

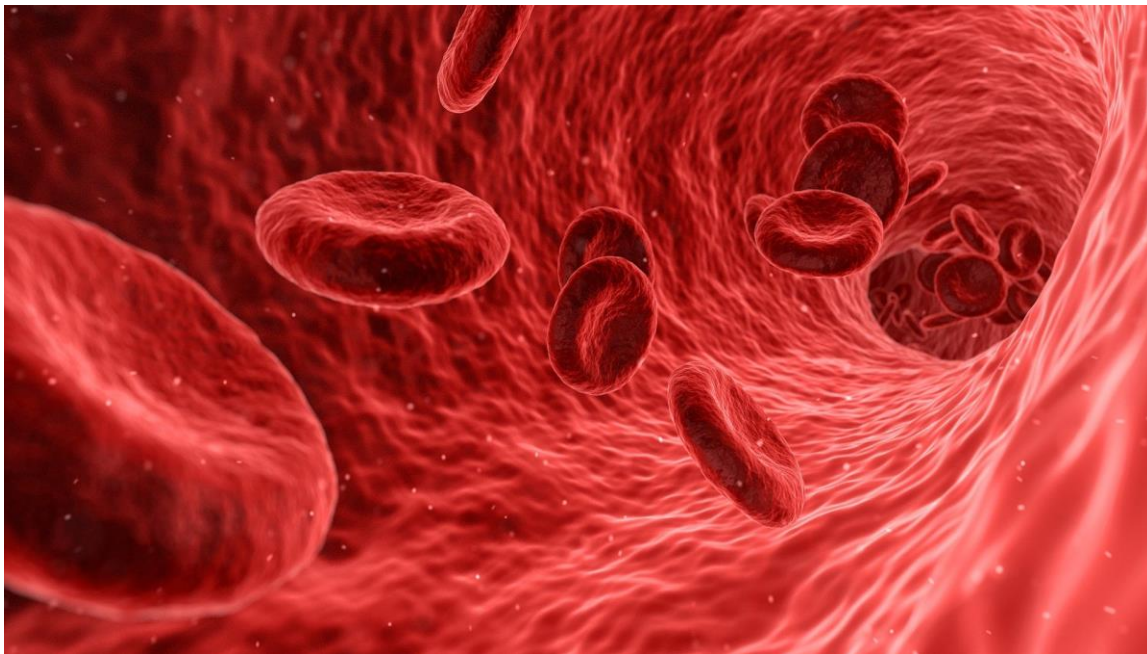


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ &
ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΑΙΜΟΛΥΣΗ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ



ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ

ΜΠΑΚΑ ΝΙΚΟΛΕΤΑ

A.M. : 19678192

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΑΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Αθήνα, 2023

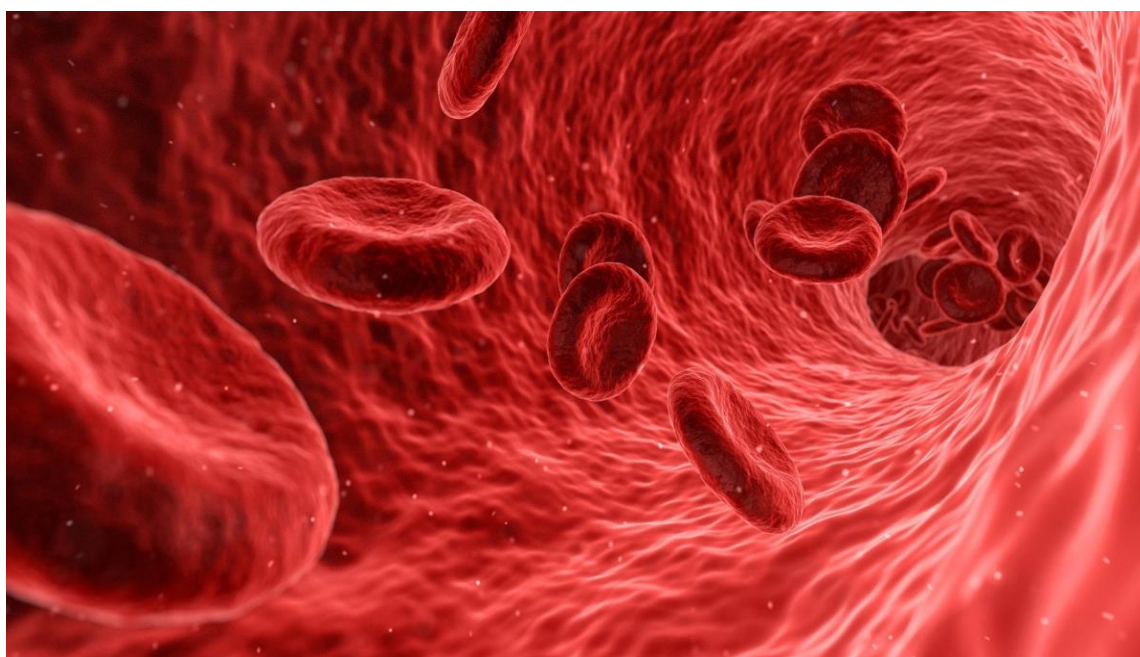


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ &
ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ



DIPLOMA THESIS

MECHANICAL AND OXIDATIVE HEMOLYSIS OF RED BLOOD CELLS



WRITER

ΒΑΚΑ ΝΙΚΟΛΕΤΑ

CANDIDATE NUMBER: 19678192

SUPERVISOR

KRIEBARDIS ANASTASIOS

PROFESSOR

Athens, 2023



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



ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΙΣΗΓΗΤΗ

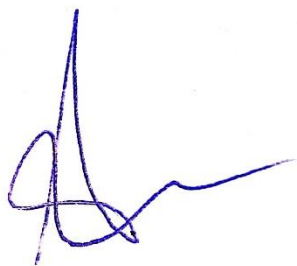
Η διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι εξεταστική επιτροπή:

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ	
ΜΠΙΡΤΣΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ	ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟΣ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ	
ΠΑΥΛΟΥ ΕΥΘΥΜΙΑ	ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη ΜΠΑΚΑ ΝΙΚΟΛΕΤΑ του ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ, με αριθμό μητρώου 19678192 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ του Τμήματος ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, 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: Κριεμπάρδης Αναστάσιος

Καθηγητής

Περίληψη

Τα ερυθροκύτταρα αποτελούν τα πολυπληθέστερα κύτταρα του αίματος και η δράση τους σχετίζεται με τη μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες προς τους διάφορους ιστούς. Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ερυθροκυττάρου. Αποτελείται από μία λιπιδική διπλοστιβάδα με ενσωματωμένες διάφορες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και έναν υπομεμβρανικό κυτταροσκελετό που απαρτίζεται από σκελετικές πρωτεΐνες. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά την *ex vivo* αποθήκευση τους, είτε με τις συμβατικές μεθόδους είτε με κρυσυντήρηση, υφίστανται ποικίλες αλλοιώσεις και βλάβες, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως “Αποθηκευτική βλάβη”. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να είναι βιοχημικές, μηχανικές ή/και μεμβρανικές. Η αποθηκευτική ικανότητα των ερυθρών καθορίζεται από τη χρονική διάρκεια παραμονής εντός της μονάδας, αλλά και από τα χαρακτηριστικά του συντηρητικού που αυτή περιέχει.

Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη των ποιοτικών χαρακτηριστικών των κατεψυγμένων συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων, καθώς και η αποθηκευτική τους βλάβη σε σύγκριση με συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια που αποθηκεύονται σύμφωνα με τα κλασικά πρωτόκολλα. Η κρυσυντήρηση συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων με γλυκερόλη είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε κρίσιμες περιόδους που απαιτείται συστηματική συλλογή αίματος, αλλά και στην ταχύτερη εύρεση σπάνιων ομάδων αίματος. Ωστόσο, τα στάδια απόψυξης/απογλυκεροποίησης καταπονούν ιδιαίτερα τα συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα, τα οποία παρά την καλή ανάκτηση που εμφανίζουν, μετά την αποθήκευση τους στους 4°C για περίπου 1-2 εβδομάδες παρουσιάζουν πλήθος κυτταρικών βλαβών. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει πως οι μονάδες μετάγγισης που αποθηκεύτηκαν σε υποθερμικές συνθήκες φαίνεται να είναι ασφαλείς προς μετάγγιση. Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται από τη διατήρηση εντός φυσιολογικών ορίων των τιμών RBCs, Hct και MCHC παρά τις αλλαγές που εμφάνισαν κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Τέλος, παρά την αυξημένη αιμόλυση που παρουσίασαν τα συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα λόγω μηχανικού και οξειδωτικού στρες, καμία μονάδα μετάγγισης δε ξεπέρασε το Ευρωπαϊκό όριο αιμόλυσης. Τα αποτελέσματα αυτά μένει να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερο αριθμό δείγματος και να συνδυαστούν με άλλα ποιοτικά χαρακτηριστικά των συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων με στόχο τη δημιουργία ασφαλών και

λειτουργικών αποθεμάτων κατεψυγμένων ερυθροκυττάρων που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περιόδους κρίσης.

Λέξεις κλειδιά : ερυθροκύτταρο, μεμβράνη, οξειδωτικό, μηχανικό, αποθήκευση.

Abstract

Red blood cells are the most numerous cells in the blood and their action is related to the transport of oxygen from the lungs to the various tissues. The erythrocyte membrane plays a particularly important role in the function of the erythrocyte. It consists of a lipid bilayer with several transmembrane proteins embedded in it and a submembrane cytoskeleton composed of skeletal proteins. Red blood cells during their *ex vivo* storage, either by conventional methods or by cryopreservation, undergo a variety of alterations and damages, which are classified as “storage damage”. These changes may be biochemical, mechanical and/or membrane-mediated. The storage capacity of red blood cells is determined by the length of time they remain within the unit and also by the characteristics of the preservative it contains.

The purpose of the work is to study the quality characteristics of packed red blood cells and their storage damage compared to concentrated red blood cells stored according to classical protocols. Cryopreservation of packed red blood cells with glycerol is particularly useful in critical periods when systematic blood collection is required, but also in the faster identification of rare blood groups. However, the thawing/deglycerolizing stages are particularly stressful for the packed red blood cells, which, despite their good recovery, after storage at 4°C for about 1-2 weeks show a number of cellular damages. In this study, therefore, it was shown that transfusion units stored under hypothermic conditions appear to be safe for transfusion. This conclusion is supported by the maintenance within normal limits of RBCs, Hct and MCHC values despite the changes they showed during storage. Finally, despite the increased haemolysis of packed red blood cells due to mechanical and oxidative stress, no transfusion unit exceeded the European haemolysis limit. These results remain to be confirmed in a larger sample size and combined with other quality characteristics of the packed red blood cells in order to create safe and functional stocks of frozen red blood cells that can be used in times of crisis.

Key words : erythrocyte, membrane, oxidative, mechanical, storage.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	11
A) Εισαγωγή.....	14
A1) Κύτταρα του Αίματος.....	14
A2) Ερυθροκύτταρα	14
A.2.1) Λειτουργία των ερυθροκυττάρων	15
A3) Ερυθροκυτταρική Μεμβράνη	16
A. 3.1) Λιπιδική διπλοστιβάδα	17
A.3.2) Διαμεμβρανικές Πρωτεΐνες	18
A.3.3) Περιφερικές Μεμβρανικές Πρωτεΐνες.....	22
A.3.4) Μεμβρανοσυνδεόμενες Πρωτεΐνες.....	23
A.3.5) Κυτταροσκελετός	23
A.3.6) Σύμπλοκα Ερυθροκυτταρικής Μεμβράνης	24
A4) Μεταβολισμός Ερυθροκυττάρου	26
A.4.1) Μεταβολισμός Γλυκόζης.....	26
A.4.2) Ρύθμιση Μεταβολισμού Γλυκόζης	28
A.4.3) Μεταβολισμός Οξειδωτικών Ριζών	29
A5) Ερυθροκυτταρική Γήρανση.....	31
A.5.1) Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης.....	32
A.5.2) Μονοπάτι Συσχετιζόμενο με την Πρωτεΐνη CD47	32
A.5.3) Μονοπάτι Συσχετιζόμενο με την Πρωτεΐνη Ζώνη 3	32
A.5.4) Εξαγγειακή Εκκαθάριση Ερυθρών Αιμοσφαιρίων.....	34
A.5.5) Οξειδωτικό Στρες	35
A6) Ερυθρόπτωση	35
A7) Αποθήκευση και Αποθηκευτική Βλάβη Ερυθρών Αιμοσφαιρίων.....	37
A.7.1) Συνθήκες Αποθήκευσης.....	37
A.7.2) Αποθηκευτική Βλάβη	37
A.7.3) Βιοχημικές Βλάβες	38
A.7.4) Μηχανικές Βλάβες	38
A.7.5) Μεμβρανικές Βλάβες.....	38
A.7.6 Κρυσσυντήρηση Ερυθροκυττάρων	39
A.7.7) Σκοπός της Εργασίας.....	39

B) Υλικά και Μέθοδοι.....	40
B1) Υλικά και Μέθοδοι.....	40
B.1.1) Όργανα και Συσκευές.....	40
B.1.2) Χημικά Αντιδραστήρια.....	40
B.1.3) Αναλώσιμα.....	41
B2) Εργαστηριακές μέθοδοι.....	41
B.2.1) Μέτρηση Μηχανικής Ευθραυστότητας.....	41
B.2.2) Μέτρηση Οξειδωτικής Αιμόλυσης.....	42
B.3) Στατιστική Επεξεργασία.....	43
Γ) Αποτελέσματα.....	44
Γ.1) Αιματολογικό Προφίλ.....	44
Γ.1.1) Αριθμός Ερυθροκυττάρων (RBCs).....	44
Γ.1.2) Αιμοσφαιρίνη Hb.....	45
Γ.1.3) Αιματοκρίτης HCT.....	46
Γ.1.4) Μέση Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (MCHC).....	47
Γ.2) Επίδραση Μηχανικού και Οξειδωτικού Στρες στα Ερυθροκύτταρα.....	48
Γ.2.1) Μέτρηση Μηχανικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων.....	48
Γ.2.2) Μέτρηση Οξειδωτικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων.....	50
Δ) Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	52
Δ.1) Συζήτηση.....	52
Δ2) Συμπεράσματα.....	54
Ε) Βιβλιογραφία.....	55

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε κατά την περίοδο Ιανουαρίου – Σεπτεμβρίου 2023 με σκοπό την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Το πειραματικό μέρος έλαβε χώρα στο « Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην εργαστηριακή Αιματολογία», το οποίο ανήκει στο τμήμα των Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εισηγητή και επιβλέποντα καθηγητή μου, **κ. Αναστάσιο Γ. Κριεμπάρδη**, Υπεύθυνο του εργαστηρίου, ο οποίος μου έδωσε τις γνώσεις για να πραγματοποιήσω τις πειραματικές διαδικασίες στον εργαστηριακό χώρο, με προμήθευσε με τα απαραίτητα πειραματικά υλικά και στάθηκε δίπλα μου τόσο κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, όσο και κατά τη συγγραφή της πτυχιακής μου εργασίας. Ο ζήλος που επέδειξε και η υποστήριξη που παρείχε, λειτούργησαν καταλυτικά στη διαμόρφωση της ερευνητικής μου ταυτότητας.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την **κ. Παύλου Ευθυμία**, καθώς και τον **κ. Μπίρτσα Βασίλειο** Ακαδημαϊκοί Υπότροφοι του τμήματος, για τη συμμετοχή τους στη τριμελή επιτροπή, αλλά και για τις γνώσεις και τις συμβουλές που μου μετέδωσαν από τα πρώτα κιόλας εξάμηνα της εκπαίδευσης μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, τον **κ. Τζούνακα Βασίλειο**, Επίκουρο καθηγητή στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ και να αλληλεπιδράσω μαζί του επιστημονικά και την **κ. Αναστασιάδη Αλκμήνη**, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια και Εξωτερική Συνεργάτιδα, για την πολύτιμη βοήθεια της, τόσο πρακτική όσο και ψυχολογική αλλά και για την παροχή γνώσεων και συμβουλών που αποτέλεσαν τα θεμέλια για την συγγραφή της διπλωματικής μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον **κ. Φόρτη Σωτήριο**, Ακαδημαϊκό Υπότροφο του τμήματος για την σημαντική συμβολή του στη σύνταξη της εργασίας μου. Αποτέλεσε σπουδαίο φίλο και σύμβουλο, καθώς οποιαδήποτε στιγμή και αν χρειάστηκε η βοήθεια του, δε δίστασε να την μου τη χαρίσει απλόχερα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΕΙΚΟΝΩΝ

(Εικόνα 1): Δομή του μορίου αιμοσφαιρίνης. Αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ανά δύο όμοιες και τέσσερα μόρια αίμης που είναι ενωμένα ανά ένα σε κάθε αλυσίδα..	16
(Εικόνα 2): Σχηματική αναπαράσταση της ασύμμετρης λιπιδικής κατανομής του ερυθρού αιμοσφαιρίου. Η σφινγγομυελίνη (SM) και η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) εντοπίζονται κυρίως στην εξωτερική στιβάδα, ενώ η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) στην εσωτερική.	18
(Εικόνα 3): Σχηματική απεικόνιση της κυριότερης λειτουργίας της Ζώνης 3. Ανταλλαγή ιόντων Cl^- και HCO_3^- που προκύπτουν από τον καταβολισμό του CO_2 με τη δράση της καρβονικής ανυδράσης II.	19
(Εικόνα 4): Απεικόνιση της διπλής λειτουργίας του μεταφορέα γλυκόζης Glut-1. Μεταφορά γλυκόζης και αφυδρασκορβικού οξέος.	20
(Εικόνα 5): Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου της πρωτεΐνης Piezo-1 και των καναλιών Gardos στη ρυθμιστή του όγκου του κυττάρου ύστερα από τη δράση μηχανικού στρες. Η δράση της Piezo-1 ενεργοποιείται με την άσκηση μηχανικής καταπόνησης, η οποία μεταφράζεται σε αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωση Ca^{2+} . Έτσι ενεργοποιούνται τα κανάλια Gardos και παρατηρείται αυξημένη εκροή K^+ και μορίων H_2O .	21
(Εικόνα 6): Σχηματική αναπαράσταση της CD47 ως “δείκτης εαυτού”. Όταν ο υποδοχέας SiRPa στα μακροφάγα αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη CD47 στην ερυθροκυττάρων αποτρέπεται η φαγοκυττάρωση.	22
(Εικόνα 7): Σχηματική Αναπαράσταση των συμπλόκων της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης.	25
(Εικόνα 8): Απεικόνιση των μεταβολικών μονοπατιών του ερυθροκυττάρου.	28
(Εικόνα 9): Σχηματική απεικόνιση της οξυγονοεξαρτώμενης ρύθμισης του μεταβολισμού της γλυκόζης. Σε υψηλά επίπεδα O_2 τα γλυκολυτικά ένζυμα προσδέονται στη θέση πρόσδεσης στη ζώνη 3 και απενεργοποιούνται προάγοντας τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών. Αντίθετα, σε χαμηλά επίπεδα O_2 τα γλυκολυτικά ένζυμα απομακρύνονται από τη θέση πρόσδεσης της ζώνης 3 και ενεργοποιούνται προάγοντας την γλυκολυτική οδό.	29
(Εικόνα 10): Αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss. Μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων οι δραστικές ρίζες οξυγόνου παράγουν υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το H_2O_2 παράγει δραστικές ρίζες υδροξυλίου και οξειδωμένου σιδήρου.	30
(Εικόνα 11): Σχηματική αναπαράσταση της δράσης των ενζυματικών και μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών του ερυθροκυττάρου. Οι μηχανισμοί αυτοί καταπολεμούν το οξειδωτικό στρες.	31
(Εικόνα 12): Δημιουργία νέο-αντιγόνου γήρανσης Ζώνης 3 μέσω αιμοχρωμάτων. Η οξειδωτική καταπόνηση προκαλεί συσσώρευση αιμοχρωμάτων κυτταροπλασματικά, προκαλώντας τον ολιγομερισμό της Hb. Έτσι, αυτόλογα IgGs συνδέονται στη πρωτεΐνη ζώνη 3 και αναγνωρίζονται από τα φαγοκύτταρα.	33
(Εικόνα 13): Δημιουργία νέο-αντιγόνου γήρανσης μέσω θραύσεις πρωτεϊνών. Βλάβη της ζώνης 3 λόγω πρωτεόλυσης και απελευθέρωσης μη προσβάσιμων αντιγονικών θέσεων στη πρωτεΐνη ζώνη 3. Έτσι, τα αυτόλογα IgGs συνδέονται στη πρωτεΐνη ζώνη 3 και αναγνωρίζονται από τα φαγοκύτταρα.	33
(Εικόνα 14): Σηματοδότηση ερυθρόπτωσης. Ενδογενή ή/ και εξωγενή μόρια επάγουν την ερυθρόπτωση. Η PGE_2 προκαλεί την είσοδο ιόντων Ca^{2+} και την εκροή ιόντων K^+ και Cl^- . Η καλπαΐνη προκαλεί φυσαλιδοποίηση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Ο παράγοντας PAF απελευθερώνεται και παράγει κεραμίδιο μέσω της σφινγγομυελινάσης. Το κεραμίδιο ενεργοποιεί μία σκραμπλάση που προκαλεί την εξωτερίκευση PS οδηγώντας στη φαγοκυττάρωση.	36

Συντομογραφίες

RBCs	Ερυθρά Αιμοσφαίρια (Red Blood Cells)	2,3-DPG	2,3-διφωσφογλυκερικό (2,3-diphosphoglycerate)
SM	Σφιγγομυελίνη (Sphingomyelin)	NADH	Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (Nicotinamide adenine dinucleotide)
PC	Φωσφατιδυλοχολίνη (Phosphatidylcholin)	NADPH	φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
PS	Φωσφατιδυλοσερίνη (Phosphatidylserine)	CAT	Καταλάση (Catalase)
PE	Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (Phosphatidylethanolamine)	AE1	Ανιοντοανταλλάκτης 1 (anion exchanger)
DHA	Αφυδροασκορβικό οξύ (Docosahexaenoic acid)	SLC4A1	Οικογένεια φορέων διαλυτών ουσιών 4 μέλος 1 (Solute Carrier Family 4 Member 1)
Prx-2	Υπεροξειδοξίνη-2 (Peroxiredoxin)	Prx-2	Υπεροξειδοξίνη-2 (Peroxiredoxin)
GADPH	Αφυδρογονάση της 3 - φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)	pRBCs	Συμπυκνωμένα Ερυθροκύτταρα (packed Red Blood Cells)
G6PD	αφυδρογονάση της γλυκόζης-6-φωσφορικής (Glucose-6-phosphate dehydrogenase)	ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate)
ROS	Δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive oxygen species)	Gpx	Αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase)
SOD	Υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase)	Prdx	Υπεροξειδοξίνες (peroxideroxin)
TSP-1	Θρομβοσπονδίνη-1 (Thrombospondin-1)	RPM	Μακροφάγα του ερυθρού πολφού (red pulp macrophages)
HSECs	Ανθρώπινα ρινικά επιθηλιακά κύτταρα (human splenic endothelial cells)	PAF	Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor)
PGE₂	Προσταγλαδίνη E ₂ (Prostaglandin E ₂)	CPD	κιτρικά, φωσφορικά και δεξτρόζη (citrate, phosphate, dextrose)
SAGM	αδενίνη, γλυκόζη και μαννιτόλη (saline, adenine, glucose, mannitol)	CPDA	κιτρικά, φωσφορικά, δεξτρόζη και αδενίνη (citrate, phosphate, dextrose, adenine)

A) Εισαγωγή

A1) Κύτταρα του Αίματος

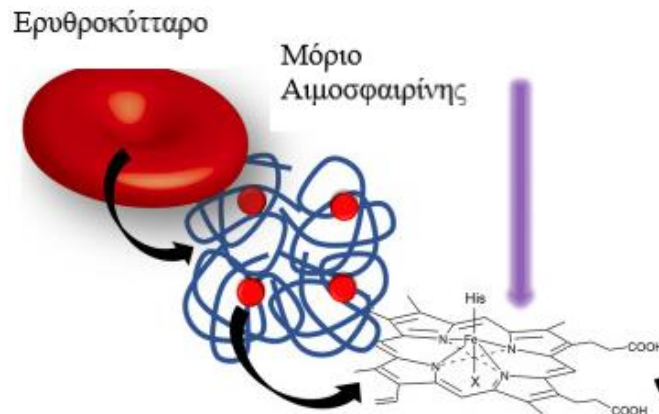
Το αίμα κυκλοφορεί στο καρδιαγγειακό σύστημα και είναι ένα από τα πιο σημαντικά υγρά του σώματος. Αποτελεί συνδετικό ιστό που συνίσταται από τα κύτταρα του αίματος και το πλάσμα. Τα βασικότερα κυτταρικά στοιχεία είναι τα λευκά αιμοσφαίρια, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Τα ερυθροκύτταρα συντελούν στην ορθή λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος. Τα λευκοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την ανοσοαπόκριση του οργανισμού, προστατεύοντας τον από την εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών, όπως είναι τα παράσιτα, τα βακτήρια και οι ιοί. Οι πέντε σημαντικότεροι τύποι ώριμων λευκών κυττάρων που συντελούν σε αυτή τη διαδικασία είναι τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα. Τα αιμοπετάλια αποτελούν κυτταρικά θραύσματα απαραίτητα για τη δημιουργία θρόμβου και τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ αιμόστασης και αιμορραγίας. Το πλάσμα του αίματος ως εξωκυττάριο υγρό συνίσταται κυρίως από νερό, οργανικά μόρια, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες, ιόντα και αέρια και συμμετέχει μέσω των πρωτεϊνών του στη θρομβογένεση και την εξουδετέρωση ξένων εισβολέων (Silverthorn 2018).

A2) Ερυθροκύτταρα

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια αποτελώντας τη πολυπληθέστερη κυτταρική ομάδα του αίματος παρουσιάζουν ιδιαίτερη δομική και λειτουργική σημασία. Το σχήμα και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν, τους διευκολύνουν στην υλοποίηση βασικών λειτουργιών, όπως είναι η ανταλλαγή αερίων στους ιστούς της αγγειακής κυκλοφορίας (Silverthorn 2018; Barbalato and Pillarisetty 2023). Επομένως, έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία η διερεύνηση της πολυπλοκότητας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης για να κατανοηθεί η σχέση δομής – λειτουργίας του ερυθροκυττάρου (Risinger and Kalfa 2020).

A.2.1) Λειτουργία των ερυθροκυττάρων

Στον άνθρωπο υπολογίζεται ότι περιέχονται πέντε εκατομμύρια ερυθρά ανά μικρόλιτρο αίματος (Silverthorn 2018). Ωστόσο, παρατηρούνται διαφορές στον αριθμό των ερυθροκυττάρων μεταξύ των δύο φύλων. Συγκεκριμένα στον άνδρα εκτιμάται ότι υπάρχουν $4,7-6,1 \times 10^6$ Ερυθρά Αιμοσφαίρια (Red Blood Cells, RBCs), ενώ στη γυναίκα $4.2-5.4 \times 10^6$ RBCs (Dzierzak and Philipsen 2013). Παρά ταύτα, ο ρυθμός παραγωγής των ερυθροκυττάρων από το μυελό των οστών και ο ρυθμός εκκαθάρισης τους από το σπλήνα είναι παρόμοιος μεταξύ των φύλων και εκτιμάται περίπου στα δύο εκατομμύρια ερυθρά ανά δευτερόλεπτο (Silverthorn 2018; Pretini et al. 2019). Τα ερυθροκύτταρα είναι απύρρηνα κύτταρα, δε διαθέτουν πολλά βασικά οργανίδια και επιβιώνουν περίπου τέσσερις μήνες εντός του πολύπλοκου αγγειακού συστήματος. Αυτά τα βασικά χαρακτηριστικά επιτρέπουν, κυρίως την παραμόρφωση των ερυθρών εντός των τριχοειδών αγγείων για την ασφαλή μεταφορά οξυγόνου (O_2) από τους πνεύμονες στη περιφέρεια και διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) από τη περιφέρεια στους πνεύμονες. Σε αυτή τη σημαντική για τη ζωή διαδικασία συντελεί η αιμοσφαιρίνη, η οποία εντοπίζεται περιφερικά του ερυθροκυττάρου και είναι υπεύθυνη για το κόκκινο χρώμα του αίματος. Η σύνθετη αυτή πρωτεΐνη αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές αλυσίδες, ανά δύο όμοιες, καθεμία από τις οποίες περικλείουν ένα οξυγονοδεσμευτικό μόριο αίμης (Silverthorn 2018; Pretini et al. 2019) **((Εικόνα 1)**. Η αιμοσφαιρίνη, λοιπόν, είναι ο κύριος ρυθμιστής της αναπνοής και εξασφαλίζει την επάρκεια των ιστών σε οξυγόνο, ακόμα και σε περιπτώσεις μειωμένης οξυγόνωσης, παραδείγματος χάριν σε καταστάσεις μεγάλης απώλειας αίματος και ιστικής υποξίας (Sen Gupta 2019).



(Εικόνα 1): Δομή του μορίου αιμοσφαιρίνης. Αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ανά δύο όμοιες και τέσσερα μόρια αίμης που είναι ενωμένα ανά ένα σε κάθε αλυσίδα. Ανατύπωση από (Dybas et al. 2020).

Σε όλη τη διάρκεια ζωής του ανθρώπου, ο μυελός των οστών με τη δράση διάφορων κυτταροκινών και παραγόντων διέγερσης αποικιών παράγει τα κύτταρα του αίματος. Μέσω της ερυθροποίησης προκύπτει η παραγωγή εκατομμύρια ερυθροκυττάρων, τα οποία προέρχονται από ένα πολυδύναμο αιμοποιητικό βλαστοκύτταρο. Κατά τη τελευταία φάση της ερυθροποίησης τα δικτυοερυθροκύτταρα διέρχονται από το μυελό των οστών στη κυκλοφορία του αίματος και μετατρέπονται σε ώριμα ερυθροκύτταρα εντός 24 ωρών (Silverthorn 2018). Σε αυτό το στάδιο τα ερυθροκύτταρα παίρνουν το χαρακτηριστικό σχήμα αμφίκουλου δίσκου με διάμετρο 7μm, εφόσον έχει προηγηθεί η απώλεια κατά 20% της πλασματικής μεμβράνης και βασικών οργανιδίων, όπως είναι τα μιτοχόνδρια και τα ριβοσώματα. Η αμφίκουλη δισκοειδής μορφή εξυπηρετεί τη δυνατότητα παραμόρφωσης και την αύξηση της ελαστικότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων για να ανταποκρίνονται σε διάφορες ωσμωτικές επιδράσεις του αίματος. Συνεπώς, η ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι εκείνη που καθορίζει την ιδιότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων να παρουσιάζουν παραμορφωσιμότητα και ελαστικότητα καθώς διέρχονται από τα στενά τριχοειδή του καρδιαγγειακού συστήματος (Silverthorn 2018; Pretini et al. 2019).

A3) Ερυθροκυτταρική Μεμβράνη

Η δομική κατασκευή της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης προσδίδει στο ερυθροκύτταρο ανθεκτικότητα, ευελιξία και προσαρμοστικότητα από την αρχή μέχρι και το τέλος της ζωής του.

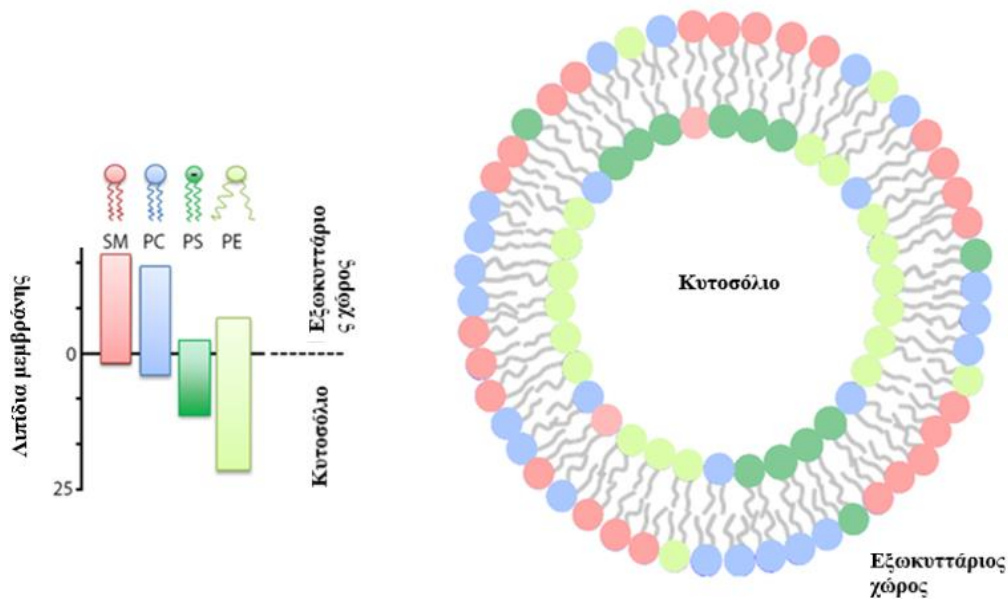
Συγκεκριμένα, η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων αποτελείται από μία διπλοστιβάδα λιπιδίων, εκλεκτικά διαπερατή μόνο για πολικά μόρια, στην οποία είναι ενσωματωμένες διάφορες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Trejo-Soto et al. 2022). Υπομεμβρανικά, υπάρχει ένα δισδιάστατο δίκτυο σκελετικών πρωτεϊνών, που ονομάζεται σύμπλεγμα 4.1R ή κυτταροσκελετός σπεκτρίνης-ακτίνης και καθιστά την ερυθροκυτταρική μεμβράνη ιδιαίτερα σταθερή (Pretini et al. 2019). Στη συνέχεια θα αναλυθούν λεπτομερώς οι σημαντικότερες μεμβρανικές πρωτεΐνες.

A. 3.1) Λιπιδική διπλοστιβάδα

Η λιπιδική διπλοστιβάδα συνίσταται από ίση αναλογία φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης. Η χοληστερόλη, εκτιμάται ότι, κατανέμεται εξίσου στις δύο στιβάδες, σε αντίθεση με τα 4 κύρια φωσφολιπίδια που παρουσιάζουν ασύμμετρη κατανομή. Η σφιγγομυελίνη (sphingomyelin, SM) και η φωσφατιδυλοχολίνη (phosphatidylcholin , PC) εντοπίζονται κυρίως στην εξωτερική στιβάδα, ενώ η φωσφατιδυλοσερίνη (phosphatidylserine, PS) και η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (phosphatidylethanolamine, PE) περιορίζονται στην εσωτερική [8]. Η άνιση διάθεση των φωσφολιπιδίων στη λιπιδική διπλοστιβάδα είναι κλινικά σημαντική. Σε περίπτωση έκθεσης της PS στην εξωτερική μεμβράνη, τα μακροφάγα καθίστανται ικανά να αναγνωρίζουν και να φαγοκυτταρώσουν το ερυθρό αιμοσφαίριο. Η αποκλειστική παραμονή της PS στην εσωτερική μονοστιβάδα παρεμποδίζει, επίσης, την προσκόλληση των φυσιολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων στο αγγειακό ενδοθήλιο, επιτρέποντας, έτσι, την ομαλή κυκλοφορία τους. Επιπλέον, συμμετέχει στη μηχανική σταθερότητα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, καθώς φαίνεται να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (Pretini et al. 2019; Mohandas and Gallagher 2008).

Υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες που συμβάλλουν στη μεταφορά λιπιδίων και κατά επέκταση διατηρούν την ανισοκατανομή. Η φλοππάση μεταφέρει λιπίδια από την εσωτερική προς την εξωτερική μονοστιβάδα, ενώ η φλιππάση επιτελεί την αντίθετη λειτουργία, διατηρώντας με αυτό τον τρόπο την ασυμμετρία της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Η μεταφορά λιπιδίων αντίθετα προς τη διαβάθμιση συγκέντρωσης απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας. Αντίθετα, η ενεργοποίηση της σκραμπλάσης επιφέρει τη μεταφορά λιπιδίων από και προς τις δυο κατευθύνσεις, χωρίς να καταναλώνει ενέργεια και έχει σαν επακόλουθο την έλλειψη

ασυμμετρίας και ομοιόστασης της μεμβράνης (Mohandas and Gallagher 2008; Pomorski and Menon 2016) ((Εικόνα 2).



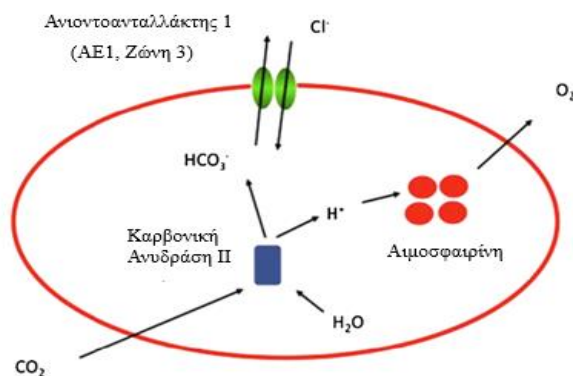
(Εικόνα 2): Σχηματική αναπαράσταση της ασύμμετρης λιπιδικής κατανομής του ερυθρού αιμοσφαιρίου. Η σφιγγομυελίνη (SM) και η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) εντοπίζονται κυρίως στην εξωτερική στιβάδα, ενώ η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) στην εσωτερική. Ανατύπωση από (Marquardt, Geier, and Pabst 2015)

A.3.2) Διαμεμβρανικές Πρωτεΐνες

A.3.2.1 Ζώνη 3 -Δίαυλος ανταλλαγής ανιόντων

Η ζώνη 3, η οποία είναι γνωστή και ως ανιοντοανταλλάκτης 1 (anion exchanger, AE1), είναι η βασικότερη διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη. Λειτουργεί ως διάυλος ανταλλαγής ανιόντων και ανήκει στην οικογένεια διττανθρακικών μεταφορέων πρωτεϊνών ανταλλαγής ανιόντων (Solute Carrier Family 4 Member 1, SLC4A1). Συνολικά, απαρτίζεται από 911 αμινοξέα και χωρίζεται σε 3 κύριες περιοχές: τη αμινοτελική κυτοσολική (N - τελική κυτταροπλασματική περιοχή), την καρβοξυτελική κυτοσολική (C - τελική μεμβρανική περιοχή) και τη διαμεμβρανική περιοχή, η οποία διέρχεται από τη μεμβράνη 12-14 φορές (Pretini et al. 2019). Η ζώνη 3, μέσω του C-τελικού μεμβρανικού πεδίου πραγματοποιεί την ανταλλαγή ιόντων χλωρίου και διττανθρακικών ιόντων, τα οποία προκύπτουν από το μεταβολισμό του διοξειδίου του άνθρακα ύστερα από τη

δράση της καρβονικής ανυδράσης II. Συνεπώς, η ζώνη 3 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της αναπνοής (Reithmeier et al. 2016; West et al. 2014) ((Εικόνα 3).



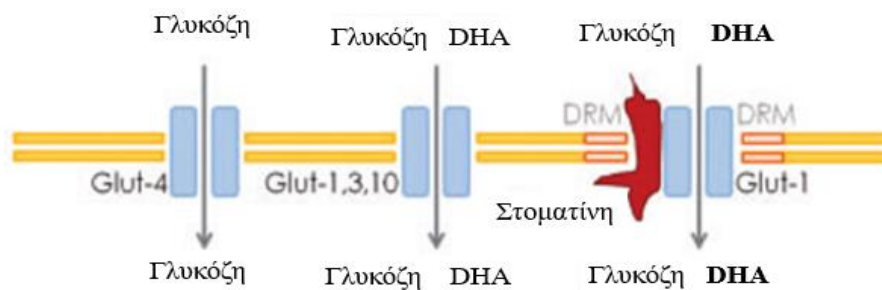
(Εικόνα 3): Σχηματική απεικόνιση της κυριότερης λειτουργίας της Ζώνης 3. Ανταλλαγή ιόντων Cl^- και HCO_3^- που προκύπτουν από τον καταβολισμό του CO_2 με τη δράση της καρβονικής ανυδράσης II. Ανατύπωση από (Reithmeier 2022).

Μία ακόμη λειτουργία της πρωτεΐνης ζώνης 3 είναι η διατήρηση της ακεραιότητας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Μέσω του N-τελικού κυτταροπλασματικού άκρου συνδέεται με πρωτεΐνες του υπομεμβρανικού σκελετού, με γλυκολυτικά ένζυμα και με τη δεοξυαιμοσφαιρίνη και συνεπώς συμμετέχει στη ρύθμιση του μονοπατιού της γλυκόλυσης (Pretini et al. 2019; Puchulu-Campanella et al. 2013). Η δράση αυτή της ζώνης 3 ενισχύεται από τη δημιουργία δεσμών με γλυκοφορίνες, το σύμπλεγμα Rhesus, το μεταφορέα γλυκόζης Glut-1, τη στοματίνη και άλλες πρωτεΐνες. Αυτές μέσω της πρωτεΐνης 4.2R και της αγκυρίνης συνδέονται με την σπεκτρίνη, ενώ μέσω των πρωτεϊνών Glut-1, p55, αδουσίνη, 4.1R και 4.2R συνδέονται με την ακτίνη (Lux 2016). Αν και αποδίδουν λειτουργικά τα μονομερή της ζώνης 3, παρατηρείται η δημιουργία ενός μεγάλου ποσοστού διμερών και τετραμερών στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων (Reithmeier et al. 2016).

A.3.2.2) Μεταφορέας Γλυκόζης GLUT-1

Ο μεταφορέας της γλυκόζης, Glut-1, είναι μία διαμεμβρανική υδρόφοβη πρωτεΐνη που αποτελείται από 492 αμινοξέα και 12 μεμβρανικές α -έλικες με ένα καρβοξυτελικό και ένα

αμινοτελικό κυτταροπλασματικό άκρο (Carruthers et al. 2009). Η πρωτεΐνη αυτή είναι υπεύθυνη για τη παθητική μεταφορά και διακίνηση της γλυκόζης, αλλά και του αφυδροασκορβικού οξέος (Docosahexaenoic acid, DHA). Κύριος ρυθμιστής της λειτουργίας της είναι η περιφερική μεμβρανική πρωτεΐνη στοματίνη, η οποία ύστερα από την πρόσδεση της στο μεταφορέα γλυκόζης αλλάζει την προτίμηση υποστρώματος από γλυκόζη σε αφυδροασκορβικό οξύ. Το DHA, στη συνέχεια, εισέρχεται στο ερυθροκύτταρο και μετατρέπεται σε ασκορβικό οξύ (οξειδωμένη βιταμίνη C), το οποίο αποτελεί σημαντικό θρεπτικό στοιχείο που δεν βιοσυντίθεται από τον άνθρωπο ((**Εικόνα 4**). Η δημιουργία αποθηκών ασκορβικού οξέος και η ανακύκλωση του στο πλάσμα συμβάλλει στην ενίσχυση του αντιοξειδωτικού δυναμικού του ερυθροκυττάρου (Hornung and Biesalski 2019). Όπως και η ζώνη 3, έτσι και ο μεταφορέας της γλυκόζης συμμετέχει στην ακεραιότητα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Mankelow, Satchwell, and Burton 2012).

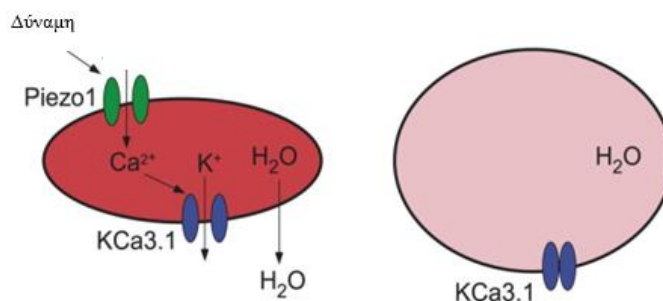


(**Εικόνα 4**): Απεικόνιση της διπλής λειτουργίας του μεταφορέα γλυκόζης Glut-1. Μεταφορά γλυκόζης και αφυδροασκορβικού οξέος. Ανατύπωση από (Hornung and Biesalski 2019).

A.3.2.3) Piezo-1 – Κανάλια Gardos

Η πρωτεΐνη Piezo-1 αποτελεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο PIEZO1 και λειτουργεί ως κανάλι ιόντων. Λειτουργεί υπό την επίδραση μηχανικής καταπόνησης και συμβάλλει στη διατήρηση του όγκου του ερυθροκυττάρου. Αυτό συμβαίνει με την μετατροπή του μηχανικού ερεθίσματος σε ροή κατιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}). Παρουσία αυξημένης ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου, ενεργοποιούνται τα κανάλια Gardos, τα οποία πυροδοτούν την αύξηση εκροής ιόντων καλίου (K^+) και μορίων νερού, όπως φαίνεται και στην ((**Εικόνα 5**). Με τον τρόπο αυτό, τα ερυθρά αιμοσφαίρια ελαττώνουν τον όγκο τους, ως απόκριση στο μηχανικό στρες που δέχονται κατά την κυκλοφορία τους στον οργανισμό (Cahalan

et al. 2015). Έχει αποδειχθεί ότι αυτή η μείωση του κυτταρικού όγκου δημιουργεί ευνοϊκές συνθήκες για την ανταλλαγή αερίων, όπως είναι το οξυγόνο με το διοξείδιο του άνθρακα (Rao et al. 2009).



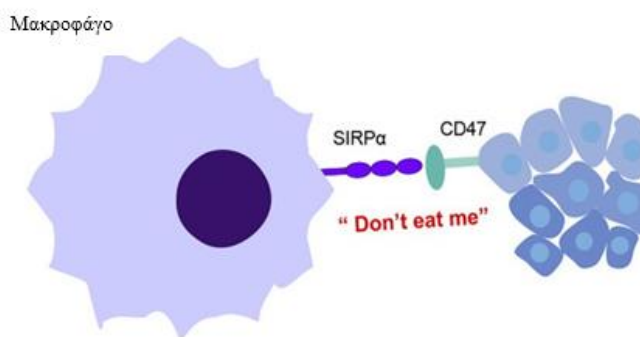
(Εικόνα 5): Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου της πρωτεΐνης Piezo-1 και των καναλιών Gardos στη ρυθμιστή του όγκου του κυττάρου ύστερα από τη δράση μηχανικού στρες. Η δράση της Piezo-1 ενεργοποιείται με την άσκηση μηχανικής καταπόνησης, η οποία μεταφράζεται σε αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωση Ca^{2+} . Έτσι ενεργοποιούνται τα κανάλια Gardos και παρατηρείται αυξημένη εκροή K^+ και μορίων H_2O . Ανατύπωση από (Patel, Demolombe, and Honore 2015).

Ο ακριβής τρόπος λειτουργίας του καναλιού Piezo-1 δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Ωστόσο, υπάρχουν δύο επικρατέστερες υποθέσεις για το μηχανισμό δράσης του. Η μία υπόθεση, η οποία είναι γνωστή και ως μοντέλο “δύναμης από τα λιπίδια”, περιγράφει την επίδραση της μηχανικής δύναμης στη λιπιδική διπλοστιβάδα. Το μηχανικό στρες είναι δυνατό να προκαλέσει αναδιάταξη της λιπιδικής δομής της ερυθροκυτταρικής στιβάδας και έτσι το κανάλι Piezo-1 ανοίγει. Η άλλη θεωρία αφορά στο μοντέλο “δύναμης από τα νήματα”, το οποίο βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις του καναλιού Piezo-1, είτε με τις μεμβρανικές σκελετικές πρωτεΐνες, είτε με το εξωκυτταρικό περιβάλλον (Murthy, Dubin, and Pataroutian 2017).

A.3.3) Περιφερικές Μεμβρανικές Πρωτεΐνες

A.3.3.1) CD47

Η πρωτεΐνη CD47, γνωστή και ως δείκτης-εαυτού, διέρχεται από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη πέντε φορές, με το αμινοτελικό άκρο της να εκβάλλει στον εξωκυττάριο χώρο και το καρβοξυτελικό στο κυτταρόπλασμα (Oldenborg et al. 2000). Η έκθεση αυτής της πρωτεΐνης στα κύτταρα εκφράζει σήμα αναγνώρισης εαυτού από τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Ειδικότερα, τα μακροφάγα μέσω του επιφανειακού υποδοχέα SIRPα αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη CD47 των ερυθροκυττάρων αποτρέποντας την φαγοκυττάρωση τους, σήμα “don't eat me” (Sosale et al. 2015) ((**Εικόνα 6**). Όμως, δομικές αλλαγές της πρωτεΐνης ή μειωμένη παρουσία της στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι δυνατόν να σηματοδοτήσει την εκκαθάριση του ερυθροκυττάρου από την κυκλοφορία (Burger et al. 2012).



(**Εικόνα 6**): Σχηματική αναπαράσταση της CD47 ως “δείκτης εαυτού”. Όταν ο υποδοχέας SIRPα στα μακροφάγα αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη CD47 στον ερυθροκυττάρων αποτρέπεται η φαγοκυττάρωση. Ανατύπωση από (Huang et al. 2020).

A.3.3.2) Στοματίνη

Η πρωτεΐνη στοματίνη εκφράζεται στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, χωρίς να τη διαπερνά και αποτελεί το βασικό συστατικό της ζώνης 7, για αυτό και ονομάζεται πρωτεΐνη 7.2. Περιλαμβάνει ένα αμινοτελικό κυτοσολικό άκρο εξαιρετικά υδρόφοβο και ένα καρβοξυτελικό κυτοσολικό άκρο. Ο ρόλος της σχετίζεται με την αλληλεπίδραση και την ρύθμιση πρωτεϊνών μεταφοράς, όπως είναι ο μεταφορέας γλυκόζης Glut-1, ο ανιοντοανταλλάκτης 1 (AE1) και η υδατοπορίνη-1 (Genetet et al. 2017). Η στοματίνη, επίσης, είναι κύριο συστατικό των λιπιδικών σχεδίων (Lapatsina et al. 2012).

A.3.4) Μεμβρανοσυνδεόμενες Πρωτεΐνες

A.3.4.1) Υπεροξειδοξίνη -2

Η υπεροξειδοξίνη-2 (Peroxiredoxin, Prx-2) αποτελεί την τρίτη πιο άφθονη πρωτεΐνη στα ερυθροκύτταρα και ανήκει στην κατηγορία των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Low, Hampton, and Winterbourn 2008). Σε υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), συμπεριλαμβανομένου και αυτού που προέρχεται από την αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης, η Prx-2 συνδέεται στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη θειορεδοξίνη αναγάγει τα υπεροξειδία (Oh et al. 2022). Συνεπώς, η πρόσδεση της πρωτεΐνης Prx-2 στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων προστατεύει το κύτταρο από οξειδωτικές βλάβες και για αυτό μπορεί να θεωρηθεί δείκτης της οξειδωτικής του κατάστασης (Ishida et al. 2014).

A.3.5) Κυτταροσκελετός

Ο κυτταροσκελετός αποτελεί δυσδιάστατο υπομεμβρανικό δίκτυο που είναι σε στενή σχέση με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Τα σημαντικότερα πρωτεϊνικά συστατικά του είναι η α - και β -σπεκτρίνη, η ακτίνη, η αγκυρίνη, η πρωτεΐνη 4.1R, η αδουσίνη, η δεματίνη, η τροπομυοσίνη και η τροπομοντουλίνη (Mohandas and Gallagher 2008).

A.3.5.1) Σπεκτρίνη

Η σπεκτρίνη αποτελεί τη βασικότερη υπομεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο αντιπαράλληλες αλυσίδες α - και β -σπεκτρίνης. Οι αλυσίδες αυτές δέχονται πλευρικές δυνάμεις και σχηματίζουν αντιπαράλληλα ετεροδιμερή που, τελικά, οδηγούν στην δημιουργία ενός ετεροτετραμερούς. Η πρωτεΐνη σπεκτρίνη φέρει θέσεις πρόσδεσης για πολλές πρωτεΐνες, όπως είναι η αγκυρίνη, η ακτίνη, οι πρωτεΐνες 4.1R, 4.2 και τα νημάτια ακτίνης (Mohandas and Gallagher 2008).

A.3.5.2) Ακτίνη

Η ακτίνη παρουσιάζεται στη μεμβράνη με τη μορφή νηματίων F - ακτίνης, τα οποία σχηματίζουν κυρίως μονομερή. Η σπεκτρίνη μπορεί μέσω τη πρωτεΐνης 4.1R να συνδεθεί με την ακτίνη, όπως και διάφορες άλλες σκελετικές πρωτεΐνες. Επίσης, η τροπομυοσίνη ελέγχει το μήκος των νηματίων και οι πρωτεΐνες αδουσίνη και τροπομοντουλίνη καλύπτουν τα άκρα τους (Lux 2016).

A.3.5.3) Δεματίνη – Αδουσίνη – Τροπομυοσίνη – Τροπομοντουλίνη

Η δεματίνη, όπως και η αδουσίνη είναι σε συνεχή αλληλεπίδραση με τα νημάτια F – ακτίνης, τα οποία και σταθεροποιούν διευκολύνοντας την σύνδεση τους με την πρωτεΐνη σπεκτρίνη. Επιπλέον, συμμετέχουν στις κάθετες συνδέσεις της μεμβράνης με τον κυτταροσκελετό, καθώς μπορούν να δεσμεύονται σε μεμβρανικές πρωτεΐνες (Lux 2016). Η τροπομυοσίνη αποτελεί ένα μακροσκελές διμερές που συνιστάται από α – και γ – ισομορφές τροπομυοσίνης, οι οποίες προσδένονται μεμονωμένα σε μία από τις δύο έλικες που είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία των νηματίων ακτίνης (Mohandas and Gallagher 2008). Ωστόσο, η τροπομοντουλίνη ρυθμίζει το μήκος, καθώς και την οργάνωση των νηματίων ακτίνης, εμποδίζοντας τη σύνδεση της τροπομυοσίνης στην ακτίνη (Yamashiro et al. 2012).

A.3.5.4) Πρωτεΐνη 4.1R

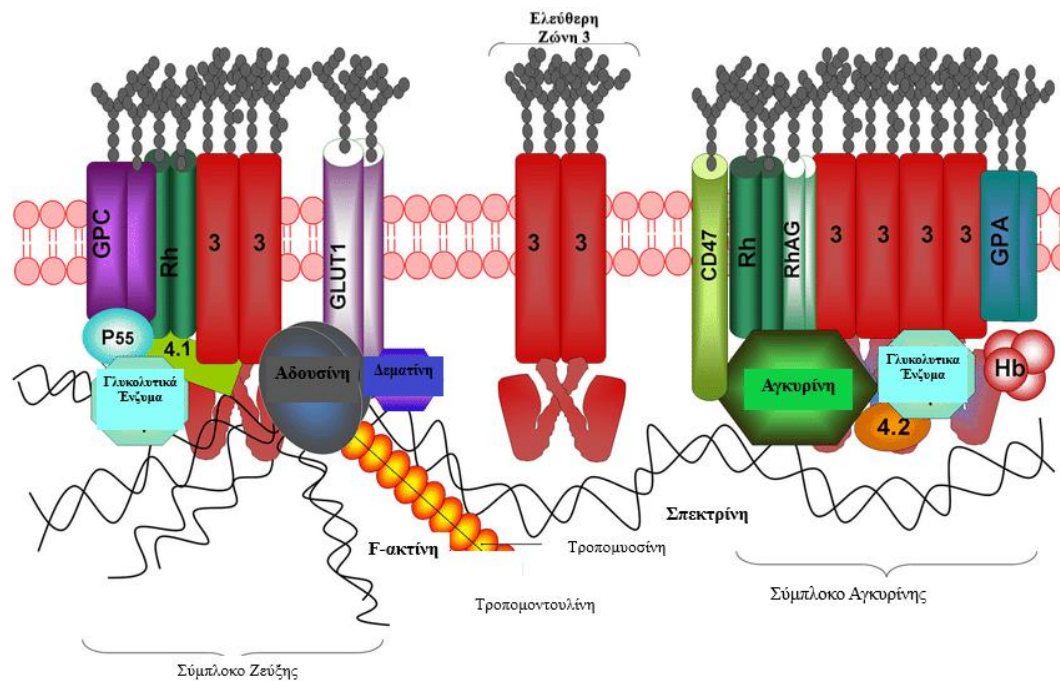
Φυσιολογικά, δεν εμφανίζεται υψηλή συγγένεια σύνδεσης μεταξύ σπεκτρίνης και νηματίων F-ακτίνης. Η πρωτεΐνη 4.1R μεσολαβεί στη δέσμευση αυτών των δύο πρωτεϊνών, δημιουργώντας έτσι ένα ισχυρό σύμπλοκο. Επίσης, μέσω του αμινοτελικού της άκρου συμβάλλει στη πρόσδεση άλλων πρωτεϊνών, όπως είναι η ζώνη 3, η πρωτεΐνη p55 και η γλυκοφορίνη C (Lux 2016). Συνεπώς, η πρωτεΐνη 4.1R καθορίζει την οργάνωση και τη σταθερότητα του υπομεμβρανικού σκελετού, αλλά και την παραμορφωσιμότητα του ερυθροκυττάρου (Salomao et al. 2008).

A.3.5.5) Αγκυρίνη

Ο ρόλος της αγκυρίνης εστιάζεται στην πρόσδεση διάφορων πρωτεϊνών στη λιπιδική διπλοστιβάδα, όπως και στη σύνδεση της πρωτεΐνης σπεκτρίνης στο σύμπλεγμα της ζώνης 3. Διακρίνεται σε τρεις λειτουργικές περιοχές: το αμινοτελικό άκρο για τη σύνδεση με τετραμερή της ζώνης 3, την κεντρική περιοχή για τη δέσμευση της σπεκτρίνης και το καρβοξυτελικό άκρο που έχει ρυθμιστικό ρόλο. Η σύνδεση της αμινοτελικής περιοχής με την ζώνη 3 εξυπηρετεί την αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο Rh-RhAG (Lux 2016).

A.3.6) Σύμπλοκα Ερυθροκυτταρικής Μεμβράνης

Τα σύμπλοκα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης εξασφαλίζονται μέσω κάθετων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υποκείμενων κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών και των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και μέσω οριζόντιων αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και το εσωτερικό της μεμβράνης. Τα βασικότερα σύμπλοκα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης είναι 3: σύμπλοκο αγκυρίνης/ζώνης 3, σύμπλοκο Rhesus και το σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης (Lux 2016), όπως φαίνεται και στην **((Εικόνα 7))**.



(Εικόνα 7): Σχηματική Αναπαράσταση των συμπλόκων της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Ανατύπωση από (Kodippili et al. 2012).

A.3.6.1) Σύμπλοκο Αγκυρίνης/Ζώνης 3

Το σύμπλοκο αυτό απαρτίζεται από ένα τετραμερές της ζώνης 3 που μέσω του αμινοτελικού του άκρου ενώνεται με την πρωτεΐνη 4.2 και την αγκυρίνη. Κατά επέκταση, η αγκυρίνη θα συνδεθεί με την κυτταροσκελετική σπεκτρίνη. Στο σύμπλοκο συμμετέχουν, επίσης, διμερή ή ετεροδιμερή γλυκοφορίνων και το σύμπλοκο Rhesus (θα αναλυθεί παρακάτω) (Lux 2016).

A.2.6.2) Σύμπλοκο Ζεύξης Ακτίνης

Στο σύμπλοκο αυτό παρατηρείται η δημιουργία ενός πυρήνα ζεύξης που αποτελείται από 6 μόρια πρωτεΐνης 4.1R και 6 μόρια σπεκτρίνης, δεσμευμένα με 1 μόριο ακτίνης, αλλά και από επαρκή ποσότητα γλυκοφορίνων A,B και C, πρωτεϊνών ζώνης 3, Glut1 και στοματίνης. Στο σύμπλοκο αυτό αλληλεπιδρούν, επίσης, και άλλες πρωτεΐνες, πως η αδουσίνη και η δεματίνη που αλληλεπιδρούν με τον μεταφορά γλυκόζης Glut1 και δημιουργούν το σύμπλοκο του μεταφορά γλυκόζης (Lux 2016; Mohandas and Gallagher 2008).

A.2.6.3) Σύμπλοκο Rhesus

Τα κύρια συστατικά του συμπλόκου είναι τα πολυπεπτίδια Rh και η γλυκοπρωτεΐνη RhAG που εμφανίζεται κυρίως ως ετεροτριμερές (RhAG₂Rh) και συνδέεται με τη γλυκοφορίνη B, την πρωτεΐνη CD47 και τη γλυκοπρωτεΐνη Landsteiner – Wiener. Το σύμπλοκο Rhesus αλληλεπιδρά

με ένα σύμπλοκο που ονομάζεται μακροσύμπλοκο της ζώνης 3, το οποίο σχηματίζεται ύστερα από την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης CD47 με την πρωτεΐνη 4.2. Η σύνδεση μεμβράνης κυτταροσκελετού επιτυγχάνεται με την αμοιβαία επίδραση του RhAG₂Rh στο μόριο της αγκυρίνης (Van Kim, Colin, and Cartron 2006).

A4) Μεταβολισμός Ερυθροκυττάρου

Η λειτουργικότητα του ερυθρού αιμοσφαιρίου εξασφαλίζεται κατά κύριο λόγο από τον ενεργό μεταβολισμό του. Η μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς του οργανισμού, η διατήρηση της οσμωτικότητας του ερυθροκυττάρου και η προστασία του από οξειδωτικές βλάβες που μπορεί να οδηγήσουν στη λύση του, απαιτούν συνεχή παροχή ενέργειας. Εφόσον το ερυθροκύτταρο δε διαθέτει μιτοχόνδρια, διασφαλίζει την απαραίτητη αυτή ενέργεια μέσω του αναερόβιου μεταβολισμού και ιδίως μέσω της γλυκόλυσης (Silverthorn 2018).

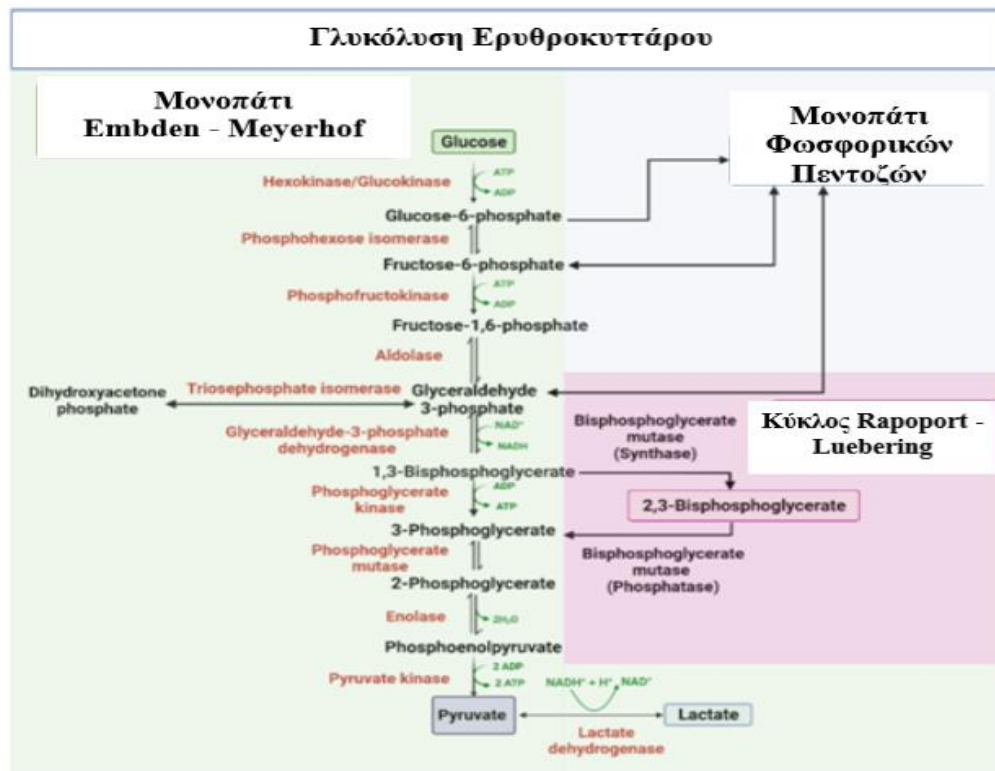
A.4.1) Μεταβολισμός Γλυκόζης

Ο καταβολισμός της γλυκόζης σηματοδοτείται με την είσοδο της γλυκόζης στο ερυθροκύτταρο μέσω του μεταφορέα γλυκόζης Glut-1 και ακολουθεί δύο σημαντικά μονοπάτια που είναι τα μονοπάτια της γλυκόλυσης, γνωστό και ως Embden – Meyerhof και των φωσφορικών πεντοζών (Chaudhry and Varacallo 2023; Aziz and Mohiuddin 2023).

Η γλυκόλυση λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα των ερυθροκυττάρων και αρχίζει με τη δράση του ενζύμου εξοκινάση, όπως διακρίνεται και στην **((Εικόνα 8))**. Ακόμα και σε συνθήκες χαμηλού κυτταρικού αποθέματος γλυκόζης, η εξοκινάση μετατρέπει την ενδοκυττάρια γλυκόζη σε 6-φωσφορική γλυκόζη λόγω της υψηλής συγγένειας που παρουσιάζει με το υπόστρωμα. Στο 6^ο βήμα του ενζυμο - καταλυόμενου αυτού μονοπατιού η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GADPH) καταλύει τη μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης σε 1,3 – δισφωγλυκερικό και στη συνέχεια μέσω διαδοχικών αντιδράσεων, το 1,3 – δισφωγλυκερικό με τη δράση της διφωσφογλυκερικής μουτάσης μετατρέπεται σε 2,3 – διφωσφογλυκερικό οξύ (2,3-diphosphoglycerate, 2,3-DPG), το οποίο εισέρχεται στο κύκλο Rapoport – Luebering, παρακάμπτοντας το επόμενο στάδιο της γλυκόλυσης. Αύξηση στη συγκέντρωση του 2,3-DPG ενισχύει την εκλεκτική δέσμευση του με τη δεοξυαιμοσφαιρίνη και συνεπώς επιτρέπει την ευκολότερη απελευθέρωση του οξυγόνου στους

ιστούς του οργανισμού λόγω μειωμένης συγγένειας του με την αιμοσφαιρίνη. Μέσω αυτού του κύκλου, λοιπόν, ρυθμίζεται η συγγένεια του οξυγόνου με την αιμοσφαιρίνη (Cho et al. 2008). Στο τελευταίο στάδιο της γλυκόλυσης η πυροσταφυλική κινάση παράγει πυροσταφυλικό και ένα μόριο τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate, ATP) με υπόστρωμα το φωσφοενολοπυρουβικό. Τελικά, από το μονοπάτι της γλυκόλυσης παράγονται 2 μόρια ATP από κάθε μόριο γλυκόζης (Chaudhry and Varacallo 2023).

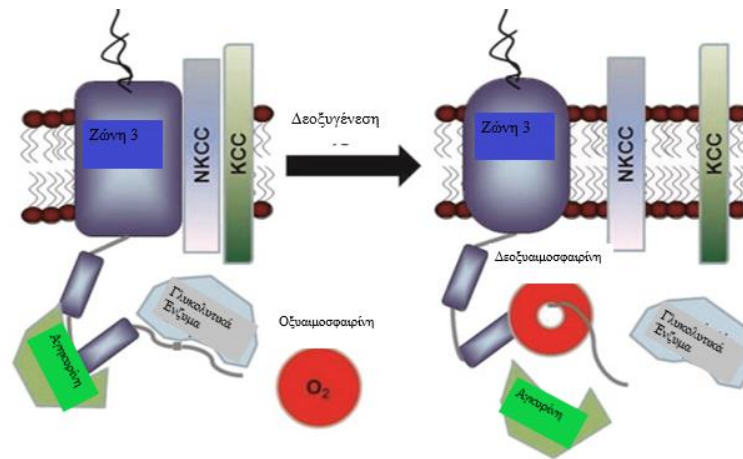
Η γλυκόζη, ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου, μπορεί να ακολουθήσει τη γλυκολυτική οδό ή εναλλακτικά το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Ο κύκλος των φωσφορικών πεντοζών λαμβάνει δράση στο κυτταρόπλασμα παράλληλα με το μονοπάτι Embden-Meyerhof και αποσκοπεί στη παραγωγή αναγωγικής δύναμης φωσφορικού δινουκλεοτιδίου νικοτιναμιδικής αδενίνης (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) για την καταπολέμηση της οξειδωτικής καταπόνησης. Αποτελείται από δύο επιμέρους φάσεις, την οξειδωτική που είναι αναστρέψιμη και τη μη οξειδωτική που είναι μη αναστρέψιμη. Κατά την οξειδωτική φάση, το ένζυμο αφυδρογονάση της γλυκόζης-6-φωσφορικής (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD) μετατρέπει την 6-φωσφορική γλυκόζη σε 6-φωσφογλυκονικό και παράγεται ως παραπροϊόν ένα μόριο NADPH. Τελικά, παράγεται η 5 – φωσφορική ριβουλόζη και ένα ακόμη μόριο NADPH. Συνεπώς, συνολικά από την οξειδωτική φάση προκύπτουν 2 αναγωγικά μόρια NADPH. Κατά την μη οξειδωτική φάση του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών πραγματοποιείται η μετατροπή της 5-φωσφορικής ριβουλόζης σε 5-φωσφορική ριβόζη χωρίς να παρατηρείται η δημιουργία μορίων NADPH. Η 5-φωσφορική ριβόζη σε αυτή τη φάση μπορεί να οδηγηθεί στη γλυκολυτική οδό σαν 6-φωσφορική φρουκτόζη με τη παρουσία του ενζύμου τρανσκετολάση (Aziz and Mohiuddin 2023).



(Εικόνα 8): Απεικόνιση των μεταβολικών μονοπατιών του ερυθροκυττάρου. Ανατύπωση από (Alramadhani et al. 2022)

A.4.2) Ρύθμιση Μεταβολισμού Γλυκόζης

Σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν, το οξυγόνο αποτελεί το κύριο ρυθμιστή του μεταβολισμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Μάλιστα, έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει οξυγονοεξαρτώμενη αλληλεπίδραση μεταξύ του κυτοσολικού άκρου της ζώνης 3 και των γλυκολυτικών ενζύμων, όπως είναι το GADPH, η φωσφοφρουκτοκινάση και η αλδολάση. Παρατηρείται, όμως, και υψηλή συγγένεια της δεοξυαιμοσφαιρίνης με το αμινοτελικό αυτό άκρο της ζώνης 3. Το γεγονός αυτό προκαλεί έντονο ανταγωνισμό μεταξύ των γλυκολυτικών ενζύμων και της δεοξυαιμοσφαιρίνης για τη πρόσδεση τους στη μεμβρανική πρωτεΐνη. Όπως φαίνεται και στην ((Εικόνα 9) σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου τα ένζυμα απομακρύνονται από τη θέση δέσμευσης και ενεργοποιούνται προάγοντας έτσι τη γλυκολυτική οδό. Αντίθετα, σε υψηλά επίπεδα οξυγόνου τα ένζυμα προσδέονται στη ζώνη 3 και απενεργοποιούνται, στρέφοντας τον μεταβολισμό προς το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Είναι σαφές, λοιπόν, ότι η κατάσταση οξυγόνωσης του ερυθροκυττάρου διατηρεί την ισορροπία ανάμεσα στα μονοπάτια της γλυκόλυσης και των φωσφορικών πεντοζών (Campanella, Chu, and Low 2005; Stefanovic et al. 2013).



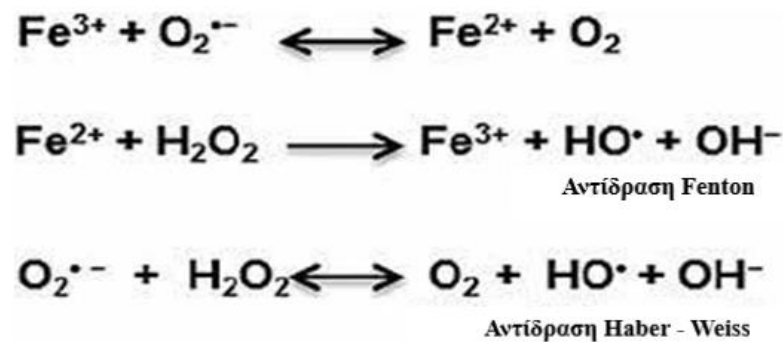
(Εικόνα 9): Σχηματική απεικόνιση της οξυγονοεξαρτώμενης ρύθμισης του μεταβολισμού της γλυκόζης. Σε υψηλά επίπεδα O_2 τα γλυκολυτικά ένζυμα προσδένονται στη θέση πρόσδεσης στη ζώνη 3 και απενεργοποιούνται προάγοντας τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών. Αντίθετα, σε χαμηλά επίπεδα O_2 τα γλυκολυτικά ένζυμα απομακρύνονται από τη θέση πρόσδεσης της ζώνης 3 και ενεργοποιούνται προάγοντας την γλυκολυτική οδό. Ανατύπωση από (Sega et al. 2015).

A.4.3) Μεταβολισμός Οξειδωτικών Ριζών

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια παρουσιάζουν σημαντική συμβολή στην ομοιοστάση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Συγκεκριμένα, τα ερυθροκύτταρα είναι μεταφορείς αντιοξειδωτικών μορίων, ενζύμων και βιταμινών τα οποία λειτουργούν ως προστάτες των κυττάρων από βλάβες, που είναι δυνατόν να προκαλέσουν τη λύση τους, λόγω αυτοοξειδωσης της αιμοσφαιρίνης. Η εναλλαγή οξυγονωμένης και μη οξυγονωμένης μορφής της αιμοσφαιρίνης καθορίζει την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και συνεπώς ρυθμίζει το αντιοξειδωτικό δυναμικό του αίματος (Kuhn et al. 2017). Η διαταραχή αυτού του οξειδωαναγωγικού ισοζυγίου καλείται οξειδωτικό στρες (Bissinger et al. 2019).

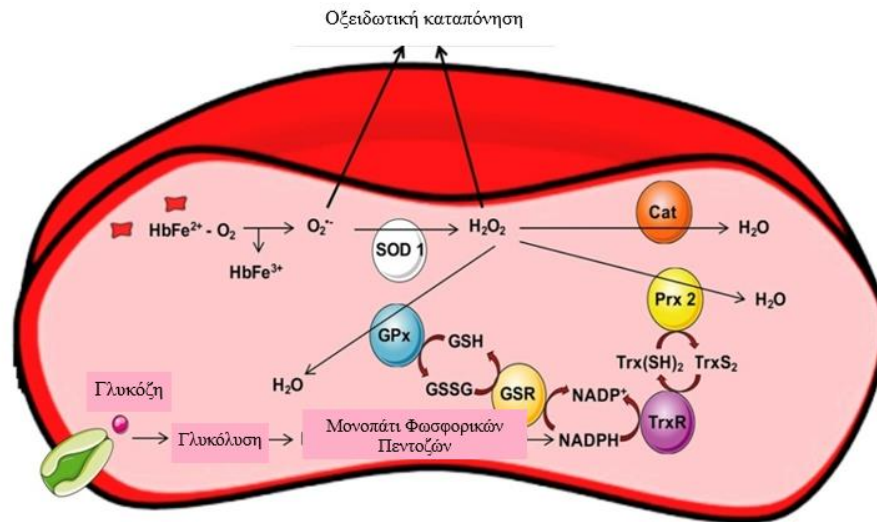
Οι ρίζες υπεροξειδικών ανιόντων (O_2^-) και η μεθαιμοσφαιρίνη που παράγονται λόγω οξείδωσης της αιμοσφαιρίνης αποτελούν τις σημαντικότερες πηγές οξειδωτικού στρες στα ερυθροκύτταρα (Bissinger et al. 2019). Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου μέσω της συμμετοχής τους σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο σχετίζεται με τη παραγωγή δραστικών ριζών υδροξυλίου και οξειδωμένου σιδήρου, μέσω των αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss (Perrone et al. 2023) ((Εικόνα 10). Ωστόσο, ο ελεύθερος σίδηρος δύναται να απομακρυνθεί με τη δράση της φερριτίνης των ερυθροκυττάρων. Φυσιολογικά, η μεθαιμοσφαιρίνη παρουσία της αναγωγάσης της μεθαιμοσφαιρίνης και του ηλεκτρονιοδότη δινουκλεοτίδιο νικοτιναμδικής αδενίνης (nicotinamide adenine dinucleotide,

NADH) ανακυκλώνεται στη λειτουργική της μορφή, όμως σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες μετατρέπεται σε αιμοχρώματα. Οι δομές αυτές δεσμεύονται ομοιοπολικά στις ερυθροκυτταρικές μεμβρανικές πρωτεΐνες, ιδίως στη ζώνη 3 και παρεμποδίζουν την ελαστικότητα του κυττάρου (Kuhn et al. 2017).



(Εικόνα 10): Αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss. Μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων οι δραστικές ρίζες οξυγόνου παράγουν υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το H₂O₂ παράγει δραστικές ρίζες υδροξυλίου και οξειδωμένου σιδήρου. Ανατύπωση από (Singh et al. 2014).

Για την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες το ερυθροκύτταρο διαθέτει ένα σύστημα αντιοξειδωτικών ενζυματικών και μη ενζυματικών παραγόντων (Kuhn et al. 2017). Οι κυριότερες μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι, όπως προαναφέρθηκε το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) και η γλουταθειόνη, ενώ οι ενζυματικές είναι η αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase, Gpx), η υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase, SOD), η καταλάση (catalase, CAT) και οι υπεροξειδοξίνες (peroxidoxin, Prdx) (Pastore et al. 2001; Mohanty, Nagababu, and Rifkind 2014). Πολύ σημαντικοί συμπαραγόντες αυτών των αντιοξειδωτικών μηχανισμών αποτελούν οι αναγωγικές μορφές NADH και NADPH (Kuhn et al. 2017), όπως παρατηρούμε και στην ((Εικόνα 11).



(Εικόνα 11): Σχηματική αναπαράσταση της δράσης των ενζυματικών και μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών του ερυθροκυττάρου. Οι μηχανισμοί αυτοί καταπολεμούν το οξειδωτικό στρες. Ανατύπωση από (Barbarino et al. 2021).

A5) Ερυθροκυτταρική Γήρανση

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν μία αυστηρά καθορισμένη διάρκεια ζωής περίπου τεσσάρων μηνών, με την πάροδο των οποίων υφίστανται μία φυσιολογική διαδικασία που ονομάζεται γήρανση και οδηγεί στην απώλεια λειτουργικότητας και ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης (Orbach et al. 2017). Οι αλλαγές αυτές είναι αποτέλεσμα της έντονης φυσικής και βιοχημικής καταπόνησης που υπόκεινται τα ερυθρά κύτταρα κατά το κύκλο ζωής των 120 ημερών. Ειδικότερα, τα ερυθροκύτταρα, καθώς διέρχονται από τα τριχοειδή αγγεία, παρουσιάζουν, είτε έντονη παραμορφωσιμότητα και μηχανικές μεμβρανικές αλλαγές ως απόκριση στις διάφορες διατμητικές τάσεις, είτε ισχυρό χημικό στρες εξαιτίας της αυξημένης συσσώρευσης δραστικών ριζών και οξειδωτικών ουσιών (Badiou and Casey 2018). Τα γηρασμένα κύτταρα, τελικά, απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος ύστερα από εξωτερίκευση PS στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, μείωση των επιπέδων σιαλικού οξέος, φωσφολιπιδίων, χοληστερόλης (Morioka, Maueroeder, and Ravichandran 2019) και διάφορες αλλαγές στην ενζυμική ενεργότητα (D'Alessandro et al. 2013). Η ερυθροκυτταρική γήρανση, επίσης, συνοδεύεται από μικροκυστιδιοποίηση, η οποία οδηγεί στην απώλεια αιμοσφαιρίνης και μεμβρανικών υλικών και ακολούθως στην συρρίκνωση του κυττάρου (Garcia-Roa et al. 2017). Το οξειδωτικό στρες είναι γνωστό πως αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ερυθροκυτταρικής γήρανσης, καθώς είναι στενά συνυφασμένο με υψηλά επίπεδα έκφρασης PS και κατά συνέπεια

με αυξημένη σηματοδότηση της πρωτεΐνης CD47 (Arias and Arias 2017). Η εκκαθάριση των γηρασμένων κυττάρων πραγματοποιείται κυρίως μέσω του ερυθρού πολφού του σπλήνα, ο οποίος είναι πλούσιος σε μακροφάγα που αναγνωρίζουν των δείκτη εαυτού, αλλά και από το ήπαρ. Σε αυτά τα όργανα γίνεται αναγνώριση και απομάκρυνση οψωνισμένων και γηρασμένων ερυθροκυττάρων που εμφανίζουν μειωμένη ελαστικότητα (Eggleton, Tenner, and Reid 2000) ή εκφράζουν διάφορα σήματα “eat-me”, όπως θα αναφερθεί παρακάτω (Klei et al. 2017).

A.5.1) Εξωτερικήυση Φωσφατιδυλοσερίνης

Η διατήρηση της ασυμμετρίας της λιπιδικής διπλοστιβάδας και ιδίως της PS εσωτερική μονοστιβάδα είναι σημαντική για την επιβίωση του ερυθροκυττάρου. Ωστόσο, *in vitro*, σε καταστάσεις οξειδωτικής καταπόνησης ενεργοποιείται η ερυθροκυτταρική προκασπάση 3 και εξωτερικεύεται η PS μέσω της τροποποίησης της ζώνης 3. Εφόσον, *in vivo* ανιχνεύονται μόρια ενεργής κασπάσης 3 πιθανολογείται ότι παρατηρείται ο ίδιος μηχανισμός, ο οποίος καταλήγει στην αναγνώριση της PS από επιφανειακούς υποδοχείς των μακροφάγων ως “eat me signal” (Klei et al. 2017; Mandal et al. 2003). Λαμβάνοντας υπόψη πως η PS έχει πολύ ισχυρή θρομβογόνο δράση και ότι τα περισσότερα εξωκυττάρια κυστίδια που προέρχονται από ερυθροκύτταρα φέρουν εξωτερικευμένη PS, είναι πιθανό να συμμετέχει στη γήρανση και στην απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε καταστάσεις στρες, αλλά όχι ως κύριος μηχανισμός ερυθροκυτταρικής γήρανσης (Antonelou, Kriebardis, and Papassideri 2010).

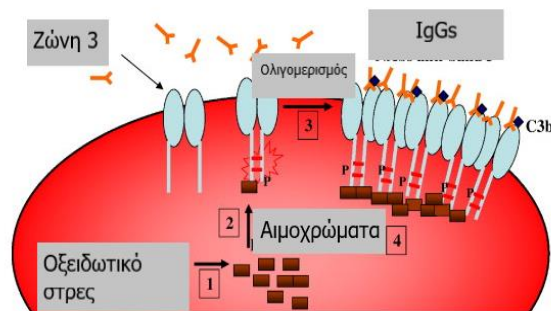
A.5.2) Μονοπάτι Συσχετιζόμενο με την Πρωτεΐνη CD47

Η πρωτεΐνη CD47 στα νεαρά ερυθροκύτταρα, ασκεί ανασταλτική δράση στα μακροφάγα γνωστή ως “don’t eat me signal”. Η δράση της αυτή στηρίζεται στη δέσμευση της στον υποδοχέα SIRPa των μακροφάγων (Sosale et al. 2015). Όμως, στα γηρασμένα ερυθρά κύτταρα λόγω προοδευτικής μείωσης της παρουσίας της στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη ή λόγω στερεοδομικών αλλαγών στη δομή της, η δράση της ως αναστολέας της φαγοκυττάρωσης εξασθενεί ραγδαία. Η τροποποιημένη μορφή της CD47 αναγνωρίζεται από τη θρομβοσπονδίνη-1 (Thrombospondin-1, TSP-1), γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία μία νέας θέσης πρόσδεσης για τον SIRPa και στην εκπομπή σήματος εκκαθάρισης από τα φαγοκύτταρα (Burger et al. 2012).

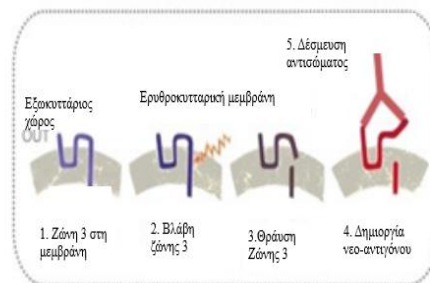
A.5.3) Μονοπάτι Συσχετιζόμενο με την Πρωτεΐνη Ζώνη 3

Ένα από τα κυριότερα μονοπάτια που συμβάλλουν στην ερυθροκυτταρική γήρανση, είναι το μονοπάτι που σχετίζεται με τη πρωτεΐνη ζώνη 3, καθώς είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό του νέο-αντιγόνου γήρανσης, που αποτελεί ισχυρό σήμα γήρανσης (Antonelou, Kriebardis, and

Papassideri 2010). Ο οψωνισμός της ζώνης 3 οφείλεται κυρίως σε αποδόμηση ή πρωτεόλυση (Bosman 2013), σε στερεοδιαταξικές τροποποιήσεις, σε οξείδωση ή διασύνδεση της αιμοσφαιρίνης κυτταροπλασματικά (Hornig and Lutz 2000) και σε πλευρική κατανομή πρωτεϊνών (Turrini et al. 1991). Υπάρχουν δύο επικρατέστερα μοντέλα, κατά τα οποία τα αυτόλογα IgGs συνδέονται στη ζώνη 3 και έτσι αναγνωρίζονται από τα φαγοκύτταρα, όπως είναι τα ηπατικά Kupffer (Xu et al. 2019). Στο πρώτο μοντέλο παρατηρείται κυτταροπλασματική συσσώρευση οξειδωμένων αιμοχρωμάτων με μεγαλύτερη συγγένεια από την αιμοσφαιρίνη που προκαλούν τον ολιγομερισμό της (Pantaleo et al. 2008) ((Εικόνα 12). Η άλλη θεωρία βασίζεται στη πρωτεόλυση και απελευθέρωση ή αποκάλυψη μη προσβάσιμων αντιγονικών θέσεων στη ζώνη 3 των γηρασμένων ερυθροκυττάρων (Bosman 2013) ((Εικόνα 13).



(Εικόνα 12): Δημιουργία νέο-αντιγόνου γήρανσης Ζώνης 3 μέσω αιμοχρωμάτων. Η οξειδωτική καταπόνηση προκαλεί συσσώρευση αιμοχρωμάτων κυτταροπλασματικά, προκαλώντας τον ολιγομερισμό της Hb. Έτσι, αυτόλογα IgGs συνδέονται στη πρωτεΐνη ζώνη 3 και αναγνωρίζονται από τα φαγοκύτταρα. Ανατύπωση από (Pantaleo et al. 2008).



(Εικόνα 13): Δημιουργία νέο-αντιγόνου γήρανσης μέσω θραύσεις πρωτεϊνών. Βλάβη της ζώνης 3 λόγω πρωτεόλυσης και απελευθέρωσης μη προσβάσιμων αντιγονικών θέσεων στη πρωτεΐνη ζώνη 3. Έτσι, τα αυτόλογα IgGs συνδέονται στη πρωτεΐνη ζώνη 3 και αναγνωρίζονται από τα φαγοκύτταρα. Ανατύπωση από (Bosman 2013).

A.5.4) Εξωαγγειακή Εκκαθάριση Ερυθρών Αιμοσφαιρίων

Τα ερυθροκύτταρα χαρακτηρίζονται κυρίως από ελαστικότητα και παραμορφωσιμότητα (Baskurt and Meiselman 2003) και τα σημαντικότερα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους είναι το σχήμα, το μέγεθος και η αναλογία επιφάνειας προς όγκο (Duez et al. 2015). Αλλαγές σε ένα από αυτά τα χαρακτηριστικά προκαλεί προβλήματα στη λειτουργική και μηχανική συμπεριφορά των ερυθρών (Dinkla et al. 2014). Για παράδειγμα, ο πολυμερισμός της ενδοκυττάριας αιμοσφαιρίνης μειώνει τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες της μεμβράνης, αυξάνοντας την ακαμψία των ερυθροκυττάρων, ενώ μεταβολές στις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού που συνδέουν το δίκτυο σπεκτρίνης με τη μεμβράνη οδηγούν στη προοδευτική μείωση της αναλογίας επιφάνειας προς όγκου. Στις συνθήκες αυτές, τα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται από την κυκλοφορία και οδηγούνται στο σπλήνα για φαγοκυττάρωση (Duez et al. 2015).

Ο σπλήνας αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά όργανα εκκαθάρισης των ερυθροκυττάρων και εξουδετέρωσης τοξικών επιδράσεων της αιμοσφαιρίνης. Μέσω της εξειδικευμένης δομής του φλεβικού συστήματος, ο κόκκινος πλφός του σπλήνα συγκρατεί τα γηρασμένα και καταπονημένα ερυθρά, που εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα παραμόρφωσης. Συγκεκριμένα, τα μακροφάγα του ερυθρού πλφού (red pulp macrophages, RPM) φαγοκυτταρώνουν τα πολύ άκαμπτα ερυθροκύτταρα που δε μπορούν να περάσουν μέσα από τις διαενδοθηλιακές σχισμές του ερυθρού πλφού (Mebius and Kraal 2005). Τα RPM, καταλαμβάνουν το 50% του ερυθρού πλφού και ενεργοποιούνται ύστερα από σήματα που λαμβάνουν από συμβατικές αλληλεπιδράσεις συνδέτη-υποδοχέα, όπως είναι η εξωτερίκευση της PS, "eat-me signals" μέσω του CD47 ή το νεοαντιγόνο γήρανσης ζώνης-3. Επιπλέον, με τη φαγοκυττάρωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η αιμοσφαιρίνη αποικοδομείται και προκύπτουν παράγωγα αίμης και σιδήρου, που εξάγονται στο πλάσμα μέσω της φερροπορτίνης. Στη συνέχεια, η τρανσφερίνη μεταφέρει το σίδηρο στα κύτταρα που τον χρειάζονται συμβάλλοντας στην ομοιόσταση του σιδήρου μέσω της ανακύκλωσης του (Hentze, Muckenthaler, and Andrews 2004). Πρόσφατα έχει αποδειχθεί πως η ασβεστιοεξαρτώμενη εκροή ιόντων K^+ , μέσω των καναλιών Gardos, μειώνει τα σιαλικά

κατάλοιπα στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων επάγοντας την ενεργοποίηση μορίων προσκόλλησης. Μέσω αυτών των μορίων τα ερυθροκύτταρα δεσμεύονται στη λαμινίνη α5 στον ερυθρό πολφό και λύνονται, δημιουργώντας μεμβράνες (ghosts) που αναγνωρίζονται από τα RPMs και τελικά αποδομούνται (Klei et al. 2017). Συνεπώς, το υψηλό ποσοστό των RPM στον ερυθρό πολφό και η μοναδική δομή του σπλήνα, του επιτρέπουν να ελέγχει την ακεραιότητα των ερυθροκυττάρων (Duez et al. 2015).

Το ήπαρ αποτελεί, επίσης, ένα πολύ σημαντικό όργανο εκκαθάρισης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και ανακύκλωσης του σιδήρου (Klei et al. 2017). Έχει βρεθεί πως τα κατεστραμμένα και γηρασμένα ερυθροκύτταρα, εξαρτώμενα από την εξωτερίκευση της PS, απομονώνονται στο ηπατικό ιγμόρειο και πως τα ανθρώπινα ηπατικά επιθηλιακά κύτταρα (human splenic endothelial cells, HSECs), ανεξάρτητα από τα κύτταρα Kupffer παρεμβαίνουν στη σύνδεση των κατεστραμμένων ερυθρών κυττάρων μέσω των μεμβρανικών υποδοχέων stabilin-1 και stabilin-2. Οι υποδοχείς αυτοί παρέχουν κυρίως τις λειτουργίες της κυτταρικής προσκόλλησης στα ηπατικά μακροφάγα, της ενδοκυττάρωσης και της φαγοκυττάρωση (Xu et al. 2019).

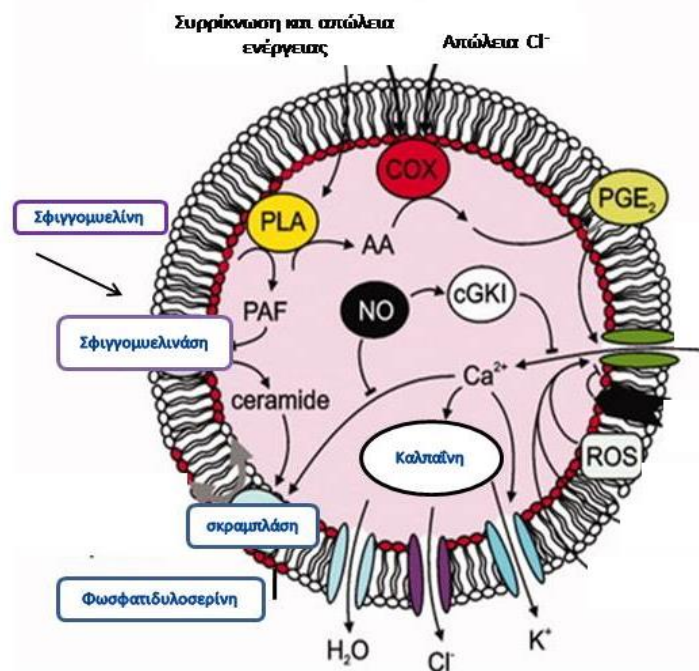
A.5.5) Οξειδωτικό Στρες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στα υγιή ερυθροκύτταρα η αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης δημιουργεί την ανενεργή μεθαιμοσφαιρίνη που μπορεί και ανακυκλώνεται στην ενεργή μορφή της. Σε διαταραχή αυτής της ισορροπίας, αυξάνονται τα επίπεδα μεθαιμοσφαιρίνης και σχηματίζονται αιμοχρώματα, τα οποία είναι παράγωγα αιμοσφαιρίνης ανίκανα να δεσμεύσουν οξυγόνο (Arese, Turrini, and Schwarzer 2005). Παρατηρείται, λοιπόν, δέσμευση και συσσώρευση της αιμοσφαιρίνης στο αμινοτελικό άκρο της ζώνης 3, τα οποία, τελικά, οδηγούν στη συσσωμάτωση της ζώνης 3, γεγονός το οποίο διευκολύνει την πρόσδεση των IgGs σε αυτήν (Shaklai, Yguerabide, and Ranney 1977).

A6) Ερυθρόπτωση

Σε προηγούμενη ενότητα αναφέρθηκε η εκκαθάριση των ερυθροκυττάρων μέσω της φυσιολογικής διαδικασίας της γήρανσης. Ωστόσο, σε περιπτώσεις βλαβών του κυττάρου λόγω οξειδωτικής, μηχανικής ή οσμωτικής καταπόνησης πυροδοτείται η πρόωρη απομάκρυνση του, μέσω προγραμματισμένου ερυθροκυτταρικού θανάτου που εμφανίζεται μόνο στα ερυθρά και

ονομάζεται ερυθρόπτωση (Lang et al. 2005). Η ερυθρόπτωση, επίσης, επάγεται από εξωγενή ή/και ενδογενή μόρια, όπως είναι παράγοντες ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF), η προσταγλαδίνη E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) ή η βιταμίνη K (Repsold and Joubert 2018). Βασικότερη αιτία ερυθρόπτωσης, αποτελεί η είσοδος ιόντων Ca²⁺ στο ερυθροκύτταρο με τη δράση της (PGE₂), που ενεργοποιεί τα ασβεστιοξαρτώμενα κανάλια K⁺, υπερπολώνει την μεμβράνη και απομακρύνει το χλωριούχο κάλιο από το ερυθροκύτταρο. Το αποτέλεσμα είναι η συρρίκνωση του ερυθροκυττάρου (Lang et al. 2005) Παρατηρείται, επίσης, φυσαλιδοποίηση της μεμβράνης λόγω ενεργοποίησης της ασβεστιοξαρτώμενης καλπαΐνης, η οποία πρωτεολύει τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες (Lang et al. 2007). Σμίκρυνση του κυττάρου απελευθερώνει τον PAF, ο οποίος ενεργοποιεί μία σφιγγομυελινάση παράγοντας κεραμίδιο. Στη συνέχεια, το κεραμίδιο πυροδοτεί μία σκραμπλάση που τελικά εξωτερικεύει PS. Τελικά, επιφανειακοί υποδοχείς των φαγοκυττάρων αναγνωρίζουν την εξωτερικευμένη PS και φαγοκυτταρώνουν το ερυθροκύτταρο (Lang et al. 2005) ((Εικόνα 14).



(Εικόνα 14): Σηματοδότηση ερυθρόπτωσης. Ενδογενή ή/ και εξωγενή μόρια επάγουν την ερυθρόπτωση. Η PGE₂ προκαλεί την είσοδο ιόντων Ca²⁺ και την εκροή ιόντων K⁺ και Cl⁻. Η καλπαΐνη προκαλεί φυσαλιδοποίηση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Ο παράγοντας PAF απελευθερώνεται και παράγει κεραμίδιο μέσω της σφιγγομυελινάσης. Το κεραμίδιο ενεργοποιεί μία σκραμπλάση που προκαλεί την εξωτερίκευση PS οδηγώντας στη φαγοκυττάρωση. Ανατύπωση από (Foller, Huber, and Lang 2008).

A7) Αποθήκευση και Αποθηκευτική Βλάβη Ερυθρών Αιμοσφαιρίων

Είναι γνωστό πως το ποσοστό μετάγγισης ερυθροκυττάρων είναι ιδιαίτερα αυξημένο σε όλο τον κόσμο, για αυτό και είναι ύψιστης σημασίας η σωστή διατήρηση αυτών των κυττάρων μετά τη συλλογή. Ο χρόνος και οι συνθήκες αποθήκευσης φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ακεραιότητα των ερυθροκυττάρων.

A.7.1) Συνθήκες Αποθήκευσης

Οι μονάδες που χρησιμοποιούνται προς μετάγγιση είναι συνήθως λευκαφαιρεμένες και παρασκευάζονται ύστερα από φυγοκέντρηση ολικού αίματος και αφαίρεση του πλάσματος. Για την διατήρηση και βελτίωση της *ex vivo* ζωής τους, προστίθενται συντηρητικά διαλύματα, όπως είναι το CPD/SAGM που περιέχει κιτρικά, φωσφορικά και δεξτρόζη (citrate, phosphate, dextrose)/αλατούχο διάλυμα, αδενίνη, γλυκόζη και μαννιτόλη (saline, adenine, glucose, mannitol) αντίστοιχα. Επιπλέον, στην Ελλάδα χρησιμοποιείται και το διάλυμα CPDA (citrate, phosphate, dextrose, adenine) που περιλαμβάνει κιτρικά, φωσφορικά, δεξτρόζη και αδενίνη. Με τη χρήση του διαλύματος CPD/SAGM τα ερυθροκύτταρα διατηρούνται έως και 42 ημέρες κυρίως λόγω της δράσης της μανιτόλης, ενώ με το διάλυμα CPDA μέχρι και 35 ημέρες (D'Amici et al. 2012).

Τα κιτρικά εμπλέκονται στη διατήρηση της οσμωτικής πίεσης που δέχονται μικρά και διαπερατά από ιόντα ερυθροκύτταρα και λειτουργούν ως ισχυρός αντιπηκτικός παράγοντας. Τα φωσφορικά και η αδενίνη προστίθενται για την επαναφορά των μειωμένων επιπέδων που εμφανίζουν κατά την αποθήκευση, ενώ η δεξτρόζη αποτελώντας ισομερές της γλυκόζης χρησιμοποιείται ως βασικό συστατικό του μεταβολισμού του ερυθροκυττάρου. Επιπλέον, η μαννιτόλη είναι ένα αντιοξειδωτικό σάκχαρο που εξουδετερώνει τις δραστικές ρίζες και συμμετέχει στη σταθεροποίηση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Lagerberg et al. 2017).

A.7.2) Αποθηκευτική Βλάβη

Η χορήγηση μονάδων συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων (packed Red Blood Cells, pRBCs) εγκυμονεί κινδύνους. Τα pRBCs κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης εμφανίζουν βιοχημικές, μηχανικές και μεμβρανικές αλλαγές, γνωστές ως αλλοιώσεις αποθήκευσης ερυθρών αιμοσφαιρίων (storage lesions). Η συσσώρευση αυτών των βλαβών κατά την αποθήκευση προκαλεί κλινικές εκδηλώσεις στους δέκτες μετά τη μετάγγιση, συμπεριλαμβανόμενης της αυξημένης θνησιμότητας (Pulliam et al. 2021). Στη συνέχεια θα αναλυθούν οι σημαντικότερες αποθηκευτικές αλλοιώσεις.

A.7.3) Βιοχημικές Βλάβες

Με την πάροδο της αποθηκευτικής περιόδου παρατηρείται εξάντληση των ποσοτήτων ATP και 2,3-DPG, γεγονός που έχει αρνητική επίδραση στην κινητική δέσμευσης και απελευθέρωσης του O₂ από την αιμοσφαιρίνη (Nemkov et al. 2016). Η μείωση του ATP επηρεάζει όλα τα συσχετιζόμενα με αυτό μονοπάτια (Tavazzi et al. 2000). Συγκεκριμένα, στο μέσο της αποθήκευσης φαίνεται η αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος ως αποτέλεσμα της μείωσης του ATP, εφόσον ο μεταβολισμός της γλυκόζης των αποθηκευμένων ερυθρών πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού της γλυκόλυσης (Messana et al. 2000). Συγχρόνως, η κάθετη πτώση των επιπέδων 2,3 – DPG, ευνοεί τον ανταγωνισμό της απο – οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης με τα γλυκολυτικά ένζυμα και τελικά τη σύνδεση της στη ζώνη 3, δυσχεραίνοντας θεωρητικά την παροχή οξυγόνου από τα αποθηκευμένα ερυθρά στους ιστούς. Μετά τη μετάγγιση τα επίπεδα ATP και 2,3 – DPG επανέρχονται στα φυσιολογικά τους επίπεδα. Συνεπώς οι βλάβες που προκαλούν είναι αναστρέψιμες (Kor, Van Buskirk, and Gajic 2009; Heaton, Keegan, and Holme 1989).

A.7.4) Μηχανικές Βλάβες

Τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα με τη πάροδο των 42 ημερών, παρουσιάζουν αλλαγές στο σχήμα τους και μετατρέπονται από δισκοειδή σε εχινοκύτταρα και τελικά σε σφαιροεχινοκύτταρα. Λόγω μεγάλης απώλειας μεμβρανικού υλικού, τα εχινοκύτταρα δεν είναι δυνατόν να επιστρέψουν στο αρχικό αμφίκιclo δισκοειδές σχήμα αυξάνοντας τη πιθανότητα απομάκρυνσης τους από τη κυκλοφορία ύστερα από τη μετάγγιση στον δέκτη. Οι βλάβες αυτές δυσχεραίνουν την ροή των ερυθρών αιμοσφαιρίων στα τριχοειδή αγγεία με αποτέλεσμα τη μειωμένη οξυγόνωση των ιστών (Berezina et al. 2002).

A.7.5) Μεμβρανικές Βλάβες

Κατά την αποθήκευση, διάφορες οξειδωμένες κυτοσολικές πρωτεΐνες, όπως και η οξειδωμένη αιμοσφαιρίνη, προσκολλώνται στη μεμβράνη και στον κυτταροσκελετό, διαταράσσοντας έτσι τις συνδέσεις μεταξύ τους. Η κατάσταση αυτή, επάγει την οξειδωτική βλάβη των δομικών πρωτεϊνών και καταλήγει στην απώλεια της ικανότητας ελαστικής παραμόρφωσης του ερυθροκυττάρου (Kriebardis et al. 2007; Barshtein, Pajic-Lijakovic, and Gural 2021). Η υπεροξείδωση των λιπιδίων αποτελεί, επίσης, σημαντική αποθηκευτική βλάβη που ευθύνεται για την αλλοίωση των συστατικών της μεμβράνης, την ελάττωση της σταθερότητας της και τη μεταβολή του σχήματος του ερυθροκυττάρου (Chaudhary and Katharia 2012). Κρίσιμη είναι η

αναδιοργάνωση των λιπιδίων της μεμβράνης, που οδηγεί στην εξωτερίκευση PS και σχετίζεται την αιμόλυση εντός της μεταγγιζόμενης μονάδας και με την κυστιδιοποίηση (Dinkla et al. 2014). Τελικά, το ερυθρό αιμοσφαίριο για να απορρίψει τα οξειδωμένα μόρια αιμοσφαιρίνης και πρωτεϊνών, κυστιδιοποιείται και αποβάλλει με τον τρόπο αυτό ένα μεγάλο μέρος της μεμβράνης του, προκαλώντας αλλαγή του σχήματος του και μείωση της ικανότητας παραμόρφωσης του (Kriebardis et al. 2008).

A.7.6 Κρυσσυντήρηση Ερυθροκυττάρων

Τα τελευταία χρόνια για τη βελτίωση της αποθήκευσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και τον περιορισμό των επικείμενων βλαβών, οι επιστήμονες έχουν εστιάσει παγκοσμίως στην κρυσσυντήρηση συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων (Chang et al. 2017). Η αποθήκευση ανθρώπινων ιστών σε θερμοκρασίες χαμηλότερες του 0°C έχει αποδειχθεί ότι είτε επιβραδύνει, είτε σταματά πλήρως τις μεταβολικές διεργασίες εντός του κυττάρου (Pegg 1976). Οι μονάδες ΣΕ που χρησιμοποιούνται υπόκεινται σε αναζωογόνηση και αποθηκεύονται στους -80°C για διάστημα 4-6 μηνών παρουσία γλυκερόλης, διαδικασία γνωστή και ως γλυκερυλίωση. Μετά ακολουθεί απόψυξη, απογλυκεροποίηση και αποθήκευση τους στους 4°C για διάστημα 7 ημερών. Ωστόσο, μια μακρά σειρά βιοχημικών, μεταβολικών και μορφολογικών αλλοιώσεων παρατηρείται και στην υποθερμική αποθήκευση, φαινόμενο γνωστό ως “αποθηκευτική βλάβη” (Cohn et al. 2020)

A.7.7) Σκοπός της Εργασίας

Οι διαδικασίες της απόψυξης και απογλυκεροποίησης είναι γνωστό ότι καταπονούν τα ΣΕ. Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης εργασίας συγκεντρώθηκαν 6 κατεψυγμένες μονάδες μετάγγισης συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων (ΣΕ) και 6 μονάδες που περιέχουν συντηρητικό CPD – SAGM. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να ελεγχθεί η οξειδωτική και η μηχανική αιμόλυση ερυθροκυττάρων πρώιμης και προχωρημένης ημέρας αποθήκευσης των κατεψυγμένων μονάδων ΣΕ, καθώς και των ΣΕ που έχουν αποθηκευτεί σε συντηρητικό CPD – SAGM σε κλασικές συνθήκες (4°C).

B) Υλικά και Μέθοδοι

B1) Υλικά και Μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκε δείγμα από 6 μονάδες μετάγγισης συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων (ΣΕ) αποθηκευμένες στους -80°C για 4 έως 6 μήνες παρουσία γλυκερόλης και ύστερα από την απόψυξη/απογλυκεροποίηση ακολούθησε αξιολόγηση των ποιοτικών τους χαρακτηριστικών. Ο έλεγχος των μονάδων πραγματοποιήθηκε στην αρχή και στο τέλος της υποθερμικής αποθήκευσης τους, έναντι 6 μονάδων ΣΕ σε CPD/SAGM. Συνολικά, δηλαδή, χρησιμοποιήθηκαν 12 μονάδες ΣΕ, στις οποίες εξετάστηκαν η οξειδωτική και μηχανική αιμόλυση ενώ αξιολογήθηκαν και τα αποτελέσματα από τη γενική εξέταση αίματος.

B.1.1) Όργανα και Συσκευές

- Αιματολογικός Αναλυτής Convergys X3 NG
- Φασματοφωτόμετρο LKB Novaspec
- Ψυχόμενη Επιτραπέζια Φυγόκεντρος Thermo Fisher Scientific SL Plus Series
- Ψυχόμενη Επιτραπέζια Φυγόκεντρος Hettich Micro 22 R
- Επιτραπέζια Φυγόκεντρος Thermo Fisher Scientific SL plus seriemicroCL 17
- Ηλεκτρονικός Ζυγός Kern QControl
- Πιπέτες Bio - Rad
- Vortex Velp Scientifica
- Ανακινήτης – Ρόδα Apelab
- Ξηρός κλίβανος Hybaid

B.1.2) Χημικά Αντιδραστήρια

- Phenylhydrazine (PHZ)
- Phosphate Buffer Saline tablets (PBS) 1x pH 7,4
- dH_2O

B.1.3) Αναλώσιμα

- Eppendorfs όγκου 1,5 mL
- Κυβέτες Φασματοφωτόμετρου
- Σύριγγες όγκου 10 mL
- Βελόνες αιμοληψίας (19G)
- Μεταλλικά Σφαιρίδια
- Ρύγχοι πιπέτας τύπου Pasteur

B2) Εργαστηριακές μέθοδοι

B.2.1) Μέτρηση Μηχανικής Ευθραυστότητας

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο ελέγχεται η αντοχή των ερυθροκυττάρων στο μηχανικό στρες. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια υπόκεινται σε μηχανική καταπόνηση κατά τη διέλευση τους από τα τριχοειδή αγγεία. Πραγματοποιείται, λοιπόν, μέτρηση της αιμοσφαιρίνης που απελευθερώνεται ύστερα από τη λύση των ερυθροκυττάρων που δέχονται μηχανικό στρες. Για τον υπολογισμό του ποσοστού των ερυθρών αιμοσφαιρίων που λύνονται, υπολογίζεται και η συνολική ενδοκυττάρια αιμοσφαιρίνη των δειγμάτων.

Το πειραματικό μέρος περιλαμβάνει τα εξής :

1. Φυγοκέντρηση ολικού αίματος στα 1000xg για 10 λεπτά.
2. Αραίωση των πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων ώστε να αποκτήσουν αιματοκρίτη 20% με PBS 1x 310 mOsm (δ/μα 1).
3. Στο δ/μα 1 γίνεται αραίωση 1:10 dH₂O σε νέο eppendorf (δ/μα 2), όπου προσθέτω 10μL δ/τος 1 και 90μL.
4. Ήπια ανάδευση σε vortex του δ/τος 2 και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
5. Φυγοκέντρηση στα 1000xg για 5 λεπτά.
6. Αραίωση δ/τος 2 1:2500 με dH₂O σε νέο eppendorf (δ/μα 3), όπου προσθέτω 5μL δ/τος 2 και 1245μL dH₂O.
7. Ήπια ανάδευση σε vortex του δ/τος 3 και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

8. Φωτομέτρηση στα 380, 415 και 450nm.
9. Υπολογισμός της ενδοκυττάριας αιμοσφαιρίνης με τη μέθοδο Harboe (Συνεχίζουμε με το δ/μα 1).
10. Κάθε δείγμα χωρίζεται σε δυο Eppendorfs στα οποία τοποθετούνται 450μL και 500μL αντίστοιχα.
11. Τα Eppendorfs επάζονται 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και συγκεκριμένα εκείνα που περιέχουν 450μL αφήνονται στον πάγκο, ενώ αυτά που περιέχουν 500μL τοποθετούνται στον ανακινήτηρα για συνεχή ανάδευση με μεταλλικά σφαιρίδια.
12. Με το πέρας της μίας ώρας αφαιρούμε 450μL από τα 500μL και τα τοποθετούμε σε νέα Eppendorfs.
13. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 2750xg για 15 λεπτά, στους 4°C.
14. Λήψη 200μL από το υπερκείμενο και τοποθέτηση τους σε νέα Eppendorfs.
15. Φυγοκέντρηση στα 20800xg για 20 λεπτά, στους 4°C.
16. Λήψη 100μL από το υπερκείμενο και αραιώση τους με 900μL dH₂O (Αραιώση 1:10).
17. Επώαση των δειγμάτων 5 λεπτά στον πάγκο και φωτομέτρηση τους στα 380, 415 και 450nm.
18. Μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης με τη μέθοδο Harboe.
19. Υπολογισμός του δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας (MFI, mechanical fragility index) με τη χρήση του τύπου $MFI(\%) = [(PF\ Hb_{rocked} - PF\ Hb_{control}) / (Hb_{aliquot})] \times 100$, που PF Hb_{rocked} είναι η μέση τιμή ελεύθερης Hb στο υπερκείμενο των δειγμάτων που ήταν σε συνεχή ανάδευση με τα μεταλλικά σφαιρίδια (rocked-R), PF Hb_{control} η μέση τιμή ελεύθερης Hb στο υπερκείμενο των δειγμάτων που δεν ήταν σε συνεχή ανάδευση (non-rocked-NR), Hb_{aliquot} η μέση τιμή ενδοκυττάριας Hb των ερυθρών αιμοσφαιρίων με αιματοκρίτη 20%.

B.2.2) Μέτρηση Οξειδωτικής Αιμόλυσης

Για τη μέτρηση της οξειδωτικής αιμόλυσης πραγματοποιήθηκε επώαση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με φαινυλδραζίνη (PHZ). Τα κύτταρα που έχουν υποστεί επεξεργασία με φαινυλδραζίνη είναι άκαμπτα και ασταθή και συνεπώς είναι επιρρεπή σε λύση. Συγκεκριμένα, αυτό το μόριο προκαλεί βλάβες στην αιμοσφαιρίνη οδηγώντας στη δέσμευση οξειδωμένης και μετουσιωμένης αιμοσφαιρίνης στον κυτταροσκελετό των ερυθροκυττάρων, ενισχύοντας τα σήματα κάθαρσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων από το ήπαρ και το σπλήνα (Liu et al. 2019).

Το πειραματικό μέρος περιλαμβάνει τα εξής :

1. Υπολογισμός της ποσότητας ολικού αίματος που επιθυμώ για να έχω 50μL αίματος με 80% αιματοκρίτη μετά την επόμενη φυγοκέντρηση.
2. Φυγοκέντρηση ολικού αίματος στα 1000xg για 10 λεπτά.
3. Απόρριψη υπερκείμενου.
4. Προσθήκη 450μL PBS 1x 310 mOsm στα συμπυκνωμένα ερυθρά.
5. Προσθήκη 23,24μL PHZ.
6. Ανάδευση με το χέρι.
7. Επώαση σε ξηρό κλίβανο για 1 ώρα.
8. Φυγοκέντρηση στα 1000xg για 10 λεπτά.
9. Αραίωση των 100μL υπερκείμενου σε 900μL dH₂O (1:10).
10. Ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα Vortex.
11. Επώαση στο πάγκο για 5 λεπτά.
12. Φωτομέτρηση υπερκείμενου στα 380, 415 και 450nm.
13. Μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο σύμφωνα με τη μέθοδο Harboe.

B.3) Στατιστική Επεξεργασία

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκε το Microsoft Office Excel 2007. Για να ελεγχθούν οι διαφορές μεταξύ των επιμέρους ομάδων δειγμάτων έγινε μέτρηση t-test για ανεξάρτητα δείγματα. Ως μέτρο σύγκρισης της ποσότητας διακύμανσης ή διασποράς του συνόλου τιμών χρησιμοποιήθηκε η τυπική απόκλιση STDV. Όλα τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά για $p < 0,05$.

Γ) Αποτελέσματα

Γ.1) Αιματολογικό Προφίλ

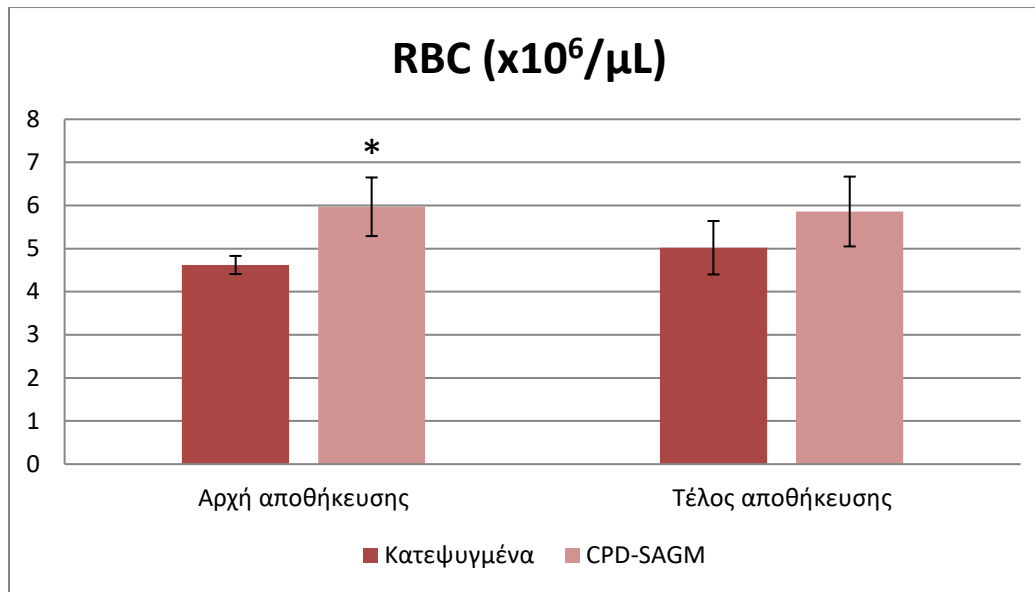
Από τη γενική εξέταση αίματος προέκυψαν οι αιματολογικοί δείκτες των μονάδων μετάγγισης κατεψυγμένων ΣΕ και CPD – SAGM (Πίνακας 1). Οι τιμές αυτές προέρχονται από τον μέσο όρο (AVG) ± την τυπική απόκλιση (SDTV). Το σύμβολο (*) επισημαίνει ότι $p < 0,05$.

	Κατεψυγμένα		CPD - SAGM	
	Πρώιμη ημέρα / Early	Προχωρημένη ημέρα / Late	Πρώιμη ημέρα / Early	Προχωρημένη ημέρα / Late
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	4.62 ± 0.21	5.02 ± 0.62	5.97 ± 0.68 *	5.86 ± 0.81
Hb (gr/dL)	13.32 ± 1.10	14.23 ± 2.37	17.45 ± 2.02 *	17.12 ± 2.77
HCT (%)	42.62 ± 3.61	43.79 ± 4.81	54.13 ± 6.14 *	56.71 ± 9.96 *
MCV (fl)	92.33 ± 6.89	93.33 ± 6.77	90.83 ± 2.40	96.50 ± 4.93
MCH (pg)	28.85 ± 1.88	28.32 ± 2.27	29.18 ± 0.90	29.17 ± 0.98
MCHC (g/dl)	31.27 ± 0.73	30.35 ± 2.32	32.20 ± 0.40 *	30.28 ± 1.31
RDW (CV%)	17.02 ± 1.41	17.33 ± 1.29	15.72 ± 0.84	17.82 ± 2.15

Πίνακας 1: Αιματολογικοί δείκτες των μονάδων μετάγγισης κατεψυγμένων ΣΕ και CPD – SAGM μονάδων. Από τη σύγκριση των τιμών, προκύπτει πως οι παράμετροι RBCs, Hb, Hct και MCHC παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των κατεψυγμένων ΣΕ και CPD-SAGM μονάδων. Οι υπόλοιποι αιματολογικοί δείκτες δεν εμφανίζουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι τιμές έχουν προκύψει από τον μέσο όρο (AVG) ± την τυπική απόκλιση (SDTV) και το σύμβολο (*) επισημαίνει οι στατιστικά σημαντικές τιμές, $p < 0.05$.

Γ.1.1) Αριθμός Ερυθροκυττάρων (RBCs)

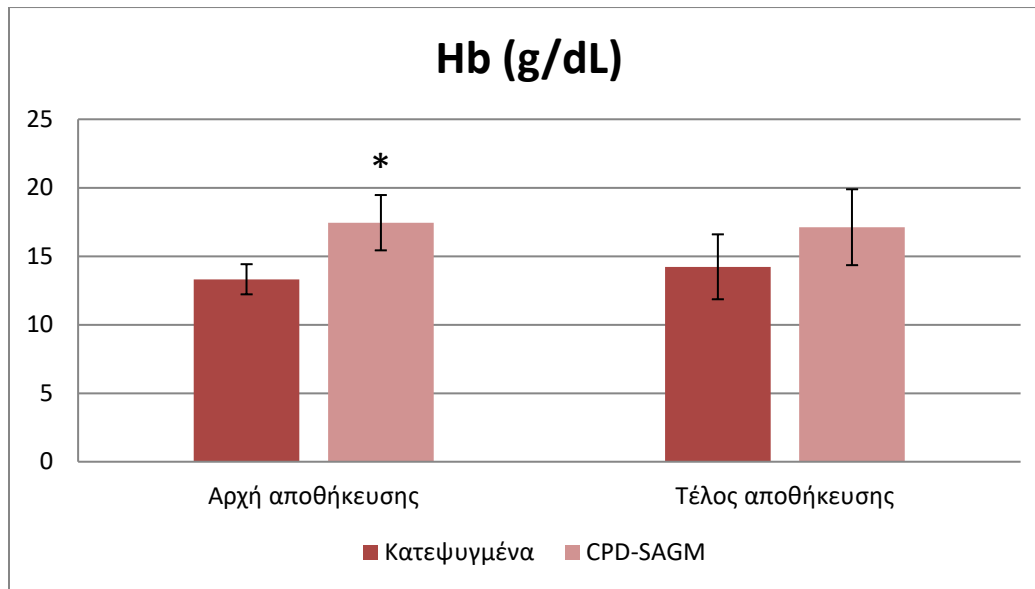
Από την αιματολογική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, προέκυψε ότι ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) των κατεψυγμένων μονάδων μετάγγισης ($4,62 \times 10^6/\mu\text{L} \pm 0,21$) ήταν μικρότερος στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου, σε σχέση με τις μονάδες που περιείχαν το συντηρητικό CPD – SAGM ($5,97 \times 10^6/\mu\text{L} \pm 0,68$). Στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά στον αριθμό των ερυθροκυττάρων ($5,86 \times 10^6/\mu\text{L} \pm 0,81$ έναντι $5,02 \times 10^6/\mu\text{L} \pm 0,62$) (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Απεικόνιση του αριθμού των ερυθροκυττάρων (RBCs) στην αρχή και στο τέλος των δύο διαφορετικών συνθηκών αποθήκευσης, $p < 0.05$. Ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων των κατεψυγμένων μονάδων μετάγγισης ήταν μικρότερος στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου, σε σχέση με τις μονάδες που περιείχαν το συντηρητικό CPD – SAGM. Στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά στον αριθμό των ερυθροκυττάρων. * Παρουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς στις τιμές των κατεψυγμένων ερυθροκυττάρων έναντι εκείνων σε CPD – SAGM.

Γ.1.2) Αιμοσφαιρίνη Hb

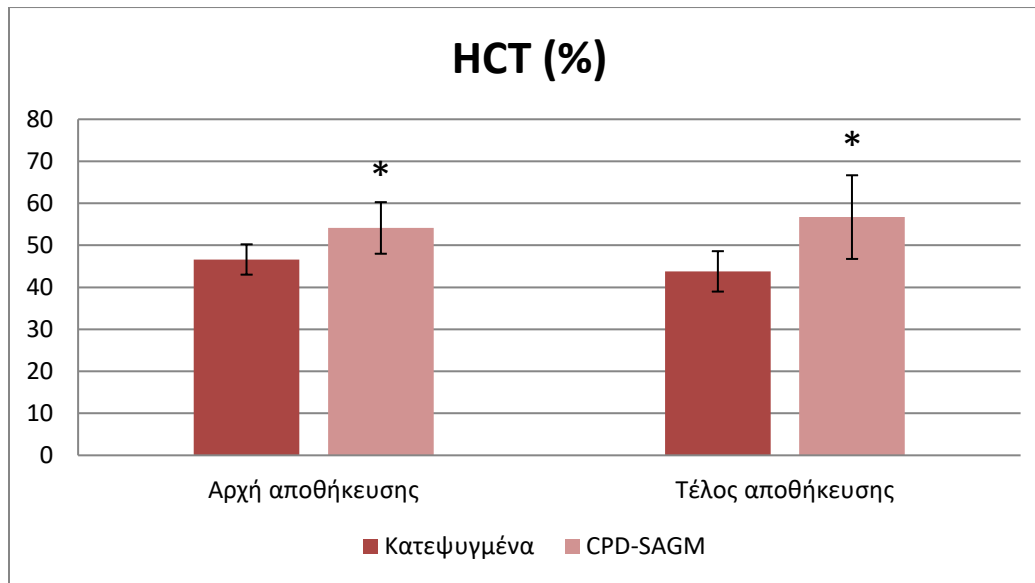
Αντίστοιχα σημαντικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για την αιμοσφαιρίνη (Hb). Ειδικότερα, η τιμή της Hb αποκαλύφθηκε μικρότερη στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου στις κατεψυγμένες μονάδες ($13,32 \pm 1,10$ g/dL), σε σχέση με τις μονάδες CPD – SAGM ($17,45 \pm 2,02$ g/dL). Στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά στη τιμή της Hb ($17,12 \pm 2,77$ g/dL έναντι $14,23 \pm 2,37$ g/dL) (**Διάγραμμα 2**).



Διάγραμμα 2: Απεικόνιση των τιμών της αιμοσφαιρίνης στην αρχή και στο τέλος των δύο διαφορετικών συνθηκών αποθήκευσης, $p < 0.05$. η τιμή της Hb αποκαλύφθηκε μικρότερη στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου στις κατεψυγμένες μονάδες, σε σχέση με τις μονάδες CPD – SAGM. Στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά στη τιμή της Hb. * Παρουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς στις τιμές των κατεψυγμένων ερυθροκυττάρων έναντι εκείνων σε CPD – SAGM.

Γ.1.3) Αιματοκρίτης HCT

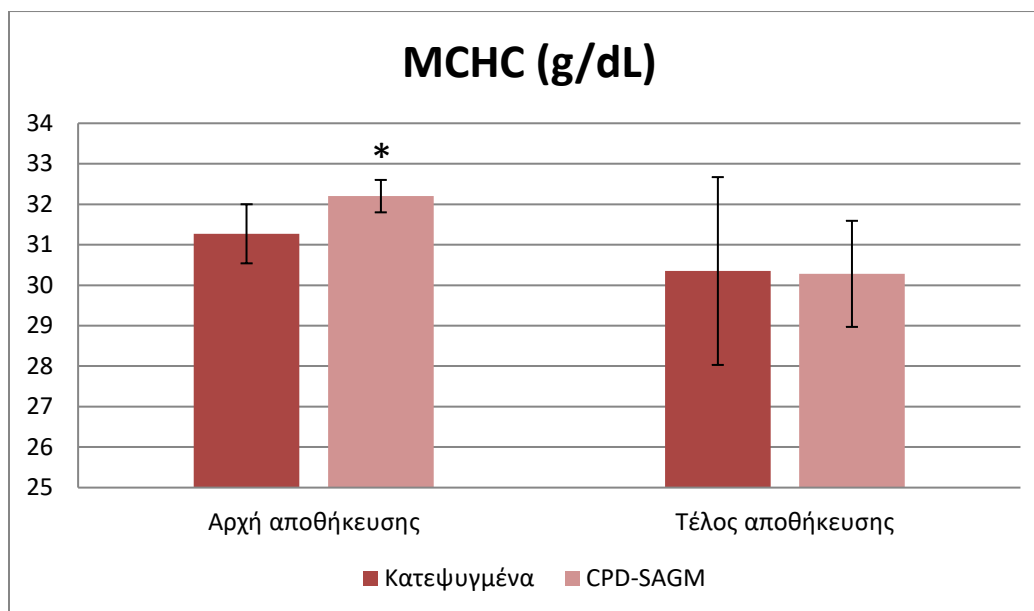
Σε αντίθεση με τις προηγούμενες αιματολογικές παραμέτρους, στον αιματοκρίτη εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά και στην αρχή και στο τέλος της αποθήκευσης. Στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου οι μονάδες CPD – SAGM παρουσίασαν κατά μέσο όρο μεγαλύτερες τιμές αιματοκρίτη ($54,13 \pm 6,14\%$) σε σύγκριση με τις κατεψυγμένες ($42,62 \pm 3,61\%$) και στο τέλος αντίστοιχα ($56,71 \pm 9,96\%$ έναντι $43,79 \pm 4,81\%$) (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3: Απεικόνιση των τιμών του αιματοκρίτη στην αρχή και στο τέλος των δύο διαφορετικών συνθηκών αποθήκευσης, $p < 0.05$. Στην αρχή, αλλά και στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου οι μονάδες CPD – SAGM παρουσίασαν κατά μέσο όρο μεγαλύτερες τιμές αιματοκρίτη σε σύγκριση με τις κατεψυγμένες. * Παρουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς στις τιμές των κατεψυγμένων ερυθροκυττάρων έναντι εκείνων σε CPD – SAGM.

Γ.1.4) Μέση Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (MCHC)

Τέλος, στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου η τιμή της MCHC παρατηρήθηκε μικρότερη στις κατεψυγμένες μονάδες ($31,27 \pm 0,73$ g/dL) σε σχέση με τις μονάδες CPD – SAGM ($32,20 \pm 0,40$ g/dL). Στο τέλος της αποθήκευσης δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά στην τιμή της MCHC (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4: Απεικόνιση των τιμών MCHC στην αρχή και στο τέλος των δύο διαφορετικών συνθηκών αποθήκευσης, $p < 0.05$. Στην αρχή της αποθηκευτικής περιόδου η τιμή της MCHC παρατηρήθηκε μικρότερη στις κατεψυγμένες μονάδες σε σχέση με τις μονάδες CPD – SAGM. Στο τέλος της αποθήκευσης δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά στην τιμή της MCHC. * Παρουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς στις τιμές των κατεψυγμένων ερυθροκυττάρων έναντι εκείνων σε CPD – SAGM.

Γ.2) Επίδραση Μηχανικού και Οξειδωτικού Στρες στα Ερυθροκύτταρα

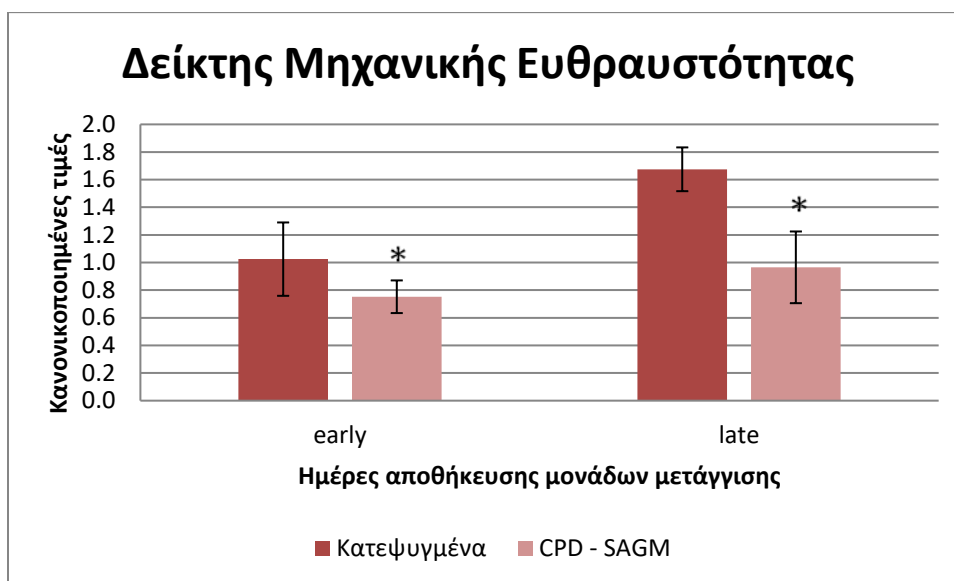
Γ.2.1) Μέτρηση Μηχανικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων

Στο παρακάτω (Πίνακας 2) αναφέρονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις που καταγράφηκαν από τον υπολογισμό της μηχανικής αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων τις πρώιμες και τις προχωρημένες ημέρες της αποθήκευσης.

	Κατεψυγμένα		CPD - SAGM	
	Πρώιμη ημέρα / Early	Προχωρημένη ημέρα / Late	Πρώιμη ημέρα / Early	Προχωρημένη ημέρα / Late
Δείκτης Μηχανικής Ευθραυστότητας Ερυθρών Αιμοσφαιρίων (MFI)	1,02	1,67	0,75 *	0,97 *
Τυπική απόκλιση (STDV)	0,27	0,16	0,12	0,26

Πίνακας 2: Στον πίνακα αποτυπώνονται οι μέσες τιμές \pm τις τυπικές αποκλίσεις που υπολογίστηκαν από τη μετρήσεις της μηχανικής ευθραυστότητας. Το σύμβολο (*) επισημαίνει τις στατιστικά σημαντικές τιμές, $p < 0.05$.

Μεταξύ των δύο συνθηκών αποθήκευσης παρατηρήθηκε ότι ο δείκτης μηχανικής αιμόλυσης ήταν μικρότερος στις μονάδες CPD – SAGM σε σχέση με τα κατεψυγμένα ($0,75 \pm 0,12$ έναντι $1,02 \pm 0,27$ και $0,97 \pm 0,26$ έναντι $1,67 \pm 0,16$ αντίστοιχα) στην αρχή και στο τέλος της αποθήκευσης (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5 : Αποτύπωση των τιμών του δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων (MFI) στις μονάδες μετάγγισης που καταψύχθηκαν και σε εκείνες που περιέχουν συντηρητικό CPD - SAGM τις πρώιμες και τις προχωρημένες ημέρες αποθήκευσης, $p < 0,05$. Ο δείκτης μηχανικής αιμόλυσης ήταν μικρότερος στις μονάδες CPD – SAGM σε σχέση με τα κατεψυγμένα στην αρχή αλλά και στο τέλος της αποθήκευσης * Παρουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς στις τιμές των κατεψυγμένων ερυθροκυττάρων έναντι εκείνων σε CPD – SAGM.

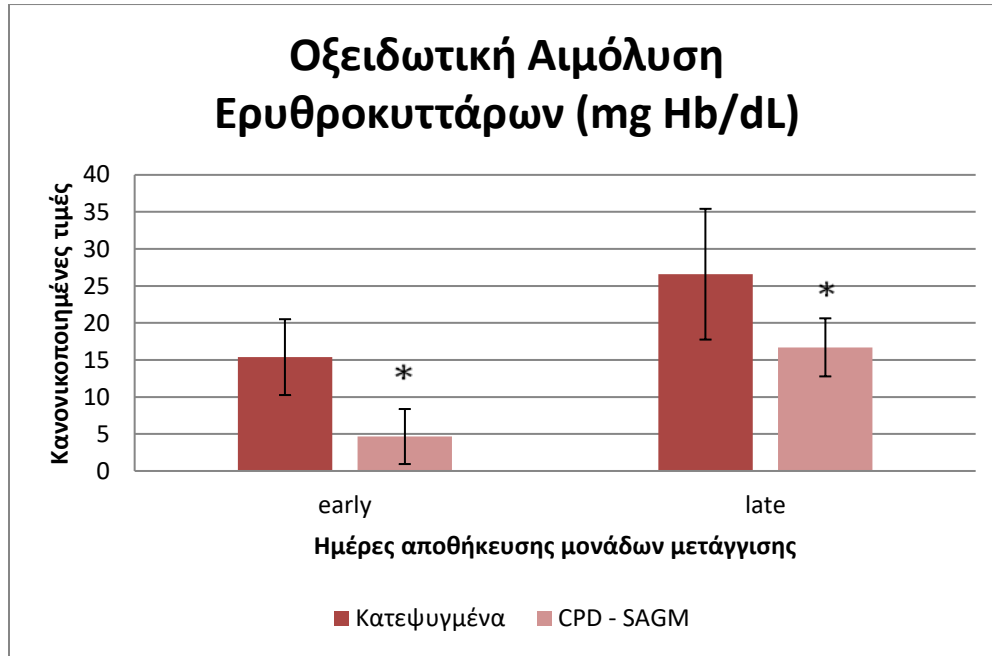
Γ.2.2) Μέτρηση Οξειδωτικής Ευθραυστότητας Ερυθροκυττάρων

Στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) αναφέρονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις που καταγράφηκαν από τον υπολογισμό της οξειδωτικής αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων τις πρώιμες και τις προχωρημένες ημέρες της αποθήκευσης των 42 ημερών.

	Κατεψυγμένα		CPD - SAGM	
	Πρώιμη ημέρα / Early	Προχωρημένη ημέρα / Late	Πρώιμη ημέρα / Early	Προχωρημένη ημέρα / Late
Δείκτης Οξειδωτικής Ευθραυστότητας Ερυθρών αιμοσφαιρίων	15,38	26,58	4,65 *	16,70 *
Τυπική απόκλιση (STDV)	5,12	8,83	3,72	3,92

Πίνακας 3: Αποτύπωση των τιμών του δείκτη οξειδωτικής ευθραυστότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων στις κατεψυγμένες μονάδες μετάγγισης και σε εκείνες που περιέχουν συντηρητικό CPD - SAGM τις πρώιμες και προχωρημένες ημέρες αποθήκευσης, $p < 0.05$.

Μεταξύ των δύο συνθηκών αποθήκευσης παρατηρήθηκε ότι η οξειδωτική αιμόλυση ήταν μικρότερη στις μονάδες CPD – SAGM σε σχέση με τα κατεψυγμένα ($4,65 \pm 3,72$ έναντι $15,38 \pm 5,12$ και $16,70 \pm 3,92$ έναντι $26,58 \pm 8,83$ αντίστοιχα) στην αρχή και στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου (Διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 6 : Αποτύπωση των τιμών του δείκτη οξειδωτικής ευθραυστότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων στις κατεψυγμένες μονάδες μετάγγισης και σε εκείνες που περιέχουν συντηρητικό CPD- SAGM τις πρώιμες και τις προχωρημένες ημέρες αποθήκευσης, $p < 0.05$. Η οξειδωτική αιμόλυση ήταν μικρότερη στις μονάδες CPD – SAGM σε σχέση με τα κατεψυγμένα στην αρχή αλλά και στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου. * Παρουσία στατιστικά σημαντικής διαφοράς στις τιμές των κατεψυγμένων ερυθροκυττάρων έναντι εκείνων σε CPD – SAGM.

Δ) Συζήτηση – Συμπεράσματα

Δ.1) Συζήτηση

Η εν λόγω εργασία προσεγγίζει τρεις θεματικές ενότητες, με σκοπό την καταγραφή των ποιοτικών χαρακτηριστικών των μονάδων συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων στο τέλος της υποθερμικής τους αποθήκευσης. Σε πρώτη φάση μελετήθηκε η δομή της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης που αντικατοπτρίζει την μηχανική λειτουργία του ερυθροκυττάρου, στη συνέχεια ο μεταβολισμός του ερυθροκυττάρου για να κατανοηθεί η οξειδωτική συμπεριφορά του και τέλος το αιματολογικό προφίλ των μονάδων μετάγγισης.

Ως προς τους αιματολογικούς δείκτες, κατά την έναρξη της αποθηκευτικής περιόδου, οι κατεψυγμένες μονάδες μετάγγισης παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, στην αιμοσφαιρίνη και στη μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης σε σύγκριση με τις συμβατικές. Αντιθέτως, ο αιματοκρίτης εμφάνισε μεγάλη διαφορά στις τιμές του, στην αρχή και στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου μεταξύ των δύο διαφορετικών συνθηκών αποθήκευσης. Όπως έχουν αναφέρει και οι Palotta et al (Pallotta et al. 2012) οι αιματολογικές αυτές παράμετροι και κυρίως οι MCHC και Hct επηρεάζονται από την προσθήκη γλυκερόλης. Ωστόσο, οι αλλαγές αυτές επανέρχονται μετά την απόξυψη/ απογλυκεροποίηση. Η ικανότητα των ερυθροκυττάρων να παραμορφώνονται εξαρτάται ιδιαίτερα από το κυτταροπλασματικό ιξώδες του κυττάρου, το οποίο αντανακλάται από το MCHC (Henkelman et al. 2010). Συνεπώς, μία παθολογική τιμή MCHC θα μπορούσε να προκαλέσει μείωση της παραμορφωσιμότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων επηρεάζοντας την μικροκυκλοφορία. Ο μειωμένος αριθμός ερυθροκυττάρων, όπως προκύπτει και από παρόμοια έρευνα του Johan W Lagerberg (Lagerberg 2015), αποτελεί ένα πρόβλημα της κρυσσοσυντήρησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων λόγω των εκπλύσεων που ακολουθούν την διαδικασία της απογλυκεροποίησης. Ωστόσο οι τιμές που προκύπτουν βρίσκονται εντός φυσιολογικών ευρωπαϊκών ορίων διατηρώντας ασφαλή την καταλληλότητα του ασκού. Οι υπόλοιποι αιματολογικοί δείκτες δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική διαφορά που θα μπορούσε να οδηγήσει σε κάποιο συμπέρασμα για την ποιότητα των κατεψυγμένων μονάδων μετάγγισης.

Τα ερυθροκύτταρα που αποθηκεύονται *ex vivo* εμφανίζουν συσσωρευμένες αποθηκευτικές βλάβες που οδηγούν σε αιμόλυση. Σε όλη τη διάρκεια της υποθερμικής αποθήκευσης τα επίπεδα αιμόλυσης των κατεψυγμένων μονάδων ΣΕ ήταν αυξημένα σε σύγκριση με τις μονάδες που περιείχαν CPD – SAGM. Οι τιμές τυπικής απόκλισης είναι επίσης ιδιαίτερα αυξημένες, καθώς η αιμόλυση εντός του κατεψυγμένου και του συμβατικού ασκού φαίνεται να είναι πολυπαραγοντικό φαινόμενο (Yoshida, Prudent, and D'Alessandro 2019). Όπως σχολιάζουν και οι Scott et al. η αυξημένη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της μετάγγισης, γεγονός που πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη, παρά τα αποδεκτά όρια αιμόλυσης (Scott, Lecak, and Acker 2005).

Η *ex vivo* αποθήκευση ΣΕ επιφέρει αλλοιώσεις στη μορφολογία, στο σχήμα, στο λόγο επιφάνειας προς όγκο και στην κατάσταση της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού τους (Raval et al. 2011; Barshtein, Manny, and Yedgar 2011), επηρεάζοντας επί το πλείστον την μηχανική συμπεριφορά του ερυθροκυττάρου. Ο δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας MFI καθ' όλη της διάρκεια της υποθερμικής αποθήκευσης παραμένει ιδιαίτερα αυξημένος στα κατεψυγμένα ΣΕ σε σύγκριση με τα συμβατικά αποθηκευμένα ερυθρά. Όπως έχει αναφέρει και ο C. Robert Valeri η αυξημένη αιμόλυση που παρατηρείται πιθανόν να οφείλεται στην αποθήκευση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στους 4°C μετά την απόψυξη/ απογλυκεροποίηση. Μία άλλη έρευνα των Dou et al υποστηρίζει πως η μείωση της αιμόλυσης θα μπορούσε να γίνει και με τη χρήση άλλων κρυοπροστατευτικών, όπως είναι τρεχαλόζη και η L –προλίνη για τον περιορισμό ανάπτυξης πάγου κατά την κατάψυξη (Dou et al. 2019). Παρόλα αυτά, τα επίπεδα αιμόλυσης των δειγμάτων μας εντοπίζονται κάτω από το Ευρωπαϊκό όριο αιμόλυσης (<0,8%), γεγονός που ενισχύει τα αποτελέσματα μίας επιτυχημένης προσπάθειας αποθήκευσης συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων σε συνθήκες ψύχους.

Δ2) Συμπεράσματα

Τα ερυθροκύτταρα ύστερα από τη κρυοσυντήρησή τους, αποθηκεύονται προσωρινά στους 4°C, γεγονός που τα καθιστά επιρρεπή σε λύση και βλάβες, κυρίως προς το τέλος της υποθερμικής αποθήκευσης τους. Ωστόσο, οι διαταραχές αυτές παρουσιάζονται και στα ερυθρά αιμοσφαίρια που αποθηκεύονται σύμφωνα με τα συμβατικά πρωτόκολλα. Ως προς τις κλινικά αξιολογήσιμες παραμέτρους, το φυσιολογικό αιματολογικό προφίλ και τα εντός Ευρωπαϊκών ορίων επίπεδα αιμόλυσης που μετρήθηκαν, επιτρέπουν το χαρακτηρισμό των κατεψυγμένων μονάδων ΣΕ ως ασφαλείς για μετάγγιση. Συνεπώς, από τα πρώτα δεδομένα που προκύπτουν για τη δημιουργία αποθεμάτων κατεψυγμένων ερυθροκυττάρων στη χώρα μας συμπεραίνουμε πως φαίνεται να είναι δυνατή η δημιουργία ενός εναλλακτικού τρόπου αποθήκευσης μονάδων μετάγγισης. Τα αποτελέσματα αυτά μένει να αξιολογηθούν σε μεγαλύτερο αριθμό δείγματος. Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων αυτών σε συνδυασμό με την αξιολόγηση και άλλων ποιοτικών χαρακτηριστικών θα επιτρέψει τη δημιουργία αποθεμάτων κατεψυγμένων ερυθροκυττάρων που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περιόδους κρίσης.

E) Βιβλιογραφία

- Alramadhani, D., A. S. Aljahdali, O. Abdulmalik, B. D. Pierce, and M. K. Safo. 2022. 'Metabolic Reprogramming in Sickle Cell Diseases: Pathophysiology and Drug Discovery Opportunities', *Int J Mol Sci*, 23.
- Antonelou, M. H., A. G. Kriebardis, and I. S. Papassideri. 2010. 'Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice', *Blood Transfus*, 8 Suppl 3: s39-47.
- Arese, P., F. Turrini, and E. Schwarzer. 2005. 'Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes', *Cell Physiol Biochem*, 16: 133-46.
- Arias, C. F., and C. F. Arias. 2017. 'How do red blood cells know when to die?', *R Soc Open Sci*, 4: 160850.
- Aziz, H., and S. S. Mohiuddin. 2023. 'Biochemistry, Hexose Monophosphate Pathway.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Bador, K. E., and J. R. Casey. 2018. 'Molecular mechanism for the red blood cell senescence clock', *IUBMB Life*, 70: 32-40.
- Barbalato, L., and L. S. Pillarisetty. 2023. 'Histology, Red Blood Cell.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Barbarino, F., L. Waschenbach, V. Cavalho-Lemos, M. Dillenberger, K. Becker, H. Gohlke, and M. M. Cortese-Krott. 2021. 'Targeting spectrin redox switches to regulate the mechanoproperties of red blood cells', *Biol Chem*, 402: 317-31.
- Barshtein, G., N. Manny, and S. Yedgar. 2011. 'Circulatory risk in the transfusion of red blood cells with impaired flow properties induced by storage', *Transfus Med Rev*, 25: 24-35.
- Barshtein, G., I. Pajic-Lijakovic, and A. Gural. 2021. 'Deformability of Stored Red Blood Cells', *Front Physiol*, 12: 722896.
- Baskurt, O. K., and H. J. Meiselman. 2003. 'Blood rheology and hemodynamics', *Semin Thromb Hemost*, 29: 435-50.
- Berezina, T. L., S. B. Zaets, C. Morgan, C. R. Spillert, M. Kamiyama, Z. Spolarics, E. A. Deitch, and G. W. Machiedo. 2002. 'Influence of storage on red blood cell rheological properties', *J Surg Res*, 102: 6-12.
- Bissinger, R., A. A. M. Bhuyan, S. M. Qadri, and F. Lang. 2019. 'Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases', *FEBS J*, 286: 826-54.
- Bosman, G. J. 2013. 'Survival of red blood cells after transfusion: processes and consequences', *Front Physiol*, 4: 376.
- Burger, P., P. Hilarius-Stokman, D. de Korte, T. K. van den Berg, and R. van Bruggen. 2012. 'CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis', *Blood*, 119: 5512-21.
- Cahalan, S. M., V. Lukacs, S. S. Ranade, S. Chien, M. Bandell, and A. Patapoutian. 2015. 'Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume', *Elife*, 4.
- Campanella, M. E., H. Chu, and P. S. Low. 2005. 'Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 2402-7.
- Carruthers, A., J. DeZutter, A. Ganguly, and S. U. Devaskar. 2009. 'Will the original glucose transporter isoform please stand up!', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297: E836-48.
- Chang, A., Y. Kim, R. Hoehn, P. Jernigan, and T. Pritts. 2017. 'Cryopreserved packed red blood cells in surgical patients: past, present, and future', *Blood Transfus*, 15: 341-47.
- Chaudhary, R., and R. Katharia. 2012. 'Oxidative injury as contributory factor for red cells storage lesion during twenty eight days of storage', *Blood Transfus*, 10: 59-62.
- Chaudhry, R., and M. Varacallo. 2023. 'Biochemistry, Glycolysis.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Cho, J., J. S. King, X. Qian, A. J. Harwood, and S. B. Shears. 2008. 'Dephosphorylation of 2,3-bisphosphoglycerate by MIPP expands the regulatory capacity of the Rapoport-Luebering glycolytic shunt', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 5998-6003.

- Cohn, Claudia S., Megan Delaney, Susan T. Johnson, and Louis M. Katz. 2020. *Technical Manual, Methods and Appendices* (American Association of Blood Banks).
- D'Alessandro, A., B. Blasi, G. M. D'Amici, C. Marrocco, and L. Zolla. 2013. 'Red blood cell subpopulations in freshly drawn blood: application of proteomics and metabolomics to a decades-long biological issue', *Blood Transfus*, 11: 75-87.
- D'Amici, G. M., C. Mirasole, A. D'Alessandro, T. Yoshida, L. J. Dumont, and L. Zolla. 2012. 'Red blood cell storage in SAGM and AS3: a comparison through the membrane two-dimensional electrophoresis proteome', *Blood Transfus*, 10 Suppl 2: s46-54.
- Dinkla, S., M. Peppelman, J. Van Der Raadt, F. Atsma, V. M. Novotny, M. G. Van Kraaij, I. Joosten, and G. J. Bosman. 2014. 'Phosphatidylserine exposure on stored red blood cells as a parameter for donor-dependent variation in product quality', *Blood Transfus*, 12: 204-9.
- Dou, M., C. Lu, Z. Sun, and W. Rao. 2019. 'Natural cryoprotectants combinations of l-proline and trehalose for red blood cells cryopreservation', *Cryobiology*, 91: 23-29.
- Duez, J., J. P. Holleran, P. A. Ndour, C. Pionneau, S. Diakite, C. Roussel, M. Dussiot, P. Amireault, V. M. Avery, and P. A. Buffet. 2015. 'Mechanical clearance of red blood cells by the human spleen: Potential therapeutic applications of a biomimetic RBC filtration method', *Transfus Clin Biol*, 22: 151-7.
- Dybas, J., M. J. Bokamper, K. M. Marzec, and P. J. Mak. 2020. 'Probing the structure-function relationship of hemoglobin in living human red blood cells', *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 239: 118530.
- Dzierzak, E., and S. Philipsen. 2013. 'Erythropoiesis: development and differentiation', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3: a011601.
- Eggleton, P., A. J. Tenner, and K. B. Reid. 2000. 'C1q receptors', *Clin Exp Immunol*, 120: 406-12.
- Foller, M., S. M. Huber, and F. Lang. 2008. 'Erythrocyte programmed cell death', *IUBMB Life*, 60: 661-8.
- Garcia-Roa, M., M. Del Carmen Vicente-Ayuso, A. M. Bobes, A. C. Pedraza, A. Gonzalez-Fernandez, M. P. Martin, I. Saez, J. Seghatchian, and L. Gutierrez. 2017. 'Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives', *Blood Transfus*, 15: 222-31.
- Genetet, S., A. Desrames, Y. Chouali, P. Ripoché, C. Lopez, and I. Mouro-Chanteloup. 2017. 'Stomatin modulates the activity of the Anion Exchanger 1 (AE1, SLC4A1)', *Sci Rep*, 7: 46170.
- Heaton, A., T. Keegan, and S. Holme. 1989. 'In vivo regeneration of red cell 2,3-diphosphoglycerate following transfusion of DPG-depleted AS-1, AS-3 and CPDA-1 red cells', *Br J Haematol*, 71: 131-6.
- Henkelman, S., J. W. Lagerberg, R. Graaff, G. Rakhorst, and W. Van Oeveren. 2010. 'The effects of cryopreservation on red blood cell rheologic properties', *Transfusion*, 50: 2393-401.
- Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler, and N. C. Andrews. 2004. 'Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism', *Cell*, 117: 285-97.
- Hornig, R., and H. U. Lutz. 2000. 'Band 3 protein clustering on human erythrocytes promotes binding of naturally occurring anti-band 3 and anti-spectrin antibodies', *Exp Gerontol*, 35: 1025-44.
- Hornung, T. C., and H. K. Biesalski. 2019. 'Glut-1 explains the evolutionary advantage of the loss of endogenous vitamin C-synthesis: The electron transfer hypothesis', *Evol Med Public Health*, 2019: 221-31.
- Huang, C. Y., Z. H. Ye, M. Y. Huang, and J. J. Lu. 2020. 'Regulation of CD47 expression in cancer cells', *Transl Oncol*, 13: 100862.
- Ishida, Y. I., M. Takikawa, T. Suzuki, M. Nagahama, and Y. Ogasawara. 2014. 'Irreversible hyperoxidation of peroxiredoxin 2 is caused by tert-butyl hydroperoxide in human red blood cells', *FEBS Open Bio*, 4: 848-52.
- Klei, T. R., S. M. Meinders, T. K. van den Berg, and R. van Bruggen. 2017. 'From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis', *Front Immunol*, 8: 73.
- Kodippili, G. C., J. Spector, J. Hale, K. Giger, M. R. Hughes, K. M. McNagny, C. Birkenmeier, L. Peters, K. Ritchie, and P. S. Low. 2012. 'Analysis of the mobilities of band 3 populations associated with

- ankyrin protein and junctional complexes in intact murine erythrocytes', *J Biol Chem*, 287: 4129-38.
- Kor, D. J., C. M. Van Buskirk, and O. Gajic. 2009. 'Red blood cell storage lesion', *Bosn J Basic Med Sci*, 9 Suppl 1: S21-S27.
- Kriebardis, A. G., M. H. Antonelou, K. E. Stamoulis, E. Economou-Petersen, L. H. Margaritis, and I. S. Papassideri. 2007. 'Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells', *J Cell Mol Med*, 11: 148-55.
- . 2008. 'RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components', *Transfusion*, 48: 1943-53.
- Kuhn, V., L. Diederich, T. C. S. th Keller, C. M. Kramer, W. Luckstadt, C. Panknin, T. Suvorava, B. E. Isakson, M. Kelm, and M. M. Cortese-Krott. 2017. 'Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia', *Antioxid Redox Signal*, 26: 718-42.
- Lagerberg, J. W. 2015. 'Cryopreservation of red blood cells', *Methods Mol Biol*, 1257: 353-67.
- Lagerberg, J. W., H. Korsten, P. F. Van Der Meer, and D. De Korte. 2017. 'Prevention of red cell storage lesion: a comparison of five different additive solutions', *Blood Transfus*, 15: 456-62.
- Lang, F., S. M. Huber, I. Szabo, and E. Gulbins. 2007. 'Plasma membrane ion channels in suicidal cell death', *Arch Biochem Biophys*, 462: 189-94.
- Lang, K. S., P. A. Lang, C. Bauer, C. Duranton, T. Wieder, S. M. Huber, and F. Lang. 2005. 'Mechanisms of suicidal erythrocyte death', *Cell Physiol Biochem*, 15: 195-202.
- Lapatsina, L., J. Brand, K. Poole, O. Daumke, and G. R. Lewin. 2012. 'Stomatin-domain proteins', *Eur J Cell Biol*, 91: 240-5.
- Liu, F., S. Dai, D. Feng, X. Peng, Z. Qin, A. C. Kearns, W. Huang, Y. Chen, S. Ergun, H. Wang, J. Rappaport, E. C. Bryda, A. Chandrasekhar, B. Aktas, H. Hu, S. L. Chang, B. Gao, and X. Qin. 2019. 'Versatile cell ablation tools and their applications to study loss of cell functions', *Cell Mol Life Sci*, 76: 4725-43.
- Low, F. M., M. B. Hampton, and C. C. Winterbourn. 2008. 'Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte', *Antioxid Redox Signal*, 10: 1621-30.
- Lux, S. E. th. 2016. 'Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions', *Blood*, 127: 187-99.
- Mandal, D., V. Baudin-Creuzza, A. Bhattacharyya, S. Pathak, J. Delaunay, M. Kundu, and J. Basu. 2003. 'Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3)', *J Biol Chem*, 278: 52551-8.
- Mankelov, T. J., T. J. Satchwell, and N. M. Burton. 2012. 'Refined views of multi-protein complexes in the erythrocyte membrane', *Blood Cells Mol Dis*, 49: 1-10.
- Marquardt, D., B. Geier, and G. Pabst. 2015. 'Asymmetric lipid membranes: towards more realistic model systems', *Membranes (Basel)*, 5: 180-96.
- Mebius, R. E., and G. Kraal. 2005. 'Structure and function of the spleen', *Nat Rev Immunol*, 5: 606-16.
- Messana, I., L. Ferroni, F. Misiti, G. Girelli, S. Pupella, M. Castagnola, B. Zappacosta, and B. Giardina. 2000. 'Blood bank conditions and RBCs: the progressive loss of metabolic modulation', *Transfusion*, 40: 353-60.
- Mohandas, N., and P. G. Gallagher. 2008. 'Red cell membrane: past, present, and future', *Blood*, 112: 3939-48.
- Mohanty, J. G., E. Nagababu, and J. M. Rifkind. 2014. 'Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging', *Front Physiol*, 5: 84.
- Morioka, S., C. Maueroeder, and K. S. Ravichandran. 2019. 'Living on the Edge: Efferocytosis at the Interface of Homeostasis and Pathology', *Immunity*, 50: 1149-62.
- Murthy, S. E., A. E. Dubin, and A. Patapoutian. 2017. 'Piezos thrive under pressure: mechanically activated ion channels in health and disease', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 771-83.
- Nemkov, T., K. C. Hansen, L. J. Dumont, and A. D'Alessandro. 2016. 'Metabolomics in transfusion medicine', *Transfusion*, 56: 980-93.

- Oh, J. Y., C. Y. Bae, M. Kasztan, D. M. Pollock, R. T. Russell, J. Lebensburger, and R. P. Patel. 2022. 'Peroxiredoxin-2 recycling is slower in denser and pediatric sickle cell red cells', *FASEB J*, 36: e22267.
- Oldenborg, P. A., A. Zheleznyak, Y. F. Fang, C. F. Lagenaur, H. D. Gresham, and F. P. Lindberg. 2000. 'Role of CD47 as a marker of self on red blood cells', *Science*, 288: 2051-4.
- Orbach, A., O. Zelig, S. Yedgar, and G. Barshtein. 2017. 'Biophysical and Biochemical Markers of Red Blood Cell Fragility', *Transfus Med Hemother*, 44: 183-87.
- Pallotta, V., G. M. D'Amici, A. D'Alessandro, R. Rossetti, and L. Zolla. 2012. 'Red blood cell processing for cryopreservation: from fresh blood to deglycerolization', *Blood Cells Mol Dis*, 48: 226-32.
- Pantaleo, A., G. Giribaldi, F. Mannu, P. Arese, and F. Turrini. 2008. 'Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions', *Autoimmun Rev*, 7: 457-62.
- Pastore, A., F. Piemonte, M. Locatelli, A. Lo Russo, L. M. Gaeta, G. Tozzi, and G. Federici. 2001. 'Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects', *Clin Chem*, 47: 1467-9.
- Patel, A., S. Demolombe, and E. Honore. 2015. 'An alternative to force', *Elife*, 4.
- Pegg, D. E. 1976. 'Long-term preservation of cells and tissues: a review', *J Clin Pathol*, 29: 271-85.
- Perrone, S., C. Lembo, M. Giordano, C. Petrolini, L. Cannavo, and E. Gitto. 2023. 'Molecular mechanisms of oxidative stress-related neonatal jaundice', *J Biochem Mol Toxicol*: e23349.
- Pomorski, T. G., and A. K. Menon. 2016. 'Lipid somersaults: Uncovering the mechanisms of protein-mediated lipid flipping', *Prog Lipid Res*, 64: 69-84.
- Pretini, V., M. H. Koenen, L. Kaestner, Mham Fens, R. M. Schiffelers, M. Bartels, and R. Van Wijk. 2019. 'Red Blood Cells: Chasing Interactions', *Front Physiol*, 10: 945.
- Puchulu-Campanella, E., H. Chu, D. J. Anstee, J. A. Galan, W. A. Tao, and P. S. Low. 2013. 'Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane', *J Biol Chem*, 288: 848-58.
- Pulliam, K. E., B. Joseph, A. T. Makley, C. C. Caldwell, A. B. Lentsch, M. D. Goodman, and T. A. Pritts. 2021. 'Washing packed red blood cells decreases red blood cell storage lesion formation', *Surgery*, 169: 666-70.
- Rao, S., S. Balint, B. Cossins, V. Guallar, and D. Petrov. 2009. 'Raman study of mechanically induced oxygenation state transition of red blood cells using optical tweezers', *Biophys J*, 96: 209-16.
- Raval, J. S., J. H. Waters, A. Seltsam, E. A. Scharberg, E. Richter, M. V. Kameneva, and M. H. Yazer. 2011. 'Menopausal status affects the susceptibility of stored RBCs to mechanical stress', *Vox Sang*, 100: 418-21.
- Reithmeier, R. A., J. R. Casey, A. C. Kalli, M. S. Sansom, Y. Alguel, and S. Iwata. 2016. 'Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context', *Biochim Biophys Acta*, 1858: 1507-32.
- Reithmeier, R. A. F. 2022. 'How to become a successful scientist: the 2022 CSMB Arthur Wynne Gold Medal Lecture', *Biochem Cell Biol*, 100: 371-77.
- Repsold, L., and A. M. Joubert. 2018. 'Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death', *Biomed Res Int*, 2018: 9405617.
- Risinger, Mary, and Theodosia A. Kalfa. 2020. 'Red cell membrane disorders: structure meets function', *Blood*, 136: 1250-61.
- Salomao, M., X. Zhang, Y. Yang, S. Lee, J. H. Hartwig, J. A. Chasis, N. Mohandas, and X. An. 2008. 'Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 8026-31.
- Scott, K. L., J. Lecak, and J. P. Acker. 2005. 'Biopreservation of red blood cells: past, present, and future', *Transfus Med Rev*, 19: 127-42.
- Sega, M. F., H. Chu, J. A. Christian, and P. S. Low. 2015. 'Fluorescence assay of the interaction between hemoglobin and the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3', *Blood Cells Mol Dis*, 55: 266-71.

- Sen Gupta, A. 2019. 'Hemoglobin-based Oxygen Carriers: Current State-of-the-art and Novel Molecules', *Shock*, 52: 70-83.
- Shaklai, N., J. Yguerabide, and H. M. Ranney. 1977. 'Classification and localization of hemoglobin binding sites on the red blood cell membrane', *Biochemistry*, 16: 5593-7.
- Silverthorn, D.; Unglaub. 2018. *ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (BROKEN HILL)*.
- Singh, N., S. Haldar, A. K. Tripathi, K. Horback, J. Wong, D. Sharma, A. Beserra, S. Suda, C. Anbalagan, S. Dev, C. K. Mukhopadhyay, and A. Singh. 2014. 'Brain iron homeostasis: from molecular mechanisms to clinical significance and therapeutic opportunities', *Antioxid Redox Signal*, 20: 1324-63.
- Sosale, N. G., T. Rouhiparkouhi, A. M. Bradshaw, R. Dimova, R. Lipowsky, and D. E. Discher. 2015. 'Cell rigidity and shape override CD47's "self"-signaling in phagocytosis by hyperactivating myosin-II', *Blood*, 125: 542-52.
- Stefanovic, M., E. Puchulu-Campanella, G. Kodippili, and P. S. Low. 2013. 'Oxygen regulates the band 3-ankyrin bridge in the human erythrocyte membrane', *Biochem J*, 449: 143-50.
- Tavazzi, B., D. Di Pierro, A. M. Amorini, G. Fazzina, M. Tuttobene, B. Giardina, and G. Lazzarino. 2000. 'Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress', *Eur J Biochem*, 267: 684-9.
- Trejo-Soto, C., G. R. Lazaro, I. Pagonabarraga, and A. Hernandez-Machado. 2022. 'Microfluidics Approach to the Mechanical Properties of Red Blood Cell Membrane and Their Effect on Blood Rheology', *Membranes (Basel)*, 12.
- Turrini, F., P. Arese, J. Yuan, and P. S. Low. 1991. 'Clustering of integral membrane proteins of the human erythrocyte membrane stimulates autologous IgG binding, complement deposition, and phagocytosis', *J Biol Chem*, 266: 23611-7.
- Van Kim, C. L., Y. Colin, and J. P. Cartron. 2006. 'Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane', *Blood Rev*, 20: 93-110.
- West, D., M. A. Pinard, C. Tu, D. N. Silverman, and R. McKenna. 2014. 'Human carbonic anhydrase II-cyanate inhibitor complex: putting the debate to rest', *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 70: 1324-7.
- Xu, W., F. Peng, Y. Deng, X. Fan, and N. Li. 2019. 'The emerging roles of eryptosis in liver diseases', *Transfus Clin Biol*, 26: 336-40.
- Yamashiro, S., D. S. Gokhin, S. Kimura, R. B. Nowak, and V. M. Fowler. 2012. 'Tropomodulins: pointed-end capping proteins that regulate actin filament architecture in diverse cell types', *Cytoskeleton (Hoboken)*, 69: 337-70.
- Yoshida, T., M. Prudent, and A. D'Alessandro. 2019. 'Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences', *Blood Transfus*, 17: 27-52.