

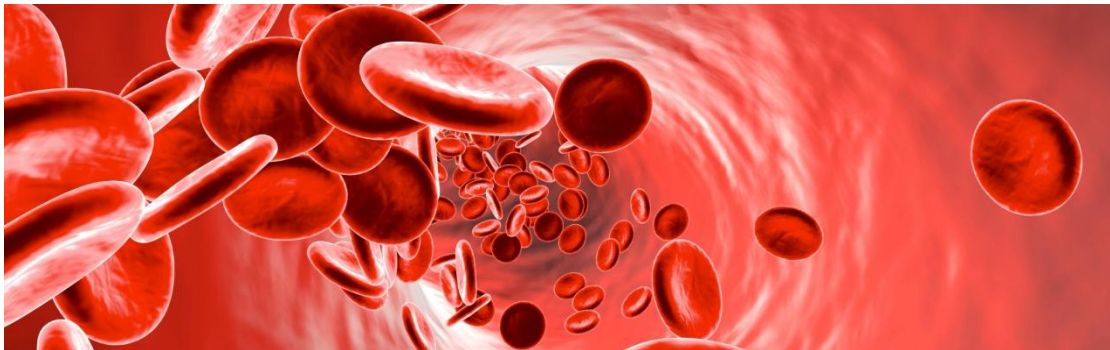


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**



## **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΠΟΣΥΡΣΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ  
ΑΠΟΘΗΚΕΥΜΕΝΑ ΣΕ ΨΥΧΟΣ**



**ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ**

**ΝΙΚΟΛΑΪΔΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**

**A.M.: 19678211**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**ΦΟΡΤΗΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ**

**ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟΣ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ**

**ΑΙΓΑΛΕΩ, ΑΘΗΝΑ 2023**

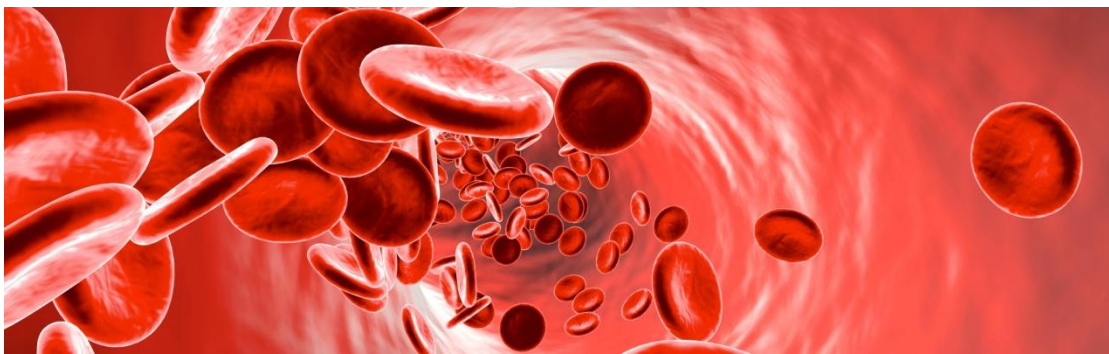


**UNIVERSITY OF WEST ATTICA**  
**FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES**  
**DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES**  
**DIVISION OF MEDICAL LABORATORIES**



**DIPLOMA THESIS**

**RED BLOOD CELL WITHDRAWAL MARKERS IN COLD-STORED  
SAMPLES**



**WRITER**

**NIKOLAIDOU AIKATERINI**

**Candidate Number: 19678211**

**SUPERVISOR**

**FORTIS SOTIRIOS**

**ACADEMIC SCHOLAR**

**AIGALEO, ATHENS 2023**



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA**  
**FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES**  
**DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES**  
**DIVISION OF MEDICAL LABORATORIES**



**ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΙΣΗΓΗΤΗ ΚΑΘΗΓΗΤΗ**

Η διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι εξεταστική επιτροπή:

<b>ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ</b>	<b>ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ</b>	<b>ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
<b>ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ</b>	<b>ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ</b>	
<b>ΜΠΙΡΤΣΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ</b>	<b>ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟΣ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ</b>	
<b>ΦΟΡΤΗΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ</b>	<b>ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟΣ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ</b>	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Νικολαΐδου Αικατερίνη, με αριθμό μητρώου 19678211 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών δηλώνω υπεύθυνα ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα



Εισηγητής: Φόρτης Σωτήριος

Ακαδημαϊκός Υπότροφος

## Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	7
Περίληψη.....	9
Abstract .....	11
Πίνακας Συντμήσεων.....	13
A.Εισαγωγή.....	15
1. Αίμα και κύτταρα του αίματος.....	15
1.1 Ερυθρά Αιμοσφαίρια .....	16
1.1.1 Λειτουργία και μορφολογία ερυθροκυττάρου .....	16
2. Ερυθροκυτταρική Μembrάνη και Κυτταροσκελετός .....	18
2.1 Λιπιδική διπλοστιβάδα .....	19
2.2 Πρωτεΐνες ερυθροκυτταρικής μεμβράνης.....	20
2.2.1 Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες .....	20
2.2.2 Περιφερειακές Μembrανικές Πρωτεΐνες .....	22
2.2.3 Μembrανοσυνδεόμενες Πρωτεΐνες .....	23
2.3 Κυτταροσκελετός.....	23
2.3.1 Πρωτεΐνες κυτταροσκελετού .....	23
2.3.2 Δομή κυτταροσκελετού .....	25
2.3.3 Σύμπλοκα Ερυθροκυτταρικής Μembrάνης .....	25
3. Ερυθροκυτταρική Γήρανση .....	28
3.1 Μονοπάτι σχετιζόμενο με τη ζώνη 3.....	28
3.2 Μονοπάτι σχετιζόμενο με το CD47 .....	29
3.3 Μικροκυστιδιοποίηση.....	30
3.4 Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης .....	30
4. Ερυθρόπτωση.....	32
4.1 Ερυθρόπτωση επαγόμενη από ιόντα $Ca^{2+}$ .....	32
4.2 Ερυθρόπτωση επαγόμενη από κεραμίδιο .....	32
4.3 Παραδείγματα επαγωγέων της ερυθρόπτωσης .....	33
4.4 Παραδείγματα αναστολέων της ερυθρόπτωσης .....	33
5. Αποθήκευση και Αποθηκευτική Βλάβη Ερυθροκυττάρων .....	34
5.1 Συνθήκες αποθήκευσης .....	34
5.2 Αποθηκευτική βλάβη .....	36

5.3 Αποθηκευτική βλάβη εξαιτίας της κρυσσυντήρησης .....	39
B. Υλικά και Μέθοδοι .....	41
1. Σκοπός της εργασίας .....	41
2. Όργανα και Αντιδραστήρια .....	42
2.1 Συσκευές και Όργανα .....	42
2.2 Χημικά Αντιδραστήρια .....	42
2.3 Αναλώσιμα .....	42
3. Εργαστηριακές Μέθοδοι .....	43
3.1 Ανίχνευση εξωτερικευμένης PS .....	43
3.2 Μέτρηση επιπέδων κυττοσολικών ιόντων $Ca^{2+}$ .....	43
3.3 Ρυθμιστικά διαλύματα .....	44
Γ. Αποτελέσματα .....	45
1. Αιματολογικά δεδομένα .....	45
2. Μέτρηση της εξωτερίκευσης της PS .....	50
3. Μέτρηση επιπέδων του ενδοκυττάριου $Ca^{2+}$ .....	51
Δ. Συζήτηση- Συμπεράσματα .....	52
1. Συζήτηση .....	52
2. Συμπεράσματα .....	54
Βιβλιογραφία .....	55
Πίνακας Εικόνων .....	59

# Πρόλογος

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε την περίοδο Ιανουάριος- Σεπτέμβριος 2023 στα πλαίσια των προπτυχιακών μου σπουδών στο Ερευνητικό Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία, του τομέα των Βιοϊατρικών Επιστημών του τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, **κ. Φόρτη Σωτήριο**, Ακαδημαϊκό Υπότροφο του τμήματος, για την πολύτιμη βοήθεια του τόσο κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας μου. Ευχαριστώ για τη μετάδοση των γνώσεων και των εμπειριών του, την εμπιστοσύνη, την ενθάρρυνση, και φυσικά την υποστήριξή του, πρακτική και συναισθηματική, οποιαδήποτε στιγμή τη χρειαζόμουν.

Ευχαριστώ πολύ τον **κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη**, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου, που μου έδωσε την ευκαιρία να είμαι στο εργαστήριο του και την τιμή να συνεργαστούμε στο συγκεκριμένο ερευνητικό πρόγραμμα. Το πάθος και η αγάπη για το αντικείμενο, οι γνώσεις, οι συμβουλές και η εργαστηριακή του ηθική συνετέλεσαν αδιαμφισβήτητα στην εκπαίδευση και την επιστημονική μου ταυτότητα.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την **κ. Παύλου Ευθυμία**, Ακαδημαϊκή Υπότροφο, που από μικρότερα κιόλας εξάμηνα μου μετέδωσε την αγάπη της για το αντικείμενο και τον **κ. Μπίρτσα Βασίλειο**, Ακαδημαϊκό Υπότροφο, για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον **κ. Τζούνακα Βασίλειο**, Επίκουρο Καθηγητή στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών για την άριστη συνεργασία και την ευκαιρία να δουλέψουμε μαζί στο συγκεκριμένο ερευνητικό πρόγραμμα και την **κ. Αναστασιάδη Αλκμήνη**, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια και Εξωτερική Συνεργάτιδα, η οποία υπήρξε σπουδαία φίλη και μου προσέφερε απλόχερα τις συμβουλές και τη βοήθεια της

τόσο κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας μου.



# Περίληψη

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά την *ex vivo* αποθήκευσή τους υφίστανται ένα σύνολο μεταβολών και βλαβών. Το σύνολο αυτό των βιοχημικών, μηχανικών και μεμβρανικών αλλαγών είναι γνωστό ως “αποθηκευτική βλάβη”. Εξαιτίας του διαφορετικού περιβάλλοντος και της απουσίας των μηχανισμών εκκαθάρισης παρατηρείται διαταραχή της ομοιόστασης των κυττάρων, γεγονός που σε συνδυασμό με την αδυναμία απομάκρυνσης των κυτταρικών αποβλήτων οδηγεί σε επιτάχυνση της διαδικασίας της γήρανσης. Για το λόγο αυτό τα ερυθροκύτταρα που αποθηκεύονται παρουσιάζουν έναν πρώιμο φαινότυπο γήρανσης που, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνει την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης και την αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάρου ασβεστίου και τα καθιστά επιδεικτικότερα σε εκκαθάριση ύστερα από τη μετάγγιση.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η αξιολόγηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών μονάδων κατεψυγμένων συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων, μετά την αναζωογόνηση τους, που αποθηκεύτηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για διάστημα 4 έως 6 μηνών παρουσία γλυκερόλης. Μετά την επακόλουθη απόψυξη, απογλυκεροποίηση και αποθήκευση στους  $4^{\circ}\text{C}$  για διάστημα 7 ημερών έγινε σύγκριση στην αρχή και στο τέλος της υποθερμικής αποθήκευσής τους, με μονάδες συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων αποθηκευμένων σε CPD-SAGM, που αποτελεί τον συνήθη τρόπο αποθήκευσης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε γενική εξέταση αίματος και μετρήθηκαν η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης και τα επίπεδα του ενδοκυττάρου ασβεστίου σε συνολικά δώδεκα μονάδες συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων, έξι μονάδες κατεψυγμένων συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων και έξι μονάδες συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων αποθηκευμένων σε CPD-SAGM.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα, δηλαδή εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου ασβεστίου τόσο στις μονάδες κατεψυγμένων συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων όσο και στις μονάδες συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων αποθηκευμένων σε CPD-SAGM. Ειδικότερα, η εξωτερίκευση της

φωσφατιδυλοσερίνης ήταν μεγαλύτερη στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου στις κατεψυγμένες μονάδες ενώ στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου τα επίπεδα της εξωτερικευμένης φωσφατιδυλοσερίνης δεν παρουσίαζαν σημαντική διαφορά. Από την άλλη, τα επίπεδα ενδοκυττάρου ασβεστίου σημειώθηκε ότι ήταν χαμηλότερα στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου στις κατεψυγμένες μονάδες χωρίς να παρατηρείται ταυτόχρονα διαφορά στα επίπεδα στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει πως η αποθήκευση συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων σε βαθιά κατάψυξη με γλυκερόλη αποτελεί μέθοδο πολλά υποσχόμενη καθώς οι ποιοτικές παράμετροι μετά την απόψυξη είναι συγκρίσιμες με αυτές των συμβατικά αποθηκευμένων μονάδων. Περαιτέρω έρευνα σε μεγαλύτερο αριθμό μονάδων αποθήκευσης είναι απαραίτητη, ωστόσο από τα προκαταρκτικά αυτά αποτελέσματα φαίνεται πως η δημιουργία αποθέματος κατεψυγμένων συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων είναι δυνατόν να εφαρμοστεί.

Λέξεις-φράσεις κλειδιά: δείκτες ερυθροκυτταρικής απόσυρσης, εξωτερίκευση PS, επίπεδα ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$ , κατεψυγμένες μονάδες ΣΕ

# Abstract

During their *ex vivo* storage, red blood cells undergo a number of changes and damage. This set of biochemical, mechanical and membrane alterations is known as "storage lesion". Due to the different environment and the absence of clearance mechanisms, there is a disturbance of cell homeostasis which, combined with the inability to remove cellular waste, leads to an acceleration of the ageing process. This causes erythrocytes that are stored for transfusion to exhibit an early aging phenotype that, among other things, involves phosphatidylserine exposure and an increase in intracellular calcium levels, making them more prone to clearance.

The aim of this study was to evaluate the quality characteristics of frozen packed erythrocyte units that had been stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 4 to 6 months in the presence of glycerol, after their regeneration. After subsequent thawing, deglycerolization and storage at  $4^{\circ}\text{C}$  for 7 days, a comparison was made at the beginning and at the end of their hypothermic storage with packed red blood cell units stored in CPD-SAGM, which is the standard storage mode. Specifically, a complete blood count was performed and phosphatidylserine exteriorization and intracellular calcium levels were measured in a total of twelve units of packed red blood cells, six units of frozen packed red blood cells and six units of packed red blood cells stored in CPD-SAGM.

The results obtained confirm the existing data, i.e. phosphatidylserine exposure and increase in intracellular calcium concentration in both frozen packed RBCs units and packed RBCs units stored in CPD-SAGM. In particular, phosphatidylserine externalization was higher at the end of the storage period in the frozen units, whereas at the beginning of the storage period the levels of externalized phosphatidylserine did not show a significant difference. On the other hand, intracellular calcium levels were noted to be lower at the beginning of the storage period in the frozen units with no difference in levels at the end of the storage period.

Our results show that the storage of packed erythrocytes in deep freezing with glycerol is a promising method as the quality parameters after thawing are

comparable to those of conventionally stored units. Further research on a larger number of storage units is necessary, but from these preliminary results it appears that the establishment of a stockpile of frozen packed erythrocytes is feasible.

Key words-phrases: erythrocyte withdrawal markers, PS exposure, levels of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , frozen pRBCs

## Πίνακας Συντμήσεων

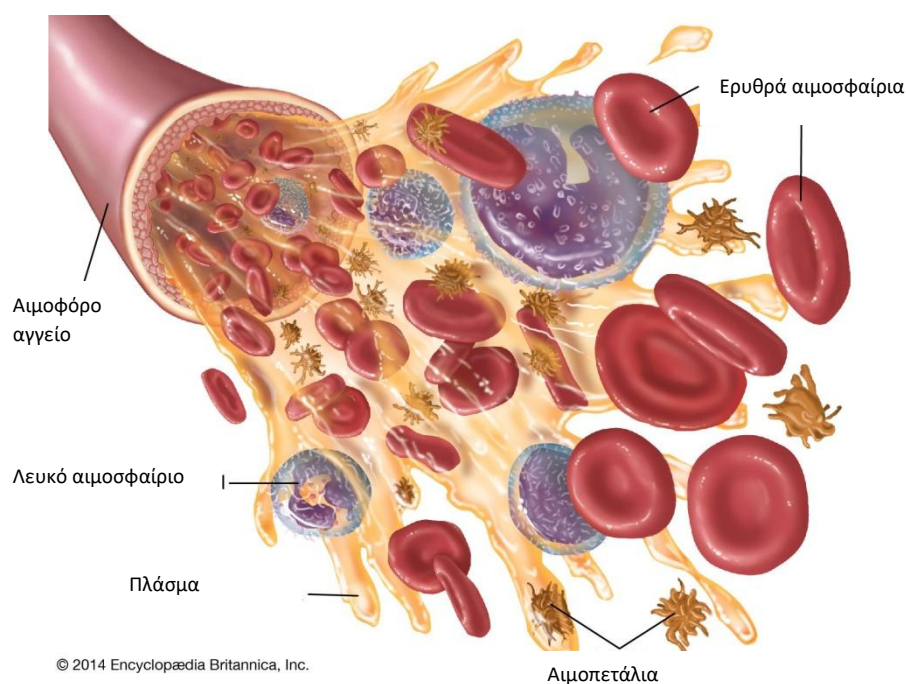
AE1	Ανιοντοανταλλάκτης 1
AQP1	Υδατοπορίνη 1
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
Ca <sup>2+</sup>	Κατιόντα ασβεστίου
Cl <sup>-</sup>	Ανιόν χλωρίου
CO <sub>2</sub>	Διοξείδιο του άνθρακα
GLUT 1	Μεταφορέας Γλυκόζης
H <sup>+</sup>	Πρωτόνια
Hb	Αιμοσφαιρίνη
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Διττανθρακικά ανιόντα
HCT	Αιματοκρίτης
IAP	Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την ιντεγκρίνη
ICAM-4	Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης 4
K <sup>+</sup>	Κατιόντα καλίου
LW	Γλυκοπρωτεΐνη Landsteiner-Weiner
MCH	Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης
MCHC	Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης
MCV	Μέσος όγκος ερυθρών
MVs	Μικροκυστίδια
Na <sup>+</sup>	Κατιόντα νατρίου
O <sub>2</sub>	Οξυγόνο
PC	Φωσφατιδυλοχολίνη
PE	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PFK	Φωσφοφρουκτοκινάση
PI	Φωσφοϊνοσιτίδια
PIP 2	4,5- διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PLA	Φωσφολιπάση A <sub>2</sub>
PS	Φωσφατιδυλοσερίνη
RBC	Ερυθρά αιμοσφαίρια
RBCs	Ερυθρά αιμοσφαίρια

RDW	Κατανομή μεγέθους ερυθρών αιμοσφαιρίων
RhAg	Γλυκοπρωτεΐνη συμπλόκου Rhesus
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ
SIRPα	Πρωτεΐνη ρύθμισης σήματος α
SLC4A1	Διττανθρακικός μεταφορέας πρωτεϊνών ανταλλαγής ανιόντων
SM	Σφιγγομυελίνη
TSP	Θρομβοσπονδίνη
ΔΕΚ	Δικτυοερυθροκύτταρα
ΣΕ	Συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα

# Α.Εισαγωγή

## 1. Αίμα και κύτταρα του αίματος

Το αίμα είναι το σημαντικότερο υγρό του οργανισμού που ρέει στο κυκλοφορικό σύστημα. Αποτελεί ένα πολύπλοκο είδος συνδετικού ιστού και συνίσταται από πλάσμα και έμμορφα στοιχεία, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1**. Το πλάσμα είναι το υγρό συστατικό του αίματος στο οποίο εναιωρούνται τα κύτταρα και αποτελείται κυρίως από νερό (92%). Περιέχει ακόμα πρωτεΐνες, διαλυμένα οργανικά μόρια, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες, ιόντα, οξυγόνο ( $O_2$ ) και διοξείδιο του άνθρακα ( $CO_2$ ). Τα βασικά κυτταρικά στοιχεία του αίματος είναι τρία, και συγκεκριμένα τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Τα ερυθροκύτταρα παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανταλλαγή των αναπνευστικών αερίων. Τα λευκοκύτταρα χωρίζονται σε κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα), λεμφοκύτταρα (B-λεμφοκύτταρα, T-λεμφοκύτταρα και κύτταρα Φυσιικοί Φονείς) και μονοκύτταρα με βασικό ρόλο την άμυνα του οργανισμού έναντι βακτηρίων, ιών και παρασίτων μέσω της ανοσοαπόκρισης. Τέλος, τα αιμοπετάλια είναι απύρρηνα κυτταρικά θραύσματα ενός μεγαλύτερου κυττάρου, του μεγακαρυοκυττάρου, συμμετέχουν στη δημιουργία θρόμβων και συντελούν στην αιμοστατική ισορροπία. [1]



© 2014 Encyclopædia Britannica, Inc.

**Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των συστατικών του αίματος (Ανατύπωση από Encyclopædia Britannica)**

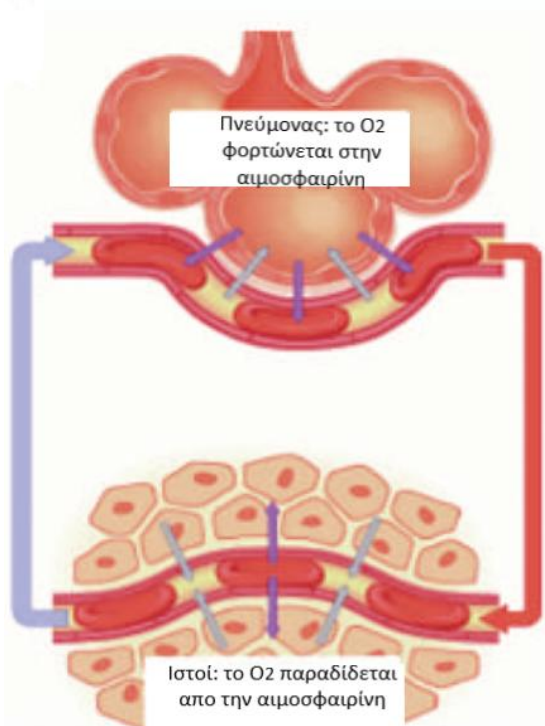
## 1.1 Ερυθρά Αιμοσφαίρια

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι τα κύτταρα του αίματος που συναντώνται σε αφθονία και προέρχονται από το πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο. Το κύτταρο αυτό βρίσκεται στον μυελό των οστών και μετά από ερεθίσματα που δέχεται από ορμόνες γνωστές ως κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες υπόκειται σε διαφοροποίηση, παράγοντας στο τέλος ώριμα μορφολογικά και λειτουργικά ερυθροκύτταρα [1-3].

### 1.1.1 Λειτουργία και μορφολογία ερυθροκυττάρου

Τα ερυθροκύτταρα σε έναν ενήλικο άνθρωπο είναι περίπου  $5 \times 10^{12}$  ανά λίτρο και έχουν μέσο όρο ζωής 120 ημέρες [2, 3]. Μάλιστα, κάθε δευτερόλεπτο δυο εκατομμύρια νεοσχηματισθέντα ερυθρά κύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία από τον μυελό των οστών και ταυτόχρονα σχεδόν ίδιος αριθμός κυττάρων αποπίπτει. Είναι υψηλά διαφοροποιημένα κύτταρα που έχουν απολέσει τον πυρήνα τους και στερούνται όλων των βασικών οργανιδίων, έτσι μπορούν να επιτελούν τις χαρακτηριστικές τους λειτουργίες [3].

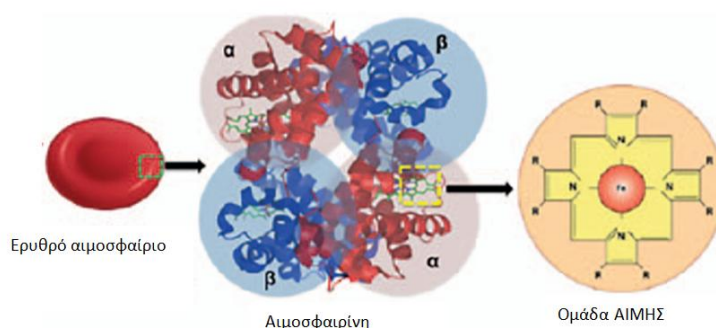
Η κύρια λειτουργία των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η ανταλλαγή των αερίων, δηλαδή η μεταφορά του  $O_2$  από τα πνευμονικά τριχοειδή στα τριχοειδή των διαφόρων ιστών, όπου το ανταλλάσσει για  $CO_2$  [2], όπως βλέπουμε στην **Εικόνα 2**.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της διαδρομής των ερυθροκυττάρων μεταξύ του πνεύμονα (σημείο φόρτωσης οξυγόνου) και των ιστών (σημείο εκφόρτωσης οξυγόνου) (Ανατύπωση από Anirban, 2019)



Η ανταλλαγή αυτή γίνεται μέσω της αιμοσφαιρίνης, μιας πρωτεΐνης-πορφυρίνης που αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ανά δύο όμοιες, 2α και 2β. Κάθε μια από αυτές φέρει ένα μόριο αίμης στο κέντρο της οποίας υπάρχει σίδηρος, που τελικά δεσμεύει ένα μόριο  $O_2$  [2, 4] **(Εικόνα 3)**. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για την κάλυψη των βασικών αναγκών των ιστών σε οξυγόνο αλλά και πιο εντατικά σε καταστάσεις ιστικής υποξίας που οφείλονται σε τραυματισμούς και αιμορραγίες [3, 4]. Από τα προηγούμενα συμπεραίνεται πως τα ερυθροκύτταρα κατέχουν θεμελιώδη ρόλο στην ομαλή λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος [3].

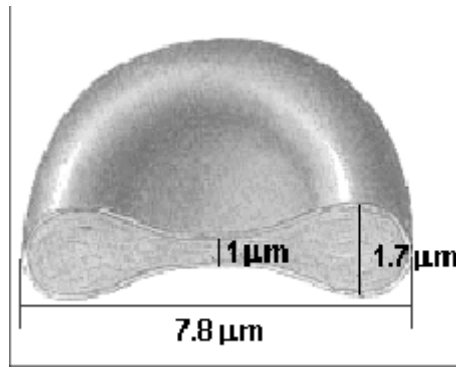


**Εικόνα 3:** Σχηματική αναπαράσταση από τα αριστερά προς τα δεξιά ενός ερυθρού αιμοσφαιρίου, ενός τετραμερούς αιμοσφαιρίνης α2β2 και μιας ομάδας αίμης (Ανατύπωση από Anirban, 2019)

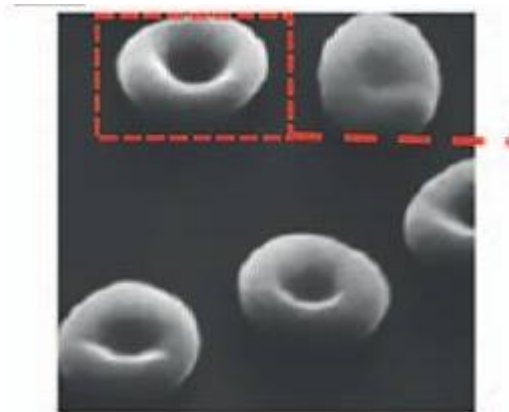
Τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά τη διάρκεια της ζωής τους και καθώς εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος αλληλεπιδρούν και επικοινωνούν με ποικιλία κυττάρων όπως ενδοθηλιακά, αιμοπετάλια, μακροφάγα και βακτήρια. Με αυτόν τον τρόπο, συμμετέχουν στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ αιμόστασης και αιμορραγίας αλλά και στην άμυνα του οργανισμού έναντι διαφόρων παθογόνων [3].

Το χαρακτηριστικό σχήμα του αμφίκιουλου δίσκου προκύπτει στο τελικό στάδιο της ωρίμασής τους όπου τα άωρα ερυθρά ή δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ) περνούν στην κυκλοφορία του αίματος. Στο στάδιο αυτό, χάνουν το 20% της μεμβράνης τους, τα μιτοχόνδρια και τα ριβοσώματά τους αποβάλλονται και το εναπομείναν ριβονουκλεϊκό οξύ (ribonucleic acid, RNA) μετατρέπεται σε αιμοσφαιρίνη [3]. Η μέση διάμετρός τους είναι 8μm και ο μέσος όγκος τους 90fl **(Εικόνα 4)**. Το σχήμα

του αμφίκιου δίσκου και η ελαστικότητα που χαρακτηρίζει τα ερυθρά, τους επιτρέπει να παραμορφώνονται ανάλογα με τις ανάγκες που προκύπτουν (**Εικόνα 5**). Έτσι, δύνανται να διευρυνθούν μέχρι τα 150 fl είτε να συρρικνωθούν ώστε να περάσουν από τριχοειδή διαμέτρου μικρότερης των 8  $\mu\text{m}$ . Η ικανότητα τους αυτή να παραμορφώνονται οφείλεται στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη [2, 3].



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του χαρακτηριστικού σχήματος του αμφίκιου δίσκου και οι φυσιολογικές διαστάσεις του ερυθρού αιμοσφαιρίου (Ανατύπωση από Anijit Hazra, 2000).



Εικόνα 5: Η εικόνα του αμφίκιου δίσκου από το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Ανατύπωση από Anirban, 2019)

## 2. Ερυθροκυτταρική Μεμβράνη και Κυτταροσκελετός

Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη αποτελεί την μόνη εναπομείνουσα μεμβράνη του ώριμου ερυθρού αιμοσφαιρίου και διαδραματίζει το ρόλο της πλασματικής του μεμβράνης [5]. Απαρτίζεται από μια λιπιδική διπλοστοιβάδα με ενσωματωμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα και ενώνουν τη μεμβράνη με το δυσδιάστατο ελαστικό δίκτυο υπομεμβρανικών πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού. Χάρη στην οργάνωση αυτή της ανθρώπινης ερυθροκυτταρικής μεμβράνης τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν να υφίστανται

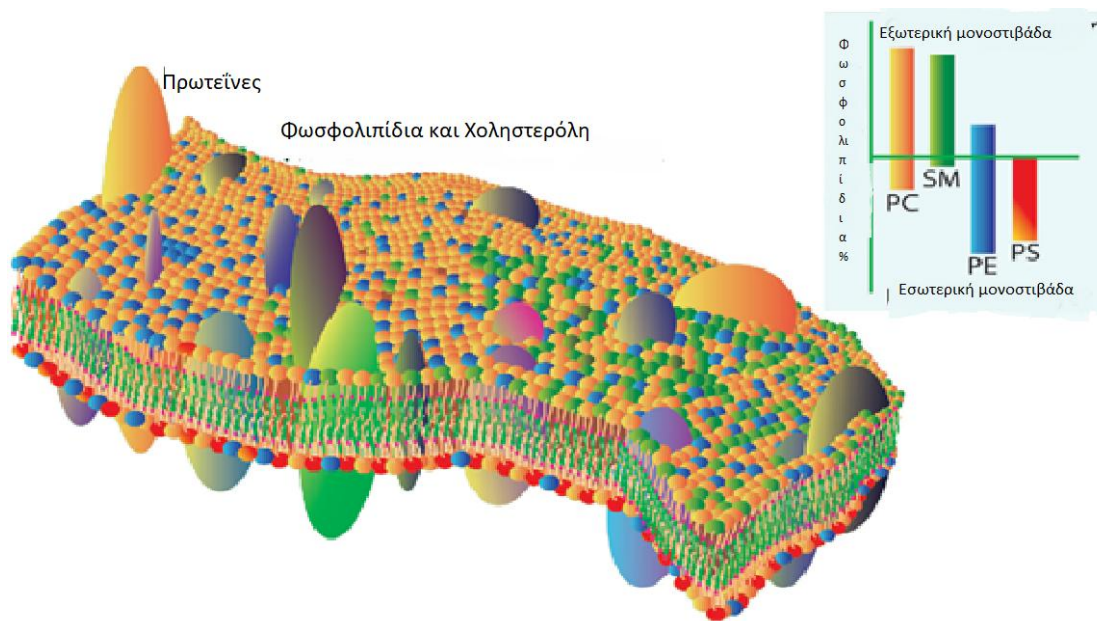
μεγάλες αναστρέψιμες παραμορφώσεις, διατηρώντας παράλληλα τη δομική τους ακεραιότητα κατά τη διάρκεια της τετράμηνης παραμονής τους στην κυκλοφορία [3, 6].

### **2.1 Λιπιδική διπλοστιβάδα**

Η χοληστερόλη και τα φωσφολιπίδια συνιστούν τα κύρια συστατικά της λιπιδικής διπλοστιβάδας, σε ίση κατανομή και ίδια αναλογία σε σχέση με το βάρος τους [3, 6]. Η χοληστερόλη είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη ανάμεσα στις δύο στιβάδες, σε αντίθεση με τα φωσφολιπίδια που κατανέμονται άνισα. Συγκεκριμένα, η εξωτερική στιβάδα είναι πλούσια σε φωσφατιδυλοχολίνη (phosphatidylcholine, PC, 27% των συνολικών μεμβρανικών φωσφολιπιδίων) και σφιγγομυελίνη (sphingomyelin, SM, 23%), ενώ η εσωτερική στιβάδα αποτελείται κυρίως από φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (phosphatidylethanolamine PE, 30%), φωσφατιδυλοσερίνη (phosphatidylserine, PS, 15%) και φωσφοϊνοσιτίδια (phosphoinositide PI, 5%) σε μικρό ποσοστό [3] **(Εικόνα 6)**.

Η λιπιδική αυτή ασυμμετρία διατηρείται από ένα σύνολο πρωτεϊνών. Οι φλιπάσες μεταφέρουν φωσφολιπίδια από την εξωτερική προς την εσωτερική μονοστιβάδα και οι φλοπάσες εκτελούν την αντίθετη μεταφορά. Καθώς οι παραπάνω μεταφορές είναι ενάντια στη διαβάθμιση της συγκέντρωσης, τα δύο αυτά είδη πρωτεϊνών απαιτούν ενέργεια για να τις πραγματοποιήσουν. Αντίθετα, οι σκραμπλάσες δρουν τυχαία στην κατανομή των λιπιδίων μεταφέροντας αμφίδρομα τα φωσφολιπίδια μεταξύ των δύο στιβάδων και δεν απαιτούν ενέργεια για τη δράση τους [6, 7].

Η διατήρηση της λιπιδικής ανισοκατανομής, και ειδικά η παραμονή της PS στην εσωτερική μονοστιβάδα, είναι εξέχουσας σημασίας. Η συχνή επαφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων με τα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος καθιστά αναγκαίο τον εσωτερικό εντοπισμό της PS καθώς τα τελευταία αναγνωρίζουν και φαγοκυτταρώνουν τα ερυθρά που εκφράζουν PS στην επιφάνειά τους. Ακόμη, εξασφαλίζεται η ομαλή κυκλοφορία τους στο μικροαγγειακό σύστημα με τη μη προσκόλλησή τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τέλος, μέσω αλληλεπιδράσεων της, με διάφορες σκελετικές πρωτεΐνες φαίνεται να συμβάλλει στη μηχανική σταθερότητα [6].



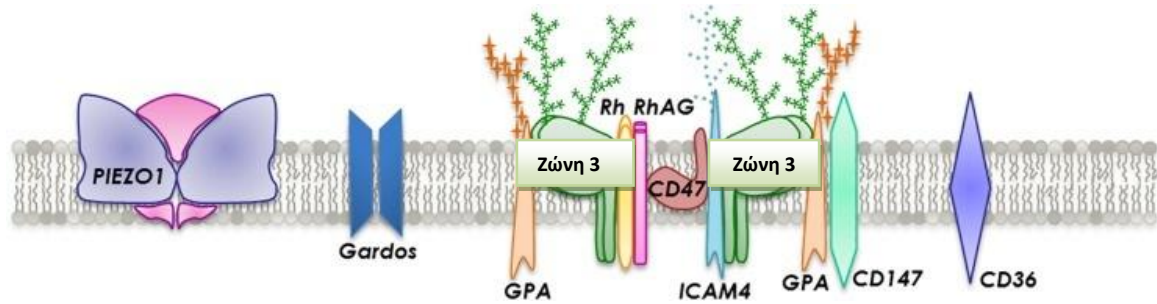
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της σύστασης της λιπιδικής διλοστιβάδας του ερυθροκυττάρου (Ανατύπωση από Frabs Kuypers, 2011)

## 2.2 Πρωτεΐνες ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

### 2.2.1 Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες

Έχει βρεθεί μεγάλο πλήθος διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που παρουσιάζουν ποικίλη λειτουργική ετερογένεια. Μπορεί να λειτουργούν ως μεταφορείς, να καταλύουν αντιδράσεις, να συμμετέχουν στην μεταγωγή σήματος, να αλληλεπιδρούν με άλλα κύτταρα του αίματος ή του ενδοθηλίου και να συμβάλλουν στη δομική σταθερότητα του ερυθρού αιμοσφαιρίου [3, 8]. Ακόμα, μεγάλο μέρος αυτών των πρωτεϊνών ορίζουν τα διάφορα αντιγόνα των ομάδων αίματος [3, 5].

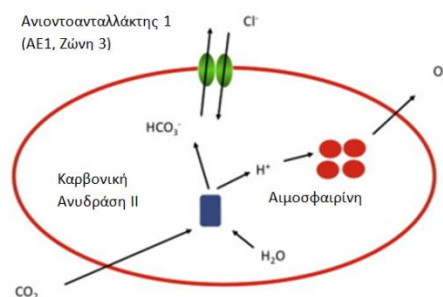
Ονομαστικά αναφέρονται η πρωτεΐνη ζώνη 3 ή διάυλος ανταλλαγής ανιόντων (Band 3), το κανάλι Gardos, το κανάλι κατιόντων PIEZO 1, ο μεταφορέας της γλυκόζης (GLUT1), η υδατοπορίνη 1 (AQP1), η γλυκοπρωτεΐνη του αντιγόνου Rhesus (RhAg), τα αντιγόνα Kidd, οι γλυκοφορίνες A, B, C, D, η γλυκοπρωτεΐνη Landsteiner-Wiener (LW), οι ATPάση  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  και ATPάση  $\text{Ca}^{2+}$ , και το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης 4 (ICAM-4) [3, 6] (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης με έμφαση στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Ανατύπωση από Pretini et al, 2019)

### Ζώνη 3

Η ζώνη 3 (band 3) ή ανιοντοανταλλάκτης 1 (AE1) ανήκει στην οικογένεια των διττανθρακικών μεταφορέων πρωτεϊνών ανταλλαγής ανιόντων (SLC4A1) και είναι η κυρίαρχη γλυκοπρωτεΐνη της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Παίζει σημαντικό ρόλο στην ανταλλαγή αερίων του ερυθρού αιμοσφαιρίου, αφού μέσω του ενζύμου καρβονική ανυδράση II μετατρέπει το διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ) σε διττανθρακικά ιόντα ( $\text{HCO}_3^-$ ) και πρωτόνια ( $\text{H}^+$ ). Το διττανθρακικό ιόν στη συνέχεια ανταλλάσσεται με ένα ιόν χλωρίου ( $\text{Cl}^-$ ) από το περιβάλλον και το πρωτόνιο προσδέεται στην αιμοσφαιρίνη οδηγώντας έτσι στην απελευθέρωση του  $\text{O}_2$  στους ιστούς [9, 10]. Η ζώνη 3 επιπλέον σχηματίζει σύμπλοκα συνδεδεμένη με άλλες πρωτεΐνες όπως το σύμπλεγμα Rh, τις γλυκοφορίνες A και B, τη στοματίνη καθώς και πρωτεΐνες που συνδέονται με τη σπεκτρίνη μέσω της αγκυρίνης και της πρωτεΐνης 4.2R και με την ακτίνη μέσω της πρωτεΐνης 4.1R, 4.2R, p55, αδουσίνη και GLUT1 [11] (Εικόνα 8). Διαδραματίζει, ακόμα, ενεργό ρόλο στη γήρανση και την απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, τα οποία θα αναλυθούν εκτενώς παρακάτω [12].



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της βασικής λειτουργίας της πρωτεΐνης ζώνης 3 των ερυθροκυττάρων (Ανατύπωση από Rethmeier et al, 2012)

### ***Piezo-1 και κανάλια Gardos***

Η πρωτεΐνη Piezo-1 είναι ένας μη εκλεκτικός διάυλος κατιόντων που λειτουργεί ως μηχανικός αισθητήρας και διαδραματίζει καίριο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του όγκου των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα κανάλια Gardos είναι κανάλια καλίου ενεργοποιούμενα από ασβέστιο και συναντώνται σε μικρό αριθμό στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη [3]. Η ενεργοποίηση του Piezo-1 από μηχανικές δυνάμεις οδηγεί σε αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ ) η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τα κανάλια Gardos με αποτέλεσμα την απομάκρυνση  $K^+$  και μορίων νερού [13, 14]. Με αυτόν τον τρόπο τα ερυθροκύτταρα δύνανται να αλλάζουν σχήμα/όγκο προκειμένου να διέρχονται από στενά τριχοειδή και μεσοδιαστήματα [15]. Η Piezo-1, ακόμα, πιθανολογείται πως συμμετέχει στο μονοπάτι κατιόντων που προκαλείται εξαιτίας της διατμητικής τάσης που ασκείται στα ερυθρά αιμοσφαίρια και εμπλέκεται στη γήρανση τους [16].

### **2.2.2 Περιφερειακές Μεμβρανικές Πρωτεΐνες**

#### ***CD47***

Η πρωτεΐνη CD47, γνωστή και ως πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την ιντεγκρίνη (IAP), είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελεί δείκτη εαυτού για τα ερυθρά αιμοσφαίρια [17]. Έχει υψηλή συγγένεια με τη θρομβοσπονδίνη (TSP) και την πρωτεΐνη ρύθμισης σήματος άλφα (SIRPα) στη μεμβράνη των μακροφάγων [18]. Έτσι, όταν η CD47 εκτίθεται σε κάποιο κύτταρο προλαμβάνει την φαγοκυττάρωση του από τα μακροφάγα, καθώς αλληλεπιδρά με τη SIRPα, προκαλώντας τελικά ανασταλτική σηματοδότηση [17, 19]. Προκύπτει συνεπώς πως τα ερυθροκύτταρα που στερούνται CD47 ή εκφράζουν CD47 με παραλλαγμένη δομή, απομακρύνονται ταχέως από την κυκλοφορία από τα σπληνικά μακροφάγα του ερυθρού πολφού. Όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, η έκφραση του CD47 και η προστασία που παρέχει στο κύτταρο, ελαττώνεται ως αποτέλεσμα γήρανσης ή αποθήκευσης τους [20, 21].

### 2.2.3 Μεμβρανοσυνδεδεμένες Πρωτεΐνες

#### **Καλπαΐνη-1**

Η καλπαΐνη-1 ή μ-καλπαΐνη είναι μια ασβεστιοεξαρτώμενη πρωτεάση κυστεΐνης που ανήκει στο σύστημα των καλπαϊνών μαζί με την καλπαΐνη-2 (ή m-καλπαΐνη) και την καλπασατίνη που αναστέλλει τη δράση των καλπαϊνών [22]. Τροποποιεί τη δραστηριότητα πολλών υποστρωμάτων μέσω περιορισμένης πρωτεόλυσης των ρυθμιστικών τους περιοχών. Ακόμα, η ενεργοποίηση της μπορεί να ενισχύσει την προ-αποπτωτική κυτταρική σηματοδότηση κατά την εισροή  $Ca^{2+}$  [23]. Παραδείγματα της δραστηριότητάς της αποτελούν η διάσπαση της ΑΤΡάσης  $Ca^{2+}$ , που ρυθμίζει τη μεταφορά  $Ca^{2+}$  στα ερυθρά αιμοσφαίρια, η ρύθμιση της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών (π.χ. 4.1 R) της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, αλλά και η πρωτεόλυση της αιμοσφαιρίνης που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία σωματιδίων Heinz [24].

### 2.3 Κυτταροσκελετός

Ο σκελετός των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι ένα υπομεμβρανικό, δυσδιάστατο σύμπλεγμα πρωτεϊνών του οποίου τα κύρια συστατικά αποτελούν η σπεκτρίνη, η ακτίνη, πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με την ακτίνη (τροπομυοσίνη, τροπομοντουλίνη, αδουσίνη, δεματίνη), η 4.1R και η αγκυρίνη. Συνδέεται στενά με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη και μαζί προσδίδουν στο ερυθροκύτταρο το σχήμα και την αναστρέψιμη παραμορφωσιμότητά του [3, 11].

#### 2.3.1 Πρωτεΐνες κυτταροσκελετού

##### **Σπεκτρίνη**

Η ερυθροκυτταρική σπεκτρίνη είναι μια εύκαμπτη πρωτεΐνη μεγάλου μήκους που αποτελείται από δύο παράλληλες αλυσίδες (α- και β- σπεκτρίνη) που έχουν αντίθετο προσανατολισμό. Συγκεκριμένα, μεμονωμένες α- και β- αλυσίδες σχηματίζουν μέσω πλευρικών δυνάμεων αντιπαράλληλα ετεροδιμερή, τα οποία στη συνέχεια οδηγούν στη δημιουργία του τετραμερούς της σπεκτρίνης, το σημαντικότερο δομικό συστατικό του δισδιάστατου σκελετικού δικτύου. Σε κάθε μόριο σπεκτρίνης υπάρχουν λειτουργικές περιοχές όπου συνδέονται διάφορες πρωτεΐνες όπως η αγκυρίνη, η 4.1R, η 4.2 R και νημάτια ακτίνης [11].

### **Ακτίνη**

Η ακτίνη στα ερυθρά αιμοσφαίρια απαντάται με τη μορφή νηματίων F-ακτίνης. Τα νημάτια αυτά, που ονομάζονται «πρωτονημάτια» είναι μικρά, σχηματίζουν διπλή έλικα και αποτελούνται από  $14 \pm 1$  μονομερή β-ακτίνης. Τα άκρα τους καλύπτονται από τις πρωτεΐνες τροπομοντουλίνη και αδουσίνη και το μήκος τους ρυθμίζεται από την τροπομυοσίνη, που φροντίζει και την ενίσχυσή του μετά τη συναρμολόγηση [11, 25].

### **Τροπομυοσίνη, Τροπομοντουλίνη, Αδουσίνη, Δεματίνη**

Η τροπομυοσίνη είναι ένα διμερές μεγάλου μήκους που αποτελείται από α- και γ-ισομορφές τροπομυοσίνης. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω συνδέεται με τα νημάτια ακτίνης και αυτό γίνεται με τρόπο μαγνήσιο-εξαρτώμενο. Ακόμα, δημιουργεί δεσμούς με την τροπομοντουλίνη. Η τροπομοντουλίνη δεσμεύοντας την τροπομυοσίνη καθορίζει το τελικό μήκος του νηματίου ακτίνης καλύπτοντας το τερματικό σημείο επέκτασής του [11, 26]. Η αδουσίνη είναι μια σύνθετη πρωτεΐνη με πολλές λειτουργίες, όπως τη σταθεροποίηση της ακτίνης και τη σύνδεσή της με τη σπεκτρίνη αλλά και τη σύνδεση του κυτταροσκελετού με τη λιπιδική διπλοστιβάδα μέσω αλληλεπιδράσεων με τη ζώνη 3 και GLUT1. Τέλος, η δεματίνη έχει παρόμοια δράση με την αδουσίνη, δηλαδή ενισχύει τη σύνδεση σπεκτρίνης-ακτίνης και συμμετέχει στις κάθετες συνδέσεις μεμβράνης-κυτταροσκελετού αλληλεπιδρώντας με τον GLUT1 [11].

### **Πρωτεΐνη 4.1R**

Η πρωτεΐνη 4.1R έχει δύο βασικές λειτουργίες, τη σύνδεση μεμβράνης και κυτταροσκελετού και την ενίσχυση των δεσμών ακτίνης σπεκτρίνης. Η τελευταία είναι εξέχουσας σημασίας καθώς υπό φυσιολογικές συνθήκες η ερυθροκυτταρική σπεκτρίνη συνδέεται ασθενώς με τα νημάτια της F-ακτίνης. Στο αμινοτελικό της άκρο συνδέεται με τη γλυκοφορίνη C, την p55, τη ζώνη 3 και την καλμοδουλίνη, καθώς έχει διακριτές θέσεις πρόσδεσης για κάθε μια από αυτές [11, 27]. Η 4.1R συνδέεται επίσης με λιπίδια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, όπως η φωσφατιδυλοσερίνη και η 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (PIP 2) [28].

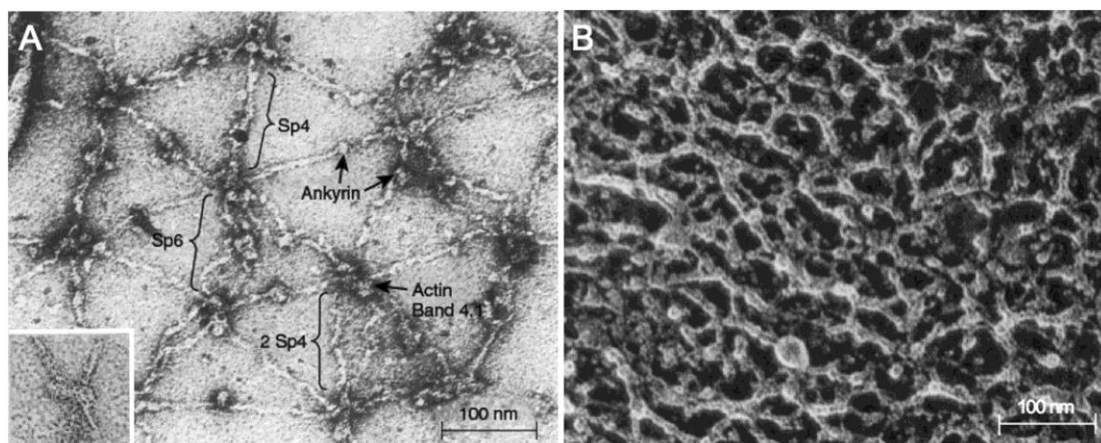


## Αγκυρίνη

Η ερυθροκυτταρική αγκυρίνη συνδέει τη σπεκτρίνη στο σύμπλεγμα της ζώνης 3 και άλλες πρωτεΐνες με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές, και συγκεκριμένα την αμινοτελική που συνδέεται με τη ζώνη 3, την κεντρική που δεσμεύει την σπεκτρίνη και την καρβοξυτελική που ρυθμίζει τις άλλες δυο [11]. Πιθανολογείται, ακόμα, πως η συμπίεση της αγκυρίνης που μοιάζει με ελατήριο συμβάλλει στο χαρακτηριστικό σχήμα και την ευελιξία των ερυθροκυττάρων [29].

### 2.3.2 Δομή κυτταροσκελετού

Ο κυτταροσκελετός των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι δυσδιάστατος και οργανωμένος ως εξαγωνικό πλέγμα. Τα ινίδια σπεκτρίνης διατάσσονται έτσι ώστε να σχηματίζουν τις πλευρές και τις ακτίνες του εξαγώνου και ενώνονται μεταξύ τους μέσω βραχέων νηματίων ακτίνης. Τη δομή αυτή σταθεροποιούν πρωτεΐνες όπως η αδουσίνη και η πρωτεΐνη 4.1R [11, 30] (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9: Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του ερυθροκυτταρικού υπομεμβρανικού σκελετού και του μορίου σπεκτρίνης (Ανατύπωση από Lux, 2016)

### 2.3.3 Σύμπλοκα Ερυθροκυτταρικής Μεμβράνης

Τα σύμπλοκα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, δηλαδή οι οριζόντιες αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, συμβάλλουν σημαντικά στη σύνδεση του μεμβρανικού σκελετού με τη λιπιδική διπλοστιβάδα της μεμβράνης.

Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται και από την πρόκληση δύσμορφων ερυθροκυττάρων (σφαιροκύτταρα, ελλειπτοκύτταρα, οβαλοκύτταρα) σε περίπτωση διαταραχής τους. Τα κυριότερα σύμπλοκα είναι το σύμπλοκο ζώνης 3 ή αγκυρίνης, το Rhesus και το σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης [11, 31] (**Εικόνα 10**).

### ***Σύμπλοκο Ζώνης 3 ή Αγκυρίνης***

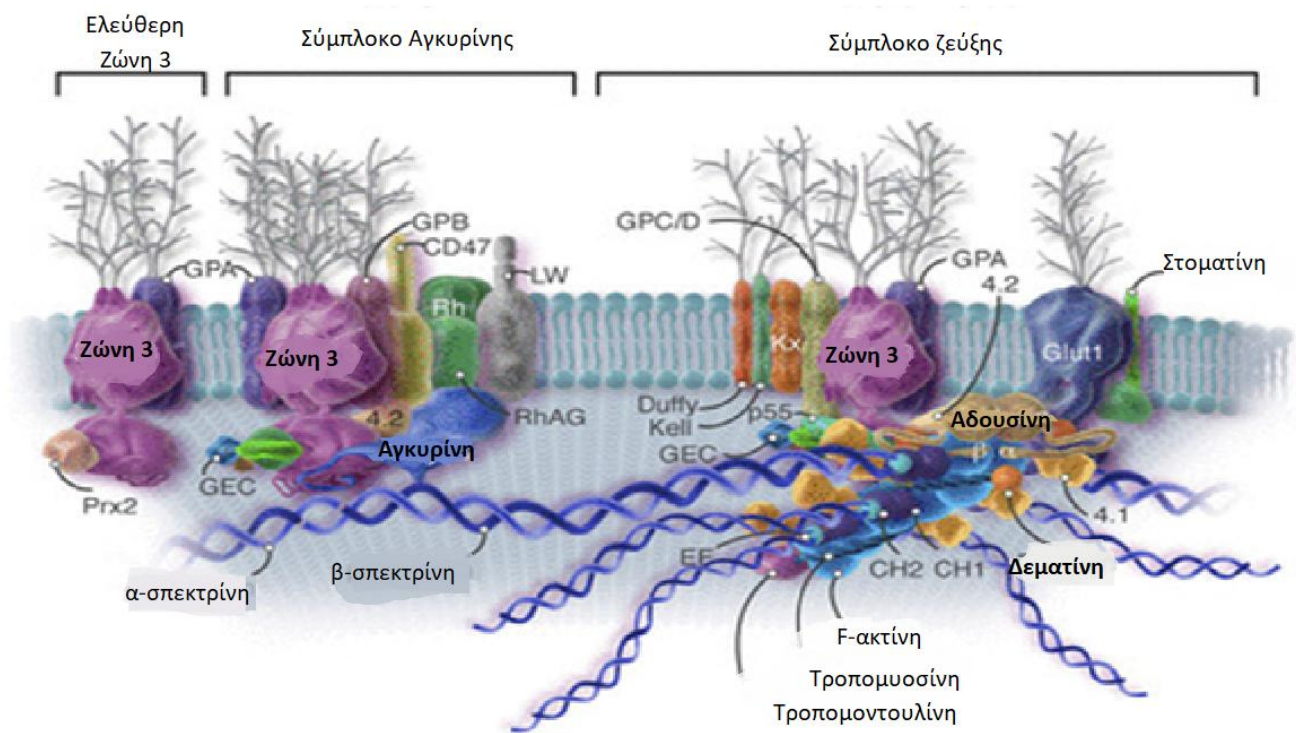
Οι κυριότερες πρωτεΐνες του συμπλόκου ζώνης 3 ή αγκυρίνης, όπως φανερώνει και το όνομά του, είναι η αγκυρίνη και η ζώνη 3. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο αυτό απαρτίζεται από ένα μόριο αγκυρίνης, ένα τετραμερές ζώνης 3, δύο διμερή ή ετεροδιμερή γλυκοφορίνης A ή B, δύο μόρια πρωτεΐνης 4.2 και από το σύμπλοκο Rhesus, που θα αναλυθεί ακολούθως. Έτσι, τα δύο αυτά υποσύμπλοκα συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν ένα πολυπρωτεϊνικό μακροσύμπλοκο [11].

### ***Σύμπλοκο Rhesus***

Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από ένα τετραμερές, συντιθέμενο από 2 Rh πολυπεπτίδια και 2 μόρια RhAG γλυκοπρωτεΐνης, που συνδέεται με τη CD47, τη γλυκοφορίνη B και τη γλυκοπρωτεΐνη Landsteiner-Wiener. Έχει, επίσης, αποδειχθεί πως το σύμπλοκο συνδέεται με τον κυτταροσκελετό μέσω αλληλεπιδράσεων με την αγκυρίνη και την πρωτεΐνη 4.2, συμβάλλοντας έτσι στη σταθερότητα και τη δομή της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Τέλος, οι πρωτεΐνες της οικογένειας Rhesus είναι ισχυρά αντιγονικές και διαδραματίζουν, επομένως, κρίσιμο ρόλο στην ιατρική των μεταγγίσεων [3, 32].

### ***Σύμπλοκο Ζεύξης Ακτίνης***

Το σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης επικεντρώνεται γύρω από τη «συμβολή» που προκύπτει από πλευρικές συνδέσεις μεταξύ των πρωτεϊνών 4.1, ακτίνης και β-σπεκτρίνης. Στο σύμπλοκο αυτό προσδέονται επίσης και πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με την ακτίνη, όπως η αδουσίνη (α- και β-) και η δεματίνη. Καθώς αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες γλυκοφορίνη C και D, 4.1 και p55, το σύμπλοκο αυτό συμβάλλει στη σύνδεση του κυτταροσκελετού με τη μεμβράνη [31].



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των συμπλόκων της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Ανατύπωση από Lux, 2016)

### **3. Ερυθροκυτταρική Γήρανση**

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια υφίστανται ακραίες φυσικές και χημικές καταπονήσεις σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους στην κυκλοφορία, επιτελώντας το ρόλο τους στην ανταλλαγή αερίων. Η καταπόνηση αυτή μπορεί να αφορά στην παραμόρφωση της μεμβράνης και στο μηχανικό στρες, καθώς τα ερυθροκύτταρα διέρχονται μέσω των τριχοειδών αγγείων, αλλά ακόμα και σε χημική βλάβη προερχόμενη από οξειδωτικά είδη και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου [33, 34]. Η συσσώρευση των βλαβών δημιουργεί την επιτακτική ανάγκη της αποτελεσματικής και προσεκτικής απομάκρυνσης των γηρασμένων ερυθροκυττάρων προκειμένου να διατηρηθεί η σωστή λειτουργία του κυκλοφορικού συστήματος [33]. Ακόμα, τα ερυθροκύτταρα μπορεί να απομακρυνθούν από την κυκλοφορία πριν ολοκληρώσουν το προσδόκιμο της ζωής τους, εξαιτίας βλάβης που υπέστησαν από ποικίλους παράγοντες [35]. Τα γηρασμένα ερυθρά παρουσιάζουν έναν συγκεκριμένο “φαινότυπο” που περιλαμβάνει αυξημένη εξωτερίκευση της PS, μείωση των σιαλικών οξέων, της χοληστερόλης και των φωσφολιπιδίων, μεταβολές της ενζυματικής δραστηριότητας καθώς και την χαρακτηριστική αλλαγή του λόγου των πρωτεϊνών 4.1a/4.1b [36] [33]. Φαινόμενο της γήρανσης αποτελεί επίσης η κυστιδιοποίηση και η συρρίκνωση του ερυθρού αιμοσφαιρίου [37]. Παρατηρείται, ακόμα, απώλεια αιμοσφαιρίνης, μεμβρανικού υλικού καθώς και παρεμπόδιση της μεταφοράς των ιόντων [37, 38]. Τα γεγονότα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη πυκνότητα των γηρασμένων ερυθροκυττάρων [36]. Η εκκαθάριση των εκφυλισμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων λαμβάνει χώρα στον σπλήνα. Σπληνικά μακροφάγα προερχόμενα από τον ερυθρό πολφό αναγνωρίζουν και προωθούν τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα στους σπληνικούς κόλπους όπου και θα φαγοκυτταρωθούν [34].

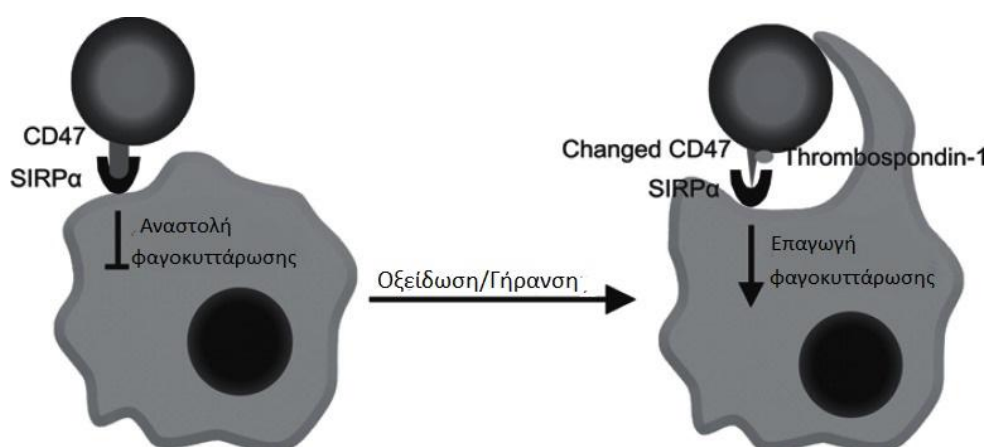
#### **3.1 Μονοπάτι σχετιζόμενο με τη ζώνη 3**

Το μονοπάτι σχετιζόμενο με τη ζώνη 3 είναι ένα από τα πιο σημαντικά μονοπάτια που αφορούν στη γήρανση των ερυθροκυττάρων καθώς οδηγεί στο σχηματισμό του νέο-αντιγόνου της γήρανσης, που αποτελεί πολύ ισχυρό σήμα αυτής [36]. Υπάρχουν ποικίλες προτάσεις ως προς τις μεταβολές που υφίσταται η ζώνη 3 και οδηγείται σε οψωνισμό. Η αποδόμηση ή πρωτεόλυση της ζώνης 3 που οδηγεί στην αποκάλυψη

αντιγονικών επιτόπων της πρωτεΐνης που μέχρι τότε δεν ήταν προσβάσιμοι [39] [40]. Η οξειδωση και η μετουσίωση της αιμοσφαιρίνης οδηγεί στη δημιουργία των οξειδωμένων αιμοχρωμάτων που συγκεντρώνονται στη μεμβράνη και προσδένονται στη ζώνη 3, σχηματίζοντας έτσι συσσωματώματα ζώνης 3 και κατ' επέκταση έκφραση νέων αντιγόνων [41-43]. Σε κάθε περίπτωση επάγονται και δεσμεύονται στη ζώνη 3 αυτόλογα IgGs και πιθανά το κλάσμα C3 του συμπληρώματος, πυροδοτώντας έτσι την ερυθροφαγοκυττάρωση [36].

### 3.2 Μονοπάτι σχετιζόμενο με το CD47

Η CD47 αποτελεί “δείκτη εαυτού” για τα ερυθροκύτταρα και έχει αντιφαγοκυτταρική δράση (“don't eat me” signal) διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην ομοίωση του ερυθροκυττάρου [19]. Καθώς όμως το ερυθροκύτταρο γερνάει η παρουσία του στη μεμβράνη ελαττώνεται [21] ή υφίσταται μεταβολές στη δομή [20], με αποτέλεσμα να μετατρέπεται σε προφαγοκυτταρικό σήμα (“eat me” signal) [19]. Συγκεκριμένα, η CD47 αναστέλλει τη φαγοκυττάρωση μέσω ανασταλτικής σηματοδότησης που προκαλείται από τη σύνδεση με τον υποδοχέα SIRPα των μακροφάγων. Ωστόσο, κατά τη γήρανση μεταβάλλεται η διαμόρφωση της CD47 με αποτέλεσμα να μπορεί να συνδέεται σε αυτή η θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1), κι έτσι δημιουργείται μια νέα θέση σύνδεσης με τον υποδοχέα SIRPα. Με τη δημιουργία της εναλλακτικής αυτής θέσης προάγεται η φαγοκυττάρωση του ερυθρού αιμοσφαιρίου [19], όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 11**.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της CD47 ως επαγωγέας της ερυθροκυτταρικής φαγοκυττάρωσης (Ανατύπωση από Burger et. al, 2012)

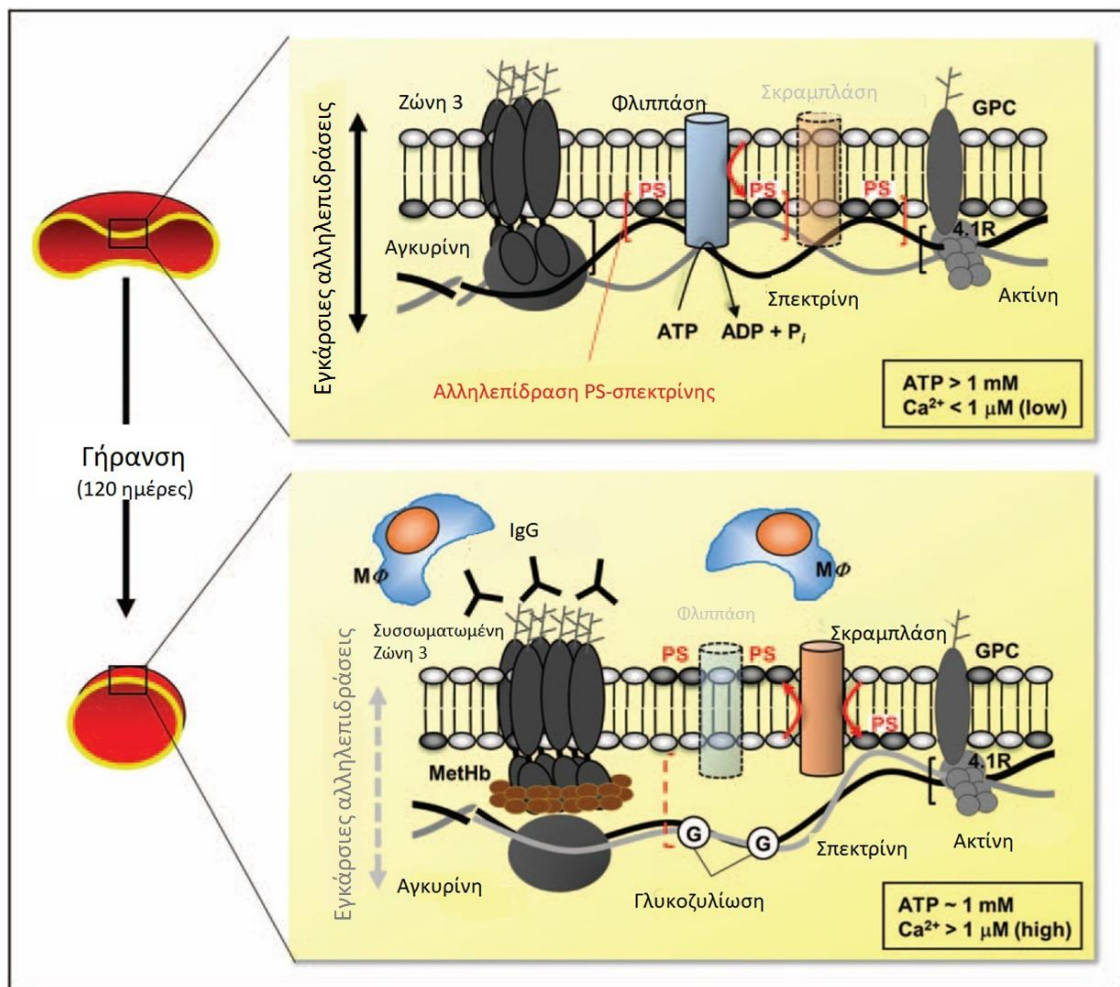
### 3.3 Μικροκυστιδιοποίηση

Ως μικροκυστίδια (microvesicles, MVs) ορίζονται τα άθικτα, υπομικροσκοπικά κυστίδια που είναι πλούσια σε φωσφολιπίδια και απελευθερώνονται από τη μεμβράνη ποικίλων κυττάρων κατά την ενεργοποίηση τους ή/και κατά την απόπτωση. Στη μικροκυστιδιοποίηση οδηγούν ερεθίσματα που μπορεί να είναι φυσικά, όπως η διατμητική τάση αλλά και προερχόμενα από ενδοτοξίνες ή κυτταροκίνες. Παρατηρείται μια αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, απώλεια της ασυμμετρίας και φυσαλιδοποίηση της μεμβράνης που οδηγεί στον σχηματισμό και την απελευθέρωση των MVs. Εξαιτίας της απώλειας της μεμβρανικής ασυμμετρίας τα μικροκυστίδια αποτελούνται από μια διπλοστιβάδα πλούσια φωσφολιπιδίων που φέρει PS στο εξωτερικό στρώμα [44]. Ακόμα, περιέχουν συσσωματώματα ζώνης 3 δεσμευμένα με αντισώματα IgG [45, 46]. Ο σχηματισμός των μικροκυστιδίων είναι μέρος της ωρίμασης των ερυθροκυττάρων και έχει ως στόχο την απομάκρυνση κατεστραμμένων συστατικών τους. Τελικά σημαίνονται ως γηρασμένα για την απομάκρυνση τους από την κυκλοφορία [36, 45]. Ωστόσο, με την αυξημένη κυστιδιοποίηση χάνονται σημαντικά ποσοστά αιμοσφαιρίνης και μεμβρανικού υλικού [45] γεγονός που περιορίζει τη λειτουργία τους καθώς οδηγεί σε αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας και ταυτόχρονη μείωση της παραμορφωσιμότητάς και της ελαστικότητάς τους [36].

### 3.4 Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης

Στα υγιή ερυθρά αιμοσφαίρια η PS βρίσκεται στο εσωτερικό στρώμα της λιπιδικής διπλοστιβάδας, καθώς τα ερυθροκύτταρα γερνάνε, χάνουν την ασυμμετρία γεγονός που οδηγεί στην έκθεση της PS στο εξωτερικό φύλλο της μεμβράνης. Αποτέλεσμα αυτού είναι τα μακροφάγα να την αναγνωρίζουν, αφού λειτουργεί ως σήμα που προάγει τη φαγοκυττάρωση (“eat me” signal) [19]. Η εξωτερίκευση αυτή έχει ερμηνευτεί με ποικίλους μηχανισμούς. Η PS αλληλεπιδρά με τη σπεκτρίνη που υπάρχει στον κυτταροσκελετό [47], εξαιτίας όμως της διαταραχής των συνδέσεων μεμβράνης-σκελετού κατά τη γήρανση και τη δημιουργία του νέου αντιγόνου γήρανσης της ζώνης 3, παρατηρείται και διαταραχή της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας [48]. Ακόμα, κατά τη γήρανση, η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$  ενεργοποιεί τη σκραμπλάση και οδηγεί στην εξωτερίκευση της PS [47]. Η ενεργή κασπάση 3 και 8 που έχει εντοπιστεί στα γηρασμένα

ερυθροκύτταρα επίσης οδηγεί σε εξωτερίκευση της PS [36]. Η πλειονότητα των κυστιδίων προερχόμενων από ερυθροκύτταρα εκφράζουν PS [45]. Ακόμα, ορισμένες αιματολογικές ασθένειες ή *in vitro* στρεσογόνες για το ανθρώπινο ερυθροκύτταρο δοκιμασίες οδηγούν στην έκθεση PS. Απο τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το γεγονός πως η PS όταν εξωτερικεύεται έχει εξαιρετικά θρομβογόνο δράση γίνεται κατανοητό πως συμμετέχει στη γήρανση και την απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων υπό συγκεκριμένες συνθήκες, όχι όμως ως κύριος μηχανισμός [36].



Εικόνα 12: Μεταβολές που αφορούν στη δομή της μεμβράνης, στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου και στα αποθέματα ενέργειας που οδηγούν σε εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης κατά τη γήρανση (Ανατύπωση από Arashiki, 2017)

## 4. Ερυθρόπτωση

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, υπό φυσιολογικές συνθήκες έχουν διάρκεια ζωής 120 ημέρες οπότε και απομακρύνονται από την κυκλοφορία σε μια προσπάθεια διασφάλισης της ομοιόστασης των ιστών, αφού η απομάκρυνση των γηρασμένων ή κατεστραμμένων ερυθροκυττάρων βρίσκεται σε ισορροπία με την ερυθροποίηση [49]. Ωστόσο, σε ορισμένες συνθήκες, όπως οξειδωτικό στρες, ωσμωτικό σοκ, μηχανικές πιέσεις, μείωση ενεργειακών αποθεμάτων ερυθρών κυττάρων μπορεί να οδηγηθούν σε πρόωρη απομάκρυνση τους από την κυκλοφορία. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μιας μορφής ειδικού κυτταρικού θανάτου, γνωστή ως ερυθρόπτωση. Τα ερυθροκύτταρα που υφίστανται ερυθρόπτωση παρουσιάζουν χαρακτηριστικά όπως η συρρίκνωση του κυττάρου, η φυσαλιδοποίηση της μεμβράνης και η έκθεση της PS [50]. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που πυροδοτούν την ερυθρόπτωση (**Εικόνα 13**).

### 4.1 Ερυθρόπτωση επαγόμενη από ιόντα $Ca^{2+}$

Βασική αιτία της ερυθρόπτωσης αποτελεί η αύξηση του κυτοσολικού  $Ca^{2+}$ . Η ενεργοποίηση των μη επιλεκτικών καναλιών κατιόντων από την προσταγλανδίνη  $E_2$  ( $PGE_2$ ) (η οποία παράγεται σε καταστάσεις υπερωσμωτικού σοκ) οδηγεί σε είσοδο στο ερυθροκύτταρο ιόντων  $Ca^{2+}$ . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της φωσfolιπιδικής ασυμμετρίας της μεμβράνης και την εξωτερίκευση της PS. Εξαιτίας της ενδοκυττάριας αύξησης του  $Ca^{2+}$  ενεργοποιούνται τα ασβεστιοεξαρτώμενα κανάλια  $K^+$ , δηλαδή τα κανάλια Gardos. Αυτό συνεπάγεται την έξοδο κατιόντων  $K^+$  και συνεπώς την υπερπόλωση της μεμβράνης αλλά και την απομάκρυνση χλωριούχου καλίου (KCl) από το ερυθροκύτταρο με επακόλουθη απομάκρυνση νερού και άρα συρρίκνωση του ερυθροκυττάρου [49, 51]. Ακόμα, η αύξηση των ιόντων  $Ca^{2+}$  ενεργοποιεί την ασβεστιοεξαρτώμενη πρωτεάση καλπαΐνη με αποτέλεσμα την φυσαλιδοποίηση της μεμβράνης [52].

### 4.2 Ερυθρόπτωση επαγόμενη από κεραμίδιο

Η ερυθρόπτωση πέρα από το  $Ca^{2+}$  μπορεί να επαχθεί και από το κεραμίδιο. Το κεραμίδιο παράγεται από τη σφιγγομυελίνη της κυτταρικής μεμβράνης μέσω μιας σφιγγομυελινάσης, η οποία ενεργοποιείται από τον PAF (platelet activating factor,



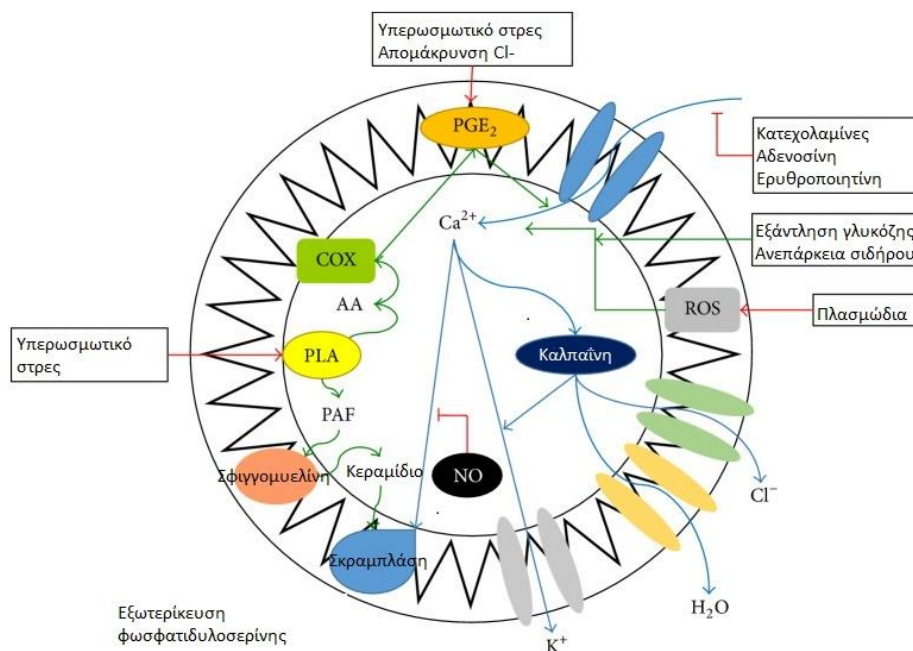
παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων). Ο PAF σχηματίζεται από το ένζυμο φωσφολιπάση A<sub>2</sub> (PLA) και απελευθερώνεται από τα ερυθροκύτταρα λόγω της συρρίκνωσης τους [51]. Το κεραμίδιο τροποποιεί την αλληλεπίδραση της μεμβράνης με τον κυτταροσκελετό και αυξάνει την ευθραυστότητα της μεμβράνης [53]. Αυτό γίνεται καθώς ενεργοποιεί μια σκραμπλάση, και έχει ως τελικό αποτέλεσμα την έκθεση PS. Η εξωτερικευμένη PS αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς των μακροφάγων και το ερυθροκύτταρο τελικά φαγοκυτταρώνεται [50].

#### **4.3 Παραδείγματα επαγωγών της ερυθρόπτωσης**

Επαγωγή της ερυθρόπτωσης μπορούν ακόμα να προκαλέσουν ποικίλες ουσίες και ερεθίσματα. Συγκεκριμένα, ξενοβιοτικές ουσίες, ενδογενείς ή εξωγενείς ενεργοποιούν τη διαδικασία: α) μέσω εισόδου ιόντων Ca<sup>2+</sup> (αντι-A IgG αντισώματα), β) μέσω σχηματισμού κεραμιδίου (βιταμίνη K) ή γ) μειώνοντας τα αποθέματα ενέργειας (γλυκοφορίνη C). Το αρσενικό (As) μπορεί να προκαλέσει ερυθρόπτωση και με τους τρεις τρόπους. Άλλες ενδεικτικές ουσίες αποτελούν το κάδμιο, το α-λιποϊκό οξύ, η αμφοτερικίνη B, ο PAF, το λίθιο. Τέλος, καταστάσεις όπως το οξειδωτικό στρες, η γήρανση, η υπερωσμωτικότητα και η αυξημένη θερμοκρασία ενεργοποιούν τη διαδικασία της ερυθρόπτωσης [54].

#### **4.4 Παραδείγματα αναστολέων της ερυθρόπτωσης**

Αντίστοιχα, υπάρχουν ουσίες που μπορούν να αναστείλουν την ερυθρόπτωση με τους παραπάνω τρόπους. Συγκεκριμένα, οι κατεχολαμίνες εμποδίζουν την είσοδο ιόντων Ca<sup>2+</sup>, το νιτρικό οξύ μειώνει τα αποθέματα ενέργειας και η ουρία αναστέλλει το σχηματισμό του κεραμιδίου αλλά και περιορίζει τα αποθέματα ενέργειας. Η ερυθροποιητίνη, η καφεΐνη, η θυμόλη, η αδενosίνη αποτελούν ακόμη κάποια παραδείγματα ουσιών που δρουν ως ανασταλτές της ερυθρόπτωσης [54].



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της ερυθρόπτωσης (Ανατύπωση από Repsold and Joubert, 2018).

## 5. Αποθήκευση και Αποθηκευτική Βλάβη Ερυθροκυττάρων

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια συνιστούν, σε παγκόσμιο επίπεδο, το παράγωγο του αίματος που χορηγείται συχνότερα για μετάγγιση. Ο παραπάνω λόγος αλλά και συνθήκες όπως τα μειωμένα αποθέματα, οι σπάνιες ομάδες αίματος και οι έκτακτες ανάγκες που απαιτούν μεγάλες ποσότητες αίματος, καθιστούν τη βέλτιστη συλλογή και αποθήκευση τους εξαιρετικής σημασίας.

### 5.1 Συνθήκες αποθήκευσης

Για την παραγωγή των μονάδων συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων, το ολικό αίμα φυγοκεντρείται για την απομάκρυνση του πλάσματος και συνήθως υφίσταται και λευκαφαίρεση. Στη συνέχεια, βάσει του συνήθους πρωτοκόλλου, στα συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια προστίθεται συντηρητικό και προσθετικό διάλυμα προκειμένου να διασφαλιστεί η βέλτιστη και μέγιστη *ex vivo* επιβίωση τους [55]. Το συντηρητικό διάλυμα CPD (citrate-phosphate-dextrose) περιέχει κιτρικά και φωσφορικά άλατα και δεξτρόζη ενώ το προσθετικό διάλυμα SAGM (saline-adenine-glucose-mannitol) περιέχει αλατούχο διάλυμα, αδενίνη, γλυκόζη και μαννιτόλη. Τα ερυθροκύτταρα σε CPD/ SAGM αποθηκεύονται έως 42 ημέρες. Ακόμα, υπάρχει και το συντηρητικό διάλυμα CPDA (citrate-phosphate-dextrose-adenine) που περιέχει κιτρικά και φωσφορικά άλατα, δεξτρόζη και αδενίνη και σε

αυτό τα ερυθροκύτταρα αποθηκεύονται έως 35 ημέρες. Και στις δύο περιπτώσεις, τα ερυθρά αιμοσφαίρια αποθηκεύονται στους 1–6 °C [35, 55].

Τα κιτρικά άλατα έχουν αντιπηκτική δράση η οποία οφείλεται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν τα ελεύθερα ιόντα ασβεστίου, καθιστώντας τα μη διαθέσιμα στους ασβεστιοεξαρτώμενους παράγοντες πήξης (II, VII, IX και X) [56]. Τα φωσφορικά άλατα όπως και η αδενίνη μειώνονται σημαντικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των ερυθροκυττάρων, οπότε η προσθήκη τους εξασφαλίζει τη σύνθεση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) [57]. Οι υδατάνθρακες γλυκόζη και δεξτρόζη, αποτελούν θρεπτικά συστατικά των ερυθροκυττάρων [58]. Το αλατούχο διάλυμα συντελεί στη ρύθμιση του pH, που παρουσιάζει μεταβολές κατά τη διάρκεια της αποθηκευτικής περιόδου εξαιτίας της αδυναμίας απομάκρυνσης των προϊόντων του ερυθροκυτταρικού μεταβολισμού [59]. Η μαννιτόλη είναι σάκχαρο που σταθεροποιεί την ερυθροκυτταρική μεμβράνη και έχει αντιοξειδωτική δράση [58].

Μια εναλλακτική μέθοδος αποθήκευσης των συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η φύλαξη τους σε βαθιά κατάψυξη (-65°C έως -196°C) με τη χρήση γλυκερόλης ως κρυοπροστατευτικό. Η γλυκεροποίηση των μονάδων δύναται να γίνει με δύο μεθόδους. Η πρώτη μέθοδος περιλαμβάνει υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, αργή ψύξη και αποθήκευση σε θερμοκρασίες -60°C έως -80°C, ενώ η δεύτερη χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, ταχεία ψύξη και αποθήκευση σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των -140°C. Ανεξάρτητα όμως από τη μέθοδο γλυκεροποίησης, οι μονάδες των συμπυκνωμένων ερυθρών εντός επτά ημερών από τη συλλογή υφίστανται μια σειρά βημάτων που περιλαμβάνουν γλυκεροποίηση/ψύξη, αποθήκευση και απόψυξη/απογλυκεροποίηση [60]. Αντίστοιχο πρωτόκολλο έχει εφαρμοστεί και σε μονάδες συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων αποθηκευμένων στις συνήθεις συνθήκες για 42 ημέρες μετά από αναζωογόνηση με εγκεκριμένο διάλυμα [61].

## 5.2 Αποθηκευτική βλάβη

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια επιτελούν τις λειτουργίες τους μέχρι να συσσωρεύσουν βλάβες και να απομακρυνθούν από την κυκλοφορία μέσω του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Αυτό όμως συμβαίνει στο φυσικό τους περιβάλλον, δηλαδή τους 37°C, παρουσία πλάσματος και απουσία αντιπηκτικών. Κατά την υποθερμική αποθήκευση τους σε τράπεζες αίματος, ύστερα από πλασμαφαίρεση και λευκαφαίρεση οι μηχανισμοί αυτοί παύουν να υφίστανται με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ποικίλες βλάβες [62, 63]. Το σύνολο των μεταβολικών, μηχανικών και μεμβρανικών μεταβολών που σημειώνονται κατά την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων ονομάζονται αποθηκευτικές βλάβες και επηρεάζουν την ασφάλεια και την αποδοτικότητα των μεταγγιζόμενων ερυθρών αιμοσφαιρίων [58].

### 5.2.1 Μεταβολικές Αλλαγές

Η γλυκόλυση αποτελεί τη μοναδική πηγή ενέργειας για τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Κατά τη διαδικασία αυτή, διασπούν τη γλυκόζη για την σύνθεση ATP και παράγουν γαλακτικό οξύ και ιόντα υδρογόνου. Σημαντικό ένζυμο για την διαδικασία αποτελεί η φωσφοφρουκτοκινάση (PFK) [58]. Όσο προχωρά ο χρόνος αποθήκευσης η συσσώρευση των ιόντων υδρογόνου και η επακόλουθη πτώση του pH έχουν ως αποτέλεσμα την προοδευτική αναστολή της PFK και της γλυκόλυσης και συνεπώς την αδυναμία παραγωγής επαρκούς ATP για την κάλυψη των κυτταρικών μεταβολικών απαιτήσεων. Η μείωση της πηγής ενέργειας επηρεάζει τη δραστηριότητα της μεμβρανικής  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPάσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, τη σταθερότητα της μεμβράνης, τη μεταφορά γλυκόζης, τους μηχανισμούς άμυνας από το οξειδωτικό στρες και την κατανομή των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης [64]. Εξαιτίας αυτής της μείωσης επηρεάζονται επίσης διάφορες ενζυμικές λειτουργίες και αντλίες ιόντων, όπως οι αντλίες  $\text{Ca}^{2+}$ , με αποτέλεσμα την εισροή  $\text{Ca}^{2+}$  [62]. Τα επίπεδα του ATP επανέρχονται άμεσα μετά τη μετάγγιση, γεγονός που αντιστρέφει και τις μορφολογικές αλλαγές που προκλήθηκαν στα ερυθροκύτταρα εξαιτίας των χαμηλών του επιπέδων [65].

Η χαμηλή θερμοκρασία απενεργοποιεί επίσης την κύρια αντλία  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPάση. Ως αποτέλεσμα, το κάλιο, το οποίο διαρρέει αργά από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, δεν

επιστρέφεται και η συγκέντρωση του εξωκυττάριου καλίου στο αιωρούμενο υγρό της μεταγγιζόμενης μονάδας αυξάνεται με σταθερό ρυθμό [58].

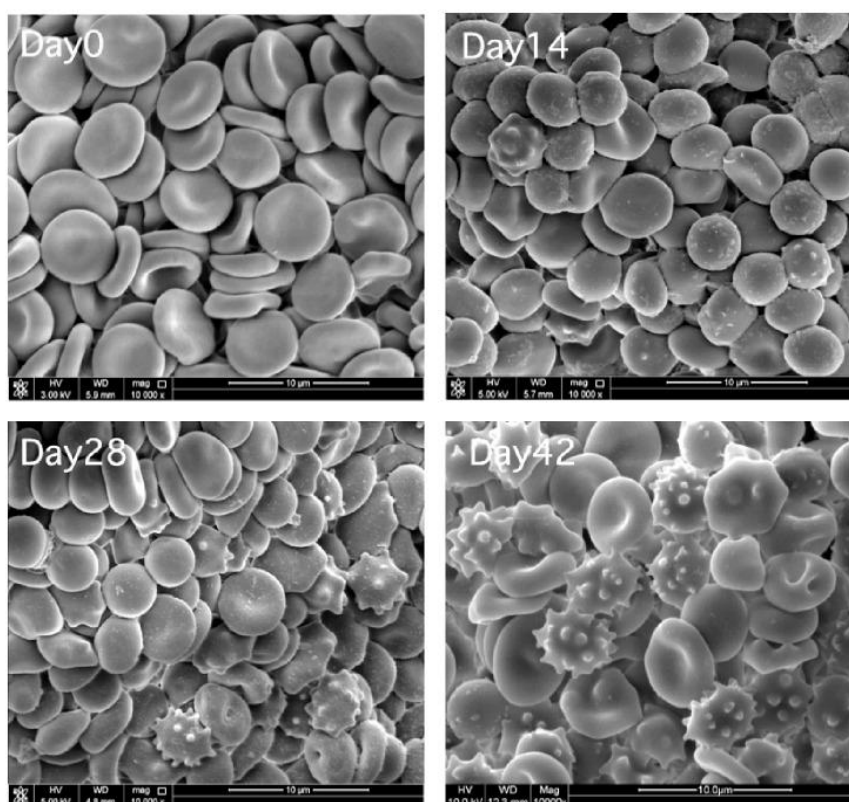
Η μείωση των επιπέδων του 2,3-DPG είναι σαφέστατη, αφού εντός μιας εβδομάδας έχει ήδη καταναλωθεί πλήρως. Το γεγονός αυτό, που οφείλεται στην πτώση του pH [58], μεταφράζεται σε αυξημένη συγγένεια της αιμοσφαιρίνης για το οξυγόνο και, κατά συνέπεια, σε μειωμένη ικανότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων να απελευθερώνουν οξυγόνο ανάλογα με τις μεταβολικές ανάγκες του εκάστοτε ιστού. Η μείωση των επιπέδων του 2,3-DPG αποτελεί επίσης αναστρέψιμο γεγονός αφού η επιστροφή στα απολύτως φυσιολογικά επίπεδα μπορεί να επιτευχθεί εντός τριών ημερών από τη μετάγγιση [55].

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) παράγεται από το ενδοθήλιο και αποτελεί αγγειοδιασταλτικό σήμα. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια παίζουν άμεσο ρόλο στη ρύθμιση της ροής τους στα τριχοειδή αγγεία μέσω της δέσμευσης του NO από την αιμοσφαιρίνη που περιέχουν. Η απορρύθμιση της ροής του αίματος εξαιτίας της διαταραχής της διαμεσολαβούμενης από το NO αγγειορύθμισης είναι ακόμη μια σημαντική επίδραση της μετάγγισης αποθηκευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Συγκεκριμένα, η εξωκυττάρια ελεύθερη αίμη και τα μικροκυτίδια δεσμεύουν ταχύτερα το NO οδηγώντας σε ανεπαρκή βιοδιαθεσιμότητα του, με αποτέλεσμα τη διαταραχή των σημάτων για αύξηση της αιματικής ροής και την υψηλότερη παροχή οξυγόνου στους υποξικούς ιστούς [62]. Οι παραπάνω μεταβολές δεν είναι αναστρέψιμες μετά από τη μετάγγιση γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς των μεταγγιζόμενων ατόμων [64].

### 5.2.2 Μηχανικές αλλαγές

Καθ' όλη τη διάρκεια της παρατεταμένης αποθήκευσης τους, τα ερυθροκύτταρα υφίστανται προοδευτική αλλαγή σχήματος από έναν εύκολα παραμορφώσιμο αμφίκυκλο δίσκο, σε ελάχιστα παραμορφώσιμα εχινόκυτταρα και τελικά σε μη παραμορφώσιμα σφαιροεχινόκυτταρα (**Εικόνα 14**). Παρόλο που αρχικά οι αλλαγές αυτές είναι αναστρέψιμες, μόλις το πρώιμο στάδιο των σφαιροεχινόκυττάρων ξεπεραστεί, η απώλεια της παραμορφωσιμότητας γίνεται μόνιμη καθώς τα ερυθροκύτταρα χάνουν μεμβράνη μέσω της εκβλάστησης των μικροκυστιδίων από τις άκρες των εχινόκυτταρικών ακίδων, όπως θα αναφερθεί και παρακάτω. Αυτές οι

αλλαγές στο σχήμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων οδηγούν σε μειωμένη τριχοειδική αιμάτωση, γεγονός που υπονομεύει την οξυγόνωση των ιστών [64].



Εικόνα 14: Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης ερυθροκυττάρων αποθηκευμένων σε ασκούς με CPDA/SAGM, μεγέθυνση 10000x, που απεικονίζει τις μεταβολές της μορφολογίας των ερυθροκυττάρων τις ημέρες 0, 14, 28 και 42. (Ανατύπωση από Mustafa et. al, 2016)

### 5.2.3 Μεμβρανικές αλλαγές

Η αποθήκευση για μεγάλο χρονικό διάστημα επιφέρει κυτταρικό στρες γεγονός που αντανακλά σε ποικίλες πρωτεϊνικές και λιπιδικές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, σημειώνεται υπεροξειδωση των λιπιδίων, μείωση της έκφρασης σημαντικών αντιγονικών δεικτών όπως ο CD47, οξείδωση της αιμοσφαιρίνης και σύνδεση της με τη μεμβράνη, που οδηγούν σε μεταβολή του σχήματος και των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων των ερυθροκυττάρων [66]. Ακόμα, παρατηρείται εξωτερικευση PS, το ποσοστό της οποίας φαίνεται να σχετίζεται με την αιμόλυση και τη συγκέντρωση μικροκυστιδίων στις μονάδες συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων [67].

Η κυστιδιοποίηση, αποτελεί μηχανισμό απομάκρυνσης κατεστραμμένων συστατικών όπως οξειδωμένα λιπίδια, αιμοσφαιρίνη, πρωτεΐνες που έχουν υποστεί βλάβη αλλά και εξωτερικευμένη PS. Τα εκτεθειμένα, αρνητικά φορτισμένα λιπίδια

σε αυτά τα κυστίδια μπορούν να τα καταστήσουν προφλεγμονώδη και προθρομβωτικά [58]. Επιπρόσθετα, η αυξημένη παραγωγή κυστιδίων προκαλεί μη αναστρέψιμες αλλαγές στο σχήμα και τη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων με αποτέλεσμα τα προκύπτοντα πυκνά, ελάχιστα παραμορφώσιμα σφαιροκύτταρα να απομακρύνονται ταχέως από την κυκλοφορία μετά τη μετάγγιση [68].

Τέλος, η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών εξαιτίας του οξειδωτικού στρες που υφίστανται κατά την αποθήκευση αποτελεί βασική αιτία μεταβολής της μεμβράνης. Έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της πρωτεϊνικής λειτουργίας, τη θραύση ή τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών και κατά συνέπεια μπορεί να επηρεάσει την αρχιτεκτονική και τη λειτουργία της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων οδηγώντας σε αποσταθεροποίηση του κυτταροσκελετού και σε μειωμένη επιβίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων [69]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η συσσωμάτωση της ζώνης 3 με αποτέλεσμα να αναγνωρίζεται από τις ανοσοσφαιρίνες G (IgG) [70].

### **5.3 Αποθηκευτική βλάβη εξαιτίας της κρυοσυντήρησης**

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, οι μονάδες συμπυκνωμένων ερυθρών που πρόκειται να αποθηκευτούν σε βαθιά κατάψυξη υπόκεινται στις απαραίτητες διαδικασίες εντός μιας εβδομάδας από τη συλλογή, οπότε και η αποθηκευτική βλάβη είναι περιορισμένη. Αυτό συνεπάγεται πως οι κλασικές βιοχημικές μεταβολές και η τάση για συσσωμάτωση δεν είναι τόσο εμφανείς στα κρυοσυντηρημένα ερυθροκύτταρα σε σύγκριση με τα αποθηκευμένα στις συνήθεις συνθήκες, ενώ σημειώνεται ίδια κυτταρική παραμορφωσιμότητα και στις δύο μεθόδους. Επιπλέον, η κρυοσυντήρηση δεν προκαλεί την εμφάνιση δεικτών στρες ή απομάκρυνσης όπως η ενεργοποίηση των κασπασών ή η έκφραση του αντιγόνου CD47, ούτε προάγει τη μικροκυστιδιοποίηση [60].

Παρόλα αυτά, η κρυοσυντήρηση επηρεάζει την ομοιόσταση των ιόντων και την ακεραιότητα των ερυθροκυττάρων. Τα στάδια της απογλυκεροποίησης και της πλύσης οδηγούν σε μειωμένο ενδοκυτταρικό pH και αυξημένη ευαισθησία στην οσμωτική αιμόλυση. Ενώ αρχικά οι αποθηκευτικές αλλοιώσεις αναστέλλονται, η απόψυξη των μονάδων συνεπάγεται την ενεργοποίηση και επιτάχυνσή τους, γεγονός που περιορίζει τη διάρκεια ζωής των αποψυγμένων ερυθροκυττάρων. Οι

τραυματισμοί και οι βλάβες των ερυθρών αιμοσφαιρίων ύστερα από την απογλυκεροποίηση τους ελαττώνουν την ικανότητά τους να αντέχουν το στρες αποθήκευσης. Τέλος, η αυξημένη εξωκυττάρια αιμοσφαιρίνη, που παρατηρείται αμέσως μετά την απόψυξη, και ουσίες όπως οι κυτταροκίνες και το κάλιο που συνδέονται με παρενέργειες της μετάγγισης, απομακρύνονται από τα επόμενα στάδια πλύσης [60].



## **B. Υλικά και Μέθοδοι**

### **1. Σκοπός της εργασίας**

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η αξιολόγηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών μονάδων κατεψυγμένων συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων (ΣΕ), μετά την αναζωογόνηση τους, που αποθηκεύτηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για διάστημα 4 έως 6 μηνών παρουσία γλυκερόλης. Μετά την επακόλουθη απόψυξη, απογλυκεροποίηση και αποθήκευση στους  $4^{\circ}\text{C}$  για διάστημα 7 ημερών έγινε σύγκριση στην αρχή και στο τέλος της υποθερμικής αποθήκευσης τους, με μονάδες ΣΕ αποθηκευμένων σε CPD-SAGM, που αποτελεί τον συνήθη τρόπο αποθήκευσης [71]. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε γενική εξέταση αίματος και μετρήθηκαν η εξωτερίκευση της PS και τα επίπεδα του ενδοκυττάρου  $\text{Ca}^{2+}$  σε συνολικά δώδεκα (12) μονάδες ΣΕ, έξι (6) μονάδες κατεψυγμένων ΣΕ και έξι (6) μονάδες ΣΕ αποθηκευμένων σε CPD-SAGM.

## 2. Όργανα και Αντιδραστήρια

### 2.1 Συσκευές και Όργανα

- Αιματολογικός αναλυτής, Convergys X3 NG (Convergent Technologies)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος MicroCL 17 (Thermo Fisher Scientific)
- Επωαστικός κλίβανος “Shake n Stack”, Hybaid
- Ζυγός ακριβείας (Kern ALJ)
- Κυτταρόμετρο (BD FACSCanto)
- Μηχανικός Αναδευτήρας (Vortex), Velp Scientifica
- Πιπέτες τύπου BIO RAD

### 2.2 Χημικά Αντιδραστήρια

- Annexin-V PE, ImmunoTools
- Bovine Serum Albumin (BSA), SIGMA
- CD235-FITC, Becton Dickinson
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Fluo-4 AM, Thermo Fisher Scientific
- HEPES/NaOH
- Phosphate Buffered Saline 1X (PBS), Gibco-Thermo Fisher Scientific
- Γλυκόζη
- Χλωριούχο ασβέστιο ( $\text{CaCl}_2$ )
- Χλωριούχο κάλιο (KCL)
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl)

### 2.3 Αναλώσιμα

- Eppendorfs των 1,5 mL
- FACS tubes
- Falcons ποικίλων όγκων
- Αλουμινόχαρτο
- Ρύγχη για πιπέτες
- Σύριγγες των 10 mL με βελόνες 21G

### 3. Εργαστηριακές Μέθοδοι

#### 3.1 Ανίχνευση εξωτερικευμένης PS

Η αρχή μεθόδου βασίζεται στην συμπλοκοποίηση της εξωτερικευμένης PS των αποπτωτικών ερυθροκυττάρων με την πρωτεΐνη Annexin-V, η οποία είναι συζευγμένη με το φθοριόχρωμα φικοερυθρίνη (PE). Η PE διεγείρεται στα 540-570 nm και εκπέμπει στα 578 nm.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Αραίωση των ΣΕ με διάλυμα PBS.
2. Προσθήκη σε FACS tube ποσότητα αραιωμένων ΣΕ και ρυθμιστικού διαλύματος Annexin BSA 3% για το τυφλό διάλυμα.
3. Προσθήκη σε FACS tube ποσότητα αραιωμένων ΣΕ, ρυθμιστικού διαλύματος Annexin BSA 3%, Annexin-PE και αντισώματος έναντι της γλυκοφορίνης A (CD235-FITC) για τα δείγματα.
4. Επώαση των σωληναρίων σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι για 20 λεπτά.
5. Προσθήκη απαιτούμενης ποσότητας διαλύματος ρυθμιστικού διαλύματος για τερματισμό της αντίδρασης.
6. Ανάλυση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο.

#### 3.2 Μέτρηση επιπέδων κυτοσολικών ιόντων $Ca^{2+}$

Η μέθοδος αυτή αποσκοπεί στον προσδιορισμό των επιπέδων των κυτοσολικών ιόντων  $Ca^{2+}$  μέσω της χρήσης του μορίου Fluo-4 AM. Το Fluo-4 AM είναι ένας κυτταροδιαπερατός δείκτης του  $Ca^{2+}$  που μεταβολίζεται από την ενδοκυτταρική εστεράση με αποτέλεσμα να εμφανίζεται φωτεινό πράσινο φθορίζον σήμα όταν δεσμεύει ιόντα  $Ca^{2+}$ . Το Fluo-4 AM διεγείρεται στα 494 nm και εκπέμπει στα 506 nm.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Αραίωση των ΣΕ με διάλυμα PBS σε HCT 4%.
2. Προσθήκη σε erpendorf ποσότητα αραιωμένων ΣΕ και ρυθμιστικού διαλύματος  $Ca^{2+}$ -BSA 0,1% για το τυφλό διάλυμα.
3. Προσθήκη σε erpendorf ποσότητα αραιωμένων ΣΕ, ρυθμιστικού διαλύματος  $Ca^{2+}$ -BSA 0,1% και το Fluo-4 AM για τα δείγματα.

4. Επώαση των δειγμάτων υπό ανακίνηση σε επωαστικό κλίβανο (37° C) για 50 λεπτά.
5. Προσθήκη σε FACS tube της απαιτούμενης ποσότητας του παραπάνω διαλύματος και ρυθμιστικού διαλύματος Ca<sup>2+</sup>-BSA 0,1%.
6. Ανάλυση των δειγμάτων στο κυτταρόμετρο.

### **3.3 Ρυθμιστικά διαλύματα**

#### **1. Ρυθμιστικό διάλυμα Annexin BSA 3%**

Για το ρυθμιστικό διάλυμα Annexin BSA 3% αναμείχθηκαν κατάλληλες ποσότητες των διαλυμάτων Hepes/NaOH, NaCl και CaCl<sub>2</sub>, και προστέθηκε σε αυτά η απαραίτητη ποσότητα σκόνης BSA. Το διάλυμα αναμείχθηκε σε μηχανικό αναδευτήρα, διηθήθηκε και αποθηκεύτηκε σε falcon tube.

#### **2. Ρυθμιστικό διάλυμα Ca<sup>2+</sup>-BSA 0,1%**

Για το ρυθμιστικό διάλυμα Ca<sup>2+</sup>-BSA 0,1% αναμείχθηκαν κατάλληλες ποσότητες των διαλυμάτων Hepes/NaOH, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, γλυκόζης και KCl, και προστέθηκε σε αυτά η απαραίτητη ποσότητα σκόνης BSA. Το διάλυμα αναμείχθηκε σε μηχανικό αναδευτήρα, διηθήθηκε και αποθηκεύτηκε σε falcon tube.

## Γ. Αποτελέσματα

Από την αξιολόγηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών έξι (6) μονάδων κατεψυγμένων συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων (ΣΕ) στην αρχή και στο τέλος της υποθερμικής αποθήκευσης τους, έναντι έξι (6) μονάδων ΣΕ αποθηκευμένων σε CPD-SAGM προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα αναφορικά με τη γενική εξέταση αίματος, την εξωτερίκευση της PS και τα επίπεδα του ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$ .

### 1. Αιματολογικά δεδομένα

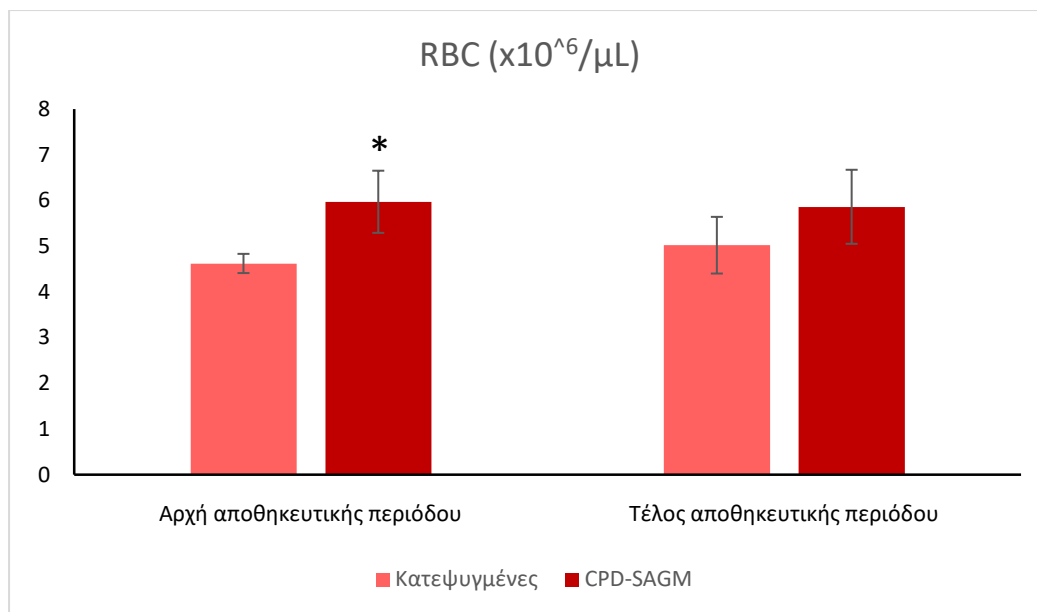
Όσον αφορά στις μετρήσεις που προέκυψαν από τη γενική εξέταση αίματος παρατίθεται ο Πίνακας 1:

**Πίνακας 1:** Ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των παραμέτρων της γενικής εξέτασης αίματος των μονάδων ΣΕ στις διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης. Με (\*) επισημαίνονται οι στατιστικά σημαντικές τιμές,  $p < 0.05$ .

		Κατεψυγμένες μονάδες		Μονάδες CPD-SAGM	
		Αρχή αποθηκευτικής περιόδου	Τέλος αποθηκευτικής περιόδου	Αρχή αποθηκευτικής περιόδου	Τέλος αποθηκευτικής περιόδου
<b>RBC</b> ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	Μέσος όρος	4,62	5,02	<b>5,97*</b>	5,86
	Τυπική Απόκλιση	0,21	0,62	0,68	0,81
<b>Hb</b> (g/dL)	Μέσος όρος	13,32	14,23	<b>17,45*</b>	17,12
	Τυπική Απόκλιση	1,10	2,37	2,02	2,77
<b>HCT (%)</b>	Μέσος όρος	42,62	43,79	<b>54,13*</b>	<b>56,71*</b>
	Τυπική Απόκλιση	3,61	4,81	6,14	9,96
<b>MCV (fL)</b>	Μέσος όρος	92,33	93,33	90,83	96,50
	Τυπική Απόκλιση	6,89	6,77	2,40	4,93
<b>MCH (pg)</b>	Μέσος όρος	28,85	28,32	29,18	29,17
	Τυπική Απόκλιση	1,88	2,27	0,90	0,98
<b>MCHC (g/dL)</b>	Μέσος όρος	31,27	30,35	<b>32,20*</b>	30,28
	Τυπική Απόκλιση	0,73	2,32	0,40	1,31
<b>RDW (%)</b>	Μέσος όρος	17,02	17,33	15,72	17,82
	Τυπική Απόκλιση	1,41	1,29	0,84	2,15

## Ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων

Μεταξύ των δύο συνθηκών αποθήκευσης βρέθηκε ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) να είναι μεγαλύτερος στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου στις μονάδες CPD-SAGM ( $5,97 \times 10^6 / \mu\text{L} \pm 0,68$ ) σε σχέση με τις κατεψυγμένες ( $4,62 \times 10^6 / \mu\text{L} \pm 0,21$ ), ( $p < 0,05$ ), ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στον αριθμό των RBC στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου ( $5,86 \times 10^6 / \mu\text{L} \pm 0,81$  έναντι  $5,02 \times 10^6 / \mu\text{L} \pm 0,62$ ) (Γράφημα 1).

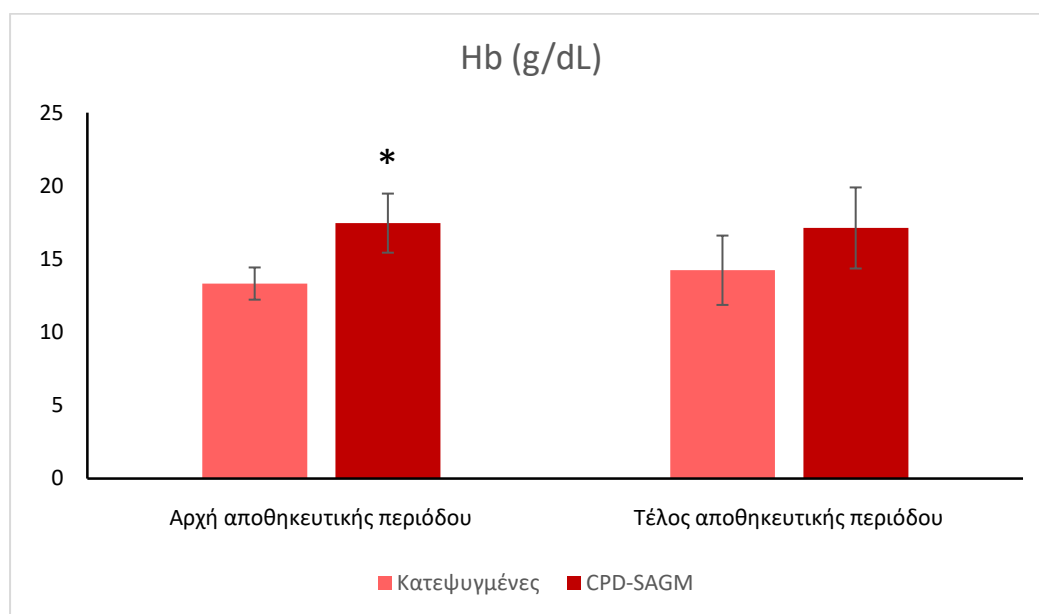


**Γράφημα 1:** Διαγραμματική απεικόνιση του αριθμού των RBC στις δύο διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, στην αρχή και στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου.

\* Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο συνθηκών αποθήκευσης ( $p < 0,05$ )

## Αιμοσφαιρίνη

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για την αιμοσφαιρίνη (Hb). Συγκεκριμένα, η τιμή της Hb σημειώθηκε μεγαλύτερη στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου στις μονάδες CPD-SAGM ( $17,45 \pm 2,02$  g/dL) σε σχέση με τις κατεψυγμένες ( $13,32 \pm 1,10$  g/dL), ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην τιμή της Hb στο τέλος της αποθήκευσης ( $17,12 \pm 2,77$  g/dL έναντι  $14,23 \pm 2,37$  g/dL) (**Γράφημα 2**).

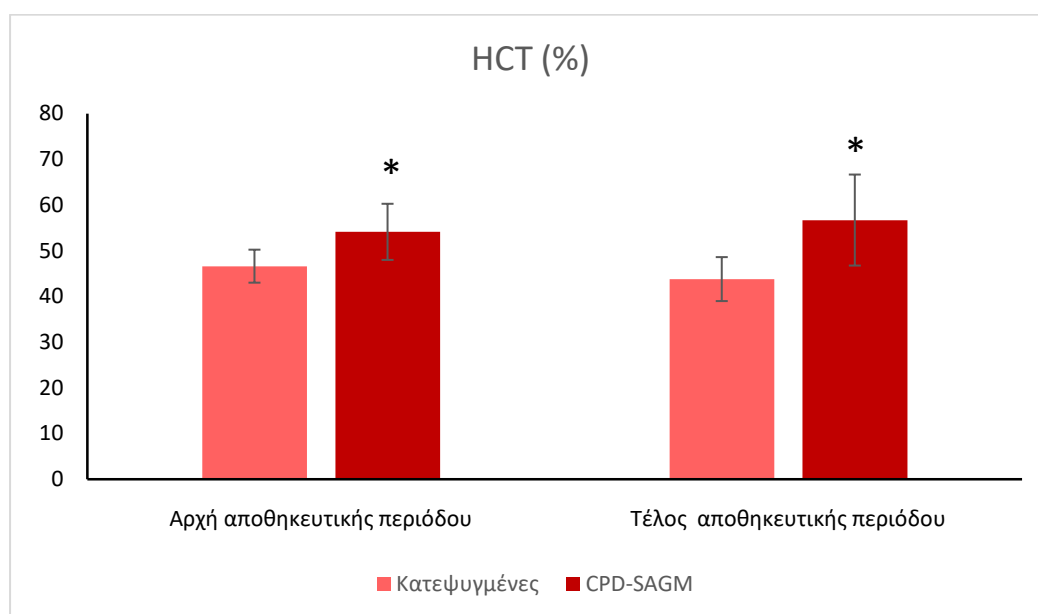


**Γράφημα 2:** Διαγραμματική απεικόνιση της τιμής της αιμοσφαιρίνης στις δύο διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, στην αρχή και στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου.

\* Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο συνθηκών αποθήκευσης ( $p < 0.05$ )

## Αιματοκρίτης

Όσον αφορά στον αιματοκρίτη (HCT) βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά και στα δύο χρονικά σημεία μελέτης (αρχή και τέλος αποθηκευτικής περιόδου). Συγκεκριμένα, στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου οι μονάδες CPD-SAGM είχαν κατά μέσο όρο HCT  $54,13 \pm 6,14\%$  ενώ οι κατεψυγμένες  $42,62 \pm 3,61\%$  και στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου  $56,71 \pm 9,96\%$  έναντι  $43,79 \pm 4,81\%$ , αντίστοιχα (Γράφημα 3).



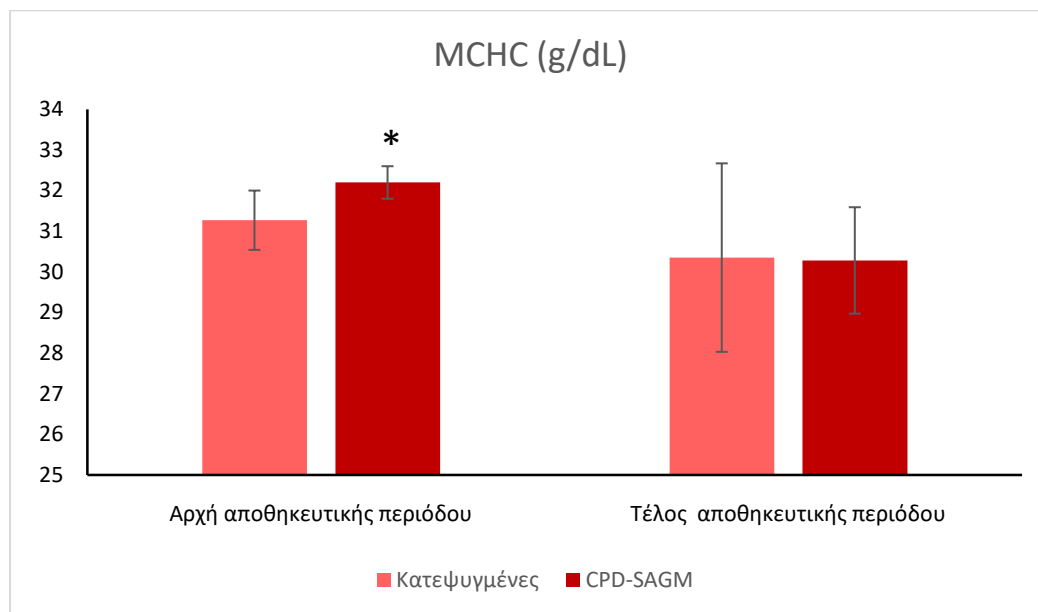
**Γράφημα 3:** Διαγραμματική απεικόνιση της τιμής του αιματοκρίτη στις δύο διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, στην αρχή και στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου.

\* Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο συνθηκών αποθήκευσης ( $p < 0.05$ )



### Μέση συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης

Τέλος, στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε για τη μέση συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης (MCHC). Ειδικότερα, η τιμή της MCHC σημειώθηκε μεγαλύτερη στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου στις μονάδες CPD-SAGM ( $32,20 \pm 0,40$  g/dL) σε σχέση με τις κατεψυγμένες ( $31,27 \pm 0,73$  g/dL), ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην τιμή της MCHC στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου ( $30,28 \pm 1,31$  g/dL έναντι  $30,35 \pm 2,32$  g/dL) (Γράφημα 4).



**Γράφημα 4:** Διαγραμματική απεικόνιση της τιμής της MCHC στις δύο διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, στην αρχή και στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου.

\* Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο συνθηκών αποθήκευσης ( $p < 0.05$ )

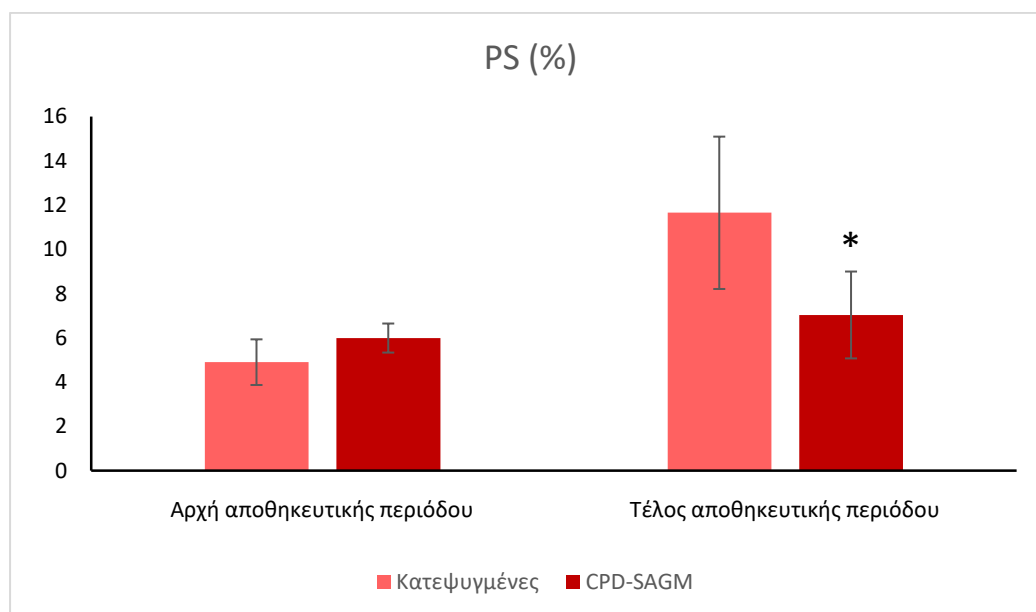
## 2. Μέτρηση της εξωτερίκευσης της PS

Στον πίνακα και στο γράφημα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων της εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης (PS).

**Πίνακας 2:** Ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων της εξωτερίκευσης PS των μονάδων ΣΕ στις διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης. Με (\*) επισημαίνονται οι στατιστικά σημαντικές τιμές,  $p < 0.05$ .

		Κατεψυγμένες μονάδες		Μονάδες CPD-SAGM	
		Αρχή αποθηκευτικής περιόδου	Τέλος αποθηκευτικής περιόδου	Αρχή αποθηκευτικής περιόδου	Τέλος αποθηκευτικής περιόδου
PS (%)	Μέσος όρος	4,90	11,65	5,99	7,03*
	Τυπική απόκλιση	1,03	3,44	0,66	1,96

Παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο συνθηκών αποθήκευσης πως η εξωτερίκευση της PS ήταν μικρότερη στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου στις μονάδες CPD-SAGM ( $7,03 \pm 1,96\%$ ) σε σχέση με τις κατεψυγμένες ( $11,65 \pm 3,44\%$ ) ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην έκθεση στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου ( $5,99 \pm 0,66\%$  έναντι  $4,90 \pm 1,03\%$ ) (Γράφημα 5).



**Γράφημα 5:** Διαγραμματική απεικόνιση της τιμής της εξωτερίκευσης της PS στις δύο διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, στην αρχή και στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου.

\* Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο συνθηκών αποθήκευσης ( $p < 0.05$ )

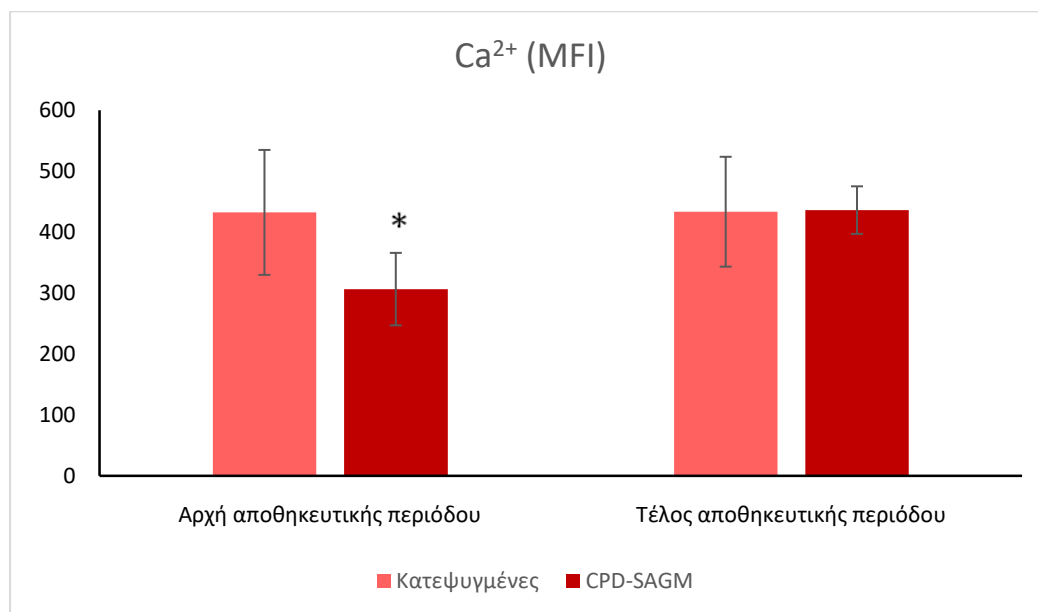
### 3. Μέτρηση επιπέδων του ενδοκυττάριου $\text{Ca}^{2+}$

Στον πίνακα και στο γράφημα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων των επιπέδων του ενδοκυττάριου  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Πίνακας 3:** Ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων των επιπέδων του ενδοκυττάριου  $\text{Ca}^{2+}$  των μονάδων ΣΕ στις διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης. Με (\*) επισημαίνονται οι στατιστικά σημαντικές τιμές,  $p < 0.05$ .

		Κατεψυγμένες μονάδες		Μονάδες CPD-SAGM	
		Αρχή αποθηκευτικής περιόδου	Τέλος αποθηκευτικής περιόδου	Αρχή αποθηκευτικής περιόδου	Τέλος αποθηκευτικής περιόδου
$\text{Ca}^{2+}$ (MFI)	Μέσος όρος	432,42	433,50	306,50*	436,17
	Τυπική απόκλιση	102,54	90,18	59,46	39,07

Αναφορικά με τα επίπεδα ενδοκυττάριου  $\text{Ca}^{2+}$  σημειώθηκε ότι ήταν χαμηλότερα στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου στις μονάδες CPD-SAGM ( $306,50 \pm 59,46$  MFI) σε σχέση με τις κατεψυγμένες ( $432,42 \pm 102,54$  MFI) χωρίς να παρατηρείται ταυτόχρονα διαφορά στα επίπεδα στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου ( $436,17 \pm 39,07$  MFI έναντι  $433,50 \pm 102,54$  MFI) (Γράφημα 6).



**Γράφημα 6:** Διαγραμματική απεικόνιση της τιμής των επιπέδων του ενδοκυττάριου  $\text{Ca}^{2+}$  στις δύο διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, στην αρχή και στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου.

\* Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο συνθηκών αποθήκευσης ( $p < 0.05$ )

# Δ. Συζήτηση- Συμπεράσματα

## 1. Συζήτηση

Η αποθήκευση των ΣΕ σε βαθιά κατάψυξη με γλυκερόλη αποσκοπεί στην εξασφάλιση επαρκών αποθεμάτων μονάδων μετάγγισης για έκτακτες ανάγκες σε περιόδους κρίσης. Όμως, η απόψυξη και η απογλυκεροποίηση καταπονεί τα ΣΕ, και παρότι αρχικά παρουσιάζουν καλή ανάκτηση και διατήρηση της ερυθροκυτταρικής φυσιολογίας, μετέπειτα κατά την αποθήκευσή τους στους 4°C, που διαρκεί από 1-2 εβδομάδες, υφίστανται επιταχυνόμενες κυτταρικές βλάβες. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθούν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των αποψυγμένων ΣΕ και η αποθηκευτική τους βλάβη συγκριτικά με ΣΕ που αποθηκεύονται σε κλασικές συνθήκες (4°C), και ειδικότερα μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν δείκτες ερυθροκυτταρικής απόσυρσης όπως η εξωτερίκευση της PS και τα επίπεδα του ενδοκυττάρου Ca<sup>2+</sup>.

Στα κέντρα αιμοδοσίας το ολικό αίμα που ύστερα από φυγοκέντρηση διαχωρίζεται στα παράγωγα του τα οποία φιλτράρονται και απομακρύνονται τα λευκά αιμοσφαίρια καθώς και τα αιμοπετάλια. Τα ΣΕ επαναδιαλυτοποιούνται σε όξινο διάλυμα πρόσθετων ουσιών σε αιματοκρίτη περίπου 60% και αποθηκεύονται υποθερμικά στους 1-6 °C για έως και 3-7 εβδομάδες. Κατά την υποθερμική αποθήκευση, οι χημικές αντιδράσεις συνεχίζονται -με μειωμένους ρυθμούς- χωρίς τους προστατευτικούς μηχανισμούς που απαντώνται στην κυκλοφορία. Έτσι, παρατηρείται σταδιακός εκφυλισμός των ερυθροκυττάρων και σημειώνονται ποικίλες μεταβολές που καλούνται συλλογικά «αποθηκευτική βλάβη» και έχουν ως αποτέλεσμα περιορισμένη διάρκεια ζωής έως και 7 εβδομάδες. Στα κρυσταλλωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια με διάρκεια αποθήκευσης άνω των 10 ετών, οι χημικές αντιδράσεις αναστέλλονται με την αποθήκευσή τους σε συνθήκες ψύχους παρουσία κρυσταλλωτικού [62]. Μετά την απόψυξη, οι βλάβες επιταχύνονται και παρουσιάζουν αντιστοιχία με αυτές των αποθηκευμένων μονάδων στις συνήθεις συνθήκες [60].

Μια από τις σημαντικότερες αποθηκευτικές βλάβες αφορά στον μεταβολισμό του ερυθροκυττάρου και συγκεκριμένα στη μείωση του ATP. Το γεγονός αυτό, μεταξύ

άλλων, επηρεάζει διάφορες ενζυμικές λειτουργίες και αντλίες ιόντων, όπως οι αντλίες  $Ca^{2+}$ , με αποτέλεσμα την εισροή  $Ca^{2+}$  [62]. Μια εξίσου σοβαρή μεταβολή που σχετίζεται με τη μεμβράνη αποτελεί η εξωτερίκευση της PS, το ποσοστό της οποίας φαίνεται να συνδέεται άμεσα με την αιμόλυση και τη συγκέντρωση μικροκυστιδίων στις μονάδες συμπυκνωμένων ΣΕ [67].

Η PS είναι φωσφολιπίδιο που στα φυσιολογικά, νεαρά ερυθροκύτταρα εντοπίζεται στο εσωτερικό της λιπιδικής διπλοστιβάδας [3]. Όταν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, εξαιτίας των ποικίλων καταπονήσεων που υφίστανται στη διάρκεια της τετράμηνης ζωής τους γεράσουν, δηλαδή συσσωρεύσουν μεγάλο αριθμό μη αναστρέψιμων βλαβών απομακρύνονται από την κυκλοφορία [33]. Ένα χαρακτηριστικό φαινόμενο της γήρανσης αποτελεί η εξωτερίκευση της PS, γεγονός που λειτουργεί ως σήμα που προάγει τη φαγοκυττάρωση (“eat me” signal), και ακολουθώντας την αναγνώριση των γηρασμένων ερυθρών από τα μακροφάγα [19]. Ακόμα, η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$  ενεργοποιεί τη σκραμπλάση και οδηγεί στην εξωτερίκευση της PS [47].

Τα ερυθροκύτταρα ωστόσο είναι πιθανό να οδηγηθούν σε πρόωρη απομάκρυνση τους από την κυκλοφορία, που μπορεί να οφείλεται σε μηχανικές πιέσεις, οξειδωτικό στρες, ωσμωτικό σοκ, μείωση των ενεργειακών αποθεμάτων και ποικίλες βλάβες. Η μορφή αυτή του ειδικού κυτταρικού θανάτου καλείται ερυθρόπτωση [50]. Βασική αιτία που πυροδοτεί την ερυθρόπτωση αποτελεί η αύξηση του κυτοσολικού  $Ca^{2+}$  που έχει, μεταξύ άλλων, ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας και την εξωτερίκευση της PS [51].

Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώνονται και από την παρούσα έρευνα καθώς τα αποτελέσματα έδειξαν εξωτερίκευση PS και αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$  τόσο στις μονάδες κατεψυγμένων ΣΕ όσο και στις μονάδες ΣΕ αποθηκευμένων σε CPD-SAGM. Πιο συγκεκριμένα, η εξωτερίκευση της PS ήταν μεγαλύτερη στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου στις κατεψυγμένες μονάδες ενώ στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου τα επίπεδα της εξωτερικευμένης PS δεν παρουσίαζαν σημαντική διαφορά. Από την άλλη, τα επίπεδα ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$  σημειώθηκε ότι ήταν χαμηλότερα στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου στις

κατεψυγμένες μονάδες χωρίς να παρατηρείται ταυτόχρονα διαφορά στα επίπεδα στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου.

## **2. Συμπεράσματα**

Από τα παραπάνω προκύπτει πως η αποθήκευση ΣΕ σε βαθιά κατάψυξη με γλυκερόλη αποτελεί μέθοδο πολλά υποσχόμενη καθώς οι ποιοτικές παράμετροι μετά την απόψυξη είναι συγκρίσιμες με αυτές των συμβατικά αποθηκευμένων μονάδων. Περαιτέρω έρευνα σε μεγαλύτερο αριθμό μονάδων αποθήκευσης είναι απαραίτητη, ωστόσο από τα προκαταρκτικά αυτά αποτελέσματα φαίνεται πως η δημιουργία αποθέματος κατεψυγμένων ΣΕ είναι δυνατόν να εφαρμοστεί, γεγονός ιδιαίτερα ενθαρρυντικό καθώς εξαιτίας της εθελοντικής φύσης της αιμοδοσίας το ισοζύγιο αποθεμάτων και αναγκών είναι συχνά ελλειμματικό.

# Βιβλιογραφία

1. Silverthorn, D.U., *ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ*. 2018: BROKEN HILL.
2. Peter Klinken, S., *Red blood cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(12): p. 1513-8.
3. Pretini, V., et al., *Red Blood Cells: Chasing Interactions*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 945.
4. Sen Gupta, A., *Hemoglobin-based Oxygen Carriers: Current State-of-the-art and Novel Molecules*. Shock, 2019. **52**(1S Suppl 1): p. 70-83.
5. Beaumont, C.B., P.; Beuzard, Y.; Brugnara, C., *ESH Handbook on Disorders of Erythropoiesis, Erythrocytes and Iron Metabolism*. 2009.
6. Mohandas, N. and P.G. Gallagher, *Red cell membrane: past, present, and future*. Blood, 2008. **112**(10): p. 3939-48.
7. Hankins, H.M., et al., *Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution*. Traffic, 2015. **16**(1): p. 35-47.
8. Pasini, E.M., et al., *In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells*. Blood, 2006. **108**(3): p. 791-801.
9. West, D., et al., *Human carbonic anhydrase II-cyanate inhibitor complex: putting the debate to rest*. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2014. **70**(Pt 10): p. 1324-7.
10. Reithmeier, R.A., et al., *Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1858**(7 Pt A): p. 1507-32.
11. Lux, S.E.t., *Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions*. Blood, 2016. **127**(2): p. 187-99.
12. Kay, M.M., *Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3521-5.
13. Cahalan, S.M., et al., *Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume*. Elife, 2015. **4**.
14. Gallagher, P.G., *Disorders of erythrocyte hydration*. Blood, 2017. **130**(25): p. 2699-2708.
15. Danielczok, J.G., et al., *Red Blood Cell Passage of Small Capillaries Is Associated with Transient Ca(2+)-mediated Adaptations*. Front Physiol, 2017. **8**: p. 979.
16. Bagriantsev, S.N., E.O. Gracheva, and P.G. Gallagher, *Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes*. J Biol Chem, 2014. **289**(46): p. 31673-31681.
17. Sosale, N.G., et al., *Cell rigidity and shape override CD47's "self"-signaling in phagocytosis by hyperactivating myosin-II*. Blood, 2015. **125**(3): p. 542-52.
18. Lutz, H.U., *Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2004. **50**(2): p. 107-16.
19. Klei, T.R., et al., *From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 73.
20. Burger, P., et al., *CD47 in Erythrocyte Ageing and Clearance - the Dutch Point of View*. Transfus Med Hemother, 2012. **39**(5): p. 348-52.
21. Oldenborg, P.A., et al., *Role of CD47 as a marker of self on red blood cells*. Science, 2000. **288**(5473): p. 2051-4.
22. Goll, D.E., et al., *The calpain system*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 731-801.
23. Shapovalov, I., D. Harper, and P.A. Greer, *Calpain as a therapeutic target in cancer*. Expert Opin Ther Targets, 2022. **26**(3): p. 217-231.
24. Wieschhaus, A., et al., *Calpain-1 knockout reveals broad effects on erythrocyte deformability and physiology*. Biochem J, 2012. **448**(1): p. 141-52.

25. Picart, C., P. Dalhaimer, and D.E. Discher, *Actin protofilament orientation in deformation of the erythrocyte membrane skeleton*. *Biophys J*, 2000. **79**(6): p. 2987-3000.
26. Yamashiro, S., et al., *Tropomodulins: pointed-end capping proteins that regulate actin filament architecture in diverse cell types*. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2012. **69**(6): p. 337-70.
27. Han, B.G., et al., *Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization*. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(10): p. 871-5.
28. Baines, A.J., *Evolution of spectrin function in cytoskeletal and membrane networks*. *Biochem Soc Trans*, 2009. **37**(Pt 4): p. 796-803.
29. Sae-Lee, W., et al., *The protein organization of a red blood cell*. *Cell Rep*, 2022. **40**(3): p. 111103.
30. Barbarino, F., et al., *Targeting spectrin redox switches to regulate the mechanoproperties of red blood cells*. *Biol Chem*, 2021. **402**(3): p. 317-331.
31. Mankelov, T.J., T.J. Satchwell, and N.M. Burton, *Refined views of multi-protein complexes in the erythrocyte membrane*. *Blood Cells Mol Dis*, 2012. **49**(1): p. 1-10.
32. Van Kim, C.L., Y. Colin, and J.P. Cartron, *Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane*. *Blood Rev*, 2006. **20**(2): p. 93-110.
33. Badior, K.E. and J.R. Casey, *Molecular mechanism for the red blood cell senescence clock*. *IUBMB Life*, 2018. **70**(1): p. 32-40.
34. Thiagarajan, P., C.J. Parker, and J.T. Prchal, *How Do Red Blood Cells Die?* *Front Physiol*, 2021. **12**: p. 655393.
35. Garcia-Roa, M., et al., *Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives*. *Blood Transfus*, 2017. **15**(3): p. 222-231.
36. Antonelou, M.H., A.G. Kriebardis, and I.S. Papassideri, *Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice*. *Blood Transfus*, 2010. **8 Suppl 3**(Suppl 3): p. s39-47.
37. Willekens, F.L., et al., *Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation*. *Blood*, 2003. **101**(2): p. 747-51.
38. Lew, V.L., et al., *Effects of age-dependent membrane transport changes on the homeostasis of senescent human red blood cells*. *Blood*, 2007. **110**(4): p. 1334-42.
39. Kay, M.M., et al., *Senescent cell antigen is immunologically related to band 3*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(6): p. 1631-5.
40. Kay, M.M., et al., *Alteration in membrane protein band 3 associated with accelerated erythrocyte aging*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(15): p. 5834-8.
41. Kay, M.M., et al., *Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(8): p. 2463-7.
42. Ando, K., K. Kikugawa, and M. Beppu, *Induction of band 3 aggregation in erythrocytes results in anti-band 3 autoantibody binding to the carbohydrate epitopes of band 3*. *Arch Biochem Biophys*, 1997. **339**(1): p. 250-7.
43. Turrini, F., et al., *Clustering of integral membrane proteins of the human erythrocyte membrane stimulates autologous IgG binding, complement deposition, and phagocytosis*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(35): p. 23611-7.
44. Inal, J.M., et al., *Blood/plasma secretome and microvesicles*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1834**(11): p. 2317-25.
45. Willekens, F.L., et al., *Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism?* *Br J Haematol*, 2008. **141**(4): p. 549-56.
46. Lutz, H.U. and A. Bogdanova, *Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans*. *Front Physiol*, 2013. **4**: p. 387.



47. Arashiki, N. and Y. Takakuwa, *Maintenance and regulation of asymmetric phospholipid distribution in human erythrocyte membranes: implications for erythrocyte functions*. *Curr Opin Hematol*, 2017. **24**(3): p. 167-172.
48. Koshkaryev, A., et al., *Non-oxidative band-3 clustering agents cause the externalization of phosphatidylserine on erythrocyte surfaces by a calcium-independent mechanism*. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2020. **1862**(6): p. 183231.
49. Dreischer, P., et al., *Eryptosis: Programmed Death of Nucleus-Free, Iron-Filled Blood Cells*. *Cells*, 2022. **11**(3).
50. Lang, K.S., et al., *Mechanisms of suicidal erythrocyte death*. *Cell Physiol Biochem*, 2005. **15**(5): p. 195-202.
51. Lang, E., S.M. Qadri, and F. Lang, *Killing me softly - suicidal erythrocyte death*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. **44**(8): p. 1236-43.
52. Lang, F., et al., *Plasma membrane ion channels in suicidal cell death*. *Arch Biochem Biophys*, 2007. **462**(2): p. 189-94.
53. Lang, E., et al., *Ceramide in the regulation of eryptosis, the suicidal erythrocyte death*. *Apoptosis*, 2015. **20**(5): p. 758-67.
54. Repsold, L. and A.M. Joubert, *Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death*. *Biomed Res Int*, 2018. **2018**: p. 9405617.
55. D'Alessandro, A., et al., *Red blood cell storage: the story so far*. *Blood Transfus*, 2010. **8**(2): p. 82-8.
56. Feth, M., et al., *Pyrophosphate as a novel anticoagulant for storage of whole blood: A proof-of-concept study*. *Transfusion*, 2023. **63**(7): p. 1392-1398.
57. Hess, J.R., *An update on solutions for red cell storage*. *Vox Sang*, 2006. **91**(1): p. 13-9.
58. Hess, J.R., *Red cell storage*. *J Proteomics*, 2010. **73**(3): p. 368-73.
59. Hess, J.R. and T.G. Greenwalt, *Storage of red blood cells: new approaches*. *Transfus Med Rev*, 2002. **16**(4): p. 283-95.
60. Anastasiadi, A.T., et al., *When I need you most: frozen red blood cells for transfusion*. *Transfus Apher Sci*, 2020. **59**(3): p. 102786.
61. D'Alessandro, A., et al., *Red blood cell metabolic responses to refrigerated storage, rejuvenation, and frozen storage*. *Transfusion*, 2017. **57**(4): p. 1019-1030.
62. Yoshida, T., M. Prudent, and A. D'Alessandro, *Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences*. *Blood Transfus*, 2019. **17**(1): p. 27-52.
63. Tissot, J.D., et al., *The storage lesions: From past to future*. *Transfus Clin Biol*, 2017. **24**(3): p. 277-284.
64. Obrador, R., S. Musulin, and B. Hansen, *Red blood cell storage lesion*. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 2015. **25**(2): p. 187-99.
65. Kor, D.J., C.M. Van Buskirk, and O. Gajic, *Red blood cell storage lesion*. *Bosn J Basic Med Sci*, 2009. **9 Suppl 1**(Suppl 1): p. S21-S27.
66. Kriebardis, A.G., et al., *Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells*. *J Cell Mol Med*, 2007. **11**(1): p. 148-55.
67. Dinkla, S., et al., *Phosphatidylserine exposure on stored red blood cells as a parameter for donor-dependent variation in product quality*. *Blood Transfus*, 2014. **12**(2): p. 204-9.
68. Kriebardis, A.G., et al., *RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components*. *Transfusion*, 2008. **48**(9): p. 1943-53.
69. Kriebardis, A.G., et al., *Membrane protein carbonylation in non-leukodepleted CPDA-preserved red blood cells*. *Blood Cells Mol Dis*, 2006. **36**(2): p. 279-82.

70. Kriebardis, A.G., et al., *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): p. 1212-20.
71. Cohn, C.S., et al., *Technical Manual, Methods and Appendices*. 20th ed. 2020: American Association of Blood Banks. 816 pages.

# Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των συστατικών του αίματος (Ανατύπωση από Encyclopaedia Britannica) .....	15
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της διαδρομής των ερυθροκυττάρων μεταξύ του πνεύμονα (σημείο φόρτωσης οξυγόνου) και των ιστών (σημείο εκφόρτωσης οξυγόνου) (Ανατύπωση απο Anirban, 2019) .....	16
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση από τα αριστερά προς τα δεξιά ενός ερυθρού αιμοσφαιρίου, ενός τετραμερούς αιμοσφαιρίνης α2β2 και μιας ομάδας αίμης (Ανατύπωση απο Anirban, 2019) .....	17
Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του χαρακτηριστικού σχήματος του αμφίκιουλου δίσκου και οι φυσιολογικές διαστάσεις του ερυθρού αιμοσφαιρίου (Ανατύπωση από Avijit Hazra, 2000).....	18
Εικόνα 5: Η εικόνα του αμφίκιουλου δίσκου απο το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Ανατύπωση απο Anirban, 2019) .....	18
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της σύστασης της λιπιδικής διπλοστιβάδας του ερυθροκυττάρου (Ανατύπωση απο Frabs Kuypers,2011) .....	20
Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης με έμφαση στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Ανατύπωση απο Pretini et al, 2019).....	21
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της βασικής λειτουργίας της πρωτεΐνης ζώνης 3 των ερυθροκυττάρων (Ανατύπωση απο Rethmeier et al, 2012).....	21
Εικόνα 9: Φωτογραφία απο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του ερυθροκυτταρικού υπομεμβρανικού σκελετού και του μορίου σπεκτρίνης (Ανατύπωση απο Lux, 2016) .....	25
Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των συμπλόκων της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Ανατύπωση απο Lux, 2016) .....	27
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της CD47 ως επαγωγέας της ερυθροκυτταρικής φαγοκυττάρωσης (Ανατύπωση απο Burger et. al, 2012) .....	29
Εικόνα 12: Μεταβολές που αφορούν στη δομή της μεμβράνης , στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου και στα αποθέματα ενέργειας που οδηγούν σε εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης κατά τη γήρανση (Ανατύπωση απο Arashiki, 2017).....	31
Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της ερυθρόπτωσης (Ανατύπωση απο Repsold and Joubert, 2018). .....	34
Εικόνα 14: Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης ερυθροκυττάρων αποθηκευμένων σε ασκούς με CPDA/SAGM, μεγέθυνση 10000x, που απεικονίζει τις μεταβολές της μορφολογίας των ερυθροκυττάρων τις ημέρες 0, 14, 28 και 42. (Ανατύπωση από Mustafa et. al, 2016).....	38