



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Η αποθηκευτική βλάβη του ερυθροκυττάρου σε τράπεζες
αίματος ως συνάρτηση εγγενών χαρακτηριστικών του αιμοδότη»**

REDISΑ ΖΕQO

AM:225308

ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ



ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: *Μαριάννα Χ. Αντωνέλου*

**Επίκουρη Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας,
ΕΚΠΑ**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Βιολογίας και Κντάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας κα. Μαριάννας Χ. Αντωνέλου την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά για την επιστημονική καθοδήγηση και την καθοριστική της συμβολή στη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης. Ήταν μεγάλη μου τιμή και χαρά να είμαι στην ομάδα της για αυτόν τον χρόνο.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην διευθύντρια του Μεταπτυχιακού και του Τομέα που μου έδωσε την δυνατότητα να παρακολουθήσω το Μ.Δ.Ε «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» και για τις πολύτιμες συμβουλές της στα πλαίσια της διπλωματικής μου εργασίας. Συνεχίζοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη για την φιλοξενία στο εργαστήριό του στις εγκαταστάσεις του ΤΕΙ Αθήνας και για τις σημαντικές υποδείξεις και την πολύτιμη βοήθειά του στην πραγματοποίηση των πειραμάτων που έγιναν εκεί. Ξεχωριστές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην υποψήφια διδάκτορα Χαρά Γεωργατζάκου και ιδιαίτερα στον διδάκτορα Βασίλη Τζούνακα για την αμέριστη συμπαράσταση, τις κριτικές επισημάνσεις και συμβουλές του, καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην αναφέρω τους προπτυχιακούς φοιτητές Δημήτρη Καραδήμα και Αλκμήνη Αναστασιάδη για την επίσης άψογη συνεργασία η οποία συνάμα αποτέλεσε και μια ευχάριστη εμπειρία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
<u>A.1 ΤΟ ΑΙΜΑ.....</u>	6
A.1.1 Εμμορφα συστατικά.....	6
A.1.2 Το πλάσμα.....	7
A.1.2.1 Ασκορβικό οξύ.....	8
A.1.2.2 Γλουταθειόνη (GSH).....	8
A.1.2.3 Ουρικό οξύ.....	9
A.1.2.4 α-Τοκοφερόλη.....	9
A.1.2.5 Αλβουμίνη	9
A.1.2.6 Χολερυθρίνη.....	10
<u>A.2 ΤΟ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΟ (RBC).....</u>	10
A.2.1. Ερυθροποίηση.....	10
A.2.2. Αιμοσφαιρίνη (Hb).....	11
A.2.3. Ερυθροκυτταρική Μembrάνη.....	12
A.2.3.1. Λιπίδια της Μembrάνης.....	13
A.2.3.2. Λιπιδικές σχεδίες.....	14
A.2.3.2.I Σύσταση λιπιδικών σχεδίων.....	15
A.2.3.3. Πρωτεΐνες Ερυθροκυτταρικής Μembrάνης.....	16
A.2.3.3.I. Ζώνη 3 ή ανιοντοανταλλάκτης (AE1).....	17
A.2.3.3.II. Γλυκοφορίνες	18
A.2.3.3.III. Σύστημα Rhesus.....	19
A.2.3.3.IV. Υδατοπορίνη (AQP1).....	20
A.2.3.3.V. Μεταφορέας γλυκόζης (Glut1).....	20
A.2.3.3.VI. Στοματίνη (Ζώνη 7).....	21
A.2.3.4. Υπομεμβρανικός σκελετός.....	21
A.2.3.4.I. Σπεκτρίνη	22
A.2.3.4.II. Αγκυρίνη.....	23
A.2.3.4.III. Ακτίνη (Ζώνη 5).....	23
A.2.3.4.IV. Πρωτεΐνη 4.1.....	24
A.2.3.4.V. Πρωτεΐνη 4.2 (Παλλιδίνη).....	24

A.2.3.4.VI. Αδουσίνη	24
A.2.3.4.VI. Τροπομοντουλίνη, Τροπομουσίνη.....	24
A.2.3.4.VIII. Πρωτεΐνη p55.....	25
A.2.3.4.IX. Δεματίνη (Ζώνη 4.9).....	25
A.2.3.5 Κυτοσολικές πρωτεΐνες.....	25
A.2.3.5.I. Καλπαΐνες.....	25
A.2.3.5.II. Υπεροξειδοξίνες.....	25
A.2.3.5.III. Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ (Hsp).....	26
A.2.3.5.IV. Καθεγίνες.....	26
A.2.3.5.VI. Κλαστερίνες	26
<u>A.3. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΟΥ.....</u>	27
A.3.1. Γενικά.....	27
A.3.2. Οξειδωτικό Στρες στα Ερυθροκύτταρα.....	28
A.3.3. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του ερυθροκυττάρου.....	29
A.3.3.1. Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί.....	29
A.3.3.2. Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	30
<u>A.4. ΓΗΡΑΝΣΗ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΟΥ- In Vivo Σηματοδοτικά Μονοπάτια και Δείκτες των RBCs.....</u>	30
A.4.1. Μικροκυστιδιοποίηση.....	31
A.4.2. Το Βασιζόμενο στην Ζώνη-3 Μονοπάτι Γήρανσης.....	31
A.4.3. Ομοίωση Ασβεστίου.....	32
A.4.4. Σηματοδότηση μέσω κασπασών και Εξωτερικήυση PS	33
A.4.5. Επιπλέον Μηχανισμοί Ερυθροκυτταρικής Γήρανσης In Vivo.....	33
A.4.6. Ο Ρόλος του Οξειδωτικού Στρες.....	34
<u>A.5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ.....</u>	34
A.5.1. Απόπτωση στα ερυθροκύτταρα (Ερυθρόπτωση).....	34
A.5.2. Απόπτωση μέσω Υποδοχέων	36
<u>A.6. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ.....</u>	36
A.6.1. Γενικά.....	36
A.6.2. Διαλύματα Συντήρησης.....	37
A.6.3. Αποθηκευτική Βλάβη Ερυθροκυττάρων.....	37
A.6.4. Σηματοδοτικά μονοπάτια και Δείκτες Γήρανσης RBCs σε Συνθήκες Αποθήκευσης	40

A.6.4.1. Το Βασιζόμενο στη Ζώνη 3 Μονοπάτι γήρανσης και η Κυστιδιοποίηση ex vivo.....	40
A.6.4.2. Επίδραση Ca ⁺² και Μονοπάτι Απόπτωσης ex vivo	41
A.6.4.3. Φαγοκυττάρωση Σχετιζόμενη με το CD47 σε αποθηκευμένα RBCs.....	41
A.6.4.4. Οξειδωτικό Μονοπάτι αποθηκευμένων RBCs.....	41
A.6.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την Ποιότητα των Αποθηκευμένων RBCs.....	43
A.6.5.1. Λευκαφαίρεση.....	43
A. 6.5.2. Επίδραση Εγγενών Χαρακτηριστικών του Δότη.....	44
A.6.5.2.I. Γενικά.....	44
A.6.5.2.II. Γενετικοί παράγοντες	45
A.6.5.2. III. Μη γενετικοί παράγοντες.....	46
A.6.5.3. Επίδραση Εμμηνόπαυσης.....	47
A.6.5.3.I. Ορμονικές αλλαγές κατά την εμμηνόπαυση.....	47
A.6.5.3.I. Αντιοξειδωτική δράση οιστρογόνων.....	48
A.6.5.3.II. Συγκριτικές Μελέτες	48
ΣΚΟΠΟΣ.....	49
<u>B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</u>	50
<u>B.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΙΜΟΔΟΤΩΝ / ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....</u>	50
<u>B.2. ΟΡΓΑΝΑ- ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....</u>	50
<u>B.3. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....</u>	50
<u>B.4. ΜΕΘΟΔΟΙ.....</u>	51
B.4.1. Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη.....	51
B.4.2. Μέτρηση Οσμωτικής Ευθραυστότητας.....	51
B.4.3. Μέτρηση Μηχανικής Ευθραυστότητας.....	52
B.4.4. Μέτρηση επιπέδων ενδοκυττάρων ROS.....	53
B.4.5. Μέτρηση επιπέδων ενδοκυττάρου Ca ⁺²	54
B.4.6. Αντιοξειδωτική Ικανότητα Πλάσματος.....	54
B.4.7. Ανίχνευση Φωσφατιδυλοσερίνης (PS).....	55
B.4.8. Παρατήρηση RBCs σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM).....	56
<u>Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</u>	57
Γ.1. Αιματολογική εικόνα πριν και κατά την αποθήκευση.....	57
Γ.2. Μορφολογικές τροποποιήσεις.....	59

Γ.3. Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης (PS).....	60
Γ.4. Επίπεδα Ca^{+2}	61
Γ.5. Επίπεδα Ενεργών Ριζών Οξυγόνου (ROS).....	62
Γ.6. Βιολογικές Μετρήσεις Ερυθροκυττάρων και Πλάσματος.....	62
Γ.6.1. Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη Πλάσματος.....	62
Γ.6.2. Οσμωτική Ευθραυστότητα.....	63
Γ.6.3. Μηχανική Ευθραυστότητα.....	64
Γ.6.4. Αντιοξειδωτική Ικανότητα Πλάσματος	65
<u>Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	67
Αιματολογικό Πρότυπο.....	67
Μορφολογική Εικόνα.....	67
Μορφολογικές τροποποιήσεις.....	67
Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης (PS).....	68
Αιμολυτική εικόνα.....	68
Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη	68
Οσμωτική Ευθραυστότητα.....	69
Μηχανική Ευθραυστότητα.....	69
Εικόνα Οξειδωτικής/Αντιοξειδωτικής κατάστασης RBCs και Πλάσματος.....	70
Επίπεδα Ενεργών Ριζών Οξυγόνου (ROS)	70
Επίπεδα Ενδοκυττάρου Ca^{+2}	70
Αντιοξειδωτική Ικανότητα Πλάσματος.....	71
<u>Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	71
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	73
ABSTRACT	75
<u>Ζ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	77

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

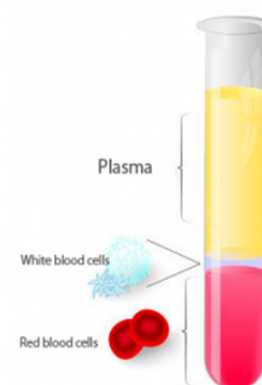
A.1. ΤΟ ΑΙΜΑ

Το αίμα αποτελεί ειδική κατηγορία ερειστικού ιστού που απαρτίζεται από το πλάσμα (ρευστή μεσοκυττάρια ουσία) και κυτταρικά στοιχεία (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια), και αποτελεί το 8% του συνολικού βάρους ενός ενήλικα. Αποτελεί ένα δυναμικό και θεμελιώδες υγρό που διακατέχει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην εξασφάλιση της φυσιολογίας όλου του σώματος και στην διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Ως εκ τούτου, δυσμενείς μεταβολές του αίματος έχουν ως αποτέλεσμα πολλές επιπτώσεις, αρκετές από τις οποίες είναι σοβαρές και απειλητικές για την ίδια τη ζωή (Blann and Ahmed, 2014).

Τα έμμορφα συστατικά του αίματος αποτελούν περίπου το 45% του ολικού αίματος ενώ το υπόλοιπο 55% αποτελείται από το πλάσμα. Το φυσιολογικό pH του ανθρώπινου αρτηριακού αίματος είναι περίπου 7.4 (Kellum, 2000). Αυτό εξυπηρετεί την ομαλή διεκπεραίωση των μεταβολικών και χημικών δραστηριοτήτων του σώματος και ρυθμίζεται από τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές που είναι το διοξείδιο του άνθρακα (pCO_2), οι σχετικές συγκεντρώσεις ηλεκτρολυτών (SID) και οι συνολικές συγκεντρώσεις ασθενών οξέων (A_{TOT}) (Stewart, 1981; Stewart, 1983). Το αίμα είναι ιξώδες υγρό (πενταπλάσιο ιξώδες από αυτό του νερού) και η θερμοκρασία του είναι ελαφρώς πιο αυξημένη ($38^\circ C$) σε σύγκριση με αυτή του σώματος ($37^\circ C$) εξαιτίας της θερμότητας που παράγεται από την τριβή και αντίσταση στα οποία υποβάλλεται το αίμα όταν διαπερνά τα αιμοφόρα αγγεία.

Το αίμα επιτελεί σημαντικές λειτουργίες. Αυτές είναι:

- **Μεταφορικές:** ανταλλαγή αερίων (αιμοσφαιρίνη), η μεταφορά ουσιών όπως θρεπτικών συστατικών, ορμονών και βιταμινών στους ιστούς, η απομάκρυνση των μεταβολικών αποβλήτων των κυττάρων.
- **Ρυθμιστικές:** ρύθμιση του pH του αίματος, της θερμοκρασίας του σώματος, της οσμωτικής πίεσης καθώς και της περιεκτικότητας των κυττάρων σε νερό μέσω διαλυμένων ιόντων και πρωτεϊνών.
- **Προστατευτικές:** πήξη του αίματος (αιμοπετάλια) που αποτελεί μηχανισμό προστασίας από απώλεια αίματος, άμυνα του οργανισμού (λευκά αιμοσφαίρια) .



Εικ. 1. 3 Φάσεις του αίματος.

A.1.1. Έμμορφα συστατικά

Τα ερυθροκύτταρα αποτελούν τα πιο πολυάριθμα κύτταρα του αίματος και έχουν μέσο χρόνο ζωής 120 ημέρες. Σχηματίζονται στο μυελό των οστών και ύστερα από μια σειρά σταδίων ωρίμανσης, κατευθυνόμενα κυρίως από την ορμόνη ερυθροποιητίνη (Klinken, 2002) φτάνουν στην ώριμη μορφή τους και εισέρχονται στην κυκλοφορία έχοντας

χαρακτηριστική μορφολογία η οποία τα κάνει εύκολα αναγνωρίσιμα (Yared Alemu et al., 2006). Η αποπυρήνωση τους προσδίδει το πλεονέκτημα του μειωμένου βάρους και τον μετασχηματισμό τους σε αμφίκοιλα δισκοειδή (με διάμετρο 8μm) με αυξημένη παραμορφωσιμότητα (Howard and Hamilton, 2013) που τους επιτρέπει να διέρχονται κατ'επανάληψη μέσα στην μικροκυκλοφορία (της οποίας η ελάχιστη διάμετρος είναι 3.5 μm), προκειμένου να μεταφέρουν την αιμοσφαιρίνη σε στενή επαφή με τους ιστούς και να επιτύχουν την ανταλλαγή αερίων (Hoffbrand and Moss, 2011).

Ο όρος “λευκά αιμοσφαίρια” (WBC), αναφέρεται σε μια ετερογενή ομάδα εμπύρηνων κυττάρων του αίματος, τα ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, ηωσινόφιλα, και βασεόφιλα, τα οποία αν και αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 1% του συνολικού του όγκου του αίματος, είναι ζωτικής σημασίας για την άμυνα του οργανισμού έναντι ασθενειών και μεταφέρονται μέσω του αίματος σε διάφορους ιστούς όπου ασκούν τον φυσιολογικό τους ρόλο πχ. φαγοκυττάρωση (Howard and Hamilton, 2013). Τα λευκά αιμοσφαίρια είναι τα μόνα πλήρη κύτταρα του αίματος δηλαδή περιέχουν πυρήνα και τα συνήθη οργανίδια (Marieb, 2015). Τα αιμοπετάλια (PLT) είναι μικρά (1-4μm) απύρηννα στρογγυλά /οβάλ θραύσματα μεγακαρυοκυττάρων με φυσιολογικό εύρος: 150-400 x 10³/μl που υπάρχουν στην κυκλοφορία του αίματος και μπορούν να ανιχνεύουν και να αντιμετωπίσουν ταχέως οποιαδήποτε υπάρχουσα αγγειακή βλάβη (Qiu et al., 2015).

A.1.2. Το πλάσμα

Το πλάσμα είναι η ρευστή μεσοκυττάρια ουσία μέσα στην οποία κυκλοφορούν τα κύτταρα και αποτελείται περίπου από 91.5% νερό και 8.5% διαλυμένες ουσίες όπως θρεπτικές ουσίες, άλατα (ηλεκτρολύτες), αναπνευστικά αέρια, ορμόνες, πρωτεΐνες του πλάσματος, και διάφορα απόβλητα και προϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων (Elaine N. Marieb, 2015). Τις πρωτεΐνες του πλάσματος αποτελούν η αλβουμίνη, οι σφαιρίνες και το ινωδογόνο το οποίο συντίθενται στο ήπαρ και ευθύνεται για την πήξη του αίματος (OpenStax College, 2013).

Το ανθρώπινο πλάσμα είναι προικισμένο με μια σειρά αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών που είτε συνθέτει ο ίδιος ο οργανισμός (πρωτεΐνες και διάφορα μικρά μόρια εκ των οποίων κάποια αποτελούν προϊόντα μεταβολικών οδών), είτε παραλαμβάνονται μέσω της διατροφής (βιταμίνες όπως ασκορβικό, α-τοκοφερόλη, β-καροτίνη) (Frei et al., 1989). Τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά του πλάσματος είναι το ασκορβικό οξύ, η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, η α-τοκοφερόλη, η δεσμευμένη με αλβουμίνη χολερυθρίνη και η ίδια η αλβουμίνη. Οι σουλφυδρυλικές ομάδες πρωτεϊνών επίσης φαίνεται να συμβάλλουν στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του πλάσματος, παρόλο που η οξειδωσή τους θα μπορούσε να θεωρηθεί ως οξειδωτική βλάβη ανάλογα με τις πρωτεΐνες που επηρεάζουν. Επιπρόσθετα, η τρανσφερίνη και η σερουλοπλασμίνη δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης αποτρέποντάς τα με αυτόν τον τρόπο να συμμετέχουν σε αντιδράσεις ελευθέρων ριζών, και τέλος η εξοκυτταρική δισμουτάση υπεροξειδίου επίσης φαίνεται να εμπλέκεται στην αντιοξειδωτική άμυνα του ανθρώπινου πλάσματος (Frei et al., 1988).

A.1.2.1. Ασκορβικό οξύ

Το ασκορβικό οξύ είναι το πιο αποτελεσματικό υδρόφιλο αντιοξειδωτικό στο πλάσμα του αίματος. Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, η βιταμίνη C δρα ως δότης ηλεκτρονίων (Buettner, 1993) και αποτελεί ισχυρό μέσο δέσμευσης ελεύθερων ριζών στο πλάσμα, προστατεύοντας τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από τις δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) (Carr et al., 1999; Izzi et al., 2012; Marzocchella et al., 2011). Οι σταθερές ρίζες ασκορβικού που προκύπτουν ανάγονται ξανά σε ασκορβικό μέσω της NADH και μέσω NADPH-εξαρτώμενων αναγωγασών που έχουν υψηλή συγγένεια με τις χαμηλές συγκεντρώσεις των ριζών που παράγονται (Wakefield et al., 1986). Αν και υδρόφιλο μόριο, σε συνεργασία με την βιταμίνη E (της οποίας η αντιοξειδωτική ικανότητα αυξάνεται από την παρουσία του ασκορβικού), εμπλέκεται στην προστασία υδρόφοβων ενώσεων όπως είναι τα λιπίδια της μεμβράνης (Martinez et al., 2014). Συγκεκριμένα, όσον αφορά στην προστασία των λιπιδίων της μεμβράνης, το ασκορβικό, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά που μπορούν να μειώνουν το ρυθμό υπεροξειδωσης λιπιδίων, είναι σε θέση να προλαμβάνει ακόμη και την έναρξη αυτής (Frei, 1991).

Ο άνθρωπος δεν έχει την ικανότητα να συνθέσει *de novo* ασκορβικό οξύ, με αποτέλεσμα να το προσλαμβάνει μέσω της διατροφής. Τα ώριμα ερυθροκύτταρα προσλαμβάνουν το ασκορβικό (ακριβέστερα της οξειδωμένης του μορφής, αφυδροασκορβικό οξύ – DHA) μέσω της αυξημένης έκφρασης του μεταφορέα γλυκόζης (GLUT1). Μάλιστα, η συγγένειά του με το DHA αυξάνεται μέσω της πρόσδεσης σε αυτόν της μεμβρανικής πρωτεΐνης στοματίνης, που κατά την διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων εκφράζεται περισσότερο (Monten-Hagen et al., 2008; Zhang et al., 2001).

A.1.2.2. Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπίδιο αποτελούμενο από τα αμινοξέα γλουταμινικό, κυστεΐνη και γλυκίνη (Shan et al., 1990). Αποτελεί σουλφυδρικό αντιοξειδωτικό (-SH), αντιοξίνη και ενζυμικό συμπάραγοντα, ανήκει στους **μη ενζυμικούς** ρυθμιστές της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης και υπάρχει σε ποικιλία κυττάρων καθώς επίσης και στο πλάσμα. Υπάρχει σε δύο μορφές: σε μορφή ανηγμένης -πλούσιας σε ηλεκτρόνια- γλουταθειόνης (GSH) και στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Στο πλάσμα όπου μεταφέρεται αφού συντεθεί στο ήπαρ η αναλογία της είναι 85% και 15% αντίστοιχα και ο λόγος GSSG/GSH μπορεί να θεωρηθεί ως δείκτης οξειδωτικού στρες. Η γλουταθειόνη ελέγχεται ομοιοστατικά και αυτορυθμίζεται με τη βοήθεια ενζυμικών συστημάτων τα οποία στοχεύουν στην ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης της GSH (GSH συνθετάσες), της ανακύκλωσης της GSSG (GSH αναγωγάσες) και της αξιοποίησής της (υπεροξειδάσες, μεταφοράσες, τρανσπεπτιδάσες, τρανσυδρογενάσες) (Hagen et al., 2008). Εμφανίζει τις αντιοξειδωτικές της δράσεις με πολλούς τρόπους, ενώ παράλληλα προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση αντιδρώντας με προαποπτωτικά και αντιαποπτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια (Masella et al., 2005).

A.1.2.3. Ουρικό οξύ (UA)

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν αποδόμησης των πουρινών στους ανθρώπους και αποτελεί το πιο άφθονο αντιοξειδωτικό του πλάσματος με συγκέντρωση που φτάνει τα όρια της διαλυτότητάς του (120-450 $\mu\text{mol/L}$) (Becker, 1993). Εισέρχεται εντός της μεμβράνης είτε μέσω διάχυσης είτε με ενεργητική μεταφορά μέσω ειδικών για το ουρικό οξύ υποδοχέων. Δρα ως ισχυρός εκκαθαριστής μοριακού οξυγόνου (O_2), ριζών υπεροξειδίου (RO_2^\cdot) καθώς και ριζών υδροξυλίου (OH^\cdot) (Ames et al., 1981), προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο την ερυθροκυτταρική μεμβράνη από την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Kellogg and Fridovich, 1977). Έχει την ικανότητα να δρα επίσης ως χηλικός παράγοντας σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου (Fe^{+3}), παρεμποδίζοντας έτσι την οξειδωτική δράση τους μέσω των αντιδράσεων Fenton και Harber-Weiss με αποτέλεσμα την αναστολή αντιδράσεων που καταλύονται από τον σίδηρο (Miura et al., 1993). Η παρουσία του ασκορβικού φαίνεται να είναι απαραίτητη για την εκδήλωση της αντιοξειδωτικής προστασίας του ουρικού οξέος έναντι της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (Frei et al., 1988) καθώς επίσης και για την εκκαθάριση των νιτρικών υπεροξειδίων του πλάσματος (Kuzkaya et al., 2005). Στο εσωτερικό των ερυθροκυττάρων παρεμποδίζει την οξείδωση της αιμοσφαιρίνης και τη μετατροπή της σε μεθαιμοσφαιρίνη και αιμοχρώματα και κατά συνέπεια την συσσωμάτωση της ζώνης 3 πάνω στην μεμβράνη.

A.1.2.4. α -Τοκοφερόλη

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη και υπάρχει σε οκτώ διαφορετικές ισομορφές, τις τοκοφερόλες. Στον άνθρωπο η α -τοκοφερόλη είναι η πιο ενεργή μορφή της βιταμίνης και αποτελεί το κυριότερο μεμβρανο-συνδεδεμένο αντιοξειδωτικό των κυττάρων (Hensley et al 2004). Συμβάλλει στην προστασία των μεμβρανών από την υπεροξειδωση των λιπιδίων εκκαθαρίζοντας τις ρίζες υπεροξειδίου (Thakur and Srivastava, 1996). Σε αντίθεση με τα άλλα αντιοξειδωτικά τα οποία είναι συστατικά ενζύμων ή ενζυμικά-εξαρτώμενων συστημάτων, η α -τοκοφερόλη έχει ταχεία και μη ενζυματική αντιοξειδωτική δράση. Κατά την διάρκεια της αντιοξειδωτικής αντίδρασης η α -τοκοφερόλη δωρίζει ένα ασταθές άτομο υδρογόνου στο λιπίδιο-στόχο ή στην λιπιδική ρίζα υπεροξειδίου, ενώ η σταθερή ρίζα α -τοκοφερόλης που προκύπτει ανάγεται ξανά σε α -τοκοφερόλη με τη βοήθεια του ασκορβικού οξέος (Kojo, 2004). Έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με πλήθος αντιοξειδωτικών, όπως με την βιταμίνη C, τη GSH, το β -καροτένιο και το α -λιποϊκό οξύ, από τα οποία εξαρτάται η αναγεννητική της ικανότητα (Coombes et al., 2001). Επίσης, έχει δειχθεί ότι προκαλεί απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και αναστέλλει τον σχηματισμό των ελεύθερων ριζών (White, et al., 1997).

A.1.2.5. Αλβουμίνη

Η αλβουμίνη είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος αντιπροσωπεύοντας το 55-60% των πρωτεϊνών του ορού (Gosling, 1995). Έχει πολλούς ρόλους ένας εκ των οποίων είναι η δράση της ως αντιοξειδωτικό του πλάσματος (Bourdon and Blache, D, 2001). Οι αντιοξειδωτικές της ιδιότητες στηρίζονται στην μοριακή της δομή και συγκεκριμένα στα ανηγμένα κατάλοιπα κυστεΐνης (Cys34) που περιέχει, τα οποία μέσω των ελεύθερων σουλφυδριλικών (-SH) ομάδων εκκαθαρίζουν τις ρίζες υδροξυλίου (Gutteridge, 1986), τις

ενεργές ρίζες αζώτου (RNS) (Carballal et al., 2003) καθώς επίσης και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) ο σχηματισμός του οποίου καταλύεται από την απελευθέρωση της μυελουπεροξειδάσης από τα ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα όπως τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα (Weiss, 1989; Winterbourn et al., 2000; Halliwell, B. 1988). Αντίστοιχα, έχει προταθεί η υπόθεση ότι ο κύκλος οξειδωσης και αναγωγής των καταλοίπων μεθειονίνης (Met) (6 στην ανθρώπινη αλβουμίνη) στα βιολογικά συστήματα αποτελεί επίσης έναν σημαντικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό έναντι των ROS προλαμβάνοντας έτσι τις εκτεταμένες τροποποιήσεις των πρωτεϊνών (Levine et al., 1999).

A.1.2.6. Χολερυθρίνη

Η χολερυθρίνη αποτελεί τελικό προϊόν του μεταβολισμού της αίμης και σχηματίζεται με τη βοήθεια της οξυγενάσης της αίμης και της αναγωγάσης της χολοπρασίνης (Schmid, and McDonagh., 1975). Αποτελεί ισχυρό ενδογενές αντιοξειδωτικό που παρέχει κυτταροπροστασία και οι αντιοξειδωτικές της δράσεις ενισχύονται δραματικά από την αναγωγή της χολοπρασίνης κατά την διάρκεια του κύκλου χολοπρασίνης-χολερυθρίνης (Baranano et al., 2002). Έχειδειχθεί ότι ως λιπόφιλο μόριο, προστατεύει από την υπεροξειδωση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών και σε συνδυασμό με την γλουταθειόνη GSH (η οποία εξαιτίας της υδροφιλικότητάς της, προστατεύει κυρίως τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες), παρέχουν συμπληρωματικές αντιοξειδωτικές και κυτταροπροστατευτικές δράσεις (Sedlak. et al., 2008). Όταν συνδέεται με την αλβουμίνη του πλάσματος προστατεύει τα συνδεδεμένα σε αυτή λιπαρά οξέα καθώς και την ίδια την πρωτεΐνη από οξείδωση (Wu et al., 1996), ενώ αντίθετα μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα στα ερυθροκύτταρα σε μεταβολές συγκέντρωσης και θερμοκρασίας (Brito et al., 2000).

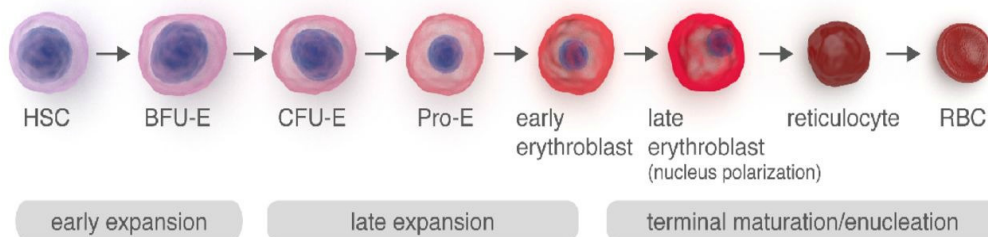
A.2 ΤΟ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΟ (RBC)

A.2.1. Ερυθροποίηση

Τα ερυθροκύτταρα είναι τα πιο άφθονα και πιο εξειδικευμένα κύτταρα του σώματος. Αποτελούνται από μια πλούσια σε **πρωτεΐνες, υδατάνθρακες** και **λιπίδια** πλασματική μεμβράνη η οποία περικλύει την κύρια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου την αιμοσφαιρίνη (Hb). Το ώριμο ερυθροκύτταρο στερείται πυρήνα, ριβοσωμάτων και μιτοχονδρίων άρα και της ικανότητας κυτταρικής διαίρεσης, πρωτεϊνοσύνθεσης καθώς επίσης και των σχετιζόμενων με τα μιτοχόνδρια οξειδωτικών αντιδράσεων (Cimen, 2007).

Το χαρακτηριστικό σχήμα του αμφίκυκλου δίσκου παρέχει την ικανότητα να περνά από τα στενά τριχοειδή της μικροκυκλοφορίας διατομής 1/3 της διαμέτρου του, όπως συμβαίνει και κατά την διέλευσή του από το σπλήνα. Η αποτελεσματική ανταλλαγή των αερίων βασίζεται στην ροή του αίματος, στην δραστηριότητα των μεμβρανικών πρωτεϊνών καθώς επίσης και στο μικροπεριβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου (Bruce 2008). Η ερυθροποίηση ρυθμίζεται από την ορμόνη ερυθροποιητίνη (EPO) η οποία παράγεται στα περισωληνιακά κύτταρα των νεφρών, διεγείρει την αύξηση του ποσοστού των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων που προορίζονται για ερυθροποίηση και ευθύνεται για τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων CFU-E. Η παραγωγή και

η ωρίμανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων λαμβάνει μέρος στο μυελό των οστών και υποδιαιρείται σε τρία στάδια: την πρόωμη ερυθροποίηση, την ερυθροποίηση τελικού σταδίου και την ωρίμανση των δικτυοερυθροκυττάρων. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της παραπάνω διαδικασίας είναι ότι η κάθε κυτταρική διαίρεση συνοδεύεται με ταυτόχρονη διαφοροποίηση, δηλαδή τα θυγατρικά κύτταρα είναι δομικά και λειτουργικά διαφορετικά από τα μητρικά (εικόνα 2). Κατά το πρώτο στάδιο, τα αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα διαφοροποιούνται σε πρόδρομα ερυθροειδή κύτταρα (BFU-E, CFU-E), τα οποία στη συνέχεια ξεκινώντας από το στάδιο του προερυθροβλάστη (στη φάση της τελικής ερυθροποίησης), μέσω διαδοχικών μιτώσεων διαφοροποιούνται σε βασεόφιλα, πολυχρωματικά και ορθοχρωματικά. Κατά το στάδιο αυτό τα κύτταρα υφίστανται μεταβολές συμπεριλαμβανομένης της μείωσης του μεγέθους τους, της αύξησης της αιμοσφαιρινοποίησης στο κυτταρόπλασμα, την συμπύκνωση της χρωματίνης και τελικά, την αποπυρήνωσή τους. Παρατηρούνται έντονες αλλαγές και ως προς την έκφραση και συγκρότηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών ενώ στο τελευταίο στάδιο της ερυθροποίησης, τα πολυλοβωτά δικτυοερυθροκύτταρα ωριμάζουν σε δισκοειδή ερυθροκύτταρα τα οποία στερούνται ενδοκυτταρικών οργανιδίων, χάνουν κυτταρική μεμβράνη, ελαττώνουν τον κυτταρικό τους όγκο και αναδιοργανώνουν τόσο τις μεμβρανικές όσο και τις σκελετικές τους πρωτεΐνες (Jingpi Hu et al., 2013).

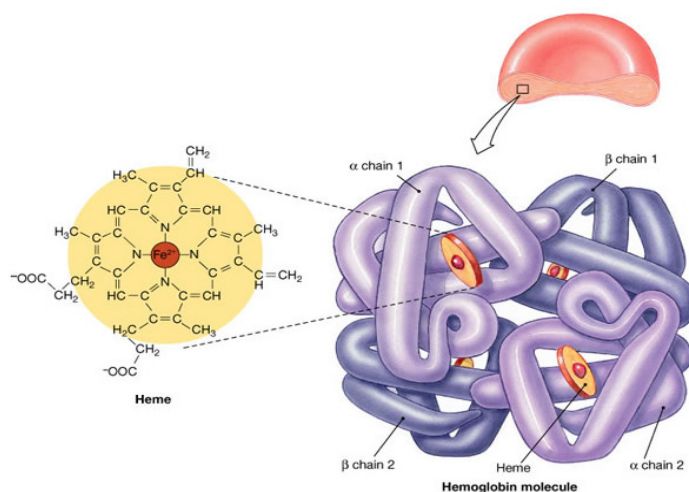


Εικ 2. Στάδια Ερυθροποίησης RBCs.

A.2.2. Αιμοσφαιρίνη (Hb)

Η αιμοσφαιρίνη αντιπροσωπεύει το 97-98% του συνολικού πρωτεόματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων και αυτό οφείλεται στην μοναδική κατασκευή και πλαστικότητα τους που τους επιτρέπει να μεταφέρουν οξυγόνο στη βέλτιστη συγκέντρωση. Είναι ένα ετεροτετραμερές μοριακού βάρους 67kD και διαμέτρου περίπου 5,5nm και αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ανα δύο όμοιες, από την οικογένεια της α-σφαιρίνης (α ή ζ σφαιρίνες) και την οικογένεια της β-σφαιρίνης (β, γ, δ ή ε σφαιρίνες) (εικόνα 3), οι οποίες κωδικοποιούνται από 2 γονίδια στα χρωμοσώματα 16 και 11, αντίστοιχα. Με κάθε αλυσίδα σφαιρίνης συνδέεται μια ομάδα αίμης η οποία περιέχει έναν δακτύλιο πορφυρίνης με ένα άτομο σιδήρου, με το οποίο συνδέεται αντιστρεπτά το οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα, σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο την οξυαιμοσφαιρίνη και την δεοξυαιμοσφαιρίνη. Η HbA ($\alpha_2\beta_2$) αποτελεί το 97% της Hb ενός φυσιολογικού ενήλικα. Η κύρια λειτουργία της στα θηλαστικά όπως είναι γνωστό είναι η μεταφορά του οξυγόνου (O_2) από τους πνεύμονες στους ιστούς του σώματος όπως και η αλληλεπίδρασή της με το CO_2 , CO και NO. Ο βαθμός κορεσμού-αποκορεσμού της Hb με το O_2 εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του, το pH, και την περιεκτικότητα σε 2,3-

διφωσφογλυκερινικό οξύ (2,3 DPG). Έτσι, όταν η οξυαιμοσφαιρίνη φεύγει από τους πνεύμονες στους ιστούς όπου και η συγκέντρωση του CO₂ είναι αυξημένη ενώ το pH χαμηλό, ευνοείται ο αποκορεσμός της σε μεγαλύτερο βαθμό με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του οξυγόνου και την δέσμευση του CO₂ (Chhabra., 2013).



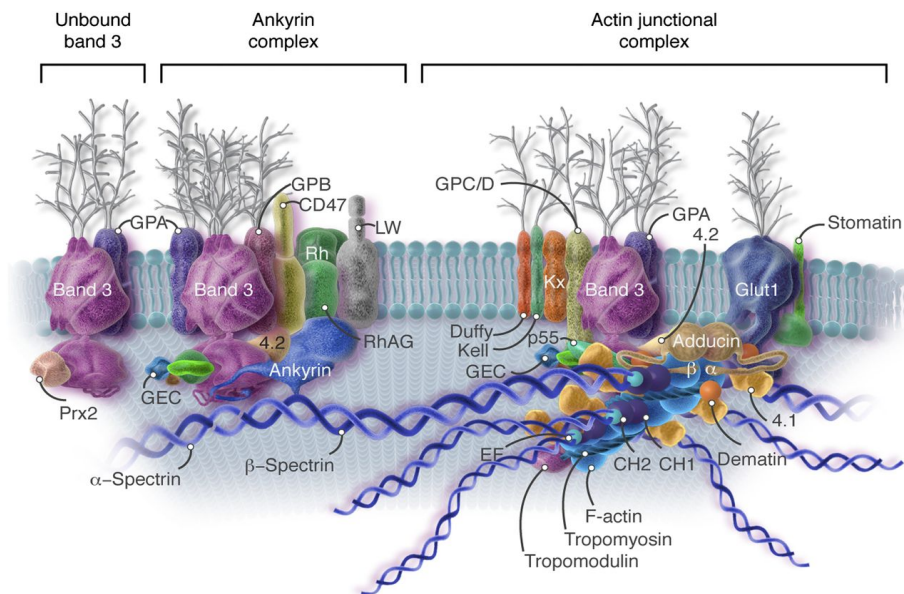
Εικ 3. Δομή της αιμοσφαιρίνης. Ανατύπωση από (Chhabra ., 2013)

Πρόσφατα εντοπίστηκε έκφραση αιμοσφαιρίνης και σε μη ερυθροειδή κύτταρα όπως σε ενεργοποιημένα μακροφάγα, σε ηπατοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα ιστών όπου η ομοιότητα του οξυγόνου είναι υψίστης σημασίας συμπεριλαμβανομένων εκείνων των πνευμόνων, των νευρώνων, του αμφιβληστροειδούς, του ενδομητρίου και των επιθηλιακών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας όπου φαίνεται να εμφανίζουν και αντιμικροβιακή-αντιοξειδωτική δράση. Σε αυτά τα κύτταρα το σύμπλεγμα των γονιδίων της β-σφαιρίνης φαίνεται να βρίσκεται σε ανενεργή ετεροχρωματίνη ενώ αυτό της α-σφαιρίνης ενσωματωμένο σε διαμορφώσεις ανοιχτής χρωματίνης σε όλους τους τύπους κυττάρων (Hardison., 1998).

A.2.3. Ερυθροκυτταρική Μembrάνη

Το απύρηνο ερυθροκύτταρο ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού στο ότι η πλασματική του μεμβράνη (εικόνα 4) αποτελεί το μοναδικό δομικό του συστατικό που ευθύνεται για τις ποικίλες αντιγονικές, μεταφορικές και τις μηχανικές του ιδιότητες. Αποτελεί μια σύνθετη δομή στην οποία η λιπιδικής φύσεως διπλοστιβάδα, αποτελούμενη κυρίως από χοληστερόλη και φωσφολιπίδια, συνδέεται σε ένα δυσδιάστατο ελαστικό δίκτυο σκελετικών πρωτεϊνών μέσω θέσεων πρόσδεσης επάνω στις κυτταροπλασματικές περιοχές των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι ενσωματωμένες στην λιπιδική διπλοστιβάδα. Όσον αφορά στην χημική της σύσταση, οι πρωτεΐνες καταλαμβάνουν το 52% της συνολικής μάζας, τα λιπίδια 40% και οι υδατάνθρακες (πολυσακχαρίτες) το 8% (Kaushansky et al., 2010).

Η ερυθροκυτταρική πλασματική μεμβράνη έχει ιδιαίτερη δομική συμπεριφορά: είναι εξαιρετικά ελαστική, ανταποκρίνεται ταχέως σε διάφορες καταπονήσεις και είναι εξαιρετικά ανθεκτική στις πιέσεις που ασκούνται από τη ροή του αίματος (Mohandas and Gallagher, 2008).



Εικ 4. Ερυθροκυτταρική Μεμβράνη. (Ανατύπωση από Lux, 2016)

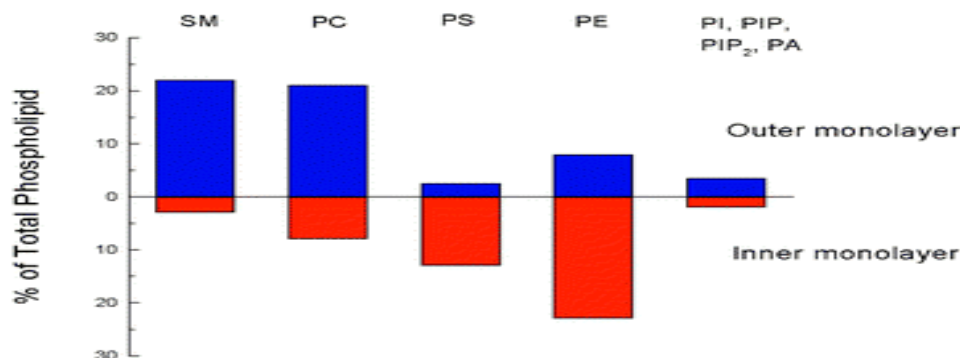
Η λειτουργικότητα και η βιωσιμότητα των ερυθροκυττάρων εξαρτάται καθοριστικά από την ακεραιότητα της μεμβράνης, για να διατηρηθεί το ομαλό σχήμα του κυττάρου, η ικανότητα παραμόρφωσης και η μηχανική σταθερότητα (Kriebardis et al., 2007). Εκτεταμένες μελέτες έχουν εντοπίσει **τρία ιδιοσυστατικά χαρακτηριστικά** του ερυθροκυττάρου που του προσδίδουν την ικανότητα παραμόρφωσης (Discher DE., 2000; Li et al., 2007) και την ικανότητα να παραμένει μηχανικά σταθερό για να αντιστέκεται στον κατακερματισμό. Αυτά είναι:

- **Η κυτταρική γεωμετρία** (αμφίκυκλο δισκοειδές σχήμα) εξαρτάται κυρίως από την αναλογία του εμβαδού της επιφάνειας του κυττάρου (Surface Area) προς τον όγκο (Volume), (υψηλές τιμές SA/V διευκολύνουν την παραμορφωσιμότητα).
- **Το κυτταροπλασματικό ιξώδες** το οποίο προσδίδει στα ερυθροκύτταρα την ικανότητα να αλλάζουν το σχήμα τους κατά την διέλευση τους από τα στενά τριχοειδή και ρυθμίζεται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης.
- **Η παραμορφωσιμότητα της μεμβράνης και η μηχανική σταθερότητα**, τα οποία ρυθμίζονται κυρίως από το δίκτυο σπεκτρίνης.

A.2.3.1. Λιπίδια της Μεμβράνης

Η λιπιδική διπλοστοιβάδα ευθύνεται για την διαπερατότητα των ουσιών παίζοντας ρόλο στην διακυτταρική σηματοδότηση και τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα κύτταρα, συμβάλλει στο σχήμα και την παραμορφωσιμότητα του κυττάρου και χρησιμεύει ως μήτρα στην οποία είναι εγκατεστημένες οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Αποτελείται από ίσες κατά βάρος αναλογίες χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων όπου η χοληστερόλη πιστεύεται ότι κατανέμεται ισομερώς ανάμεσα στη διπλοστοιβάδα ενώ τα φωσφολιπίδια είναι τοποθετημένα ασύμμετρα (εικόνα 5). Συγκεκριμένα, η φωσφατιδιλοχολίνη και η σφιγγομυελίνη βρίσκονται κατά κύριο λόγο στην εξωτερική μονοστοιβάδα ενώ η

φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και η φωσφατιδυλοσερίνη μαζί με τα φωσφολιπίδια ινοσιτόλης βρίσκονται κυρίως στην εσωτερική μονοστιβάδα (Daleke., 2008).



Εικ 5. Λιπιδική Κατανομή. (Ανατύπωση από Bradley D. Smith and Timothy N. Lamberta 2003)

Όπως γίνεται αντιληπτό, χωρίς τη δυνατότητα για *de novo* σύνθεση φωσφολιπιδίων, οι κύριοι μηχανισμοί ανανέωσής τους είναι η επιδιόρθωσή τους και η ανταλλαγή τους με το εξωτερικό περιβάλλον. Έτσι, ενώ η ελεύθερη χοληστερόλη ανταλλάσσεται με την αντίστοιχη των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος, και εστεροποιείται μέσω της λεκιθίνης της ακυλοτρανσφεράσης της χοληστερόλης (LCAT), η διατήρηση της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας επιτυγχάνεται κυρίως μέσω αρκετών ενεργειακά εξαρτώμενων (φλιπάσες, φλοπάσες) και ενεργειακά ανεξάρτητων πρωτεϊνών (σκραμπλάσες), μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φωσφολιπιδίων και των σκελετικών πρωτεϊνών της μεμβράνης, καθώς και μέσω παθητικής διάχυσης (φωσφολιπίδια χολίνης) μεταξύ των δυο μονοστιβάδων (Yawata, 2003; Devaux et al. 1991). Η διατήρηση της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας στις δυο μονοστιβάδες είναι κρίσιμης λειτουργικής σημασίας για την επιβίωση του ερυθροκυττάρου, καθώς η διαταραχή της οδηγεί στην μετατόπιση της PS στην εξωτερική μονοστιβάδα, και έχει ως συνέπεια την αναγνώριση και φαγοκυττάρωση των ερυθροκυττάρων από τα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, την πρόωρη καταστροφή των ερυθροκυττάρων και την προσκόλλησή τους στο ενδοθήλιο, παρεμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ομαλή κυκλοφορία (Setty et al., 2002).

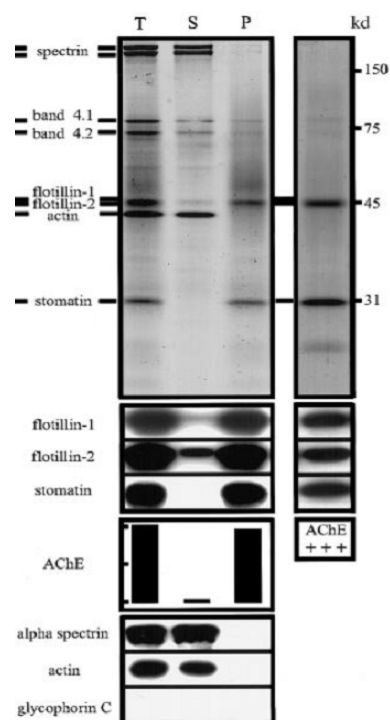
A.2.3.2. Λιπιδικές σχεδίες

Πρόκειται για δυναμικές, λειτουργικά ανεξάρτητες, πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη περιοχές που θεωρούνται περιοχές σηματοδότησης και πλατφόρμες διαλογής πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε κρίσιμα σηματοδοτικά μονοπάτια. Είναι αδιάλυτες σε απορρυπαντικά και ποικίλουν σε σχήμα και μέγεθος (Salzer and Prohaska, 2001). Οι λιπιδικές σχεδίες έχουν ετερογένεια στην λειτουργία τους και αυτό οφείλεται στη διαφορετική τους σύσταση (Lai, 2003), γενικά όμως ο ρόλος τους όπως προαναφέρθηκε, είναι κυρίως σηματοδοτικός, γι'αυτό όταν βρίσκονται σε κατάσταση διέγερσης συσσωρεύονται για να επιτευχθεί η ενίσχυση του σήματος (Sacamoto, 2005).

Οι GPI-συνδεδεμένες πρωτεΐνες προστατεύουν από την επίθεση του συμπληρώματος (Miwa and Song, 2001) ενώ η υψηλή περιεκτικότητα των λιπιδικών σχεδίων σε χοληστερόλη επιτρέπει την απομόνωσή τους υπο τη μορφή σωματιδίων χαμηλής πυκνότητας. Τέλος, ρυθμίζουν την μεταφορά νερού (υδατοπορίνη-1) και εμπλέκονται στην είσοδο του παρασίτου της ελονοσίας *Plasmodium Falciparum* στο ερυθροκύτταρο, οδηγώντας σε γεγονότα διαλογής και σηματοδότησης (Murphy et al., 2004).

A.2.3.2.1. Σύσταση λιπιδικών σχεδίων

Οι λιπιδικές σχεδίες είναι ιδιαιτέρως πλούσιες σε χοληστερόλη και γλυκοσφιγγολιπίδια, και οι πλευρικές αλυσίδες των φωσφολιπιδίων είναι πολύ εμπλουτισμένες σε λιπαρά οξέα σε σύγκριση με τις γύρω περιοχές της πλασματικής μεμβράνης (εικόνα 6). Τα σφιγγολιπίδια έχοντας ισχυρή πλευρική συνοχή δημιουργούν σφιχτά κατασκευασμένες περιοχές στη διπλοστιβάδα, ενώ η χοληστερόλη που υπάρχει και στις δυο μονοστιβάδες δρά ως διαχωριστικό αυτών δημιουργώντας σταθερές (μικρότερης ρευστότητας) περιοχές στην πλασματική μεμβράνη (Brown and London, 2000). Η ασυμμετρία ανάμεσα στις δυο μονοστιβάδες διατηρείται και εδώ με τις συνδεδεμένες με γλυκοζυλοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (GPI) πρωτεΐνες που βρίσκονται στην εξωτερική μονοστιβάδα ενώ στην εσωτερική πλευρά εντοπίζονται ακετυλιωμένες κινάσες τυροσίνης της οικογένειας Src (Magee and Paramyrd., 2003). Ενσωματώνουν συγκεκριμένα πρωτεϊνικά συστατικά τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε ένα περιβάλλον προστατευμένο από την επίδραση των λιπιδίων που βρίσκονται έξω από τα πλαίσια της λιπιδικής σχεδίας. Περιέχουν λιπιδικά τροποποιημένες πρωτεΐνες όπως είναι οι GPI-συνδεδεμένες πρωτεΐνες και άφθονες άλλες πρωτεΐνες όπως φλοτιλίνη 1 και φλοτιλίνη 2 (μεμβρανοσυνδεόμενες πρωτεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν ικρίωμα φτιάχνοντας ολιγομερή στη μεμβράνη), στοματίνη, υδατοπορίνη, σορκίνη, συνεξίνη και ακετυλοχολινεστεράση, ενώ κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες όπως η σπεκτρίνη, η ακτίνη, η ζώνη 4.1 και 4.2 συνδέονται με αυτές δρώντας ως μεμονωμένα συστατικά του ικριώματός τους στην κυτταροπλασματική τους πλευρά (Salzer and Prohaska 2001). Η σορκίνη και η συνεξίνη είναι κυτοσολικές πρωτεΐνες οι οποίες μετατοπίζονται στην μεμβράνη σε καταστάσεις έντονου στρες λόγω αύξησης του ενδοκυτταρίου Ca^{+2} (Salzer and Prohaska, 2001). Τέλος, το CD59 είναι μια συνδεδεμένη με γλυκοζυλοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλη πρωτεΐνη, που ρυθμίζει το σύστημα του συμπληρώματος και βρίσκεται στην εξωκυτταρική πλευρά της μεμβράνης. Εμπλέκεται τόσο στην κυστιδιοποίηση της μεμβράνης όσο και στην αναστολή της δημιουργίας του συμπλόκου μεμβρανικής επίθεσης και αποτελεί δείκτη των λιπιδικών σχεδίων μαζί με το μόρια GAS (Mandal et al., 2005).



Εικ 6. Ταυτοποίηση πρωτεϊνών των λιπιδικών σχεδίων του ερυθροκυττάρου. (Ανατύπωση από Salzer and Prohaska, 2001)

A.2.3.3. Πρωτεΐνες Ερυθροκυτταρικής Μembrάνης.

Η σχετικά απλή κυτταρική δομή του ερυθροκυττάρου, σε συνδυασμό με τον εύκολο καθαρισμό του και την άμεση διαθεσιμότητά του, το καθιστούν ως το καλύτερα μελετημένο κύτταρο από άποψη πρωτεϊνικής σύνθεσης και λειτουργίας. Απο πρωτεομικές μελέτες (proteomics) και μελέτες αλληλεπίδρασης (interactomics) που έχουν πραγματοποιηθεί, ο αριθμός των πρωτεϊνών που εντοπίζονται μέχρι σήμερα φτάνει τις 2.638 από τις οποίες οι 846 είναι μεμβρανικές (Hegedus et al. 2015). Επίσης, όπως δείχνουν πρόσφατα αποτελέσματα, ο προσδιορισμός των εύκολα προσβάσιμων πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης μπορεί να παρέχει σημαντικές διαγνωστικές δυνατότητες. Ωστόσο, η εφαρμογή πρόσφατων μεμβρανοειδικών πρωτεομικών μελετών του ανθρώπινου ερυθροκυττάρου βοήθησε στην δημιουργία μιας ολοκληρωμένης και επεκτάσιμης βάσης δεδομένων που αναφέρεται σε πρωτεομικά, γενετικά και ιατρικά δεδομένα και περιέχει έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών ερυθροκυτταρικής μεμβράνης που προηγουμένως θεωρούνταν ότι ήταν ιστοειδικές άλλων ιστών ή/και που σχετίζονταν με διάφορες ασθένειες (Hegedus et al. 2015). Η απομόνωση των κυτταρικών μεμβρανών (ghosts) γίνεται με την μέθοδο της υποτονικής αιμόλυσης κατά Dodge (Dodge et al., 1963). Ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες και αφού διαχωριστούν οι πρωτεΐνες κυρίως με βάση τη μάζα τους, βάφονται με τη χρώση coomassie blue με αποτέλεσμα να διακρίνονται ποικίλες ζώνες (Laemmli et al., 1970).

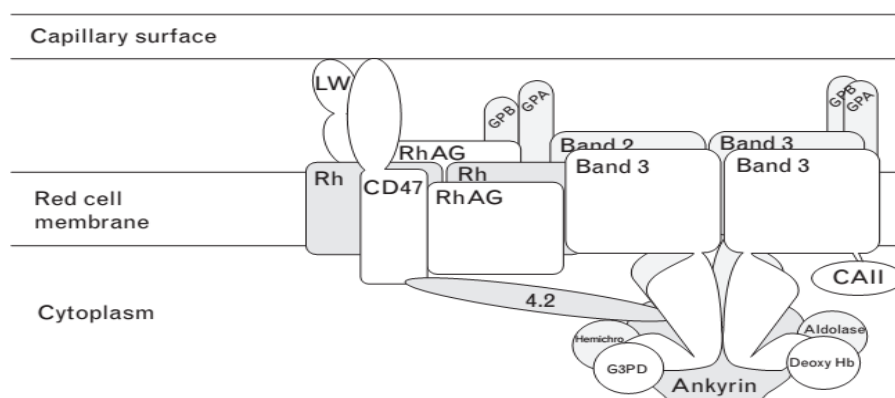
Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε διαμεμβρανικές, σε συνδεδεμένες με τη μεμβράνη μέσω γεφυρών γλυκοζυλφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (GPI-anchored proteins), σε συνδεδεμένες στο εσωκυττάριο τμήμα της, σε εξωκυτταρικές και τέλος, σε κυτταροσκελετικές (Pasini et al. 2009). Εμφανίζουν μεγάλη λειτουργική ετερογένεια με κάποιες να χρησιμεύουν ως πρωτεΐνες μεταφορείς, πρωτεΐνες προσκόλλησης που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις των ερυθροκυττάρων με τα άλλα κύτταρα και με τα ενδοθηλιακά, ως υποδοχείς σηματοδότησης κ.α. Βλάβες των πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης όπως για παράδειγμα θραύση ή/και συσσωμάτωση της ζώνης 3 κ.α. (όπως αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω), έχει δειχθεί ότι σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα των μεταγγίσεων (Kriebardis et al.2007; Antonelou et al., 2010). Σημαντικές πρωτεΐνες με μεταφορικό ρόλο είναι η ζώνη 3 (ανιοντοαταλλάκτης), η υδατοπορίνη 1 (μεταφορέας νερού), ο Glut1, (μεταφορέας γλυκόζης και DHA), η πρωτεΐνη του αντιγόνου Kidd (μεταφορέας ουρίας), η RhAG (μεταφορέας αερίων), η ATP-άση $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, η ATP-άση Ca^{++} , οι συμμεταφορείς $\text{Na} - \text{K} - 2\text{Cl}$, $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ και $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ και τα κανάλια Gardos (Gardos channels) (Pasini et al. 2009). Παρακάτω θα αναλυθούν οι κυριότερες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης.

A.2.3.3.I. Ζώνη 3 ή ανιοντοανταλλάκτης (AE1)

Η ζώνη 3 ή ανιοντοανταλλάκτης αποτελεί την κύρια διαμεμβρανική πρωτεΐνη (περίπου 1×10^6 αντίγραφα μονομερών/κύτταρο) αντιπροσωπεύοντας το 1/3 των ολικών μεμβρανικών πρωτεϊνών. Είναι προϊόν ενός γονιδίου που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με 911 αμινοξικά κατάλοιπα από τα οποία τα 432 ανήκουν στην κυτοσολική της περιοχή ενώ τα υπόλοιπα 479 στην διαμεμβρανική (Lux SE

et al., 1989). Αποτελείται από τρεις περιοχές. Το κυτοσολικό αμινοτελικό άκρο (1-400 αμινοξέα) που αποτελεί μια ιδιαίτερα δομημένη κυτταροπλασματική περιοχή και συνδέεται με διαφορετικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (αγκυρίνη, πρωτεΐνη 4.1 και 4.2), γλυκοζυτικά ένζυμα (αλδολάση, GAPDH, φωσφοφρουκτοκινάση), προϊόντα οξειδωσης της αιμοσφαιρίνης (αιμοχρώματα) και με την πρωτεΐνη κινάση τυροσίνης (p72 Syk) επηρεάζοντας την κυτταρική μορφολογία, τη σταθερότητα και τη λειτουργία (Zhang et al., 2000). Το κυτοσολικό καρβοξυτελικό άκρο συνδέεται με την καρβονική ανυδράση II (CAII), ενώ το διαμεμβρανικό τμήμα διαπερνά την μεμβράνη 12-14 φορές καταλύοντας την ανταλλαγή ανιόντων (κυρίως $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$). Περιέχει αντιγονικούς παράγοντες που αναγνωρίζονται από τα φυσικά αντισώματα (Nabs) (κυρίως σε περιπτώσεις συσσωμάτωσης ή θραύσης της) και οδηγούν στην απομάκρυνση των γηρασμένων ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία (Pantaleo et al., 2008).

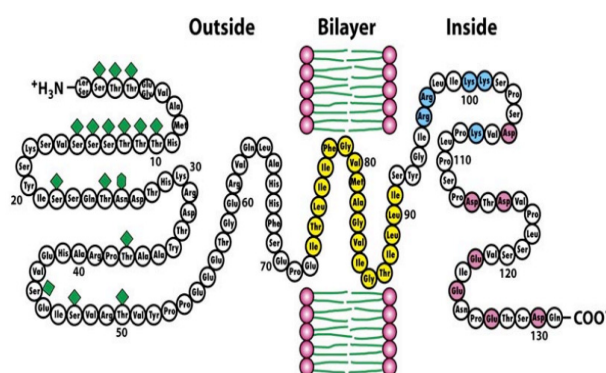
Η ζώνη 3 εκτός από τον ρόλο της στην ομοιοστάση της μεταφοράς των αερίων, αποτελεί μια πρωτεΐνη-πολυσυνδέτη η οποία συμβάλλει στην διατήρηση της δομής και σχήματος της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Υπάρχει υπό την μορφή διμερών (60%) και τετραμερών (40%) όπου τα πρώτα συνδέονται με την πρωτεΐνη 4.1 ή μετακινούνται ελεύθερα στην μεμβράνη (Bruce et al., 2003). Εδώ, αρχικά, η διμερής μορφή της ζώνης 3 συνδέεται με την αδουσίνη και στη συνέχεια δημιουργείται ένα μακροσύμπλοκο πρωτεϊνών (εικόνα 7) αποτελούμενο από την γλυκοφορίνη C, την αδουσίνη, την δεματίνη, την ακτίνη, την τροπομοουσίνη, την τροπομοντουλίνη, τις πρωτεΐνες 4.1 και 4.2, το σύμπλεγμα πρωτεϊνών Rhesus, την p55 και γλυκολυτικά ένζυμα (σύμπλοκο ζεύξης). Όσον αφορά στην τετραμερή μορφή, αυτή αποτελεί το πιο σημαντική σύνδεση της μεμβράνης με τον υπομεμβρανικό σκελετό και επιτυγχάνεται μέσω πρόσδεσης με την γλυκοφορίνη A, την πρωτεΐνη 4.2 και την αγκυρίνη και την πρόσδεση με τον σκελετό σπεκτρίνης, η οποία ισχυροποιείται με το σύμπλεγμα Rhesus (Bruce et al., 2003). Επίσης, εμπλέκεται στην οξειδοαναγωγική ομοιοστάση καθώς αλληλεπιδρά εξίσου και με την υπεροξειρεδοξίνη, εκκαθαριστή των χαμηλών επιπέδων υδρογόνων υπεροξειδίου (Low et al., 2007) ενώ αποτελεί στόχο των ενδοκυτταρικών πρωτεασών (κασπασών) και των ROS (Rinalducci et al., 2012).



Εικ 7. Το μακροσύμπλοκο ζώνης 3. Ανατύπωση από Bruce., 2008.

A.2.3.3.II. Γλυκοφορίνες

Οι γλυκοφορίνες αποτελούν μια κατηγορία πρωτεϊνών πλούσιων σε υδατάνθρακες (σιαλικά οξέα) και συνιστούν πάνω από το 60% του καθαρού αρνητικού φορτίου της επιφάνειας του ερυθροκυττάρου, ρυθμίζοντας τις ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις τους αλλά και αυτές μεταξύ των ερυθροκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι κύριες γλυκοφορίνες που προκύπτουν ύστερα από διαχωρισμό τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ύστερα από ειδική χρώση *PAS (periodic acid Schiff's base)*, είναι τέσσερις: (*GpA*, *GpB*, *GpC* και *GpD*). Διακρίνονται σε δυο τάξεις από τις οποίες η πρώτη περιλαμβάνει τις *GpA*, *GpB* και χαρακτηρίζονται ως *κύριες* (ερυθροειδικές), ενώ η δεύτερη τις *GpC* και *GpD* και χαρακτηρίζονται ως *δευτερεύουσες*. Πρόκειται για διαφορετικά πολυπεπίδια τα οποία αποτελούν προϊόντα διαφορετικών γονιδίων. Έτσι, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δύο πρώτες βρίσκονται στο χρωμόσωμα 4 ενώ το γονίδιο που κωδικοποιεί τις *GpC* και *GpD* στο χρωμόσωμα 2 (Chasis and Mohandas., 1992). Επίσης έχει απομονωθεί ένα καινούργιο *GpE* γονίδιο (Kudo and Fukuda., 1990).



Εικ. 8 Απεικόνιση του μορίου γλυκοφορίνης στις τρεις περιοχές της μεμβράνης. Η εξωκυτταρική περιοχή περιέχει πολλές θέσεις πρόσδεσης υδατανθρακικών αλυσίδων σε κατάλοιπα Ser, Thr και Asn (Ανατύπωση από Berg et al., 2002)

Οι γλυκοφορίνες αποτελούνται από τρεις περιοχές (εικόνα 8): μια κυτταροπλασματική περιοχή που περιέχει ένα σύμπλεγμα από βασικά κατάλοιπα σιαλικών οξέων τοποθετημένα κοντά στην πλασματική μεμβράνη, μια υδρόφοβη περιοχή η οποία σχηματίζει μια μονή άλφα έλικα η οποία εκτείνεται μέσα στην διπλοστιβάδα, και μια εξωκυττάρια περιοχή η οποία είναι έντονα γλυκοζυλιωμένη. Αυτή ακριβώς η παρουσία υδατανθράκων είναι που ευθύνεται για το ισχυρό καθαρό αρνητικό φορτίο της επιφάνειας του κυττάρου και η *GpA*, έχοντας την υψηλότερη συγκέντρωση σιαλικών οξέων, είναι η κύρια πρωτεΐνη που συμβάλλει στην παρεμπόδιση των παραπάνω αλληλεπιδράσεων. Επίσης, η *GpA* συνδέεται εν μέρει με την ζώνη 3 συμβάλλοντας στην μηχανική υποστήριξη της μεμβράνης (Prchal et al. 1987), και φαίνεται να αποτελεί φορέα του *P. falciparum* (Sim et al., 1994). Οι δευτερεύουσες γλυκοφορίνες, από την άλλη, εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού σχήματος και στις ελαστικές ιδιότητες της μεμβράνης. Συγκεκριμένα, η *GpC* αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη 4.1 και την p55, συνιστώντας με αυτόν τον τρόπο ένα κομβικό σημείο στήριξης του υπομεμβρανικού σκελετού (Nunomura et al., 2011), και εξίσου σημαντικό σύμπλοκο για την εισβολή και ανάπτυξη του *P. falciparum* μέσα στο ερυθροκύτταρο (Chisti et al., 1996).

A.2.3.3.III. Σύστημα Rhesus

Το σύστημα Rhesus είναι ένα από τα πιο ανοσογονικά και πολυμορφικά συστήματα των ομάδων αίματος του ανθρώπου. Στα ερυθροκύτταρα, οι πρωτεΐνες Rh (**D,C,c,E,e**) αλληλεπιδρούν με άλλες μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, τις: **RhAG, LW, CD47** και **GPB**, σχηματίζοντας το **σύμπλεγμα Rhesus**. Αποτελείται από ένα τετραμερές το οποίο αποτελείται από 2 RhAG μόρια και 2 RhCcEe ή RhD πρωτεϊνικά μόρια (Eyers et al., 1994), σταθεροποιημένα με τη βοήθεια των αμινοτελικών και καρβοξυτελικών περιοχών τους (Eyers et al., 1994; Huang., 1998), καθώς και μέσω της σύνδεσής τους με τον κυτταροσκελετό, στον οποίο συνδέονται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς οι CD47, LW και GPB (Cartron., 1994). Το σύστημα Rh μέσω της σύνδεσής του με τον υπομεμβρανικό σκελετό με τη βοήθεια της πρωτεΐνης 4.2 και της αγκυρίνης συμβάλει στην διατήρηση των μηχανικών ιδιοτήτων της μεμβράνης. Σε έλλειψη των πρωτεϊνών Rh (σύνδρομο Rh_{null}) παρατηρείται αυξημένη οσμωτική ευθραυστότητα, διαταραχή φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας και αλλοιωμένη μορφολογία ερυθροκυττάρων που οδηγεί σε βραχύτερο χρόνο επιβίωσης αυτών, in vivo (Cartron, 1999; Huang, et al., 2000).

Παρακάτω γίνεται λεπτομερέστερη αναφορά των πρωτεϊνών του συμπλόκου Rh:

- **Rh-Συνδεδεμένη Γλυκοπρωτεΐνη (RhAG):** Η πρωτεΐνη RhAG είναι μια N-γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 50kDa, η οποία παρουσιάζει ομολογία κατά 32,9% και 38,5% με τις RhCE και RhD αντίστοιχα, και είναι απαραίτητη για την έκφραση του συμπλέγματος Rh. Μελέτες έχουν δείξει ότι διευκολύνει την μεταφορά CH₃NH₂/NH₃ καθώς και τη μεταφορά CO₂ διαμέσω της μεμβράνης (Hemker et al., 2003; Endeward et al., 2008).
- **Γλυκοπρωτεΐνη LW (ICAM-4):** Είναι πρωτεΐνη 42kDa, η οποία διαπερνά μια φορά τη μεμβράνη. Παρουσιάζει ομολογία με τα μόρια προσκόλλησης (ICAMs), και συνδέεται με διάφορα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων των ιντεγκρινών, παίζοντας σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του αίματος ή/και των ενδοθηλιακών κυττάρων (Bailly et al., 1995).
- **Γλυκοφορίνη B:** Είναι πρωτεΐνη 20kDa, η οποία φέρει τα αντιγόνα της ομάδας αίματος MNSs. Επίσης, σχηματίζει ετεροδιμερή με την γλυκοφορίνη A και γεφυρώνει το σύμπλοκο Rh με το σύμπλεγμα ζώνη 3/GPA.
- **CD47 (Integrin Associated Protein):** Είναι εκτενώς κατανεμημένη στο ερυθροκύτταρο και διαπερνά την ερυθροκυτταρική μεμβράνη 5 φορές. Είναι μια επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη 50 kDa η οποία συμμετέχει στο σύμπλοκο Rhesus. Υπάρχει σε πολλές ισομορφές σε διάφορους ιστούς όπου αλληλεπιδρά με τις ιντεγκρίνες α₇β₃ και α₂β₁ και στη συνέχεια φτιάχνουν ετεροτριμερή με τις πρωτεΐνες G. Σχηματίζουν, με αυτόν τον τρόπο, ένα σηματοδοτικό σύμπλοκο που εμπλέκεται σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως κυτταρική προσκόλληση, ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, φαγοκυττάρωση καθώς επίσης και σε σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου (Brown and Frazier., 2001; Pettersen, 2000). Στα ερυθροκύτταρα εκφράζεται στην ισομορφή 2 και συνδέεται με την θρομβοσπονδίνη (Gao et al., 1996). Η CD47 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη SIRPα

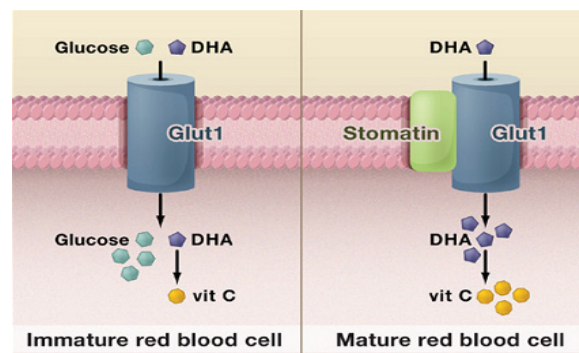
των μακροφάγων παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση των δευτέρων, και κατ'επέκταση την φαγοκυττάρωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων από αυτά. Αποτελεί “δείκτη εαυτού” των ερυθροκυττάρων, και οποιαδήποτε αλλαγή στην στερεοδιαμόρφωσή της (*in vitro* ή κάτω από συνθήκες στρες) (Burger et al., 2012) ή μείωσή της, έχει ως αποτέλεσμα την εκκαθάριση των RBCs από τα μακροφάγα (Oldenborg, 2004; Oldenborg et al., 2000).

A.2.3.3.IV. Υδατοπορίνη (AQP1)

Η υδατοπορίνη (AQP1) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 28 kDa η οποία ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια καναλιών νερού, την οικογένεια των υδατοπορινών, (πάνω από 10 διαφορετικά γονίδια στον άνθρωπο). Εντοπίστηκε για πρώτη φορά στα ερυθροκύτταρα και εκφράζεται ευρέως στην πλασματική μεμβράνη των επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων όπου λειτουργεί ως υδατο-επιλεκτικός πόρος και ρυθμίζει την γρήγορη και αμφίδρομη διέλευση νερού από και προς το κύτταρο (Preston, et al., 1992). Είναι ένα ομοτετραμερές, του οποίου το κάθε μονομερές αποτελείται από 269 αμινοξικά κατάλοιπα που σχηματίζουν δυο διαδοχικές επαναλήψεις τριών διαμεμβρανικών περιοχών α-έλικας με τα δύο άκρα τους να βρίσκονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης (Murata et al., 2000). Το κάθε μονομερές σχηματίζει έναν ανεξάρτητο υδατικό διάυλο (από τον οποίο διέρχονται 3×10^9 μόρια νερού ανά δευτερόλεπτο) και συνδεόμενα μεταξύ τους τα μονομερή, σχηματίζουν τον υδατικό πόρο (Preston et al., 1994). Μελέτες έχουν δείξει ότι η AQP1 και η πρωτεΐνη RhAG δρουν και ως κανάλια μεταφοράς αερίων (CO_2 , O_2), και ότι η απώλεια κάποιας από τις δύο αντισταθμίζεται από την παρουσία της άλλης (Bruce, 2008).

A.2.3.3.V. Μεταφορέας γλυκόζης (Glut1)

Ο μεταφορέας γλυκόζης 1 (Glut1) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 55kDa που, αν και μη ερυθροειδική, στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό (700.000 μόρια/κύτταρο) αντιπροσωπεύοντας το 10% της συνολικής πρωτεϊνικής μάζας τους. Αποτελείται από 492 αμινοξέα και σχηματίζει 12 διαμεμβρανικές περιοχές α-έλικας (Mueckler et al., 1985). Μεταφέρει γλυκόζη με παθητική διάχυση, ενώ υπάρχουν δυο βασικά μοντέλα μεταφοράς στα οποία ο Glut1 παρουσιάζεται αφενώς ως μεταφορέας μίας κατεύθυνσης (uniporter) (Vollers and Carruthers, 2012) όπου μεταφέρει μονόδρομα ένα μόριο εξόζης τη φορά, και αφετέρου ως αντιμεταφορέας (antiporter) όπου μεταφέρει δύο μόρια σε αντίθετες κατευθύνσεις ταυτόχρονα, κάτι που εξηγεί και την πολύπλοκη δομική ασυμετρία του μορίου και την πολυφασική κινητική κατά την μεταφορά (εικόνα 9) (Naftalin., 2008). Ο Glut1 επιτρέπει την αποτελεσματική πρόσληψη της DHA από τα ερυθροκύτταρα, και αυτό επιτυγχάνεται με την βοήθεια της στοματίνης με την οποία συνδέεται, και μάλιστα, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων,



Εικ.9 Η πρόσληψη της DHA. (Ανατύπωση από Troadec and Kaplan 2008).

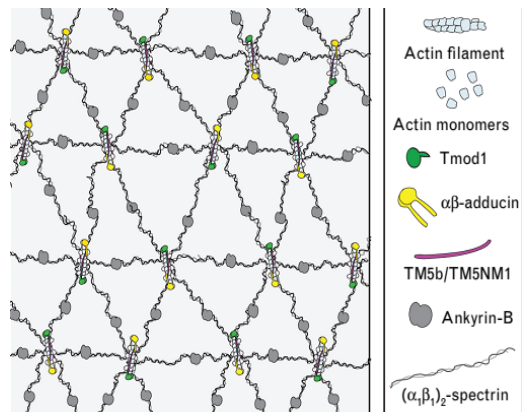
που η έκφραση της στοματινής αυξάνεται, αυξάνεται σημαντικά και η πρόσληψη της DHA (Montel-Hagen et al., 2008). Τέλος, ο Glut1 συνδέεται στην περιοχή του συμπλόκου ζεύξης με τις πρωτεΐνες αδουσίνη και δεματίνη συμβάλλοντας στις μηχανικές ιδιότητες της μεμβράνης (Khan et al., 2008).

A.2.3.3.VI. Στοματινή (Ζώνη 7)

Η στοματινή αποτελεί μια σημαντική μεμβρανοσυνδεδεμένη πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων η οποία λείπει από τα ερυθρά αιμοσφαίρια των ατόμων με κληρονομική σφαιροκυττάρωση δίνοντάς τους χαρακτηριστική μορφολογία (στοματοκύτταρα). Έχει μοριακό βάρος 31 kDa και περιέχει μια υδρόφοβη περιοχή κοντά στην αμινοτελική της περιοχή η οποία είναι φωσφορυλιωμένη (Stewart, 1997). Αλληλεπιδρά με διάφορα κανάλια ιόντων, αλλά κυρίως με την ζώνη 3, την υδατοπορίνη και τον μεταφορέα γλυκόζης (Glut1). Στην σύνδεσή της με τον τελευταίο προκαλεί δομική αλλαγή η οποία ευνοεί την εισροή αφυδροασκορβικού οξέος και εμποδίζει αυτήν της γλυκόζης (Montel-Hagen et al., 2008). Τέλος, θεωρείται κύρια πρωτεΐνη των λιπιδικών σχεδίων (Saltzer and Prohaska., 2001).

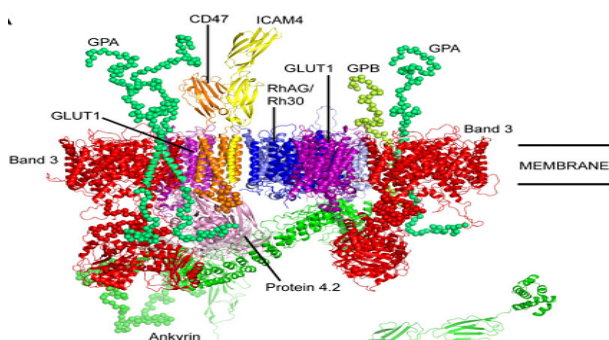
A.2.3.4. Υπομεμβρανικός σκελετός

Ο ερυθροκυτταρικός κυτταροσκελετός σχηματίζεται από ένα εξαγωνικό πλέγμα (εικόνα 10) αποτελούμενο από τετραμερή σπεκτρίνης (α και β υπομονάδες), τα οποία συνδέονται με κοντά νημάτια ακτίνης στα σύμπλοκα ζεύξης και σχηματίζουν δισδυάστατο πλέγμα οριζόντιων αλληλεπιδράσεων, το οποίο προσδένεται με την διπλοστοιβάδα μέσω κάθετων αλληλεπιδράσεων με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες (Fowler., 2013; Bennet and Baines., 2001). Η κάθε εξαγωνική δομή αποτελείται από 6 τριγωνικά επαναληπτικά στοιχεία, το καθένα από τα οποία, με τη σειρά του αποτελείται από ένα σύμπλοκο ζεύξης σε κάθε κορυφή, από ένα σύμπλοκο αγκυρίνης σε κάθε πλευρά, και από 4 ελεύθερα διμερή ζώνης 3 εικ.



Εικ 10. Εξαγωνικό πλέγμα (Ανατύπωση από Gokhin and Fowle., 2016)

Οι κύριες διασυνδέσεις μεταξύ της μεμβράνης και του σκελετού είναι δύο: **το σύμπλοκο αγκυρίνης** και **το σύμπλοκο ζεύξης**.



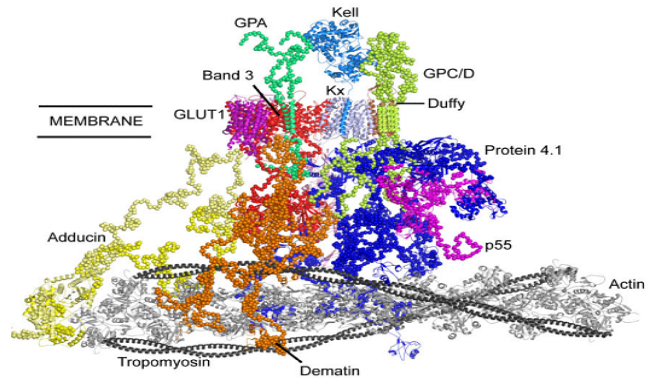
Εικ 11. Σύμπλοκο Αγκυρίνης. (Ανατύπωση από Mankelov et al., 2015).

Το σύμπλοκο αγκυρίνης ή αλλιώς το μακροσύμπλοκο ζώνης 3 (εικόνα 11), συνδέει πρωτεΐνες από δυο μικρότερα σύμπλοκα: **το σύμπλοκο** (της τετραμερούς μορφής) **της ζώνης 3** (ζώνη 3, GPA, πρωτεΐνη 4.2, καρβονική ανυδράση II) και **το σύμπλοκο Rh** (RhAG, RhCE, RhD, CD47, I-CAM-4, GPB) μέσω της άμεσης

σύνδεσης της ζώνης 3, της πρωτεΐνης 4.2 και της RhAG με την αγκυρίνη.

Η πρωτεΐνη 4.2 χρησιμεύει ως γέφυρα μεταξύ των 2 υποσυμπλόκων εξαιτίας της ταυτόχρονης σύνδεσής της με την ζώνη 3 και το CD47. Το μακροσύμπλοκο αγκυρίνης συνδέεται στον κυτταροσκελετό μέσω αλληλεπιδράσεων της αγκυρίνης με την β-σπεκτρίνη (La-Borde et al., 2010).

Το σύμπλοκο ζεύξης αναφέρεται στις πλευρικές συνδέσεις των τετραμερών σπεκτρίνης με τα κοντάνημάτια ακτίνης και την πρωτεΐνη 4.1 (εικόνα 12). Στο σημείο αυτό, προσδένεται πλήθος κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών-προσαρμογέων (α και β αδουσίνη, δεματίνη, πρωτεΐνη 4.1, διμερή τροπομουσίνης, τροπομοντουλίνη και p55), και συνδέουν τον κυτταροσκελετό με τις πρωτεΐνες της μεμβράνης (διμερή ζώνης 3, Glut1, GPC/D, Duffy, GPA, Kell

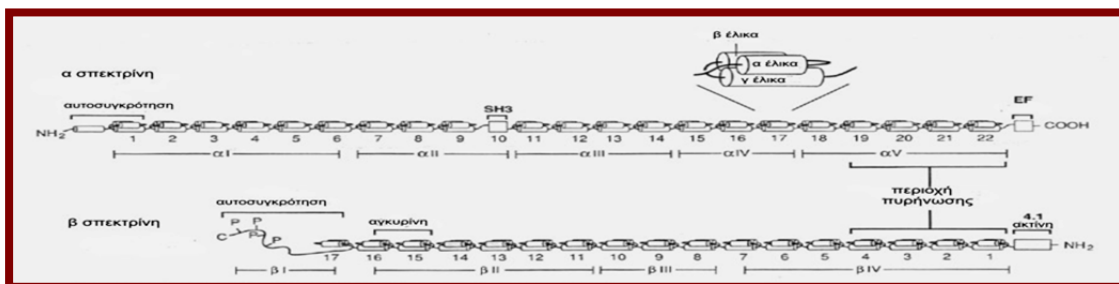


Εικ 12. Σύμπλοκο Ζεύξης. (Ανατύπωση από Mankelov et al., 2015).

και Kx) (Hemming et al., 1995), όπου συγκεκριμένα, οι γλυκοφορίνες C και D αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες p55 και 4.1, τα διμερή της ζώνης 3 με τον Glut1 ως επιπλέον θέσεις σύνδεσης των συμπλόκων ζεύξης, και τέλος, έχει προταθεί ένα επιπλέον μοντέλο (σε ερυθροκύτταρα ποντικού), όπου τα διμερή της ζώνης 3 πλαισιώνονται από ένα σύνολο πρωτεϊνών Rh, Duffy, Kell και Kx τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν στο σύμπλοκο ζεύξης, χωρίς να είναι ακόμα γνωστό το πώς και το πού ακριβώς εντάσσονται στο σύμπλοκο τα τρία τελευταία. (Salomao et al., 2008). Παρακάτω αναλύονται οι κυριότερες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες:

A.2.3.4.I. Σπεκτρίνη

Η σπεκτρίνη είναι μια μεγάλη, ετεροδιμερής, κυρίαρχη πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού η οποία συμβάλει στην διατήρηση της σταθερότητας και δομής της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και στη διατήρηση του κυτταρικού σχήματος. Συνίσταται από 2 μη ταυτόσημες υπομονάδες (α και β σπεκτρίνες) οι οποίες είναι αντιπαράλληλες και συνυφασμένες πλευρικά. Το βασικό δομικό στοιχείο της σπεκτρίνης είναι τα συνεχή ελικοειδή μοτίβα που σχηματίζουν, τις “επαναλήψεις σπεκτρίνης”.



Εικ 13. Ετεροτετραμερές σπεκτρίνης.

Τα ετεροδιμερή σχηματίζονται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των επαναλήψεων α19-α22 του καρβοξυτελικού άκρου της α-αλυσίδας με τις επαναλήψεις β1-β4 του αμινοτελικού άκρου της β αλυσίδας, (περιοχές πυρήνωσης των δύο αλυσίδων). Οι δύο αντιπαράλληλες υπομονάδες σχηματίζουν εύκαμπτα ετεροδιμερή μήκους 100nm, τα οποία με τη σειρά τους ενώνονται κεφαλή με κεφαλή απέναντι από τις περιοχές πυρήνωσης της κάθε αλυσίδας, και σχηματίζουν ένα ετεροτετραμερές μόριο σπεκτρίνης μήκους 200nm (εικόνα 13) (DeSilva et al., 1992). Η σπεκτρίνη εξασφαλίζει ελαστικότητα στα κύτταρα, δρώντας σαν ένα μοριακό ελατήριο που μπορεί να προσαρμόζει το μήκος του ανάλογα με τις πιέσεις και τις ανάγκες του.

Έχει αρκετές θέσεις σύνδεσης με άλλες πρωτεΐνες της μεμβράνης. Η καρβοξυτελική περιοχή της β υπομονάδας (14ⁿ-15ⁿ επανάληψη) αποτελεί θέση σύνδεσης με την αγκυρίνη (Ipsaro et al., 2008), καθώς και με την κυτταροπλασματική περιοχή της ζώνης 3, παρέχοντας την κύρια σύνδεση μεταξύ της λιπιδικής διπλοστιβάδας και του σκελετού. Επιπλέον, κοντά ή μέσα στην αμινοτελική της περιοχή συνδέεται με την ακτίνη (domain ABD ή 2CH), όπου συγκεκριμένα, το πρωτονημάτιο ακτίνης μήκους 37 nm, αποτελούμενο από 12-14 μονομερή, ενώνεται με το άκρο της τετραμερούς δομής της β σπεκτρίνης (Byers and Branton, 1985). Στην αμινοτελική περιοχή, η β σπεκτρίνη συνδέεται και με την πρωτεΐνη 4.1 (Ungewickell et al., 1979).

A.2.3.4.II. Αγκυρίνη

Η αγκυρίνη αποτελείται από 1879 αμινοξέα και συνίσταται από τρεις λειτουργικές περιοχές: μία αμινοτελική μεμβρανοσυνδεδεμένη περιοχή 89 kDa, μία κεντρική περιοχή δέσμευσης με την σπεκτρίνη 62kDa, και ένα καρβοξυτελικό ρυθμιστικό τμήμα 55kDa. Έχει διακριτές θέσεις σύνδεσης για την ζώνη 3 και την σπεκτρίνη μεσολαβώντας στην σύνδεση της μεμβράνης με τον σκελετό, και υφίσταται στα 100.000 αντίγραφα/κύτταρο. Η περιοχή σύνδεσης με την σπεκτρίνη περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 911-1068 (ZU5 domain-Ank) (Ipsaro and Mondragon A. 2010). Το αμινοτελικό άκρο της αγκυρίνης περιέχει θέσεις σύνδεσης για την ζώνη 3 καθώς και για ένα πλήθος άλλων πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων των CD47, Na⁺-K⁺ ATPάση, πρωτεΐνη 4.2 και RhAG (Nicolas et al., 2003). Τα κατάλοιπα της αγκυρίνης που συνδέονται με την πρωτεΐνη 4.2 είναι τα 402-827 (Su et al., 2006).

A.2.3.4.III. Ακτίνη (Ζώνη 5)

Η ακτίνη αποτελεί σφαιρική πρωτεΐνη 375 αμινοξέων. Το μονομερές ακτίνης G (Globular [G] actin) πολυμερίζεται για να σχηματίσει κοντά, λεπτά και εύκαμπτα νημάτια ακτίνης (Filamentous [F] actin) με διάμετρο περίπου 7nm. Τα μικρονημάτια ακτίνης είναι άφθονα στον υπομεμβρανικό σκελετό και σχηματίζουν ένα δίκτυο που παρέχει μηχανική υποστήριξη, καθορίζει το σχήμα του κυττάρου και επιτρέπει την κυτταρική παραμοσφοσιμότητα. Τα νημάτια ακτίνης ενώ συμμετέχουν στις οριζόντιες αλληλεπιδράσεις (σύμπλοκα ζεύξης) μπορούν ταυτόχρονα να παρέχουν πρόσθετες θέσεις πρόσδεσης με την διπλοστιβάδα μέσω των συνδέσεων αβ-αδουσίνης με τη ζώνη 3, και 4.1 πρωτεΐνης με την ζώνη 3 και την GPC. Νεότερα στοιχεία δείχνουν ότι τα νημάτια ακτίνης είναι δυναμικές δομές των οποίων η συναρμολόγηση και αποσυναρμολόγηση παίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία των ερυθροκυττάρων. Από την άλλη, αν και δυναμικές

δομές, τα μήκη τους είναι ιδιαίτερα ομοιόμορφα και σταθερά (37nm) (Gokhin and Fowler., 2016).

A.2.3.4.IV. Πρωτεΐνη 4.1

Η μοριακού βάρους 80kDa πρωτεΐνη 4.1 είναι απαραίτητη για το σχήμα και την ακεραιότητα των κυττάρων παρέχοντας συνδέσεις μεταξύ του σκελετού και της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Αποτελείται από 4 δομικά και λειτουργικά ανεξάρτητες περιοχές: το αμινοτελικό άκρο (**FERM**) **30kDa** για την σύνδεση με την GPC, την καλμοντουλίνη και την p55, μια περιοχή **16kDa** η οποία ενδεχομένως να επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις της 4.1 με την ζώνη 3, την GPC, την σπεκτρίνη και την ακτίνη, μια περιοχή (**SABD**) **10kDa** για την σύνδεση με την σπεκτρίνη-ακτίνη, και το καρβοξυτελικό άκρο (**CTD**) **22/24kDa** (Diakowski et al., 2006). Η διαφορά 2 kDa του καρβοξυτελικού άκρου προκαλεί την ύπαρξη δύο ισομορφών 4.1a και 4.1b είναι αποτέλεσμα μιας μετά-μεταφραστικής τροποποίησης της ασπαραγίνης (Asn⁵⁰² σε Asp⁵⁰²) η οποία λαμβάνει χώρα στην γήρανση των ερυθροκυττάρων και ως εκ τούτου το καθιστά αποτελεσματικό δείκτη της ηλικίας τους (Inaba et al., 1992).

A.2.3.4.V. Πρωτεΐνη 4.2 (Παλλιδίνη)

Είναι περιφερική μεμβρανική πρωτεΐνη και μία από τις πιο άφθονες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Συνδέει τα δύο σημαντικά σύμπλοκα όπως είναι αυτό της ζώνης 3 με σύμπλοκο Rh, μέσω αλληλεπιδράσεων με το αμινοτελικό άκρο της ζώνης 3 και με το CD47 καθώς επίσης μέσω των αλληλεπιδράσεων με την αγκυρίνη, την σπεκτρίνη και την πρωτεΐνη 4.1. Η απουσία της παλλιδίνης εξαιτίας μεταλλάξεων οδηγεί σε κληρονομική σφαιροκυττάρωση, τονίζοντας τον σημαντικό ρόλο της στην διατήρηση της δομικής ακεραιότητας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Μάλιστα, η σύνδεσή της με το CD47 φαίνεται να συμβάλλει στην επιβίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην κυκλοφορία και ομοίως να ευθύνεται για αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη γήρανση και αποθηκευτική βλάβη των κυττάρων (Satchwel et al. 2009).

A.2.3.4.VI. Αδουσίνη

Στα ερυθροκύτταρα, η αδουσίνη υπάρχει σε μορφή ετεροδιμερών ή ετεροτετραμερών αποτελούμενη από την α και β υπομονάδα. Αλληλεπιδρά με την ακτίνη, τη σπεκτρίνη και με τη ζώνη 3 και σταθεροποιεί τις συνδέσεις μεταξύ ακτίνης και β-σπεκτρίνης συμβάλλοντας στην σταθερότητα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Anong et al., 2009). Επίσης συνδέεται με την καλμοντουλίνη όπως και η πρωτεΐνη 4.1 (Mische et al., 1987). Αποτελείται από 3 περιοχές: μία N-τελική σφαιρική περιοχή, μία συνδετική περιοχή, και μια C-τελική ινώδη περιοχή αποτελούμενη κυρίως από υδρόφοβα κατάλοιπα. Η N-τελική περιοχή συνδέεται με τα νημάτια ακτίνης, ενώ η C-τελική περιοχή ευθύνεται για τις αλληλεπιδράσεις με τις σπεκτρίνη, ακτίνη, καλμοντουλίνη και ζώνη 3, αν και φαίνεται να απαιτούνται οι C-τελικές MARCKS περιοχές της β αδουσίνης για την κάλυψη των άκρων των νηματίων ακτίνης (Franco and Low., 2010).

A.2.3.4.VII. Τροπομοντουλίνη, Τροπομυοσίνη

Η τροπομυοσίνη στα ερυθροκύτταρα σχηματίζει διμερή περίπου ίδιου μήκους με αυτό των πρωτονηματίων ακτίνης ορίζοντας με αυτόν τον τρόπο το μήκος των δεύτερων

ενώ η τροπομοντουλίνη καλύπτει τα άκρα των νηματίων. Περιέχει 7 διαδοχικές επαναλήψεις οι οποίες δεσμεύουν 7 μονομερή ακτίνης (Hitchcock-DeGregori 2008). Η περιοχή αλληλεπίδρασης της τροπομυοσίνης με την τροπομοντουλίνη είναι το N-τελικό της άκρο και η συγγένεια της πρώτης με την ακτίνη διπλασιάζεται με την παρουσία της δεύτερης (Weber et al., 1999).

A.2.3.4.VIII. Πρωτεΐνη p55

Η πρωτεΐνη p55 εντοπίστηκε για πρώτη φορά στα ερυθροκύτταρα και συμβάλει στην σταθερότητα και μηχανική υποστήριξη της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης μέσω των αλληλεπιδράσεων με την πρωτεΐνη 4.1 και με την GPC. Ανήκει σε μια οικογένεια των πρωτεϊνών MAGUKs αφού η C-τελική της περιοχή έχει ενεργότητα γουανιλικής κινάσης (Anderson., 1996).

A.2.3.4.IX. Δεματίνη (Ζώνη4.9)

Η δεματίνη είναι μια τριμερής πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από μια μικρή περιοχή πρόσδεσης με την ακτίνη, συμβάλλοντας στην σταθεροποίηση των νηματίων ακτίνης στο σύμπλοκο ζεύξης, επηρεάζοντας την σταθερότητα της μεμβράνης. Έχει δύο υπομονάδες 48kDa και μια 52kDa. Η φωσφορυλιωμένη της μορφή έχει μειωμένη συγγένεια με την ακτίνη εξαιτίας μιας διαμορφωτικής αλλαγής που προκαλεί η φωσφορυλίωση στην περιοχή του καλύμματος (Frank et al., 2004).

A.2.3.5 Κυτοσολικές πρωτεΐνες

Το εσωτερικό του ερυθροκυττάρου περιέχει εκτός από την αιμοσφαιρίνη και μια σειρά από ένζυμα (πρωτεάσες, κινάσες, φωσφατάσες, αντιοξειδωτικά ένζυμα), γλουταθειόνη, 2,3 διφωσφορογλυκερόλη, ηλεκτρολύτες και ενδιάμεσα μεταβολικά προϊόντα φωσφορυλίωσης (Beutler, 1978).

A.2.3.5.I. Καλπαΐνες

Η καλπαΐνη είναι μια ενδοκυτταρική Ca^{+2} εξαρτώμενη πρωτεάση κυστεΐνης και ένα από τα σημαντικότερα πρωτεολυτικά ένζυμα. Στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα συναντάται κυρίως η μ-καλπαΐνη ενώ η m-καλπαΐνη (calpain-2) απουσιάζει (Inomata et al., 1993). Όσον αφορά στο μηχανισμό ενεργοποίησής τους, στο τμήμα της πρωτεάσης της κυστεΐνης, υπάρχουν δυο δομές οι οποίες συντήκονται για να σχηματίσουν μια λειτουργική πρωτεάση μόνο όταν συνδέονται με το Ca^{+2} (Sorimachi et al., 2011). Στόχοι της ενεργοποιημένης καλπαΐνης είναι κυρίως οι διαμεμβρανικές και μεμβρανο-συνδεδεμένες πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων της αντλίας Ca^{+2} (PMCA), των πρωτεϊνών των ζωνών 1, 2, 2.1, 3, 4.1 και 4.2 καθώς και της αιμοσφαιρίνης. Ενεργοποιείται σε ασθένειες γήρατος καθώς επίσης και κατά την ερυθρόπτωση (Lang et al., 2014).

A.2.3.5.II. Υπεροξειρεδοξίνες

Οι υπεροξειρεδοξίνες αποτελούν εξαιρετικά άφθονα και ευρέως καταναμημένα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Η υπεροξειρεδοξίνη 2 (Px2) που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των ερυθροκυττάρων ως διμερές και δεκαμερές, χρησιμοποιεί υπολείμματα κυστεΐνης για

να αποικοδομήσει τα υπεροξειδία του υδρογόνου. Ανταγωνίζεται αποτελεσματικά την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης για την εκκαθάριση των χαμηλών επιπέδων υπεροξειδίων συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που προέρχονται από την αυτό-οξειδωση της αιμοσφαιρίνης με την οποία και συνδέεται είτε ως εκκαθαριστής υπεροξειδίων είτε ως πρωτεΐνη συνοδός (Low et al., 2008). Έχει βρεθεί ότι αν και κυτοσολική πρωτεΐνη, προσδένεται και στην μεμβράνη σε καταστάσεις έντονου οξειδωτικού στρές και αυξημένου ενδοκυτταρικού Ca^{+2} (Moore et al., 1991; Antonelou et al., 2010).

A.2.3.5.III. Πρωτεΐνες Θερμικού Σοκ (Hsp)

Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsp) είναι μοριακές συνοδοί οι οποίες συμβάλλουν στην σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και παίζουν σημαντικό ρόλο στη επιβίωση του κυττάρου σε καταστάσεις στρές (Gething and Sambrook, 1992). Στα ερυθροκύτταρα εντοπίζεται η οικογένεια των Hsp 70. Συγκεκριμένα, κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των ερυθροκυττάρων, αυξάνεται η συγγένεια των Hsp 70 με την μεμβράνη όπου αλληλεπιδρούν με τις μερικώς αλλοιωμένες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες για να τις προστατεύουν και να τις σταθεροποιούν (Gudi and Gupta., 1993; Antonelou et al., 2010).

A.2.3.5.IV. Καθεψίνες

Η καθεψίνη E ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια πρωτεασών ασπαρτικού και σε περιπτώσεις *in vivo* γήρανσης των ερυθροκυττάρων αφού ενεργοποιηθεί, απελευθερώνεται στο κυτοσόλιο ως αποτέλεσμα βλαβών των μεμβρανικών πρωτεϊνών που προκύπτουν από την αυξημένη σύνδεση της αιμοσφαιρίνης (Yamamoto et al., 1989).

A.2.3.5.VI. Κλαστερίνες

Οι κλαστερίνες είναι ετεροδιμερείς γλυκοπρωτεΐνες, μοριακού βάρους 75-80kDa οι οποίες λειτουργούν σε σωματίδια υψηλής πυκνότητας σε λιποπρωτεΐνη, ως απολιποπρωτεΐνες, και έχει αποδειχθεί ότι συνδέονται με μερικώς ξεδιπλωμένες πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων περιοχών, και, μέσω ενός ATP-ανεξάρτητου τρόπου αναστέλλουν τη συσσωμάτωσή τους, δρώντας ως ομόλογα των HSPs. Η εκκρινόμενη απολιποπρωτεΐνη /κλαστερίνη (sCLU) αποτελεί συστατικό τόσο του κυτοσολίου όσο και των δύο πλευρών της μεμβράνης, όπου στην ενδοκυτταρική της πλευρά συνδέεται με τον AE1 και την Hb ή/και με μη κυτταροσκελετικές μεμβρανικές πρωτεΐνες, ενώ στην εξωκυτταρική της πλευρά συνδέεται επίσης με τον AE1, το CD59, IgGs ή ειδικούς υποδοχείς sCLU (Antonelou et al., 2011a). Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις φαίνεται να εμπλέκουν τις sCLU στην αποβολή οξειδωμένου/ελαττωματικού υλικού μέσω της κυστιδιοποίησης προλαμβάνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την πρόωρη εκκαθάριση των ερυθροκυττάρων (Antonelou et al., 2011b). Επιπρόσθετα, εμπλέκονται λειτουργικά στους μηχανισμούς σηματοδότησης σε γηρασμένα, στρεσαρισμένα και σε παθολογικά ερυθροκύτταρα. Τέλος, τα μειωμένα επίπεδα sCLU (μέσω της εξωκυστιδιοποίησης) μετά από την έκθεση των κυττάρων σε ενδογενείς και εξωγενείς στρεσογόνους παράγοντες, σχετίζονται στενά με τα επίπεδα κυτταρικής γήρανσης και τους δείκτες οξειδοαναγωγικής ανισορροπίας,

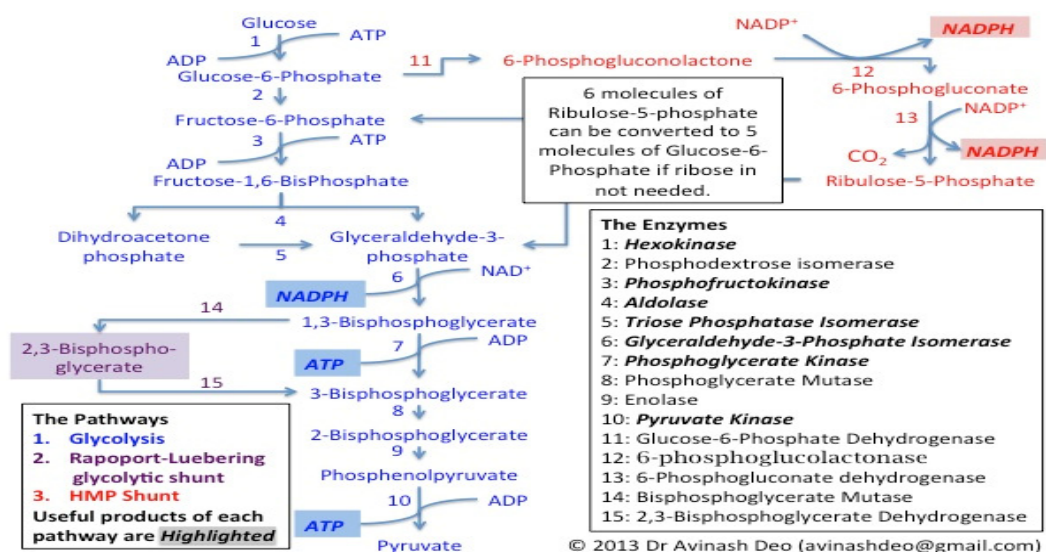
αναδεικνύοντάς τα ευαίσθητους βιοδείκτες της γήρανσης και του κυτταρικού στρες (Antonelou et al., 2011a).

A.3. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΟΥ

A.3.1. Γενικά

Εξαιτίας της έλλειψης οργανιδίων, τα ερυθροκύτταρα δεν έχουν τη δυνατότητα παραγωγής ενέργειας μέσω του κύκλου του Krebs. Ως εκ τούτου στηρίζονται σε ένα δίκτυο από μεταβολικά μονοπάτια παραγωγής ενέργειας για την παραγωγή μεταβολιτών όπως τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), 2,3 διφωσφογλυκερινικό (2,3 DPG) και ανηγμένο νικοτιναμιδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο (NADH). Το ATP αποτελεί το ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου για τις πολλές βιοχημικές του αντιδράσεις και τα επίπεδά του επηρεάζουν την σταθερότητα της μεμβράνης και ως εκ τούτου την επιβίωση των κυττάρων (Nakao et al., 1962), το 2,3 DPG ρυθμίζει την συγγένεια της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο και το NADH δρά ως συμπαράγοντας ο οποίος αποτρέπει την οξείδωση της αιμοσφαιρίνης σε μεθαιμοσφαιρίνη μέσα στο ερυθροκύτταρο (Yoshida and Shevkorlyas, 2010).

Τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια είναι: το μονοπάτι της αναερόβιας διάσπασης της γλυκόλυσης (*Embden-Meyerhof pathway*) το οποίο ευθύνεται για το 90% του παραγόμενου ATP, το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (*PPP*) το οποίο σε φυσιολογικές συνθήκες ευθύνεται για το 10% του παραγόμενου ATP και αποκρίνεται στο οξειδωτικό στρες, και τον κύκλο *Rapoport-Lumbering* για την παραγωγή του 2,3 DPG από το 1,3 DPG (εικόνα 14). Η μετάβαση από το ένα μονοπάτι στο άλλο καθορίζεται από την λειτουργία (μεταφορά οξυγόνου) και τοπολογία των ερυθροκυττάρων (περιφερικοί ιστοί, πνεύμονες) καθώς σε καταστάσεις έντονου οξειδωτικού στρες (έκθεση σε φάρμακα, αυξημένη πίεση οξυγόνου στους πνεύμονες) γίνεται μετάβαση στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Αντίθετα, στους περιφερικούς ιστούς όπου η μερική πίεση οξυγόνου είναι χαμηλή ενώ ταυτόχρονα τα ερυθροκύτταρα καταπονούνται μηχανικά και χάνουν κατιόντα, γίνεται μετάβαση στη γλυκόλυση για την παραγωγή μορίων ATP για την διατήρηση της ενδοκυττάριας ισορροπίας ιόντων (Greer, 2014).



Εικ 14. Τα βασικά μονοπάτια παραγωγής ενέργειας του ερυθροκυττάρου. (www.allaboutblood.com)

Επίσης, βιοχημικές μελέτες έχουν αναδείξει ότι οι αρνητικά φορτισμένες N-τελικές περιοχές του ΑΕ1 συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της δεοξυαιμοσφαιρίνης, η σύνδεση με την οποία προκαλεί την απελευθέρωση και ενεργοποίηση γλυκολυτικών ενζύμων, παρέχοντας μια οξυγονο-εξαρτώμενη μεταβολική ρύθμιση στα ερυθροκύτταρα (Castagnola et al., 2010).

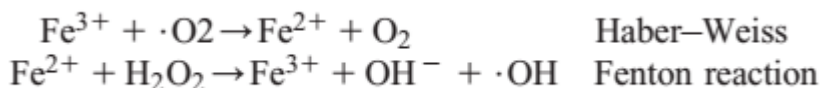
Σε συνθήκες αποθήκευσης λαμβάνουν χώρα πολλές μεταβολές όσον αφορά στον μεταβολισμό των ερυθροκυττάρων. Τα ερυθροκύτταρα αποθηκεύονται στους 4°C, θερμοκρασία που βοηθά στην διατήρηση της λειτουργικότητας και βιωσιμότητας των κυττάρων μέσω της επιβράδυνσης του μεταβολικού τους ρυθμού. Κατά τη διάρκεια της γλυκόλυσης μέσα στη μονάδα μετάγγισης παράγεται γαλακτικό οξύ το οποίο συσσωρεύεται στο υπερκείμενο και η προκύπτουσα οξέωση (<6,5 pH) αναστέλει την γλυκόλυση και οδηγεί σε προοδευτική μείωση του ATP, του NADH και του 2,3DPG. Η χαμηλή θερμοκρασία σε συνδυασμό με το μειωμένο pH επηρεάζουν τόσο την ενεργότητα των ενζύμων της γλυκόλυσης συμπεριλαμβανομένων της εξωκινάσης και πυροσταφυλικής κινάσης όσο και την συγγένεια πρόσδεσης της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο (D'Alessandro et al., 2012). Συγκεκριμένα, ενώ οι πρώτες δύο εβδομάδες της αποθήκευσης δείχνουν αυξημένα επίπεδα των μεταβολιτών της γλυκόλυσης, μετά από αυτό το χρόνο παρατηρείται σημαντική κατανάλωσή τους και εκτροπή προς την οξειδωτική φάση των φωσφορικών πεντοζών, ως απάντηση στον υψηλό κορεσμό του οξυγόνου και στο οξειδωτικό στρές. Το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών παράγει NADPH, το οποίο με τη σειρά του αφ' ενός ανάγει την οξειδωμένη γλουταθειόνη προς σχηματισμό της ανηγμένης της μορφής για την μείωση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, και αφ' ετέρου παρέχει αναγωγικά ισοδύναμα για την αναγωγή της μεθαιμοσφαιρίνης και τη μετατροπή της οξυαιμοσφαιρίνης από μεθαιμοσφαιρίνη (D'Alessandro and Zolla, 2013).

A.3.2. Οξειδωτικό Στρες στα Ερυθροκύτταρα

Ο όρος "ROS" αναφέρεται α) σε όλους τους ασταθείς μεταβολίτες του μοριακού οξυγόνου (O_2) που έχουν υψηλότερη δραστικότητα από αυτό, όπως είναι οι ρίζες υπεροξειδίου ($O_2\cdot$) και υδροξυλίου ($HO\cdot$) και β) σε μόρια-μη ρίζες (non radicals), που σχηματίζονται από την ένωση των ασύζευκτων ηλεκτρονίων των ελευθέρων ριζών, όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (Birben et al., 2012). Τα ερυθροκύτταρα εκτίθενται συνεχώς τόσο σε ενδογενείς όσο και σε εξωγενείς πηγές ROS οι οποίες μπορούν να βλάψουν και να παρεμποδίσουν την ομαλή λειτουργία τους. Οι μεμβρανικές και κυτοσολικές πρωτεΐνες δέχονται επίθεση από τις δραστικές ρίζες οι οποίες προκαλούν αμινοξικές τροποποιήσεις. Από τη άλλη, τα ερυθροκύτταρα εξαιτίας της έλλειψης πρωτεϊνοσύνθεσης αδυνατούν να αναπληρώσουν τα εξαντλημένα πρωτεϊνικά μόρια και έτσι συσσωρεύουν τις αλλοιώσεις αυτές μέχρι το τέλος της ζωής τους.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, μια μικρή ποσότητα οξυαιμοσφαιρίνης υφίσταται οξείδωση, σχηματίζοντας μεθαιμοσφαιρίνη (η οποία έχει οξειδωμένο Fe^{3+} και δεν μπορεί να δεσμεύει οξυγόνο) και ελεύθερες ρίζες. Η μεθαιμοσφαιρίνη είναι από την φύση της ασταθές μόριο και διασπάται σε σφαιρίνη και ελεύθερη αίμη τα οποία με τη σειρά τους σε συνδυασμό με τις ελεύθερες ρίζες δημιουργούν επικίνδυνες ρίζες υδροξυλίου

προκαλώντας οξειδωτικές βλάβες στα λιπίδια της μεμβράνης και στις πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, τα μόρια της μεθαιμοσφαιρίνης συσσωρεύονται στο εσωτερικό της μεμβράνης και παράγουν περαιτέρω ROS συμμετέχοντας στις αντιδράσεις Fenton και Harber-Weiss (Fenton, 1984).



Επιπλέον, τα αιμοχρώματα (οξειδωμένη μεθαιμοσφαιρίνη) έχοντας μεγάλη συγγένεια με το κυταροπλασματικό τμήμα του AE1, συνδέονται και προκαλούν συσσωμάτωσή του, δημιουργούν το νεοαντιγόνο γήρανσης και οδηγούν στην κυτταρική αναγνώριση και εκκαθάριση (Delobel et al., 2010).

Υπο κανονικές συνθήκες τα ερυθροκύτταρα προστατεύονται από οξειδωτικές βλάβες λόγω του αργού ρυθμού αυτο-οξείδωσης της αιμοσφαιρίνης, λόγω της αναγωγής της μεθαιμοσφαιρίνης η οποία ανάγει ξανά την μεθαιμοσφαιρίνη σε οξυαιμοσφαιρίνη και της ύπαρξης κυτοσολικών και μεμβρανικών αντιοξειδωτικών τα οποία εξουδετερώνουν τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες. Σε συνθήκες αποθήκευσης όλοι αυτοί οι προστατευτικοί μηχανισμοί διαταράσσονται. Η αυξημένη οξείδωση της αιμοσφαιρίνης εξαιτίας της αυξημένης μερικής πίεσης του οξυγόνου και εξαιτίας της οξέωσης αφενός, και η μείωση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών λόγω των μεταβολικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα κατά την αποθήκευση, αφετέρου, οδηγούν σε αυξημένο οξειδωτικό στρες των ερυθροκυττάρων το οποίο αποτελεί την κύρια αιτία βλαβών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Yoshida and Shevkoplyas., 2010; D'Alessandro et al. 2012; Mohanty et al., 2014; Kriebardis et al., 2007; Antonelou et al., 2010).

A.3.3. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του ερυθροκυττάρου

Για να αντισταθμίσουν τις οξειδωτικές βλάβες, τα ερυθροκύτταρα είναι εξοπλισμένα με μια σειρά αντιοξειδωτικών μηχανισμών (ενζυμικών και μη ενζυμικών) οι οποίοι λειτουργώντας σε συνέργεια, αμύνονται έναντι των ελευθέρων ριζών, συμβάλλοντας στην προστασία των κυττάρων. Τα σημαντικότερα ενζυμικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), την καταλάση (CAT), την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), την αναγωγία της γλουταθειόνης (GR), ενώ τα μη ενζυμικά (βλ παράγραφος A.1.2) περιλαμβάνουν την βιταμίνη E, την βιταμίνη C, τα φλαβονοειδή, τιςθειόλες (GSH), το ουρικό οξύ, την φερριτίνη, την χολερυθρίνη και διάφορα άλλα συστατικά που λειτουργούν ως ενζυμικοί συμπαράγοντες (χαλκός, σίδηρος, σελήνιο, μαγγάνιο, συνένζυμο Q10 κ.α) (Rahman, 2007).

A.3.3.1. Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Τα ανωτέρω αντιοξειδωτικά ένζυμα μετατρέπουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου σε μη δραστικές μορφές. Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά, ενδοκυτταρικά ενζυματικά αντιοξειδωτικά, που καταλύει την μετατροπή των ανιόντων υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο. Στους ανθρώπους υπάρχει σε τρεις ισομορφές από τις οποίες οι δύο βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου και μία εξωκυτταρικά. Η εξουδετέρωση των ανιόντων υπεροξειδίου πραγματοποιείται με

τη μετάβαση μέσω διαδοχικών οξειδωτικών και αναγωγικών κύκλων των ιόντων μετάλλων μετάπτωσης, στην δραστική της θέση (Chaudiere and Ferrari., 1999). Η καταλάση υφίσταται ως τετραμερές όπου το κάθε μονομερές περιέχει μια ομάδα αίμης στο ενεργό κέντρο. Μετατρέπει το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο και δεσμεύει το NADPH ως αναγωγικό ισοδύναμο για να προλαμβάνει την οξειδωτική απενεργοποίηση του ενζύμου από το H₂O₂ καθώς μετατρέπεται σε νερό (Kirkman et al., 1999). Ένα μόριο καταλάσης μετατρέπει περίπου 6 εκατ. μόρια H₂O₂ σε νερό και οξυγόνο/λεπτό (Mates et al., 1999). Η GPx είναι υπεύθυνη για την αναγωγή του H₂O₂ και των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων και αποτελεί το πιο σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό για την προστασία της μεμβράνης. Περιέχει το αμινοξύ σεληνοκυστεΐνη στην ενεργή τους θέση, και χρησιμοποιώνταςθειόλες (όπως GSH) ανάγει το H₂O₂ και τα υπεροξειδία των λιπιδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες τους (Flohé, 1988). Τέλος, η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι μια φλαβοπρωτεΐνη που επιτρέπει την μετατροπή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή (GSH) μέσω της οξείδωσης της NADH σε NAD⁺ (Papas, 1999c).

A.3.3.2. Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Από τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά, (όπως αναφέρονται λεπτομερώς στο κεφάλαιο A.1.2) η γλουταθειόνη αποτελεί το σημαντικότερο μη ενζυμικό ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων κατά των ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων και των ελευθέρων ριζών, με το να διατηρεί τις SH-ομάδες των πρωτεϊνών της μεμβράνης στην ανηγμένη τους μορφή, η οξείδωση των οποίων προκαλεί αλλοιώσεις στην κυτταρική δομή και λειτουργία. Επίσης, με τη βοήθεια της GPx αποτοξινώνει από τα υπεροξειδία του υδρογόνου και τα υπεροξειδία των λιπιδίων, δρώντας ως δότης ηλεκτρονίων, ενώ παράλληλα, δίνει πρωτόνια στα λιπίδια της μεμβράνης και τα προστατεύει από τις οξειδωτικές επιθέσεις, και δρά ως συμπαραγοντας σε διάφορα αντιοξειδωτικά ένζυμα (GPx και τρανσφεράσες) (Sies, 1986).

A.4. ΓΗΡΑΝΣΗ ΤΟΥ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΟΥ - *In Vivo* Σηματοδοτικά Μονοπάτια και Δείκτες των RBC

Τα ερυθροκύτταρα έχουν συγκεκριμένη διάρκεια ζωής 120 ± 4 ημερών, κάτι που υποδηλώνει την ύπαρξη καλά οργανωμένων μηχανισμών, υπεύθυνων για τον προγραμματισμό της, και για τη μη τυχαία απομάκρυνσή των γηρασμένων κυττάρων από την κυκλοφορία. Μέχρι το τέλος της ζωής του το ανθρώπινο ερυθροκύτταρο έχει αντιμετωπίσει επιτυχώς έναν μεγάλο αριθμό κινδύνων όπως είναι οι δίοδοι από τα στενά τριχοειδή και τις σχισμές του σπληνός, οι περιοδικές υψηλές πιέσεις της ροής του αίματος, οι καταστάσεις έντονου στρες και οι εξαιρετικά υπέρτονες συνθήκες. Ως εκ τούτου υποβάλλονται σε μεταβολικές και φυσικές μεταβολές που συνδέονται με την διαδικασία της γήρανσης.

Η γήρανση των ερυθροκυττάρων αντιπροσωπεύει ένα σύνολο χρονοεξαρτώμενων αλλά όχι κατ' ανάγκη γραμμικών μοριακών γεγονότων, τα οποία τελικά οδηγούν σε

κυτταρική εκκαθάριση (ερυθροφαγοκυττάρωση). Η διαδικασία χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση δομικών, μεταβολικών και λειτουργικών τροποποιήσεων όπως κυτταρική συρρίκνωση, αναδιαμόρφωση της μεμβράνης, μικροκυστιδιοποίηση, τροποποιήσεις της αιμοσφαιρίνης και προοδευτική βλάβη κυτταρικής ομοιόστασης και της αντιοξειδωτικής άμυνας (Antonelou et al., 2010). Ισχυρά σήματα εκκαθάρισης είναι η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης και η ειδική σύνδεση των αυτόλογων ανοσοσφαιρινών (IgGs) στο νεοαντιγόνο γήρανσης που προκύπτει από δομικές αλλαγές της ζώνης 3. Η αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας, η μη ενζυματική γλυκοζυλίωση της Hb και η απαμίδωση της πρωτεΐνης 4.1b σε 4.1a χρησιμοποιούνται ευρέως ως ευαίσθητοι δείκτες της ηλικίας των ερυθροκυττάρων. Η διαδικασία της γήρανσης συνδέεται (τουλάχιστον μορφολογικά) με την απόπτωση που πιθανώς διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση των καλπαϊνών και κασπασών, με την ενεργοποίηση των κασπασών 3 και 8 να θεωρούνται ένδειξη της γήρανσης των RBCs (Mandal et al., 2003; Mandal et al., 2005).

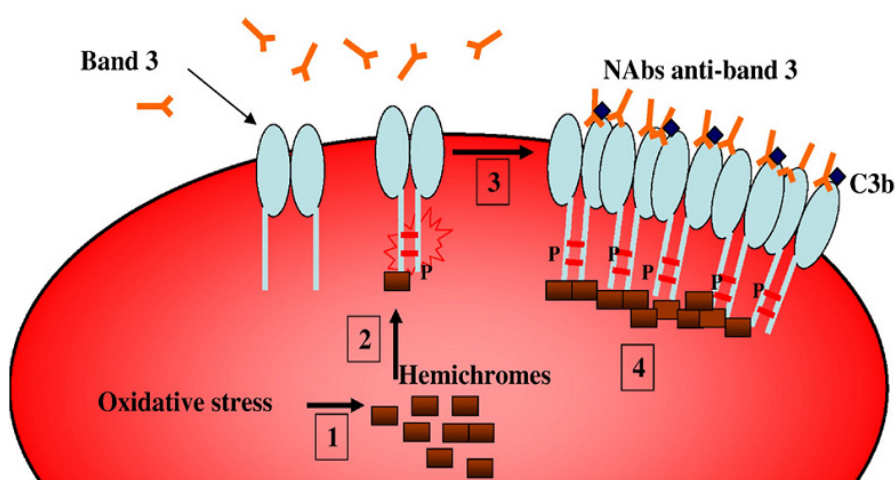
A.4.1. Μικροκυστιδιοποίηση

Τα μικροκυστίδια είναι υποκυτταρικά σωματίδια 0,1μm-1,0μm που απελευθερώνονται απευθείας από τη πλασματική μεμβράνη ως μέρος της ερυθροκυτταρικής ωρίμανσης. Εκφράζουν δείκτες επιφάνειας οι οποίοι επιτρέπουν την αναγνώριση της προέλευσής τους, φέρουν κυταροπλασματικές και μεμβρανοσυνδεδεμένες πρωτεΐνες καθώς και βιοδραστικά λιπίδια, ενώ δεν αποτελούν αντίγραφα των μητρικών κυττάρων. Η μεμβρανική μικροκυστιδιοποίηση είναι μια καλά οργανωμένη διαδικασία η οποία αν και επιταχύνεται ταχύτερα σε γηραιότερα κύτταρα (Willekens et al., 2003), μπορεί να δράσει υπέρ και κατά αυτών, βοηθώντας στην πρώτη περίπτωση στην απομάκρυνση κατεστραμμένων και σηματοδοτικά ενεργών συστατικών των κυττάρων, και επιφέροντας την απώλεια μεμβράνης και αιμοσφαιρίνης στη δεύτερη περίπτωση. Η εξωκυττάρωση των μη λειτουργικών πρωτεϊνών και δεικτών γήρανσης μέσω κυστιδιοποίησης όχι μόνο προστατεύει τα κύτταρα από τον πρόωρο θάνατο, αλλά αποδεικνύει ότι τα ίδια σιινάλα αναγνώρισης μεσολαβούν για την ραγδαία απομάκρυνση των γηρασμένων ερυθροκυττάρων και των κυστιδίων από την κυκλοφορία (Willekens et al., 2008). Κατά την γήρανση, με την εξωκυστιδιοποίηση τα κύτταρα χάνουν μεμβράνη αυξάνοντας την πυκνότητά τους με αποτέλεσμα να χάνουν την ικανότητα ελαστικής τους παραμόρφωσης (Bosch et al., 1992). Τα μικροκυστίδια ασκούν τη δράση τους διεγείροντας τα κύτταρα-στόχους είτε μέσω υποδοχέων είτε μέσω άμεσης μεταφοράς του περιεχομένου τους, αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι των παραγώγων αίματος που προορίζονται για μετάγγιση, και παρουσιάζουν προ-πηκτική δράση (Jin et al., 2005).

A.4.2. Μονοπάτι Γήρανσης που βασίζεται στη Ζώνη-3

Μελέτες έχουν δείξει ότι η σύνδεση των NABs με το νεοαντιγόνο γήρανσης που προκύπτει από την πρωτεολυτική θραύση (Kay, 2005) και την συσσωμάτωση της ζώνης 3 (Pantaleo et al., 2008) αποτελεί ισχυρό σήμα κυτταρικής γήρανσης *in vivo*. Η διαμόρφωση του νεοαντιγόνου γήρανσης σχετίζεται με την οξειδωση που πραγματοποιείται μέσω των ελευθέρων ριζών. Τα αιμοχρώματα που προκύπτουν από την οξειδωμένη αιμοσφαιρίνη μετατοπίζονται στην μεμβράνη όπου συνδέονται με την κυταροπλασματική πλευρά της ζώνης 3 και προκαλούν οξειδωση και συσσωμάτωσή της (εικόνα 15) (Pantaleo et al.,

2008). Επίσης, η κυτταροπλασματική πλευρά της ζώνης 3 αποτελεί υπόστρωμα για κινάσες τυροσίνης οι οποίες ενεργοποιούνται από το οξειδωτικό στρες. Η οξειδωμένη και ατελώς γλυκοζυλιωμένη ζώνη 3 φωσφορυλιώνεται επιλεκτικά από τις κινάσες Syk. Ελλατώνεται έτσι η σύνδεσή της με τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και προάγεται η πλευρική της κινητικότητα (Pantaleo et al., 2009). Ο ρόλος του ασβεστίου είναι υψίστης σημασίας στην αποδιοργάνωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ζώνης 3 και φωσφατάσης τυροσίνης 1B (PTP1B), με αποτέλεσμα την τροποποίηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της κυτταροπλασματικής περιοχής του AE1. Η φωσφορυλίωση λαμβάνει χώρα μετά την μεσολαβούμενη από τα αιμοχρώματα οξείδωση και παίζει ρόλο στην συσσωμάτωση και δημιουργία του νεοαντιγόνου γήρανσης. Τέλος, τα συσσωματώματα ζώνης-3 που δημιουργούνται, αποτελούν τις περιοχές σύνδεσης των IgGs και συστατικών του συμπληρώματος με αποτέλεσμα τον οψωνισμό αυτών των αντιγονικών θέσεων προκαλώντας ερυθροφαγοκυττάρωση (Kay et al., 1983; Lutz et al., 1993).



Εικ 15 .Το βασικό μονοπάτι γήρανσης που βασίζεται στην τροποποίηση της ζώνης 3. Βήμα1. Οξειδωτική αποδιάταξη της Hb και σχηματισμός αιμοχρωμάτων. **Βήμα 2.** Σύνδεση αιμοχρωμάτων στην κυτταροπλασματική πλευρά της ζώνης 3 προκαλώντας την φωσφορυλίωσή της σε συγκεκριμένες θέσεις **Βήμα 3.** Αποσύνδεση από τον κυτταροσκελετό και ολιγομερισμός της ζώνης 3 **Βήμα 4.** Σχηματισμός συμπλεγμάτων ζώνης 3/αιμοχρωμάτων και οψωνισμός τους από φυσικά αυτό-αντισώματα του ορού (NAbs) και το C3b συστατικό του συμπληρώματος. (Ανατύπωση από Pantaleo et al., 2008)

A.4.3. Ομοιόσταση Ασβεστίου

Τα ενδοκυττάρια επίπεδα Ca^{+2} στα κυκλοφορούντα ερυθροκύτταρα λαμβάνουν μέρος όχι μόνο στον έλεγχο των βιοφυσικών ιδιοτήτων τους όπως είναι η σύνθεση της μεμβράνης, ο όγκος και οι ρεολογικές ιδιότητες αλλά και στις φυσιολογικές παραμέτρους όπως είναι η μεταβολική δραστηριότητα, η οξειδοαναγωγική κατάσταση και η κυτταρική εκκαθάριση. Η διαταραχή της ομοιόστασης Ca^{+2} είναι πιθανά κομμάτι ενός άλλου μονοπατιού γήρανσης είτε ως παράγοντας ενεργοποίησης, είτε ως συνέπεια αυτού (Samaja et al., 1990). Η εισροή ασβεστίου που συνοδεύει είτε την γήρανση των RBCs, είτε τα διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα *in vitro*, προκαλεί άμεσα ή προωθεί εμμέσως έναν καταρράκτη μοριακών και κυτταρικών γεγονότων όπως διαρροή καλίου, κυτταρική αφυδάτωση και συρρίκνωση, παραμόρφωση, εχνοκύττωση, σινιάλα αναγνώρισης και ερυθρόπτωση (μορφή απόπτωσης για τα απύρνηνα ερυθροκύτταρα) (Antonellou et al., 2010;

Kiefer and Snyder., 2000). Τέλος, παρά το γεγονός ότι το ασβέστιο εμφανίζεται ως ένας σαφής δείκτης γήρανσης, η σχέση της ερυθρόπτωσης με την γήρανση *in vivo* δεν έχει ακόμη εδραιωθεί.

A.4.4. Σηματοδότηση μέσω κασπασών και Εξωτερίκευση PS

Η ενεργοποίηση των κασπασών 3 και 8 θεωρείται ως ένδειξη γήρανσης των RBCs καθώς λαμβάνει χώρα στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα κυκλοφορίας και αντιπροσωπεύει έναν ασφαλέστερο τρόπο εκκαθάρισής τους (μέσω της ερυθρο-φαγοκυττάρωσης) για αποφυγή της αιμόλυσης, ενώ από τη άλλη μπορεί να σχετίζεται με την μόνιμη αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της μεμβράνης η οποία διαταράσσει τόσο τις μηχανικές ιδιότητες όσο και την έκταση της κυστιδιοποίησης (Suzuki et al., 2007; Pietraforte et al., 2007). Οι κασπάσες έχουν άμεση επίδραση στις πρωτεΐνες της μεμβράνης, οδηγώντας σε κατακερματισμό σπεκτρίνης και ζώνης 3. Η επαγωγή του προγράμματος κυτταρικού θανάτου Fas/κασπασών έχει συσχετιστεί με την πρωτεόλυση ή την συσσωμάτωση της ζώνης 3 και σε συνθήκες αποθήκευσης συνδέεται με την ενεργοποίηση της κασπάσης 3 (Kriebardis et al., 2007). *In vitro*, η προκασπάση 3 ενεργοποιείται κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες και οδηγεί σε τροποποιήσεις της ζώνης 3, σε εξωτερίκευση PS και ερυθροφαγοκυττάρωση. Η φωσφατιδυλοσερίνη αποτελεί ευαίσθητο δείκτη ταχείας αναγνώρισης και απομάκρυνσης των ερυθροκυττάρων από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα σύμφωνα με *in vitro* μελέτες γήρανσης ερυθροκυττάρων ως απόκριση σε στρες ή σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις (Lang et al., 2006). Τα γηραιότερα ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν χαμηλότερη ενεργότητα μετατοπάσης αμινοφωσφολιπιδίων και υψηλότερα επίπεδα εξωτερίκευσης PS σε σχέση με τα νεότερα (Mandal et al., 2005). Τα περισσότερα κυστίδια που προέρχονται από τα ερυθροκύτταρα εξωτερικεύουν φωσφατιδυλοσερίνη (Willekens et al., 2008). Πειραματικά, έχει βρεθεί ενεργή κασπάση και έκθεση PS σε κλάσμα RBCs, απομονωμένων από την κυκλοφορία του αίματος. Λαμβάνοντας υπόψη τη ισχυρή θρομβογενετική δράση της PS, είναι πολύ πιθανό να παίζει ρόλο στην γήρανση και απομάκρυνση φυσιολογικών ή και στρεσαρισμένων ερυθροκυττάρων μέσω ενεργοποίησης διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών (Antonellou et al., 2010).

A.4.5. Επιπλέον Μηχανισμοί Ερυθροκυτταρικής Γήρανσης *In Vivo*

Άλλοι μηχανισμοί που έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την επιλεκτική αναγνώριση των γηρασμένων ερυθροκυττάρων από τα μακροφάγα περιλαμβάνουν την χρονο-εξαρτώμενη συσχέτιση των μεμβρανικών πρωτεϊνών με το σιαλικό οξύ ή παράγωγα αυτού που οδηγεί σε έκθεση γλυκοπεπτιδίων ως παραγόντων γήρανσης σε γηρασμένα ερυθροκύτταρα. Εκτός από το μηχανισμό των οψωνινών που δεσμεύονται στα ερυθροκύτταρα, τα σιαλικά οξέα αλλά και μεμβρανικά συστατικά όπως το CD47 φαίνεται να παίζουν έναν ρυθμιστικό ρόλο στην εξάλειψη των γηρασμένων κυττάρων αναστέλλοντας την ερυθροφαγοκυττάρωση (Ensinck et al., 2006). Η μεμβρανική τους τοπολογία και στοιχειομετρία λειτουργεί ως ένα αποτελεσματικό σήμα “*do not eat me*” για τους αντίστοιχους υποδοχείς των μακροφάγων. Ωστόσο τόσο η μετά από συνθήκες στρες όσο και η *in vitro* γήρανση προωθεί μια χωροδιαταξική αλλαγή στην πρωτεΐνη η οποία

ενεργοποιεί την σύνδεσή της με την θρομβοσπονδίνη-1 και την φαγοκυττάρωσή των ερυθροκυττάρων από μακροφάγα (Burger et al. 2012).

A.4.6. Ο Ρόλος του Οξειδωτικού Στρες

Τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες και τροποποιημένη ομοιόσταση γλουταθειόνης εξαιτίας της μειωμένης δραστηριότητας του G6PD και της αναγωγάσης του NADH κυτοχρώματος b5 (Strange et al., 1982; Brajovich et al., 2009). Η ανεπάρκεια GSH *in vivo*, συνοδεύεται από παράλληλη σημαντική μείωση του ρυθμού σύνθεσής της ($-45\pm 8\%$) (Lewis et al., 2009). Εκτός από τις επιπτώσεις στον ΑΕΙ και την ενεργοποίηση αποπτωτικών παραγόντων, το οξειδωτικό στρες επηρεάζει την αιμοσφαιρίνη και τις αλληλεπιδράσεις της με τα μεμβρανικά συστατικά, καθώς και την κασπάση 3. Φαίνεται, ότι εκτός από την αλληλεπίδραση της οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης με τη ζώνη 3, η συμπλοκοποίησή της με την σπεκτρίνη είναι ένας εξίσου σημαντικός και πολύ πιθανός δείκτης γήρανσης *in vivo*, που σχετίζεται με αυξημένη δυσκαμψία ερυθροκυττάρων, μειωμένη ικανότητα παραμόρφωσης, εχνοκυττάρωση και ερυθροφαγοκυττάρωση (Snyder et al., 1985; Fortier et al., 1988). Αυτό το σύμπλεγμα διαταράσσει τη σύζευξη της διπλοστιβάδας με τον κυτταροσκελετό μέσω των διαρθρωτικών αλλαγών της ζώνης 3, και μπορεί να απειλεί τον ομαλό σχηματισμό του τετραμερούς της σπεκτρίνης και την οξείδωση των φωσφολιπιδίων, οδηγώντας σε εξωτερίκευση PS και αναγνώριση από τον CD36 υποδοχέα των μακροφάγων (Kiefer and Synder., 2000).

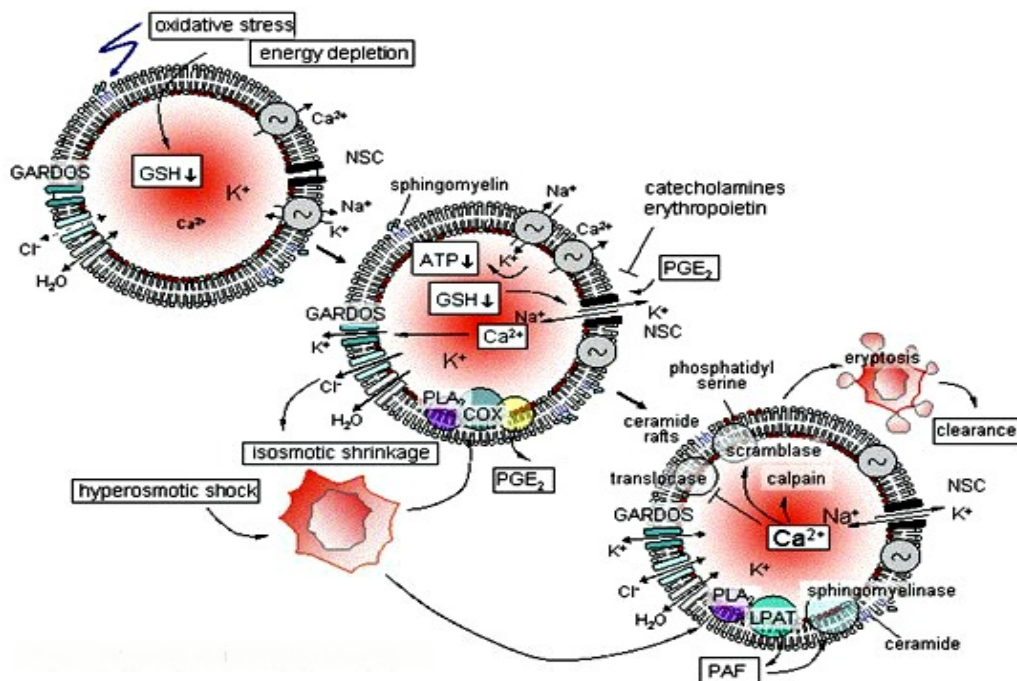
A.5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΘΑΝΑΤΟΣ

Υπάρχουν δυο τύποι κυτταρικού θανάτου: **α) ο θάνατος τύπου νέκρωσης** και **β) η Απόπτωση (ΠΚΘ)**. Ο θάνατος τύπου νέκρωσης αποτελεί μια μη ελεγχόμενη κατάσταση και ουσιαστικά αντιστοιχεί στην ενδοαγγειακή αιμόλυση των ερυθροκυττάρων. Λαμβάνει χώρα κυρίως σε παθολογικές καταστάσεις όπως διάφορες αιμολυτικές αναιμίες όπου παρατηρείται λύση της πλασματικής μεμβράνης και απελευθέρωση αιμοσφαιρίνης στο εξωκυττάριο χώρο. Η απόπτωση από την άλλη μεριά, χαρακτηρίζεται από κατανάλωση ενέργειας και εξωτερίκευση σηματοδοτικών μορίων στην επιφάνεια των αποπτωτικών κυττάρων, τα οποία οδηγούν στην αναγνώρισή τους από μακροφάγα.

A.5.1. Απόπτωση στα ερυθροκύτταρα (Ερυθρόπτωση)

Ο όρος ερυθρόπτωση δημιουργήθηκε από την ομάδα του Florian Lang για να προσδιορίσει ένα σύνολο μηχανισμών που λαμβάνουν μέρος κατά την διάρκεια μιας ειδικής μορφής απόπτωσης που συμβαίνει στα απύρηνα ερυθροκύτταρα. Πρόκειται για ένα σύνολο ασβεστοεξαρτώμενων μονοπατιών που συμβαίνουν στο ερυθροκύτταρο ως απάντηση σε καταστάσεις στρες (όπως απώλεια ενέργειας, οξειδωτικό στρες κ.α, τα οποία μειώνουν την αναπλήρωση γλουταθειόνης, αποδυναμώνοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου) και χαρακτηρίζεται από εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, κυτταρική συρρίκνωση, φυσαλιδοποίηση της μεμβράνης, σχηματισμό κεραμιδίου, άνοιγμα των καναλιών κατιόντων, αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{+2} , και ενεργοποίηση των

ενδοκυττάρων πρωτεασών όπως μ-καλπαϊνών, σε απουσία αιμόλυσης και με επακόλουθη φαγοκυτταρική αναγνώριση της εξωτερικευμένης φωσφατιδυλοσερίνης από τους υποδοχείς των μακροφάγων (Lang et al., 2008). Εκτός από την ενεργοποίηση των κασπασών, το οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί επιπλέον δύο σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία προκαλούν ερυθρόπτωση. Το πρώτο σχετίζεται με τον σχηματισμό της προσταγλανδίνης E₂ και την ενεργοποίηση των καναλιών ασβεστίου, και το δεύτερο με την απελευθέρωση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) που διαμεσολαβείται από την φωσφολιπάση A₂, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της σφιγγομυελινάσης και ως εκ τούτου τον σχηματισμό κεραμιδίου. Η αυξημένη δραστηριότητα του ενδοκυττάρου ασβεστίου και τα αυξημένα επίπεδα κεραμιδίου οδηγούν σε αναδιαμόρφωση της μεμβράνης και εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης. Επιπλέον, τα ενεργοποιημένα ασβεστο-εξαρτώμενα κανάλια οδηγούν σε απώλεια KCl και νερού, προκαλώντας κυτταρική συρρίκνωση (Foller et al., 2008). Επίσης, τα κανάλια Gardos ενεργοποιούνται από το αυξημένο ενδοκυττάριο Ca²⁺ το οποίο αυξάνει την συχνότητα των ανοιγμάτων τους, οδηγώντας σε αύξηση διαπερατότητας ιόντων K⁺ και σε κυτταρική συρρίκνωση (Leinders et al., 1992). Το κυτοσολικό ασβέστιο διεγείρει την πρωτεάση καλπαΐνη, η οποία προσδένεται στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης όπου πρωτεολύει πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού όπως σπεκτρίνη, ακτίνη και πρωτεΐνη 4.1. Η αύξηση ασβεστίου ενεργοποιεί την τρανσγλουταμινάση 2 (TG2) η οποία σε συνδυασμό με τις καλπαΐνες ευθύνεται για την απώλεια της πλαστικότητας του κυτταροσκελετού και την κυτταρική παραμορφωσιμότητα (Redding et al., 1991).



Εικ.16 Σύνοψη του μηχανισμού της Ερυθρόπτωσης.

Έχει αποδειχθεί ότι τα κανάλια ασβεστίου αναστέλλονται από ουσίες όπως η ερυθροποιητίνη, οι κατεχολαμίνες, η επινεφρίνη κ.α. Η φυσιολογική σημασία της ερυθρόπτωσης έγκειται στην απομάκρυνση από την κυκλοφορία, των τραυματισμένων ερυθροκυττάρων προς αποφυγή της αιμόλυσης, δηλαδή διόγκωσης του κυττάρου (και

έξοδο αιμοσφαιρίνης) η οποία προλαμβάνεται μέσω της ενεργοποίησης των καναλιών “Gardos” τα οποία καθυστερούν την διάγκωση του κυττάρου δίνοντας χρόνο στα μακροφάγα να αναγνωρίσουν και να εκκαθαρίσουν τα τραυματισμένα ερυθροκύτταρα με τη βοήθεια της εξωτερικευμένης PS. Τέλος, η ταχεία εκκαθάριση περιορίζει την ανάπτυξη ενδοκυτταρικών παρασίτων (Lang et al., 2004).

A.5.2. Απόπτωση μέσω Υποδοχέων

Το οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί τις κασπάσες οι οποίες οδηγούν σε πρωτεόλυση της ζώνης 3, της σπεκτρίνης και ακτίνης, και σε εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης (Mandal et al., 2003). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι Fas, FasL, FADD και η κασπάση 8 εντοπίζονται στις λιπιδικές σχεδίες των γηρασμένων ή στρεσαρισμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Συγκεκριμένα ο ολιγομερισμός Fas/CD95 προσελκύει τον FADD και το σχηματιζόμενο σύμπλοκο προκαλεί την εξαρτώμενη από την κασπάση 8 ενεργοποίηση της κασπάσης τελεστή, όπως είναι η κασπάση 3 η οποία με τη σειρά της θα προκαλέσει αποδόμηση της ζώνης 3. Η στρατολόγηση της προκασπάσης 8 στο σύμπλεγμα, προκαλεί την αυτοπρωτεόλυσή της σε ενεργό κασπάση 8 η οποία απελευθερώνεται στο κυττοσόλιο όπου συναντά την κασπάση 3. Η ενεργοποίηση των κασπασών σχετίζεται με την απώλεια της αμινοφωσφολιπιδικής μετατοπάσης και με την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (Mandal., 2005).

A.6. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ

A.6.1. Γενικά

Η βιοσυντήρηση των ερυθροκυττάρων αφορά στην ικανότητα διατήρησης της ακεραιότητάς τους εκτός του φυσικού περιβάλλοντός τους για συγκεκριμένη περίοδο με σκοπό να διατηρούνται βιώσιμα και λειτουργικά προς κλινική χρήση (μετάγγιση). Προς το παρόν, το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο αποθήκευσης των ερυθροκυττάρων είναι η συλλογή τους σε αντιπηκτικά διαλύματα, η λευκαφαίρεση, ο απαραίτητος εργαστηριακός έλεγχος (ABO, Rhesus, και έλεγχος για λοιμώδη νοσήματα), και η αποθήκευσή τους σε πρόσθετα διαλύματα στους 4°C για 42 ημέρες). Οι τρέχουσες Ευρωπαϊκές και Αμερικανικές κατευθυντήριες γραμμές για τα αποδεκτά κριτήρια των μεταγγιζόμενων ερυθροκυττάρων ορίζουν ως όγκο συλλογής τα 450mL, μέση 24ωρη *in vivo* επιβίωση του 75% των μεταγγιζόμενων RBCs, επίπεδα αιμόλυσης στο τέλος της αποθήκευσης <1.0%, (<0,8% για την Ευρώπη), λιγότερα από $1,0 \times 10^6$ WBCs στις λευκαφαιρεμένες μονάδες συμπυκνωμένων RBCs και όχι λιγότερο από 40g αιμοσφαιρίνης (45g σε μη λευκαφαιρεμένους μονάδες) ανά μονάδα μετάγγισης (Council of Europe, 2008).

Η υποθερμική συντήρηση των RBCs είναι απαραίτητη για την καταστολή των βιοχημικών και μοριακών αλληλεπιδράσεων οι οποίες ελαχιστοποιούν την αποδόμηση των κυττάρων (σε θερμοκρασία ανάμεσα στους 1-6°C έχει εκτιμηθεί ότι ο μεταβολισμός του ερυθροκυττάρου μειώνεται κατά 40 φορές) και παρεμποδίζει την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηριακών οργανισμών (Brecher 2005). Οι πλαστικοί ασκοί έχουν τα

πλεονέκτηματα του χαμηλού βάρους, αποτελούν αποστειρωμένα κλειστά συστήματα συλλογής που μειώνουν τον κίνδυνο βακτηριακών μολύνσεων, παρέχουν οπτική καθαρότητα, αποκλείουν φυσαλίδες αέρα (μείωση κινδύνου εμβολής κατά την έγχυση) και έχουν μικρό όγκο. Επιπρόσθετα οι μονάδες από πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC) περιέχουν την χημική ένωση DEHP (Diethylhexyl Phthalate) η οποία εισχωρεί στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων και τη σταθεροποιεί μειώνοντας έτσι την απώλεια αυτής μέσω κυστιδιοποίησης και τα επίπεδα αιμόλυσης (Hill et al., 2001).

A.6.2. Διαλύματα Συντήρησης

Το διάλυμα συντήρησης ACD (Acid Citrate Dextrose) κατασκευάστηκε κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου και επέτρεψε την αποθήκευση του αίματος για 3 εβδομάδες. Το CPD (Citrate Phosphate Dextrose) με 16 mM/L φωσφορικό άλας αύξησε το ποσοστό των ανακτηθέντων RBCs από 75% σε περισσότερο από 79%. Το 1968 παρασκευάστηκε το CPDA-1 και επέτρεψε την αποθήκευση ολικού αίματος για 5 εβδομάδες. Προστέθηκαν αργότερα τα πρόσθετα διαλύματα (Additive Solutions) για να παρέχουν πρόσθετο όγκο και θρεπτικά συστατικά για μεγαλύτερο χρόνο αποθήκευσης και καλύτερη ροή των πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων (Moore et al., 1980), με πρώτο το SAG το οποίο μείωσε τον αιματοκρίτη των πακεταρισμένων RBCs στο 55%, ξεπερνώντας έτσι προβλήματα που προέκυπταν από το αυξημένο ιξώδες. Μεταγενέστερα προστέθηκε και μαννιτόλη. (Moore et al., 1980). Το διάλυμα **CPD/SAGM (Citrate, Phosphate, Dextrose / Saline, Adenine, Glucose, Maninitol)** χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία και τα συστατικά του είναι: κιτρικά τα οποία προσδένουν το ασβέστιο και δρουν ως αντιπηκτικό, φωσφορικά για την αναπλήρωση των φωσφορικών προμηθειών των αποθηκευμένων RBCs, γλυκόζη και δεξτρόζη που είναι απαραίτητα για την παροχή ενέργειας και την διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά την μετάγγιση, αδενίνη για αναπλήρωση των αντίστοιχων απωλειών και μαννιτόλη η οποία δρα αντιοξειδωτικά και σταθεροποιεί την μεμβράνη. Η μαννιτόλη αυξάνει τον χρόνο αποθήκευσης κατά μια εβδομάδα φτάνοντας έτσι τις 6 εβδομάδες αποθήκευσης (Hogman et al., 1981).

Τέλος, εκτός από την παρασκευή και άλλων προσθετικών διαλυμάτων που παρατείνουν τον χρόνο αποθήκευσης, η αναζωογόνηση των αποθηκευμένων RBCs (Rejuvenation) πριν την μετάγγιση, επιτρέπει την αναπλήρωση του ATP και 2,3 DPG, μειώνει την προσκόλληση των κυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, την εξωτερική PS, τα επίπεδα ενδοκυττάρου Ca^{+2} και ROS παρέχοντας καλύτερης ποιότητας ερυθρά αιμοσφαίρια (Meyer et al., 2011; Koshkaryev et al., 2009)

A.6.3. Αποθηκευτική Βλάβη Ερυθροκυττάρων

Τα ερυθροκύτταρα μπορούν να αποθηκευθούν *ex vivo* μέχρι και 42 ημέρες μετά την αιμοδοσία. Οι συνθήκες αποθήκευσης απέχουν πολύ από τις φυσιολογικές, με αποτέλεσμα τα ερυθροκύτταρα να υποβάλλονται σε διάφορες μεταβολικές και δομικές αλλαγές, θέτοντας πιθανώς σε κίνδυνο την λειτουργικότητα και βιωσιμότητά τους *in vivo* μετά την μετάγγιση. Αυτές οι αλλοιώσεις ορίζονται ως **“Αποθηκευτική Βλάβη Ερυθροκυττάρων”** και διακρίνονται σε βιοχημικές, μεμβρανικές, οξειδωτικές και μηχανικές.

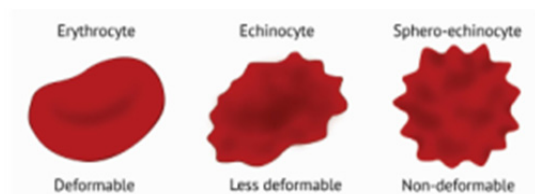
Οι εύκολα αναγνωρίσιμες βιοχημικές επιδράσεις της αποθήκευσης, που είναι αποτέλεσμα της χαμηλής θερμοκρασίας, αφορούν στη μείωση της δραστηριότητας των μεταβολικών ενζύμων οδηγώντας τελικά σε μείωση τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Παράλληλα, η κατανάλωση της γλυκόζης οδηγεί σε παραγωγή γαλακτικού το οποίο συσσωρεύεται στο υπερκείμενο της μονάδας προκαλώντας μείωση του pH (Hess, 2010). Η οξέωση αναστέλλει τον ρυθμό γλυκόλυσης με επακόλουθη μείωση του διφωσφογλυκερινικού (2,3DPG), το οποίο εξαντλείται εντός των 2 πρώτων εβδομάδων και οδηγεί σε αυξημένη συγγένεια της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο, άρα μειωμένη ικανότητα απελευθέρωσής του στους ιστούς. Απώλεια του 2,3-DPG προκαλεί μετατόπιση της καμπύλης κορεσμού της αιμοσφαιρίνης των αποθηκευμένων RBCs προς τα αριστερά. Μόρια 2,3 DPG διαμορφώνουν τη σταθερότητα της μεμβράνης, και ως εκ τούτου την ικανότητα παραμόρφωσης των ερυθροκυττάρων μέσω αλληλεπιδράσεων με την ζώνη 3 και την πρωτεΐνη 4.1, διαταράσσοντας με αυτόν τον τρόπο τις συνδέσεις της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού (Moriyama et al., 1993; Chang and Low, 2001). Τέλος, η δέσμευση του 2,3DPG στη ζώνη 3 επηρεάζει την αντίστοιχη σύνδεση των γλυκολυτικών ενζύμων διαμορφώνοντας έτσι την ρύθμισή τους (Rogers et al., 2013).

Εξαιτίας της συσσώρευσης των ενδιάμεσων μεταβολιτών, ενεργοποιείται το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών για να παραχθούν ανηγμένα συνένζυμα και για να αντιμετωπιστεί η προοδευτική μείωση της GSH (Blasi et al., 2012). Οι διαταραχές στο μεταβολισμό του ATP επιπλέον επιδρούν στην ενεργότητα της αντλίας $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (είσοδος νατρίου και έξοδος καλίου), στη μεμβρανική σταθερότητα/ παραμορφωσιμότητα, κυτταρικό σχήμα και την κυστιδιοποίηση (Salzer et al. 2008). Το ATP συνδέεται στενά με την *in vivo* ικανότητα ανάκτησης των ερυθροκυττάρων όπως και το 2,3DPG. Παρόλα αυτά, η μείωσή τους είναι αναστρέψιμη εντός των πρώτων ωρών που ακολουθούν μία μετάγγιση.

Οι οξειδωτικές βλάβες έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον επειδή είναι μη αναστρέψιμες. Εξαιτίας της οξείδωσης και της αυξημένης πίεσης οξυγόνου κατά την αποθήκευση, αυξάνεται η αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης η οποία σε συνδυασμό με τις μειωμένες αντιοξειδωτικές άμυνες εκθέτει τα ερυθροκύτταρα σε αυξημένο οξειδωτικό στρες, την κυρίαρχη αιτία μεμβρανικών βλαβών. Οι ROS προκαλούν αντιδράσεις υπεροξειδωσίας λιπιδίων της μεμβράνης, οδηγώντας σε απώλεια της ακεραιότητας της μεμβράνης και σε κυτταρικό θάνατο (Baynes, 2005). Για παράδειγμα, τελικό προϊόν υπεροξειδωσίας λιπιδίων αποτελεί η μαλονοδιαλδεϋδη (MDA), ένα ιδιαίτερα δραστικό μόριο που ασκεί μια σειρά αρνητικών επιπτώσεων στο ερυθροκύτταρο. Το MDA επηρεάζει την λειτουργία του AE1 και των συνδεόμενων σε αυτόν ενζύμων (GP3D, φωσφοφρουκτοκινάση) βλάπτει την δομή της μεμβράνης μέσω μιας σειράς γεγονότων όπως είναι ο σχηματισμός πόρων που ευνοούν την διαρροή καλίου και μεταβάλλουν τη διαπερατότητα του νερού, ο πολυμερισμός συστατικών της μεμβράνης, η μείωση παραμορφωσιμότητας, οι διασταυρούμενες συνδέσεις πρωτεϊνών, η αυξημένη εξωτερίκευση PS, η αυξημένη σύνδεση IgGs και τέλος, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος (Kuypers et al., 1998). Τα επίπεδα εξωτερικευμένης φωσφατιδυλοσερίνης *in vitro* παραμένουν αρκετά χαμηλά και αυξάνονται μετά την 21^η μέρα της αποθήκευσης (Dinkla et al., 2013). Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών (οφειλόμενη στην ταυτόχρονη με το αυξημένο οξειδωτικό στρες,

υπερενεργοποίηση την οξειδωτικής φάσης των πεντοζών) αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των οξειδωτικών τροποποιήσεων και αυξάνεται στις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Kriebardis et al., 2007). Σύμφωνα με έρευνες, αυξάνεται μέχρι την 4^η εβδομάδα (Kriebardis et al., 2006) και μετά μειώνεται κατά το τέλος της αποθήκευσης (Antonelou et al., 2012).

Οι κυτταροσκελετικές αλλοιώσεις αφορούν στις μηχανικές βλάβες. Οι πιο εμφανείς αλλαγές των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων, η αναστρεψιμότητα των οποίων εξαρτάται από την διάρκεια αποθήκευσής τους, είναι οι μορφολογικές μεταβολές όπου από ένα φυσιολογικό



Εικ 17. Φαινοτυπικές μεταβολές ερυθροκυττάρου

δισκοειδές κύτταρο προκύπτει ένα αναστρέψιμο παραμορφωμένο εχινοκύτταρο και στη συνέχεια ένα μη αναστρέψιμο σφαιροεχिनοκύτταρο (εικόνα 17) (Berezina et al., 2002). *In vitro*, ο φαινότυπος μη αναστρέψιμης μορφολογίας των ερυθροκυττάρων αυξάνεται σημαντικά μετά τις δυο εβδομάδες αποθήκευσης, ενώ κατά την ημέρα 21 πάνω από το 50% των κυττάρων εμφανίζουν μη δισκοειδές σχήμα (Blasi et al., 2012). Τα σφαιροκύτταρα είναι μικρότερα σε επιφάνεια και αιμολύονται στη μονάδα ή απομακρύνονται από την κυκλοφορία (επειδή είναι δύσκαμπτα) μετά τη μετάγγιση. Οι παραπάνω αλλαγές προκαλούνται από τη μη-αναστρέψιμη απώλεια μεμβράνης μέσω κυστιδίων, ο ρυθμός των οποίων αυξάνεται μετά την δεύτερη εβδομάδα αποθήκευσης (Kriebardis et al., 2008) και έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται σε φλεγμονώδεις και ανοσοτροποποιητικές αποκρίσεις κατά την μετάγγιση (Kriebardis et al., 2012). Η φύση των μηχανισμών κυστιδιοποίησης αλλά και η έκτασή τους ποικίλουν από άποψη μεγέθους, δομής, πρωτεϊνικής σύστασης και την έκθεση PS.

Η αιμόλυση που παρατηρείται στο υπερκείμενο της μονάδας αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων οφείλεται τόσο στην ελεύθερη αιμοσφαιρίνη όσο και στα κυστίδια. Η απελευθέρωση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης μέσα στη μονάδα μετάγγισης μετά το δεύτερο μισό της αποθήκευσης αποτελεί δείκτη επιδείνωσης της κυτταρικής ποιότητας και είναι μη αναστρέψιμη βλάβη. Το 25-70% της εξωκυττάριας αιμοσφαιρίνης βρίσκεται στα μικροκυστίδια (Greenwalt, 2006). Όπως συμβαίνει και εντός των κυττάρων, ποσότητα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης που βρίσκεται στο υπερκείμενο της μονάδας υφίσταται αυθόρμητα οξείδωση η οποία οδηγεί στη συσσώρευση μεθαιμοσφαιρίνης, αίμης, σιδήρου και δραστικών ριζών στο υπερκείμενο, επιδεινώνοντας το οξειδωτικό στρες στο οποίο εκτίθενται τα ερυθροκύτταρα κατά την αποθήκευση. Τα φορτωμένα με αιμοσφαιρίνη μικροκυστίδια συσσωρεύονται στο υπερκείμενο και μειώνουν τη διαθεσιμότητα του ενδοθηλιακής προέλευσης-μονοξειδίου του αζώτου στο δέκτη της μετάγγισης, διότι αλληλεπιδρούν με το NO 1000 φορές ταχύτερα σε σχέση με τα RBCs (Liu et al., 2013). Το μονοξείδιο του αζώτου αποτελεί ισχυρό αγγειοδιασταλτικό, αντιοξειδωτικό και αναστολέα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και όταν αλληλεπιδρά με την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη σχηματίζει μεθαιμοσφαιρίνη και νιτρικό άλας (Gladwin and Kim, 2009). Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις μπορούν να προκαλέσουν μετα-μεταγγισιακές διαταραχές στο δέκτη. Τέλος, υψίστης σημασίας είναι η προοδευτική αύξηση του αριθμού των γηρασμένων

(αλλά μη αιμολυμένων) ερυθροκυττάρων κατά την αποθήκευση, τα οποία αποτελούν το 25% των συνολικών ερυθροκυττάρων μιας μονάδας αίματος κατά την 4^η εβδομάδα αποθήκευσης. Αυτά αιμολύονται στη κυκλοφορία του δέκτη και απομακρύνονται μέσα σε μια ώρα από την μετάγγιση. Η ταχεία απομάκρυνσή τους ενδέχεται να υπερφορτώσει τα φυσιολογικά συστήματα αντιμετώπισης της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, με κίνδυνο τον ανεπαρκή περιορισμό των τοξικών επιδράσεων της (Orlov et al., 2015).

A.6.4. Σηματοδοτικά μονοπάτια και Δείκτες Γήρανσης RBCs σε Συνθήκες Αποθήκευσης

Η διαβίωση των ερυθροκυττάρων μέσα στη μονάδα μετάγγισης είναι πολύ διαφορετική σε σχέση με αυτήν στην κυκλοφορία. Τα *in vivo* σηματοδοτικά μονοπάτια αναμένεται να είναι περισσότερο ή λιγότερο διατηρημένα στις *in vitro* συνθήκες, αλλά κάπως διαμορφωμένα ως απόκριση σε ένα διαφορετικό περιβάλλον. Τα ερυθροκύτταρα εκτός του ότι στερούνται τη φυσιολογική συνύπαρξη με τα υπόλοιπα κυτταρικά στοιχεία ή το πλάσμα το οποίο δρά ευεργετικά για την επιβίωσή τους, υποχρεώνονται να παραμένουν στη μονάδα μετάγγισης μαζί με διάφορα συσσωρευμένα κυτταρικά απόβλητα, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται δυσμενώς η επιβίωσή τους και η λειτουργικότητά τους (Antonellou et al., 2010). Όσον αφορά στα μη λευκαφαιρεμένα ερυθροκύτταρα, έχει βρεθεί ότι ασκείται αρνητική επίδραση από τα ένζυμα, κυτοκίνες και ρίζες οξυγόνου που απελευθερώνονται από τα λευκοκύτταρα.

A.6.4.1. Μονοπάτι γήρανσης που βασίζεται στη Ζώνη 3 και κυστιδιοποίηση *ex vivo*

Τα αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια σταδιακά εκφράζουν μερικά από τα τυπικά σήματα γήρανσης και ερυθροφαγοκυττάρωσης (Bosman et al., 2010). Συγκεκριμένα, όσον αφορά στη ζώνη 3, παρατηρείται συσσωμάτωση της οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης στη μεμβράνη, πρόωμη αλληλεπίδρασή της με τη σπεκτρίνη, ολιγομερισμός της ζώνης 3 στη μεμβράνη και σύνδεση IgGs σε αυτήν (Kriebardis et al., 2007a; Kriebardis et al., 2007b).

Όπως ήταν αναμενόμενο, υπάρχουν ορισμένες διαφορές μεταξύ της γήρανσης *in vivo* και *ex vivo* όσον αφορά στο περιεχόμενο, το μέγεθος και το σχήμα των κυστιδίων. Η ανάλυση κυστιδίων που προέρχονται από αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα έχει δείξει ότι είναι εμπλουτισμένα σε οξειδωμένη αιμοσφαιρίνη, ακετυλοχολινεστεράση, τροποποιημένη ζώνη 3, γλυκοφορίνη A (GPA), λιπίδια, IgGs, αλλά όχι σε σπεκτρίνη και αγκυρίνη (Baron et al., 2011), ενώ παράλληλα ο σχηματισμός και η συσσώρευση κυστιδίων αυξάνεται εκθετικά κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Η συγκέντρωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών (που προκύπτουν κατά την αποθήκευση) στα μικροκυστίδια, υποδηλώνει τον ευεργετικό ρόλο της κυστιδιοποίησης στην επιβίωση των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων (Kriebardis et al., 2008; Antonellou et al., 2010), καθώς αποτελεί αποτελεσματικό τρόπο απαλλαγής τους από αυτές. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η συνύπαρξή τους με τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται αποτελεί μια καινοτομία που δεν συναντάται *in vivo*.

A.6.4.2. Επίδραση Ca^{+2} και Μονοπάτι Απόπτωσης *ex vivo*

Στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα η ομοιόσταση των κατιόντων διαταράσσεται σταδιακά με αποτέλεσμα την αλλοίωση του σχήματος και του όγκου των κυττάρων. Τα κύτταρα διογκώνονται, αποδυναμώνοντας τον κυτταροσκελετό, (εξαιτίας της οξειδωσης και της πτώσης του ATP), η μεμβράνη γίνεται ασταθής, σχηματίζονται εχνοκύτταρα και χάνεται μεμβράνη (μέσω κυστιδίων). Περίπου το 1/3 των κυστιδίων εξωτερικεύουν PS και μπορεί να έχουν προ-πηκτικές ιδιότητες με αποτέλεσμα την εκδήλωση θρομβοεμβολικών επιπλοκών. Όσον αφορά στην επίδραση του ασβεστίου, έχει βρεθεί ότι, παρά την παρουσία κιτρικών, πιθανότατα να λαμβάνουν χώρα ασβεστοεξαρτώμενες διεργασίες στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα οι οποίες να οδηγούν σε προσκόλληση της σορκίνης και συνεξίνης στην μεμβράνη (Kriebardis et al., 2007b). Επίσης, μόρια FADD και κασπάση 8 έχει βρεθεί ότι υπάρχουν σε κυστίδια, και ότι η ποσότητα των κυστιδίων που συνδέονται με τον Fas και την κασπάση 3 αυξάνονται με τον χρόνο αποθήκευσης (Mandalet al., 2005).

A.6.4.3. Φαγοκυττάρωση Σχετιζόμενη με το CD47 σε αποθηκευμένα RBCs

Όσον αφορά στα άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, έχει παρατηρηθεί σε αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια η απώλεια του δείκτη CD47, ιδιαίτερα από τα γηραιότερα κύτταρα, κάνοντάς τα πιο επιρρεπή στην εκκαθάριση αφού μεταγγισθούν. Από την άλλη, η ποσότητά του στα κυστίδια έχει βρεθεί ότι αυξάνει κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (Annis and Sparrow, 2002). Αποθηκευμένα RBCs για μεγάλο χρονικό διάστημα, εμφανίζουν αλλαγή στη χωροδιαμόρφωση του CD47, με αποτέλεσμα τη σύνδεση θρομβοσπονδίνης-1 (Burger et al., 2012).

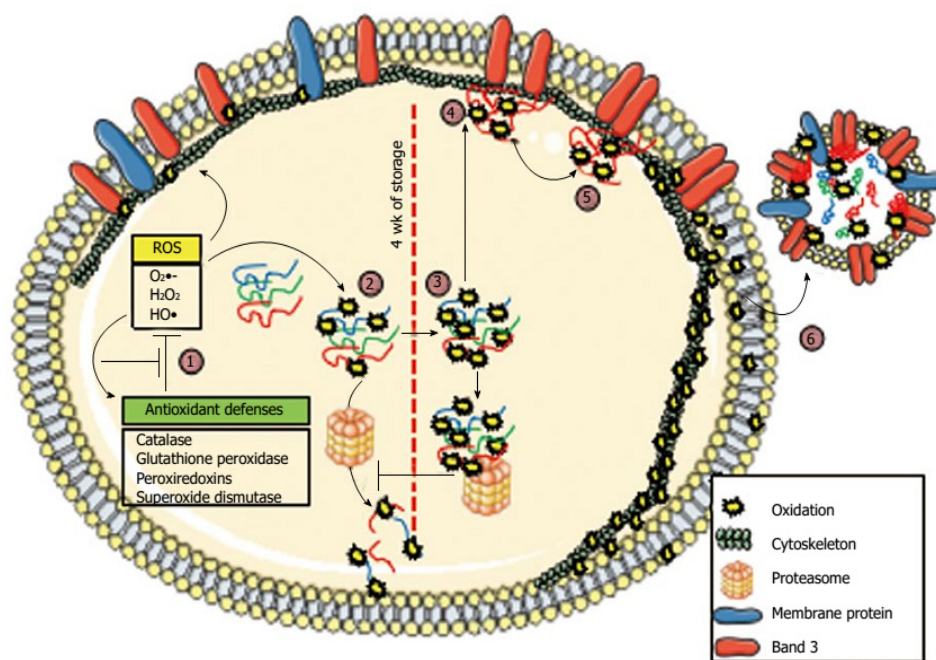
A.6.4.4. Οξειδωτικό Μονοπάτι αποθηκευμένων RBCs

Καθώς εξελίσσεται η αποθήκευση, αποδυναμώνονται οι αντιοξειδωτικές άμυνες των κυττάρων με αποτέλεσμα τη συσσώρευση πολλών βλαβών σε συστατικά της μεμβράνης και του κυτοσολίου (Antonelou et al., 2010; Kriebardis et al., 2007). Η καρβονυλίωση συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων που επάγεται από τα ROS ή άλλα προϊόντα του οξειδωτικού στρες, αποτελεί μία από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών και οδηγεί σε αλλαγή της δραστηότητάς τους, στην αναγνώριση από το πρωτεολυτικό σύστημα (πρωτεολυτική διάσπαση) ή αντίθετα στον σχηματισμό συσσωματωμάτων (Nistrom, 2005).

Τις πρώτες 4 εβδομάδες της αποθήκευσης, οι πρωτεΐνες συσσωρεύουν οξειδωτικές αλλοιώσεις οι οποίες πιθανά αναγνωρίζονται από το P-20S πρωτεολυτικό σύστημα όπου καταστρέφονται (εικόνα 18). Η AO (οξειδάση αλκοόλης) είναι λιγότερο επιρρεπής στη μη αναστρέψιμη οξείδωση κυστεΐνης, γεγονός που υποδηλώνει τη διατήρηση της ενεργούς της θέσης για την καταπολέμηση των ROS. Ωστόσο, από το μέσο της αποθήκευσης (από την ημέρα 26 μέχρι την ημέρα 41), η AO εμφανίζει μεγαλύτερο βαθμό καρβονυλίωσης που σχετίζεται με διπλάσιες επιπτώσεις οξείδωσης. Σταδιακά, οι μειωμένες αντιοξειδωτικές άμυνες αδυνατούν να αντισταθμίσουν τους οξειδωτικούς παράγοντες, επιτρέποντας την οξείδωση των πρωτεϊνών. Η τελευταία συμβάλλει στον σχηματισμό συσσωματωμάτων και στον σχηματισμό αιμοχρωμάτων τα οποία συνδέονται στην κυτταροπλασματική περιοχή της ζώνης 3 (η οποία αποτελεί θέση σύνδεσης μεμβράνης-κυτταροσκελετού και πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, και προσδένει πρωτεΐνες που

συμμετέχουν στη διαδικασία της γλυκόλυσης), αποσταθεροποιούν τον κυτταροσκελετό και αλλάζουν τις γλυκολυτικές λειτουργίες των ερυθροκυττάρων, οδηγώντας τελικά στην εμφάνιση δεικτών γήρανσης και σε μικροκυστιδιοποίηση (Delobel et al., 2015).

Πράγματι, η οξειδωτική κατάσταση της αιμοσφαιρίνης και οι μεμβρανικές αλλοιώσεις που προκαλεί αποτελούν κομβικό σημείο τόσο στη φυσιολογία του κυττάρου όσο και στην προαγωγή μη αναστρέψιμων σηματοδοτικών μονοπατιών (Antonelou et al., 2010; Kriebardis et al., 2008). Η ερυθρόπτωση κατά την αποθήκευση είναι αναγνωρίσιμη από την εξωτερίκευση της PS, τη συσσωμάτωση της ζώνης 3, την αλλοιωμένη CD47 και την αποβολή κυστιδίων (Burger et al., 2012). Η καρβονυλίωση, δείκτης του οξειδωτικού στρες των πρωτεϊνών, έχει δείχθει ότι συμβαίνει νωρίτερα και ότι είναι πιο έντονη ερυθροκύτταρα αποθηκευμένα σε CPDA σε σχέση με εκείνα που αποθηκεύονται σε μονάδες με CPD-SAGM (Antonelou et al., 2010). Τέλος, αν συνυπολογιστεί η απουσία μηχανισμών εκκαθάρισης μέσα στη μονάδα μετάγγισης, γίνεται σαφές ότι το αποτέλεσμα των παραπάνω μηχανισμών “πολλαπλασιάζεται” εις βάρος της επιβίωσης των ερυθροκυττάρων προς μετάγγιση (Antonelou et al., 2010).



Εικ 18. Οξειδωτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην αποθήκευση των ερυθροκυττάρων. Το μοντέλο δείχνει ένα ερυθροκύτταρο χωρισμένο στη μέση (διακεκομμένη γραμμή) ενώ διακρίνονται τα χαρακτηριστικά των πρώιμων (αριστερό ημισφαίριο) και όψιμων σταδίων (αριστερό ημισφαίριο) της οξειδωτικής βλάβης. Δεξιά φαίνεται ένα μικροκυστιδίο έξω από το ερυθροκύτταρο. Τα προοδευτικά βήματα οξείδωσης αναγράφονται ως εξής: **Βήμα 1:** Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί, εμποδίζουν την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από τα ROS, μέσω της μετατροπής τους σε λιγότερο δραστικά ενδιάμεσα προϊόντα, ή μέσω οξειδωσής τους και ύστερα αναγωγής τους από μηχανισμούς αποκατάστασης. Σε παρατεταμένη αποθήκευση αυτοί οι μηχανισμοί εξασθενούν εξαιτίας του οξειδωτικού στρες και οξείδωσης πρωτεϊνών της μεμβράνης και του κυτοσολίου. **Βήμα 2:** Καθώς εξαπλώνονται οι οξειδωμένες πρωτεΐνες εκθέτουν υδρόφοβες περιοχές που αναγνωρίζονται από το 20S πρωτεολυτικό σύστημα το οποίο εκτελεί πρωτεόλυση. Η ανεπάρκεια αντιοξειδωτικής άμυνας οδηγεί σε υπεροξείδωση του περιεχομένου του RBC. **Βήμα 3:** Στις 4 εβδομάδες αποθήκευσης οι πρωτεΐνες υφίστανται διασταυρούμενες συνδέσεις που αποτρέπουν την περαιτέρω αποδόμησή τους, και ως εκ τούτου οι μερικές κατεστραμμένες πρωτεΐνες συσσωρεύονται. **Βήμα 4:** Η οξειδωμένη/αποδιαταγμένη αιμοσφαιρίνη δημιουργεί αιμοχρώματα τα οποία συνδέονται με την ζώνη 3 και ακολουθεί τροποποίησή της και αλλοίωση συνδέσεων με τον κυτταροσκελετό, ενώ ταυτόχρονα εκτοπίζονται τα γλυκολυτικά ένζυμα στην περιοχή. **Βήμα 5:** Η αυτοοξείδωση των αιμοχρωμάτων παράγει επιπλέον ROS τα οποία προκαλούν οξείδωση των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού και της μεμβράνης. **Βήμα 6:** Ακολουθεί η εκθετική φάση της απελευθέρωσης κυστιδίων η οποία επιτρέπει την εξάλειψη των δεικτών γήρανσης (όπως αλλοιωμένη ζώνη 3, και εξωτερικευμένη PS). (Ανατύπωση από Delobel et al., 2015)

A.6.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την Ποιότητα των Αποθηκευμένων RBCs

Οι παράγοντες που επηρεάζουν ανάκτηση των αποθηκευμένων RBCs είναι α) η διάρκεια της αποθήκευσης, β) το είδος του πλαστικού που χρησιμοποιείται για τη μονάδα μετάγγισης, γ) το διάλυμα συντήρησης, δ) ο όγκος του διαλύματος συντήρησης ε) η ποιότητα της λευκαφαίρεσης, και ζ) η διακύμανση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών διαφορετικών αιμοδοτών, η οποία φαίνεται να επηρεάζει την αποθηκευτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων (Hess, 2012). Παρακάτω θα αναλυθούν τα δύο τελευταία.

A.6.5.1. Λευκαφαίρεση

Η μετάγγιση μεγάλων όγκων αίματος μπορεί να σχετίζεται με σημαντικές επιπλοκές που αποδίδονται στο μεταγγιζόμενο αίμα αυτό καθαυτό. Κοινές αντιδράσεις που σχετίζονται με τη μετάγγιση περιλαμβάνουν αιμολυτικές αντιδράσεις, εμπύρετες μη αιμολυτικές αντιδράσεις (*Febrile Non-Hemolytic Transfusion Reactions*), αλλεργικές αντιδράσεις μετάγγισης (*Allergic Transfusion Reactions*), οξεία πνευμονική βλάβη που σχετίζεται με τη μετάγγιση (*Transfusion Related Acute Lung Injury, TRALI*), υπερφόρτωση κυκλοφορικού (*Transfusion Associated Circulatory Overload*), ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις ως αποτέλεσμα περιπτώσεων ανοσοκαταστολής και βλαβών επαναιμάτωσης. Αρκετοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί, συμπεριλαμβανομένης της αποθηκευτικής βλάβης, των κυστιδίων που προέρχονται από τα ερυθροκύτταρα καθώς επίσης και των κυτοκινών, των αντιγόνων και των λευκοκυττάρων του δότη (Hoehn et al., 2015).

Η λευκαφαίρεση έχει ως στόχο να μετριάσει τις παραπάνω αντιδράσεις μέσω του φιλτραρίσματος των λευκοκυττάρων του δότη από τις πακεταρισμένες μονάδες. Απομακρύνεται το 99,9% των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων μέσω φίλτρου διήθησης και κατακράτησης των κυττάρων. Μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε κατά την παραγωγή των παραγώγων αίματος (προαποθηκευτική λευκαφαίρεση) είτε αμέσως πριν την μετάγγιση. Η πρώτη έχει το πλεονέκτημα της απομάκρυνσης των λευκοκυττάρων πριν προλάβουν να συνεισφέρουν στην αποθηκευτική βλάβη. Είναι πιο εύχρηστη και εφαρμόζονται καλύτερα μέτρα ελέγχου ποιότητας. Από την άλλη η δεύτερη αποτελεί μια οικονομικότερη διαδικασία. Με την λευκαφαίρεση αφαιρούνται εκτός από τα λευκοκύτταρα και οι προφλεγμονώδεις μεσολαβητές, παρεμποδίζεται η μετάδοση μολυσματικών παραγόντων και μειώνεται η παραγωγή HLA αντιωμάτων σε ευαισθητοποιημένους δέκτες (Jackman et al., 2014).

Τα αποθηκευμένα λευκοκύτταρα παράγουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες οι οποίες προκύπτουν καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης όπως για παράδειγμα TNF- α , ιντερλευκίνη 1 (IL-1) και IL-8. Αυτά απομακρύνονται με την λευκαφαίρεση, καταργώντας κατ'αυτόν τον τρόπο αυτή τη φλεγμονώδη απόκριση (Sparrow RL, Patton et al., 2004). Επιπλέον, απομακρύνονται τα ανθρώπινα ουδετεροφιλικά πεπτιδία (Vossier et al., 2014). Οι λευκαφαιρεμένες μονάδες αίματος περιορίζουν την μετάδοση μολυσματικών παραγόντων μέσω της μετάγγισης όπως για παράδειγμα ιογενών παραγόντων που

μεταδίδονται μέσω των λευκοκυττάρων (EBV, CMV, HTLV-I) (Thiele et al., 2011; Qu et al., 2005; Pennington et al., 2002).

Η λευκαφαίρεση παρέχει σημαντική βελτίωση της ποιότητας των παραγώγων αίματος και της βιωσιμότητάς τους μετά την μετάγγιση. Ύστερα από μελέτες οι οποίες στόχευαν στην διαλεύκανση των επιπτώσεων της λευκαφαίρεσης στην αποθηκευτική βλάβη των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων, έχει βρεθεί ότι τα υπολείμματα λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων αντιπροσωπεύουν παράγοντα στρες κατά την αποθήκευση που απειλεί την δομική και λειτουργική ακαιρεότητα των αποθηκευμένων RBCs. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι ο βαθμός αιμόλυσης, ο σχηματισμός μη αναστρέψιμων εχινοκυττάρων, η μικροκυστιδιοποίηση, τα σήματα εκκαθάρισης, η συσσώρευση ROS/ ασβεστίου, οι μεταβολές της ζώνης 3 που σχετίζονται με την γήρανση, οι επιφανειακοί δείκτες και η ανάδειξη ενός φαινοτύπου γήρανσης σε νεαρά ερυθροκύτταρα, παρατηρούνται κυρίως σε μη λευκαφαιρεμένες μονάδες (Antonelou et al., 2012).

Υπάρχουν 2 μηχανισμοί μέσω των οποίων η λευκαφαίρεση πιθανά βελτιώνει την εικόνα των αποθηκευμένων RBCs. Πρώτον, μέσω της αφαίρεσης των βιοδραστικών λευκοκυττάρων πριν αυτά προλάβουν να καταναλώσουν την γλυκόζη που υπάρχει στη μονάδα και να παραχθούν απόβλητα, και δεύτερον με την απομάκρυνση των άθικτων ακόμη λευκοκυττάρων, προλαμβάνοντας την απελευθέρωση των ενζύμων που θα έβλαπταν τα ερυθροκύτταρα. Η αιμόλυση μειώνεται στο 50% (αν και επηρεάζεται και από τα χαρακτηριστικά του δότη όπως θα αναφερθεί παρακάτω), μειώνει ουσιαστικά όχι μόνο την κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων, αλλά και τον αριθμό μικροκυστιδίων που προέρχονται από τα αιμοπετάλια μετά την μετάγγιση (Sugawara et al., 2010) και αυξάνει την ανάκτηση των RBCs κατά 2% (Hess, 2010). Ωστόσο, με την λευκαφαίρεση δεν εξαλείφονται όλα τα λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια, οπότε τα υπολείμματά τους συνυπάρχουν με τα RBCs και είναι σε θέση να παράγουν δυνητικά βιοδραστικές ουσίες οι οποίες μπορούν να επιφέρουν πιθανόν ανεπιθύμητες επιδράσεις.

A. 6.5.2. Επίδραση Εγγενών Χαρακτηριστικών του Δότη

A.6.5.2.I. Γενικά

Το φαινόμενο της «ποικιλότητας του αιμοδότη» που αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά από την ομάδα του Dem το 1966 και απασχολεί μέχρι σήμερα τις σύγχρονες στρατηγικές αποθήκευσης, αναφέρεται σε ουσιαστικές διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στους διαφορετικούς αιμοδότες οι οποίες επηρεάζουν την ποιότητα του αποθηκευμένου αίματος και την ανάκτηση των παραγώγων του μετά την μετάγγιση (Dem et al., 1966). Πράγματι, ο χρόνος αποθήκευσης αποτελεί ένα σχετικό κριτήριο αξιολόγησης της αποθηκευτικής βλάβης των ερυθροκυττάρων, καθώς υπο τις ίδιες συνθήκες ερυθροκύτταρα διαφορετικών αιμοδοτών παρουσιάζουν σημαντικά διαφορετικές ιδιότητες/ μετά την μετάγγιση. Ο προσδιορισμός βιοδεικτών αποθήκευσης που σχετίζονται με τους αιμοδότες θα μπορούσε να επισπεύσει την ανάπτυξη και τελειοποίηση των συστημάτων αποθήκευσης που θα επέτρεπαν την αποτελεσματικότερη διαχείριση των μονάδων αίματος σύμφωνα με την αποθηκευτική ικανότητα του αιμοδότη και θα βελτιώναν ως εκ τούτου την περίθαλψη και να μειώσουν σημαντικά το κόστος του συστήματος υγείας (Tzounakas et al., 2016a).

Έχει βρεθεί ότι διακυμάνσεις μεταξύ των αιμοδοτών που αφορούν στη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, τα επίπεδα της GSH, τον δείκτη MCV, την οσμωτική ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων και την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, διατηρούνται κατά τον χρόνο αποθήκευσής τους, και ως εκ τούτου μπορούν να προβλεφθούν εύκολα. Αξιοσημείωτο είναι, ότι η ποικιλότητα μεταξύ των αιμοδοτών όχι μόνο επηρεάζει μια σειρά φυσιολογικών ιδιοτήτων των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων, αλλά φαίνεται να είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στην αιμόλυσή τους εντός της μονάδας και έχει χαρακτηριστεί ως ένας από τους σημαντικότερους καθοριστικούς παράγοντες της ανάκτησής τους *in vivo* μετά την μετάγγιση (Tzounakas et al., 2016a).

Εκτός από την αιμόλυση και την ανάκτηση *in vivo*, διάφορες παράμετροι των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων φαίνεται να διαφέρουν ανάμεσα σε διαφορετικούς υγιείς αιμοδότες, συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) (Arduini et al., 1997), της αποτελεσματικής μεταφοράς οξυγόνου, της κυτταρικής ευθραυστότητας (Tarasev et al., 2014), του μεταβολικού ρυθμού και της συγκέντρωσης ποικίλων μεταβολιτών, της επιδεκτικότητας στο οξειδωτικό στρες και της συσσώρευσης βιοδεικτών του όπως η υπεροξειδοξίνη-2 (Prx-2) (η αυξημένη *in vivo* πρόσδεση στην μεμβράνη συνδέεται με αυξημένη υπεροξείδωση λιπιδίων κατά την διάρκεια της αποθήκευσης), της κυστιδιοποίησης της μεμβράνης κ.α. (Bosman et al., 2010; Rinalducci et al., 2011; Antonelou et al., 2012). Αναφορικά με την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης, έχει βρεθεί ότι υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στα προ-αποθηκευτικά επίπεδα PS και στην αιμόλυση εντός της μονάδας (Dinkla et al., 2014), ενώ το ίδιο παρατηρείται και με τα νιτρικά/νιτρώδη καθώς και άλλους βιοενεργούς παράγοντες οι οποίοι φαίνεται να παρουσιάζουν υψηλή μεταβλητότητα ανάμεσα στους αιμοδότες και αυξάνονται κατά την αποθήκευση ανάλογα με τις προ-αποθηκευτικές τους τιμές (Tzounakas et al., 2016b).

A.6.5.2.II. Γενετικοί παράγοντες

Η ευρεία ετερογένεια που παρατηρείται στις αποθηκευτικές παραμέτρους των ερυθροκυττάρων ανάμεσα στους υγιείς αιμοδότες θα μπορούσε να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες, γενετικούς και μη. Παράδειγμα παραγόντων με γενετικό υπόβαθρο θα μπορούσαν να είναι οι μεταλλάξεις των μεμβρανικών πρωτεϊνών στην περίπτωση της κληρονομικής σφαιροκυττάρωσης η οποία μπορεί να επηρεάζει εξέλιξη της αποθηκευτικής βλάβης των ερυθροκυττάρων από άποψη κυτταρικής αστάθειας (Eber et al., 1992). Επίσης έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωση της GSH του ανθρώπινου ερυθροκυττάρου αποτελεί κληρονομικό γνώρισμα (van t'Erve et al., 2013). Τα ερυθροκύτταρα των αιμοδοτών που είναι ετερόζυγοι φορείς β-Μεσογειακής αναιμίας, παρουσιάζουν αρκετές διαφορές σε σύγκριση με εκείνα του γενικού πληθυσμού, όπως χαμηλή συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, ελαφρώς αυξημένη αιμόλυση και οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα να έχουν μεγαλύτερη προδιάθεση για αυξημένη οξειδωτική βλάβη και αιμόλυση κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Από την άλλη, χαρακτηριστικά όπως χαμηλότερη συσσωμάτωση ερυθροκυττάρων και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην κυτταρική λύση θα μπορούσαν να αποτελούν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι των φυσιολογικών αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων (Tzounakas et al., 2016a). Επιπρόσθετα, τα κύρια χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων με έλλειψη του ενζύμου G6PD είναι τα

χαμηλά επίπεδα GSH και οι ανεπαρκείς αντιοξειδωτικές άμυνες, με αποτέλεσμα, η προκύπτουσα υπεροξειδωση των λιπιδίων να επηρεάζει την *in vivo* παραμορφωσιμότητα, πρωτεϊνική καρβονυλίωση και αποσταθεροποίηση της μεμβράνης. Έτσι, λαμβάνοντας υπ' όψη ότι, η αποθήκευση αυτή καθ' αυτή αντιπροσωπεύει ένα εξωγενές οξειδωτικό ερέθισμα για τα ερυθροκύτταρα, θα περίμενε κανείς ότι θα επηρεάζονταν αρνητικά η αποθηκευτική τους ικανότητα και θα αυξάνονταν η εκκαθάρισή τους μετά την μετάγγιση. Παρόλα αυτά, τα ερυθροκύτταρα με έλλειψη του ενζύμου εκπροσωπούν έναν νεότερο πληθυσμό ο οποίος ενδεχομένως είναι πιο ανθεκτικός στην επιταχυνόμενη γήρανση κατά την αποθήκευση. Εξάλλου, έχουν αναφερθεί αντιφατικά αποτελέσματα της αιμόλυσης μετά την μετάγγιση αίματος από φορείς με έλλειψη G6PDH (Fransis et al., 2013).

Η ύπαρξη πολυμορφισμών σε ορισμένα γονίδια συνδέονται με διακυμάνσεις στις ιδιότητες των RBCs όπως μεταξύ άλλων στους δείκτες MCV και MCH. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι ο αιματοκρίτης, η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, ο αριθμός των ερυθροκυττάρων, οι δείκτες της ομοιόστασης του σιδήρου (φυλλικό οξύ, φερριτίνη, τρανσφερίνη) (Cafolla et al., 2000) και το ουρικό οξύ (αντιοξειδωτικός παράγοντας και πιθανός βιοδείκτης της ποιότητας της αποθήκευσης) (Tzounakas et al., 2015) είναι χαμηλότερα στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άντρες. Τα γυναικεία ερυθροκύτταρα είναι λιγότερο επιρρεπή σε οξειδωτικά, οσμωτικά και μηχανικά στρεσογόνα ερεθίσματα *in vitro* και παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα αιμόλυσης και λιπιδικής υπεροξειδωσης τόσο σε ποντίκια και σε ανθρώπους (Mladenovic et al., 2014; Raval et al., 2011). Οι γυναικείες ορμόνες συμπεριλαμβανομένης της οιστραδιόλης πιθανώς συμβάλλουν σε αυτές τις ιδιότητες (Mladenovic et al., 2014; Raval et al., 2010). Η οιστραδιόλη προωθεί την παραγωγή της GSH στο πλάσμα και στα ερυθροκύτταρα (Massafra et al., 2000), μειώνει την διαρροή του ATP από τα ερυθροκύτταρα και την παραγωγή του νιτρικού οξέος από το ενδοθήλιο (Letourneau et al., 2010). Επιπρόσθετα, έχουν παρατηρηθεί χαμηλότερα επίπεδα κυστιδιοποίησης της μεμβράνης στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες (Gustafson et al., 2015).

A. 6.5.2. III. Μη γενετικοί παράγοντες

Οι βλάβες κατά την αποθήκευση μπορεί να σχετίζονται εξίσου με τον τρόπο ζωής του αιμοδότη όπως το κάπνισμα, οι διατροφικές συνήθειες, η χρόνια κατανάλωση αλκοόλ, η οξεία και έντονη άσκηση καθώς και τα επίπεδα της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης του δότη την στιγμή της αιμοδοσίας (Antonellou et al., 2011b). Για παράδειγμα, το κάπνισμα εκθέτει τα άτομα σε υπερβολικές ποσότητες οξειδωτικών και τοξινών τα οποία κάνουν τα ερυθροκύτταρα πιο δύσκαμπτα, πιο εύθραυστα και πιο ευαίσθητα στην αιμόλυση, ενώ ταυτόχρονα παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα φυλλικού οξέος και αντιοξειδωτικής άμυνας. Όσον αφορά το πλάσμα των καπνιστών, έχουν παρατηρηθεί συσσωρευμένες δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου, χαμηλά επίπεδα ασκορβικού, λιπιδική υπεροξειδωση και πρωτεϊνική καρβονυλίωση. Το σωματικό βάρος συσχετίζεται με την ολική συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης μέσα στη μονάδα πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων. Επιπρόσθετα, οι τροφές υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά επηρεάζουν τα αντιοξειδωτικά του πλάσματος, και την ερυθροκυτταρική μεμβράνη (αιμόλυση, αυξημένα επίπεδα ROS, χαμηλή αναλογία GSH/GSSG, μειωμένη παραμορφωσιμότητα,

και διαταραχές στην ιοντική ομοιόσταση) πιθανώς επειδή τα εκθέτουν σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και οξειδωτικών παραγόντων (Roberts et al., 2006).

Τέλος, κάτω από την επίδραση πολλών συστημικών παραγόντων, η γήρανση του ερυθροκυττάρου επιταχύνεται σε ηλικιακά μεγαλύτερα άτομα. Η γήρανση είναι μια αναπόφευκτη βιολογική διεργασία που χαρακτηρίζεται από γενική μείωση των φυσιολογικών λειτουργιών και της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης τα οποία προκύπτουν από συσσωρευμένες βλάβες των κυττάρων. Τα ευθροκύτταρα εμφανίζουν ελαττωμένη παραμορφωσιμότητα, αυξημένη επιδεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες και μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα όπως αποδεικνύεται από τα χαμηλά επίπεδα της GSH, την ενζυμική αντιοξειδωτική δραστηριότητα και την διακύμανση της κλαστερίνης (Antonellou et al., 2011a), σε συνδυασμό με τα παθολογικά αυξημένα επίπεδα οξειδωτικών βλαβών των πρωτεϊνών και λιπιδίων της μεμβράνης. Έχει δειχθεί ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση της ανθρώπινης γήρανσης με την συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, αλλά θετική συσχέτιση με την δραστηριότητα του οξειδοαναγωγικού συστήματος της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, δρώντας ως πιθανός προστατευτικός μηχανισμός για την αναγωγή του δεϋδροασκορβικού οξέος κάτω από την επίδραση αυξημένου οξειδωτικού στρες (Rizvi et al., 2006). Η κυστιδιοποίηση σε φρέσκο αίμα και η αιμόλυση εντός της μονάδας αυξάνονται ανάλογα με την ηλικία του αιμοδότη πιθανώς σε συνδυασμό και με το φύλο του (Gustafson et al., 2015; Jordan et al., 2014).

A.6.5.3. Επίδραση Εμμηνόπαυσης

Η εμμηνόπαυση είναι μια μορφή γήρανσης του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος και ορίζεται ως η οριστική παύση της ωοθυλακικής δραστηριότητας των ωοθηκών και τελικά του εμμηνορροϊκού κύκλου. Αναπόσπαστο γεγονός της γήρανσης του αναπαραγωγικού είναι και η παύση της παραγωγής των δυο κυρίαρχων ορμονών: των οιστρογόνων και της προγεστερόνης η οποία προκαλεί μια ποικιλία συμπτωμάτων που επηρεάζουν κάθε γυναίκα διαφορετικά. Τα οιστρογόνα εκτός από τον ρόλο τους στο γυναικείο αναπαραγωγικό, επάγουν επίσης μια ποικιλία ωφέλιμων επιδράσεων σε άλλα μέρη του σώματος γι' αυτό και οι δυσμενείς επιπτώσεις της εμμηνόπαυσης αποδίδονται στη μείωση των επιπέδων τους, που οδηγούν: σε μεταβολές του προτύπου των λιπιδίων, του δείκτη μάζας σώματος, των επιπέδων ινσουλίνης, σε αυξημένο κίνδυνο υπέρτασης, στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νόσων, οστεοπόρωσης, καρκίνου και άλλων εκφυλιστικών αλλαγών (Pacifci, 1996).

A.6.5.3.I. Ορμονικές αλλαγές κατά την εμμηνόπαυση

Αναφορικά με τις ορμονικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα, οι πρώτες αφορούν αύξηση των γοναδοτροπινών, της ωοθυλακιοτρόπου (FSH) και της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH). Η αύξηση της FSH οφείλεται στην μειωμένη παραγωγή της ιχνιμπίνης Β (INH-B), μίας διμερούς γλυκοπρωτεΐνης που καταστέλλει την FSH. Η αύξηση της FSH διεγείρει τα ωοθυλάκια να αναπτυχθούν και να παράγουν οιστρογόνα, με τα περισσότερα να υφίστανται ατρησία. Αυτή η διαδικασία οδηγεί στην εξάντληση όλων των ωοθυλακίων από τις ωοθήκες και η παραγωγή των οιστρογόνων πέφτει δραματικά. Φυσιολογικά, στις ωοθήκες τα οιστρογόνα παράγονται από την μετατροπή των ανδρογόνων μέσω του ενζύμου αρωματάσης, και υπάρχουν σε τρεις μορφές: στη μορφή της οιστραδιόλης, της

οιστριόλης, και της οιστρόνης. Η πρώτη υπάρχει κυρίως στην προεμμηνόπαυσιακή και στη περιεμμηνόπαυσιακή περίοδο, ενώ η τελευταία (και ασθενέστερη μορφή) κυριαρχεί μετά την εμμηνόπαυση σε αναλογία 2:1 έναντι της πρώτης (Kuhl, 1990). Η οιστρόνη παράγεται από την μετατροπή της ανδροστενεδιόνης από το λιπώδη ιστό καθώς και από το ήπαρ (Doshi and Agarwal, 2013; OpenStax College, 2013).

A.6.5.3.I. Αντιοξειδωτική δράση οιστρογόνων

Τα οιστρογόνα προστατεύουν τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες με τρόπο ανεξάρτητο υποδοχέων οιστρογόνων, μειώνοντας την παραγωγή των ROS και προλαμβάνοντας την ενδοκυττάρια συσσώρευση υποεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Όπως η βιταμίνη E, η οιστραδιόλη, η οιστριόλη και η οιστρόνη έχουν στο μόριό τους ένα φαινολικό A-δακτύλιο, γεγονός που τα καθιστά μέλη μιας κατηγορίας ενώσεων που ονομάζονται φαινολικά αντιοξειδωτικά. Τα οιστρογόνα πιστεύεται ότι διακόπτουν αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών όπως υπεροξειδωση των λιπιδίων και προλαμβάνουν τις επαγόμενες από τις ελεύθερες ρίζες οξειδωτικές βλάβες σε βιολογικά μακρομόρια όπως το DNA και οι πρωτεΐνες. Η ελεύθερη φαινολική υδροξυλική (OH) ομάδα έχει θεωρηθεί το κατεξοχήν χαρακτηριστικό που προσδίδει προστασία έναντι στο οξειδωτικό στρες. Τα ερυθροκύτταρα λειτουργούν ως φορείς των στεροειδών φυλετικών ορμονών στην κυκλοφορία του αίματος με τρόπο παρόμοιο με αυτόν της αλβουμίνης και είναι υπεύθυνα για την μεταφορά του 5-15% αυτών στους ιστούς στόχους (Koefoed and Brahm, 1994). Στα ερυθροκύτταρα, η υπεροξειδωση των λιπιδίων προλαμβάνεται μέσω μεταφοράς ενός ατόμου υδρογόνου σε μια λιπιδική ρίζα ($LOO\bullet$) σχηματίζοντας λιπιδικό υδροϋπεροξειδίο ($LOOH$) και φαινοξυλική ρίζα. Η προκύπτουσα φαινοξυλική ρίζα οιστρογόνων ανάγεται ξανά σε ορμόνη μέσω της NADPH χωρίς την παραγωγή ROS (Prokai and Prokai-Tatrai, 2005). Επίσης έχει δειχθεί ότι τα οιστρογόνα αλληλεπιδρούν συνεργιστικά με την γλουταθειόνη (Green et al., 1998; Gridley et al., 1998).

Γ.6.5.3.II. Συγκριτικές Μελέτες

Μέχρι στιγμής, μία συγκριτική έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα που προέρχονταν από γυναίκες πριν και μετά την εμμηνόπαυση, έδειξε αυξημένη αιμόλυση και μηχανική ευθραυστότητα στα ερυθροκύτταρα των μετεμμηνόπαυσιων σε σχέση με τα δείγματα που προέρχονταν από τις προεμμηνόπαυσιες γυναίκες, υποδηλώνοντας την συμβολή εμμηνορροϊκών ή ορμονικών παραγόντων στην διαφορά αυτή. Επιπρόσθετα, η βελτιωμένη μηχανική ευθραυστότητα των προεμμηνόπαυσιων γυναικών σε σύγκριση με εκείνη των αντρών καταργείται μετά την εμμηνόπαυση, όπου ο δείκτης MFI των μετεμμηνόπαυσιων γυναικών καθίσταται ισοδύναμος με τον αντίστοιχο των αντρών (Raval., 2010). Εξίσου καλύτερη εικόνα σε αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα προεμμηνόπαυσιων γυναικών σε σχέση με ερυθροκύτταρα αντρών από άποψη αιμόλυσης κάτω από την επίδραση μηχανικών και οσμωτικών στρεσογόνων παραγόντων έχουν παρατηρηθεί σε μελέτη από την ομάδα του Kanias (Kanias et al., 2011). Παρόμοια προστατευτική επίδραση έχει παρατηρηθεί και για την προγεστερόνη (μειωμένη οσμωτική ευθραυστότητα και κυτταρική λύση των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων) (DeVenuto and Wilson, 1976). Αντίθετα, μη σημαντικές διαφορές σε επίπεδο μηχανικών ιδιοτήτων και αιμόλυσης

ανάμεσα σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και άντρες βρέθηκαν από την ομάδα του Daly (Daly et al., 2014).

In vivo, έχει παρατηρηθεί αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών μετά την εμμηνοπαυση εξαιτίας της απότομης αλλαγής της ορμονικής κατάστασης σε συνδυασμό με πτώση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συγκριτικά με τα επίπεδα στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Miquel et al., 2006; Ruiz-Larrea et al., 2000; Kolesnikova et al., 2015). Τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), και καταλάση (CAT) έχουν παρατηρηθεί μειωμένα στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες υποδηλώνοντας οξειδωτικό στρες στα κύτταρα. Επίσης, έχει παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα του ασκορβικού οξέος των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών λόγω της αυξημένης κατανάλωσής του, ως απόκριση στο αυξημένο οξειδωτικό στρες (Ansar et al., 2015).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του αιμοδότη στην ποιότητα των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων και συγκεκριμένα, η σύγκριση της αποθηκευτικής εικόνας των μονάδων αίματος που προέρχονται από γυναίκες πριν και μετά την εμμηνόπαυση. Ο απώτερος στόχος της μελέτης ήταν η αναζήτηση τυχόν διαφορών ανάμεσα στα εξεταζόμενα δείγματα και η συσχέτιση των τελευταίων με ορμονικούς παράγοντες του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος καθώς επίσης και η πιθανότητα διαφορικής διαχείρισης των μονάδων μετάγγισης που προέρχονται από τους αντίστοιχους αιμοδότες προς όφελος των ασθενών και των διαθέσιμων αποθεμάτων των τραπεζών αίματος.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΙΜΟΔΟΤΩΝ / ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Για την πραγματοποίηση των παρακάτω πειραματικών μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν λευκαφαιρεμένες CPD/SAGM μονάδες RBCs από συνολικά **11 γυναίκες υγιείς αιμοδότριες**, οι οποίες είχαν χωριστεί σε δύο ομάδες: σε **προεμμηνοπαυσιακές** και σε **μετεμμηνοπαυσιακές**. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν 4 μονάδες προεμμηνοπαυσιακών γυναικών και 7 μονάδες που ανήκαν στην δεύτερη ομάδα. Οι μονάδες φυλάχθηκαν στους 4°C για 42 ημέρες. Τη στιγμή της αιμοδοσίας καθώς και σε συγκεκριμένες περιόδους αποθήκευσης (ημέρες 2 – 14 – 28 – 42) της μονάδας συλλέχθηκε συγκεκριμένη ποσότητα αίματος υπό άσηπτες συνθήκες. Για την παραλαβή των πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων, η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με την χρήση βελόνων μεγάλης διαμέτρου (19G) για την αποφυγή πιθανού τραυματισμού των κυττάρων. Η αιματολογική εικόνα των γυναικών ήταν φυσιολογική και οι εμμηνοπαυσιακές γυναίκες δεν είχαν λάβει ορμονική θεραπεία εξωγενώς.

B.2. ΟΡΓΑΝΑ- ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraeus, κεφαλή #3344
- Φωτόμετρο (ZEISS)
- Φθορισμόμετρο (BIO-RAD)
- Κλίβανος
- Ηλεκτρικός ζυγός (KERN PRS 320-3)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf, 5410
- Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM 515, PHILIPS)
- Πιπέτες τύπου Gilson διαφόρων όγκων
- Κυτταρόμετρο (BD FACsCan)
- Αιματολογικός αναλυτής Sysmex K-4500 (ROCHE)
- Ηλεκτρονικό πεχάμετρο

B.3. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Eppendorfs διαφόρων όγκων
- Πιπέτες μιας χρήσεως
- Ακροφύσια για πιπέτες τύπου Gilson
- Κυβέτες φασματοφωτομέτρου (SIGMA)
- Κυβέτες φθορισμόμετρου
- Αλουμινόχαρτο
- Αντικειμενοφόροι (stubs) για ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης
- Καλυπτρίδες
- Ταινία διπλής όψης
- Σύριγγες
- Βελόνες αιμοληψίας (19G)
- Μεταλλικά σφαιρίδια

B.4. ΜΕΘΟΔΟΙ

B.4.1. Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη

Η μέτρηση της συγκέντρωσης της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο της μονάδας RBCs υπολογίζει το ποσό της αιμόλυσης που έχει επέλθει κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Η φασματοφωτομετρική μέθοδος Harboe αποτελεί μια συνηθισμένη εργαστηριακή μέθοδο υπολογισμού των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης του πλάσματος. Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται από την απορρόφηση της οξυαιμοσφαιρίνης (415nm) που υπάρχει στο πλάσμα ή το υπερκείμενο της μονάδας και διορθώνεται για τις απορροφήσεις του υποβάθρου στα 380nm και 450nm γιατί στα ίδια μήκη κύματος απορροφούν και άλλες ουσίες συμπεριλαμβανομένων της αλβουμίνης και χολερυθρίνης (*Harboe, 1959*). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης γίνεται από τον ακόλουθο τύπο μετά από διόρθωση κατά Allen:

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

Πειραματική Διαδικασία

- Φυγοκέντρηση ολικού αίματος 1000xg /10 λεπτά
- Συλλογή πλάσματος
- Φυγοκέντρηση 1000xg /10 λεπτά
- Συλλογή υπερκείμενου
- Αραίωση σε dH₂O (1:10) – Vortex
- Επώαση για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
- Μέτρηση στα 380nm - 415nm - 450nm

B.4.2. Μέτρηση Οσμωτικής Ευθραυστότητας

Η οσμωτική ευθραυστότητα αποτελεί μια από της παλαιότερες μεθόδους διερεύνησης της φυσικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων. Στο αίμα τα ερυθροκύτταρα βρίσκονται σε οσμωτική ισορροπία με το πλάσμα. Για τα ερυθροκύτταρα του ανθρώπου, ισότονο είναι ένα διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 0,9%. Σύμφωνα με το φαινόμενο της όσμωσης, μπορεί να γίνει μεταφορά μορίων νερού κάθετα στο επίπεδο της μεμβράνης όταν τα κύτταρα βρεθούν σε περιβάλλον διαφορετικής οσμωτικής πίεσης. Όταν τοποθετηθούν σε υπότονο διάλυμα, τότε εισέρχεται νερό διαμέσου της μεμβράνης στα κύτταρα και ο όγκος τους αυξάνεται δυσανάλογα ως προς τη φυσιολογική μεμβρανική τους επιφάνεια, με αποτέλεσμα, όταν η αύξηση του όγκου υπερβεί το κρίσιμο όριο της μηχανικής αντοχής του κυττάρου (περίσσεια επιφάνειας), η μεμβράνη χάνει κατά τόπους τη δομική της συνέχεια και διαρρηγνύεται ελευθερώνοντας στο περιβάλλον κυτοσολικά συστατικά, με κυρίαρχη την αιμοσφαιρίνη (αιμόλυση). Στην πραγματικότητα, δεν είναι η

“κατάσταση ευθραυστότητας” που μετράται όταν τα κύτταρα αιωρούνται σε διαβαθμισμένα υποτονικά διαλύματα αλλά αντίθετα η αναλογία επιφάνειας /όγκου των ερυθροκυττάρων όταν αυτά αιωρούνται σε ένα ισότονο διάλυμα. Με άλλα λόγια η οσμωτική ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων αντανakλά την έκταση της περίσσειας της μεμβράνης που υπάρχει όταν τα ερυθροκύτταρα βρίσκονται σε ισότονο διάλυμα (Beutler et al., 1982). Μετά την αντιστοίχιση των απορροφήσεων με τις συγκεντρώσεις NaCl, δημιουργείται καμπύλη οσμωτικής ευθραυστότητας και υπολογίζεται ο δείκτης MCF που αντιστοιχεί στην συγκέντρωση NaCl που προκαλεί 50% της λύσης των κυττάρων.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- NaCl
- dH₂O

Για τα δείγματα παρασκευάστηκαν δ/ματα NaCl των παρακάτω συγκεντρώσεων: 0% - 0,2% - 0,3% - 0,35% - 0,4% - 0,45% - 0,5% - 0,55% - 0,6% - 0,7% - 0,8% - 0,9%

Πειραματική Διαδικασία

- Παρασκευή διαλυμάτων NaCl (0.0-0.9%)
- Προσθήκη ολικού αίματος σε αναλογία 1:100
- Ήπιο Vortex, Επώαση 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση 5 λεπτά σε 1500rpm
- Φωτομέτρηση υπερκείμενου στα 540nm

Εκτός από την πρώτη μέτρηση της οσμωτικής ευθραυστότητας, επώαστηκαν δείγματα σε κλίβανο στους 37 °C για 24 ώρες (για μέτρηση οσμωτικής ευθραυστότητας των κυττάρων μετά την πάροδο του συγκεκριμένου χρόνου) για προσομοίωση των συνθηκών in vivo, στις οποίες βρίσκονται τα κύτταρα μετά την μετάγγιση.

B.4.3. Μέτρηση Μηχανικής Ευθραυστότητας

Η μηχανική ευθραυστότητα παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ακεραιότητα της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων λόγω της δυνατότητάς της να αντανakλά συνολικά όλες τις βιοχημικές και μηχανικές αλλαγές που σχετίζονται με την αποθήκευση. Ο δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας (MFI) αποτελεί *in vitro* μέτρηση του υποθανάτιου (*sublethal*) τραυματισμού των RBCs, και αποτελεί έναν αξιόπιστο και πρακτικό τρόπο προσομοίωσης της διατμητικής τάσης που υφίστανται τα κύτταρα κατά τη διέλευσή τους μέσα από μια μηχανική αντλία. Χρησιμοποιούνται παράλληλα με τα RBCs που έχουν υποστεί μηχανική καταπόνηση (καθώς περιέχουν μεταλλικά σφαιρίδια και αναδεύονται ελεγχόμενα για συγκεκριμένο χρόνο, στους 4°C) και δείγματα-μάρτυρες του ίδιου δότη (τα οποία δεν περιέχουν σφαιρίδια οπότε δεν καταπονούνται μηχανικά). Ο δείκτης MFI υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\text{MFI} = [(\text{PF Hb rocked} - \text{PF Hb control}) / (\text{Hb aliquot} - \text{PF Hb control})] \times 100$$

Το **PF Hb rocked** είναι η συγκέντρωση της ελεύθερης Hb του πλάσματος που υπάρχει στο υπερκείμενο των δειγμάτων που περιείχαν σφαιρίδια, το **PF Hb control** η αντίστοιχη των δειγμάτων που δεν περιείχαν σφαιρίδια (δεν ήταν υπό ανάδευση), και το **Hb aliquot** αντιστοιχεί στη συγκέντρωση της **ενδοκυττάριας Hb** σε αιματοκρίτη **20%** (Harm et al., 2012).

Υλικά-Αντιδραστήρια

- dH₂O
- PBS 310mosm
- Μεταλλικά σφαιρίδια

Πειραματική διαδικασία

- Φυγοκέντρωση 1000xg /10 λεπτά στους 4°C
- Αραίωση των pRBCs σε 20% Hct με προσθήκη PBS 310mosm
- Μέτρηση της **ενδοκυττάριας Hb** σε δείγμα 20% Hct κατά Harboe*
- Προσθήκη σφαιριδίων Ανάδευση για 1ώρα στους 4°C
- Φυγοκέντρωση 2.750xg/15 λεπτά στους 4°C
- Μεταφορά υπερκείμενου σε erpendorf - Φυγοκέντρωση 20.800xg/20 λεπτά στους 4°C
- Μέτρηση Hb στα υπερκείμενα των δειγμάτων που ήταν υπό ελεγχόμενη ανάδευση και των αντίστοιχων δειγμάτων που ήταν σε ηρεμία (Rocked και Non Rocked) (μέθοδος Harboe 1:10σε dH₂O)

B.4.4 Μέτρηση επιπέδων ενδοκυττάριας ROS

Η συγκέντρωση των ενδοκυττάριας επιπέδων ROS στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα ανιχνεύθηκε με τη χρήση του αντιδραστήριου CMH₂DCFDA. Πρόκειται για ένα λιπόφιλο, μη φθορίζον συστατικό το οποίο διαπερνά την ερυθροκυτταρική πλασματική μεμβράνη, εισέρχεται στο κύτταρο, κόβεται από εστεράσες, οξειδώνεται από τα ενδοκυττάρια ROS και φθορίζει, με τα επίπεδα φθορισμού να αντικατοπτρίζουν άμεσα τα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS (Antonellou et al., 2012).

Υλικά-Αντιδραστήρια

- CMH₂DCFDA
- DMSO
- PBS 310 mosm
- ΦθορισμόμετροVersaFluor™, Bio-Rad
- Γλυκόζη stock 500mM
- ddH₂O

Πειραματική Διαδικασία

- Αρχική φυγοκέντρωση 1000xg / 10 λεπτά - Αφαίρεση πλάσματος και μεσόφασης λευκοκυττάρων (στα μη αποθηκευμένα δείγματα) και προσθήκη PBS σε αναλογία 1:1 (310mosm)

- Προσθήκη αντιδραστηρίου DCFDA - Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση, σε σκοτάδι για 30 λεπτά
- Φυγοκέντρηση 1000xg /20''- Αφαίρεση Υπερκείμενου
- Προσθήκη PBS, σύντομο vortex και αφήνεται υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι για 12 λεπτά
- Ξέπλυμα με PBS - Αφαίρεση Υπερκείμενου
- Λύση με 1mL ddH₂O
- Μέτρηση στο φθορισμόμετρο (μήκος κύματος διέγερσης: 490nm, μήκος κύματος εκπομπής: 520nm)

B.4.5. Μέτρηση επιπέδων ενδοκυττάριου Ca⁺²

Η μέτρηση των ενδοκυττάριων επιπέδων ασβεστίου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Fluo 4-AM. Είναι λιπόφιλος, μη φθορίζον εστέρας, ο οποίος εισέρχεται εντός της πλασματικής μεμβράνης, κόβεται από εστεράσες, αντιδρά με ιόντα ασβεστίου και φθορίζει με τα παραγόμενα επίπεδα φθορισμού να είναι ανάλογα της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Fluo 4-AM PBS 310mosm
- 145mM NaCl
- 7.5mM KCl
- 1.8mM CaCl₂
- 10mM glucose
- 10mM Hepes/NaOH, pH 7.4 10mM pyruvate
- DMSO
- ddH₂O

Πειραματική Διαδικασία

- Αρχική φυγοκέντρηση 1000xg /10 λεπτά - Αφαίρεση πλάσματος και μεσόφασης λευκοκυττάρων (στα μη αποθηκευμένα δείγματα) και προσθήκη PBS(310mosm), σε αναλογία 1:1.
- Προσθήκη αντιδραστηρίου Fluo-4 (2μM)- Επώαση για 40 λεπτά, στους 37°C, στο σκοτάδι υπό ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση 1000xg /20''- Αφαίρεση υπερκείμενου
- Προσθήκη Ca²⁺buffer (NaCl, KCl, CaCl₂, glucose, Hepes/NaOH, pyruvate) - Αφήνεται για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι υπό ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση 1000xg /20''- Αφαίρεση Υπερκείμενου
- Λύση με 1mL ddH₂O
- Μέτρηση στο φθορισμόμετρο (μήκος κύματος διέγερσης: 485nm, μήκος κύματος εκπομπής: 520nm)

B.4.6. Αντιοξειδωτική Ικανότητα Πλάσματος

Οι μέθοδοι μέτρησης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας παρέχουν ένα σημαντικό εργαλείο για την αποτύπωση της συνολικής εικόνας του αντιοξειδωτικού δυναμικού του αίματος. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι οι οποίες διαφοροποιούνται από το γεγονός ότι βασίζονται σε διαφορετικές πηγές ελευθέρων ριζών, μόρια-στόχους και τελικά προϊόντα. Η μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος πραγματοποιείται με τη χρήση της μεθόδου FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), η οποία μετρά την ικανότητα αναγωγής του συμπλόκου τρισθενούς σιδήρου-τριπυριδυλοτρίαζίνη (Fe^{3+} -TPTZ) σε σύμπλοκο δισθενούς σιδήρου-TPTZ (Fe^{2+} -TPTZ) από τα αντιοξειδωτικά του πλάσματος. Η αντίδραση αυτή, σε χαμηλό pH οδηγεί στον σχηματισμό ενός έντονου μπλε χρώματος, που απορροφά σε μήκος κύματος 593nm. Για τη μέτρηση του ποσοστού συμμετοχής του ουρικού οξέος και των υπολοίπων αντιοξειδωτικών στην αναγωγική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, χρησιμοποιείται το ένζυμο ουρικάση που υδρολύει το ουρικό οξύ μετατρέποντάς το σε αλλαντοΐνη (Benzie and Strain, 1996).

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα (300mM)
- Stock διάλυμα TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) (100mM) FeCl_3 (20mM)
- Uricase
- Πρότυπα διαλύματα ασκορβικού οξέος

Το αντιδραστήριο FRAP είναι έτοιμο μετά από ανάμειξη του ρυθμιστικού διαλύματος, με το αραιωμένο διάλυμα TPTZ (10 mM) σε 40Mm HCL, και του διαλύματος FeCl_3 (20mM) σε αναλογία 10:1:1.

Πειραματική διαδικασία

- Φυγοκέντρηση ολικού αίματος 1000xg /10 λεπτά - Μεταφορά πλάσματος/υπερκειμένου σε νέο erpendorf - Φυγοκέντρηση 1000xg /10 λεπτά-Λήψη πλάσματος από το υπερκείμενο.
- Προσθήκη πλάσματος (με ή χωρίς ουρικάση) στο αντιδραστήριο FRAP - vortex.
- Επώαση για 4 λεπτά στους 37°C.
- Φωτομέτρηση στα 593nm.
- Αντιστοίχιση της απορρόφησης σε πρότυπη καμπύλη.

B.4.7. Ανίχνευση Φωσφατιδυλοσερίνης (PS)

Με τη βοήθεια του κυτταρόμετρου τα κύτταρα περνούν ένα-ένα μέσα από τη δέσμη φωτός, και μια σειρά από αισθητήρες ανιχνεύουν τα είδη του φωτός που διαθλώνται ή εκπέμπονται από αυτά. Ο όρος FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) αφορά την απομόνωση των κυττάρων η οποία βασίζεται σε κυτταρομετρία ροής ενεργοποιημένης από φθορισμό και δίνεται η δυνατότητα διαχωρισμού ενός ετερογενούς μείγματος κυττάρων σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς ανάλογα με τις παραμέτρους που καθορίζονται. Κάθε κύτταρο που περνά μέσα από το κυτταρόμετρο ανιχνεύεται και χαρακτηρίζεται ως ένα ξεχωριστό συμβάν (*event*). Επιπλέον, κάθε είδος δέσμης που

ανιχνεύεται από το κυτταρόμετρο (πρόσθια σκέδαση, πλάγια σκέδαση, και κάθε μήκος κύματος από το οποίο εκπέμπεται φθορισμός) καταχωρείται στο αντίστοιχο κανάλι (*channel*). Τέλος, με την περιογή διαλογής του επιθυμητού κυτταρικού πληθυσμού (*gating*) δίνεται η δυνατότητα επιλογής των κυττάρων που θέλουμε να αναλύσουμε με περισσότερη λεπτομέρεια (Ormelod, 2008)

Μια από τις σημαντικές τροποποιήσεις της πλασματικής μεμβράνης του ερυθροκυττάρου είναι η μετατόπιση της PS στην εξωτερική μονοστιβάδα. Τα αντισώματα έναντι αννεξίνης V και έναντι γλυκοφορίνης A που χρησιμοποιούνται είναι επισημασμένα με διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες (FITC και PE) που φθορίζουν σε διαφορετικά μήκη κύματος, σχηματίζοντας διαφορετικά χρώματα το καθένα. Η αννεξίνη V είναι μια Ca^{2+} εξαρτώμενη πρωτεΐνη η οποία συνδέεται εκλεκτικά με την PS, και ως εκ τούτου χρησιμοποιείται ως ένας ευαίσθητος ιχνηθέτης της, ενώ το CD235 αποτελεί δείκτη της γλυκοφορίνης A, που είναι η κύρια σιαλογλυκοπρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων. Τα δείγματα ελέγχθηκαν για την παρουσία διπλά θετικών κυττάρων (αννεξίνη V/CD235). Για τον προσδιορισμό του απόλυτου αριθμού κυττάρων που εξωτερικεύουν PS χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες με γνωστή συγκέντρωση φθορίζοντα σφαιρίδια (TruCount™).

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Blocking Solution 3,5% BSA
- Anti-CD235-FITC
- Anti-annexin V-PE
- Stop Buffer (0.5 BSA, 1x PBS)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες με TruCounts (φθορίζοντα σφαιρίδια)

Πειραματική Διαδικασία

- Επώαση μικρής ποσότητας ερυθροκυττάρων με Blocking Solution 3,5% BSA για κάλυψη όλων των αντιγονικών θέσεων για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά ποσότητας δείγματος σε σωλήνες με TruCounts.
- Επώαση αραιωμένου αίματος με αντισώματα έναντι αννεξίνης V και γλυκοφορίνης A (CD235) για 20 λεπτά, στο σκοτάδι.
- Σταμάτημα επώασης με προσθήκη του Stop Buffer
- Ανάλυση στο Κυτταρόμετρο, στα 50.000 συμβάντα (*total events*).
- Ανάλυση για διπλά θετικό πληθυσμό.

B.4.8. Παρατήρηση RBCs σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM)

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης στηρίζεται στην αρχή λειτουργίας ενός καθοδικού σωλήνα και περιέχει πηνία για απόκλιση της 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 αυτών (οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια) β) την έξοδό τους από την επιφάνεια του παρασκευάσματος (δευτερογενή ηλεκτρόνια) και, γ) την απελευθέρωση της ηλεκτρο-

μαγνητικής ακτινοβολίας που χαρακτηρίζει την σύσταση του παρασκευάσματος. Ανάλογα με τις πληροφορίες που θέλουμε να πάρουμε, οι ανιχνευτές χρησιμοποιούν και τα αντίστοιχα ηλεκτρόνια. Για παράδειγμα για την παρατήρηση της ακρότατης επιφανειακής μορφολογίας χρησιμοποιούνται τα δευτερογενή ηλεκτρόνια. Για την παραγωγή δευτερογενών ηλεκτρονίων χρειάζεται η επιφάνεια του δείγματος να είναι αγωγίμη, γι' αυτό γίνεται επικάλυψη με Χρυσό - Παλλάδιο (Au-Pd).

Υλικά-Αντιδραστήρια

- PBS 310mosm
- Κακοδυλικό Νάτριο 0,2M
- Διάλυμα 2% γλουταρικής αλδεϋδης
- 4% Σουκρόζη
- Διάλυμα 2% OsO₄
- erpendorf 1,5mL
- Αιθανόλη 100%
- Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης, PHILIPS SEM515
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf, 5410

Πειραματική Διαδικασία

- Φυγοκέντρηση κυτταρικού εναιωρήματος σε χαμηλές στροφές για το διαχωρισμό των ερυθροκυττάρων από το διάλυμα συντήρησης.
- Προσθήκη διαλύματος 2% γλουταραλδεϋδης σε 0,1 mM, κακοδυλικό νάτριο pH 7,4 σε μικρό όγκο κυττάρων και επώαση για 1 ώρα.
- Ξέπλυμα των κυττάρων με διάλυμα 4% σουκρόζης σε 0,1 mM κακοδυλικό νάτριο pH 7,4.
- Προσθήκη 1% OsO₄ σε 0,1 mM κακοδυλικό νάτριο pH 7,4 και επώαση στους 4°C.
- Ξέπλυμα με διάλυμα 4% σουκρόζης σε 0,1 mM κακοδυλικό νάτριο pH 7,4.
- Διαδοχική αφυδάτωση των κυττάρων σε διαλύματα αιθανόλης συγκεντρώσεων 30, 50, 70, 85, 95 και 100%.
- Επίστρωση μικροποσότητας ερυθροκυττάρων σε καλυπτρίδα.
- Κάλυψη με Χρυσό-Παλλάδιο.
- Παρατήρηση στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

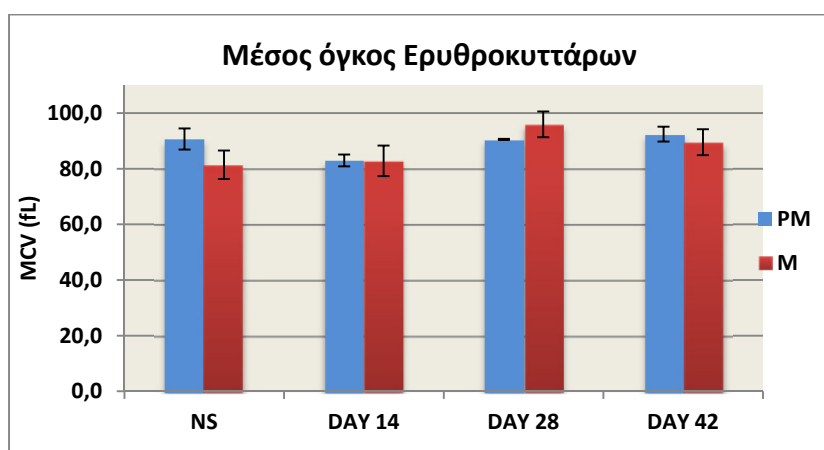
Γ.1. Αιματολογική εικόνα πριν και κατά την αποθήκευση

Σε γενικές γραμμές, οι αιματολογικές παράμετροι που εξετάστηκαν (RBCs, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC, RDW) εμφάνισαν φυσιολογικές τιμές τόσο πριν την αποθήκευση, όσο και στα πακεταρισμένα ερυθροκύτταρα (πίνακας 1). Ωστόσο, τα ερυθροκύτταρα των μετεμνηνοπαυσιακών (PM) γυναικών εμφάνισαν υψηλό δείκτη ανισοκυττάρωσης (RDW) *in vivo*, ο οποίος παρέμεινε σταθερός και στα πακεταρισμένα ερυθροκύτταρα καθ' όλη τη

διάρκεια της αποθήκευσης. Αντίθετα, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση του ίδιου δείκτη στα ερυθροκύτταρα των προεμμηνοπαυσιακών (M) γυναικών όσο προχωράει ο χρόνος της αποθήκευσης, υποδηλώνοντας την προοδευτική εμφάνιση μεγαλύτερων αλλαγών στη μορφολογία των κυττάρων. Επίσης, ο Μέσος Ερυθροκυτταρικός Όγκος (MCV) παρουσιάζει σταθερή αύξηση κατά τη διάρκεια του χρόνου της αποθήκευσης ιδιαίτερα από την ημέρα 28 μέχρι το τέλος της αποθήκευσης.

General Blood Test	NS		DAY 14		DAY 28		DAY 42	
	M (N=4)	PM (N=7)	M (N=4)	PM (N=7)	M (N=4)	PM (N=7)	M (N=4)	PM (N=7)
RBCs (x1000000/μl)	4,53 ±0,27	4,49 ±0,33	6,48 ±0,20	6,52 ±0,35	6,50 ±0,39	6,77 ±0,21	6,54 ±0,42	6,49 ±0,35
Hb (gr/dl)	12,50 ±0,75	13,25 ±1,20	17,73 ±1,24	17,85 ±0,64	19,93 ±0,75	20,90 ±0,71	18,47 ±1,08	18,40 ±0,32
Hct (%)	36,75 ±1,97	40,60 ±1,27	53,63 ±3,37	54,10 ±1,56	56,58 ±2,08	58,50 ±1,56	58,08 ±2,03	59,95 ±2,32
MCV (fl)	81,45 ±5,12	90,70 ±3,82	82,85 ±5,48	83,00 ±2,12	95,98 ±4,63	90,55 ±0,21	89,55 ±4,66	92,45 ±2,66
MCH (pg)	27,60 ±2,32	29,50 ±0,42	27,40 ±2,02	27,40 ±0,57	29,90 ±1,83	29,95 ±0,21	28,05 ±1,32	28,40 ±0,87
MCHC (gr/dl)	33,98 ±1,02	32,55 ±1,91	33,05 ±0,33	33,00 ±0,28	32,88 ±0,84	33,45 ±0,35	32,25 ±0,54	30,75 ±0,67
RDW-CV (%)	12,18 ±0,10	15,85* ±2,19	13,85 ±0,18	15,32 ±1,77	15,70 ±0,22	15,25 ±1,63	15,85 ±1,12	16,4 ±0,53

Πίνακας 1. Αιματολογικοί Δείκτες των δυο ομάδων. NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day14 - Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. N=4 ή N=7 Αναφέρεται στον αριθμό των δειγμάτων κάθε ομάδας. (*): Στατιστικά Σημαντική Διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες (P<0,05). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος (AVG) ± τυπική απόκλιση (SD).

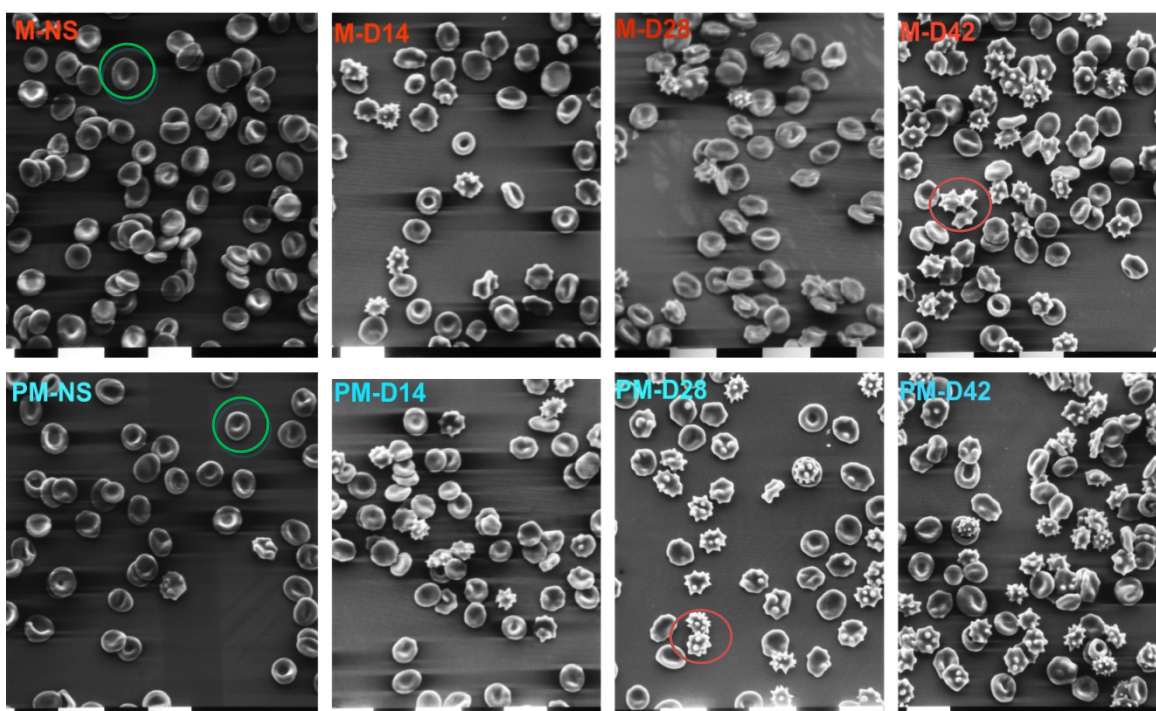


Διάγραμμα 1: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων του δείκτη MCV. NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day14 - Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. Γραμμές σφάλματος: Τυπική Απόκλιση Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος (AVG) ± τυπική απόκλιση (SD)

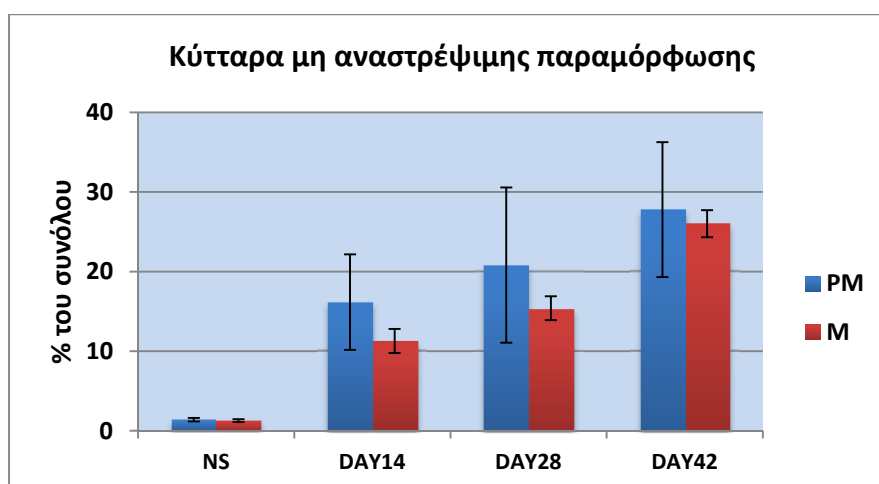
Γ.2. Μορφολογικές τροποποιήσεις

Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης, τα ερυθροκύτταρα υφίστανται μια σταδιακή, βαθμιαία αλλαγή όσον αφορά στο σχήμα τους, όπου από δισκοκύτταρα σταδιακά μετατρέπονται σε εχينوκύτταρα, σφαιρο-εχينوκύτταρα και τελικά σε σφαιροκύτταρα μέσω της απώλειας μεμβράνης υπό τη μορφή κυστιδίων. Μετά από κατάλληλη προετοιμασία των δειγμάτων, ακολούθησε παρατήρηση σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης όπου εντοπίστηκαν χαρακτηριστικές μεταβολές στην μορφολογία τους. Στην παρούσα εργασία δόθηκε έμφαση στις μη αναστρέψιμες μορφές (κυρίως σφαιρο-εχينوκύτταρα) οι οποίες επηρεάζουν αρνητικά την ανάκτηση των ερυθροκυττάρων μετά την μετάγγιση.

Γενικά παρατηρήθηκε μείωση των δισκοκυτταρικών μορφών με ταυτόχρονη έντονη μορφολογική τροποποίηση των ερυθροκυττάρων, η οποία αυξανόταν σε συνάρτηση με τη διάρκεια αποθήκευσης. Ανάμεσα στις δύο ομάδες δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης (Διαγραμμα 2). Παρόλαυτά, όπως φαίνεται πιο καθαρά στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2) υπήρξε μια τάση για υψηλότερα επίπεδα μη αναστρέψιμης εχينوκυττάρωσης στα δείγματα των μετεμμηνοπαυσιακών. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται αντιπροσωπευτικές μορφές των διαφορετικών τύπων ερυθροκυττάρων όπως στοματοκύτταρα, εχينوκύτταρα, σφαιρο-εχينوκύτταρα κ.α.



Εικόνα 19. Ηλεκτρονιογραφίες δειγμάτων από ΗΜΣ. Διακρίνονται φυσιολογικά ερυθροκύτταρα (πράσινοι κύκλοι) και μη αναστρέψιμες εχينوκυτταρικές μορφές (κόκκινοι κύκλοι). **NS:** Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. **Day14-Day42:** Ημέρες Αποθήκευσης. **M:** Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. **PM:** Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. Γραμμές σφάλματος: Τυπική Απόκλιση.



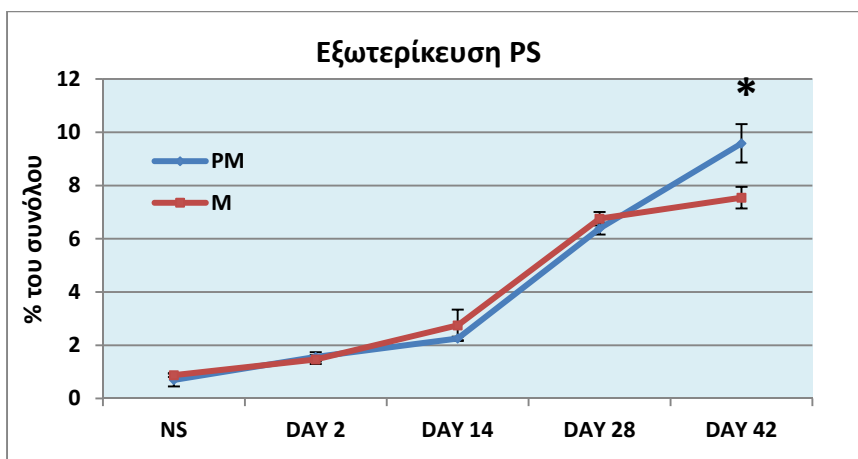
Διαγραμμα 2. Ποσοστά μη αναστρέψιμων μορφολογικών τροποποιήσεων. NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day14-Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. Γραμμές σφάλματος: Τυπική Απόκλιση.

Ποσοστά μη αναστρέψιμων μορφολογικών τροποποιήσεων (%)		NS	DAY14	DAY28	DAY42
PM (N=7)	AVG	1,40	16,17	20,82	27,78
	SD	0,22	6,00	9,76	8,48
M (N=4)	AVG	1,28	11,29	15,41	26,01
	SD	0,17	1,51	1,50	1,70

Πίνακας 2. Ποσοστά μη αναστρέψιμων μορφολογικών τροποποιήσεων. NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day14-Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση.

Γ.3. Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης (PS)

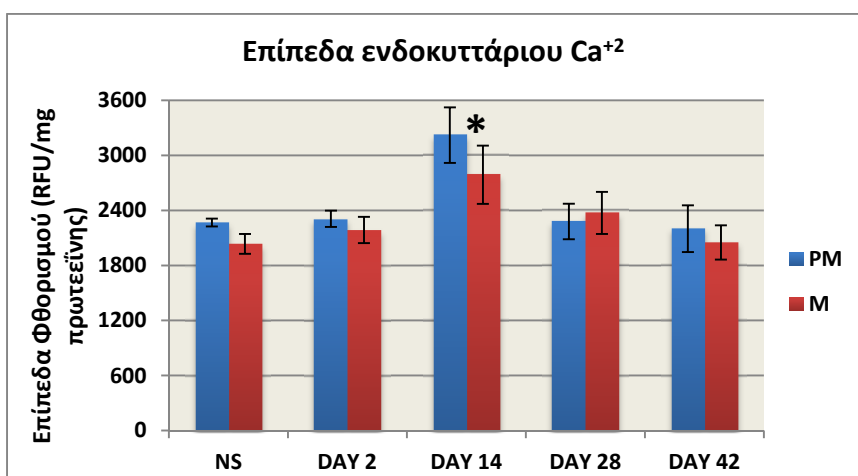
Η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης από τα ερυθροκύτταρα σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση των μεταγγιζόμενων ερυθροκυττάρων μετά την μετάγγιση και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κλινικών επιλοκών στον δέκτη. Γενικά, κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των μονάδων αίματος, παρατηρήθηκε μια σταδιακή αύξηση των επιπέδων των PS⁺ ερυθροκυττάρων, η οποία ήταν ανάλογη του χρόνου αποθήκευσής τους. Ειδικότερα, μέχρι τις 2 πρώτες εβδομάδες της αποθήκευσης, τα επίπεδα ήταν σχετικά χαμηλά ενώ από την 14^η ημέρα μέχρι την 28^η υπήρξε μια απότομη αύξηση της εξωτερικευμένης PS η οποία κορυφώθηκε την ημέρα 42 της αποθήκευσης και για τις δύο ομάδες. Στην τελευταία μέτρηση που πραγματοποιήθηκε (42^η ημέρα), παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0,05) ανάμεσα στις δύο ομάδες των μονάδων με αρκετά υψηλότερη εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης στις μονάδες των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών.



Διάγραμμα 3: Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού των ερυθροκυττάρων που εκθέτουν φωσφατιδυλοσερίνη πριν (NS) και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day2-Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. (*) Στατιστικά Σημαντική Διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($P<0,05$). Γραμμές σφάλματος: Τυπική Απόκλιση

Γ.4. Επίπεδα Ca^{+2}

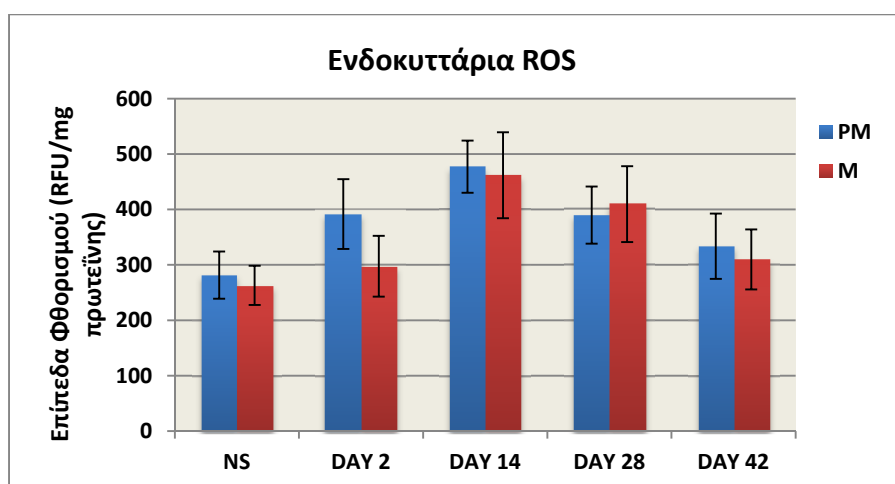
Η συσσώρευση ασβεστίου συνοδεύει είτε την γήρανση των ερυθροκυττάρων είτε την *in vitro* επιβολή στρεσογόνων ερεθισμάτων και προκαλεί άμεσα ή προωθεί έμμεσα έναν καταρράκτη γεγονότων που οδηγούν σε αλλαγές όσον αφορά στο δυναμικό της μεμβράνης, τον κυτταρικό όγκο και την κυτταρική μορφολογία. Σύμφωνα με τον φθορισμομετρικό προσδιορισμό, αρχικά παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων του ενδοκυττάρου Ca^{+2} ανάμεσα στις δύο ομάδες πριν την αποθήκευση (NS). Σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε την 14^η ημέρα της αποθήκευσης και για τις 2 ομάδες, με μια επακόλουθη, σταδιακή μείωση τις δύο τελευταίες εβδομάδες της αποθήκευσης. Επιπρόσθετα, αν και ανάμεσα στις δύο ομάδες μονάδων τα ενδοκυτταρικά επίπεδα Ca^{+2} ήταν παρόμοια, την 14^η ημέρα της αποθήκευσης, οι μονάδες των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών παρουσίασαν υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τις μονάδες των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών.



Διάγραμμα 4: Διαγραμματική απεικόνιση της χρονοεξαρτώμενης διακύμανσης των επιπέδων ενδοκυττάρου Ca^{+2} . NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day2-Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. (*) Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες ($P<0,05$). Γραμμές σφάλματος: Τυπική Απόκλιση.

Γ.5. Επίπεδα Ενεργών Ριζών Οξυγόνου (ROS)

Τα επίπεδα ενδοκυττάρων ROS μετρήθηκαν τόσο πριν όσο και κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των ROS των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων σε σχέση με τα NS δείγματα ήδη από τις πρώτες 2 ημέρες της αποθήκευσης, ειδικά στα δείγματα των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών. Η αύξηση συνεχίστηκε, φτάνοντας τα μέγιστα επίπεδα την 14^η ημέρα της αποθήκευσης. Στη συνέχεια, και στις δύο ομάδες παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση των επιπέδων των ROS, κάτι που συμβαδίζει με την εικόνα του ενδοκυττάρου ασβεστίου. Τέλος, από την 14^η ημέρα του ασκού, και μέχρι το τέλος της αποθήκευσης, οι δύο ομάδες φαίνεται να συμβαδίζουν ως προς τα σταδιακά μειωμένα επίπεδα ROS, χωρίς να παρουσιάζουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικές διαφορές.

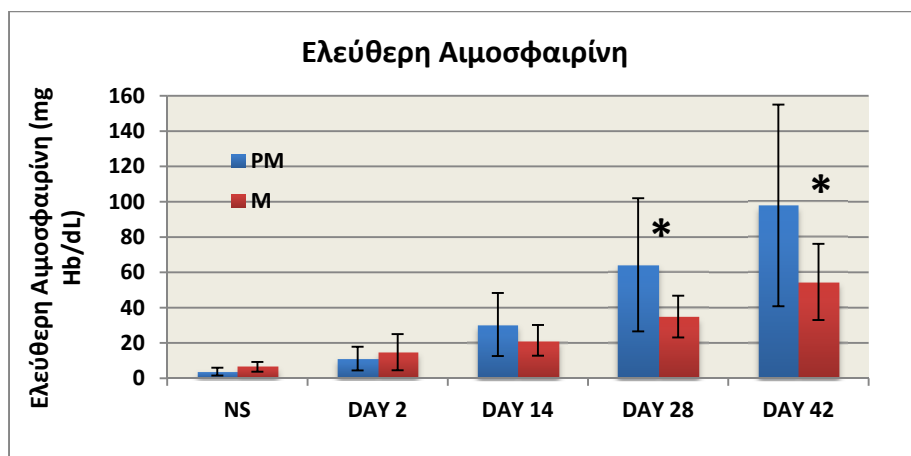


Διάγραμμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της χρονοεξαρτώμενης διακύμανσης των επιπέδων ROS. NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day2-Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. Γραμμές σφάλματος: Τυπική Απόκλιση.

Γ.6. Βιολογικές Μετρήσεις Ερυθροκυττάρων και Πλάσματος

Γ.6.1. Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη Πλάσματος

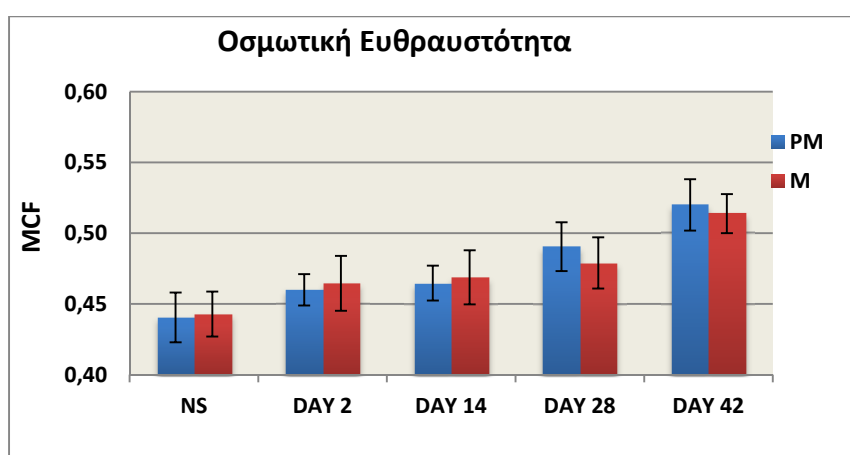
Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη είναι ευθέως ανάλογη του ποσοστού της αιμόλυσης που λαμβάνει χώρα κατά την διάρκεια της αποθήκευσης των ερυθροκυττάρων. Η αιμόλυση αυξάνεται με την αποθήκευση, και παρουσιάζει διαφορές ανάμεσα στους διαφορετικούς αιμοδότες. Από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, σε κανένα δείγμα η αιμόλυση εντός της μονάδας μετάγγισης δεν ξεπέρασε το 0,8%, που είναι το ανώτερο επιτρεπτό όριο σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης με υψηλότερα επίπεδα μετά την δεύτερη εβδομάδα της αποθήκευσης και για τις δυο ομάδες μονάδων. Ωστόσο, οι μονάδες που προέρχονταν από μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, εμφάνισαν σταθερά υψηλότερα επίπεδα, φτάνοντας σε σχεδόν διπλάσιες τιμές (M=34,92 και 54,59 mg/dl έναντι PM=64,27 και 97,90 mg/dl αντίστοιχα, στις δύο τελευταίες χρονικές περιόδους αποθήκευσης των μονάδων - ημέρες 28 και 42).



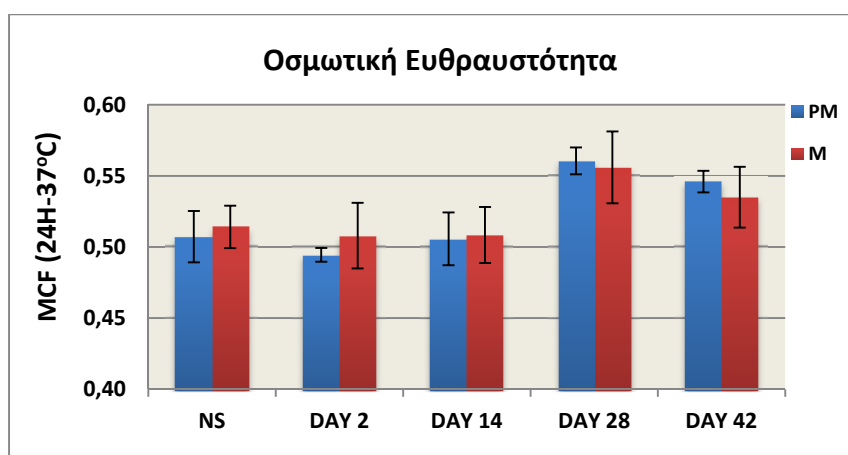
Διάγραμμα 6: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων ελεύθερης αιμοσφαιρίνης. NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day2-Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. (*) Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες ($P < 0,05$). Γραμμές σφάλματος: Τυπική Απόκλιση.

Γ.6.2. Οσμωτική Ευθραυστότητα

Τα δείγματα μετρήθηκαν δύο φορές σε κάθε χρονική περίοδο αποθήκευσης, με τη δεύτερη μέτρηση να πραγματοποιείται μετά από 24ωρη επώαση των δειγμάτων στους 37°C. Σε γενικές γραμμές, παρατηρήθηκε γραμμική, χρονοεξαρτώμενη αύξηση της οσμωτικής ευθραυστότητας σε όλα τα δείγματα. Ειδικότερα, όσον αφορά στις πρώτες μετρήσεις των δειγμάτων (πριν την επώαση στους 37°C), η αιμόλυση φαίνεται να ξεκινά περίπου στο 0,45% NaCl στις πρώτες δύο εβδομάδες αποθήκευσης, και στο 0,50% περίπου, στις δύο τελευταίες εβδομάδες χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες μονάδων. Στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν μετά την 24ωρη επώαση των αντίστοιχων δειγμάτων, η αιμόλυση ξεκίνησε περίπου στο 0,50% NaCl για τις πρώτες δύο εβδομάδες, ενώ την 28^η ημέρα η συγκέντρωση NaCl που προκάλεσε 50% αιμόλυση ήταν γύρω στο 0,55% και για τις δυο ομάδες.



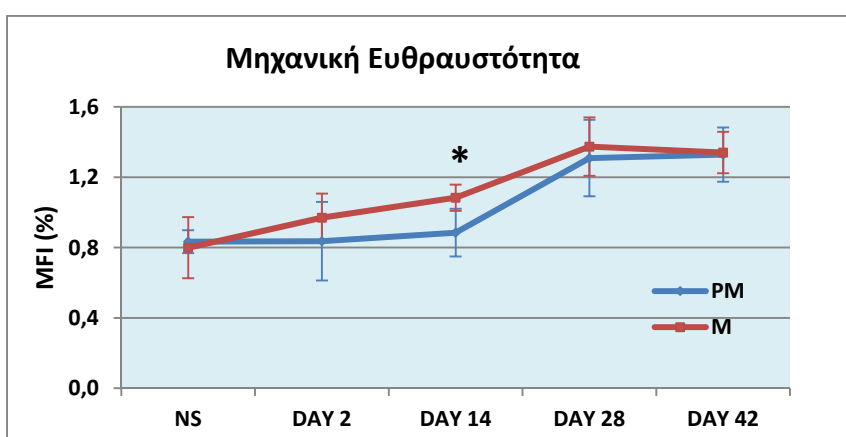
Διάγραμμα 7: Διαγραμματική απεικόνιση της χρονοεξαρτώμενης μεταβολής της οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων. NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day2-Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. Γραμμές σφάλματος: Τυπική Απόκλιση.



Διάγραμμα 8: Διαγραμματική απεικόνιση της χρονοεξαρτώμενης μεταβολής της οσμωτικής ευθραυστότητας ερυθροκυττάρων ύστερα από 24ωρη επώαση στους 37 °C. NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day2-Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. Γραμμές σφάλματος: Τυπική Απόκλιση.

Γ.6.3. Μηχανική Ευθραυστότητα

Παρατηρήθηκε σαφής τάση αύξησης του δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας τόσο στα ερυθροκύτταρα των μετεμμηνοπαυσιακών όσο και σε αυτά των προεμμηνοπαυσιακών αιμοδοτριών καθ' όλη τη διάρκεια αποθήκευσης. Τα φρέσκα δείγματα και των δυο ομάδων είχαν παρόμοιο δείκτη MFI. Ωστόσο, τα δείγματα των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών παρουσίασαν υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με εκείνα των μετεμμηνοπαυσιακών ήδη από την δεύτερη ημέρα της αποθήκευσης. Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες μονάδων υπήρξε την 14^η ημέρα με τα ερυθροκύτταρα των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών να παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές σε σχέση με εκείνα των μετεμμηνοπαυσιακών. Η υψηλότερη τιμή μηχανικής ευθραυστότητας και για τις δύο ομάδες μονάδων χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους παρουσιάστηκε την 28^η ημέρα αποθήκευσης, ενώ εμφανίστηκε σταθεροποίηση των επιπέδων την ημέρα 42.

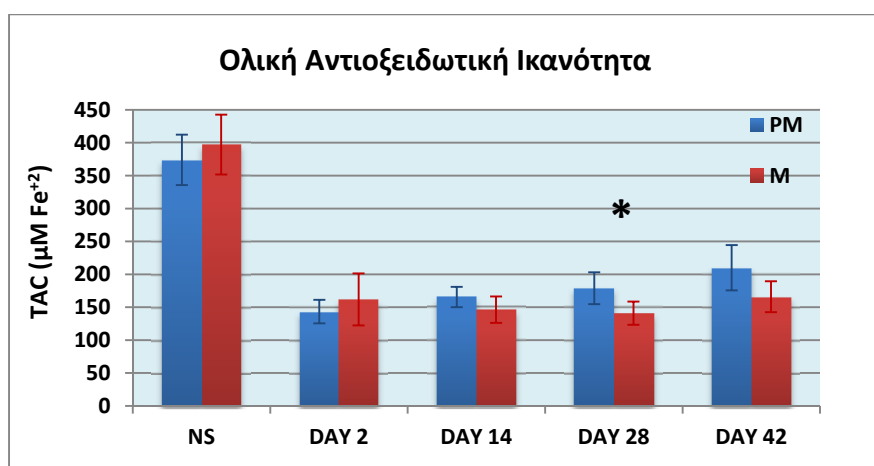


Διάγραμμα 9: Διαγραμματική απεικόνιση της χρονοεξαρτώμενης μεταβολής της μηχανικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων. NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day2-Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. (*) Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες ($P < 0,05$). Γραμμές σφάλματος: Τυπική Απόκλιση.

Γ.6.4. Αντιοξειδωτική Ικανότητα Πλάσματος

Η αντιοξειδωτική ικανότητα μετρήθηκε στο υπερκείμενο των μονάδων μετάγγισης όπως αναφέρεται αναλυτικά στο προηγούμενο κεφάλαιο (B.4.6). Τόσο στα φρέσκα δείγματα όσο και στα αποθηκευμένα δείγματα μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος/υπερκειμένου, η αντιοξειδωτική ικανότητα του ουρικού οξέος, και υπολογίστηκε η ποσοστιαία συμμετοχή του δεύτερου στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.

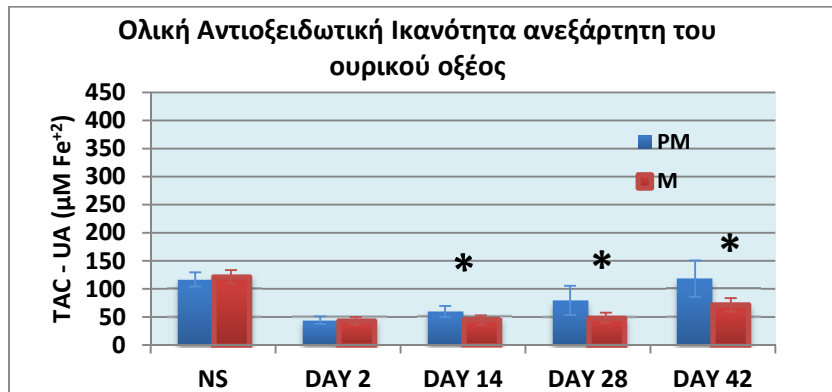
Όσον αφορά στη μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος /υπερκειμένου, στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα, σημειώθηκε απότομη μείωση των επιπέδων αντιοξειδωτικής ικανότητας σε σχέση με εκείνα των φρέσκων (NS) δειγμάτων (διάγραμμα 10). Επίσης, αν και παρατηρήθηκε μικρή αύξηση μέχρι το τέλος της αποθήκευσης, η αντιοξειδωτική ικανότητα στο υπερκείμενο των πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων που μετρήθηκε την ημέρα 42, ήταν πολύ χαμηλότερη σε σύγκριση με εκείνη των NS δειγμάτων. Ανάμεσα στις δύο ομάδες μονάδων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές τιμών εκτός από την 28^η ημέρα όπου τα επίπεδα αντιοξειδωτικής ικανότητας των μονάδων των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών ήταν σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με εκείνα των μονάδων των προεμμηνοπαυσιακών (179±24,2 έναντι 141±17,6μM).



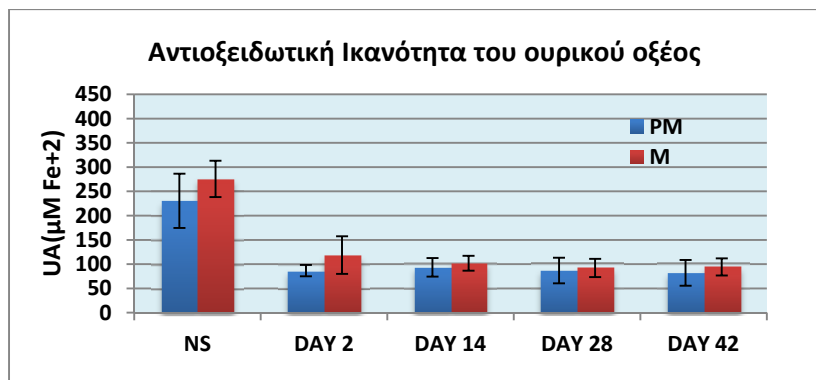
Διάγραμμα 10. Διαγραμματική απεικόνιση της χρονοεξαρτώμενης διακύμανσης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος/υπερκειμένου. NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day2-Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. (*) Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες (P<0,05). Γραμμές σφάλματος: Τυπική Απόκλιση.

Το ουρικό οξύ φαίνεται να συμβάλλει σημαντικά στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος σύμφωνα με τις μετρήσεις που έγιναν καθώς η αντιοξειδωτική ικανότητα χωρίς τη συμμετοχή του ουρικού οξέος παρουσιάζει εμφανώς χαμηλότερες τιμές (διάγραμμα 11). Συγκεκριμένα, η ποσοστιαία συμμετοχή της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ουρικού οξέος στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα φτάνει το 70% περίπου τόσο στα NS δείγματα όσο και στα αποθηκευμένα δείγματα (διάγραμμα 13). Επιπρόσθετα, παρατηρείται η ίδια σταδιακή αύξηση των επιπέδων αντιοξειδωτικής

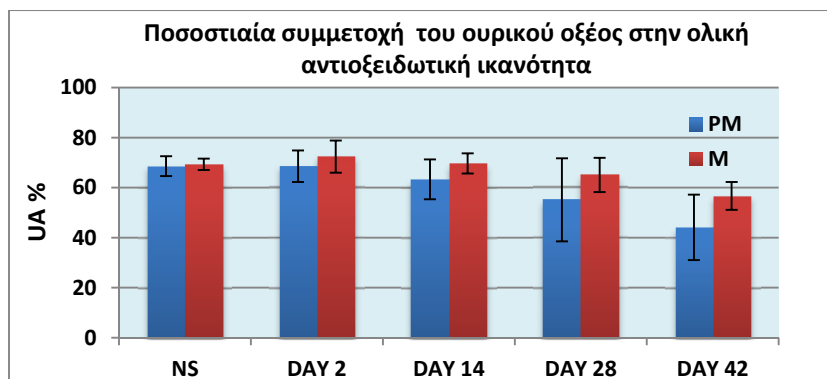
ικανότητας από την ημέρα 14 έως την ημέρα 42 της αποθήκευσης όπου παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων.



Διάγραμμα 11. Διαγραμματική απεικόνιση της χρονοεξαρτώμενης διακύμανσης της ανεξάρτητης του ουρικού οξέος αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος/υπερκειμένου. NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day2-Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. (*) Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες (P<0,05). Γραμμές σφάλματος: Τυπική Απόκλιση.



Διάγραμμα 12. Διαγραμματική απεικόνιση της χρονοεξαρτώμενης διακύμανσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ουρικού οξέος. NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day2-Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. Γραμμές σφάλματος: Τυπική Απόκλιση.



Διάγραμμα 13. Απεικόνιση της ποσοστιαίας συμμετοχής του ουρικού οξέος στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. NS: Φρέσκο δείγμα πριν την Αποθήκευση σε Μονάδα Μετάγγισης. Day2-Day42: Ημέρες Αποθήκευσης. M: Γυναίκες πριν την Εμμηνόπαυση. PM: Γυναίκες μετά την Εμμηνόπαυση. Γραμμές σφάλματος: Τυπική Απόκλιση.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αιματολογικό Πρότυπο

Η παρατηρούμενη αύξηση του δείκτη MCV κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και στις δυο ομάδες αιμοδοτριών, δηλώνει διόγκωση των κυττάρων εξαιτίας της διαρροής κατιόντων και εισροής νερού ήδη από την πρώτη μέρα της αποθήκευσης (Antonellou et al., 2012). Η αύξηση του κυτταρικού όγκου σε συνδυασμό με την απώλεια μεμβράνης ορισμένων ερυθροκυττάρων μέσω κυστιδιοποίησης και τη δημιουργία μικρότερων σφαιροκυτταρικών μορφών, οδηγεί σε σταθερή αύξηση του δείκτη ανισοκυττάρωσης (Flatt et al., 2014) όπως παρατηρήθηκε στα δείγματα των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών. Όσον αφορά στα αυξημένα επίπεδα RDW που παρατηρούνται στα δείγματα των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών *in vivo*, έρευνες υποστηρίζουν ότι το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή επηρεάζουν αυτόν τον ερυθροκυτταρικό δείκτη δημιουργώντας ένα μικτό πληθυσμό ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία (Patel et al., 2009).

Μορφολογική Εικόνα

Μορφολογικές τροποποιήσεις

Η μορφολογία των κυττάρων των δυο ομάδων επιδεινώθηκε κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Συγκεκριμένα, φαινότυπος μη αναστρέψιμης μορφολογίας αυξήθηκε σημαντικά μετά τις 2 εβδομάδες αποθήκευσης, γεγονός που συμφωνεί με την δημοσιευμένη βιβλιογραφία (Blasi et al., 2012). Τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα εμφάνισαν σταδιακή αλλαγή στο σχήμα τους όπου μέσω κυστιδιοποίησης, από δισκοκύτταρα μετασχηματίστηκαν σε εχινοκύτταρα και τελικά σφαιροκύτταρα και κύτταρα ακανόνιστου σχήματος. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ελαφρώς πιο αυξημένα επίπεδα των μη αναστρέψιμων ερυθροκυτταρικών μορφών (σφαιροεχινοκυττάρων) στα δείγματα των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών καθόλη τη διάρκεια της αποθήκευσης, όμως, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντικές αυτές οι διαφορές. Ωστόσο, έρευνες έχουν δείξει χαμηλότερα επίπεδα κυστιδιοποίησης σε ερυθροκύτταρα που προέρχονταν από προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σχέση με εκείνα των μετεμμηνοπαυσιακών (Gustafson et al., 2015). Είναι σημαντική η παρατήρηση ότι το χρονικό σημείο της αύξησης του ποσοστού των σφαιροεχινοκυττάρων συμπίπτει με εκείνο της μείωσης του ATP. Κατά την αποθήκευση, η μεμβρανική σταθερότητα (ως εκ τούτου και η ανάκτηση των ερυθροκυττάρων *in vivo*) επηρεάζεται από τα επίπεδα του ATP *in vitro* (Nakao et al., 1962), τα οποία μειώνονται σταδιακά από το μέσο της αποθήκευσης και μετά, καθώς οι συνθήκες που ευνοούν τη σύνθεσή του χειροτερεύουν (χαμηλή θερμοκρασία και pH) (Hess, 2014). Αν και ο συνολικός ρόλος της ελάττωσης του ATP στις μετα-μεταγγισιακές επιπλοκές φαίνεται να είναι αρκετά περιορισμένος (Karger et al., 2012), η οιστραδιόλη έχει δείχθει ότι μειώνει τη διαρροή ATP από ερυθροκύτταρα όπως και η προγεστερόνη (Letourneau et al., 2010; De Venuto and Wilson, 1976).

Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης (PS)

Όπως έχει αναφερθεί, η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης αποτελεί ευαίσθητο δείκτη ταχείας αναγνώρισης και απομάκρυνσης των ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία. Η χρονο-εξαρτώμενη εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης που παρατηρήθηκε και στις δύο ομάδες μονάδων, συμφωνεί με την δημοσιευμένη βιβλιογραφία, γεγονός που την αναδεικνύει ως βιολογικά σημαντική παράμετρο για την ποιότητα των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων (Verhoeven et al., 2006; Bosman et al., 2011). Παρατηρήθηκε παράλληλη αύξηση του ποσοστού της εξωτερικευμένης φωσφατιδυλοσερίνης με αύξηση του MCV, και της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος των δειγμάτων, τα οποία συμφωνούν επίσης με παλαιότερες έρευνες (Salzer et al., 2008; Lutep et al., 2004). Τα προαποθηκευτικά επίπεδα της εξωτερικευμένης φωσφατιδυλοσερίνης αλλά και αυτά κατά την αποθήκευση ήταν παρόμοια ανάμεσα στις δύο ομάδες, με μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά το τέλος της αποθήκευσης. Σύμφωνα με ανασκόπηση της πρόσφατης βιβλιογραφίας, δεν έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα που να αποδίδουν άμεσα την παραπάνω αύξηση σε ορμονικούς παράγοντες του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Παρόλα αυτά, είναι γνωστό ότι η εξωτερίκευση της PS *in vitro* αυξάνεται με τη δημιουργία στρεσογόνων παραγόντων που την προάγουν καθώς προχωρά η αποθήκευση (Orlov et al., 2015). Στους παράγοντες αυτούς συγκαταλέγεται και το οξειδωτικό στρες. Πράγματι, προηγούμενες έρευνες αναφέρουν την επίδραση της οιστραδιόλης στη βελτίωση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών (ενζυμικών και μη) των ερυθροκυττάρων *in vivo* (Massafra et al., 2000; Rembacz et al., 2012; Ansar et al., 2015). Επιπλέον, οι προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αναμένεται να έχουν νεότερο ερυθροκυτταρικό πληθυσμό εξαιτίας της περιοδικής απώλειας αίματος (Kamaneva et al., 1999) και είναι ενδιαφέρον ότι η επιδεκτικότητα στην -προκαλούμενη από οξειδωτικό στρες- εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης, είναι αυξημένη σε γηραιότερα σε σχέση με τα νεαρά ερυθροκύτταρα (Ghashghaeinia et al., 2012)

Παράμετροι που σχετίζονται με την αιμόλυση

Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη

Η αιμόλυση της μονάδας μετάγγισης αποτελεί βασικό κριτήριο για την αξιολόγηση της ποιότητας των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων. Η αυξανόμενη απελευθέρωση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, οφείλεται στις συνεχώς επιδεινούμενες συνθήκες που επικρατούν εντός της μονάδας (Hess, 2014). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων που εμφανίστηκαν από την ημέρα 28 και μετά, συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία και συγκεκριμένα με την ομάδα της Raval και των συνεργατών της που παρατήρησαν χαμηλότερα ποσοστά αιμόλυσης στις μονάδες ερυθροκυττάρων προεμμηνοπαυσιακών γυναικών (Raval et al., 2010) συγκριτικά με εκείνες των μετεμμηνοπαυσιακών. Σε συγκριτική μελέτη αιμόλυσης μεταξύ ερυθροκυττάρων από προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σχέση με ανδρών συγκρίσιμης ηλικίας, παρατηρήθηκε εξίσου μικρότερη τάση αιμόλυσης πιθανά λόγω της ευεργετικής (αντιοξειδωτικής) επίδρασης των οιστρογόνων στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (Kanias et al., 2011), μιας και τα επίπεδα οιστρογόνων και προγεστερόνης των

τελευταίων είναι πιο αυξημένα συγκριτικά με τους άντρες και τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Fisher, 2007). Επιπλέον, στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, εξαιτίας της περιοδικής απώλειας αίματος, επηρεάζεται σημαντικά η ηλικιακή κατανομή των ερυθροκυττάρων με αποτέλεσμα τα νεότερα ερυθροκύτταρα να απελευθερώνουν λιγότερη αιμοσφαιρίνη στο πλάσμα (Kamaneva et al., 1999). Έχει δειχθεί άλλωστε ότι κάτω από την επίδραση διάφορων οξειδοαναγωγικών και μεταβολικών διαταραχών, η ηλικία των ερυθροκυττάρων τη στιγμή της αιμοδοσίας πιθανώς επηρεάζει την ποιότητά τους κατά την αποθήκευση σε μονάδες μετάγγισης (Tuo et al., 2014).

Οσμωτική Ευθραυστότητα

Η γραμμική, χρονοεξαρτώμενη αύξηση της οσμωτικής ευθραυστότητας των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων είναι αναμενόμενη ως παράγοντας της αποθηκευτικής βλάβης (Blasi et al., 2012). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δυο ομάδες αιμοδοτριών. Αν και δεν έχουν πραγματοποιηθεί παρόμοιες έρευνες που να συγκρίνουν τις δύο ομάδες ως προς την οσμωτική ευθραυστότητα, σε έρευνες μεταξύ αντρών και προεμμηνοπαυσιακών γυναικών παρατηρείται χαμηλότερη οσμωτική ευθραυστότητα στα δείγματα των δεύτερων (Kaniyas et al., 2011) *in vitro*. Επίσης, σε *in vitro* έρευνα, στην οποία είχε προστεθεί εξωγενώς προγεστερόνη σε αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα παρατηρήθηκε μειωμένη οσμωτική ευθραυστότητα και κυτταρική λύση σε σχέση με ερυθροκύτταρα τα οποία δεν δέχθηκαν την επίδραση της ορμόνης (De Venuto and Wilson, 1976).

Ίδια εικόνα παρατηρήθηκε όσον αφορά στις μεταξύ τους διαφορές και για τα επίπεδα οσμωτικής ευθραυστότητας μετά από 24ωρη επώαση. Ωστόσο, και οι δύο ομάδες παρουσίασαν αυξημένο δείκτη οσμωτικής ευθραυστότητας μετά την επώαση, σε συνθήκες δηλαδή στις οποίες αυξάνεται η ευαισθησία της δοκιμασίας. Πράγματι, σε αυτές τις συνθήκες μπορεί να αποκαλυφθεί ευαισθησία μη φυσιολογικών κυττάρων στην οσμωτική λύση (Pleari et Mosca, 2008).

Μηχανική Ευθραυστότητα

Όσον αφορά στη μηχανική ευθραυστότητα, είναι γνωστό ότι οι μηχανικές ιδιότητες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης επηρεάζονται σημαντικά από τις συνθήκες της αποθήκευσης (Tarasev et al., 2013). Αυτό το γεγονός επιβεβαιώνεται από τις μετρήσεις μας στις οποίες παρατηρήθηκε χρονοεξαρτώμενη αύξηση της μηχανικής ευθραυστότητας και για τις δυο ομάδες αιμοδοτριών. Έρευνες έχουν δείξει σημαντικές διαφορές στις μηχανικές ιδιότητες των “νεαρών” σε σχέση με τα “γηρασμένα” ερυθροκύτταρα (Kameneva et al., 1998). Ωστόσο, οι περισσότερες αυξημένες τιμές παρατηρήθηκαν στην ομάδα των προεμμηνοπαυσιακών (με στατιστικά σημαντική διαφορά την 14^η ημέρα) σε αντίθεση με την έως τώρα δημοσιευμένη βιβλιογραφία (Raval et al., 2010; Kaniyas et al., 2012). Από την άλλη, η ομάδα του Daly και συν. επίσης δεν βρήκε σημαντικές διαφορές σε επίπεδο μηχανικών ιδιοτήτων και κυτταρικής παραμορφωσιμότητας σε έρευνα με συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα αντρών και προεμμηνοπαυσιακών γυναικών (Daly et al., 2014). Η ικανότητα παραμόρφωσης της μεμβράνης μπορεί να είναι χαρακτηριστικό που διαφέρει ανάμεσα σε υγιείς αιμοδότες, οι οποίοι μπορεί εμφανίζουν από μηδέν έως 20% υπο-παραμορφώσιμα και υπερ-παραμορφώσιμα κύτταρα (Dobbe et al., 2002). Βέβαια, δεν

είναι γνωστό πόσο εκτεταμένες μπορεί να είναι τέτοιες διαφορές, ούτε πόσο ανιχνεύσιμη θα μπορούσε να είναι μια τέτοια εγγενής ποικιλομορφία κυτταρικών ιδιοτήτων όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών μονάδων αλλά και μέσα στην ίδια μονάδα αποθήκευσης. Παρόλα αυτά, ένα πείραμα με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων υπό αυστηρώς ίδιες συνθήκες θα μπορούσε να αποσαφηνίσει το εύρος των διαφορών (αν και εφόσον υπάρχουν) ανάμεσα στις δύο εξεταζόμενες ομάδες.

Εικόνα Οξειδωτικής/Αντιοξειδωτικής κατάστασης RBCs και Πλάσματος

Επίπεδα Ενεργών Ριζών Οξυγόνου (ROS)

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό της αποθηκευτικής βλάβης των ερυθροκυττάρων. Τα οξειδωτικά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης πιθανώς σχετίζονται με τον κίνδυνο επιπλοκών μετά την μετάγγιση. Η προέλευση των ROS θα μπορούσε να αποδοθεί στην κυτταρική γήρανση, στην οξείδωση της αιμοσφαιρίνης, στην υπεροξείδωση των λιπιδίων και στις αλλαγές των αντιοξειδωτικών μηχανισμών που συνδέονται με μεταβολικές αλλαγές που παρατηρούνται στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα (Kaniyas et al., 2010; Jozwik et al., 1997; Messana et al., 2000). Τα ενδοκυττάρια επίπεδα ROS και για τις δύο ομάδες αυξήθηκαν σταδιακά την πρώτη εβδομάδα της αποθήκευσης, φτάνοντας τα μέγιστα επίπεδα την δεύτερη εβδομάδα. Η πτώση που ακολούθησε μετά, μπορεί να αποδίδεται είτε σε διαρροή του αντιδραστηρίου από το εσωτερικό των ερυθροκυττάρων εξαιτίας των υψηλών επιπέδων αιμόλυσης είτε, πιο πιθανό, στη χαμηλή ενεργότητα των εστερασών στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα (Gottlieb et al., 2012).

Ανάμεσα στις δύο ομάδες δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Ωστόσο, μιας και η ποσότητα των αντιοξειδωτικών στο ερυθροκύτταρο αποτελεί κατάλληλο δείκτη για την αξιολόγηση της έκθεσης σε ROS, μελέτες που αναδεικνύουν την βελτίωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των RBCs σε φρέσκο αίμα από την οιστραδιόλη, υποστηρίζουν την επαγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, CAT) και την ελάττωση υπεροξείδωσης των λιπιδίων (Mahla et al., 2014; Rembacz et al., 2012; Mladenovic et al., 2013) σε καταστάσεις αυξημένου οξειδωτικού στρες. Επίσης, έχει βρεθεί σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες κατά την διάρκεια του έμμηνου κύκλου ότι τα αυξημένα επίπεδα της οιστραδιόλης του πλάσματος οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα GSH και καταλάσης των ερυθροκυττάρων (Chang et al., 2014), ενώ παράλληλα, συγκριτική μελέτη των δυο ομάδων έδειξε σημαντική μείωση των αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, GPx, CAT) στα ερυθροκύτταρα μετεμμηνοπαυσιακών *in vivo* (Ansar et al., 2015).

Επίπεδα Ενδοκυττάρου Ca^{+2}

Παρόμοια εικόνα (όσον αφορά στον χρόνο αποθήκευσης) με εκείνη των ενδοκυττάρων ROS παρατηρήθηκε και στα ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου όμως με στατιστικά σημαντικές διαφορές πριν την αποθήκευση και την 14^η ημέρα υπέρ των εμμηνοπαυσιακών γυναικών. Η εισροή ασβεστίου σχετίζεται σαφώς με την οξειδωτική

βλάβη, την κυστιδιοποίηση και τις μορφολογικές τροποποιήσεις των γηρασμένων ερυθροκυττάρων *in vivo* (Kiefer and Synder, 2000). Δεν έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής συγκριτικές μελέτες μέτρησης ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου σε αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα προεμμηνοπαυσιακών και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, είναι γνωστό ότι η ενεργότητα της ATP-ασης Ca^{+2} μειώνεται αισθητά καθώς αυξάνεται η ηλικία των ερυθροκυττάρων (Lew et al, 2003). Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί μεταβλητότητα μεταξύ των διαφορετικών υγιών αιμοδοτών ως προς τα βασικά επίπεδα των καναλιών ασβεστίου, γεγονός που οδηγεί σε διαφορετικά επίπεδα ενδοκυττάρου ασβεστίου (Makhro et al., 2013).

Αντιοξειδωτική Ικανότητα Πλάσματος

Η μέτρηση TAC παρέχει μια σφαιρική εικόνα της ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης στο υπερκείμενο διάλυμα της μονάδας αίματος, η οποία προκύπτει από την αντιοξειδωτική δράση χαμηλού μοριακού βάρους συστατικών του πλάσματος, με υδρόφιλο και υδρόφοβο χαρακτήρα, (Reddy et al., 2010). Όσον αφορά στην παραπάνω μέτρηση, αξιοσημείωτο είναι ότι οι δυο ομάδες δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές *in vivo*. Μάλιστα, *in vitro*, τα μειωμένα επίπεδα που παρατηρήθηκαν κυρίως στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα που είναι ανεξάρτητη της συμμετοχής του ουρικού αφορούσαν τα δείγματα των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών. Μελέτες, υποστηρίζουν μειωμένα επίπεδα ασκορβικού οξέος στο πλάσμα γυναικών μετά την εμμηνόπαυση (Mahla et al., 2014; Ansar et al., 2015). Παρόλα αυτά, τα δεδομένα μας έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος όχι μόνο κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα ανάμεσα στις δύο ομάδες *in vivo*, αλλά ήταν εμφανώς καλύτερη *in vitro* για τα δείγματα των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών. Τέλος, η σημαντική συμβολή του ουρικού οξέος στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος και των δύο ομάδων αιμοδοτριών όπως αυτή εκτιμάται με τη μέθοδο FRAP, συμφωνεί με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Benzie and Strain, 1996).

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης, η ποιότητα των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων υποβαθμίζεται προϊόντος του χρόνου όπως επιβεβαιώνεται από τις εξεταζόμενες παραμέτρους (αιμολυτικές, οξειδωτικές, μορφολογικές), οι οποίες εμφάνισαν σημαντική χρονοεξαρτώμενη διαφοροποίηση των επιπέδων τους.

Ως προς την επίδραση της εμμηνόπαυσης στη ποιότητα των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων, παρά το γεγονός ότι οι εξεταζόμενες ομάδες αιμοδοτριών διέφεραν σαφώς από ορμονικής άποψης (παραγωγή και μη οιστρογόνων), τα αποτελέσματά μας δεν παρουσίασαν εμφανείς διαφορές σε όλες τις εξεταζόμενες παραμέτρους ή τουλάχιστον τις “αναμενόμενες” διαφορές ανάμεσα στις δυο ομάδες αιμοδοτριών σε συγκεκριμένες μετρήσεις όπως κυτταρικής ευθραυστότητας και αντιοξειδωτικής ικανότητας ερυθροκυττάρων. Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης της τελευταίας ημέρας της αποθήκευσης, ως προς τα *in vivo* ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου καθώς και της 14^{15} ημέρας, και ως προς τα επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης μετά το μέσο της αποθήκευσης, με τα δείγματα των

μετεμμηνοπαυσιακών αιμοδοτριών να εμφανίζουν αυξημένες τιμές. Παράλληλα, δεν παρουσιάστηκαν διαφορές ως προς την οσμωτική ευθραυστότητα, τα επίπεδα ROS και την αντιοξειδωτική ικανότητα του ουρικού οξέος. Τέλος, τα δείγματα των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών εμφάνισαν υποβάθμιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στην οποία δεν συμμετέχει το ουρικό οξύ και σαφή τάση για αυξημένη μηχανική ευθραυστότητα.

Πράγματι, οι υγιείς αιμοδότριες *in vivo* παρόλο που πληρούν τα κριτήρια αιμοδοσίας δεν αποτελούν ομοιογενή πληθυσμό, παρουσιάζοντας ένα εύρος διακύμανσης πολλών παραμέτρων όπως είναι η κυτταρική ευθραυστότητα, η αιμόλυση και η αντιοξειδωτική ικανότητα. Η ποικιλομορφία που παρουσιάζουν τόσο τα ερυθροκύτταρα όσο και το πλάσμα των αιμοδοτών οδηγεί σε διαφορετικό σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη της αποθηκευτικής βλάβης των ερυθροκυττάρων, με αποτέλεσμα την διαφορετική αποθηκευτική ικανότητα των παραγώγων αίματος. Για παράδειγμα, τα κυττοσολικά επίπεδα GSH/GSSG εμφανίζουν υψηλά και άμεσα εξαρτώμενα από το δόση ποσοστά διακύμανσης και η ποσότητά τους κατά την αποθήκευση είναι ευθέως ανάλογη των προαποθηκευτικών τους επιπέδων (Van't Evre et al., 2014). Επίσης, ενδεχομένως οι διατροφικές συνήθειες των αιμοδοτριών (κυρίως των μετεμμηνοπαυσιακών) να έχουν επηρεάσει την αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (αυξημένο ασκορβικό οξύ, βιταμίνη E, καροτενοειδή κ.α). Παρόλα αυτά, η αυξημένη ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και η εξωτερικευμένη φωσφατιδυλοσερίνη που παρατηρήθηκαν στα δείγματα των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, παράμετροι που σχετίζονται άμεσα με τη ποιότητα των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων και με μειωμένη επιβίωση των ερυθροκυττάρων μετά την μετάγγιση, αντίστοιχα, αποτελούν ασθενείς ενδείξεις για πιθανά μειωμένη αποδοτικότητα μεταγγίσεων μετά από χρήση των εν λόγω μονάδων. Βέβαια, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν επιπλέον συγκριτικές έρευνες ανάμεσα στις δύο ομάδες, χρησιμοποιώντας μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων (όσο αυτό είναι εφικτό), τόσο για να αποσαφηνιστεί το εύρος διαφορών (αν και εφόσον υπάρχουν) ανάμεσα στις δύο εξεταζόμενες ομάδες, όσο και για να προσδιοριστεί ο βαθμός συμβολής ορμονικών παραγόντων του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος σε αυτές τις διαφορές. Με αυτόν τον τρόπο, ο πιθανός εντοπισμός εύχρηστων βιοδεικτών αποθηκευτικής ικανότητας (ορμονικά επίπεδα, στην προκειμένη περίπτωση) θα βοηθούσε στην αποτελεσματικότερη διαχείριση των μονάδων αίματος.

Περίληψη

Τα ερυθροκύτταρα αντιπροσωπεύουν το συχνότερο μεταγγιζόμενο συστατικό του αίματος με αποτέλεσμα πολλές ζωές να επηρεάζονται από την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια των μεταγγίσεων. Ακόμα και μετά τις προόδους που σημειώθηκαν στο χώρο της βιοσυντήρησης του αίματος, οι οποίες βελτίωσαν σημαντικά την ποιότητα αλλά και τη διάρκεια αποθήκευσης των ερυθροκυττάρων πριν τη μετάγγιση, τα αποθηκευμένα παράγωγα αίματος εξακολουθούν να υφίστανται μια σειρά δομικών, μεταβολικών και λειτουργικών αλλαγών μερικές εκ των οποίων είναι αναστρέψιμες ενώ άλλες όχι. Αυτές οι τροποποιήσεις που αποδίδονται με τον όρο «αποθηκευτική βλάβη ερυθροκυττάρων» αναπτύσσονται μέσω ενός συνόλου μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και συσσωρεύονται εντός της μονάδας μετάγγισης εξαιτίας της έλλειψης μηχανισμών εκκαθάρισης. Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι η διακύμανση μεταξύ των αιμοδοτών αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα που συμβάλλει στην ποιότητα και την ανάκτηση των ερυθροκυττάρων *in vivo* μετά από μετάγγιση ακόμη και αν όλες οι υπόλοιπες παράμετροι (ποιότητα λευκαφαίρεσης, είδος πλαστικοποιητή που χρησιμοποιείται, σύνθεση και όγκος του διαλύματος συντήρησης, χρόνος αποθήκευσης) έχουν ληφθεί υπ' όψη. Η εμμηνόπαυση χαρακτηρίζεται από την σταδιακή μείωση των οιστρογόνων, τα οποία (ιδιαίτερα η οιστραδιόλη) φαίνεται να λειτουργούν κυτταροπροστατευτικά στην κατεύθυνση κυρίως της εξουδετέρωσης των δραστικών ριζών οξυγόνου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του αιμοδότη στην ποιότητα των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων και συγκεκριμένα η σύγκριση της αποθηκευτικής ικανότητας μονάδων αίματος που προέρχονται από γυναίκες πριν και μετά την εμμηνόπαυση. Επιπλέον, οποιαδήποτε συσχέτιση των αιματολογικών και των φυσιολογικών ευρημάτων με ορμονικούς παράγοντες του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος μπορεί επίσης να μελετηθεί για να συμβάλει στη διαφορική “διαχείριση” των μονάδων αίματος που προσφέρονται από γυναίκες αιμοδότριες προς το μέγιστο όφελος των ασθενών και των αποθεμάτων των τραπεζών αίματος. Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων χρησιμοποιήθηκαν έντεκα (11) λευκαφαιρεμένες μονάδες συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων σε συντηρητικό διάλυμα CPD/SAGM από γυναίκες υγιείς αιμοδότριες, οι οποίες ανήκαν σε δύο ομάδες: βρισκόνταν πριν και μετά την εμμηνόπαυση. Στα δείγματα έγιναν μετρήσεις τόσο κατά τη στιγμή της αιμοδοσίας όσο και σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους αποθήκευσης (ημέρες 2 – 14 – 28 – 42), των αιματολογικών παραμέτρων, των επιπέδων ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, της οσμωτικής και μηχανικής ευθραυστότητας, της αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος, των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου και ROS, της εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης μέσω κυτταρομετρίας ροής, καθώς και παρατήρηση της κυτταρικής μορφολογίας με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν φυσιολογικά επίπεδα αιματολογικών παραμέτρων τόσο πριν όσο και κατά την αποθήκευση. Παρατηρήθηκε μια χρονοεξαρτώμενη αύξηση του δείκτη MCV και στις δυο ομάδες δειγμάτων ενώ παράλληλα στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες παρατηρήθηκε αυξημένος δείκτης ανισοκυττάρωσης. Γενικότερα, και στις δυο ομάδες, οι αιμολυτικές, οξειδωτικές και μορφολογικές παράμετροι επιδεινώθηκαν

προϊόντος του χρόνου αποθήκευσης. Ανάμεσα στις δύο ομάδες υπήρξε διακύμανση μεταξύ των εξεταζόμενων παραμέτρων με τα δείγματα των μετεμμηνοπαυσιακών να παρουσιάζουν πιο αυξημένες τιμές ελεύθερης αιμοσφαιρίνης μετά την 2^η εβδομάδα αποθήκευσης, επιπέδων ασβεστίου *in vivo* και την 14^η ημέρα αποθήκευσης, και εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης την τελευταία μέρα της αποθήκευσης. Παράλληλα, εμφάνισαν βελτιωμένη μηχανική ευθραυστότητα την 14^η ημέρα και αντιοξειδωτική ικανότητα υπερκείμενου τις ημέρες 14-42 σε σχέση με τα δείγματα των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών. Ενδέχεται, ο τρόπος ζωής των αιμοδοτριών να είναι συμπαράγοντας της προστατευτικής δράσης των ορμονών του γυναικείου αναπαραγωγικού, γεγονός που οδηγεί στην ανάγκη πραγματοποίησης επιπλέον συγκριτικών μελετών με στόχο την αποσαφήνιση στατιστικά σημαντικών διαφορών και την εύρεση επιπλέον πιθανών -συσχετίσεων με ορμονικούς παράγοντες - στην προσπάθεια ανεύρεσης βιοδεικτών αποθηκευτικής ικανότητας εντός της μονάδας συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων.

Abstract

Erythrocytes represent the most widely transfused blood component. Consequently, many lives are affected by the efficiency and the safety of transfusions. Even after a series of advances in the biopreservation of blood, which have led to a significant quality improvement and a remarkable increase of the shelf-life of stored RBCs, the stored RBCs still undergo a series of structural, metabolic and functional changes, reversible or irreversible post-transfusion. These changes are collectively called “red blood cell storage lesion” and are developed through a set of cell signaling pathways which interact with each other and accumulate inside the blood unit, owing to the lack of clearance mechanisms. Nevertheless, it seems that the “donor variation effect” is the most significant contributing factor to the quality and *in vivo* recovery of RBCs, even after all other parameters (namely, quality of leukapheresis, type of unit’s plasticizer, composition and volume of the suspending solution, and storage period) are taken into consideration. Menopause is characterized by the gradual decline of estrogens, the free-radical scavenging activity of which has been implicated as one non-genomic mechanism of cytoprotection.

The aim of this thesis was to study the women-donor-associated effects on the quality of stored red blood cells, and more specifically, to compare the storability of blood units obtained from premenopausal and postmenopausal female donors. Moreover, any correlation of the hematological and physiological findings with hormonal factors of the female reproductive system may also be studied to help establishing the differential “management” of blood units obtained from female donors to the maximum benefit of patients and of blood banks’ inventory.

Eleven (11) leukoreduced, units of packed red blood cells in CPD/SAGM from healthy female donors were classified into 2 groups: premenopausal (M) and postmenopausal (PM) women. The units were sampled at the time of donation and afterwards on days 2, 14, 28 and 42 of the storage period. Evaluation of hematologic profiles, free hemoglobin analysis, osmotic and mechanical RBC fragility measurements, plasma/supernatant antioxidant capacity, evaluation of the intracellular levels of calcium and ROS, phosphatidylserine externalization on RBC surface by flow cytometry as well as the morphology evaluation of RBCs by Scanning Electron Microscopy, were performed.

Our data showed physiological levels of haematological parameters before and during storage. A time dependent increase in MCV ratio of both groups was observed, while samples of postmenopausal women exhibited higher RDW. In general, hemolytic, oxidizing and morphological parameters of both groups deteriorated throughout storage time. A variability among pre- and post-menopausal units emerged with samples of post menopausal females demonstrating a higher free hemoglobin concentration after the second week of storage, increased intracellular levels of calcium *in vivo* and on day 14, and phosphatidylserine externalization at the end of storage, but improved mechanical properties of day 14 and plasma/supernatant antioxidant capacity from days 14 to 42 of storage with the observed differences being statistically significant. Donors’ lifestyle might be a contributing factor to the protective effect of female reproductive hormones. Consequently, further comparative studies are needed in order to clarify statistically

significant differences and to identify additional correlations with hormonal factors, exhibiting biomarker potential, within the units of packed red blood cells.

Z. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Andrew Blann, Nessar Ahmed (2014): Blood Science Principles and Pathology. John Wiley & Sons, Ltd

Elaine N. Marieb, Holyoke Community College (2015): Essentials of Human Anatomy & Physiology, 11th Edition. Pearson Education, Inc

John P. Greer, John P. Greer, Daniel A. Arer, Bertil Glader, Alan F. List, Robert T. Means, Frixos Paraskevas, George M. Rodgers, John Foerster (2013): Wintrobe's Clinical Hematology 13e. 13th Edition.

Kaushansky K, Lichman M, Beutler E, Kipps T, Prchal J, Seligson UW (2010): Hematology 8th edition.

Martin R. Howard, Peter J Hamilton (2013): Haematology An Illustrated Colour Text, Martin R. Howard, Peter J Hamilton 4th edition

OpenStax College (2013): Anatomy and Physiology. OpenStax College.

R. A. S. Hemat (2004): Principles of Orthomolecularism.

Robert S. Hillman, Kenneth A. Ault, Michel Leporrier, Henry M. Rinder (2011): Hematology in clinical practice. 5th edition. The McGraw-Hill Company, Inc.

ΑΡΘΡΑ

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;78:6858–6862.

Anderson JM (1996) Cell signalling: MAGUK magic. Curr Biol 6:382–384

Annis, A. M., and Sparrow, R. L. (2002): Expression of CD47 (integrin-associated protein) decreases on red blood cells during storage. Transfus. Apher. Sci. 27, 233–238. doi: 10.1016/S1473-0502(02)00070-8

Anong WA, Franco T, Chu H, et al. Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion. Blood. 2009; 114:1904–12. [PubMed: 19567882]

Antonelou Marianna H, Kriebardis Anastasios. G, Stamoulis Konstantinos E, Trougakos Ioannis. P, Papassideri Issidora S. (2011 a): Apolipoprotein J/Clusterin Is a Novel Structural Component of Human Erythrocytes and a Biomarker of Cellular Stress and Senescence PLoS One 2011, 6, e26032

Antonelou Marianna H. Kriebardis., Anastasios G., Stamoulis Konstantinos E, Trougakos Ioannis P., Papassideri Issidora S. (2011b): Apolipoprotein J/Clusterin in Human Erythrocytes Is Involved in the Molecular Process of Defected Material Disposal during Vesiculation

Antonelou MH, Kriebardis AG, Papassideri IS. (2010): Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. Blood Transfusion 2010; 8(Suppl 3): s39–47.

Antonelou MH, Kriebardis AG, Papassideri IS. Aging and death signalling in mature red cells (2010): From basic science to transfusion practice. Blood Transfus. 2010; Suppl 3:s39-47.

Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS.(2010): Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphatedextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. Transfusion 2010;50:376-89.

Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, et al. (2012): Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76:220-38

Arduini, A., Holme, S., Sweeney, J. D., Dottori, S., et al., (1997): Addition of L-carnitine to additive solutionsuspended red cells stored at 4 degrees C reduces in vitro hemolysis and improves in vivo viability. Transfusion 1997, 37, 166-174.

Bailly P, Tontti E, Hermand P, Cartron JP, Gahmberg CG. (1995): The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. Eur J Immunol 1995;25:3316–20.

Balz Frei, Laura England and Bruce N. Ames (1989): Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. Department of Biochemistry, University of California, Berkeley, CA 94720

- Balz Frei, Roland Stocker, Bruce N. Ames (1988):** Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 85, pp. 9748-9752, Medical Sciences
- Balz Frei (1991):** Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage *Am J Clin Nutr.* 1991 Dec;54(6 Suppl):1113S-1118S
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH (2002):** Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16093–16098.
- Baron M, Boulanger CM, Staels B, Tailleux A. (2011):** Cellderived microparticles in atherosclerosis: biomarkers and targets for pharmacological modulation? *J Cell Mol Med* 2011; DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01486.x
- 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 Radical Biol Med* 1993;14:615-31
- Bennett V, Baines AJ. (2001):** Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* 2001; 81:1353– 1392.
- Benzie I.F. and Strain J.J. (1996):** “The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay.” *Anal Biochem.* 15;239(1):70-6. Duplancic D., Kukoc-Modun L., Modun D., Radic N. (2011) “Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity.” *Molecules.* 17;16(8):7058-68
- Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al (2002):** Influence of storage on red blood cell rheo-logical properties. *J Surg Res* 2002; 102(1):6–12.
- Birben Esra PhD,1 Umit Murat Sahiner MD,1 Cansin Sackesen MD,1 Serpil Erzurum MD,2 and Omer Kalayci, MD (2012):** Oxidative Stress and Antioxidant Defense
- Blasi B, D’Alessandro A, Ramundo N, Zolla L. (2012):** Red blood cell storage and cell morphology. *Transfus Med* 2012; 22: 90-96 [PMID:22394111 DOI: 10.1111/j.1365-3148.2012.01139.x]
- Bosch FH, Werre JM, Roerdinkholder-Stoelwinder B, et al. (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, et al. (2010):** Comparative proteomics of erythrocyte aging in vivo and in vitro. *J Proteomics* 2010;73:396-402.
- Bosman GJ, Werreb Jm, Willekens FLA, Novotny VMJ (2008):** Erythrocyte ageing in vbivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion. *Transfus Med* 2008;18:335-47
- Bosman GJ, Cluitmans JC, Groenen YA, et al. (2011):** Susceptibility to hyperosmotic stress-induced phosphatidylserine exposureincreases during red blood cell storage. *Transfusion* 2011; 51: 1072-8
- Bourdon, E. and Blache, D. (2001):** The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid. Redox Signal.* 3, 293–311.
- Brajovich ML, Rucci A, Acosta IL, Cotorruelo C, García Borrás S, Racca L, et al.(2009):** Effects of aging on antioxidant response and phagocytosis in senescent erythrocytes. *Immunol Invest.* 2009;38(6):551-9
- Brecher ME, Hay SN. (2005):** Bacterial contamination of blood components. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:195–204.
- Brito MA, Silva R, Tiribelli C & Brites D. (2000):** Assessment of bilirubin toxicity to erythrocytes. Implication in neonatal jaundice management. *European J Clinical Invest* 30: 239-247.
- Brown EJ, Frazier WA. (2001):** Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 2001;11:130–5.
- Brown, D. A., and London, E. (2000):** Structure and function of sphingolipidand cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 17221–17224
- Buettner G.R. (1993) :** The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300, 535-543
- Burger P, Hilarius-Stokman P, de Korte D, et al.(2012):** CD47 functions as amolecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood* 2012; 119:5512– 5521

- Byers T.J., Branton D. (1985):** Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82 (1985), pp. 6153–6157
- Carballal, S., Radi, R., Kirk, M.C., Barnes, S., Freeman, B.A. and Alvarez, B. (2003):** Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry* 42, 9906–9914.
- Carr A., Frei B. (1999):** Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 13, 1007-1024
- Cartron JP (1994):** Defining the Rh blood group antigens. *Biochemistry and molecular genetics. Blood Rev* 1994;8:199–212
- 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, et al.(2010):** Oxygen-linked modulation of erythrocyte metabolism: state of the art. *Blood Transfus* 2010;8:53-8.
- Cafolla, A., Dragoni, F., Girelli, G., Tosti, M. E., et al., (2000):** Folate status in Italian blood donors: relation to gender and smoking *Haematologica* 2000, 85,694-698
- Chang, S. H., and Low, P. S. (2001):** Regulation of the glycophorin C-protein 4.1 membrane-to-skeleton bridge and evaluation of its contribution to erythrocyte membrane stability. *J. Biol. Chem.* 276, 22223–22230. doi: 10.1074/jbc.M100604200
- Chasis Joel Anne, Mohandas Narla (1992):** Red Blood Cell Glycophorins
- Chaudière J, Ferrari-Iliou R. 1999:** Intracellular Antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms.
- Chen Liu, Xiaohua Liu, John Janes Ryan Stapley, Rakesh P. Patel, Mark T. Gladwin, Daniel B. Kim-Shapiro (2014):** Mechanism of faster NO scavenging by older stored red blood cells
- Chhabra Namrata (2013):** Structure of Hemoglobin- An Overview
- Chishti AH, Palek J, Fisher D, et al. (1996):** Reduced invasion and growth of *Plasmodium falciparum* into elliptocytic red blood cells with a combined deficiency of protein 4.1, glycophorin C, and p55. *Blood* 1996; 87:3462.
- Cimen Burak M.Y (2007):** Free radical metabolism in human erythrocytes.
- Council of Europe (2008):** Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Recommendation no R (95) 15 on the preparation, use and quality assurance of blood components. 14th ed. Strasbourg: Council of Europe Press; 2008.
- 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;98:389-96.
- D'Alessandro, A., D'Amici, G. M., Vaglio, S., and Zolla, L. (2012):** Timecourse investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red blood cell concentrates: from metabolism to proteomics. *Haematologica* 97, 107–115. doi: 10.3324/haematol.2011.051789
- Daleke DL (2008):** Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane.
- Daly, A., Raval, J. S., Waters, J. H., Yazer, M. H., Kameneva, M. V., (2014):** Effect of blood bank storage on the rheological properties of male and female donor red blood cells. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014, 56, 337345
- Dern, R. J., Gwinn, R. P., Wiorkowski, J. J., (1966):** Studies on the preservation of human blood. I. Variability in erythrocyte storage characteristics among healthy donors. *J Lab Clin Med* 1966, 67, 955-965.
- DeSilva TM, Peng KC, Speicher KD, Speicher DW. (1992):** Analysis of human red cell spectrin tetramer (head-to-head) assembly using complementary univalent peptides. *Biochemistry.* 1992;31:10872-10878.
- Devaux PF (1991):** Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 1993; 30:1163.
- DeVenuto, F., Wilson, S. M. (1976):** Distribution of progesterone and its effect on human blood during storage. *Transfusion* 1976, 16, 107-112
- Discher DE (2000):** New insights into erythrocyte membrane organization and microelasticity. *Curr Opin Hematol* 2000;7:117–22.

- Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J. (1963):** The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1963;100:119
- Eber, S. W., Pekrun, A., Neufeldt, A., Schroter, 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
- Endeward V, Carton J-P, Ripoche P, Gros G. (2008):** RhAG protein of the Rhesus C complex is a CO₂ channel in the human red cell membrane.
- Ensinck A, Biondi CS, Marini A, et al. (2006):** Effect of membrane-bound IgG and desialylation in the interaction of monocytes with senescent erythrocytes. *Clin Exp Med* 2006; 6: 138-42
- Ernest Beutler, Wanda Kuhl, and Carol West (1982):** The Osmotic Fragility of Erythrocytes After Prolonged Liquid Storage and After Reinfusion
- Eyers SA, Ridgwell K, Mawby WJ, Tanner MJ. (1994):** Topology and organization of human Rh (rhesus) blood group-related polypeptides. *J Biol Chem* 1994;269:6417–23.
- Fenton HJH (1984):** Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc.* 1984;65:899–910.
- Flatt Joanna F., Bawazir Waleed M., Bruce Lesley. J (2014):** The involvement of cation leaks in the storage lesion of red blood cells
- Flohé L. (1988):** Glutathione peroxidase. *Basic Life Sci.* 1988;49:663–668.
- Fowler VM. (2013):** The human erythrocyte plasma membrane: a Rosetta Stone for decoding membrane-cytoskeleton structure. *Curr Top Membr* 2013; 72:39– 88.
- Francis, R. O., Jhang, J. S., Pham, H. P., Hod, E. A., et al.,** Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in transfusion medicine: the unknown risks. *Vox Sang* 2013, 105, 271-282.
- Franco T, Low PS. (2010):** Erythrocyte adducin: a structural regulator of the red blood cell membrane. *Transfus Clin Biol.* 2010; 17:87–94. [PubMed: 20655268]
- Frank BS, Vardar D, Chishti AH, McKnight CJ. (2004):** The NMR structure of dematin headpiece reveals a dynamic loop that is conformationally altered upon phosphorylation at a distal site. *J Biol Chem.* 2004; 279:7909–16. [PubMed: 14660664]
- Gao AG, Lindberg FP, Finn MB, Blystone SD, Brown EJ, Frazier WA. (1996):** Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. *J Biol Chem.* 1996;271:21-24.
- Gething MJ, Sambrook J.** Protein folding in the cell. *Nature* 1992;355:33-45.
- Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. (2009):** Storage lesion in banked blood due to hemolysis-dependent disruption of nitric oxide homeostasis. *Current Opinion in Hematology* 2009; 16: 515–23
- Goodman SR, Daescu O, Kakhniashvili DG, Zivanic M (2013):** The proteomics and interactomics of human erythrocytes
- Gosling P. (1995):** Albumin and the critically ill. *Care Crit III* 1995;11:57-61
- Gottlieb Y, Topaz O, Cohen LA, Yakov LD, Harber T, Morgenstern A. (2012):** Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis in vivo but not in vitro. *Haematologica* 2012;97:994-1035
- Green PS, Gridley KE, Simpkins JW. (1998):** Nuclear estrogen receptor-independent neuroprotection by estratrienes: a novel interaction with glutathione. *Neuroscience* 84:7–10
- Greenwalt TJ (2006):** The how and why of exocytic vesicles. *Transfusion* 2006; 46:143–152
- Gridley KE, Green PS, Simpkins JW. (1998):** A novel, synergistic interaction between 17 beta-estradiol and glutathione in the protection of neurons against beta-amyloid 25-35-induced toxicity in vitro. *Mol Pharmacol* 54:874–880
- 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.
- Gustafson, C. M., Shepherd, A. J., Miller, V. M., Jayachandran, M., (2015):** Age- and sex-specific differences in blood-borne microvesicles from apparently healthy humans. *Biol Sex Differ* 2015, 6, 10.

- Gutteridge, J.M. (1986):** Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochim. Biophys. Acta* 869, 119–127.
- Halliwell, B. (1988):** Albumin – an important extracellular antioxidant? *Biochem. Pharmacol.* 37, 569–571.
- Harboe, (1959):** A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry.
- Hardison R. (1998):** “Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression,” *The Journal of Experimental Biology*, vol. 201, no. 8, pp. 1099–1117, 1998.
- HarmS.K., WatersJ.H., LynnP., DygaR., RavalJ.S., DiMarcoR.F., YazerM.H. (2012):** “Changes in mechanical fragility and free hemoglobin levels after processing salvaged cardiopulmonary bypass circuit blood with a modified ultrafiltration device.” *JExtraCorporTechnol.* 44(1):21-5.
- Hegedus Tamas Mayank Pururawa Gyorgy Varady Chaubey, Szabo Edit, Saranko Hajnalka, Hofstetter Lia, Roschitzki Bernd, Stieger Bruno and Sarkadi Balazs (2015):** Inconsistencies in the red blood cell membrane proteome analysis: generation of a database for research and diagnostic applications
- Hemker MB, Cheroutre G, van Zwieten R et al., (2003):** The Rh complex expert ammonium from human red blood cells. *Br J Haematol* 2003; 122:333-340
- Hemming NJ, Anstee DJ, Staricoff MA, Tanner MJ, Mohandas N. (1995):** Identification of the membrane attachment sites for protein 4.1 in the human erythrocyte. *J Biol Chem.* 1995; 270:5360–6. [PubMed: 7890649]
- Hensley K, Benakass EJ, Bolli R, et al. (2004):** New perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Rad Biol Med*, 36:1–15
- Hess JR. (2010):** Red cell changes during storage. *Transfus Apher Sci* 2010; 43: 51-59
- Hess (2012):** Scientific problems in the regulation of red blood cell products. *Transfusion.* 2012 Aug;52(8): 1827-35
- Hess (2014):** Measures of stored red blood cell quality.
- 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;81:161–6.
- Hoehn RS, Jernigan PL, Chang AL, Edwards MJ, Pritts TA. (2015):** Molecular mechanisms of erythrocyte aging. *J Biol Chem* 2015; 396: 621-31
- 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
- Hu Jingping, Jing Liu, Fumin Xue,1 Gregory Halverson, Marion Reid, Anqi Guo, Lixiang Chen, Azra Raza, Naomi Galili, Julie Jaffray, Joseph Lane, Joel Anne Chasis, Naomi Taylor, Narla Mohandas, and Xiuli An (2013):** Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo
- Huang CH, Liu PZ, Cheng JG. (2000):** Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. *Semin Hematol* 2000;37:150–65.
- Huang CH. (1998):** The human Rh50 glycoprotein gene. Structural organization and associated splicing defect resulting in Rh (null) disease. *J Biol Chem* 1998;273:2207–13.
- 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* 79: 3355-3361
- Inomata M., Nakamura M., Imajoh-Ohmi S., Kawashima S. (1993):** A variety of calpain/calpastatin systems in mammalian erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993;1178:207–214.
- Ipsaro J.J., L. Huang, L. Gutierrez, R.I. MacDonald (2008):** Molecular epitopes of the ankyrin–spectrin interaction *Biochemistry*, 47(2008), pp. 7452–7464
- Ipsaro JJ, Mondragon (2010):** A. Structural basis for spectrin recognition by ankyrin. *Blood.* 2010; 115:4093–4101. [PubMed: 20101027]
- Izzi V., Masuelli L., Tresoldi I., Foti C., Modesti A., Bei R.: Immunity and malignant mesothelioma (2012):** From mesothelial cell damage to tumor development and immune response-based therapies. *Cancer Lett* 322, 18-34

- J. S. Raval, J. H. Waters, A. Seltsam, E. A. Scharberg, E. Richter, M. V. Kameneva & M. H. Yazer (2010):** Menopausal status affects the susceptibility of stored RBCs to mechanical stress
- Jackman RP, Deng X, Bolgiano D, Utter GH, Schechterly C, Lebedeva M et al. (2014):** Leukoreduction and ultraviolet treatment reduce both the magnitude and the duration of the HLA antibody response. *Transfusion* 2014; 54: 672-80.
- Jin M, Drwal G, Bourgeois T, et al. (1940):** Distinct proteome features of plasma microparticles. *Proteomics* 2005;5: 1940-52.
- John A Kellum (2000):** Determinants of blood pH in health and disease
- Jordan A., Chen D., Devine D., Acker J.,(2014):** Using blood bank quality control data to analyze manufacturing and donor variability. *Transfusion* 2014, 54(2S), 42A
- Julien Delobel, Olivier Garraud, Stefano Barelli, Jean-Jacques Lefrère, Michel Prudent, Niels Lion, Jean-Daniel Tissot (2015):** Storage lesion: History and perspectives
- Julien Delobel, Olivier Rubin, Michel Prudent, David Crettaz, Jean-Daniel Tissot and Niels Lion (2010):** Biomarker Analysis of Stored Blood Products: Emphasis on Pre-Analytical Issues
- Jung, J., Preston, G. M., Smith, B., Guggino, W. & Agre, P. (1994):** Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* 269, 14648±14654
- Kameneva M.V., Garrett K.O., Watach M.J. and Borovetz H.S. (1998):** Red blood cell aging and risk of cardiovascular diseases, *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 18(1) 67–74
- Kameneva M.V., Watach M.J. and Borovetz H.S. (1999):** Gender difference in rheologic properties of blood and risk of cardiovascular diseases
- Kanias, T., Gladwin, M. T. (2012):** Nitric oxide, hemolysis, and the red blood cell storage lesion: interactions between transfusion, donor, and recipient. *Transfusion* 2012, 52, 1388-1392
- Kanias Tamir , Lee Janet, Yazer Mark H. , Triulzi Darrell J, Lippert Ashley and Gladwin Mark T (2011):** Correlation Between Female Gender and the Red Blood Cell Propensity to Hemolyze Under Various Stresses
- Karger R, Lukow C, Kretschmer V. (2012):** Deformability of red blood cells and correlation with ATP content during storage as leukocyte-depleted whole blood. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2012; 39: 277–82
- Kay MM, Goodman SR, Sorensen K, et al.(1983):** Senescent cell antigen is immunologically related to band 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; **80**: 1631-5.
- Kay MMB (2005):** Immunoregulation of cellular life span. *Ann N Y Acad Sci* 2005; **1057**: 85-111
- Kellogg EW 3rd, Fridovich I (1977):** Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1977;252:6721–6728.
- Khalid Rahman (2007):** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging* 2007;2(2) 219–236
- Khan AA, Hanada T, Mohseni M et al. (2008):** Dematin and adducing provide a link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1.
- Kiefer CR, Snyder LM. (2000):** Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol* 2000; 7: 113-6.
- Koefoed Peter, Brahm Jesper (1994):** The permeability of the human red cell membrane to steroid sex hormones
- Kojo S. (2004):** Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress.
- Kolesnikova L, Semenova N, Madaeva I, Suturina L, Solodova E, Grebenkina L and Darenskaya M. (2015):** Antioxidant status in peri- and postmenopausal women. *Maturitas* 2015; 81: 83-87
- Koshkaryev A, Zelig O, Manny N, Yedgar S, Barshtein G. (2009):** Rejuvenation treatment of stored red blood cells reverses storage-induced adhesion to vascular endothelial cells. *Transfusion* 2009; **49**: 2136-2143
- 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. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2007; 11: 148–55.
- 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(7):1212-20.

- Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, et al.** Membrane protein carbonylation in non-leukodepleted CPDA preserved red blood cells. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36
- Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, et al. (2008):** RBC derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. *Transfusion* 2008;48:1943-53.
- Kriebardis, A., Antonelou, M., Stamoulis, K., and Papassideri, I. (2012):** Cell-derived microparticles in stored blood products: innocent bystanders or effective mediators of post-transfusion reactions? *Blood Transfus.* 10(Suppl. 2), s25–s38. doi: 10.2450/2012.006S
- Kuhl H. (1990):** Pharmacokinetics of oestrogens and progestogens. *Maturitas.* 1990 Sep;12(3): 171–97. PubMed PMID: 2170822. Epub 1990/09/01. Eng
- Kuypers FA, Yuan J, Snyder LM, Kiefer CR, Bunyaratvej A, Fucharoen S, et al.(1998):** Membrane phospholipid asymmetry in human thalassemia. *Blood* 1998;91:3044-51
- Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S (2005):** Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol* 2005;70:343–354. [PubMed: 15963955]
- L. Masuelli, I. Tresoldi, P. Sacchetti, A. Modesti, F. Galvano, R. Bei (2012):** The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks. *Front Biosci* 17, 2396-2418
- La-Borde PJ, Stabach PR, Simonovic I, Morrow JS, Simonovic M.** Ankyrin recognizes both surface character and shape of the 14-15 di-repeat of beta-spectrin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010
- Laemmli, UK. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.
- Lai (2003):** Lipid rafts make for slippery platforms
- Lang F, Abed M, Lang E Foller M, (2014):** Oxidative stress and suicidal erythrocyte death.
- Lang F, Gulbins E, Lerche H, Huber SM, Kempe DS, Foller M. (2008):** Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell Physiol Biochem* 2008;22(5-6):373-80.
- Lang F, Lang KS, Lang PA, et al.(2006):** Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1183-92
- Lang F., Lang P. A., Lang K. S., Brand V., Tanneur V., Duranton C., Wieder T., and Huber S. M. (2004):** Channel-induced apoptosis of infected host cells -the case of malaria. *Pflugers Arch.* 448, 319– 324
- Laszlo Prokai , Katalin Prokai-Tatrai (2005):** Mechanistic insights into the direct antioxidant effects of estrogens
- Leinders, T., van Kleef, R. G., & Vijverberg, H. P. (1992):** Single Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocytes: Ca²⁺ dependence of opening frequency but not of open lifetimes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1112, 67–74.
- Lesley J. Bruce (2008):** Red cell membrane transport abnormalities.
- Lesley J. Bruce, Roland Beckmann, M. Leticia Ribeiro, Luanne L. Peters, Joel A. Chasis, Jean Delaunay, Narla Mohandas, David J. Anstee and Michael J.A. Tanner (2003):** A band 3–based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane
- Letourneau Suzanne & Hernandez Luiza & Faris Andrea N. & Spence Dana M (2010):** Evaluating the effects of estradiol on endothelial nitric oxide stimulated by erythrocyte-derived ATP using a microfluidic approach
- Levine, R.L., Berlett, B.S., Moskovitz, J., Mosoni, L. And Stadtman, E.R. (1999):** Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech. Ageing Dev.* 107, 323–332.
- Lew, V.L., Daw, N., Perdomo, D., Etzion, Z., Bookchin, R.M. and Tiffert, T. (2003):** Distribution of plasma membrane Ca²⁺ pump activity in normal human red blood cells. *Blood*, 102,4206-4213
- Lewis IA, Campanella ME, Markley JL (2009):** response and phagocytosis in senescent erythrocytes.
- 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.
- Li J, Lykotrafitis G, Dao M, Suresh S (2007):** Cytoskeletal dynamics of human erythrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:4937–42.
- Liu C., W. Zhao, G.J. Christ, M.T. Gladwin, D.B. Kim-Shapiro(2013):** *Free Radic. Biol. Med.* 65C (2013) 1164–1173

Low FM, Hampton MB, Peskin AV, Winterbourn CC. (2007): Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. *Blood* 2007;109: 2611-7.

Low FM, Hampton MB, Winterbourn CC. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte.

Lutz HU, Stammer 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.

Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Bost HJ, et al. (2004): Survival of the fittest?--survival of stored red blood cells after transfusion. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2004; **50**: 197-203.

Lux SE, John KM, Kopito RR, Lodish HF. (1989): Cloning and characterization of band 3, the human erythrocyte anion-exchange protein (AE1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:9089.

Magee A, Parmryd I (2003): Detergent resistant membranes and the protein composition of lipid rafts. *Genome Biology* 2003;4:234-7

Mahla Mamta, Mahla Kumar Varun, R. C. Gupta (2014): Antioxidant status in peri-menopausal and post-menopausal women.

Makhro, A., Hanggi, P., Goede, J. S., Wang, J., et al., (2013): N-methyl-D-aspartate receptors in human erythroid precursor cells and in circulating red blood cells contribute to the intracellular calcium regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013, 305, C1123-1138

Mandal D, Mazumder A, Das P, et al. (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, 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 Debabrata, Veronique Baudin-Creuzza, Asima Bhattacharyya, Shresh Pathak, Jean Delaunay, Manikuntala

Kundu Joyoti Basu (2003):Caspase 3-mediated Proteolysis of the N-terminal Cytoplasmic Domain of the Human Erythroid Anion Exchanger 1 (Band 3)

Martinez Mdel C, Afonso SG, Buzaleh AM, Batlle A (2014): Protective action of antioxidants on hepatic damage induced by griseofulvin.

Marzocchella L., Fantini M., Benvenuto M., Masuelli L., Tresoldi I., Modesti A., Bei R. (2011): Dietary flavonoids: molecular mechanisms of action as anti-inflammatory agents. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 5, 200-220

Masella R, Di Benedetto R, Vari 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*.16:577–586.

Massafra, C., Gioia, D., De Felice, C., Picciolini, E., et al.,(2000): Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. *J Endocrinol* ; 167, 447-452

Mates JM, Perez-Gomez C and De Castro IN. (1999): Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, 32:595–603

Meyer EK, Dumont DF, Baker S, Dumont LJ.(2010): Rejuvenation capacity of red blood cells in additive solutions over long-term storage. *Transfusion* 2011; 51: 1574-1579 [PMID: 21251004 DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.03021.x]

Michael Foller¹, Stephan M. Huber² and Florian Lang 2008: Critical Review Erythrocyte Programmed Cell Death

Michael G. Ormerod (2008): Flow Cytometry - A Basic Introduction

Miquel J, Ramirez-Bosca A, Ramirez-Bosca JV and Alperi JD (2006): Menopause: a review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr* 2006;42: 289-306

Mische SM, Mooseker MS, Morrow JS. (1987): Erythrocyte adducin: a calmodulin-regulated actinbundling protein that stimulates spectrin-actin binding. *J Cell Biol*. 1987; 105:2837–45. [PubMed: 3693401]

Miura T, Muraoka S, Ogiso T (1993): Inhibitory effect of urate on oxidative damage induced by adriamycin-Fe³⁺ in the presence of H₂O₂. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* [1993, 79(1):75-85]

Miwa T, Song WC. (2001): Membrane complement regulatory proteins: 853 insight from animal studies and relevance to

human diseases. 854 *Int Immunopharmacol* 2001;1:445–59

Mladenovic, J., Ognjanovic, B., Dordevic, N., Matic, M., et al. (2014): Protective effects of oestradiol against cadmium-induced changes in blood parameters and oxidative damage in rats. *Arh Hig Rada Toksikol* 2014, 65, 37-46

Mohandas Narla and Gallagher Patrick G. (2008): Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. 2008;112(10):3939.

Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM.(2014): Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in Physiology* 2014; 5: 84.

Montel-Hagen A, Kinet S, Manel N, Mongellaz C, Prohaska R, Battini JL et al. (2008): Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C. *Cell* 132: 1039–1048.

Moore GL (1987): Additive solutions for better blood preservation. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1987; 25:211–228

Moore RB, Mankad MV, Shriver SK, Mankad VN, Plishker GA. (1991): Reconstitution of Ca²⁺-dependent K⁺ transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein. *J Biol Chem* 1991;266:18964-8

Moriyama, R., Lombardo, C. R., Workman, R. F., and Low, P. S. (1993): Regulation of linkages between the erythrocyte membrane and its skeleton by 2,3- diphosphoglycerate. *J. Biol. Chem.* 268, 10990–10996

Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, et al. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*. 1985;229:941–945.

Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agree P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y (2000): Structural determinants of water permeation through aquaporin-1.

Murphy SC, Samuel BU, Harrison T, Speicher KD, et al. (2004): Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. *Blood* 2004;103:1920–8.

Naftalin RJ. (2008): Alternating carrier models of asymmetric glucose transport violate the energy conservation laws. *Biophys J.* 2008;95: 4300–4314.

Nakao K, Wada T, Kamiyama T, et al. (1962): A direct relationship between adenosine triphosphate-level and in vivo viability of erythrocytes. *Nature* 1962;194:877-8.

Nicolas V, Le Van Kim C, Gane P, et al (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. [PubMed: 12719424]

Nunomura Wataru,1 Philippe Gascard,2 and Yuichi Takakuwa1 (2011): Insights into the Function of the Unstructured N-Terminal Domain of Proteins 4.1R and 4.1G in Erythropoiesis

Nyström T (2005): Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence.

Ogunro PS, Bolarinde AA, Owa OO, Salawu AA, Oshodi AA. (2014): Antioxidant status and reproductive hormones in women during reproductive, perimenopausal and postmenopausal phase of life

Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 2000;288: 2051–4.

Oldenborg PA. (2004): Role of CD47 in erythroid cells and in autoimmunity. *Leuk Lymphoma* 2004;45:1319–27.

Orlov and Karkouti (2015): The pathophysiology and consequences of red blood cell storage

Pacifici R. (1996): Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1043-1051.

Pantaleo A, Ferru E, Giribaldi G, et al. (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.

Pantaleo Antonella, Giuliana Giribaldi, Franca Mannu, Paolo Arese, Franco Turrini, (2008): Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions.

Papas AM. 1999c. Other antioxidants. In: Papas AM, editor. *Antioxidant status, diet, nutrition, and health*. Boca Raton, Fla.: CRC Press. p 231–48.

Pasini Erica M, Lutz Hans Ulrich (2009): Red blood cell (RBC) membrane proteomics - Part I: Proteomics and RBC physiology

Patel KV, Semba RD, Ferrucci L, Newman AB, Fried LP, Wallace RB, Bandinelli S, Phillips CS, Yu B, Connelly S, Shlipak MG, Chaves PHM, Launer LJ, Ershler WB, Harris TB, Longo DL, Guralnik JM. (2009): Red cell

distribution width and mortality in older adults: A meta-analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. Epub ahead of print.

Patrick Burger, Dirk de Korte, Timo K. van den Berg, and Robin van Bruggen (2012): CD47 in Erythrocyte Ageing and Clearance – the Dutch Point of View

Pennington J, Taylor GP, Sutherland J, Davis RE, Seghatchian J, Allain JP, Williamson LM. (2002): Persistence of HTLV-I in blood components after leukocyte depletion. *Blood* 2002; 100: 677-81

Pettersen RD (2000): CD47 and death signaling in the immune system. *Apoptosis* 2000;5:299–306

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.

Prabhakar E. Reddy¹, Suchitra M. Manohar¹, Seshadri V. Reddy¹, Aparna R. Bitla¹, Sivakumar Vishnubhotla², Srinivasa Rao P.V. Lakshmi Narasimh (2010): Ferric Reducing Ability of Plasma and Lipid Peroxidation in Hemodialysis Patients: Intradialytic Changes

Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B. & Agre, P. (1992): Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256, 385±387

Qu L, Xu S, Rowe D, Triulzi D. (2005): Efficacy of Epstein-Barr virus removal by leukoreduction of red blood cells. *Transfusion* 2005; 45: 591-95

Raval, J. S., Waters, J. H., Seltsam, A., Scharberg, E. A., et al. (2010): The use of the mechanical fragility test in evaluating sublethal RBC injury during storage. *Vox Sang* 2010, 99, 325-331

Raval, J. S., Waters, J. H., Seltsam, A., Scharberg, E. A., et al., (2011): Menopausal status affects the susceptibility of stored RBCs to mechanical stress. *Vox Sang* 2011, 100, 418-421

Redding GS, Record DM, Raess BU. (1991): Calcium-stressed erythrocyte-membrane structure and function for assessing glipizide effects on transglutaminase activation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991;196:76–82

Rembacz, K. P., Sawicka, E., Dlugosz, A., (2012): Role of estradiol in chromium-induced oxidative stress. *Acta Pol Pharm* 2012, 69, 1372-1379

Renata Paleari, Andrea Mosca (2008): Controversies on the osmotic fragility test

Rettig MP, Low PS, Gimm JA, et al. Evaluation of biochemical changes during in vivo erythrocytesenescence in the dog. *Blood* 1999; **93**: 376-84

Rinalducci S, D'Amici GM, Blasi B, et al. (2011): 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.

Rinalducci S, Ferru E, Blasi B, Francesco Turrini, and Lello Zolla (2012): Oxidative stress and caspase-mediated fragmentation of cytoplasmic domain of erythrocyte band 3 during blood storage. *Blood Transfus* 2012;10:s55-62

Rizvi, S. I., Jha, R., Maurya, P. K., (2006): Erythrocyte plasma membrane redox system in human aging. *Rejuvenation Res* 2006, 9, 470-474.

Roberts, C. K., Barnard, R. J., Sindhu, R. K., Jurczak induced metabolic, M., et al., (2006): Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet- syndrome. *Metabolism* 2006, 55, 928- 934

Rogers, S. C., Ross, J. G., d'Avignon, A., Gibbons, L. B., Gazit, V., Hassan, M. N., et al. (2013): Sickle hemoglobin disturbs normal coupling among erythrocyte O₂ content, glycolysis, and antioxidant capacity. *Blood* 121, 1651–1662. doi: 10.1182/blood 2012-02-414037

Ruiz-Larrea MB, Martin C, Martinez R, Navarro R, Lacort M and Miller NJ. (2000): Antioxidant activities of estr against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens. *Chem Phys Lipids* 2000; 105 188.

Sabah Ansar, Tayef Alhefdhi, Ansari M Aleem (2015): Status of trace elements and antioxidants in premenopausal postmenopausal phase of life: a comparative study *Int J Clin Exp Med* 2015;8(10):19486-19490

Sacamoto H (2005): Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy. *Nat Chem Biol* 2005;1(6):333-7

Salzer U, Zhu R, Lutten M, et al. (2008): Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin. *Transfusion* 2008; **48**: 451-62.

Samaja M, Rubinacci A, Motterlini R, et al.(1990): Red cell aging and active calcium transport. *Exp Gerontol* 1990; **25**: 279-86.

Sejal B. Doshi, Ashok Agarwal (2013):The role of oxidative stress in menopause

Semba D Richard., Patel V Kushang., Ferrucci Luigi, Sun Kai, Roy N Cindy., Guralnik M. Jack, and Fried P.Linda, (2010): Serum antioxidants and inflammation predict red cell distribution width in older women: the Women's Health and Aging Study I

Setty BN, Kulkarni S, Stuart MJ (2002): Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion.
Shan XQ , Aw TY , Jones DP (1990): Glutathione-dependent protection against oxidative injury.

Sheng-Huang Chang, Chieh-Hisin Chang, Mu-Chun Yang, Wen-Tung Hsu, Chia-Ying Hsien Ya-ing Hung, Wan Ling Su, Juan-Jen Shiu, Chih-Yang Huang and Jer-Yuh Liu (2015): Effects of estrogen on glutathione and catalase levels in human erythrocyte during menstrual cycle

Sies H.(1986): Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem* 1986; 25:1058-71

Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K, et al. (1994): Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science* 1994; 264:1941.

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, 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

Sorimachi H., Hata S., Ono Y. (2011): Impact of genetic insights into calpain biology *J. Biochem.*, 150 (2011), pp. 23–37

Sparrow RL, Patton KA.(2004): Supernatant from stored red blood cell primes inflammatory cells: influence of prestorage white cell reduction. *Transfusion* 2004; 44: 722-30

Stewart GW (1997): Stomatins

Stewart PA (1981): How to understand acid–base. In : *A Quantitative acid–base Primer for Biology and Medicine*. Edited by Stewart PA, New York: Elsevier, 1-286.

Stewart PA (1983): Modern quantitative acid–base chemistry. *Can J Physiol Pharmacol.*, 61: 1444-1461.

Strange RC, Johnson PH, Lawton A, Moulton JA, Tector MJ, Tyminski RJ, et al.(1982): Studies on the variability of glutathione transferase from human erythrocytes. *Clin Chim Acta.* 1982;120(2):251-60. 38.

Su Y, Ding Y, Jiang M, et al. (2006): Associations of protein 4.2 with band 3 and ankyrin. *Mol Cell Biochem.* 2006; 289:159–66. [PubMed: 16718373]

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

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;44:179-90.

Svetina S, Žekš B (1992) The elastic deformability of closed multilayered membranes is the same as that of a bilayer membrane. *Eur Biophys J* 21:251–255

Tarasev M, Alfano K, Chakraborty S, et al.(2011): Evaluation of novel in-vitro RBC fragility metrics as age-independent measures of stored RBC quality. *Transfusion* 2011;51:79A.

Tarasev M, Alfano K, Chakraborty S, Bertholf M and Zubair A (2013): Mechanical Fragility as a Potential Time-Independent Measure of Membrane Integrity among Stored RBC Units

Thiele T, Krüger W, Zimmermann K, Ittermann T, Wessel A, Steinmetz I et al. (2011): Transmission of cytomegalovirus (CMV) infection by leukoreduced blood products not tested for CMV antibodies: a single-center prospective study in high-risk patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (CME). *Transfusion* 2011; 51: 2620-26

Thomas W. Sedlak, Masoumeh Salehb, Daniel S. Higginsonb, Bindu D. Paul, Krishna R. Juluri, and Solomon H. Snyder (2008): Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles.

Timothy J. Satchwell, Debbie K. Shoemark, Richard B. Sessions, Ashley M. Toye (2009): Review Protein 4.2 : A complex linker

Tuo, W., Wang, D., Liang, W. J., Huang, Y. X., (2014): How cell number and cellular properties of bloodbanked red

blood cells of different cell ages decline during storage. *PLoS One* 2014, 9, e105692

Tzounakas, V. L., Georgatzakou, H. T., Kriebardis, A. G., Papageorgiou, E. G., et al., (2015): Uric acid variation among regular blood donors is indicative of red blood cell susceptibility to storage lesion markers: A new hypothesis tested. *Transfusion* 2015, 55, 2659-2671

Tzounakas Vassilis L., Kriebardis Anastasios G., Papassideri Issidora S., Antonelou Marianna H. (2016a): Donor-variation effect on red blood cell storage lesion: A close relationship emerges

Tzounakas VL, Georgatzakou HT, Kriebardis AG, Voulgaridou AI, Stamoulis KE, Foudoulaki-Paparizos LE, Antonelou MH, Papassideri IS. (2016b): Donor variation effect on red blood cell storage lesion: a multivariable, yet consistent, story.

Ulrich Salzer and Rainer Prohaska (2001): Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts.

Ungewickell E., P.M. Bennett, R. Calvert, V. Ohanian, W.B (1979): Grätzer In vitro formation of a complex between cytoskeletal proteins of the human erythrocyte *Nature*, 280 (1979), pp. 811–814

Van t' Erve, T. J., Wagner, B. A., Ryckman, K. K., Raife, T. J., Buettner, G. R., (2013) : The concentration of glutathione in human erythrocytes is a heritable trait. *Free Radic Biol Med* 2013, 65, 742-749.

Verhoeven AJ, Hilarius PM, Dekkers DW, et al.(2006): Prolonged storage of red blood cells affects aminophospholipid translocase activity. *Vox Sang* 2006; 91: 244-51

Vollers SS, Carruthers A. (2012): Sequence determinants of GLUT1-mediated accelerated-exchange transport: analysis by homology-scanning mutagenesis. *J Biol Chem.* 2012; 287:42533–42544.

Vossier L, Leon F, Bachelier C, Marchandin H, Lehmann S, Leonetti JP et al.(2014): An innovative biologic recycling process of leukoreduction filters to produce active human antimicrobial peptides. *Transfusion* 2014; 54: 1332-39

Wakefield L.M., Cass A.E., Radda G.K. (1986): Electron transfer across the chromaffin granule membrane. Use of EPR to demonstrate reduction of intravesicular ascorbate radical by the extravesicular mitochondrial NADH:ascorbate radical oxidoreductase. *J Biol Chem* 261, 9746-9752

Weber A, Pennise CR, Fowler VM. (1999): Tropomodulin increases the critical concentration of barbed end-capped actin filaments by converting ADP.P(i)-actin to ADP-actin at all pointed filament ends. *J Biol Chem.* 1999; 274:34637–45. [PubMed: 10574928]

Weiss, S.J. (1989): Tissue destruction by neutrophils. *New Engl. J. Med.* 320, 365–376.

White E, Shannon JS, Patterson RE (1997): Relationship between vitamin and calcium supplement use and colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6:769–774.

Willekens FLA, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Döpp YAM, et al. (2003): Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation. *Blood* 2003; 101: 747-51.

Willekens FLA, Werre JM, Groenen-Dopp YAM, et al. (2008): Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism?

Willekens, F.L., Werre, J.M., Groenen-Dopp, Y.A., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., de Pauw, B. & Bosman, G.J. (2008): Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *British Journal of Haematology*, 141, 549–556

Winterbourn, C.C., Vissers, M.C. and Kettle, A.J. (2000): Myeloperoxidase. *Curr. Opin. Hematol.* 7, 53–58

Witold Diakowski, Michał Grzybek and Aleksander F. Sikorski (2006): Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily

Wu T-W, Fung KP, Wu J, Yang C-C & Weisel RD (1996): Antioxidation of human lowdensity lipoprotein by unconjugated and conjugated bilirubins. *Biochem Pharmacol* 51: 859-862

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.

Yawata Y. Cell membrane (2003): the red blood cell as a model. Weinheim: Wiley-VCH

Yongzhi Qiu, Jordan Ciciliano David R. Myers, Reginald Trana, Wilbur A. Lama, (2015): Platelets and physics: How platelets “feel” and respond to their mechanical microenvironment. *Blood Reviews* 29 (2015) 377–386

Yoshida T, Shevkopyas SS. (2010): Anaerobic storage of red blood cells. *Blood Transfusion* 2010; 8: 220–36

Zhang D, Kiyatkin A, Bolin JT, Low PS (2000): Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *Blood* 2000;96:2925.

Zhang JZ, Abbud W, Prohaska R, Ismail-Beigi F (2001): Overexpression of stomatin depresses GLUT-1 glucose transporter activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1277–C1283.