol* 1983;53:237–40.
- [7] van de Watering L. Red cell storage and prognosis. *Vox Sang* 2011;100:36–45.
- [8] Weinberg JA, McGwin Jr G, Griffin RL, Huynh VQ, Cherry III SA, Marques MB, et al. Age of transfused blood: an independent predictor of mortality despite universal leukoreduction. *J Trauma* 2008;65:279–82 discussion 82–4.
- [9] Hess JR, Sparrow RL, van der Meer PF, Acker JP, Cardigan RA, Devine DV. Red blood cell hemolysis during blood bank storage: using national quality management data to answer basic scientific questions. *Transfusion* 2009;49:2599–603.
- [10] Hess JR, Greenwalt TG. Storage of red blood cells: new approaches. *Transfus Med Rev* 2002;16:283–95.
- [11] Racek J, Herynkova R, Holecek V, Faltysova J, Krejcová I. What is the source of free radicals causing hemolysis in stored blood? *Physiol Res* 2001;50:383–8.
- [12] Baumgartner JM, Nydam TL, Clarke JH, Banerjee A, Silliman CC, McCarter MD. Red blood cell supernatant potentiates LPS-induced proinflammatory cytokine response from peripheral blood mononuclear cells. *J Interferon Cytokine Res* 2009;29:333–8.
- [13] Sparrow RL. Red blood cell storage and transfusion-related immunomodulation. *Blood Transfus* 2010;8(Suppl. 3):s26–30.
- [14] Heaton WA, Holme S, Smith K, Brecher ME, Pineda A, AuBuchon JP, et al. Effects of 3–5 log<sub>10</sub> pre-storage leucocyte depletion on red cell storage and metabolism. *Br J Haematol* 1994;87:363–8.
- [15] Ran Q, Hao P, Xiao Y, Zhao J, Ye X, Li Z. Effect of irradiation and/or leucocyte filtration on RBC storage lesions. *PLoS One* 2011;6:e18328.
- [16] Grimshaw K, Sahler J, Spinelli SL, Phipps RP, Blumberg N. New frontiers in transfusion biology: identification and significance of mediators of morbidity and mortality in stored red blood cells. *Transfusion* 2011;51:874–80.
- [17] Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. *Transfusion* 2010;50:376–89.
- [18] Zwart A, van Assendelft OW, Bull BS, England JM, Lewis SM, Zijlstra WG. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition). *J Clin Pathol* 1996;49:271–4.
- [19] Sowemimo-Coker SO. Red blood cell hemolysis during processing. *Transfus Med Rev* 2002;16:46–60.
- [20] Reinhart WH, Chien S. Red cell rheology in stomatocyte-echinocyte transformation: roles of cell geometry and cell shape. *Blood* 1986;67:1110–8.
- [21] Antonelou MH, Kriebardis AG, Velentzas AD, Kokkalis AC, Georgakopoulou SC, Papassideri IS. Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. *J Proteomics* 2011;74:2441–52.
- [22] Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J Surg Res* 2002;102:6–12.
- [23] D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red blood cell concentrates: from metabolomics to proteomics. *Haematologica* 2012;97:107–15.
- [24] Balzan S, D'Urso G, Nicolini G, Forini F, Pellegrino M, Montali U. Erythrocyte sodium pump stimulation by ouabain and an endogenous ouabain-like factor. *Cell Biochem Funct* 2007;25:297–303.
- [25] Terra HT, Saad MJ, Carvalho CR, Vicentin DL, Costa FF, Saad ST. Increased tyrosine phosphorylation of band 3 in hemoglobinopathies. *Am J Hematol* 1998;58:224–30.
- [26] Ferru E, Giger K, Pantaleo A, Campanella E, Grey J, Ritchie K, et al. Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood* 2011;117:5998–6006.
- [27] Bordin L, Ion-Popa F, Brunati AM, Clari G, Low PS. Effector-induced Syk-mediated phosphorylation in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005;1745:20–8.
- [28] Bosch FH, Werre JM, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Huls TH, Willekens FL, Halie MR. Characteristics of red blood cell populations fractionated with a combination of counterflow centrifugation and Percoll separation. *Blood* 1992;79:254–60.
- [29] Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Trougakos IP, Papassideri IS. Apolipoprotein J/Clusterin is a novel structural component of human erythrocytes and a biomarker of cellular stress and senescence. *PLoS One* 2011;6:e26032.
- [30] Greenwalt TJ, Dumaswala UJ. Effect of red cell age on vesiculation *in vitro*. *Br J Haematol* 1988;68:465–7.
- [31] Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. *Transfusion* 2008;48:1943–53.
- [32] Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. *J Lab Clin Med* 1976;88:328–33.
- [33] Henkelman S, Dijkstra-Tiekstra MJ, de Wildt-Eggen J, Graaff R, Rakhorst G, van Oeveren W. Is red blood cell rheology preserved during routine blood bank storage? *Transfusion* 2010;50:941–8.
- [34] Hess JR. Red cell changes during storage. *Transfus Apher Sci* 2010;43:51–9.
- [35] Haradin AR, Weed RI, Reed CF. Changes in physical properties of stored erythrocytes relationship to survival *in vivo*. *Transfusion* 1969;9:229–37.
- [36] Greenwalt TJ, Zehner Sostok C, Dumaswala UJ. Studies in red blood cell preservation. 1. Effect of the other formed elements. *Vox Sang* 1990;58:85–9.
- [37] Willekens FL, Werre JM, Groenen-Dopp YA, Roerdinkholder-Stoelwinder B, de Pauw B, Bosman GJ. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Br J Haematol* 2008;141:549–56.
- [38] Bosman GJ, Werre JM, Willekens FL, Novotny VM. Erythrocyte ageing *in vivo* and *in vitro*: structural aspects and implications for transfusion. *Transfus Med* 2008;18:335–47.
- [39] Dumaswala UJ, Dumaswala RU, Levin DS, Greenwalt TJ. Improved red blood cell preservation correlates with decreased loss of bands 3, 4.1, acetylcholinesterase, and lipids in microvesicles. *Blood* 1996;87:1612–6.
- [40] Tinmouth A, Chin-Yee I. The clinical consequences of the red cell storage lesion. *Transfus Med Rev* 2001;15:91–107.
- [41] Wagner GM, Chiu DT, Qju JH, Heath RH, Lubin BH. Spectrin oxidation correlates with membrane vesiculation in stored RBCs. *Blood* 1987;69:1777–81.
- [42] Tait JF, Gibson D. Measurement of membrane phospholipid asymmetry in normal and sickle-cell erythrocytes by means of annexin V binding. *J Lab Clin Med* 1994;123:741–8.
- [43] Lu C, Shi J, Yu H, Hou J, Zhou J. Procoagulant activity of long-term stored red blood cells due to phosphatidylserine exposure. *Transfus Med* 2011;21:150–7.
- [44] Bosman GJ, Cluitmans JC, Groenen YA, Werre JM, Willekens FL, Novotny VM. Susceptibility to hyperosmotic stress-induced phosphatidylserine exposure increases during red blood cell storage. *Transfusion* 2011;51:1072–8.

- [45] Boas FE, Forman L, Beutler E. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3077–81.
- [46] Verhoeven AJ, Hilarius PM, Dekkers DW, Lagerberg JW, de Korte D. Prolonged storage of red blood cells affects aminophospholipid translocase activity. *Vox Sang* 2006;91:244–51.
- [47] Geldwerth D, Kuypers FA, Butikofer P, Allary M, Lubin BH, Devaux PF. Transbilayer mobility and distribution of red cell phospholipids during storage. *J Clin Invest* 1993;92:308–14.
- [48] Stewart A, Urbaniak S, Turner M, Bessos H. The application of a new quantitative assay for the monitoring of integrin-associated protein CD47 on red blood cells during storage and comparison with the expression of CD47 and phosphatidylserine with flow cytometry. *Transfusion* 2005;45:1496–503.
- [49] Sparrow RL, Healey G, Patton KA, Veale MF. Red blood cell age determines the impact of storage and leukocyte burden on cell adhesion molecules, glycophorin A and the release of annexin V. *Transfus Apher Sci* 2006;34:15–23.
- [50] Bratosin D, Leszczynski S, Sartiaux C, Fontaine O, Descamps J, Huart JJ, et al. Improved storage of erythrocytes by prior leukodepletion: flow cytometric evaluation of stored erythrocytes. *Cytometry* 2001;46:351–6.
- [51] Cardo LJ, Hmel P, Wilder D. Stored packed red blood cells contain a procoagulant phospholipid reducible by leukodepletion filters and washing. *Transfus Apher Sci* 2008;38:141–7.
- [52] Frabetti F, Musiani D, Marini M, Fanelli C, Coppola S, Ghibelli L, et al. White cell apoptosis in packed red cells. *Transfusion* 1998;38:1082–9.
- [53] Hogman CF, Meryman HT. Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion. *Transfus Med Rev* 1999;13:275–96.
- [54] Luk CS, Gray-Statchuk LA, Cepinkas G, Chin-Yee IH. WBC reduction reduces storage-associated RBC adhesion to human vascular endothelial cells under conditions of continuous flow *in vitro*. *Transfusion* 2003;43:151–6.
- [55] Romero PJ, Romero EA. The role of calcium metabolism in human red blood cell ageing: a proposal. *Blood Cells Mol Dis* 1999;25:9–19.
- [56] Palek J, Stewart G, Lionetti FJ. The dependence of shape of human erythrocyte ghosts on calcium, magnesium, and adenosine triphosphate. *Blood* 1974;44:583–97.
- [57] Kiefer CR, Snyder LM. Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol* 2000;7:113–6.
- [58] Wolfe LC. The membrane and the lesions of storage in preserved red cells. *Transfusion* 1985;25:185–203.
- [59] Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A, Telen MJ, Ortel TL, Reid TS, et al. Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17063–8.
- [60] Salamino F, Sparatore B, Melloni E, Michetti M, Viotti PL, Pontremoli S, et al. The plasma membrane calcium pump is the preferred calpain substrate within the erythrocyte. *Cell Calcium* 1994;15:28–35.
- [61] Kanas T, Acker JP. Mechanism of hemoglobin-induced cellular injury in decanted red blood cells. *Free Radic Biol Med* 2010;49:539–47.
- [62] Gottlieb Y, Topaz O, Cohen LA, Yakov LD, Haber T, Morgenstern A. Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis *in vivo* but not *in vitro*. *Haematologica* 2012;97:994–1035.
- [63] Kanas T, Acker JP. Biopreservation of red blood cells—the struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J* 2010;277:343–56.
- [64] Jozwik M, Szczycka M, Gajewska J, Laskowska-Klita T. Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clin Chim Acta* 1997;267:129–42.
- [65] Messana I, Ferroni L, Misiti F, Girelli G, Pupella S, Castagnola M, et al. Blood bank conditions and RBCs: the progressive loss of metabolic modulation. *Transfusion* 2000;40:353–60.
- [66] Lachant NA, Noble NA, Myrhe BA, Tanaka KR. Antioxidant metabolism during blood storage and its relationship to posttransfusion red cell survival. *Am J Hematol* 1984;17:237–49.
- [67] Weiss SJ. The role of superoxide in the destruction of erythrocyte targets by human neutrophils. *J Biol Chem* 1980;255:9912–7.
- [68] Pietersz RN, Reesink HW, de Korte D, Dekker WJ, van den Ende A, Loos JA. Storage of leukocyte-poor red cell concentrates: filtration in a closed system using a sterile connection device. *Vox Sang* 1989;57:29–36.
- [69] Chin-Yee I, Keeney M, Krueger L, Dietz G, Moses G. Supernatant from stored red cells activates neutrophils. *Transfus Med* 1998;8:49–56.
- [70] Pantaleo A, Ferru E, Giribaldi G, Mannu F, Carta F, Matte A, et al. Oxidized and poorly glycosylated band 3 is selectively phosphorylated by Syk kinase to form large membrane clusters in normal and G6PD-deficient red blood cells. *Biochem J* 2009;418:359–67.
- [71] Low PS, Waugh SM, Zinke K, Drenckhahn D. The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science* 1985;227:531–3.
- [72] Minetti G, Piccinini G, Balduini C, Seppi C, Brovelli A. Tyrosine phosphorylation of band 3 protein in Ca<sup>2+</sup>/A23187-treated human erythrocytes. *Biochem J* 1996;320(Pt 2):445–50.
- [73] Turrini F, Arese P, Yuan J, Low PS. Clustering of integral membrane proteins of the human erythrocyte membrane stimulates autologous IgG binding, complement deposition, and phagocytosis. *J Biol Chem* 1991;266:23611–7.
- [74] Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Membrane protein carbonylation in non-leukodepleted CPDA-preserved red blood cells. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36:279–82.
- [75] Bosman GJ, Lasonder E, Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Novotny VM, Bos H, et al. The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions. *Transfusion* 2008;48:827–35.
- [76] Rinalducci S, D'Amici GM, Blasi B, Vaglio S, Grazzini G, Zolla L. Peroxiredoxin-2 as a candidate biomarker to test oxidative stress levels of stored red blood cells under blood bank conditions. *Transfusion* 2011;51:1439–49.
- [77] Rocha S, Vitorino RM, Lemos-Amado FM, Castro EB, Rocha-Pereira P, Barbot J, et al. Presence of cytosolic peroxiredoxin 2 in the erythrocyte membrane of patients with hereditary spherocytosis. *Blood Cells Mol Dis* 2008;41:5–9.
- [78] Low FM, Hampton MB, Winterbourn CC. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1621–30.
- [79] Stuhlmeier KM, Kao JJ, Wallbrandt P, Lindberg M, Hammarstrom B, Broell H, et al. Antioxidant protein 2 prevents methemoglobin formation in erythrocyte hemolysates. *Eur J Biochem* 2003;270:334–41.
- [80] Moore RB, Shriver SK. Protein 7.2b of human erythrocyte membranes binds to calpromotin. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:294–7.
- [81] D'Amici GM, Rinalducci S, Zolla L. Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage. *J Proteome Res* 2007;6:3242–55.
- [82] Ando K, Beppu M, Kikugawa K, Hamasaki N. Increased susceptibility of stored erythrocytes to anti-band 3 IgG autoantibody binding. *Biochim Biophys Acta* 1993;1178:127–34.
- [83] Snyder LM, Leb L, Piotrowski J, Sauberman N, Liu SC, Fortier NL. Irreversible spectrin-haemoglobin crosslinking *in vivo*: a marker for red cell senescence. *Br J Haematol* 1983;53:379–84.



- [84] Snyder LM, Fortier NL, Trainor J, Jacobs J, Leb L, Lubin B, et al. Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *J Clin Invest* 1985;76:1971–7.
- [85] Salzer U, Hinterdorfer P, Hunger U, Borken C, Prohaska R. Ca<sup>2+</sup>-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood* 2002;99:2569–77.
- [86] Glaser T, Schwarz-Benmeir N, Barnoy S, Barak S, Eshhar Z, Kosower NS. Calpain (Ca<sup>2+</sup>-dependent thiol protease) in erythrocytes of young and old individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7879–83.
- [87] Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Trougakos IP, Papassideri IS. Apolipoprotein J/clusterin in human erythrocytes is involved in the molecular process of defected material disposal during vesiculation. *PLoS One* 2011;6:e26033.
- [88] Anniss AM, Sparrow RL. Expression of CD47 (integrin-associated protein) decreases on red blood cells during storage. *Transfus Apher Sci* 2002;27:233–8.
- [89] Long KE, Yomtovian R, Kida M, Knez JJ, Medof ME. Time-dependent loss of surface complement regulatory activity during storage of donor blood. *Transfusion* 1993;33:294–300.
- [90] Goodman SR, Kurdia A, Ammann L, Kakhniashvili D, Daescu O. The human red blood cell proteome and interactome. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232:1391–408.
- [91] Bosch FH, Werre JM, Schipper L, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Huls T, Willekens FL, et al. Determinants of red blood cell deformability in relation to cell age. *Eur J Haematol* 1994;52:35–41.
- [92] Romero PJ, Romero EA, Winkler MD. Ionic calcium content of light dense human red cells separated by Percoll density gradients. *Biochim Biophys Acta* 1997;1323:23–8.
- [93] Shiga T, Sekiya M, Maeda N, Kon K, Okazaki M. Cell age-dependent changes in deformability and calcium accumulation of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985;814:289–99.
- [94] Nagababu E, Mohanty JG, Bhamidipaty S, Oстера GR, Rifkind JM. Role of the membrane in the formation of heme degradation products in red blood cells. *Life Sci* 2010;86:133–8.
- [95] Humbert JR, Fermin CD, Winsor EL. Early damage to granulocytes during storage. *Semin Hematol* 1991;28:10–3.
- [96] Mandal D, Baudin-Creuzat V, Bhattacharyya A, Pathak S, Delaunay J, Kundu M, 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;278:52551–8.
- [97] Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem* 2005;280:39460–7.
- [98] Bocci V, Pessina GP, Paulesu L. Studies of factors regulating the ageing of human erythrocytes-IV. Influence of physiological proteinase inhibitors. *Int J Biochem* 1981;13:1257–60.
- [99] Egidio MG, D'Alessandro A, Mandarello G, Zolla L. Troubleshooting in platelet storage temperature and new perspectives through proteomics. *Blood Transfus* 2010;8(Suppl. 3):s73–81.
- [100] Kaufman RM. Uncommon cold: could 4 degrees C storage improve platelet function? *Transfusion* 2005;45:1407–12.
- [101] van derWal DE, Gitz E, Du VX, Lo KS, Koekman CA, Versteeg S, et al. Arachidonic acid depletion extends survival of cold stored platelets by interfering with [Glycoprotein Ibalpha - 14-3-3zeta] association. *Haematologica* in press. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2011.059956>.
- [102] Bode AP, Knupp CL. Effect of cold storage on platelet glycoprotein Ib and vesiculation. *Transfusion* 1994;34:690–6.
- [103] Jy W, Ricci M, Shariatmadar S, Gomez-Marin O, Horstman LH, Ahn YS. Microparticles in stored red blood cells as potential mediators of transfusion complications. *Transfusion* 2011;51:886–93.
- [104] Sugawara A, Nollet KE, Yajima K, Saito S, Ohto H. Preventing platelet-derived microparticle formation—and possible side effects—with prestorage leukofiltration of whole blood. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:771–5.
- [105] Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010;107:1047–57.
- [106] Sloand EM, Mainwaring L, Keyvanfar K, Chen J, Maciejewski J, Klein HG, et al. Transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to deficient cells after erythrocyte transfusion in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2004;104:3782–8.

## ORIGINAL RESEARCH

# Uric acid variation among regular blood donors is indicative of red blood cells susceptibility to storage lesion markers: a new hypothesis tested

Vassilis L. Tzounakas,<sup>1</sup> Hara T. Georgatzakou,<sup>1</sup> Anastasios G. Kriebardis,<sup>2</sup> Effie G. Papageorgiou,<sup>3</sup> Konstantinos E. Stamoulis,<sup>4,5</sup> Leontini E. Foudoulaki-Paparizos,<sup>5\*</sup> Marianna H. Antonelou,<sup>1</sup> and Issidora S. Papassideri<sup>1</sup>

**BACKGROUND:** Oxidative stress orchestrates a significant part of the red blood cell (RBC) storage lesion. Considering the tremendous interdonor variability observed in the “storability,” namely, the capacity of RBCs to sustain the storage lesion, this study aimed at the elucidation of donor-specific factors that affect the redox homeostasis during the storage of RBCs in standard systems.

**STUDY DESIGN AND METHODS:** The hematologic profile of regular blood donors (n = 78) was evaluated by biochemical analysis of 48 different variables, including in vivo hemolysis and plasma oxidant and antioxidant factors and statistical analysis of the results. The possible effect of the uric acid (UA) variable on the RBCs storability was investigated in leukoreduced CPD/SAGM RBC units (n = 8) collected from donors exhibiting high or low prestorage levels of UA, throughout the storage period.

**RESULTS:** Among the hematologic variables examined in vivo, cluster analysis grouped the donors according to their serum UA levels. Plasma antioxidant capacity, iron indexes, and protein carbonylation represented covariants of UA factor. RBCs prepared by low- or high-UA donors exhibited significant differences between them in spherocytosis, supernatant antioxidant activity, and other RBC storage lesion-associated variables.

**CONCLUSION:** UA exhibits a storability biomarker potential. Intrinsic variability in plasma UA levels might be related to the interdonor variability observed in the storage capacity of RBCs. A model for the antioxidant effect of UA during the RBC storage is currently proposed.

**ABBREVIATIONS:** GSH = glutathione; HDL = high-density lipoprotein; LDL = low-density lipoprotein; NO = nitric oxide; ROS = reactive oxygen species; TAC = total antioxidant capacity; TIBC = total iron-binding capacity; UA = uric acid.

From the <sup>1</sup>Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, NKUA, Athens; the <sup>2</sup>Laboratory of Hematology and Transfusion Medicine, Department of Medical Laboratories, Faculty of Health and Caring Professions, and the <sup>3</sup>Laboratory of Information Science and Biostatistics, Department of Medical Laboratories, Faculty of Health and Caring Professions, Technological and Educational Institute of Athens, Athens; the <sup>4</sup>Hellenic National Blood Center, Acharnes, Athens; and the <sup>5</sup>Regional Blood Transfusion Center, “Agios Panteleimon” General Hospital of Nikea, Piraeus, Greece.

\*To the memory of beloved friend and partner Leontini Foudoulaki-Paparizos, MD pathologist, Director of the “Agios Panteleimon” General Hospital of Nikea Blood Transfusion Center, excellent scientist and dedicated doctor with great contribution to the establishment of the voluntary blood donation in Greece. Without her interest and assistance this project would not have started. To our great regret she passed away on March 30, 2015. May she rest in peace . . .

*Address reprint requests to:* Marianna H. Antonelou, Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens (NKUA), Panepistimiopolis, Athens 15784, Greece; e-mail: manton@biol.uoa.gr.

This study was partly supported by the Special Account for Research Grants of the NKUA to ISP and MHA.

Received for publication February 5, 2015; revision received May 20, 2015; and accepted May 20, 2015.

doi:10.1111/trf.13211

© 2015 AABB

TRANSFUSION 2015;00:00–00

44

AQ1

In the context of “red blood cell [RBC] storage lesion,” stored RBCs undergo a series of time-dependent physiologic alterations that are only partially reversible.<sup>1,2</sup> These alterations are probably related to the in vivo recovery of RBCs.<sup>3</sup> Growing evidence suggests a central role for oxidative stress in the RBCs aging in health and disease context as well as under storage in blood banks.<sup>4</sup> Storage lesion comprises a number of interdependent processes that are possibly orchestrated by the management of the oxidative stress *ex vivo*.<sup>5</sup> Reduction in the antioxidant activity of both stored RBCs and supernatant leads to time-dependent oxidative assaults on lipids and proteins, including hemoglobin (Hb), that are intrinsically involved in the loss of cation gradients across the membrane, microparticles release, spherocytosis, and generation of senescence neoantigens at cell surface.<sup>5-7</sup>

Uric acid (UA) is the final product of purine metabolism pathway. It functions as a general electron donor and scavenger of singlet oxygen, hydroxyl radicals, oxoheme oxidants, hydroperoxyl radicals, and hypochlorous acid in the plasma.<sup>8</sup> In fact, UA represents the most abundant plasma antioxidant with a concentration close enough to its solubility limits (120-450 μmol/L).<sup>8</sup> Its antioxidant activity has evolutionarily replaced ascorbate as the major water-soluble antioxidant.<sup>9</sup> Furthermore, UA uptake by RBCs, oxidatively stressed cells, and cancer cells suggests an antioxidant role for UA as an intracellular scavenger to prevent the accumulation of reactive oxygen species (ROS)-associated damages.<sup>8,10</sup>

Blood donors can exhibit a wide variability in the “storability,” namely, the capacity of RBCs to sustain the storage lesion,<sup>11</sup> as well as in the recovery of stored RBCs after transfusion.<sup>12</sup> Inherent variations in the oxidative burden and antioxidant activity of the donated blood might to some extent determine the storability of RBCs and probably their posttransfusion efficacy.<sup>13-15</sup> This study aimed at the elucidation of donor-specific hematologic characteristics that affect the redox homeostasis and storability of RBCs.

## 84 MATERIALS AND METHODS

### 85 Material supplies

86 Common chemicals and anti-band 3 (B-9277, Sigma  
87 Aldrich, Munich, Germany); anti-flotillin-2 (610384, BD  
88 Transduction Laboratories, San Jose, CA); anti-calpain-1  
89 (sc-7531, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); anti-  
90 peroxiredoxin 2 (Prx2, SP5464) and glucose transporter 1  
91 (GLUT1, AP10084PU, Acris GmbH, Herford, Germany);  
92 5-(and-6) chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein  
93 diacetate, acetyl ester (CMH2DCFDA) and Fluo-4 AM  
94 (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR); horseradish  
95 peroxidase (HRP)-conjugated antibodies and ECL kits  
96 (Perkin Elmer, Santa Clara, CA; and GE Healthcare, Buck-

inghamshire, UK); bis-sulfosuccinimidyl-suberate (BS3) 97  
cross-linker (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL); 98  
Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA); and plasma car- 99  
bonylation, nitric oxide (NO), and clusterin enzyme- 100  
linked immunosorbent assay (ELISA) kits (BioCell Corp., 101  
Papatoetoe, New Zealand; Cusabio, Wuhan, China; and 102  
BioVendor, Asheville, NC, respectively). 103

AQ2

### Blood donor preparation of RBC units 104

105 For the prestorage study, 78 young (19-24 years old) male  
106 regular blood donors were examined. Blood was collected  
107 into EDTA or citrate vacutainers. The RBC storability was  
108 evaluated in prestorage leukoreduced units prepared from  
109 8 young, nonsmoking male donors exhibiting high (n = 4)  
110 or low (n = 4) levels of serum UA in vivo. RBC units con-  
111 taining CPD/SAGM were stored for 42 days at 4°C. The  
112 study has been submitted and approved by the Research  
113 Bioethics and BioSecure Committee of the Faculty of Biol-  
114 ogy/NKUA. Investigations were carried out in accordance  
115 with the principles of the Declaration of Helsinki. All sub-  
116 jects gave a written consent before their participation in  
117 the study.

### Lifestyle, hematologic, and serum biochemical 118 analysis 119

120 The donors filled out a lifestyle questionnaire (diet, smok-  
121 ing, alcohol consumption, etc.). Blood cell counts and  
122 indexes (mean cell volume, mean cell Hb, mean cell Hb  
123 concentration, RBC distribution width, neutrophils, lym-  
124 phocytes, monocytes, platelets [PLTs], mean PLT volume,  
125 plateletcrit, hematocrit, etc.) were estimated by an auto-  
126 matic blood cell counter (Sysmex K-4500, Roche, India-  
127 napolis, IN). Twenty-five biochemical variables including  
128 iron (Fe), total iron-binding capacity (TIBC), UA, low-  
129 density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL),  
130 alkaline phosphatase (ALP), aspartate transaminase (AST),  
131 alanine aminotransferase (ALT), γ-glutamyl transferase,  
132 and so forth were measured in serum samples by using an  
133 automatic analyzer (Hitachi 902, Roche). Measurement of  
134 potassium (K<sup>+</sup>) and sodium (Na<sup>+</sup>) was performed with an  
135 electrolyte analyzer (9180, Roche) and of ferritin with an  
136 assay (Elecsys Systems analyzer, Roche).

### Plasma and supernatant analysis 137

138 Free Hb concentration and percentage of hemolysis were  
139 calculated by the methods of Harboe<sup>16</sup> and Drabkin,<sup>17</sup>  
140 respectively. The total antioxidant capacity (TAC) was  
141 measured by the ferric reducing antioxidant power  
142 assay.<sup>18</sup> The contribution of UA to the TAC was deter-  
143 mined by uricase treatment.<sup>19</sup> Protein carbonylation, NO,  
144 and clusterin were measured by ELISA kits according to  
145 the manufacturer's instructions.



URIC ACID VARIATION AND RBC STORAGE LESION

146 **Characterization of RBCs**

147 RBC morphology was evaluated by scanning electron  
 148 microscopy. Purified RBCs were fixed in 2% glutaralde-  
 149 hyde and postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 mmol/  
 150 L sodium cacodylate buffer, pH 7.4. Fixed cells were suc-  
 151 cessively dehydrated in ascending ethanol series and  
 152 coated with gold-palladium for examination. ROS and calci-  
 153 um accumulation were detected by fluorometry, using  
 154 the redox-sensitive probe CM-H<sub>2</sub>DCFDA and the calcium  
 155 indicator Fluo-4AM, respectively.<sup>20</sup> Glutathione (GSH)  
 156 determination was accomplished by the recycling assay  
 157 method of Tietze<sup>21</sup> that measures the reduction of Ell-  
 158 man's reagent by the GSH in the presence of NADPH and  
 159 GSH reductase.

160 **Immunoblotting analysis of RBC membrane**  
 161 **proteins**

162 RBCs were isolated by the method of Beutler and col-  
 163 leagues<sup>22</sup> and hemolyzed in 5 mmol/L sodium phosphate  
 164 buffer (pH 8.0) containing protease inhibitors. Membrane  
 165 fraction was prepared as previously described.<sup>20</sup> Equal  
 166 amounts (12-25 µg) of membrane proteins were loaded in  
 167 Laemmli gels, transferred to nitrocellulose membranes,  
 168 immune-probed for RBC proteins, and detected by HRP-  
 169 conjugated secondary antibodies and ECL development.<sup>20</sup>  
 170 The relative membrane expression of each component  
 171 was estimated by scanning densitometry.

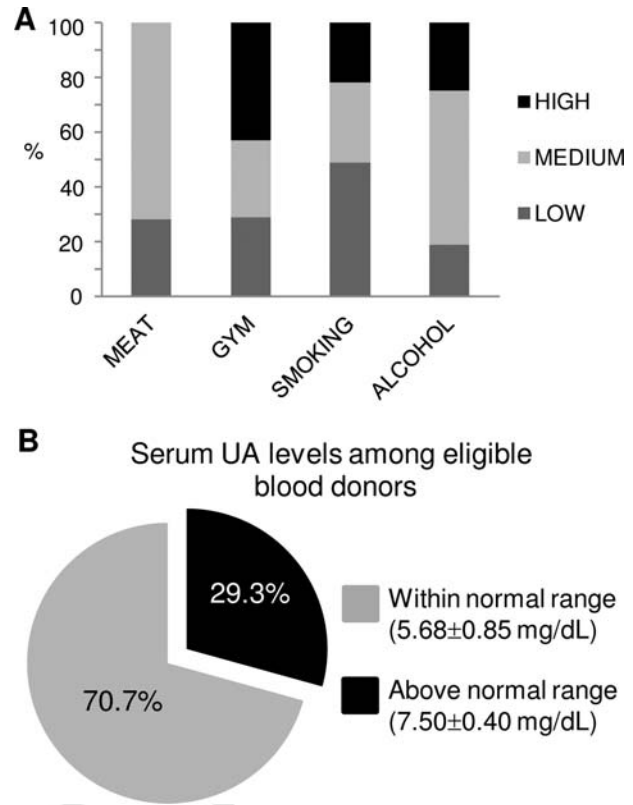
172 **Statistical analysis**

173 All experiments have been performed twice, unless other-  
 174 wise stated. For statistical analysis, computer software  
 175 (Statistical Package for Social Sciences, IBM SPSS, Version  
 176 22.0 for Windows, IBM Corp., Armonk, NY; administered  
 177 by NKUA) was used. Donors or variables for the prestor-  
 178 age evaluation were categorized using the cluster and fac-  
 179 tor analysis, respectively. Time course analysis was  
 180 performed by using repeated-measures analysis of var-  
 181 iance (ANOVA). Intergroup differences were evaluated by  
 182 one-way ANOVA and general linear models. Prediction  
 183 outcomes were estimated by regression analysis. Pearson's  
 184 and Spearman's correlation tests were performed to assess  
 185 the relationship between variables. Significance was  
 186 accepted at p values of less than 0.05.

187 **RESULTS**

188 **Prestorage examination**

189 *Lifestyle, hematologic, and serum biochemical profile*  
 190 Considering that the lipid, iron, and redox homeostasis in  
 191 the blood might be related to the donor's lifestyle, we ini-  
 192 tially examined the interdonor variation in diet, physical  
 193 exercise, smoking, and alcohol consumption aspects. Evalu-  
 194 ation of the questionnaire revealed a common average life-  
 195 style for the volunteers participating in this study. Half of



196 **Fig. 1. Lifestyle (A) and serum UA (B) variation profile among**  
 197 **the regular blood donors examined (n = 78). Percentage of**  
 198 **donors exhibiting high, medium, or low frequency of red**  
 199 **meat and alcohol consumption, physical exercise (GYM), and**  
 200 **smoking as well as aberrant levels of UA is shown.**

201 they were smokers and had physical activities on a weekly  
 202 basis, 75% were not consuming more than one drink per  
 203 week, and 27% were consuming red meat once per week  
 204 (Fig. 1A). Moreover, the vast majority of the subjects dis-  
 205 played the anticipated normal range variation in most of  
 206 the hematologic and serum and plasma biochemical varia-  
 207 bles examined (Table 1). However, donors with aberrant  
 208 levels of serum cholesterol, LDL, iron, UA, AST, and clus-  
 209 terin were also detected. In particular, approximately 30%  
 210 of the donors examined exhibited higher levels of serum UA  
 211 ( $7.5 \pm 0.4$  mg/dL) compared to the normal range ( $<7.2$  mg/  
 212 dL; Fig. 1B). This finding was very interesting, since UA  
 213 accounts for up to 60% of the TAC of the plasma.<sup>18</sup>

209 *Classification of subjects and variables*

210 To test for a possible classification of the donors on the  
 211 basis of their variable hematologic profile (48 variables), we  
 212 used cluster analysis. By this approach, all subjects were  
 213 indeed grouped into three clusters according to their serum  
 214 UA levels: high-UA Cluster A ( $7.56 \pm 0.59$  mg/dL), upper  
 215 border-UA Cluster B ( $6.96 \pm 0.51$  mg/dL), and normal-UA  
 216 Cluster C ( $6.01 \pm 0.63$  mg/dL), respectively (Fig. 2A). The

**TABLE 1. Hematologic profile of the blood donors (n = 78)\***

Variable	Normal range	Donors
Hb (g/dL)	12-18	15.0 ± 1.2
RBCs (×10 <sup>12</sup> /L)	3.8-5.3	5.0 ± 0.4
HCT (%)	36-56	44.0 ± 2.8
MCV (fL)	80-100	88 ± 7
MCH (pg)	27-32	30 ± 3
MCHC (g/dL)	32-36	34.0 ± 1.1
RDW (%)	10.0-16.5	12.5 ± 0.7
WBCs (×10 <sup>9</sup> /L)	4.0-9.0	7.0 ± 1.8
PLT (×10 <sup>9</sup> /L)	120-380	245 ± 51
Glucose (mg/dL)	65-110	89 ± 9
Cholesterol (mg/dL)	140-199	188 ± 31
LDL (mg/dL)	< 130	113 ± 27
HDL (mg/dL)	37-70	52 ± 9
HDL/LDL ratio	1.00	0.49 ± 0.15
VLDL (mg/dL)	8-40	22 ± 12
Triglycerides (mg/dL)	10-150	111 ± 29
Fe (mg/dL)	35-150	129 ± 27
TIBC (mg/dL)	260-390	328 ± 33
Ferritin (ng/mL)	18-270	96 ± 43
Transferrin (mg/dL)	200-400	306 ± 44
Transferrin saturation (%)	20-50	39 ± 6
Urea (mg/dL)	10-50	21 ± 6
Creatinine (mg/dL)	0.31-1.11	0.79 ± 0.20
UA (mg/dL)	3.5-7.2	6.9 ± 1.1
Calcium (mg/dL)	8.6-10.0	9.5 ± 0.4
Sodium (mmol/L)	135-145	140 ± 3
Potassium (mmol/L)	3.6-5.1	4.3 ± 0.4
Phosphorus (mg/dL)	2.5-4.9	3.3 ± 0.4
Total proteins	6.4-8.2	7.2 ± 0.5
Albumin (mg/dL)	3.5-5.5	4.8 ± 0.3
AST (U/L)	5-40	27 ± 18
ALT (U/L)	7-56	18 ± 10
γGT (U/L)	5-85	24 ± 12
ALP (U/L)	17-142	59 ± 11
Plasma Hb (mg/dL)	NA	41 ± 21
Plasma NO (μg/mL)	NA	3.59 ± 1.18
Plasma TAC (μmol/L Fe <sup>2+</sup> )	NA	984 ± 143
Plasma clusterin (μg/mL)	52.8-137.2	86.4 ± 51.9
Plasma protein carbonylation (nmol/mg)	<0.1	0.084 ± 0.063

\* Data are presented as mean ± SD.  
 γGT = γ-glutamyl transferase; MCH = mean cell Hb; MCHC = mean cell Hb concentration; MCV = mean cell volume; RDW = RBC distribution width; VLDL = very-low-density lipoprotein.

clusters that have arisen were also different between each other in plasma TAC, iron, ferritin, and TIBC levels (double arrows in Fig. 2A). By evaluating the cluster analysis results, we next asked whether the UA variation exhibited any significant interrelation with the cosegregated variables of TAC, TIBC, iron, and ferritin. Factor analysis revealed nine subsets of closely interrelated variables, including the anticipated RBCs, WBCs, PLTs, Hb and scavenging, liver, and lipid homeostasis factors as well as the UA-specific factor that cross-talked with that of iron indexes by TIBC and plasma carbonylation variables (Fig. 2B).

**Storage examination: the UA effect**

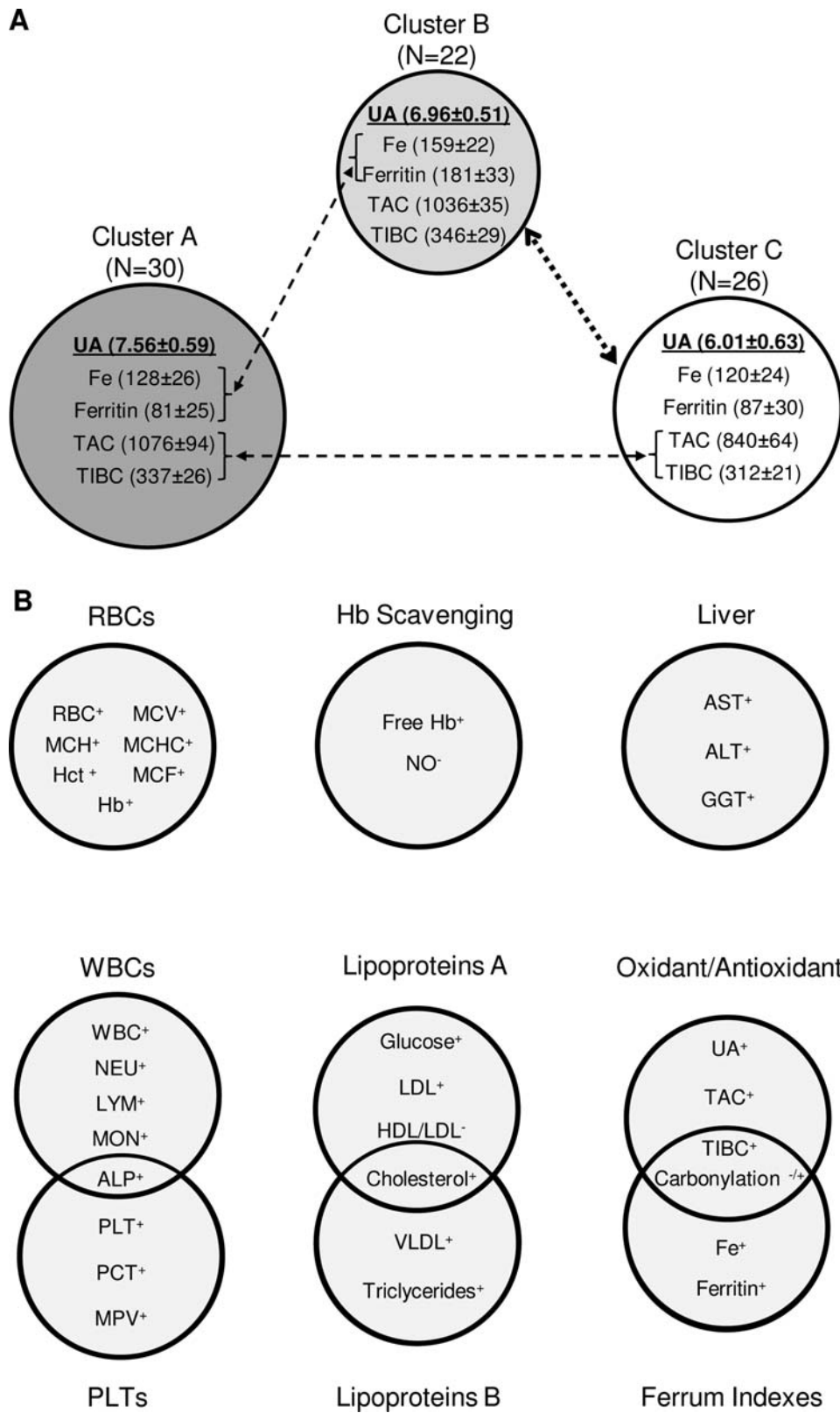
To test whether UA variation in vivo correlated with the storability of RBCs, we selected eight regular blood donors

exhibiting low (4.73 ± 0.25 mg/dL, normal range) or high (7.52 ± 0.5 mg/dL) plasma UA levels, to prepare and store leukoreduced RBCs in CPD/SAGM for 42 days at 4°C. High-UA donors exhibited UA values slightly above the normal range to be consistent with the cluster A of the prestorage analysis shown in Fig. 2A.

Stored RBC units prepared from high- or low-UA donors differed (p < 0.05) from each other in certain RBC and supernatant characteristics typically affected by the storage (asterisks in Table 2). Considerably better intracellular accumulation of calcium, spherocytosis percentage (nonreversible RBC shape modification), and TAC of the supernatant were found in units prepared from high-UA donors compared to the low-UA ones throughout the storage period (Figs. 3 and 4A). The distribution of those variables' levels in both groups at the middle and the end of the storage period is shown by the representative boxplots of Fig. 3A. After each variable was plotted against storage duration, linear progression graphs arose, with R<sup>2</sup> values high enough to allow a safe prediction of a value anywhere in the storage period on the basis of any one previous time point value, including the prestorage one (Fig. 3B). Intracellular calcium activity and spherocytosis percentage (Fig. 4A) as well as protein factors like Band 3 oligomerization (Day 21) and membrane expression of flotillin-2 (Day 42; Fig. 4B) varied significantly (p < 0.05) from low- to high-UA units of stored cells, while they did not in vivo (Table 2, Fig. 3B). High-UA stored RBCs were characterized by normal calcium accumulation and supernatant antioxidant capacity until the last days of storage while expression of flotillin-2 was decreased at pathologic levels only in low-UA RBCs stored for a long period ex vivo.

Multivariate analysis using serum UA concentration as an independent variable and the majority of the measurements (on RBCs and supernatants) collected throughout the storage period as dependent variables indicated a significant multivariate effect on the combined dependent variables of 1) intracellular Ca<sup>2+</sup>, 2) supernatant TAC, 3) percentage of spherocytosis, and 4) degree of protein Band 3 oligomerization (Day 21) or flotillin-2 membrane levels (Day 42) in respect to the donor UA levels in vivo with F(4,3) = 56.119, p = 0.024, partial η<sup>2</sup> = 0.942, and power = 0.836 for Day 21 and F(4,3) = 89.564, p = 0.011, partial η<sup>2</sup> = 0.994, and power = 0.990 for Day 42, respectively. Additional repeated-measures multivariate analysis showed that the above-mentioned multivariate effect was concomitantly significant at both the middle and the end of the storage period. Finally, to evaluate whether the prestorage plasma UA levels can predict the storage-associated variation profile, regression analysis using UA as the independent variable was performed. By this approach, significant prediction models for supernatant TAC, intracellular Ca<sup>2+</sup>, and spherocytosis were made (Fig. 4C).

Apart from the variables of the multivariate UA model that showed combined significant differences between



AQ3

**Fig. 2. Multiparametric statistical analysis (n = 78).** (A) Cluster analysis using 48 different hematologic, serum biochemical, and RBC variables grouped the donors to three clusters according to their serum UA levels (mg/dL). TAC ( $\mu\text{mol/L Fe}^{2+}$ ), TIBC (mg/dL), Fe (mg/dL), and ferritin (ng/mL) were significantly ( $p < 0.05$ ) different between clusters (double arrows). Cluster B differed from Cluster C ( $p < 0.05$ ) in all five variables included (bold-lined double arrow). Data are shown as mean  $\pm$  SD. (B) Factor analysis aggregated the same variables ensemble in nine subsets of closely interrelated (positively + or negatively -) factors specific for blood cells, free Hb, liver, iron, lipid, and oxidant and antioxidant homeostasis. ALP, cholesterol, TIBC, and carbonylation were present in more than one subset. (-/+ superscript indicates that carbonylation is negatively correlated with the oxidant or antioxidant factor but positively with the ferrum factor). GGT =  $\gamma$ -glutamyl transferase; LYM = lymphocytes; MCF = •••••; MCH = mean cell Hb; MCHC = mean cell Hb concentration; MCV = mean cell volume; MON = monocytes; MPV = mean PLT volume; NEU = neutrophils; PCT = plateletcrit; RDW = RBC distribution width; VLDL = very-low-density lipoprotein; WBCs = white blood cells.

**TABLE 2. Time course evaluation of the variability observed in selected RBC and supernatant characteristics among the high- and low-UA donors during the storage period\***

Variable	Group (n = 8)	Time point			
		NS	Day 2	Day 21	Day 42
pTAC ( $\mu\text{mol/L Fe}^{2+}$ )	Low	690 $\pm$ 64†	469 $\pm$ 44†‡	364 $\pm$ 14†‡§	317 $\pm$ 23†‡
	High	866 $\pm$ 96	618 $\pm$ 107‡	463 $\pm$ 52‡	440 $\pm$ 68‡
UA-dep AC ( $\mu\text{mol/L Fe}^{2+}$ )	Low	377 $\pm$ 34†	337 $\pm$ 38†	184 $\pm$ 24†‡§	174 $\pm$ 47†‡
	High	483 $\pm$ 64	497 $\pm$ 103	292 $\pm$ 33‡§	278 $\pm$ 36‡
UA-ind AC ( $\mu\text{mol/L Fe}^{2+}$ )	Low	313 $\pm$ 40	132 $\pm$ 14‡	180 $\pm$ 20‡§	143 $\pm$ 27‡
	High	383 $\pm$ 44	121 $\pm$ 13‡	171 $\pm$ 21‡§	162 $\pm$ 31‡
Calcium (RFU)	Low	3,813 $\pm$ 218	ND	4,353 $\pm$ 131†‡	5,331 $\pm$ 327†‡§
	High	3,365 $\pm$ 493	ND	3,834 $\pm$ 320‡	4,413 $\pm$ 353‡
NR (%)	Low	2.37 $\pm$ 0.90	ND	14.68 $\pm$ 1.04†‡	32.55 $\pm$ 1.45†‡§
	High	1.90 $\pm$ 0.23	ND	11.95 $\pm$ 1.42‡	27.26 $\pm$ 1.15‡§
Band 3 oligomers	Low	1.00 $\pm$ 0.14	ND	4.35 $\pm$ 0.81†‡	4.48 $\pm$ 0.98‡
	High	1.26 $\pm$ 0.19	ND	2.96 $\pm$ 0.52‡	4.27 $\pm$ 1.12‡
Flotillin-2	Low	1.00 $\pm$ 0.18	ND	0.99 $\pm$ 0.14	0.66 $\pm$ 0.07†‡§
	High	1.00 $\pm$ 0.24	ND	0.98 $\pm$ 0.11	0.80 $\pm$ 0.06
ROS (RFU)	Low	233 $\pm$ 25	321 $\pm$ 12†‡	563 $\pm$ 16‡	284 $\pm$ 16§
	High	222 $\pm$ 23	288 $\pm$ 21‡	551 $\pm$ 32‡§	265 $\pm$ 40§
pFREE Hb (mg/mL)	Low	0.246 $\pm$ 0.029	ND	0.269 $\pm$ 0.028	0.897 $\pm$ 0.177‡§
	High	0.215 $\pm$ 0.046	ND	0.476 $\pm$ 0.363	1.090 $\pm$ 0.816
GSH ( $\mu\text{mol/L}$ )	Low	628 $\pm$ 16	ND	558 $\pm$ 73	434 $\pm$ 102‡
	High	712 $\pm$ 163	ND	520 $\pm$ 84	385 $\pm$ 72‡
p-Carbonylation (nmol/mg)	Low	0.108 $\pm$ 0.058	ND	0.173 $\pm$ 0.024	0.195 $\pm$ 0.066
	High	0.057 $\pm$ 0.052	ND	0.151 $\pm$ 0.042	0.132 $\pm$ 0.076
Band 3 proteolysis	Low	1.00 $\pm$ 0.22	ND	2.80 $\pm$ 0.18‡	4.18 $\pm$ 0.75‡§
	High	1.16 $\pm$ 0.46	ND	2.13 $\pm$ 0.14‡	3.49 $\pm$ 0.70‡§
Calpain	Low	1.00 $\pm$ 0.53	ND	2.12 $\pm$ 0.82‡	4.47 $\pm$ 2.12‡
	High	1.06 $\pm$ 0.41	ND	1.59 $\pm$ 0.47	3.24 $\pm$ 1.82‡
Prx2	Low	1.00 $\pm$ 0.20	ND	2.5 $\pm$ 1.3‡	15.7 $\pm$ 10.7‡§
	High	0.80 $\pm$ 0.30	ND	1.8 $\pm$ 0.9	10.8 $\pm$ 6.9‡§
pClusterin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Low	59,169 $\pm$ 44,401	ND	N/D	10,920 $\pm$ 9,915‡
	High	78,195 $\pm$ 10,536	ND	N/D	23,292 $\pm$ 15,760‡
Stomatin	Low	1.00 $\pm$ 0.37	ND	0.97 $\pm$ 0.27	0.91 $\pm$ 0.28
	High	1.15 $\pm$ 0.26	ND	1.00 $\pm$ 0.15	1.02 $\pm$ 0.18
GLUT1	Low	1.00 $\pm$ 0.34	ND	0.51 $\pm$ 0.35	0.61 $\pm$ 0.19
	High	0.69 $\pm$ 0.32	ND	0.51 $\pm$ 0.15	0.61 $\pm$ 0.17

\* Row data are presented as mean  $\pm$  SD except for RBC membrane densitometry results that are further normalized to the nonstored values of low-UA donors.

† p < 0.05 low- versus high-UA donors.

‡ p < 0.05 stored versus nonstored samples.

§ p < 0.05 versus the previous time point of storage.

|| Abnormal values.

ND = not determined; NR = nonreversible; NS = nonstored.

286 high- and low-UA units throughout the whole time of stor- 303  
 F5 287 age (graphically shown in the core of Fig. 5), the UA-specific 304  
 288 antioxidant capacity was also better in unit supernatants 305  
 289 prepared from high-UA donors compared to the low-UA 306  
 290 ones and was not affected by the storage until Day 21 (Fig. 307  
 291 5). In contrast, the UA-independent antioxidant capacity of 308  
 292 the supernatant exhibited a sharp decrease (by 30%-40%) 309  
 293 soon after the preparation of the RBC units compared to 310  
 294 that of the plasma in vivo in both groups. At the end of 311  
 295 the storage both activities were reduced to approximately 312  
 296 half the in vivo values (Fig. 5). An increase of the UA- 313  
 297 independent activity was noticed on Day 21 supernatants 314  
 298 (Table 2). Additional storage-associated factors, including 315  
 299 in-bag hemolysis (Table 2) and intracellular GSH (Fig. 5), 316  
 300 were also examined in both low- and high-UA units but 317  
 301 they were not statistically different from each other. How- 318  
 302 ever, a trend for better variation in redox and calcium 319

homeostasis markers was evident in high-UA units com- 303  
 pared to the low-UA ones (Fig. 5). Among them, lower 304  
 plasma protein carbonylation, Band 3 proteolysis, and 305  
 membrane binding of calpain (calcium stress marker) and 306  
 Prx-2 (oxidative stress marker), alongside with greater 307  
 plasma clusterin levels in the high-UA units than in the 308  
 low-UA units, were included. A significant increase in the 309  
 intracellular ROS levels was observed in low-UA units soon 310  
 after the beginning of the storage. Abnormal binding of cal- 311  
 pain and Prx-2 to the membrane of stored RBCs was 312  
 observed earlier during the storage in the low-UA RBC units 313  
 compared to the high-UA ones (Table 2). Finally, although 314  
 no significant change in the membrane expression of stom- 315  
 atin and GLUT1 was detected in stored cells, the low-UA 316  
 donors exhibited a trend for higher levels of GLUT1 in vivo. 317  
 The same was also observed for the plasma carbonylation 318  
 measurement (Fig. 5). 319



URIC ACID VARIATION AND RBC STORAGE LESION

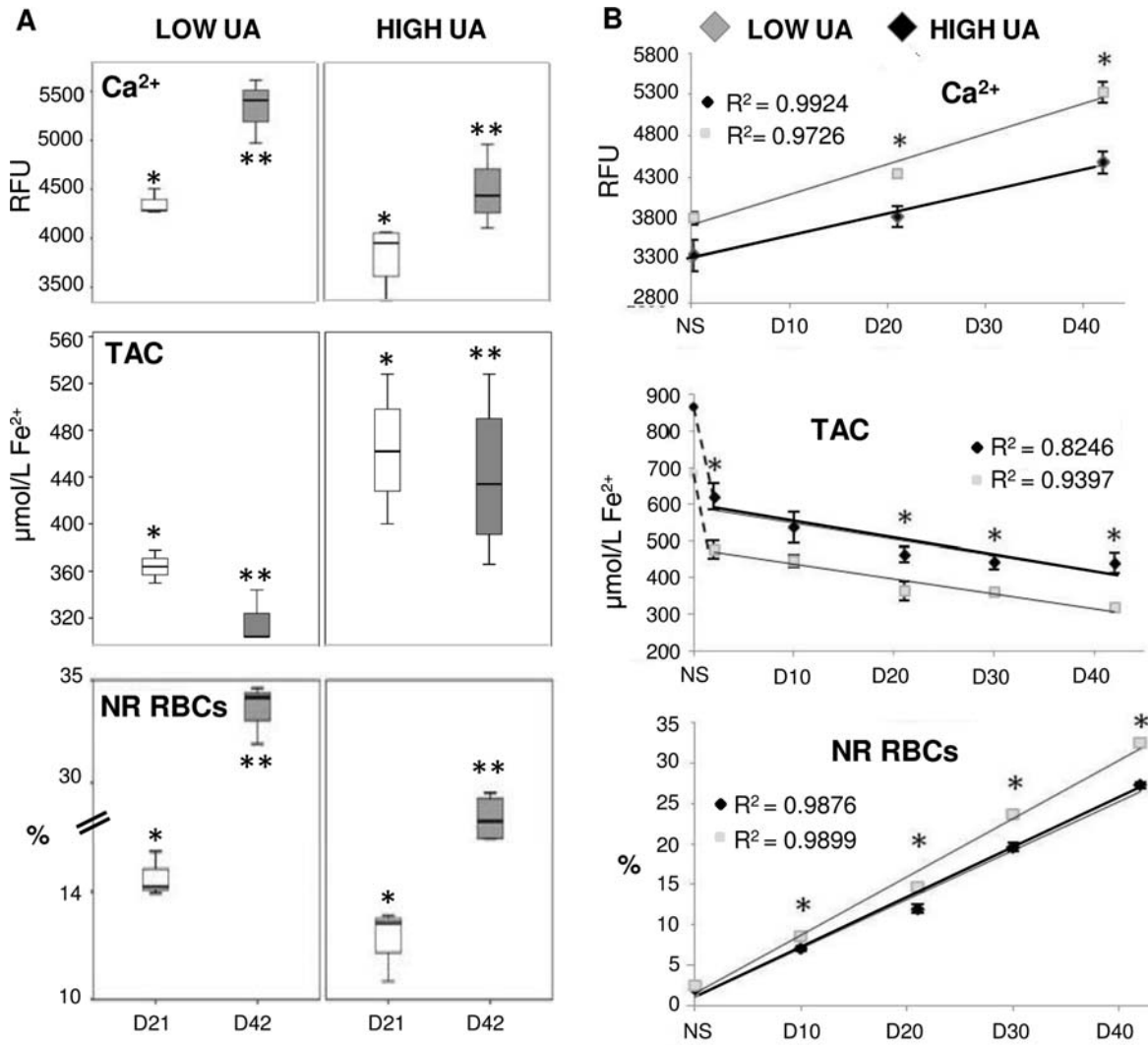


Fig. 3. In vivo UA levels as an evaluator of donor-specific RBCs storability (n = 8). (A) Representative boxplots showing the distribution of intracellular calcium (Ca<sup>2+</sup>), TAC, and nonreversible RBC shape modification (NR RBCs) levels in low- (4.73 ± 0.25 mg/dL) and high-UA (7.53 ± 0.51 mg/dL) donors at the middle (white boxplots) and the end (gray boxplots) of the storage period. \*Low vs. high donors on Day 21; \*\*low vs. high donors on Day 42; p < 0.010. (B) Time course variation of the same variables throughout the storage period compared to the nonstored (NS, in vivo) levels. The differences showed are significant (\*p < 0.05, low vs. high UA), linearly progressed (R<sup>2</sup> values) and predictable for any time point of storage based on any previous time point value, including the in vivo measurements. Discontinuous lines in the TAC scatter plot indicate the sharp gap in TAC between plasma in vivo and stored units' supernatants. Error bars = standard error of the mean.

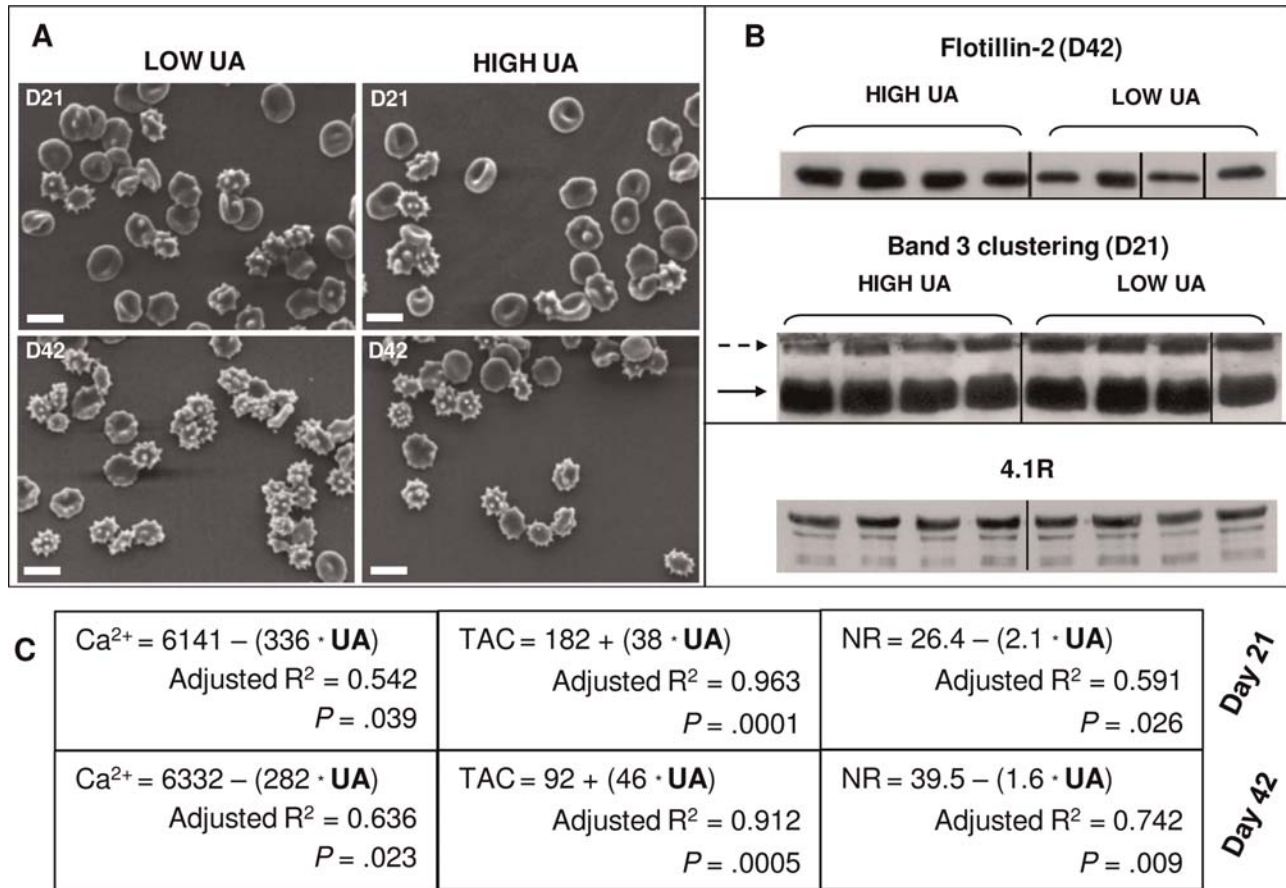
DISCUSSION

320  
 321 Regular blood donors, though meeting the established cri-  
 322 teria for blood donation, do not represent a hematology-  
 323 cally homogeneous population. More importantly, a part  
 324 of this variation in vivo seemed not to be functionally neu-  
 325 tral regarding RBC storability but rather associated in part  
 326 with the capability of RBCs to cope with the oxidative  
 327 stimuli imposed by the storage system. It is worth saying  
 328 at this point that the currently selected storage strategy  
 329 (leukoreduced CPD/SAGM units of RBCs) is superior com-

pared to similar alternatives (e.g., nonleukoreduced units 330  
 in CPDA) by exhibiting longer and better biopreservation 331  
 as well as milder oxidative lesions. 332

Donors' classification according to the prestorage 333  
 levels of serum UA 334

Cluster analysis with an input of 48 different hematologic 335  
 variables in vivo grouped the donors according to UA levels. 336  
 Iron and redox homeostasis indexes followed the UA-based 337  
 classification of both donors and profiles according to the 338



**Fig. 4.** (A) Representative scanning electron micrographs (Philips SEM515) of stored RBCs from donors exhibiting low or high UA levels in vivo, showing the prevalence of spherocytosis in the units of low-UA donors at both the middle and the end of the storage period (scale bars = 10 μm). (B) Representative immunoblot analysis showing the lower membrane expression of flotillin-2 as well as the higher proportion of Band 3 oligomerization in stored RBCs prepared from low-UA donors compared to the high-UA preparations. Band 3 and oligomer bands are indicated by solid and discontinuous arrows, respectively. (C) Regression analysis using in vivo UA levels as an independent variable produced several significant models (equations) to predict the levels of the Fig. 3 variables throughout the storage period.

339 cluster and factor analysis, respectively, suggesting that  
 340 normal-range UA variation in vivo may reveal intrinsic interdonor  
 341 variation in the basal redox status. The UA factor<sup>18</sup>  
 342 seemed to cross-talk with that of the iron indexes<sup>23</sup> through  
 343 plasma protein carbonylation and TIBC. As for the first one,  
 344 its negative correlation with UA might be associated with  
 345 the well-established antioxidant activity of urate in the  
 346 plasma.<sup>9</sup> Although a direct association of iron levels with  
 347 plasma carbonyls has not been previously reported, plasma  
 348 protein carbonylation has been found elevated in hemodialysis  
 349 patients treated with intravenous iron.<sup>24</sup> TIBC was also  
 350 found proportionate to the serum UA levels in line with the  
 351 previously reported correlation of iron homeostasis with  
 352 urate production.<sup>25</sup> It has been suggested that UA inhibits  
 353 the Fenton reaction and thus the ROS generation through its  
 354 ion chelator activity and formation of stable coordination  
 355 complexes with iron ions.<sup>26</sup>

**In vivo levels of UA and stored RBC susceptibility to storage lesion markers** 356 357

Our findings suggested that intrinsic interdonor variability 358  
 in serum UA levels is associated and might reveal the 359  
 RBCs susceptibility to certain storage lesion hallmarks. 360  
 Indeed, regression analysis of the data collected by inte- 361  
 grated analysis of the stored RBCs showed that 91% of the 362  
 supernatant TAC, 74% of the spherocytosis, and 363  
 64% of the intracellular calcium level variability observed 364  
 in the units examined might be associated with the inher- 365  
 ent variability in UA concentration. These variables repre- 366  
 sent key factors of the storage quality: supernatant TAC is 367  
 a holistic meter of the antioxidant status of the blood bag, 368  
 spherocytosis<sup>27,28</sup> undermines the posttransfusion 369  
 viability of the stored cells,<sup>29</sup> while intracellular calcium 370  
 can directly induce or indirectly promote a cascade of 371  
 events leading to cellular dehydration, echinocytosis, 372

URIC ACID VARIATION AND RBC STORAGE LESION

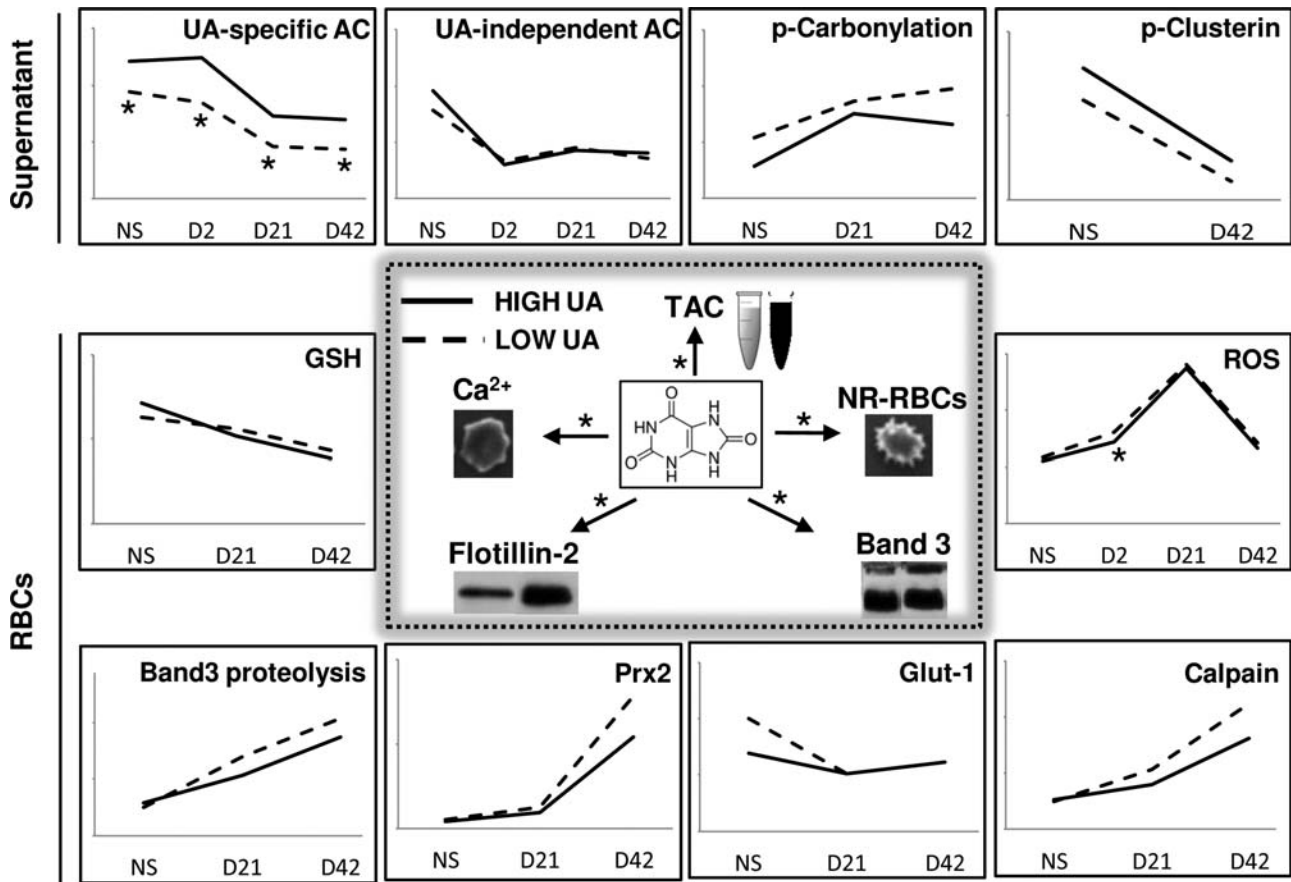


Fig. 5. Variation in measurable biologic metrics that are no components of the UA multivariate model (core panel). Plasma or supernatant (p) as well as RBC variables are shown in stored units versus nonstored (NS) samples. A trend for better variation in redox and calcium homeostasis markers is evident in high-UA units compared to the low-UA ones. (\* $p < 0.05$ , low vs. high UA).

373 protein degradation, recognition signaling, and eryptosis  
374 inside the blood bag.<sup>13,30,31</sup>

375 Donor UA present in the residual plasma of RBCs  
376 unit might reduce the ROS and reactive nitrogen species  
377 accumulation in situ leading to less oxidative hits to pro-  
378 tein and lipid targets in the soluble component and the  
379 RBC surface. According to cluster analysis, UA variation  
380 was negatively correlated with protein carbonylation and,  
381 notably, low-UA donors were characterized by abnormal  
382 mean levels of plasma protein carbonylation in vivo. At  
383 storage system, RBC units produced by high-UA donors  
384 exhibited better supernatant TAC compared to the low-UA  
385 ones throughout the storage period owing to the UA anti-  
386 oxidant effect and not to that of the coexisting plasma  
387 compounds (ascorbate, albumin,  $\alpha$ -tocopherol, carotenes,  
388 etc.). Those antioxidants seemed severely affected by the  
389 unit preparation steps exhibiting a sharp decline during  
390 the first days of storage compared to the plasma in vivo,  
391 unlike the UA-dependent activity. Better supernatant TAC  
392 may alleviate the oxidative attacks to the  $Ca^{2+}$ -permeable  
393 nonselective cation channels and  $Ca^{2+}$  transporter extrac-

394 ellularly, ensuring better ion transport regulation in stored  
395 RBCs.<sup>31</sup> In turn, better regulation of  $Ca^{2+}$  influx and efflux  
396 can minimize the activation of Gardos channel and, as a  
397 result, the calcium-dependent  $K^+$  loss, cell shrinkage,<sup>31</sup>  
398 membrane blebbing, and spherocytotic transformation of  
399 stored RBCs.<sup>7</sup> Our results, showing lower calcium  
400 accumulation, late appearance of the calcium-driven  
401 membrane binding of calpain and Prx2, better preserva-  
402 tion of the lipid raft-associated flotillin-2,<sup>32</sup> and lower  
403 level of spherocytotic transformation in the high-UA  
404 units, were in agreement with that hypothesis.

405 Further on, the UA might also act intracellularly. It  
406 has been reported that serum UA enters oxidatively  
407 stressed and cancer cells to prevent wide spreading of oxi-  
408 dative assaults.<sup>10</sup> Regarding RBCs, plasma UA can enter  
409 them either by passive membrane diffusion or through  
410 ATP-dependent transportation probably involving UA-  
411 specific protein carriers.<sup>33</sup> RBC membrane permeability to  
412 UA is increased under low-pH conditions<sup>33</sup> like those  
413 present in RBCs.<sup>34</sup> In line with that, an increased influx:efflux  
414 ratio of UA has been shown in stored RBCs in



415 proportion to the duration of storage.<sup>35</sup> In our study, the  
416 significant decrease in UA activity in Day 21 supernatants  
417 coincided with the sharp increase in intracellular ROS and  
418 the previously reported opposite decrease in pH,<sup>36</sup> condi-  
419 tions that jointly promote UA influx to RBCs.

420 As a result of the high iron and oxygen content, the  
421 generation of hydroxyls represents the primary mecha-  
422 nism of oxidative injury in RBCs.<sup>37</sup> Considering the pro-  
423 tective role of chelators against the products of Fenton  
424 and Haber-Weiss reactions carried out in RBCs, the most  
425 important role of UA in RBCs might be the formation of a  
426 coordination complex with Fe<sup>3+</sup> ions and thus the inhibi-  
427 tion of iron-catalyzed oxidations.<sup>38</sup> Not surprisingly, the  
428 peroxidation of plasma and RBC membrane lipids, the  
429 peroxide-induced hemolysis,<sup>8</sup> and the nitrite-induced oxi-  
430 dation of oxyhemoglobin<sup>39</sup> can be stopped or delayed by  
431 UA. Inside RBCs, UA could restrain Hb from oxidation  
432 and denaturation into methemoglobin and hemichromes  
433 as previously reported<sup>39</sup> and consequently the Band 3  
434 clustering on the membrane,<sup>32,40-42</sup> currently shown in  
435 high-UA donors. Interestingly, high-UA uremic plasma  
436 from renal disease patients can effectively mitigate the  
437 intracellular ROS accumulation in CPD/SAGM-stored  
438 RBCs in vitro (unpublished results), providing additional  
439 evidence for the antioxidant effect of UA influx into RBCs.

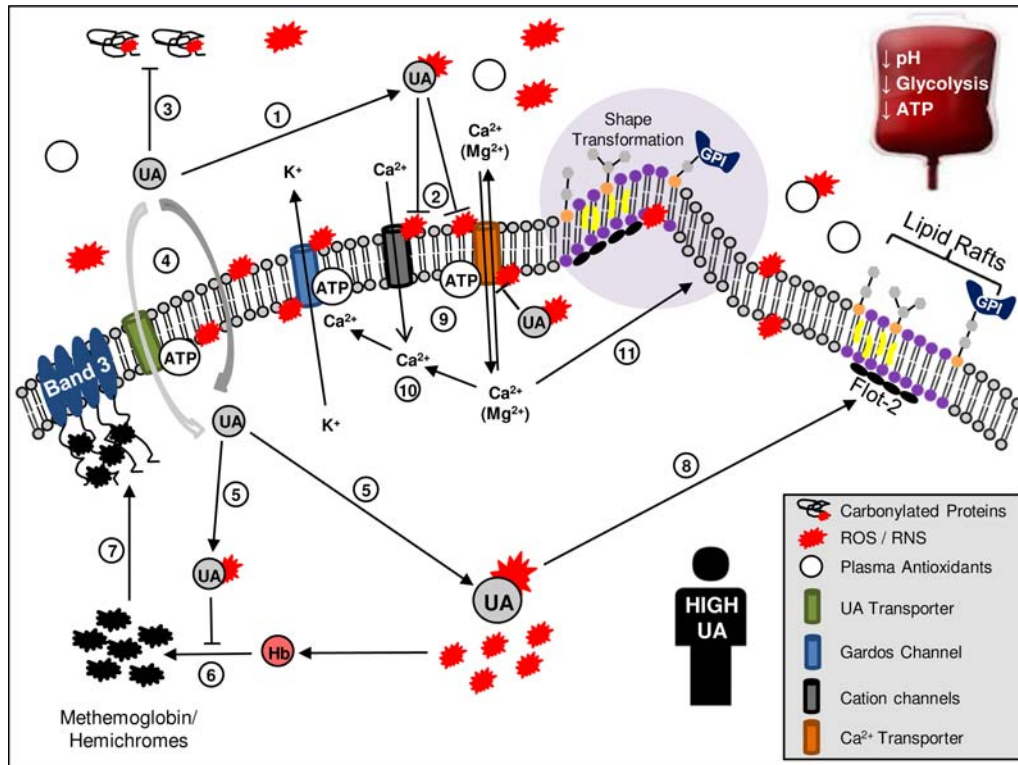
440 Urate radical and allantoin represent the ordinary  
441 products of UA oxidation. Urate radical can react with  
442 ascorbic acid (if present), regenerating urate and produc-  
443 ing the more innocuous ascorbate radical.<sup>8</sup> Membrane  
444 GLUT-1 transporter in collaboration with stomatin protein  
445 transports dehydroascorbate to RBCs where it is reduced  
446 to ascorbic acid.<sup>43</sup> In light of our data showing a trend for  
447 higher GLUT1 expression in low-UA donors in vivo, a  
448 redox homeostasis cross-talk between ascorbic acid and  
449 UA cannot be excluded. To support, it has been reported  
450 that oxidation of ascorbic acid to dehydroascorbic pro-  
451 ceeds much slower in high UA states, like uremia.<sup>44</sup> Cer-  
452 tainly this reaction might be bidirectional in that UA, as  
453 most antioxidants can also exert a prooxidant effect.  
454 Dehydroascorbic acid can be reduced by UA inside RBCs  
455 leading to generation of UA radical and ascorbate that can  
456 be subsequently released extracellularly. In our samples,  
457 the transient increase in the UA-independent (and prob-  
458 ably ascorbic acid-dependent) antioxidant capacity of the  
459 supernatant on Day 21 might be associated with that UA  
460 effect and its increased influx inside RBCs. Apparently, the  
461 steady state of those redox reactions and pathways operat-  
462 ing inside the closed system of stored RBC units needs  
463 further investigation; even more regarding UA that is not  
464 reactive against oxidants involved in RBC homeostasis,  
465 such as superoxide.

466 The currently presented data in association with the  
467 previously reported UA kinetics and functions discussed  
F6 468 were integrated into the model proposed in Fig. 6. Follow-  
469 ing the shown series of events, a part of the interdonor

470 variability in the RBCs susceptibility to certain storage  
471 lesions can be associated with donor-related variation in  
472 the UA molecules inherently present in the residual  
473 plasma of the RBCs units and its well-established antioxi-  
474 dant effects. In support of this, UA-related antioxidant  
475 capacity was constantly higher in supernatant of units  
476 produced from high-UA donors compared to the low-UA  
477 ones throughout the storage period. However, the donor-  
478 dependent implication of UA in the storage quality of  
479 RBCs might be indirect and not causal. UA variation  
480 within normal range might be indicative of the donor's  
481 basal antioxidant capacity that inherently characterizes  
482 the stored RBC units. By following this reasoning, low-UA  
483 donors' RBCs probably correspond with worse starting  
484 level of antioxidant competence and redox homeostasis  
485 on Day 0 of storage, due to the chronic contact with a UA-  
486 poor natural environment in vivo. To support this view,  
487 low-UA donors were not only characterized by lower  
488 plasma TAC compared to the high-UA ones, but also by  
489 pathologic levels of plasma protein carbonylation in vivo.  
490 A trend for worse levels of plasma clusterin, intracellular  
491 GSH, and Prx2 variation was also evident. In fact, patho-  
492 logic levels of the secreted chaperone clusterin were only  
493 measured in low-UA donors in vivo. Clusterin is a marker  
494 of oxidative stress and injury in many cells including  
495 RBCs.<sup>45</sup> It is involved in several physiologic processes  
496 including apoptosis, inflammation, cellular senescence,  
497 membrane vesiculation, and in vivo aging.<sup>46,47</sup> Notably, its  
498 plasma levels have been positively correlated with UA in  
499 healthy adults.<sup>48</sup>

500 In any case, namely, either through direct antioxidant  
501 function or as an indicator of the basal redox status and  
502 homeostasis, UA variation among donors seemed to be  
503 associated with the RBCs storage lesion profile. To our  
504 knowledge, the new hypothesis that has been introduced  
505 and tested by this study reported for the first time the pos-  
506 sibility of predicting storage lesion components based on  
507 a simple and accessible serum factor that can be meas-  
508 ured accurately before, at the time, or after blood dona-  
509 tion for producing RBCs transfusion units. Both statistical  
510 significance and power (=0.990) of the multivariate model  
511 currently reported indicate that the sample size used to  
512 test our hypothesis at storage level was sufficient to sup-  
513 port our results. Apparently, the typing of UA as a RBC  
514 storability biomarker needs further investigation in large-  
515 scale studies examining the storage lesion profile in  
516 groups of eligible blood donors associated by default with  
517 normal range UA variability, including women and ulcer  
518 patients. Based on our pre-storage and storage analysis  
519 we strongly suggest UA for evaluation in storage quality  
520 biomarkers identification studies. Finally, whether UA var-  
521 iation in vivo is also indicative of stored RBC performance  
522 after transfusion is a much harder—yet necessary—target  
523 to hit. Although recovery is expected to be better for a  
524 low-spheroechinocytosis unit compared to a higher one,

C  
O  
L  
O  
R



**Fig. 6.** Proposed model for a direct antioxidant effect of inherent donors' UA on supernatant and stored RBCs during the storage period. As an effective electron donor and ROS scavenger,<sup>9</sup> UA exhibits antioxidant activity extracellularly by lowering the oxidative attacks to RBC membrane channels and transporters (1). This effect on Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channels and Ca<sup>2+</sup> transporter ensures better ion transport regulation in stored RBCs<sup>31</sup> (2). Moreover, UA-based ROS scavenging can partly inhibit supernatant protein carbonylation (3). UA might enter RBC through UA-specific transporters or by membrane diffusion<sup>33</sup> (4). The progressive lowering of the pH of the supernatant during the preservation period causes an increase in the influx rate of UA in RBCs that is proportional to the storage time itself<sup>35</sup> (4). Inside RBCs, UA similarly alleviates the oxidative burden in situ<sup>10</sup> (5), thus restraining Hb from oxidation or denaturation into methemoglobin and hemichromes<sup>39</sup> (6) and consequently the Band 3 clustering on the membrane (7). Another benefit might be the better preservation of the lipid rafts (showing by the high flotillin-2 levels; 8) as well as of the membrane channels activity (the selective cation channels and the Ca<sup>2+</sup>-transporter are indicated in the graph), ensuring better calcium influx and efflux rate and thus low levels of calcium accumulation in RBCs (9). Low Ca<sup>2+</sup> activity intracellularly minimizes the activation of Gardos channel (10) and as a result, the calcium-dependent K<sup>+</sup> loss, cell shrinkage,<sup>31</sup> membrane blebbing, and spherocytosis of stored RBCs<sup>7</sup> (11).

525 posttransfusion studies will lead to the identification of  
 526 RBC biomarkers or assays to safely predict RBC recovery  
 527 and function inside the recipient.

528 **Concluding remarks**

529 Storage time is only a relative quality criterion for the  
 530 evaluation of the RBC storage lesion since donor-related  
 531 factors are probably more effective in determining its  
 532 profile. RBC storage lesion depends on the ability of  
 533 stored units to cope with a range of oxidative stimuli  
 534 and defects. Intrinsic variability in UA levels in vivo  
 535 seems to be associated with RBCs storage lesion hall-  
 536 marks like the degree of spherocytosis. Although  
 537 it is currently not known whether this association arises

by direct antioxidant function of UA inside the RBCs 538  
 unit or by its capability to reveal the redox homeostasis 539  
 of the individual donor, normal-range variation in UA 540  
 might be used to evaluate the susceptibility of blood 541  
 labile product to storage lesions. The ability to evaluate 542  
 storage lesion profiles by using easily accessible donor 543  
 factors is probably the first step for the effective man- 544  
 agement of the donated blood (storage strategies, addi- 545  
 tive solutions, leukoreduction, appropriate storage 546  
 period, etc.) by the blood bank services. Although we 547  
 cannot claim the discovery of a storability biomarker, 548  
 we strongly recommend UA for consideration and eval- 549  
 uation in future large-scale studies on donor variation 550  
 effects, on storage quality biomarkers, and on individu- 551  
 alized therapies applicable in transfusion medicine. 552

553 **ACKNOWLEDGMENTS**

554 The authors thank all blood donors who have participated in this  
 555 study, for their prompt volunteer response and exceptional col-  
 556 laboration; pregraduate students E. Tsolou and M. Tsoumpeli  
 557 (Department of Medical Laboratories, Faculty of Health and Car-  
 558 ing Professions, Technological and Educational Institute of Ath-  
 559 ens, Athens, Greece) and A. Fegga (Department of Cell Biology  
 560 and Biophysics, Faculty of Biology, NKUA), for their assistance in  
 561 blood collection and their help in the performance of a part of the  
 562 prestorage experiments; Dr Athanassios D. Velentzas for his assis-  
 563 tance in scanning electron microscopy observation; Assistant  
 564 Prof. I.P. Trougakos (Department of Cell Biology and Biophysics,  
 565 Faculty of Biology, NKUA) for the disposal of fluorometer device;  
 566 and finally Prof. R. Prohaska (Institute of Medical Biochemistry,  
 567 University of Vienna, Vienna, Austria) and Prof. J. Delaunay (Lab-  
 568 oratoire d'Hématologie, d'Immunologie et de Cytogénétique,  
 569 Hopital de Bicetre, Le Kremlin-Bicetre, France) for providing anti-  
 570 bodies against stomatin and protein 4.1R, respectively.

571 **CONFLICT OF INTEREST**

572 The authors have disclosed no conflicts of interest.

573 **REFERENCES**

- 574 1. Zimring JC. Established and theoretical factors to consider  
 575 in assessing the red cell storage lesion. *Blood* 2015;125:2185–  
 576 90.
- 577 2. D'Alessandro A, Kriebardis AG, Rinalducci S, et al. An update  
 578 on red blood cell storage lesions, as gleaned through  
 579 biochemistry and omics technologies. *Transfusion* 2015;55:  
 580 205–19.
- 581 3. D'Alessandro A, Liunbruno G, Grazzini G, et al. Red blood  
 582 cell storage: the story so far. *Blood Transfus* 2010;8:82–8.
- 583 4. Antonelou MH, Kriebardis AG, Papassideri IS. Aging and  
 584 death signalling in mature red cells: from basic science to  
 585 transfusion practice. *Blood Transfus* 2010;8 Suppl 3:s39–47.
- 586 5. Flatt JF, Bawazir WM, Bruce LJ. The involvement of cation  
 587 leaks in the storage lesion of red blood cells. *Front Physiol*  
 588 2014;5:214.
- 589 6. Kaniyas T, Acker JP. Biopreservation of red blood cells—the  
 590 struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J* 2010;277:343–56.
- 591 7. Kiefer CR, Snyder LM. Oxidation and erythrocyte  
 592 senescence. *Curr Opin Hematol* 2000;7:113–6.
- 593 8. Becker BF. Towards the physiological function of uric acid.  
 594 *Free Radic Biol Med* 1993;14:615–31.
- 595 9. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, et al. Uric acid provides an  
 596 antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-  
 597 caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U*  
 598 *S A* 1981;78:6858–62.
- 599 10. Itahana Y, Han R, Barbier S, et al. The uric acid transporter  
 600 SLC2A9 is a direct target gene of the tumor suppressor p53  
 601 contributing to antioxidant defense. *Oncogene* 2014;34:  
 602 1799–810.
11. Hess JR, Sparrow RL, van der Meer PF, et al. Red blood cell  
 hemolysis during blood bank storage: using national quality  
 management data to answer basic scientific questions. *Transfusion* 2009;49:2599–603.
12. Hess JR. Scientific problems in the regulation of red blood  
 cell products. *Transfusion* 2012;52:1827–35.
13. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, et al. Effects of  
 pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signal-  
 ing: a time-course evaluation from shape to proteome. *J Proteomics* 2012;76 Spec No.:220–38.
14. Bosman GJ, Stappers M, Novotny VM. Changes in band 3  
 structure as determinants of erythrocyte integrity during  
 storage and survival after transfusion. *Blood Transfus* 2010;8  
 Suppl 3:s48–52.
15. Rinalducci S, D'Amici GM, Blasi B, et al. Peroxiredoxin-2 as a  
 candidate biomarker to test oxidative stress levels of stored  
 red blood cells under blood bank conditions. *Transfusion*  
 2011;51:1439–49.
16. Harboe M. A method for determination of hemoglobin in  
 plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. *Scand J Clin*  
*Lab Invest* 1959;11:66–70.
17. Zwart A, van Assendelft OW, Bull BS, et al.  
 Recommendations for reference method for  
 haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995)  
 and specifications for international haemoglobinocyanide  
 standard (4th edition). *J Clin Pathol* 1996;49:271.
18. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma  
 (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay.  
*Anal Biochem* 1996;239:70–6.
19. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, et al. Simple and  
 rapid method for the determination of uric acid-  
 independent antioxidant capacity. *Molecules* 2011;16:7058–  
 68.
20. Antonelou MH, Georgatzakou HT, Tzounakas VL, et al.  
 Blood modifications associated with end stage renal disease  
 duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year  
 follow-up pilot study. *J Proteomics* 2014;101:88–101.
21. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of  
 nanogram amounts of total and oxidized glutathione:  
 applications to mammalian blood and other tissues. *Anal*  
*Biochem* 1969;27:502–22.
22. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and  
 platelets from whole blood. *J Lab Clin Med* 1976;88:328–33.
23. Cook JD, Skikne BS, Lynch SR, et al. Estimates of iron  
 sufficiency in the US population. *Blood* 1986;68:726–31.
24. Michelis R, Gery R, Sela S, et al. Carbonyl stress induced by  
 intravenous iron during haemodialysis. *Nephrol Dial*  
*Transplant* 2003;18:924–30.
25. Ghio AJ, Ford ES, Kennedy TP, et al. The association between  
 serum ferritin and uric acid in humans. *Free Radic Res* 2005;  
 39:337–42.
26. Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, et al. Uric  
 acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des* 2005;11:4145–51.
27. Blasi B, D'Alessandro A, Ramundo N, et al. Red blood cell  
 storage and cell morphology. *Transfus Med* 2012;22:90–6.

## URIC ACID VARIATION AND RBC STORAGE LESION

- 658 28. D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, et al. Time-course  
659 investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red blood  
660 cell concentrates: from metabolism to proteomics. *Haematologica* 2012;97:107–15.  
661
- 662 29. Greenwalt TJ, Zehner Sostok C, Dumaswala UJ. Studies in  
663 red blood cell preservation. 1. Effect of the other formed  
664 elements. *Vox Sang* 1990;58:85–9.
- 665 30. Palek J, Stewart G, Lionetti FJ. The dependence of shape of  
666 human erythrocyte ghosts on calcium, magnesium, and  
667 adenosine triphosphate. *Blood* 1974;44:583–97.
- 668 31. Bogdanova A, Makhro A, Wang J, et al. Calcium in red blood  
669 cells—a perilous balance. *Int J Mol Sci* 2013;14:9848–72.
- 670 32. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, et al. Storage-  
671 dependent remodeling of the red blood cell membrane is  
672 associated with increased immunoglobulin G binding, lipid  
673 raft rearrangement, and caspase activation. *Transfusion*  
674 2007;47:1212–20.
- 675 33. Lucas-Heron B, Fontenaille C. Urate transport in human red  
676 blood cells. Activation by ATP. *Biochim Biophys Acta* 1979;  
677 553:284–94.
- 678 34. Pallotta V, Gevi F, D'Alessandro A, et al. Storing red blood  
679 cells with vitamin C and N-acetylcysteine prevents oxidative  
680 stress-related lesions: a metabolomics overview. *Blood*  
681 *Transfus* 2014;12:376–87.
- 682 35. Buzdygon KJ, Zydny AL. Effect of storage time on red blood  
683 cell membrane permeability to creatinine and uric acid.  
684 *ASAIO Trans* 1989;35:693–6.
- 685 36. Hess JR, Greenwalt TG. Storage of red blood cells: new  
686 approaches. *Transfus Med Rev* 2002;16:283–95.
- 687 37. Jozwik M, Szczypka M, Gajewska J, et al. Antioxidant defence  
688 of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clin*  
689 *Chim Acta* 1997;267:129–42.
- 690 38. Miura T, Muraoka S, Ogiso T. Inhibitory effect of urate on  
691 oxidative damage induced by adriamycin-Fe<sup>3+</sup> in the pres-  
692 ence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993;  
693 79:75–85.
39. Smith RC, Gore JZ, Doyle MP. Degradation of uric acid  
694 during autocatalytic oxidation of oxyhemoglobin induced by  
695 sodium nitrite. *Free Radic Biol Med* 1991;11:373–7.  
696
40. Low PS, Waugh SM, Zinke K, et al. The role of hemoglobin  
697 denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging.  
698 *Science* 1985;227:531–3.  
699
41. Bosman GJ, Lasonder E, Luten M, et al. The proteome of red  
700 cell membranes and vesicles during storage in blood bank  
701 conditions. *Transfusion* 2008;48:827–35.  
702
42. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, et al.  
703 Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and  
704 accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells.  
705 *J Cell Mol Med* 2007;11:148–55.  
706
43. Montel-Hagen A, Kinet S, Manel N, et al. Erythrocyte Glut1  
707 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to  
708 synthesize vitamin C. *Cell* 2008;132:1039–48.  
709
44. Bakaev VV, Efremov AV, Tityaev II. Low levels of  
710 dehydroascorbic acid in uraemic serum and the  
711 partial correction of dehydroascorbic acid deficiency  
712 by haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:  
713 1472–4.  
714
45. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, et al.  
715 Apolipoprotein J/Clusterin is a novel structural component  
716 of human erythrocytes and a biomarker of cellular stress  
717 and senescence. *PLoS One* 2011;6:e26032.  
718
46. Trougakos IP, Gonos ES. Chapter 9: Oxidative stress in  
719 malignant progression: the role of Clusterin, a sensitive  
720 cellular biosensor of free radicals. *Adv Cancer Res* 2009;104:  
721 171–210.  
722
47. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, et al.  
723 Apolipoprotein J/clusterin in human erythrocytes is involved  
724 in the molecular process of defected material disposal  
725 during vesiculation. *PLoS One* 2011;6:e26033.  
726
48. Won JC, Park CY, Oh SW, et al. Plasma clusterin (ApoJ) levels  
727 are associated with adiposity and systemic inflammation.  
728 *PLoS One* 2014;9:e103351. ■  
729





**Donor variation effect on red blood cell storage lesion: a multi-parameter, however, consistent story**

Journal:	<i>Vox Sanguinis</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Tzounakas, Vassilis; National and Kapodistrian University of Athens, NKUA, Faculty of Biology, Dept. of Cell Biology and Biophysics Georgatzakou, Hara; National and Kapodistrian University of Athens, NKUA, Faculty of Biology, Dept. of Cell Biology and Biophysics; Kriebardis, Anastasios; Technological and Educational Institute of Athens, Medical Laboratories Voulgaridou, Artemis; "Apostle Paul" Educational Institution, "Apostle Paul" Educational Institution Stamoulis, Konstantinos; Hellenic National Blood Center, Regional Blood Transfusion Center, "Agios Panteleimon" General Hospital of Nikea, Piraeus Foudoulaki-Paparizos, Leontini; "Agios Panteleimon" General Hospital of Nikea, Regional Blood Transfusion Center Antonelou, Marianna; National & Kapodistrian University of Athens (NKUA), Faculty of Biology, Dept. of Cell Biology & Biophysics Papassideri, Issidora; National & Kapodistrian University of Athens (NKUA), Faculty of Biology, Dept. of Cell Biology & Biophysics
Keywords:	Blood components, Donors, Red cell components, Transfusion medicine (in general)

**Donor variation effect on red blood cell storage lesion: a multi-parameter, however,  
consistent story†**

*†To the memory of beloved friend and partner Leontini Foudoulaki-Paparizos, MD pathologist, Director of the  
“Agios Panteleimon” General Hospital of Nikea Blood Transfusion Center, dedicated doctor with great  
contribution to the establishment of the voluntary blood donation in Greece.*

**V. L. Tzounakas,<sup>1</sup> H. T. Georgatzakou,<sup>1</sup> A. G. Kriebardis,<sup>2</sup> A. I. Voulgaridou,<sup>3</sup> K. E. Stamoulis,<sup>4,5</sup> L.  
E. Foudoulaki-Paparizos,<sup>5</sup>† M. H. Antonelou<sup>1\*</sup> & I. S. Papassideri<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, NKUA, Athens, Greece*

<sup>2</sup>*Laboratory of Haematology and Transfusion Medicine, Department of Medical Laboratories, Faculty of  
Health and Caring Professions, Technological and Educational Institute of Athens, Greece*

<sup>3</sup>*“Apostle Paul” Educational Institution, Thessaloniki, Greece*

<sup>4</sup>*Hellenic National Blood Center, Acharnes, Athens, Greece*

<sup>5</sup>*Regional Blood Transfusion Center, “Agios Panteleimon” General Hospital of Nikea, Piraeus, Greece*

(†) *Deceased author*

**RUNNING HEAD: Donor variation effect on RBC storability**

\*Correspondence should be addressed to:

***Marianna H. Antonelou***

*Dept. of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens (NKUA)*

*Panepistimiopolis, Athens 15784, Greece*

*Phone: (+30) 210 727 4873*

*Fax: (+30) 210 727 4742*

*E-mail: [manton@biol.uoa.gr](mailto:manton@biol.uoa.gr)*



## Abstract

**Background and Objectives** Baseline haematological characteristics concerning or influencing red blood cell (RBC) properties might affect storage lesion development in individual donors. This study was conducted to evaluate the variation in haematological characteristics among blood donors and its probable relationship with storage lesion.

**Materials and Methods** The haematological profile of  $n=137$  eligible blood donors was evaluated *in vivo*. A paired-study of  $n=10$  fresh blood versus RBC concentrates was also conducted. Haemolysis, microvesiculation, phosphatidylserine exposure, fragility and other variables were tested and analyzed by statistical and network analysis tools.

**Results** Aberrant levels of haemolysis, antioxidant capacity, iron and other variables were observed in 20-40% of the donors. Factors like plasma nitric oxide and membrane peroxiredoxin-2 exhibited high interdonor variability that further increased during storage. RBC indexes, osmotic fragility, phosphatidylserine exposure and supernatant nitric oxide fluctuated throughout the storage in proportion to their values *in vivo*. Donor levels of phosphatidylserine exposure and HbF correlated with stored cells MCHC, oxidative stress markers and cellular fragility, respectively.

**Conclusion** Although numerous storage measures exhibit wide interdonor variation, fluctuate in proportion to their own or other parameters' levels *in vivo*. Construction of “*in vivo* versus storage” biological networks might provide deeper insight into the donor variation effect on RBC storage lesion.

**Key words:** donor variation, storage lesion, haematological profile, network analysis.