



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



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Η ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΩΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ  
ΑΠΟΘΗΚΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΥΘΡΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΩΝ»**



Όνοματεπώνυμο Φοιτήτριας: Άντζελα Πετάνι  
Αριθμός Μητρώου: 19678255  
bisc19678255@uniwa.gr

Επιβλέπων Καθηγητής: Βασίλειος Μπίρτσας  
vbir@uniwa.gr

Αθήνα, 2024



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



UNDERGRADUATE THESIS

**«OXIDATION AS A QUALITY INDEX OF  
STORED RED BLOOD CELLS»**



Student Name: Anxhela Petani  
Candidate Number: 19678255  
bisc19678255@uniwa.gr

Supervisor: Vassilios Birtsas  
vbir@uniwa.gr

Athens, 2024



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



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Η ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΩΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ  
ΑΠΟΘΗΚΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΥΘΡΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΩΝ»**

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΙΣΗΓΗΤΗ

<b>Όνοματεπώνυμο</b>	<b>Βαθμίδα</b>	<b>Υπογραφή</b>
Βασίλειος Μπίρτσας	Ακαδημαϊκός Υπότροφος	
Ευθυμία Παύλου	Ακαδημαϊκός Υπότροφος	
Σωτήριος Φόρτης	Ακαδημαϊκός Υπότροφος	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη ΠΕΤΑΝΙ ΑΝΤΖΕΛΑ του ΑΛΜΠΕΡΤΙ, με αριθμό μητρώου 19678255 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

Άντζελα Πετάνι

## Πίνακας περιεχομένων

Συντομογραφίες.....	viii
Περίληψη.....	1
Abstract .....	2
A. Εισαγωγή .....	3
A1. Αίμα .....	3
A2. Το Ερυθροκύτταρο .....	3
A2.1 Ερυθροποίηση.....	3
A2.2 Μορφολογία Ερυθρού Αιμοσφαιρίου .....	4
A2.3 Αιμοσφαιρίνη.....	4
A2.4 Λειτουργία Ερυθρού Αιμοσφαιρίου.....	5
A2.5 Μεταβολισμός του Ερυθρού Αιμοσφαιρίου.....	6
A3. Οξειδωτικό Στρες .....	8
A3.1 Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου .....	8
A3.2 Παραγωγή Δραστικών Ριζών Οξυγόνου στο ερυθρό αιμοσφαίριο .....	9
A3.3 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί Του Ερυθροκυττάρου.....	11
A4. Αποθήκευση ερυθρών αιμοσφαιρίων .....	16
A4.1 Παραγωγή και Υποθερμική Αποθήκευση Μονάδων Συμπυκνωμένων Ερυθρών.....	16
A4.2 Κρυοσυντήρηση Μονάδων Συμπυκνωμένων Ερυθρών.....	18
A4.3 Αποθηκευτική Βλάβη.....	20
B. Υλικά και Μέθοδοι.....	25
B1. Σκοπός.....	25
B2. Όργανα και αντιδραστήρια.....	25
B2.1 Συσκευές και όργανα.....	25
B2.2 Χημικά και αντιδραστήρια .....	25
B2.3 Αναλώσιμα.....	26
B3. Εργαστηριακή Μέθοδος.....	26

Γ. Αποτελέσματα .....	27
Γ1. Αιματολογικές Παράμετροι.....	27
Γ2. Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου (ROS).....	28
Δ. Συζήτηση .....	30
Ε. Συμπεράσματα.....	33
ΣΤ. Βιβλιογραφία .....	34

## Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1: Σωληνάριο αίματος μετά από φυγοκέντρηση .....	3
Εικόνα 2: Το χαρακτηριστικό σχήμα του ερυθροκυττάρου.....	4
Εικόνα 3: Η δομή της αιμοσφαιρίνης .....	5
Εικόνα 4: Η καμπύλη διαχωρισμού του οξυγόνου.....	5
Εικόνα 5: Οι μεταβολικές οδοί του ερυθροκυττάρου.....	6
Εικόνα 6: Η ρύθμιση της γλυκόλυσης μέσω των επιπέδων του οξυγόνου.....	7
Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του ερυθροκυττάρου.....	11
Εικόνα 8: Τα τρία στάδια της αντίδρασης της Prx2 με το H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	14
Εικόνα 9: Η δομή της σεληνοκυστεΐνης σε σχέση με την κυστεΐνη .....	15
Εικόνα 10: Τα στάδια της αντίδρασης της GPx με τα υδροϋπεροξειδία.....	15
Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση των αποθηκευτικών βλαβών των ερυθροκυττάρων (B) σε σχέση με τα ερυθροκύτταρα in vivo (A).....	21
Εικόνα 12: Εικόνα αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.....	24

## Συντομογραφίες

<b>2,3 - DPG</b>	2,3 Diphosphoglyceric Acid	2,3 Διφωσφογλυκερικό
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
<b>CAT</b>	Catalase	Καταλάση
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus	Κυτταρομεγαλοϊός
<b>CPD</b>	Citrate – Phosphate – Dextrose anticoagulant solution	Αντιπηκτικό διάλυμα που περιέχει κιτρικά, φωσφορικά και δεξτρόζη
<b>CPDA</b>	Citrate – Phosphate – Dextrose – Adenine anticoagulant solution	Αντιπηκτικό διάλυμα που περιέχει κιτρικά, φωσφορικά, δεξτρόζη και αδενίνη
<b>DEHP</b>	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	Δις(2-αιθυλεξυλ)φθαλικός εστέρας
<b>deoxyHb</b>	Deoxyhemoglobin	Δεοξυαιμοσφαιρίνη
<b>DHA</b>	Dehydroascorbic acid	Υδροασκορβικό οξύ
<b>EBV</b>	Epstein Barr Virus	Ιός Epstein Barr
<b>GPx</b>	Glutathione peroxidase	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
<b>GR</b>	Glutathione reductase	Αναγωγή της γλουταθειόνης
<b>Grx</b>	Glutaredoxin	Γλουταρεδοξίνη
<b>GSH</b>	Reduced glutathione	Ανηγμένη γλουταθειόνη
<b>GSSG</b>	Oxidised glutathione	Οξειδωμένη γλουταθειόνη
<b>GvHD</b>	Graft – versus – host disease	Νόσος του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή
<b>HbA</b>	Hemoglobin A	Αιμοσφαιρίνη Α
<b>HGM</b>	High glycerol method	Μέθοδος Υψηλής Συγκέντρωσης Γλυκερόλης
<b>HK</b>	Hexokinase	Εξωκινάση
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen	Ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα
<b>LGM</b>	Low glycerol method	Μέθοδος Χαμηλής Συγκέντρωσης Γλυκερόλης
<b>MDA</b>	Malondialdehyde	Μαλονδιαλδεΰδη
<b>MetHb</b>	Methemoglobin	Μεθαιμοσφαιρίνη
<b>NADH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide	Νικοτιναμίδιο – αδενινο – δινουκλεοτίδιο
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης
<b>oxyHb</b>	Oxyhemoglobin	Οξυαιμοσφαιρίνη
<b>pCO<sub>2</sub></b>	Carbon dioxide partial pressure	Μερική πίεση διοξειδίου του άνθρακα



<b>PFK</b>	Phosphofructokinase	Φωσφοφρουκτοκινάση
<b>PGK</b>	Phosphoglycerate kinase	Κινάση του φωσφογλυκερικού
<b>PK</b>	Pyruvate kinase	Πυροσταφυλική κινάση
<b>pO<sub>2</sub></b>	Oxygen partial pressure	Μερική πίεση οξυγόνου
<b>pRBCs</b>	Packed red blood cells	Συμπυκνωμένα ερυθρά
<b>Prx</b>	Peroxiredoxin	Υπεροξειδοξίνη
<b>PVC</b>	Polyvinylchloride	Πολυβινυλοχλωρίδιο
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species	Δραστικές ρίζες οξυγόνου
<b>SAGM</b>	Additive solution containing saline – adenine – glucose – mannitol	Προσθετικό διάλυμα που περιέχει διάλυμα χλωριούχου νατρίου, αδενίνη, γλυκόζη και μανιτόλη
<b>SO<sub>2</sub></b>	Oxygen saturation	Κορεσμός σε οξυγόνο
<b>SOD</b>	Superoxide dismutase	Υπεροξειδική δισμουτάση
<b>TR</b>	Thioredoxin reductase	Αναγωγή της θειορεδοξίνης
<b>TRALI</b>	Transfusion-related acute lung injury	Οξεία βλάβη των πνευμόνων μετά τη μετάγγιση
<b>Trx</b>	Thioredoxin	Θειορεδοξίνη
<b>ΣΕ</b>	–	Συμπυκνωμένα ερυθρά

## Περίληψη

Τα συμπυκνωμένα ερυθρά αποτελούν το πλέον μεταγγιζόμενο παράγωγο αίματος. Η συνηθέστερη μέθοδος για την αποθήκευση των μονάδων συμπυκνωμένων ερυθρών είναι η υποθερμική αποθήκευση (2 – 6 °C). Όμως, σε αυτές τις συνθήκες η διάρκεια ζωής των μονάδων είναι περιορισμένη, γεγονός που αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα. Η κρυοσυντήρηση των ερυθροκυττάρων είναι μια άλλη μέθοδος αποθήκευσης η οποία επιτρέπει τη μακροχρόνια αποθήκευση των μονάδων. Και στις δύο περιπτώσεις, τα ερυθροκύτταρα έρχονται αντιμέτωπα με συνθήκες πολύ διαφορετικές από αυτές που επικρατούν μέσα στον οργανισμό με αποτέλεσμα τη δημιουργία αποθηκευτικών βλαβών. Οι αποθηκευτικές βλάβες περιλαμβάνουν βιοχημικές, οξειδωτικές και μορφολογικές μεταβολές. Το οξειδωτικό στρες, το οποίο ευθύνεται για τις οξειδωτικές βλάβες, είναι αποτέλεσμα υπερπαραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου καθώς και της αδυναμίας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου να την αντιμετωπίσει.

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν ο προσδιορισμός και η σύγκριση των επιπέδων των δραστικών ριζών οξυγόνου σε υποθερμικά αποθηκευμένες και κατεψυγμένες μονάδες συμπυκνωμένων ερυθρών με σκοπό την αξιολόγηση της ποιότητας των κατεψυγμένων μονάδων. Προσδιορίστηκαν, αρχικά, κάποιες βασικές αιματολογικές παράμετροι και στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τον εστέρα CM – DH<sub>2</sub>DCFDA και κυτταρομετρία ροής μετρήθηκαν τα επίπεδα ενδοκυττάρων δραστικών ριζών οξυγόνου με και χωρίς την επίδραση της φαινυλδραζίνης, ενός εξωγενούς οξειδωτικού παράγοντα, στην αρχή και στο τέλος της αποθήκευσης των μονάδων.

Στις κατεψυγμένες μονάδες ΣΕ βρέθηκαν χαμηλότερες τιμές ερυθροκυττάρων /  $\mu\text{L}$ , αιμοσφαιρίνης, αιματοκρίτη και μέσης συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης ερυθροκυττάρων στην αρχή της αποθήκευσης τους παρόλα αυτά, όμως, οι μονάδες πληρούσαν τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τη Μετάγγιση για την ασφαλή τους χρήση σε ασθενείς. Όσον αφορά τα επίπεδα των δραστικών ριζών οξυγόνου, μετά την επίδραση εξωγενούς οξειδωτικού παράγοντα βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της αποθήκευσης στις κατεψυγμένες μονάδες υποδεικνύοντας μια πιθανή διαταραχή στη λειτουργία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών από νωρίς.

**Λέξεις κλειδιά:** Συμπυκνωμένα ερυθρά, Κατεψυγμένες μονάδες συμπυκνωμένων ερυθρών, Οξειδωτικό στρες, Οξειδωτική βλάβη, Δραστικές ρίζες οξυγόνου.

## Abstract

Packed red blood cells are the most widely transfused blood component. Usually, pRBC units are stored in hypothermic conditions (2 – 6 °C). However, storing pRBCs in these conditions reduces their shelf life, which is a major disadvantage. Cryopreservation of red blood cells is another method used, that allows storage for an extended period of time. During both hypothermic storage and cryopreservation erythrocytes are subject to conditions completely different than the ones prevailing in the blood vessels which results in accumulation of storage lesions. Storage lesions consist of a series of biochemical, oxidative and morphologic changes. Oxidative stress, which is responsible for oxidative damages, is the result of the overproduction of reactive oxygen species and the inability of the cells' antioxidative mechanisms to detoxify those.

The main purpose of this thesis was the quantification and comparison of reactive oxygen species levels in hypothermically stored and frozen pRBCs in order to assess frozen pRBCs' quality. First of all, some hematological parameters were examined and then using CM – DH<sub>2</sub>DCFDA and flow cytometry the levels of reactive oxygen species, with and without the usage of phenylhydrazine, an oxidative chemical, were measured, both on the first and last day of their storage.

Frozen pRBCs were found to have decreased levels of RBCs /  $\mu$ L, hemoglobin, hematocrit and mean corpuscular hemoglobin concentration on their first day of storage, nevertheless, could be safely used for transfusion on patients according to the European Committee on Blood Transfusion's guidelines. Regarding reactive oxygen species, significantly increased levels were reported on frozen pRBCs both on the first and last day of their storage period after the usage of phenylhydrazine, possibly indicating a disruption in the cells' antioxidant mechanisms function earlier than in the hypothermically stored pRBCs.

**Key words:** Packed red blood cells, Frozen red blood cell units, Oxidative stress, Oxidative damage, Reactive oxygen species.

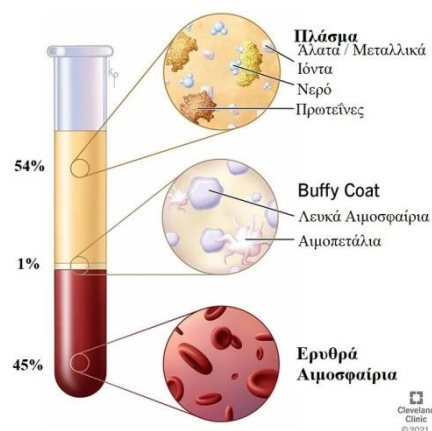
## A. Εισαγωγή

### A1. Αίμα

Εκτιμάται πως κάθε φυσιολογικός ενήλικας διαθέτει περίπου 4 – 6 L αίματος που αντιστοιχεί στο 7 – 9% του συνολικού σωματικού του βάρους. Το αίμα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σωστή λειτουργία του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, μεταφέρει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στους ιστούς καθώς και διοξείδιο του άνθρακα και άλλα προϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων με σκοπό την αποβολή τους από τον οργανισμό. Συμβάλλει στη διατήρηση της χημικής ισορροπίας και της θερμοκρασίας του σώματος, στην άμυνα του οργανισμού έναντι μικροοργανισμών καθώς και στην πήξη.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1, το αίμα αποτελείται από το υγρό μέρος που ονομάζεται πλάσμα και από τα έμμορφα συστατικά.

Το πλάσμα είναι ένα διαυγές, κιτρινωπό υγρό μέσα στο οποίο βρίσκονται διαλυμένες πρωτεΐνες όπως η αλβουμίνη, το ινωδογόνο και οι σφαιρίνες. Τα έμμορφα συστατικά διαχωρίζονται σε αιμοπετάλια, λευκά αιμοσφαίρια και ερυθρά αιμοσφαίρια. Η βασικότερη λειτουργία των αιμοπεταλίων είναι η αιμόσταση. Τα λευκά αιμοσφαίρια είναι υπεύθυνα για την άμυνα του οργανισμού. Μπορούν να διαχωριστούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με την ύπαρξη ή μη κοκκίων στο κυτταρόπλασμά τους. Τα κοκκιοκύτταρα περιλαμβάνουν τρία είδη κυττάρων, τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα ενώ κοκκία δεν περιέχουν τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα. Τα ερυθροκύτταρα είναι υπεύθυνα για την ιστική ανταλλαγή των αερίων. [1]



Εικόνα 1: Σωληνάριο αίματος μετά από φυγοκέντρηση. Με τη φυγοκέντρηση το αίμα διαχωρίζεται σε τρεις στιβάδες με βάση τα συστατικά του: πλάσμα, buffy coat (λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια) και ερυθρά αιμοσφαίρια. (Ανατόπωση με προσαρμογή από <https://my.clevelandclinic.org/health/body/22865-plasma>)

### A2. Το Ερυθροκύτταρο

#### A2.1 Ερυθροποίηση

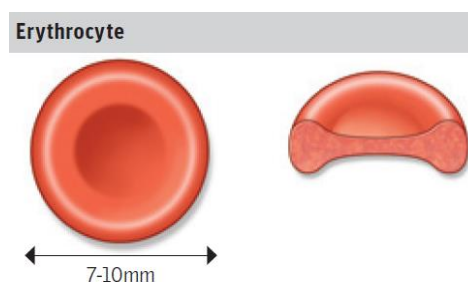
Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι το τελικό προϊόν διαδοχικών διαφοροποιήσεων του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, στο μυελό των οστών, μετά από την επίδραση ορμονών και κυτταροκινών, με βασικότερή την Ερυθροποιητίνη. Το πρώτο δεσμευμένο κύτταρο της ερυθράς σειράς είναι το BFU-E (Burst Forming Unit Erythroid) με το CFU-E (Colony Forming Unit Erythroid) να ακολουθεί. Κανένα από τα προηγούμενα δύο δεν μπορεί να αναγνωρισθεί από τη μορφολογία του. Οι προερυθροβλάστες είναι η πρώτη μορφολογικά αναγνωρίσιμη μορφή των ερυθροκυττάρων. Χαρακτηριστικά τους είναι το μεγάλο τους μέγεθος (20 – 25 μm) και η μεγάλη αναλογία πυρήνα

προς κυτταροπλάσματος. Σε αυτό το στάδιο της ερυθροποίησης ξεκινά και η σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Ακολουθεί η βασεόφιλη ερυθροβλάστη, η πολυχρωματόφιλη ερυθροβλάστη, η ορθοχρωματόφιλη ερυθροβλάστη και τέλος το δικτυοερυθροκύτταρο. Κατά τη μετάπτωση από ορθοχρωματόφιλη ερυθροβλάστη σε δικτυοερυθροκύτταρο αποβάλλεται ο πυρήνας και το δικτυοερυθροκύτταρο εξέρχεται από το μυελό στην κυκλοφορία όπου συνεχίζει να ωριμάζει για 24 – 48 ώρες, χάνοντας τα μιτοχόνδρια και τα ριβοσώματα του, δημιουργώντας τελικά το ώριμο ερυθροκύτταρο. [2]

## A2.2 Μορφολογία Ερυθρού Αιμοσφαιρίου

Τα ερυθροκύτταρα παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά κάτω από το μικροσκόπιο και περιγράφηκαν το 1658 από τους ολλανδούς Jan Swammerdam και Antoni van Leeuwenhoek. [3] Σήμερα είναι γνωστό πως τα ερυθροκύτταρα είναι το πολυπληθέστερο κύτταρο του αίματος με τον αριθμό τους να κυμαίνεται, σε έναν υγιή ενήλικα, μεταξύ  $4.8 - 5.4 * 10^{12}$

κύτταρα / L. [4] Τα φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2, έχουν σχήμα αμφίκυκλου δίσκου με διάμετρο περίπου 7.5 – 8.7  $\mu\text{m}$  και πάχος 1.7 - 2.2  $\mu\text{m}$ . Τα ερυθρά αιμοσφαίρια διαθέτουν μοναδικές μηχανικές ιδιότητες που τους δίνουν τη δυνατότητα να διαπερνούν ακόμη και αγγεία με διάμετρο ίση με το 1/3 της διαμέτρου των ίδιων. [5] Το χαρακτηριστικό τους σχήμα τους προσδίδει υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο. [6] Επίσης, η ελαστικότητα της μεμβράνης, η σύνδεση της με τον κυτταροσκελετό καθώς και το ιξώδες στο εσωτερικό τους καθιστούν δυνατή την παραμόρφωση τους. [7]

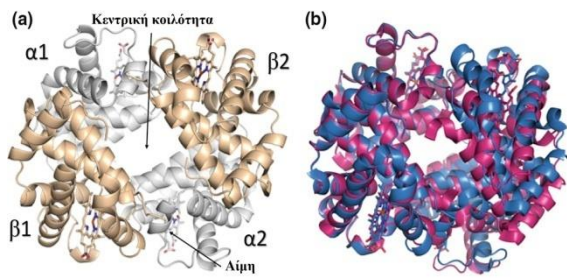


Εικόνα 2: Το χαρακτηριστικό σχήμα του ερυθροκυττάρου (Ανατύπωση από Farley A et al, 2012)

## A2.3 Αιμοσφαιρίνη

Το ερυθρό αιμοσφαίριο, σε αντίθεση με τα περισσότερα κύτταρα, δεν διαθέτει πυρήνα και οργανίδια. [8] Βασικό στοιχείο του κυτταροπλάσματος του αποτελεί η πρωτεΐνη αιμοσφαιρίνη. [9] Ενώ τα τελευταία χρόνια έχει διαπιστωθεί πως η αιμοσφαιρίνη μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες λειτουργίες του κυττάρου, ο βασικός της ρόλος στο ερυθρό αιμοσφαίριο συνεχίζει να θεωρείται η μεταφορά του οξυγόνου. [10]

Η κύρια αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων, η HbA, είναι ένα τετραμερές που αποτελείται από δυο  $\alpha$  υπομονάδες ( $\alpha_1$  και  $\alpha_2$ ) και δυο  $\beta$  υπομονάδες ( $\beta_1$  και  $\beta_2$ ) με παρόμοια δομή  $\alpha$  – έλικας. Οι υπομονάδες συνδέονται μεταξύ τους με τρόπο τέτοιο που στο κέντρο του μορίου δημιουργείται μια κοιλότητα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3. Οι  $\alpha$  υπομονάδες διαθέτουν 7 έλικες ενώ οι  $\beta$



**Εικόνα 3:** Η δομή της αιμοσφαιρίνης. Στην εικόνα (a) φαίνονται οι διαφορετικές υπομονάδες καθώς και η κεντρική κοιλότητα που σχηματίζεται στο κέντρο της. Στην (b) φαίνεται με ροζ χρώμα η Tense μορφή της ενώ με μπλε η Relaxed μορφή της. (Ανατύπωση από Ahmed MH et al, 2020)

της. Στη Tense μορφή της η κεντρική κοιλότητα της αιμοσφαιρίνης είναι μεγαλύτερη ενώ με τη σύνδεση του οξυγόνου μεταβαίνει στη Relaxed μορφή της και η κεντρική της κοιλότητα μειώνεται σε μέγεθος. Αυτή η μετάβαση διευκολύνει τη σύνδεση των υπόλοιπων μορίων οξυγόνου στην αιμοσφαιρίνη. [11]

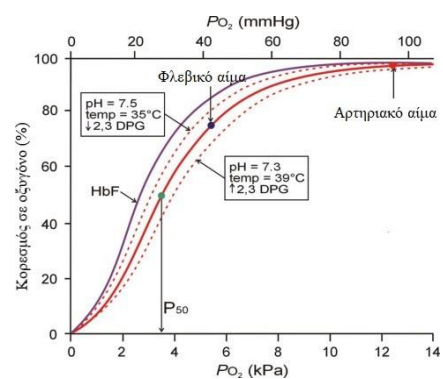
Εκτός από το οξυγόνο, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να συνδεθεί και με άλλα μόρια όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το μονοξείδιο του άνθρακα (CO). [13]

Η αποξυγονωμένη μορφή της αιμοσφαιρίνης ονομάζεται δεοξυαιμοσφαιρίνη (deoxyHb) ενώ η οξυγονωμένη μορφή της, οξυαιμοσφαιρίνη (oxyHb). [14] Η οξειδωμένη αιμοσφαιρίνη, δηλαδή η αιμοσφαιρίνη που αντί για  $Fe^{2+}$  διαθέτει  $Fe^{3+}$ , ονομάζεται μεθαιμοσφαιρίνη (MetHb) και δεν έχει την ικανότητα να δεσμεύεται με το  $O_2$ . [12, 15]

### A2.4 Λειτουργία Ερυθρού Αιμοσφαιρίου

Η βασική λειτουργία του ερυθροκυττάρου είναι η μεταφορά του  $O_2$  στους ιστούς, μέσω της αιμοσφαιρίνης. Η ικανότητα της αιμοσφαιρίνης να δεσμεύει και να αποδεσμεύει το  $O_2$  μπορεί να αναπαρασταθεί από την καμπύλη διαχωρισμού του οξυγόνου (Oxygen Dissociation Curve), όπως φαίνεται στην Εικόνα 4. Σε αυτήν την σιγμοειδή καμπύλη, φαίνεται ο κορεσμός της αιμοσφαιρίνης σε  $O_2$  ( $SO_2$ ) σε σχέση με τη μερική πίεση του οξυγόνου στους ιστούς ( $pO_2$ ). Σε υψηλές τιμές μερικής πίεσης, όπως συναντάται στα αγγεία του αναπνευστικού, ο κορεσμός της αιμοσφαιρίνης είναι υψηλός ενώ στη μικροκυκλοφορία όπου η μερική πίεση είναι χαμηλή

διαθέτουν 8, οι οποίες προσδιορίζονται με τα γράμματα A – H. Ανάμεσα στις έλικες E και F υπάρχει μια θέση πρόσδεσης της αίμης. Η αίμη αποτελείται από ένα δακτύλιο πορφυρίνης με συνδεδεμένο ένα μόριο δισθενούς σιδήρου ( $Fe^{2+}$ ). [11, 12] Ο  $Fe^{2+}$  δημιουργεί αναστρέψιμα δεσμούς με το οξυγόνο ( $O_2$ ) και το διοξείδιο του άνθρακα ( $CO_2$ ) με αποτέλεσμα τη μεταφορά τους από και προς τους ιστούς. Η σύνδεση ενός μορίου οξυγόνου στην αιμοσφαιρίνη μεταβάλλει τη δομή της από τη Tense μορφή στη Relaxed μορφή

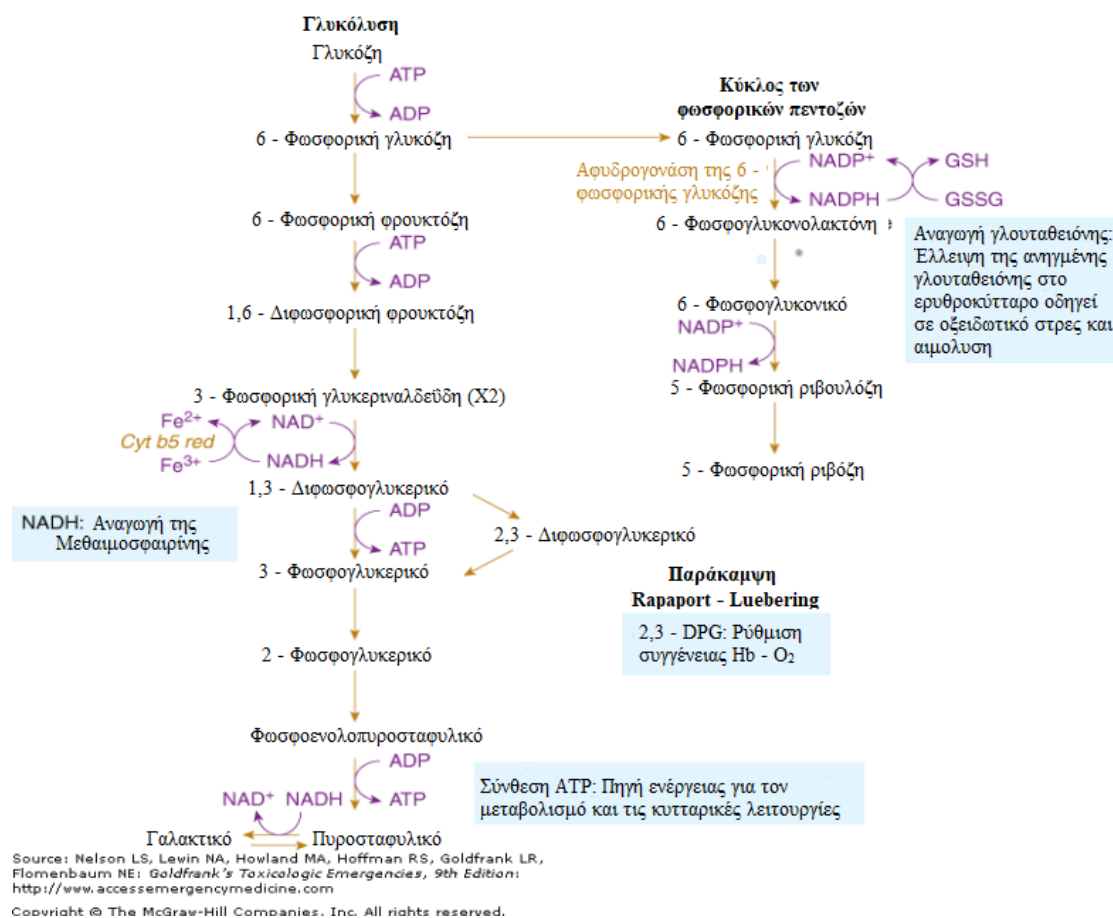


**Εικόνα 4:** Η καμπύλη διαχωρισμού του οξυγόνου. Η μείωση του pH και η αύξηση της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης του 2,3 DPG μετατοπίζει την καμπύλη προς τα δεξιά μειώνοντας τη συγγένεια του οξυγόνου με την αιμοσφαιρίνη διευκολύνοντας έτσι την αποδέσμευση του από αυτήν. (Ανατύπωση από C. Thomas et al, 2012)

το O<sub>2</sub> αποδεσμεύεται από την αιμοσφαιρίνη με αποτέλεσμα ο κορεσμός της αιμοσφαιρίνης να μειώνεται. [14] Η καμπύλη αυτή, και άρα η συγγένεια της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο, μεταβάλλεται από διάφορους παράγοντες. Αρχικά, είναι γνωστό πως η σύνδεση ενός μορίου οξυγόνου πάνω στην αιμοσφαιρίνη μεταβάλλει τη δομή της διευκολύνοντας τη σύνδεση και άλλων μορίων οξυγόνου. Επιπλέον, η καμπύλη μετατοπίζεται από τη μεταβολή της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης H<sup>+</sup> (ή αλλιώς του pH), τη μερική πίεση του διοξειδίου του άνθρακα (pCO<sub>2</sub>) και τη συγκέντρωση του 2,3 διφωσφογλυκερικού (2,3-DPG: 2,3-diphosphoglycerate). Το 2,3-DPG έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με την αιμοσφαιρίνη, αλλάζοντας τη δομή της και μειώνοντας τη συγγένεια της με το οξυγόνο. [16]

### A2.5 Μεταβολισμός του Ερυθρού Αιμοσφαιρίου

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το ερυθρό αιμοσφαίριο δε περιέχει μιτοχόνδρια, έτσι η παραγωγή ενέργειας για τις βασικές του λειτουργίες βασίζεται αποκλειστικά στην αναερόβια γλυκόλυση ή αλλιώς στο μονοπάτι Embden – Meyerhof. Εκτός από την αναερόβια γλυκόλυση, στο ερυθροκύτταρο λαμβάνουν χώρα δυο ακόμη μεταβολικές οδοί, η παράκαμψη Rapaport – Luebering και ο κύκλος των φωσφορικών πεντοζών, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5. [17]



Εικόνα 5: Οι μεταβολικές οδοί του ερυθροκυττάρου. (Ανατύπωση από Nelson L.S, 2010)

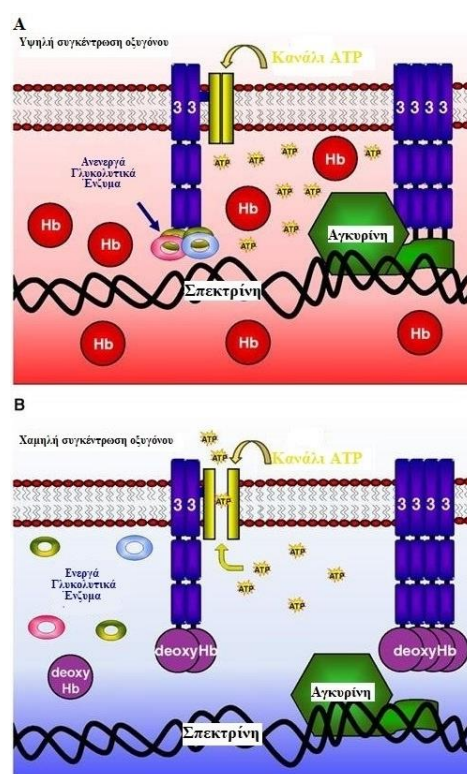


### A2.5.1 Αναερόβια Γλυκόλυση – Μονοπάτι Embden – Meyerhof

Σε φυσιολογικές συνθήκες, το 90% της γλυκόζης στο εσωτερικό του ερυθροκυττάρου καταβολίζεται μέσω του μονοπατιού Embden – Meyerhof σε πυροσταφυλικό ή γαλακτικό οξύ. Η γλυκόζη εισέρχεται στο εσωτερικό του ερυθροκυττάρου μέσω του μεμβρανικού μεταφορέα της γλυκόζης GLUT – 1. Ο GLUT – 1 όπως και η εξωκίνηση (HK: Hexokinase), το ένζυμο που καταλύει το πρώτο βήμα της οδού, εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με τη γλυκόζη εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την παραγωγή ενέργειας ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις της. [18]

Η οδός αυτή αποτελεί τη μοναδική πηγή ενέργειας, με τη μορφή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP: Adenosine triphosphate), του ερυθροκυττάρου. Κατά τη διάρκεια της παράγονται 4 μόρια ATP στα στάδια που καταλύονται από την κινάση του φωσφογλυκερικού (PGK: Phosphoglycerate kinase) και από την πυροσταφυλική κινάση (PK: Pyruvate kinase). Παρόλα αυτά, στα αρχικά στάδια της καταναλώνονται 2 μόρια ATP, ένα κατά τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης από την εξωκίνηση (HK: Hexokinase) και ένα κατά τη φωσφορυλίωση της 6 – φωσφορικής φρουκτόζης από τη φωσφοφρουκτοκινάση (PFK: Phosphofruktokinase), με αποτέλεσμα το κύτταρο τελικά να κερδίζει μόνο 2 μόρια ATP. Επιπλέον, παράγονται 2 μόρια Νικοτιναμίδιο – αδενο – δινουκλεοτιδίου (NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide) κατά την οξείδωση της 3 – φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης από την αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης.

Η αναερόβια γλυκόλυση υπόκειται σε ρύθμιση, ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Η ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων NADH ή ATP αναστέλλουν την γλυκόλυση. Επιπλέον, κάποια από τα ένζυμα της αναερόβιας γλυκόλυσης έχουν τη δυνατότητα να διεγείρονται ή να αναστέλλονται αλλοστερικά ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο το ρυθμό της γλυκόλυσης. Πιο συγκεκριμένα, η HK αναστέλλεται από την ύπαρξη της 6 – φωσφορικής γλυκόζης, η PFK υπόκειται σε αλλοστερική ρύθμιση από το 2,3 DPG ενώ η PK διεγείρεται από το φωσφοενολοπυροσταφυλικό και την 1,6 διφωσφορική φρουκτόζη ενώ αναστέλλεται από το ATP. [8] Αξιοσημείωτη είναι, ακόμη, η ρύθμιση της γλυκόλυσης από το οξυγόνο. Φαίνεται πως σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου κάποια γλυκολυτικά ένζυμα (η PFK, η αλδολάση και η



Εικόνα 6: Η ρύθμιση της γλυκόλυσης μέσω των επιπέδων του οξυγόνου. (Ανατύπωση από Gibson J.S., 2016)



αφυδρογονάση της 3 – φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης) συνδέονται στη Ζώνη 3, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο τη γλυκόλυση. Αντιθέτως, σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου στη Ζώνη 3 συνδέεται η deoxyHb, έχοντας μεγαλύτερη συγγένεια μαζί της, με αποτέλεσμα τα γλυκολυτικά ένζυμα να είναι ελεύθερα να καταβολίσουν τη γλυκόζη. (Εικόνα 6) [19]

### **A2.5.2 Παράκαμψη Rapoport – Luebering**

Η συγκεκριμένη μεταβολική παράκαμψη παρατηρείται μόνο στα ερυθροκύτταρα και παρεμβάλλεται στην αναερόβια γλυκόλυση. Πιο συγκεκριμένα, το ερυθροκύτταρο έχει τη δυνατότητα να παρακάμπτει την παραγωγή ATP με τη δράση της PFK, παράγοντας το 2,3 DPG. Η αύξηση του 2,3 DPG μειώνει τη συγγένεια της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο με αποτέλεσμα να διευκολύνει την αποδέσμευση του.

Το 2,3 DPG έχει τη δυνατότητα να επιστρέψει στην οδό Embden – Meyerhof με τη μετατροπή του σε 3 – φωσφογλυκερικό. Και οι δύο αντιδράσεις του κύκλου καταλύονται από τη μουτάση του διφωσφογλυκερινικού. [8]

### **A2.5.3 Κύκλος των φωσφορικών πεντοζών**

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, περίπου το 90% της γλυκόζης που εισέρχεται στο ερυθροκύτταρο καταβολίζεται μέσω του μονοπατιού Embden – Meyerhof. Το υπόλοιπο 10% καταλήγει στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών.

Ο κύκλος των φωσφορικών πεντοζών αποτελείται από μια μη αντιστρεπτή οξειδωτική και μια αντιστρεπτή μη οξειδωτική φάση. Κατά την οξειδωτική φάση παράγεται φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), ένα μόριο με σημαντική αντιοξειδωτική δράση για το ερυθροκύτταρο καθώς χρησιμοποιείται από διάφορα ένζυμα ως συμπάροντας για τη μείωση των δραστικών ριζών. Κατά τη μη οξειδωτική φάση παράγονται πεντόζες. [17]

## **A3. Οξειδωτικό Στρες**

### **A3.1 Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου**

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι φυσιολογικά προϊόντα του μεταβολισμού των κυττάρων. Ελεύθερες ρίζες ονομάζονται τα άτομα ή μόρια που περιέχουν ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα. Αυτά τα ηλεκτρόνια κάνουν την ελεύθερη ρίζα ασταθή και πολύ δραστική. Τα μόρια αυτά με σκοπό να αποκτήσουν σταθερότητα αποσπών ηλεκτρόνια από άλλα μόρια δημιουργώντας, όμως, με αυτό τον τρόπο και άλλη ελεύθερη ρίζα και ξεκινώντας έναν καταρράκτη αντιδράσεων που τελικά προκαλεί βλάβες στο κύτταρο. [20]

Ο όρος Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species) χρησιμοποιείται για να περιγράψει δραστικά μόρια και ελεύθερες ρίζες προερχόμενες από το μόριο του οξυγόνου. [21] Οι κυριότερες μορφές τους φαίνονται στον Πίνακα 1. [20]

ROS	Χρόνος ημιζωής
$O_2^{\bullet-}$	$10^{-6}s$
$OH^{\bullet}$	$10^{-10} s$
$H_2O_2$	Σταθερό

**Πίνακας 1:** Οι κυριότερες μορφές Δραστικών Ριζών Οξυγόνου καθώς και ο χρόνος ημιζωής τους. Όπως φαίνεται, οι ελεύθερες ρίζες είναι έχουν πολύ σύντομο χρόνο ημιζωής σε αντίθεση με τα δραστικά μόρια που, λόγω της δομής τους, χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη σταθερότητα.

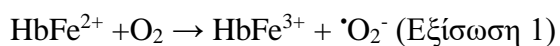
Η ύπαρξη των ROS δεν αποτελεί απαραίτητα πρόβλημα στον οργανισμό ή το κύτταρο. Αντιθέτως, οι ROS σε μικρές συγκεντρώσεις έχει αποδειχθεί πως

μπορούν να λειτουργήσουν προς όφελος του οργανισμού συμβάλλοντας, μεταξύ άλλων, στην άμυνα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, στη ρύθμιση της μεταγραφής, στη μεταγωγή σημάτων, στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και τη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών. [22, 23] Σε μεγάλες συγκεντρώσεις, όμως, οι ROS προκαλούν βλάβες σε πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα. Έτσι, σημαντικό είναι να υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή ROS και στη λειτουργία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου. Η διαταραχή αυτής της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων ονομάζεται οξειδωτικό στρες. [24]

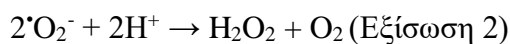
### A3.2 Παραγωγή Δραστικών Ριζών Οξυγόνου στο ερυθρό αιμοσφαίριο

Οι ROS, στο μεγαλύτερο ποσοστό τους, παράγονται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, ενώ μπορούν να παραχθούν και στο κυττοσόλιο, τα υπεροξειδισώματα, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα λυσοσώματα. [23] Τα ερυθρά αιμοσφαίρια, όμως, ενώ στερούνται τα παραπάνω οργανίδια, μπορούν και παράγουν μεγάλες ποσότητες ROS. Αυτό συμβαίνει επειδή περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις οξυγόνου και σιδήρου συνδεδεμένες πάνω στην αιμοσφαιρίνη τους.

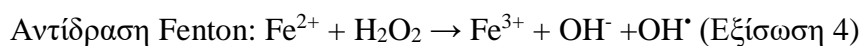
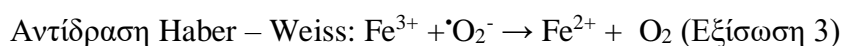
Η κυριότερη πηγή των ROS στα ερυθρά είναι η αντίδραση της αυτοοξειδωσης της αιμοσφαιρίνης κατά την οποία παράγεται, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση (Εξίσωση 1), ανιόν υπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ). [25] Η αυτοοξειδωση της αιμοσφαιρίνης είναι μια διαδικασία που συμβαίνει φυσιολογικά μέσα στο ερυθροκύτταρο. [15] Δεδομένης της υψηλής συγκέντρωσης του ερυθροκυττάρου σε αιμοσφαιρίνη (5 mM), ακόμη και σε χαμηλούς ρυθμούς αυτοοξειδωσης παράγονται σημαντικές ποσότητες ROS. [26] Φυσιολογικά, το ερυθροκύτταρο καταφέρει και συγκρατεί τη MetHb ( $HbFe^{3+}$ ) σε επίπεδα χαμηλότερα του 1% της αιμοσφαιρίνης. Αυτό συμβαίνει, κατά κύριο λόγο, με τη βοήθεια του ενζύμου κυττόχρωμα b5 – MetHb αναγωγάση χρησιμοποιώντας NADH ως συμπαραγόνα. Η συγκέντρωση της MetHb μπορεί να ξεπεράσει τα φυσιολογικά αυτά όρια λόγω γενετικών παραγόντων (έλλειψη του ενζύμου κυττόχρωμα b5 – MetHb αναγωγάση) ή μετά από επαφή με συγκεκριμένα χημικά ή φαρμακευτικές ουσίες. [15]



Το  $\cdot\text{O}_2^-$  έχει τη δυνατότητα να παράγει  $\text{H}_2\text{O}_2$  ακολουθώντας την παρακάτω αντίδραση (Εξίσωση 2). Η αντίδραση αυτή μέσα στο ερυθροκύτταρο καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (SOD: Superoxide dismutase): [4]

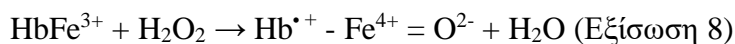
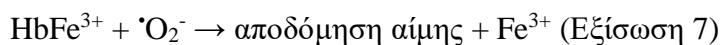
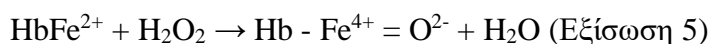


Ο τρισθενής σίδηρος ( $\text{Fe}^{3+}$ ) της MetHb έχει τη δυνατότητα να απομακρύνεται από αυτήν και συμμετέχοντας στις αντιδράσεις Haber – Weiss (Εξίσωση 3) και Fenton (Εξίσωση 4) να παράγει δραστικές ρίζες υδροξυλίου ( $\cdot\text{OH}$ ). [25, 27]



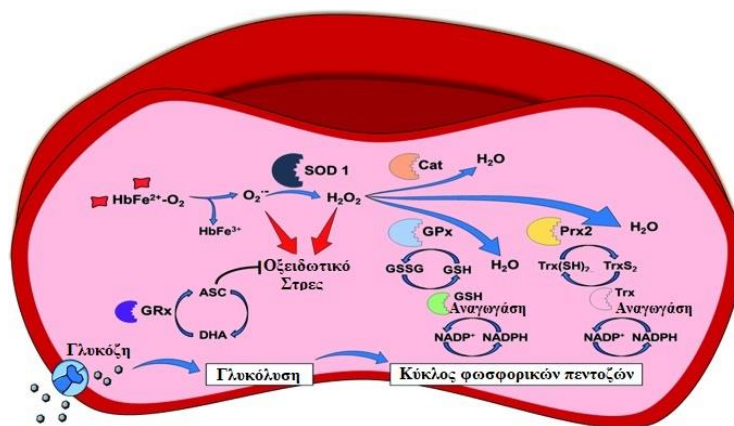
Το ερυθροκύτταρο, και σε αυτήν την περίπτωση, μπορεί και συγκρατεί την παραγωγή ελεύθερων ριζών, αυτήν τη φορά με τη βοήθεια της φερριτίνης, μιας πρωτεΐνης που δεσμεύει τον ελεύθερο σίδηρο. [25]

Ένας ακόμη τρόπος παραγωγής ROS είναι με την αντίδραση της αιμοσφαιρίνης ( $\text{HbFe}^{2+}$  και  $\text{HbFe}^{3+}$ ) με το υπεροξείδιο με αποτέλεσμα, στην πρώτη περίπτωση (Εξισώσεις 5, 6, 7), την αποδόμηση της αίμης και την απελευθέρωση ελεύθερου  $\text{Fe}^{3+}$  ενώ στη δεύτερη περίπτωση (Εξίσωση 8), την παραγωγή της ισχυρά οξειδωτικής  $\text{Hb}^{\cdot+} - \text{Fe}^{4+}$ . [25]



### A3.3 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί Του Ερυθροκυττάρου

Το οξειδωτικό στρες είναι γνωστό πως προκαλεί βλάβες σε πρωτεΐνες και λιπίδια εμποδίζοντας έτσι τη σωστή λειτουργία του ερυθροκυττάρου. Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός πως τα ερυθροκύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες ROS, κάνει επιτακτική την ανάγκη ύπαρξης πολλαπλών αντιοξειδωτικών μηχανισμών καθιστώντας, έτσι, δυνατή την επιβίωση τους στην κυκλοφορία για περίπου 120 ημέρες. [28] Αυτοί οι μηχανισμοί αποτελούνται από αντιοξειδωτικά μόρια και ένζυμα, όπως φαίνονται συνοπτικά στην Εικόνα 7. Τα αντιοξειδωτικά μόρια του ερυθροκυττάρου είναι η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH: Glutathione), ηθειορεδοξίνη (Trx: Thioredoxin), το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) και η  $\alpha$ -τοκοφερόλη (βιταμίνη E) ενώ τα ένζυμα είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD: Superoxide dismutase), η καταλάση (Cat: Catalase), η υπεροξειδοξίνη 2 (Prx2: Peroxiredoxin 2) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx: Glutathione peroxidase). [25]



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του ερυθροκυττάρου. (Ανατύπωση από Kuhn V. et al, 2017)

#### A3.3.1 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά μόρια

##### A3.3.1.1 Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτιδίο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Ηθειϊκή ομάδα (-SH) της κυστεΐνης είναι αυτή που της χαρίζει την αναγωγική της ιδιότητα. Η γλουταθειόνη θεωρείται το σημαντικότερο αντιοξειδωτικό μόριο μικρού μοριακού βάρους των ερυθροκυττάρων και η συμβολή της είναι κρίσιμη για τη δράση του ενζύμου GPx. [29] Η γλουταθειόνη ανευρίσκεται σε δύο μορφές στα ερυθροκύτταρα, την ανηγμένη GSH μορφή και την οξειδωμένη GSSG μορφή, η οποία είναι αποτέλεσμα της σύνδεσης μέσω δισουλφιδικών δεσμών δύο μορίων της. Το 90 – 95% της γλουταθειόνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή (GSH) και μεταβαίνει στην οξειδωμένη μορφή (GSSG) της μετά από τη χρήση της από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Η ανακύκλωση της γλουταθειόνης, δηλαδή η μετατροπή της από την GSSG μορφή πίσω στην GSH μορφή της, καταλύεται από το ένζυμο αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR: Glutathione reductase) και συμπάραγοντα NADPH. [25]

#### A3.3.1.2 Θειορεδοξίνη

Η θειορεδοξίνη είναι μια πρωτεΐνη μικρού μοριακού βάρους που δρα ως δότης ηλεκτρονίων συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην προστασία του ερυθροκυττάρου από τις ROS. Διαθέτει μια συντηρημένη περιοχή που αποτελείται από δύο κυστεΐνες, γλυκίνη και προλίνη. Η κυστεΐνη που βρίσκεται στην περιοχή αυτή της χαρίζει και την αντιοξειδωτική της ικανότητα. Αποστολή της στο ερυθροκύτταρο είναι κυρίως η επαναφορά του ενζύμου Grx στην αρχική του κατάσταση, αφού αυτό έχει αντιδράσει με το  $H_2O_2$ , διασπώντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς που έχουν σχηματιστεί ανάμεσα στις κυστεΐνες των δύο υπομονάδων του. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας η Trx οξειδώνεται. Υπεύθυνη για την αναγωγή της είναι το ένζυμο αναγωγάση της θειορεδοξίνης (TR: Thioredoxin reductase). Μελέτες φαίνεται να υποστηρίζουν πως η δράση των Trx / TR αλληλεπικαλύπτεται με τη δράση των GSH / Grx. [30]

#### A3.3.1.3 Βιταμίνη C (Ασκοριβικό οξύ)

Η βιταμίνη C είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη. Στον ανθρώπινο οργανισμό η σύνθεση της δεν είναι δυνατή, έτσι, η πρόσληψη της γίνεται μέσω της τροφής. Στο πλάσμα η βιταμίνη C ανευρίσκεται στην οξειδωμένη μορφή της, το υδροασκοριβικό οξύ (DHA: Dehydroascorbic acid) και εισέρχεται στο ερυθροκύτταρο μέσω υποβοηθούμενης διάχυσης χρησιμοποιώντας το μεμβρανικό υποδοχέα της γλυκόζης GLUT- 1. Μετά την είσοδο του στο ερυθροκύτταρο, το DHA ταχύτατα μετατρέπεται σε ασκοριβικό οξύ με τη βοήθεια του ενζύμου γλουταρεδοξίνη (Grx: Glutaredoxin) και της GSH. Ως ασκοριβικό οξύ πλέον έχει τη δυνατότητα να συμβάλλει στη συντήρηση της  $\alpha$  – τοκοφερόλης, μιας άλλης βιταμίνης με αντιοξειδωτικές δυνατότητες, στην ανηγμένη της μορφή. [4]

#### A3.3.1.4 Βιταμίνη E ( $\alpha$ – Τοκοφερόλη)

Η  $\alpha$  – τοκοφερόλη είναι μια λιπόφιλη βιταμίνη που δεν μπορεί να συντεθεί από τον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι, πηγή της είναι η διατροφή. Η  $\alpha$  – τοκοφερόλη φαίνεται να έχει σημαντική αντιοξειδωτική δράση για τα κύτταρα. Λόγω της λιπόφιλης φύσης της συσσωρεύεται στη μεμβράνη του ερυθροκυττάρου και την προστατεύει από τη λιπιδική υπεροξείδωση. [25] Πιο συγκεκριμένα, η  $\alpha$  – τοκοφερόλη δρα ως δότης ενός  $H^+$  σε ένα λιπιδικό υπεροξείδιο σταματώντας κατά αυτόν τον τρόπο την αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Από αυτήν την αντίδραση, η  $\alpha$  – τοκοφερόλη μετατρέπεται σε ρίζα  $\alpha$  – τοκοφερόλης. Αυτή η ελεύθερη ρίζα, στη συνέχεια, έχει τη δυνατότητα με τη βοήθεια της GRx, ενός μορίου GSH, ενός μορίου ασκοριβικού και ενός μορίου DHA να επιστρέψει πίσω στην αρχική της κατάσταση. [4]

### A3.3.2 Αντιοξειδωτικά ένζυμα

#### A3.3.2.1 Υπεροξειδική δισμουτάση

Η υπεροξειδική δισμουτάση ανήκει στην κατηγορία των μεταλλοενζύμων και οι διαφορετικές μορφές της ταξινομούνται ανάλογα με το μεταλλικό ιόν που φέρει. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ανευρίσκονται τρεις μορφές του ενζύμου: FeSOD, MnSOD, Cu/ZnSOD. [31] Τα ερυθροκύτταρα περιέχουν μόνο τη μορφή Cu/ZnSOD ή αλλιώς SOD1 σε συγκέντρωση περίπου 4μM. Η SOD1 είναι ένα ομοδιμερές κάθε μονομερές της οποίας περιέχει ένα μόριο  $\text{Cu}^{+2}$  και ένα μόριο  $\text{Zn}^{+2}$ . Από τα δύο μεταλλικά ιόντα καταλυτική δράση έχει μόνο ο  $\text{Cu}^{+2}$  ενώ ο  $\text{Zn}^{+2}$  έχει κυρίως ρυθμιστική δράση.

Η SOD καταλύει την αντίδραση μετατροπής του  $\cdot\text{O}_2^-$  σε  $\text{H}_2\text{O}_2$  ανάγοντας, αρχικά, το  $\text{Cu}^{+2}$  που περιέχει και στη συνέχεια οξειδώνοντας τον, όπως φαίνεται στις παρακάτω εξισώσεις (Εξισώσεις 9, 10):

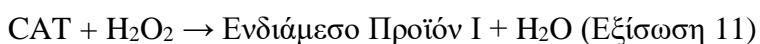


Η αντίδραση της SOD ενώ απομακρύνει τα  $\cdot\text{O}_2^-$  παράγει  $\text{H}_2\text{O}_2$  το οποίο έχει και εκείνο τη δυνατότητα να δράσει οξειδωτικά ή να παράγει  $\text{OH}\cdot$ , όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Έτσι, μετά την SOD άλλα ένζυμα αναλαμβάνουν την ευθύνη απομάκρυνσης των οξειδωτικών ριζών. [4]

#### A3.3.2.2 Καταλάση

Η καταλάση είναι μια τετραμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από τέσσερις ίδιες υπομονάδες. Κάθε υπομονάδα της περιέχει έναν δακτύλιο πορφυρίνης με συνδεδεμένο έναν  $\text{Fe}^{3+}$  και ένα μόριο NADPH. Η συγκέντρωση της μέσα στο ερυθροκύτταρο είναι περίπου 11 – 12 μM. [4] Πειράματα φαίνεται να υποστηρίζουν πως η CAT είναι κυρίως υπεύθυνη για τη διάσπαση του εξωγενούς  $\text{H}_2\text{O}_2$  του ερυθροκυττάρου ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες συμμετέχει ελάχιστα στη διάσπαση του ενδογενώς παραγόμενου  $\text{H}_2\text{O}_2$ . [32]

Η CAT διασπά το  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε δύο στάδια. Όπως φαίνεται στις παρακάτω εξισώσεις, ο  $\text{Fe}^{3+}$  οξειδώνεται από το  $\text{H}_2\text{O}_2$  με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας ρίζας κατιόντος πορφυρίνης η οποία περιέχει  $\text{Fe}^{4+}$ , που ονομάζεται αλλιώς ενδιάμεσο προϊόν I, και ενός μορίου  $\text{H}_2\text{O}$  (Εξίσωση 11). Στη συνέχεια, με ένα δεύτερο μόριο  $\text{H}_2\text{O}_2$  το ενδιάμεσο προϊόν I ανάγεται και η CAT επαναφέρεται στην αρχική της μορφή ( $\text{Fe}^{3+}$ ) παράγοντας ένα μόριο  $\text{O}_2$  και ένα μόριο  $\text{H}_2\text{O}$  (Εξίσωση 12). [4]



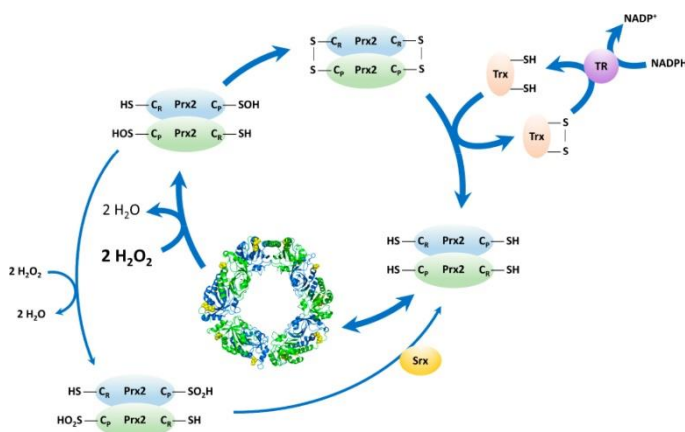
Ενδιάμεσο Προϊόν I + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → CAT + O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O (Εξίσωση 12)

Τα μόρια NADPH που περιέχει η καταλάση δεν φαίνεται να συμμετέχουν στην αντίδραση διάσπασης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Αντιθέτως, φαίνεται πως το NADPH δεν είναι απαραίτητο για τη δράση του ενζύμου ενώ ταυτόχρονα δεν υπάρχει κάποια κοινά αποδεκτή εξήγηση για την ύπαρξη του. Υποθέσεις υποστηρίζουν πως μπορεί σε περιπτώσεις χαμηλής συγκέντρωσης H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> να έχει προστατευτική δράση για το ένζυμο επαναφέροντας το από την κατάσταση του ενδιάμεσου προϊόντος, να είναι κάποιο εξελικτικό υπόλοιπο ή να έχει ρυθμιστική δράση με την απελευθέρωση του από το ένζυμο για τη χρήση από άλλους μηχανισμούς σε συνθήκες υψηλού οξειδωτικού στρες. [33]

### A3.3.2.3 Υπεροξειδοξίνη 2

Η υπεροξειδοξίνη 2 είναι η τρίτη σε αφθονία πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου. Η συγκέντρωσή της στο κυτταρόπλασμα υπολογίζεται στα 0.24 mM ενώ ανευρίσκεται και συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη του ερυθροκυττάρου, κυρίως πάνω στη Ζώνη 3. Η Prx2 για να είναι λειτουργική σχηματίζει ομοδιμερή, παρόλα αυτά συνήθως in vivo τα ομοδιμερή συνδέονται μεταξύ τους μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου σχηματίζοντας δεκαμερή δακτυλιοειδούς σχήματος. Αποστολή της Prx2 στο ερυθροκύτταρο είναι η διάσπαση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ενώ μπορεί να αντιδράσει και με υδροϋπεροξείδια και υπεροξυνιτρικά. [34] Φαίνεται να είναι το σημαντικότερο ένζυμο που διασπά το ενδογενές H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> του ερυθροκυττάρου καθώς σε πειράματα σε ποντικούς έχει υπολογιστεί πως η έλλειψη της προκαλεί αύξηση των επιπέδων H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> κατά 400%. [32]

Βασικό ρόλο για τη λειτουργικότητα του ενζύμου διαδραματίζει η κυστεΐνη που αυτό περιέχει. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8, το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αντιδρά, αρχικά, με την κυστεΐνη της πρώτης υπομονάδας της Prx2 παράγοντας ένα παράγωγο θειενικού οξέος στο καρβοξυτελικό άκρο της (C<sub>p</sub>SOH). Στη συνέχεια, το C<sub>p</sub>SOH αντιδρά με την κυστεΐνη (C<sub>r</sub>) της δεύτερης υπομονάδας σχηματίζοντας δισουλφιδικό δεσμό, ο οποίος σε επόμενο βήμα διασπάται από το σύστημα της θειορεδοξίνης. [34]



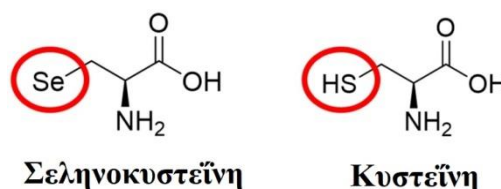
**Εικόνα 8: Τα τρία στάδια της αντίδρασης της Prx2 με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (Ανατύπωση από Moller, M. N.et al, 2023)**

Σε κάποιες περιπτώσεις, το  $C_pSOH$  μπορεί να αντιδράσει ξανά με το  $H_2O_2$  με αποτέλεσμα την παραγωγή σουλφινικών ( $C_pSO_2$ ) ή σουλφονικών οξέων ( $C_pSO_3$ ) και την απενεργοποίηση του ενζύμου. [4]

#### A3.3.2.4 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

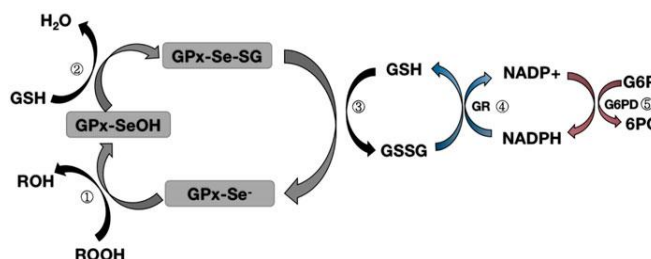
Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης είναι μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες αντιοξειδωτικών ενζύμων του οργανισμού. [35] Στο ερυθροκύτταρο ανευρίσκονται δύο ισομορφές της, η GPx1 και η GPx4. Η GPx1, που είναι και η αφθονότερη από τις δυο, καταλύει τη διάσπαση του  $H_2O_2$  καθώς και υδροϋπεροξειδίων μικρού μοριακού βάρους ενώ η GPx4 διαθέτει την ικανότητα να διασπά πιο σύνθετα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία. [4] Υποστηρίζεται πως η GPx1 είναι το κυρίαρχο αντιοξειδωτικό ένζυμο που διασπά τα ενδογενή υδροϋπεροξειδία. [32]

Και οι δύο ισομορφές είναι σεληνοπρωτεΐνες, δηλαδή πρωτεΐνες που περιέχουν το αμινοξύ σεληνοκυστεΐνη (Εικόνα 9). Η ύπαρξη της σεληνοκυστεΐνης στο ενεργό κέντρο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις διάσπασης των υδροϋπεροξειδίων ενώ φαίνεται πως αυξάνει και την καταλυτική δράση ενζύμου. [35]



Εικόνα 9: Η δομή της σεληνοκυστεΐνης σε σχέση με την κυστεΐνη. Η σεληνοκυστεΐνη διαθέτει στη θέση της θειϊκής ομάδας ένα άτομο Se. (Ανατύπωση από Weaven K. et al, 2022)

Η διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων γίνεται σε τρία στάδια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10. Αρχικά, η σεληνοκυστεΐνη του ενζύμου οξειδώνεται σε σεληνικό οξύ ( $GPx - SeOH$ ) με τη δράση του υδροϋπεροξειδίου. Στη συνέχεια, ένα μόριο GSH αντιδρά με το σεληνικό οξύ ανάγοντας το και δημιουργώντας ένα ενδιάμεσο προϊόν ( $GPx - Se - SG$ ). Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου παράγεται ένα μόριο  $H_2O$ . Για την επαναφορά του ενζύμου στην αρχική του κατάσταση ένα ακόμα μόριο GSH έρχεται και αντιδρά με αυτό, παράγοντας τελικά ένα μόριο GSSG. Η GSSG ανάγεται με τη βοήθεια της GR και του NADPH όπως περιγράφηκε προηγουμένως. [36]



Εικόνα 10: Τα στάδια της αντίδρασης της GPx με τα υδροϋπεροξειδία. (Ανατύπωση από Pei J. et al, 2023)



## **A4. Αποθήκευση ερυθρών αιμοσφαιρίων**

### **A4.1 Παραγωγή και Υποθερμική Αποθήκευση Μονάδων Συμπυκνωμένων Ερυθρών**

#### **A4.1.1 Γενικά στοιχεία**

Τα συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια (ΣΕ) αποτελούν το πλέον μεταγγιζόμενο παράγωγο αίματος. [37] Για την παραγωγή μιας μονάδας ΣΕ  $450 \pm 10\%$  ml ολικού αίματος συλλέγονται σε κλειστό σύστημα αποστειρωμένων ασκών από πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC: Polyvinyl chloride), πλαστικοποιημένων με δις(2-αιθυλεξυλ)φθαλικό εστέρα (DEHP: Bis(2-ethylhexyl) phthalate), χωρίς λάτεξ και ελευθέρους πυρετογόνων. [38] Ο DEHP είναι μια οργανική ένωση που προσδίδει ελαστικότητα και αντοχή στον ασκό. Η ύπαρξη του DEHP στον ασκό φαίνεται να έχει, ακόμη, προστατευτική δράση και για τα ερυθροκύτταρα. Το DEHP έχει τη δυνατότητα να μεταφέρεται και να ενσωματώνεται στην κυτταρική μεμβράνη του ερυθροκυττάρου, σταθεροποιώντας την, μειώνοντας την αιμόλυση, τη μικροκυστιδιοποίηση και επηρεάζοντας θετικά τη μορφολογία και την ωσμωτική του αντίσταση. [39, 40] Παρόλα αυτά, την τελευταία δεκαετία υπάρχουν ενδείξεις πως ο συγκεκριμένος εστέρας μπορεί να έχει τοξική δράση για τον οργανισμό, με αποτέλεσμα να γίνονται προσπάθειες για την αντικατάσταση του από άλλες ενώσεις. [39]

Απαραίτητη για την αποθήκευση ολικού αίματος ή παραγώγων του είναι η ύπαρξη αντιπηκτικών στον ασκό. Ένα από τα κυριότερα αντιπηκτικά στην αιμοδοσία είναι το CPD (Citrate – Phosphate – Dextrose), το οποίο περιέχει κιτρικά, φωσφορικά και δεξτρόζη. Τα κιτρικά αποτρέπουν την πήξη δεσμεύοντας το ασβέστιο, τα φωσφορικά είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της σύνθεσης του ATP και η δεξτρόζη (γλυκόζη) αποτελεί τη βασική πηγή ενέργειας των ερυθροκυττάρων. Τα ΣΕ σε αντιπηκτικό CPD διατηρούνται για 21 ημέρες. Συνήθως μαζί με το CPD χρησιμοποιείται και το προσθετικό διάλυμα SAGM (Saline – Adenine – Glucose – Manitol) το οποίο αποτελείται από διάλυμα χλωριούχου νατρίου, αδενίνη, γλυκόζη και μανιτόλη. Ρόλος της αδενίνης είναι να εξασφαλίζει τη διατήρηση της σύνθεσης του ATP ενώ η μανιτόλη δρα προστατευτικά εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες και σταθεροποιώντας τη μεμβράνη του ερυθροκυττάρου. Με τη χρήση διαλύματος CPD / SAGM η διάρκεια ζωής μιας μονάδας ΣΕ φτάνει τις 42 ημέρες. Άλλο αντιπηκτικό που χρησιμοποιείται είναι το CPDA, το οποίο είναι παρόμοιο με το CPD αλλά περιέχει, επιπλέον, αδενίνη προσδίδοντας έτσι στη μονάδα ΣΕ διάρκεια ζωής 35 ημερών. [40]

Η παραγωγή μιας μονάδας ΣΕ γίνεται μετά από φυγοκέντρηση του ασκού ολικού αίματος. Σε περίπτωση που θα παρασκευαστεί και πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια γίνεται μια φυγοκέντρηση σε χαμηλές στροφές (2000 g για 3 min) ενώ σε αντίθετη περίπτωση γίνεται φυγοκέντρηση σε υψηλές

στροφές (5000 g για 7 min). Μετά τη φυγοκέντρηση, ο ασκός τοποθετείται σε συμπιεστή με σκοπό το διαχωρισμό, μεταφέροντας το πλάσμα σε δορυφορικό ασκό. [38]

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τη Μετάγγιση Αίματος έχει δημοσιεύσει συγκεκριμένες οδηγίες για τη διασφάλιση της ποιότητας των μονάδων ΣΕ. Έτσι, η κατώτατη τιμή αιμοσφαιρίνης έχει οριστεί ως 45 g / μονάδα για τις μονάδες ΣΕ σε προσθετικό διάλυμα ενώ 40 g / μονάδα για τις αντίστοιχες λευκαφαιρεμένες μονάδες. Ακόμη, η τιμή του αιματοκρίτη και στις λευκαφαιρεμένες αλλά και στις μη λευκαφαιρεμένες θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0.50 – 0.70. Και στις δύο περιπτώσεις η αιμόλυση στο τέλος της αποθήκευσης δεν πρέπει να ξεπερνά την τιμή του 0.8% του συνόλου των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τέλος, οι μονάδες ΣΕ θα πρέπει να συντηρούνται σε υποθερμικές συνθήκες, στους 2 – 6 °C. [41]

#### **A4.1.2 Λευκαφαίρεση**

Πλέον, σε πολλές χώρες έχει καθιερωθεί η χρήση αποκλειστικά λευκαφαιρεμένων μονάδων ΣΕ ενώ σε άλλες, αυτές χρησιμοποιούνται μόνο σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών όπως οι ανοσοκατεσταλμένοι και οι χρόνια μεταγγιζόμενοι ασθενείς. Λευκαφαίρεση ονομάζεται η διαδικασία αφαίρεσης των λευκών αιμοσφαιρίων από μια μονάδα ΣΕ με τη χρήση φίλτρων ή με την απομάκρυνση της στιβάδας των λευκών αιμοσφαιρίων μετά από φυγοκέντρηση. Με βάση τις ευρωπαϊκές οδηγίες μια λευκαφαιρεμένη μονάδα ΣΕ θα πρέπει να περιέχει λιγότερα από  $10^6$  λευκοκύτταρα. Η αφαίρεση των λευκών αιμοσφαιρίων από μια μονάδα ΣΕ έχει σημαντικά πλεονεκτήματα για την κλινική εικόνα του μεταγγιζόμενου ασθενούς. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί πως μειώνει τη συχνότητα των εμπύρετων μη αιμολυτικών μετά τη μετάγγιση αντιδράσεων, την πιθανότητα μετάδοσης του κυτταρομεγαλοϊού (CMV), την πιθανότητα δημιουργίας αλλοαντισωμάτων έναντι των HLA αντιγόνων του δότη και τη θνησιμότητα σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις. Ακόμη, υπάρχουν ενδείξεις πως μπορεί να μειώσει την μετάδοση βακτηρίων, ιών ο ιός Epstein Barr (EBV) και της παραλλαγής της νόσου Creutzfeldt – Jakob μέσω της μετάγγισης, όπως επίσης και να μειώσει την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (GvHD) και την οξεία βλάβη των πνευμόνων μετά τη μετάγγιση (TRALI) [42] Επιπλέον, μελέτες δείχνουν πως η λευκαφαίρεση μπορεί να περιορίσει την αποθηκευτική βλάβη των ερυθροκυττάρων καθώς σε μη λευκαφαιρεμένες μονάδες έχουν παρατηρηθεί υψηλότερα ποσοστά αιμόλυσης, μικροκυστιδιοποίησης, μη αναστρέψιμης εχνοκυττάρωσης και οξειδωτικού στρες σε σχέση με αντίστοιχες λευκαφαιρεμένες. [43]

Η διαδικασία της λευκαφαίρεσης μπορεί να πραγματοποιηθεί πριν την αποθήκευση της μονάδας ΣΕ, δηλαδή στο κέντρο όπου θα γίνει και η παρασκευή του παραγώγου, ή μετά την αποθήκευση, στο εργαστήριο του νοσοκομείου ή παρά την κλίνη του ασθενούς. Η χρονική στιγμή κατά την οποία θα πραγματοποιηθεί η λευκαφαίρεση φαίνεται να επηρεάζει την ποιότητα του παραγώγου. Ειδικότερα, υποστηρίζεται πως η μετά – αποθηκευτική λευκαφαίρεση ίσως να μην είναι όσο αποτελεσματική όσο η προ – αποθηκευτική. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα των HLA αντιγόνων να απομακρύνονται από την κυτταρική μεμβράνη των λευκοκυττάρων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και να παραμένουν σε διαλυτή μορφή στη μονάδα ΣΕ και μετά από το φιλτράρισμα. Επίσης, στη μονάδα παραμένουν και οι κυτταροκίνες και τα διάφορα ένζυμα που εκκρίνονται από τα λευκοκύτταρα κατά την ίδια περίοδο. Τέλος, στην περίπτωση της μετά – αποθηκευτικής λευκαφαίρεσης παρά τη κλίνη του ασθενούς, καθίσταται δυσκολότερη η διαδικασία ελέγχου ποιότητας, γεγονός που αποτελεί ένα ακόμη μειονέκτημα. [44]

#### **A4.2 Κρυσσοσυντήρηση Μονάδων Συμπυκνωμένων Ερυθρών**

Η μειωμένη διάρκεια ζωής των μονάδων συμπυκνωμένων ερυθρών αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για τις Υπηρεσίες Αιμοδοσίας. Είναι γνωστό πως κατά περιόδους, και κυρίως την περίοδο του καλοκαιριού και των πρώτων χειμερινών μηνών, παρατηρούνται ελλείψεις είτε λόγω μειωμένης προσέλευσης αιμοδοτών είτε λόγω αυξημένης χρήσης των παραγώγων αίματος. [45] Τη λύση σε αυτό το πρόβλημα θα μπορούσε να δώσει η κατάψυξη συμπυκνωμένων ερυθρών.

Η κατάψυξη μονάδων ΣΕ πραγματοποιήθηκε επιτυχώς για πρώτη φορά το 1950. [46] Από τότε μέχρι σήμερα, ενώ κατεψυγμένες μονάδες ερυθρών έχουν χρησιμοποιηθεί από στρατιωτικές δυνάμεις σε περιόδους πολέμου αλλά και σε Τράπεζες φύλαξης σπάνιων ομάδων αίματος, η χρήση τους στην καθημερινή κλινική πράξη δεν είναι διαδεδομένη. Αυτό οφείλεται κυρίως στο μεγαλύτερο κόστος με το οποίο συνεπάγεται η παραγωγή μιας μονάδας κατεψυγμένων ερυθρών όπως και στην ανάγκη ύπαρξης εξειδικευμένου εξοπλισμού και προσωπικού. Παλαιότερα, σημαντικό μειονέκτημα αποτελούσε και ο αυξημένος χρόνος που απαιτούταν για την προετοιμασία του παραγώγου για μετάγγιση μετά την αποθήκευση του, ο οποίος πλέον, όμως, έχει μειωθεί σε λιγότερο από 2 ώρες. [47]

Είναι γνωστό πως η αποθήκευση σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες ( $< -65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) αναστέλλει τις μεταβολικές αντιδράσεις των κυττάρων καθιστώντας έτσι δυνατή τη διατήρησή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Παρόλα αυτά κατά τη διαδικασία της ψύξης μπορούν να προκληθούν μόνιμες βλάβες στα κύτταρα (κρύο – τραυματισμός), μέσω της δημιουργίας κρυστάλλων πάγου. Οι κρύσταλλοι, ανάλογα με το ρυθμό ψύξης, μπορούν να δημιουργηθούν στο ενδοκυττάριο ή

εξωκυττάριο περιβάλλον. Ο χαμηλός ρυθμός ψύξης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αφυδάτωση και συρρίκνωση των ερυθροκυττάρων. Υποστηρίζεται, επίσης, πως βλάβες μπορούν να προκληθούν και στη διαπερατότητα της μεμβράνης τους. [48] Αντιθέτως, σε ταχύ ρυθμό ψύξης, επειδή τα μόρια του νερού δεν προλαβαίνουν να εξέλθουν από το κύτταρο, είναι πιθανό να δημιουργηθούν κρύσταλλοι πάγου στο εσωτερικό των κυττάρων με αποτέλεσμα μηχανικές βλάβες. [48, 49]

Για την αποφυγή του κρυοτραυματισμού των κυττάρων καθίσταται επιτακτική η ανάγκη χρήσης κάποιας κρυοπροστατευτικής ουσίας. Για την κατάψυξη των ερυθροκυττάρων η βασικότερη κρυοπροστατευτική ουσία που χρησιμοποιείται είναι η γλυκερόλη. Η γλυκερόλη είναι μη τοξική για τα ερυθροκύτταρα, εισέρχεται στο εσωτερικό τους μέσω υποβοηθούμενης διάχυσης και δρα αποτρέποντας τη δημιουργία κρυστάλλων και την αφυδάτωση των ερυθροκυττάρων. [49, 50]

Πρώτο βήμα για την κατάψυξη μονάδων ΣΕ είναι η προσθήκη της γλυκερόλης. Για την κατάψυξη μονάδων συμπυκνωμένων ερυθρών χρησιμοποιούνται δυο μέθοδοι, η Μέθοδος Υψηλής Συγκέντρωσης Γλυκερόλης (HGM: High glycerol method) και η Μέθοδος Χαμηλής Συγκέντρωσης Γλυκερόλης (LGM: Low glycerol method). Με βάση την HGM, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως στις Η.Π.Α, τα κύτταρα καταψύχονται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης γλυκερόλης (40 – 50% w/v) με αργή ψύξη (1 – 3 °C / min) και αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες από – 60 έως – 80 °C. Αντιθέτως, με βάση την LGM μέθοδο, που χρησιμοποιείται κυρίως στην Ευρώπη, οι μονάδες ΣΕ καταψύχονται παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης γλυκερόλης (15 – 20 % w/v) με ταχεία ψύξη (> 100 °C / min) και αποθηκεύονται σε υγρό άζωτο (θερμοκρασίες < – 140 °C). Η αποθήκευση και στις δύο περιπτώσεις μπορεί να διαρκέσει έως και 10 χρόνια. [50] Η κατάψυξη των μονάδων ΣΕ, με βάση τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τη Μετάγγιση Αίματος, θα πρέπει να γίνεται έως και 7 ημέρες μετά τη συλλογή του αίματος. [41]

Μετά την αποθήκευση, για να είναι δυνατή η μετάγγιση τους, ακολουθούν τα βήματα της απόψυξης και απογλυκεροποίησης. Η απόψυξη γίνεται με ταχύ ρυθμό, για να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων, σε υδατόλουτρο στους 37 °C για την HGM μέθοδο και στους 42 – 45 °C για την LGM μέθοδο. [48, 50] Επόμενο βήμα είναι η απογλυκεροποίηση, η οποία πραγματοποιείται από μια σειρά πλύσεων με διάλυμα NaCl 0.9% – γλυκόζης 0.2% στο τέλος των οποίων γίνεται προσθήκη προσθετικού διαλύματος. [51] Είναι πολύ σημαντικό να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα γλυκερόλης που προστέθηκε στη μονάδα ΣΕ για την αποφυγή της λύσης των ερυθροκυττάρων μετά τη μετάγγιση τους, γεγονός που θα μπορούσε να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα στο μεταγγιζόμενο ασθενή. Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται, επίσης, και βιοδραστικά λιπίδια, κυτταροκίνες, κάλιο, ελεύθερη αιμοσφαιρίνη που πιθανόν να βρίσκονταν στο υπερκείμενο καθώς και μέρος των

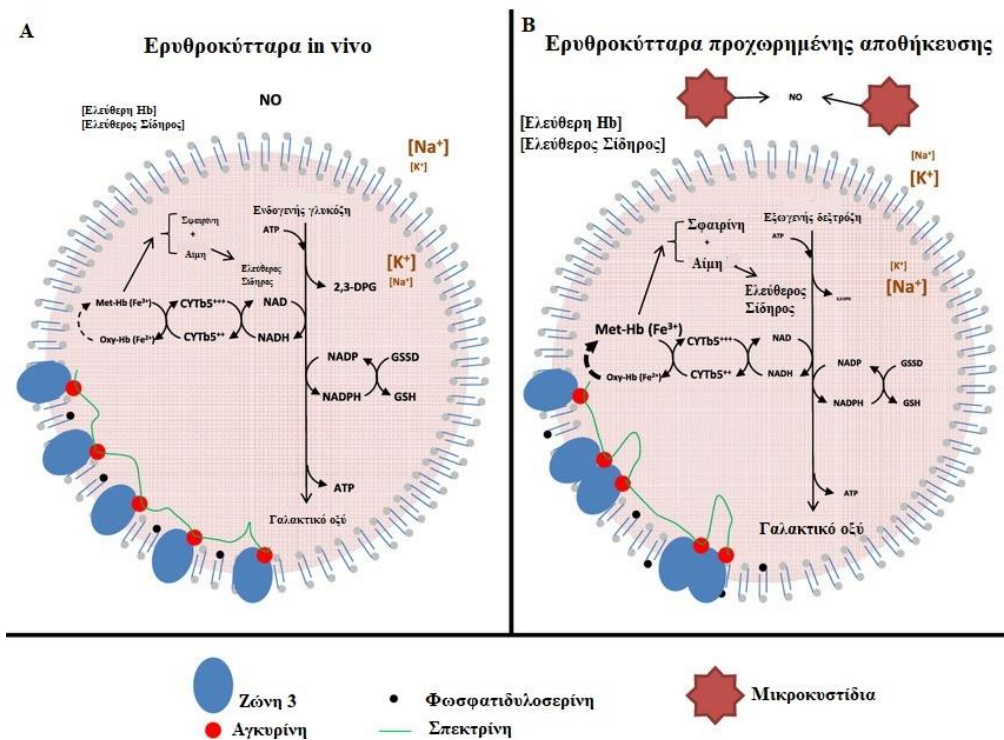
λευκοκυττάρων, αν η μονάδα δεν ήταν ήδη λευκαφαιρεμένη. [49] Αξίζει να σημειωθεί πως και αυτή η διαδικασία, όπως και οι προηγούμενες, μπορεί να είναι επιβλαβής για τα ερυθροκύτταρα. [50]

Παλαιότερα η γλυκεροποίηση και η απογλυκεροποίηση πραγματοποιούνταν με μη αυτόματο τρόπο σε ανοιχτό σύστημα καθιστώντας τη διαδικασία πιο χρονοβόρα και πιο επιρρεπή σε βακτηριακή επιμόλυνση, για αυτό το λόγο η διάρκεια ζωής του παραγώγου μετά την απογλυκεροποίηση του ήταν μόνο 24 ώρες. Πλέον, είναι δυνατή η χρήση αυτόματων συσκευών, όπως το Haemonetics ACP – 215, για την πραγματοποίηση των παραπάνω διαδικασιών σε κλειστό σύστημα. Η διαδικασία διαρκεί 60 – 70 min και αυξάνει τη διάρκεια ζωής της μονάδας σε έως 7 ημέρες αποθηκευμένη στους 2 – 6 °C. [51]

Όπως και για τις συμβατικά αποθηκευμένες μονάδες, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τη Μετάγγιση Αίματος έχει ορίσει συγκριμένες οδηγίες για τη διασφάλιση της ποιότητας των μονάδων κατεψυγμένων ερυθρών. Πιο συγκριμένα, η κατώτατη τιμή της αιμοσφαιρίνης έχει οριστεί ως 36 g / μονάδα, ο αιματοκρίτης θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0.35 – 0.70 ενώ ισχύουν οι ίδιες οδηγίες όσον αφορά το ποσοστό της αιμόλυσης και τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (για τις λευκαφαιρεμένες μονάδες). [41]

#### **A4.3 Αποθηκευτική Βλάβη**

Κατά την αποθήκευση τους, τα ερυθροκύτταρα έρχονται αντιμέτωπα με συνθήκες πολύ διαφορετικές από αυτές που επικρατούν μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Διαχωρίζονται από το πλάσμα και κατόπιν αποθηκεύονται σε υποθερμικές συνθήκες μέσα σε προσθετικό διάλυμα παρουσία οξυγόνου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρατηρούνται διάφορες μεταβολές τόσο στη μορφολογία όσο και στον τρόπο λειτουργίας τους. Οι αλλαγές αυτές ονομάζονται «Αποθηκευτικές Βλάβες», μπορεί να είναι αναστρέψιμες ή όχι και περιλαμβάνουν βιοχημικές, οξειδωτικές και μορφολογικές μεταβολές, όπως φαίνονται συνοπτικά στην Εικόνα 11. Η ύπαρξη αποθηκευτικών βλαβών, πέρα από την πιθανότητα να οδηγήσει σε λύση των ερυθροκυττάρων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, μπορεί αφενός να μειώσει τη θεραπευτική δράση της μετάγγισης καθώς τα μεταγγιζόμενα ερυθροκύτταρα, αν οι βλάβες που φέρουν είναι αρκετές και μη αναστρέψιμες, είναι πιθανό να μην επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στην κυκλοφορία και αφετέρου υπάρχουν ενδείξεις πως μπορεί να δημιουργήσουν επιπλοκές στην κλινική κατάσταση του μεταγγιζόμενου ασθενούς. [52]



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση των αποθηκευτικών βλαβών των ερυθροκυττάρων (B) σε σχέση με τα ερυθροκύτταρα in vivo (A). Διακρίνονται οι μειωμένες συγκεντρώσεις ATP, NADPH, NADH και 2,3 DPG, η μειωμένη διαθεσιμότητα NO, η αυξημένη συγκέντρωση MetHb, ελεύθερου σιδήρου και ενδοκυττάρου  $K^+$  καθώς και οι μεμβρανικές αλλοιώσεις (εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, δημιουργία συσσωματωμάτων της Ζώνης 3, κυστιδιοποίηση) (Ανατύπωση από Orlov D. et al, 2014)

#### A4.3.1 Βιοχημικές Μεταβολές

Φυσιολογικά το pH του ολικού αίματος στην κυκλοφορία ισούται περίπου με 7.35. Καθώς τα αντιπηκτικά που χρησιμοποιούνται για την αποθήκευση των ερυθρών είναι όξινα η τιμή του pH στον ασκό από την πρώτη στιγμή της αποθήκευσης είναι χαμηλότερη από την φυσιολογική (περίπου  $7.0 \pm 0.2$ ). Σε τιμές pH χαμηλότερες από 7.2 φαίνεται να ευνοείται η αποδόμηση του 2, 3 DPG, που περιείχαν ήδη τα ερυθροκύτταρα, σε 3 – φωσφογλυκερικό. Το 3 – φωσφογλυκερικό, στην συνέχεια, εισέρχεται στο μονοπάτι Embden – Meyerhoff παράγοντας ATP. Ως αποτέλεσμα, η συγκέντρωση του ATP αυξάνεται σε κάποιο βαθμό κατά το πρώτο διάστημα της αποθήκευσης. [53]

Μετά τις πρώτες 2 – 3 εβδομάδες αποθήκευσης η συγκέντρωση του 2, 3 DPG μειώνεται κατά 95 % αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την συγγένεια της Hb με το  $O_2$  και κάνοντας δυσκολότερη την αποδέσμευση του από εκείνη. Ταυτόχρονα αρχίζει να μειώνεται και η συγκέντρωση του ATP και του NADH. Ενώ ο καταβολισμός της γλυκόζης μέσω του μονοπατιού Embden – Meyerhoff με σκοπό την παραγωγή ATP δεν σταματάει κατά την αποθήκευση, ο ρυθμός με τον οποίο αυτός συμβαίνει μειώνεται καθώς η δράση των γλυκολυτικών ενζύμων και κυρίως της PFK αναστέλλεται τόσο από τη χαμηλή θερμοκρασία όσο και από το χαμηλό pH. Αξίζει να σημειωθεί πως η συσσώρευση γαλακτικού οξέος από τη γλυκόλυση μειώνει περαιτέρω το pH.

Ανεπηρέαστος δεν παραμένει ούτε ο ρυθμός καταβολισμού της γλυκόζης μέσω του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών. Έτσι, παρατηρείται μειωμένη παραγωγή NADPH από την οποία συνεπάγεται και μειωμένη συγκέντρωση ανηγμένης γλουταθειόνης. [54]

Επιπλέον, η μείωση του ATP επηρεάζει και τη λειτουργία της αντλίας  $Ca^{2+}$  και  $K^+ - Na^+$  με αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$  και του εξωκυττάρου  $K^+$  αντίστοιχα. Η μετάγγιση μονάδων ΣΕ με αυξημένη συγκέντρωση εξωκυττάρου  $K^+$  χρειάζεται προσοχή καθώς έχει παρατηρηθεί πως μπορεί να προκαλέσει αρρυθμίες κυρίως σε παιδιατρικούς ασθενείς. [53]

Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως οι παραπάνω βλάβες φαίνεται συνήθως να είναι αναστρέψιμες καθώς λίγες ώρες μετά τη μετάγγιση το ερυθροκύτταρο ξεκινά να παράγει ξανά ATP και 2, 3 DPG ενώ οι συγκεντρώσεις του  $K^+$  και  $Na^+$  επιστρέφουν και αυτές σε φυσιολογικά επίπεδα. [55, 56]

Κατά την αποθήκευση παρατηρείται, επίσης, μειωμένη διαθεσιμότητα μονοξειδίου του αζώτου (NO) στα ερυθροκύτταρα. Το μονοξείδιο του αζώτου παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυκλοφορίας του αίματος μέσω της σύνδεσης του με την αιμοσφαιρίνη. [55] Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, οι ποσότητες NO που υπάρχουν στα ερυθροκύτταρα και μπορούν να συνδεθούν με την αιμοσφαιρίνη είναι μειωμένες αφενός επειδή δεν υπάρχουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα για να το παράγουν και αφετέρου επειδή ακόμη και το ελάχιστο διαθέσιμο προλαβαίνει να συνδεθεί με την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη στο υπερκείμενο ή με την αιμοσφαιρίνη των μικροκυστιδίων. [54] Έτσι, μετά από μετάγγιση μονάδων ΣΕ που έχουν αποθηκευτεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα υπάρχει πιθανότητα δημιουργίας προβλήματος κατά τη ροή των ερυθροκυττάρων κυρίως στα τριχοειδή αγγεία. [55]

#### **A4.3.2 Οξειδωτικές Μεταβολές**

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η κύρια πηγή ROS στα ερυθροκύτταρα είναι η αντίδραση αυτοοξειδωσης της αιμοσφαιρίνης. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η αντίδραση αυτή αντιστρέφεται με τη βοήθεια του ενζύμου κυττόχρωμα b5 – MetHb αναγωγάση και συμπαραγοντα το NADH. Κατά την αποθήκευση, λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας αλλά και της μειωμένης συγκέντρωσης του NADH στα ερυθροκύτταρα η δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου μειώνεται. Αυτό σε συνδυασμό με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις διαλυμένου  $O_2$ , που οφείλονται στη χαμηλότερη θερμοκρασία, έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή ROS ιδιαίτερα μετά τη δεύτερη εβδομάδα αποθήκευσης. [54]

Οι ROS είναι γνωστό πως προκαλούν προβλήματα στο ερυθροκύτταρο οξειδώνοντας δομικές, λειτουργικές και μεταβολικές πρωτεΐνες και λιπίδια. [54] Οι συχνότερες οξειδωτικές βλάβες στις

πρωτεΐνες σχετίζονται με τον κατακερματισμό, την καρβονυλίωση και τη γλυκοζυλίωση. Ο κατακερματισμός έχει παρατηρηθεί σε δομικές πρωτεΐνες όπως η σπεκτρίνη, η αγκυρίνη και η Ζώνη 3. Η Ζώνη 3, όπως έχει αναφερθεί, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γλυκόλυσης και του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών και έτσι ο κατακερματισμός της δημιουργεί σημαντικά προβλήματα στο ερυθροκύτταρο. Η ύπαρξη καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών, η μέτρηση του επιπέδου των οποίων χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό της οξειδωτικής βλάβης στις πρωτεΐνες, φαίνεται να αυξάνεται μέχρι και την 4<sup>η</sup> εβδομάδα αποθήκευσης, κυρίως στις μη λευκαφαιρεμένες μονάδες. Στην συνέχεια, έχει παρατηρηθεί μείωση η οποία πιστεύεται πως οφείλεται στην απομάκρυνση τους μέσω μικροκυστιδίων ή στη διάσπαση τους μέσω του πρωτεασώματος. Η γλυκοζυλίωση παρατηρείται σε μεμβρανικές και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης και της αιμοσφαιρίνης. Πιστεύεται πως οφείλεται στην περίσσεια γλυκόζης μέσα στον ασκό, λόγω των αντιπηκτικών και των προσθετικών διαλυμάτων. Η γλυκοζυλίωση είναι πιθανό να επηρεάζει τη ροή των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία μετά τη μετάγγιση και να έχει προφλεγμονώδη δράση. [57]

Από την οξείδωση δεν παραμένει ανεπηρέαστη η πολυπληθέστερη πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου, η αιμοσφαιρίνη. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί πως οξειδωμένες μορφές της αιμοσφαιρίνης ή αιμοχρώματα συνδέονται σε συστατικά της μεμβράνης, με κυριότερη τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη Ζώνη 3. [58] Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να ξεκινά από την 4<sup>η</sup> ημέρα αποθήκευσης γίνεται όμως πολύ πιο έντονο μετά την 22<sup>η</sup> ημέρα. [59] Αποτέλεσμα της παραπάνω σύνδεσης είναι η δημιουργία συσσωματωμάτων πάνω στην κυτταρική μεμβράνη τα οποία αναγνωρίζονται από ανοσοσφαιρίνες και οδηγούν τελικά στην εκκαθάριση των συγκεκριμένων ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία. [58] Ταυτόχρονα, έχει παρατηρηθεί σύνδεση οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης και σε πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού του ερυθροκυττάρου γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει τη μορφολογία του. [59]

Πέρα από τις πρωτεΐνες, από τις ROS παρατηρείται και υπεροξείδωση των λιπιδίων του ερυθροκυττάρου. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων οδηγεί στη δημιουργία οξειδωμένων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με αποτέλεσμα τη διαταραχή της διπλοστιβάδας της κυτταρικής μεμβράνης του ερυθροκυττάρου. [54] Η διαδικασία ξεκινά με την αντίδραση μιας ROS με ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ της μεμβράνης όπου σε συνδυασμό με το O<sub>2</sub> έχουν τελικά ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ρίζας λιπιδικού υπεροξειδίου. Η ρίζα αυτή, στη συνέχεια, αντιδρά με ένα ακόμα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ μετατρέποντας το και εκείνο σε ρίζα λιπιδικού υπεροξειδίου και δημιουργώντας έναν καταρράκτη αντίστοιχων αντιδράσεων. Οι αντιδράσεις σταματούν όταν δύο ρίζες λιπιδικών υπεροξειδίων αντιδράσουν μεταξύ τους. [52] Η μαλονδιαλδεΐδη (MDA:

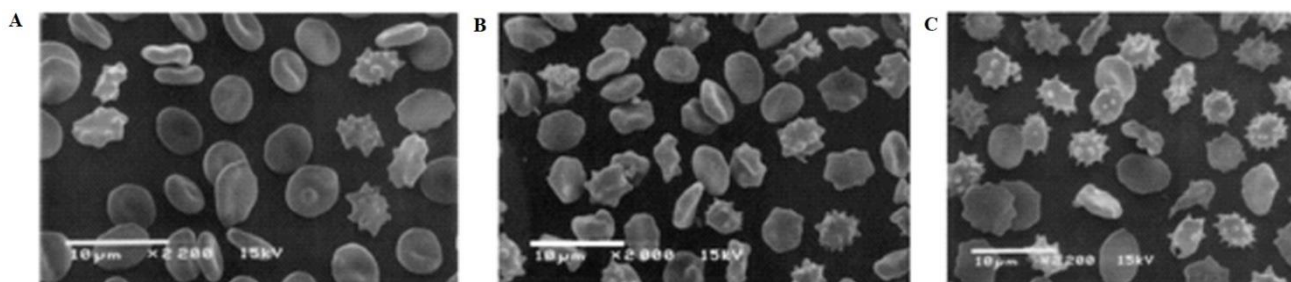


Malondialdehyde) είναι ένα από τα βασικότερα προϊόντα της διαδικασίας αυτής και για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό της οξειδωτικής βλάβης στα λιπίδια του ερυθροκυττάρου. [60] Τα οξειδωμένα λιπίδια που δημιουργούνται έχουν προφλεγμονώδη και προθρομβωτική δράση αυξάνοντας την πιθανότητα κάποιου θρομβωτικού επεισοδίου μετά τη μετάγγιση. [53]

#### A4.3.3 Μορφολογικές Μεταβολές

Κατά την αποθήκευση παρατηρούνται μεταβολές και στη μεμβράνη και τη μορφολογία των ερυθροκυττάρων. Η μείωση του ATP οδηγεί τελικά στην εξωτερίκευση της φωσφατιδιλοσερίνης, ενός φωσφολιπιδίου που βρίσκεται φυσιολογικά στην εσωτερική στιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης. Το γεγονός αυτό προάγει τη δημιουργία μικροκυστιδίων τα οποία λειτουργούν ως μηχανισμός απομάκρυνσης οξειδωμένων πρωτεϊνών και λιπιδίων από το ερυθροκύτταρο. [53, 54]

Παράλληλα, η απώλεια μέρους της μεμβράνης λόγω της μικροκυστιδιοποίησης επηρεάζει και το σχήμα του ερυθροκυττάρου το οποίο από αμφίκυκλος δίσκος μετατρέπεται σε εχινοκύτταρο και τελικά σε σφαιροεχινοκύτταρο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 12. Η μεταβολή σε σφαιροεχινοκύτταρο είναι πλέον μη αναστρέψιμη καθώς έχει χαθεί μεγάλο μέρος της μεμβράνης και το ερυθροκύτταρο δεν διαθέτει μηχανισμούς για να την ανανεώσει. Η αλλαγή του σχήματος επηρεάζει αρνητικά την παραμορφωσιμότητα των ερυθροκυττάρων δημιουργώντας ιδιαίτερες δυσκολίες στην κυκλοφορία τους στα τριχοειδή αγγεία. [53]



**Εικόνα 12:** Εικόνα αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. (Α) Την 5η ημέρα της αποθήκευσης η πλειοψηφία των ερυθροκυττάρων έχουν φυσιολογικό σχήμα αμφίκυκλου δίσκου. (Β) Τη 14η ημέρα της αποθήκευσης ήδη παρατηρείται αυξημένος αριθμός εχινοκυττάρων και σφαιροεχινοκυττάρων. (Γ) Την 42η ημέρα της αποθήκευσης τα σφαιροεχινοκύτταρα αποτελούν την πλειοψηφία των κυττάρων. (Ανατύπωση από Flatt J. et al, 2014)

## **B. Υλικά και Μέθοδοι**

### **B1. Σκοπός**

Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από 6 μονάδες συμβατικά αποθηκευμένων συμπυκνωμένων ερυθρών (ΣΕ) σε διάλυμα CPD – SAGM καθώς και δείγματα από 6 μονάδες κατεψυγμένων ΣΕ. Οι μονάδες κατεψυγμένων ΣΕ αποθηκεύτηκαν στους – 80°C παρουσία υψηλής συγκέντρωσης γλυκερόλης. Ακολούθησε απόψυξη, απογλυκεροποίηση και συντήρηση για έως 7 ημέρες σε διάλυμα CPD – SAGM. Όλες οι μονάδες ήταν λευκαφαιρέμενες.

Μελετήθηκαν τα επίπεδα των ενδοκυττάρων ROS των συμβατικά αποθηκευμένων και κατεψυγμένων μονάδων ΣΕ σε πρώτη (ημέρα 1) και προχωρημένη αποθήκευση (ημέρα 42 και ημέρα 7, αντίστοιχα), με και χωρίς την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα. Σκοπός της εργασίας ήταν η σύγκριση των επιπέδων των δραστικών ριζών οξυγόνου των δύο ομάδων ερυθρών με στόχο τη χρήση αυτού ως δείκτη ποιότητας των αποθηκευμένων ερυθρών.

### **B2. Όργανα και αντιδραστήρια**

#### **B2.1 Συσκευές και όργανα**

- Vortex
- Αιματολογικός αναλυτής Convergys X3 NG
- Αναλυτικός ζυγός
- Κλίβανος
- Κυτταρόμετρο BD FACSCANTO
- Μικροφυγόκεντρος Thermo MicroCL 17
- Πιπέτες τύπου Biorad διαφόρων όγκων

#### **B2.2 Χημικά και αντιδραστήρια**

- BSA (Bovine Serum Albumin), Sigma
- CM – DH<sub>2</sub>DCFDA, Invitrogen
- DMSO (Dimethyl sulfoxide)
- PBS (Phosphate Buffered Saline) 310 mosm
- Διάλυμα γλυκόζης 5mM
- Φαινυλδραζίνη
- Eppendorfs

### **B2.3 Αναλώσιμα**

- Ρύγχη για πιπέτες τύπου Biorad
- Σύριγγες και βελόνες αιμοληψίας (21G, 10ml)
- Σωληνάρια κυτταρομετρίας

### **B3. Εργαστηριακή Μέθοδος**

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των ενδοκυττάρων ROS των ερυθροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο εστερας CM-DH<sub>2</sub>DCFDA, ο οποίος λόγω της λιπόφιλης φύσης του έχει τη δυνατότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και να εισέρχεται στο εσωτερικό του ερυθροκυττάρου. Εκεί, υδρολύεται από ερυθροκυτταρικές εστεράσες και στη συνέχεια οξειδώνεται από τις ενδοκυττάρους ROS παράγοντας το φθορίζον προϊόν DCF. Το DCF απορροφά και εκπέμπει στα ίδια περίπου μήκη κύματος με την FITC (492–495 nm και 517–527 nm, αντίστοιχα) και έτσι με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατός ο προσδιορισμός των επιπέδων φθορισμού του. Τα επίπεδα φθορισμού του DCF είναι ανάλογα των επιπέδων των ενδοκυττάρων ROS. [61]

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η παρακάτω:

- Φυγοκέντρηση δείγματος από τη μονάδα ΣΕ στα 1000 g για 10 min με σκοπό τη συμπύκνωση σε αιματοκρίτη 80%.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου πλάσματος.
- Αραίωση με PBS σε αιματοκρίτη 4%.
- Επώαση 2.5 μL του παραπάνω δείγματος σε 125 μL διαλύματος PBS – γλυκόζη – BSA 0.1%, μετά την προσθήκη 1.25μL CM – DH<sub>2</sub>DCFDA, σε κλίβανο στους 37°C για 1 ώρα.
- Αραίωση (1:20) του επωαζόμενου δείγματος σε διάλυμα PBS – γλυκόζη – BSA 0.1% σε σωληνάριο κυτταρομετρίας.
- Μέτρηση των επιπέδων ROS με χρήση κυτταρομετρίας ροής στα ίδια μήκη κύματος που εκπέμπει / απορροφά η FITC.

Τα επίπεδα των ενδοκυττάρων ROS μετρήθηκαν και μετά από την επίδραση ενός οξειδωτικού παράγοντα που στοχεύει την αιμοσφαιρίνη, τη φαινυλδραζίνη. Σε αυτήν την περίπτωση, προηγήθηκε επώαση 5.5 μL ερυθροκυττάρων (αιματοκρίτης 40%) σε 1 ml διάλυμα PBS – γλυκόζης 0.1% παρουσία 2.9 μL φαινυλδραζίνης για 45 min στους 37°C. Μετά από 3 πλύσεις με διάλυμα PBS – γλυκόζης 0.1%, συνεχίστηκε η διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως.

## Γ. Αποτελέσματα

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Microsoft Excel. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε t – test για ανεξάρτητα δείγματα ανάμεσα στα συμβατικά αποθηκευμένα και τα κατεψυγμένα ερυθρά για κάθε περίοδο αποθήκευσης. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο  $p < 0.05$ .

### Γ1. Αιματολογικές Παράμετροι

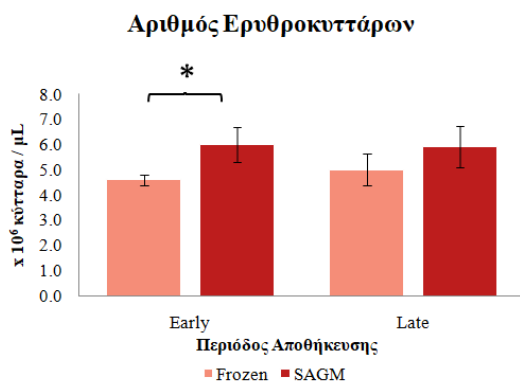
Πριν από κάθε επεξεργασία των δειγμάτων, μετρήθηκαν οι βασικές αιματολογικές παράμετροι (RBCs, Hb, HCT, MCV, MCH, MCHC και RDW) σε αιματολογικό αναλυτή. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται αναλυτικά στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγράμματα 1 – 7).

Ο αριθμός των ερυθροκυττάρων (Διάγραμμα 1) φάνηκε να είναι σημαντικά μειωμένος στις κατεψυγμένες μονάδες ( $4.6 \pm 0.2$  ερυθροκύτταρα /  $\mu\text{L}$ ) σε σχέση με τις συμβατικά αποθηκευμένες ( $6.0 \pm 0.7$  ερυθροκύτταρα /  $\mu\text{L}$ ) κατά την πρώτη ημέρα της αποθήκευσης τους. Παρόλα αυτά την τελευταία ημέρα της αποθήκευσης ενώ η υπολογιζόμενη τιμή των ερυθροκυττάρων ήταν και πάλι χαμηλότερη στις κατεψυγμένες μονάδες συγκριτικά με τις συμβατικά αποθηκευμένες ( $5.0 \pm 0.6$  και  $5.9 \pm 0.8$  ερυθροκύτταρα /  $\mu\text{L}$ , αντίστοιχα) η διαφορά δεν χαρακτηρίζεται ως στατιστικά σημαντική. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα και για την αιμοσφαιρίνη, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 2 ( $13.3 \pm 1.1$  και  $17.5 \pm 2.0$  g / dL σε κατεψυγμένες και συμβατικά αποθηκευμένες μονάδες, αντίστοιχα, την πρώτη ημέρα αποθήκευσης). Όσον αφορά τον αιματοκρίτη (Διάγραμμα 3), αυτός βρέθηκε μειωμένος στις κατεψυγμένες μονάδες συγκριτικά με τις συμβατικά αποθηκευμένες τόσο κατά την πρώτη ( $42.6 \pm 3.6$  και  $54.1 \pm 6.1$ , αντίστοιχα) όσο και κατά την τελευταία ημέρα αποθήκευσης ( $43.8 \pm 4.8$  και  $56.7 \pm 10.0$ , αντίστοιχα). Ακόμη, και η μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων (MCHC), που απεικονίζεται στο Διάγραμμα 6, φαίνεται να είναι χαμηλότερη στις κατεψυγμένες μονάδες την πρώτη ημέρα της αποθήκευσης ( $31.3 \pm 0.7$  g / dL) σε σχέση με τις συμβατικά αποθηκευμένες ( $32.2 \pm 0.4$  g / dL). Την τελευταία ημέρα της αποθήκευσης τους δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά. Στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε ούτε στην αρχή ούτε στο τέλος της αποθήκευσης στο μέσο όγκο (MCV), στη μέση αιμοσφαιρίνη (MCH) και στο εύρος κατανομής (RDW) των ερυθροκυττάρων (Διαγράμματα 4, 5, 7).

## Γ2. Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου (ROS)

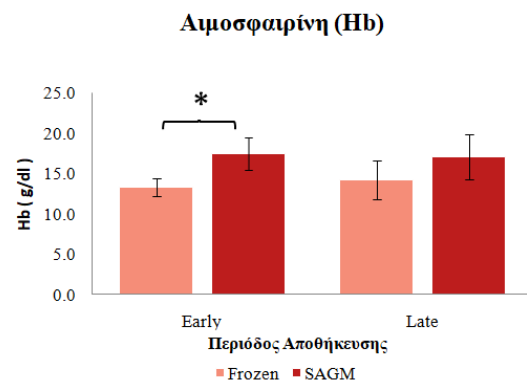
Για τον προσδιορισμό των ROS μετρήθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής η μέση ένταση φθορισμού (MFI: Mean Fluorescence Intensity). Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 8, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στα επίπεδα των ενδοκυττάρων ROS χωρίς να έχει προηγηθεί κάποια εξωγενής επίδραση στις δύο κατηγορίες ΣΕ ούτε στην αρχή ούτε στο τέλος της αποθήκευσης. Αντιθέτως, μετά από την επίδραση της φαινυλδραζίνης, ενός οξειδωτικού παράγοντα, τα επίπεδα των ενδοκυττάρων ROS είναι σημαντικά αυξημένα στις μονάδες των κατεψυγμένων ΣΕ σε σχέση με τις συμβατικά αποθηκευμένες τόσο σε πρώιμη (MFI:  $5465 \pm 970$  και  $4446 \pm 748$ , αντίστοιχα) όσο και σε προχωρημένη αποθήκευση (MFI:  $8974 \pm 1563$  και  $4672 \pm 568$ , αντίστοιχα), σύμφωνα με το Διάγραμμα 9.

### Αιματολογικές Παράμετροι



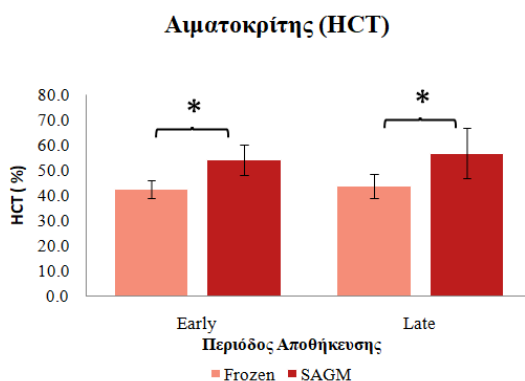
**Διάγραμμα 1:** Απεικόνιση του αριθμού των ερυθροκυττάρων σε συμβατικά αποθηκευμένες μονάδες ΣΕ (SAGM) και σε κατεψυγμένα ΣΕ (Frozen) σε πρώιμη (Early) και προχωρημένη (Late) αποθήκευση.

Με αστέρισκο (\*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.



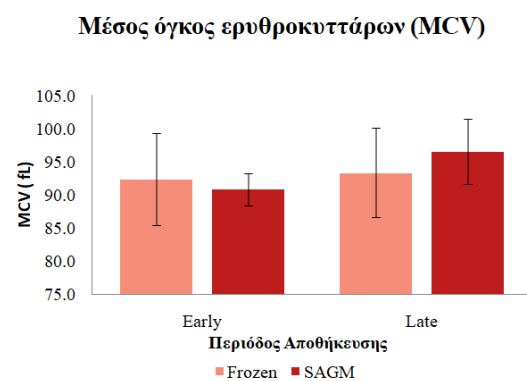
**Διάγραμμα 2:** Απεικόνιση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης σε συμβατικά αποθηκευμένες μονάδες ΣΕ (SAGM) και σε κατεψυγμένα ΣΕ (Frozen) σε πρώιμη (Early) και προχωρημένη (Late) αποθήκευση.

Με αστέρισκο (\*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.



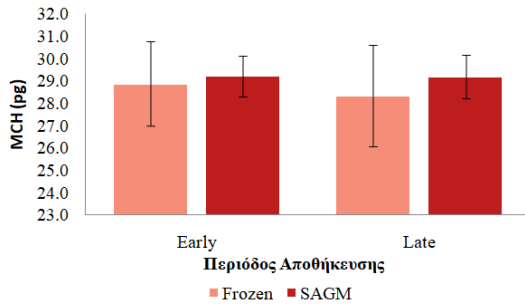
**Διάγραμμα 3:** Απεικόνιση του αιματοκρίτη σε συμβατικά αποθηκευμένες μονάδες ΣΕ (SAGM) και σε κατεψυγμένα ΣΕ (Frozen) σε πρώιμη (Early) και προχωρημένη (Late) αποθήκευση.

Με αστέρισκο (\*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.



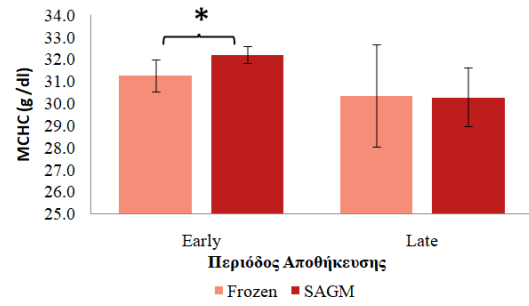
**Διάγραμμα 4:** Απεικόνιση του μέσου όγκου των ερυθροκυττάρων (MCV) σε συμβατικά αποθηκευμένες μονάδες ΣΕ (SAGM) και σε κατεψυγμένα ΣΕ (Frozen) σε πρώιμη (Early) και προχωρημένη (Late) αποθήκευση.

### Μέση Αιμοσφαιρική Ερυθροκυττάρων (MCH)



Διάγραμμα 5: Απεικόνιση της μέσης αιμοσφαιρικής (MCH) των ερυθροκυττάρων σε συμβατικά αποθηκευμένες μονάδες ΣΕ (SAGM) και σε κατεψυγμένα ΣΕ (Frozen) σε πρόωμη (Early) και προχωρημένη (Late) αποθήκευση.

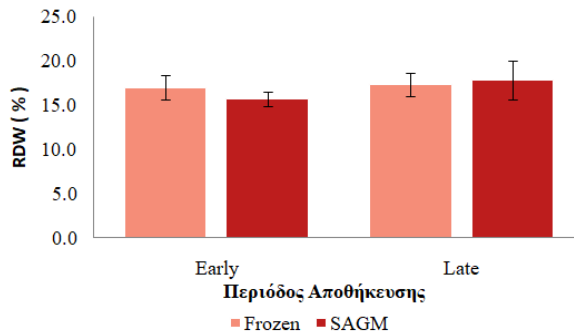
### Μέση Συγκέντρωση Αιμοσφαιρίνης Ερυθροκυττάρων (MCHC)



Διάγραμμα 6: Απεικόνιση της μέσης συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων (MCHC) σε συμβατικά αποθηκευμένες μονάδες ΣΕ (SAGM) και σε κατεψυγμένα ΣΕ (Frozen) σε πρόωμη (Early) και

Με αστερίσκο (\*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

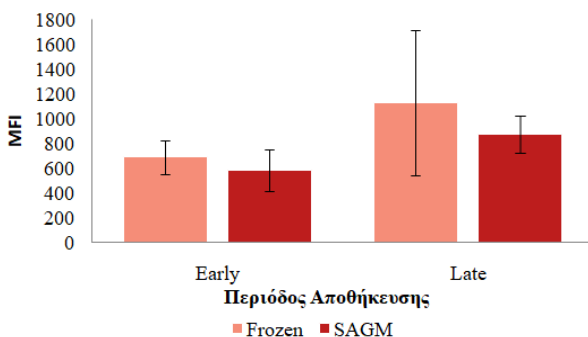
### Εύρος Κατανομής Ερυθροκυττάρων (RDW)



Διάγραμμα 7: Απεικόνιση του εύρους κατανομής των ερυθροκυττάρων (RDW) σε συμβατικά αποθηκευμένες μονάδες ΣΕ (SAGM) και σε κατεψυγμένα ΣΕ (Frozen) σε πρόωμη (Early) και προχωρημένη (Late) αποθήκευση.

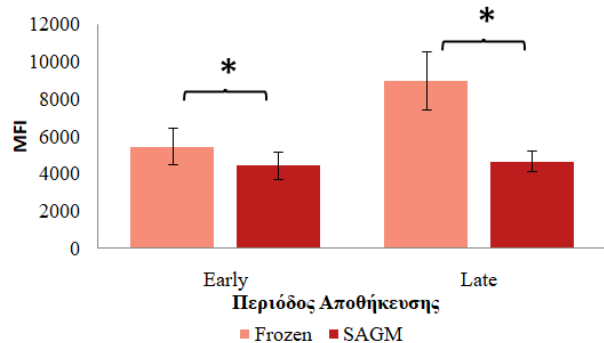
### Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου (ROS)

#### Επίπεδα Ενδοκυττάρων ROS



Διάγραμμα 8: Απεικόνιση των επιπέδων ενδοκυττάρων ROS σε συμβατικά αποθηκευμένες μονάδες ΣΕ (SAGM) και σε κατεψυγμένα ΣΕ (Frozen) σε πρόωμη (Early) και προχωρημένη (Late) αποθήκευση.

#### Επίπεδα Εξωγενώς Επαγόμενων Ενδοκυττάρων ROS



Διάγραμμα 9: Απεικόνιση των επιπέδων ενδοκυττάρων ROS μετά από την επίδραση της φαινυλδραζίνης σε συμβατικά αποθηκευμένες μονάδες ΣΕ (SAGM) και σε κατεψυγμένα ΣΕ (Frozen) σε πρόωμη (Early) και προχωρημένη (Late) αποθήκευση.

Με αστερίσκο (\*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

## Δ. Συζήτηση

Είναι γνωστό πως η υπερπαραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου καθώς και η αδυναμία των κυτταρικών μηχανισμών να την αντιμετωπίσουν δημιουργούν το οξειδωτικό στρες, το οποίο αποτελεί, μεταξύ άλλων, πηγή αποθηκευτικών βλαβών για τις μονάδες συμπυκνωμένων ερυθρών. Η συγκεκριμένη εργασία εστιάζει στον προσδιορισμό και τη σύγκριση των επιπέδων δραστικών ριζών οξυγόνου σε συμβατικά αποθηκευμένες και κατεψυγμένες μονάδες ΣΕ με απώτερο σκοπό την αξιολόγηση της ποιότητας των κατεψυγμένων ερυθρών.

Η κατανόηση των οξειδωτικών βλαβών στις οποίες υπόκεινται τα ερυθροκύτταρα κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης τους μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη αποθήκευση των μονάδων συμπυκνωμένων ερυθρών. Μέχρι σήμερα κατεψυγμένα ερυθρά έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως σε στρατιωτικές επιχειρήσεις και για την αποθήκευση μονάδων σπανίων ομάδων αίματος. Η βελτίωση της διαδικασίας κρυοσυντήρησης πιθανότατα να αποτελέσει κίνητρο για την πιο ευρεία χρήση των μονάδων αυτών. Σημαντική θα ήταν, επίσης, η συμβολή της στη δημιουργία ενός αποθέματος αίματος με σκοπό τη χρήση του σε περιόδους που παρατηρούνται ελλείψεις ή μεγάλες ανάγκες, όπως σε φυσικές καταστροφές ή δυστυχήματα μεγάλης κλίμακας. [49]

Για τη λήψη μιας ολοκληρωμένης εικόνας της κατάστασης των ερυθροκυττάρων μέσα στον ασκό προσδιορίστηκαν, αρχικά, κάποιες βασικές αιματολογικές παράμετροι. Στις κατεψυγμένες μονάδες ΣΕ παρατηρήθηκαν μειωμένες τιμές ερυθροκυττάρων /  $\mu\text{L}$ , αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη σε σχέση με τις συμβατικά αποθηκευμένες μονάδες. Αντίστοιχα αποτελέσματα καταγράφηκαν και από τους Chang et al. και Holovati et al. [62, 63] Είναι γνωστό πως η διαδικασία της γλυκεροποίησης και απόψυξης / απογλυκεροποίησης μπορεί να είναι επιβλαβής για τα ερυθροκύτταρα δημιουργώντας βλάβες σε αυτά ή προκαλώντας αιμόλυση. Ως αποτέλεσμα μόνο ένα ποσοστό των ερυθροκυττάρων στις κατεψυγμένες μονάδες ανακτώνται, δικαιολογώντας, έτσι, τις τιμές αυτές. [64, 65] Όσον αφορά το δείκτη MCV, ο οποίος σχετίζεται με τον όγκο των ερυθροκυττάρων, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε αντιστοιχία και πάλι με τα αποτελέσματα των Chang et al. και Holovati et al. [62, 63] Σε άλλη μελέτη από τους Henkelman et al. [66] βρέθηκε αυξημένη τιμή MCV στις μονάδες κατεψυγμένων ερυθρών γεγονός που αποδόθηκε στη διαδικασία της κατάψυξης – απόψυξης / απογλυκεροποίησης η οποία μπορεί να οδηγήσει στη διόγκωση των ερυθροκυττάρων. Ωστόσο, η διόγκωση αυτή δεν θεωρήθηκε κλινικά σημαντική από την επιστημονική ομάδα καθώς μετά την επαφή με το πλάσμα έχει παρατηρηθεί πως τα ερυθροκύτταρα επιστρέφουν στο φυσιολογικό τους σχήμα. [66] Ο δείκτης MCHC, ο οποίος σχετίζεται με το κυτταροπλασματικό ιξώδες, εμφανίστηκε μειωμένος στις κατεψυγμένες μονάδες στην αρχή της αποθηκευτικής τους

περιόδου. Οι Henkelman et al [66] κατέγραψαν αντίστοιχα αποτελέσματα, παρόλα αυτά κατέληξαν στο συμπέρασμα πως οι χαμηλές αυτές τιμές δεν επηρεάζουν τελικά την παραμορφωσιμότητα των κυττάρων, πιθανότατα λόγω της βοηθητικής δράσης του DEHP που περιέχεται στον ασκό και έχει τη δυνατότητα να μεταφέρεται και να ενσωματώνεται στην κυτταρική μεμβράνη του ερυθροκυττάρου. [66] Παρόλες τις διαφορές στα αιματολογικά δεδομένα ανάμεσα στις δύο ομάδες μονάδων ΣΕ είναι σημαντικό να αναφερθεί πως οι κατεψυγμένες μονάδες ΣΕ πληρούσαν τα κριτήρια που έχει θέσει η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τη Μετάγγιση Αίματος για την ασφαλή χρήση τους σε ασθενείς. [41]

Το οξειδωτικό στρες, όπως αναλύθηκε προηγουμένως, δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στην υποθερμική αποθήκευση των ερυθροκυττάρων. Σχετικά με την κρυσταλλοποίηση, τα πειράματά μας έδειξαν αυξημένα επίπεδα δραστικών ριζών οξυγόνου στα ερυθροκύτταρα μετά από την επίδραση της φαινυλδραζίνης, ενός οξειδωτικού παράγοντα που στοχεύει στην αιμοσφαιρίνη προκαλώντας την οξείδωση της, τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της αποθήκευσης.

Είναι γνωστό πως οι πολύ χαμηλές θερμοκρασίες αναστέλλουν τον κυτταρικό μεταβολισμό, επιτρέποντας, έτσι, τη συντήρηση των ερυθροκυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα. [49] Όμως, η συμβολή της κρυσταλλοποίησης στη δημιουργία οξειδωτικών βλαβών στα ερυθροκύτταρα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. [67] Πράγματι, πειράματα από τους Lecak et al [68] έχουν δείξει πως η MetHb, προϊόν της αυτοοξείδωσης της αιμοσφαιρίνης, δηλαδή της βασικής πηγής δραστικών ριζών οξυγόνου για τα ερυθροκύτταρα, παραμένει εντός φυσιολογικών τιμών κατά την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ακόμη και για πάνω από 10 χρόνια. [68] Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει έντονο ενδιαφέρον για την οξειδωτική βλάβη κατά τη διάρκεια της κρυσταλλοποίησης και έχει αποδειχθεί σε διάφορα είδη κυττάρων, όπως τα ανθρώπινα εμβρυϊκά στελεχιαία κύτταρα και τα γεννητικά κύτταρα, πως η παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου είναι δυνατή ακόμη και κάτω από τόσο χαμηλές θερμοκρασίες. Ως λύση στο συγκεκριμένο πρόβλημα, εξετάζεται η προσθήκη διάφορων αντιοξειδωτικών συστατικών πριν την κατάψυξη. [69, 70] Για τα ερυθροκύτταρα, οι Alotaibi et al [71] πρότειναν της χρήση της σαλιδροσίδης για την προστασία από την οξειδωτική βλάβη. Τα πειράματά τους σε ερυθροκύτταρα προβάτου έδειξαν πως η χρήση της σε συνδυασμό με τη γλυκερόλη μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών ενώ παρατηρήθηκε και αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου GR. [71] Ακόμη, οι Hu et al [72] διερεύνησαν την αντιοξειδωτική δράση της διμεθυλγλυκίνης στην κρυσταλλοποίηση των ερυθροκυττάρων. Η μελέτη τους έδειξε σημαντικά αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα και μειωμένα επίπεδα MDA σε σχέση με τη χρήση γλυκερόλης. [72]



Όπως αποδείχθηκε από τους Chang et al, οι αποθηκευτικές βλάβες μετά την απόψυξη και απογλυκεροποίηση σε κατεψυγμένες μονάδες ΣΕ αυξάνονται με ταχείς ρυθμούς δικαιολογώντας τις οδηγίες που ορίζουν τη διάρκεια ζωής αυτών των μονάδων σε υποθερμικές συνθήκες, παρουσία προσθετικού διαλύματος SAGM, στις 7 ημέρες. [51, 62] Βασικό ρόλο στη δημιουργία αυτών των αποθηκευτικών βλαβών διαδραματίζει, μεταξύ άλλων, και το οξειδωτικό στρες και η αδυναμία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του ερυθροκυττάρου να το αντιμετωπίσει. Κατά την υποθερμική αποθήκευση, η χαμηλή συγκέντρωση των αμινοξέων γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη καθώς και η χαμηλή συγκέντρωση ATP οδηγούν σε μειωμένη παραγωγή νέων μορίων GSH. [57] Ακόμη, σημαντική μείωση παρατηρείται και στα επίπεδα του NADPH, γεγονός που επηρεάζει άμεσα ή έμμεσα τη λειτουργία όλων των αντιοξειδωτικών παραγόντων που αναλύθηκαν νωρίτερα. [54] Σε μελέτη των Nedzi et al. παρατηρήθηκε πως η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, GPx και GP μειώνεται σημαντικά κατά την περίοδο την αποθήκευσης. [73] Επίσης, η επαναφορά (αναγωγή) του ενζύμου Prx – 2, μια διαδικασία που ακόμη και σε φυσιολογικές συνθήκες θεωρείται αργή, φαίνεται να επιβραδύνεται περαιτέρω κατά την αποθήκευση, όπως παρατηρήθηκε από τους Harper et al. [74] Έτσι, είναι πιθανό οι επιταχυνόμενες αποθηκευτικές βλάβες που παρατηρούνται στις κατεψυγμένες μονάδες να επηρεάζουν από νωρίς τη λειτουργία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των ερυθροκυττάρων, εξηγώντας κατά αυτόν τον τρόπο τα αυξημένα επίπεδα ROS που παρατηρήθηκαν μετά την επίδραση της φαινυλδραζίνης.

Μέσα στον τελευταίο αιώνα έχει γίνει σημαντική πρόοδος όσον αφορά την κρυοσυντήρηση των μονάδων συμπυκνωμένων ερυθρών και γίνονται προσπάθειες για την περαιτέρω βελτίωση των πρωτοκόλλων κρυοσυντήρησης. Ήδη υπάρχουν αυτοματοποιημένα συστήματα για τη γλυκεροποίηση και απογλυκεροποίηση των μονάδων μειώνοντας την πιθανότητα βακτηριακής επιμόλυνσης. [51] Ταυτόχρονα ερευνάται η χρήση άλλων κρυοπροστατευτικών ουσιών καθώς και η ταυτόχρονη χρήση αντιοξειδωτικών συστατικών, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, με σκοπό την αποτελεσματικότερη αποθήκευση των μονάδων. [50, 71, 72] Η κρυοσυντήρηση φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος και για αυτό είναι σημαντικό να συνεχιστεί η έρευνα μελετώντας τόσο τις μεταβολές που προκαλούνται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης αλλά και την κατάσταση των ερυθροκυττάρων και την κλινική εικόνα του ασθενή μετά τη μετάγγιση. [50]

## **Ε. Συμπεράσματα**

Η υποθερμική αποθήκευση μονάδων συμπυκνωμένων ερυθρών, αν και χρησιμοποιείται ευρέως, εμφανίζει προβλήματα, με το σημαντικότερο να είναι η περιορισμένη διάρκεια ζωής των μονάδων αυτών. Η κρυοσυντήρηση μονάδων συμπυκνωμένων ερυθρών θα μπορούσε να αποτελεί μια καλή λύση σε αυτό το πρόβλημα καθώς επιτρέπει την αποθήκευση για έως και 10 χρόνια. Παρόλα αυτά, και στις δυο περιπτώσεις τα ερυθροκύτταρα έρχονται αντιμέτωπα με συνθήκες διαφορετικές από αυτές που επικρατούν μέσα στον οργανισμό οδηγώντας στη δημιουργία αποθηκευτικών βλαβών, μέρος των οποίων οφείλεται και στο οξειδωτικό στρες. Η συγκεκριμένη εργασία, αφενός, έδειξε πως οι κατεψυγμένες μονάδες ΣΕ αν και παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές σε κάποιες από τις αιματολογικές παραμέτρους σε σχέση με τις συμβατικά αποθηκευμένες, αυτές είναι σύμφωνες με την υπάρχουσα βιβλιογραφία και τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής επιτροπής για τη Μετάγγιση καθιστώντας, έτσι, τη χρήση τους ασφαλή. Αφετέρου, τα αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάρων δραστικών ριζών οξυγόνου μετά τη χρήση οξειδωτικού παράγοντα είναι πιθανό να σχετίζονται με την επιταχυνόμενη συσσώρευση αποθηκευτικών βλαβών που έχει παρατηρηθεί στις κατεψυγμένες μονάδες, οι οποίες ίσως διαταράσσουν τη λειτουργία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του ερυθροκυττάρου από νωρίς.

## ΣΤ. Βιβλιογραφία

1. Farley, A., C. Hendry, and E. McLafferty, *Blood components*. Nurs Stand, 2012. **27**(13): p. 35-42.
2. Peter Klinken, S., *Red blood cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(12): p. 1513-8.
3. Hajdu, S.I., *A note from history: The discovery of blood cells*. Ann Clin Lab Sci, 2003. **33**(2): p. 237-8.
4. Moller, M.N., et al., *Oxidants and Antioxidants in the Redox Biochemistry of Human Red Blood Cells*. ACS Omega, 2023. **8**(1): p. 147-168.
5. Mohandas, N. and P.G. Gallagher, *Red cell membrane: past, present, and future*. Blood, 2008. **112**(10): p. 3939-48.
6. Diez-Silva, M., et al., *Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease*. MRS Bull, 2010. **35**(5): p. 382-388.
7. Huisjes, R., et al., *Squeezing for Life - Properties of Red Blood Cell Deformability*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 656.
8. van Wijk, R. and W.W. van Solinge, *The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4034-42.
9. Bryk, A.H. and J.R. Wisniewski, *Quantitative Analysis of Human Red Blood Cell Proteome*. J Proteome Res, 2017. **16**(8): p. 2752-2761.
10. Kosmachevskaya, O.V. and A.F. Topunov, *Alternate and Additional Functions of Erythrocyte Hemoglobin*. Biochemistry (Mosc), 2018. **83**(12): p. 1575-1593.
11. Ahmed, M.H., M.S. Ghatge, and M.K. Safo, *Hemoglobin: Structure, Function and Allostery*. Subcell Biochem, 2020. **94**: p. 345-382.
12. Thom, C.S., et al., *Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(3): p. a011858.
13. Marengo-Rowe, A.J., *Structure-function relations of human hemoglobins*. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2006. **19**(3): p. 239-45.
14. Jensen, F.B., *The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: oxygen carriers and regulators of local blood flow*. J Exp Biol, 2009. **212**(Pt 21): p. 3387-93.
15. Skold, A., D.L. Cosco, and R. Klein, *Methemoglobinemia: pathogenesis, diagnosis, and management*. South Med J, 2011. **104**(11): p. 757-61.
16. Thomas, C. and A.B. Lumb, *Physiology of haemoglobin*. Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain, 2012. **12**(5): p. 251-256.

17. Alramadhani, D., et al., *Metabolic Reprogramming in Sickle Cell Diseases: Pathophysiology and Drug Discovery Opportunities*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(13).
18. Yachie-Kinoshita, A., et al., *A metabolic model of human erythrocytes: practical application of the E-Cell Simulation Environment*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 642420.
19. Lewis, I.A., et al., *Role of band 3 in regulating metabolic flux of red blood cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(44): p. 18515-20.
20. Phaniendra, A., D.B. Jestadi, and L. Periyasamy, *Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases*. Indian J Clin Biochem, 2015. **30**(1): p. 11-26.
21. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
22. Alfadda, A.A. and R.M. Sallam, *Reactive oxygen species in health and disease*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 936486.
23. Di Meo, S., et al., *Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 1245049.
24. Cimen, M.Y., *Free radical metabolism in human erythrocytes*. Clin Chim Acta, 2008. **390**(1-2): p. 1-11.
25. Kuhn, V., et al., *Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia*. Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(13): p. 718-742.
26. Johnson, R.M., et al., *Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes*. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(11): p. 1407-17.
27. Kehrer, J.P., *The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity*. Toxicology, 2000. **149**(1): p. 43-50.
28. van Zwieten, R., A.J. Verhoeven, and D. Roos, *Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells*. Free Radic Biol Med, 2014. **67**: p. 377-86.
29. Forman, H.J., H. Zhang, and A. Rinna, *Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(1-2): p. 1-12.
30. Lu, J. and A. Holmgren, *The thioredoxin antioxidant system*. Free Radic Biol Med, 2014. **66**: p. 75-87.
31. Abreu, I.A. and D.E. Cabelli, *Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(2): p. 263-74.
32. Johnson, R.M., et al., *The effects of disruption of genes for peroxiredoxin-2, glutathione peroxidase-1, and catalase on erythrocyte oxidative metabolism*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(4): p. 519-25.

33. Goyal, M.M. and A. Basak, *Human catalase: looking for complete identity*. Protein Cell, 2010. **1**(10): p. 888-97.
34. Sadowska-Bartosz, I. and G. Bartosz, *Peroxiredoxin 2: An Important Element of the Antioxidant Defense of the Erythrocyte*. Antioxidants (Basel), 2023. **12**(5).
35. Weaver, K. and R. Skouta, *The Selenoprotein Glutathione Peroxidase 4: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities*. Biomedicines, 2022. **10**(4).
36. Pei, J., et al., *Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxidation*. Front Pharmacol, 2023. **14**: p. 1147414.
37. D'Alessandro, A., et al., *Red blood cell storage: the story so far*. Blood Transfus, 2010. **8**(2): p. 82-8.
38. Fung, M.K., et al., *Technical Manual*. 2017: AABB.
39. Vermeulen, C., et al., *Clinical and in vitro evaluation of red blood cells collected and stored in a non-DEHP plasticized bag system*. Vox Sang, 2022. **117**(10): p. 1163-1170.
40. Hess, J.R., *An update on solutions for red cell storage*. Vox Sang, 2006. **91**(1): p. 13-9.
41. EDQM and C.o. Europe, *Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Recommendation No. R (95) 15*. 19th Edition ed. 2017: Council of Europe.
42. Bassuni, W.Y., M.A. Blajchman, and M.A. Al-Moshary, *Why implement universal leukoreduction?* Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2008. **1**(2): p. 106-23.
43. Antonelou, M.H., et al., *Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome*. J Proteomics, 2012. **76 Spec No.**: p. 220-38.
44. Sonker, A., A. Dubey, and R. Chaudhary, *Evaluation of a red cell leukofilter performance and effect of buffy coat removal on filtration efficiency and post filtration storage*. Indian J Hematol Blood Transfus, 2014. **30**(4): p. 321-7.
45. Gilcher, R.O. and S. McCombs, *Seasonal blood shortages can be eliminated*. Curr Opin Hematol, 2005. **12**(6): p. 503-8.
46. Smith, A.U., *Prevention of haemolysis during freezing and thawing of red blood-cells*. Lancet, 1950. **2**(6644): p. 910-1.
47. Chang, A., et al., *Cryopreserved packed red blood cells in surgical patients: past, present, and future*. Blood Transfus, 2017. **15**(4): p. 341-347.
48. Scott, K.L., J. Lecak, and J.P. Acker, *Biopreservation of red blood cells: past, present, and future*. Transfus Med Rev, 2005. **19**(2): p. 127-42.
49. Henkelman, S., et al., *Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine*. Vox Sang, 2015. **108**(2): p. 103-12.

50. Anastasiadi, A.T., et al., *When I need you most: frozen red blood cells for transfusion*. Transfus Apher Sci, 2020. **59**(3): p. 102786.
51. Lagerberg, J.W., *Cryopreservation of red blood cells*. Methods Mol Biol, 2015. **1257**: p. 353-67.
52. Yoshida, T. and S.S. Shevkoplyas, *Anaerobic storage of red blood cells*. Blood Transfus, 2010. **8**(4): p. 220-36.
53. Hess, J.R., *Red cell changes during storage*. Transfus Apher Sci, 2010. **43**(1): p. 51-9.
54. Yoshida, T., M. Prudent, and A. D'Alessandro, *Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences*. Blood Transfus, 2019. **17**(1): p. 27-52.
55. Kor, D.J., C.M. Van Buskirk, and O. Gajic, *Red blood cell storage lesion*. Bosn J Basic Med Sci, 2009. **9 Suppl 1**(Suppl 1): p. S21-S27.
56. Flatt, J.F., W.M. Bawazir, and L.J. Bruce, *The involvement of cation leaks in the storage lesion of red blood cells*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 214.
57. D'Alessandro, A., et al., *An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies*. Transfusion, 2015. **55**(1): p. 205-19.
58. Rinalducci, S. and L. Zolla, *Biochemistry of storage lesions of red cell and platelet concentrates: A continuous fight implying oxidative/nitrosative/phosphorylative stress and signaling*. Transfus Apher Sci, 2015. **52**(3): p. 262-9.
59. Kriebardis, A.G., et al., *Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(1): p. 148-55.
60. Mustafa, I., et al., *Time Dependent Assessment of Morphological Changes: Leukodepleted Packed Red Blood Cells Stored in SAGM*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 4529434.
61. Eruslanov, E. and S. Kusmartsev, *Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry*. Methods Mol Biol, 2010. **594**: p. 57-72.
62. Chang, A.L., et al., *Previous Cryopreservation Alters the Natural History of the Red Blood Cell Storage Lesion*. Shock, 2016. **46**(3 Suppl 1): p. 89-95.
63. Holovati, J.L., et al., *The effects of cryopreservation on red blood cell microvesiculation, phosphatidylserine externalization, and CD47 expression*. Transfusion, 2008. **48**(8): p. 1658-68.
64. Valeri, C.R., et al., *A multicenter study of in vitro and in vivo values in human RBCs frozen with 40-percent (wt/vol) glycerol and stored after deglycerolization for 15 days at 4 degrees C in AS-3: assessment of RBC processing in the ACP 215*. Transfusion, 2001. **41**(7): p. 933-9.

65. Valeri, C.R., et al., *In vivo survival of apheresis RBCs, frozen with 40-percent (wt/vol) glycerol, deglycerolized in the ACP 215, and stored at 4 degrees C in AS-3 for up to 21 days.* Transfusion, 2001. **41**(7): p. 928-32.
66. Henkelman, S., et al., *The effects of cryopreservation on red blood cell rheologic properties.* Transfusion, 2010. **50**(11): p. 2393-401.
67. Kaniyas, T. and J.P. Acker, *Biopreservation of red blood cells--the struggle with hemoglobin oxidation.* FEBS J, 2010. 277(2): p. 343-56.
68. Lecak, J., et al., *Evaluation of red blood cells stored at -80 degrees C in excess of 10 years.* Transfusion, 2004. **44**(9): p. 1306-13.
69. Liu, X., et al., *The Feasibility of Antioxidants Avoiding Oxidative Damages from Reactive Oxygen Species in Cryopreservation.* Front Chem, 2021. **9**: p. 648684.
70. Len, J.S., W.S.D. Koh, and S.X. Tan, *The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation.* Biosci Rep, 2019. **39**(8).
71. Alotaibi, N.A., N.K. Slater, and H. Rahmoune, *Salidroside as a Novel Protective Agent to Improve Red Blood Cell Cryopreservation.* PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0162748.
72. Hu, Y., et al., *Dimethylglycine Can Enhance the Cryopreservation of Red Blood Cells by Reducing Ice Formation and Oxidative Damage.* Int J Mol Sci, 2023. **24**(7).
73. Nedzi, M., et al., *Leucoreduction helps to preserve activity of antioxidant barrier enzymes in stored red blood cell concentrates.* Vox Sang, 2016. **110**(2): p. 126-33.
74. Harper, V.M., et al., *Peroxiredoxin-2 recycling is inhibited during erythrocyte storage.* Antioxid Redox Signal, 2015. **22**(4): p. 294-307.