

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

**Αποθηκευτική Βλάβη του Ερυθροκυττάρου:
Ο ρόλος της μεμβράνης**

Ανδρέα Χριστίνα – Σύλβια (Α.Μ. 08004)

Σταματίου – Φρέρη Ασημίνα (Α.Μ. 08067)

Δρ. Κριεμπάρδης Αναστάσιος

Καθηγητής Εφαρμογών Αιματολογίας – Αιμοδοσίας

ΑΘΗΝΑ, Νοέμβριος 2012

TECHNOLOGICAL EDUCATIONAL INSTITUTE OF ATHENS

FACULTY OF HEALTH AND CARING PROFESSIONS

DEPARTMENT OF MEDICAL LABORATORIES

SECTOR OF CELLS AND REACTION

Red Blood Cell Storage Lesion:

The role of membrane

Andrea Christina – Sylvia (R. N. 08004)

Stamatiou – Freri Asimina (R. N. 08067)

Dr. Kriebardis Anastasios

Lecturer of Haematology and Transfusion Medicine

ATHENS, November 2012

Περίληψη

Aπό την αρχαιότητα, το αίμα και οι ιδιότητές του περιβάλλονταν από θρύλους και προκαταλήψεις. Το δέος, με το οποίο αντιμετωπίζονταν στους πολιτισμούς ανά τον κόσμο, δεν άργησε να οδηγήσει στην αναγνώριση της συμβολής του στη διατήρηση της υγείας και της ζωής. Έτσι, το αίμα πέρασε από το μύθο στην πραγματικότητα και από τους πειραματισμούς στην εμπειριστατωμένη έρευνα. Μέσω της γνώσης που αποκτήθηκε, αναδύθηκε η ιδέα της μετάγγισης. Με το πέρασμα των χρόνων, η χρησιμότητα της μετάγγισης αποδείχθηκε και η εφαρμογή της έχει πλέον καθιερωθεί ως μία ιδιαίτερα χρήσιμη κλινική πρακτική. Σήμερα, βασική συνιστώσα της μετάγγισης είναι η αποθήκευση του αίματος. Κύριο στόχο των σύγχρονων ερευνών στον τομέα των μεταγγίσεων αποτελεί η επίτευξη της βέλτιστης ποιότητας του αίματος, και συγκεκριμένα των ερυθρών αιμοσφαιρίων, μετά την αποθήκευση. Η αλλοίωση της ποιότητας επέρχεται λόγω της εμφάνισης των λεγόμενων αποθηκευτικών βλαβών. Ως αποθηκευτική βλάβη του ερυθροκυττάρου ορίζεται ένα σύνολο μορφολογικών, μεταβολικών, βιοχημικών και λειτουργικών μεταβολών που υφίστανται τα ερυθροκύτταρα κατά την αποθήκευση. Η πλειοψηφία των μεταβολών αυτών σχετίζεται έμμεσα ή άμεσα με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Η μείωση του ATP (αδενοσίνη 5'-τριφωσφορικό οξύ) που έχει ως αποτέλεσμα την επιβράδυνση του μεταβολισμού, η διαταραχή της λειτουργίας της αντλίας νατρίου/καλίου με συνέπεια την ελάττωση του ενδοκυτταρικού καλίου και τη συσσώρευση νατρίου στο κυτταρόπλασμα, η μείωση των επιπέδων του 2,3-DPG (2,3-διφωσφογλυκερινικό οξύ) που επηρεάζει την αιμοσφαιρίνη και κατ' επέκταση τη μεταφορά και την απελευθέρωση οξυγόνου, η απώλεια μεμβράνης μέσω της κυστιδιοποίησης, η πρόωρη απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων μέσω της ερύπτωσης, η εκκαθάριση του NO (νιτρικό οξείδιο) από την αιμοσφαιρίνη και οι οξειδωτικές βλάβες που επιφέρουν αλλαγές στη δομή της μεμβράνης και

συγκεκριμένα της πρωτεΐνης-ζώνης 3, αποτελούν ορισμένες από τις αποθηκευτικές βλάβες του ερυθροκυττάρου. Ο χρόνος ζωής των ώριμων ερυθροκυττάρων ορίζεται περίπου στις 120 ημέρες. Παρόλα αυτά, κάτω από στρεσογόνες συνθήκες, η γήρανσή τους μπορεί να επιταχυνθεί και έτσι να οδηγηθούν σε πρόωρο θάνατο, διαδικασία που ονομάζεται ερύπτωση. Η οξειδωση είναι ένας βασικός παράγοντας πυροδότησης της ερύπτωσης. Η συρρίκνωση του κυττάρου και η έκθεση PS (φωσφατιδυλοσερίνη) στην επιφάνεια της μεμβράνης, αποτελούν κύρια χαρακτηριστικά της. Κατά την αποθήκευση, το ερυθροκύτταρο μετατρέπεται σταδιακά σε εχινοκύτταρο και καταλήγει στη μη αναστρέψιμη μορφή του σφαιροεχινοκυττάρου. Από τις απολήξεις των μεμβρανικών προεκβολών του μορφολογικά αλλοιωμένου ερυθροκυττάρου, παρατηρείται απώλεια μεμβράνης υπό τη μορφή κυστιδίων. Τα κυστίδια περιέχουν μία ποικιλία πρωτεϊνών, οι οποίες προέρχονται από τη μεμβράνη και τον κυτταροσκελετό του ερυθρού αιμοσφαιρίου. Ο σχηματισμός των κυστιδίων φαίνεται αρχικά να χρησιμεύει ως ένα μέσο προστασίας, καθώς έτσι αποβάλλονται από το ερυθροκύτταρο μη λειτουργικά, και ενδεχομένως επιβλαβή, συστατικά. Η οξειδωση που υφίστανται τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά την αποθήκευση, συνεισφέρει, σε μεγάλο βαθμό, στην αποθηκευτική βλάβη. Σε οξειδωση υποβάλλονται οι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες και τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια. Όμως, ο πιο σημαντικός στόχος της, φέρεται να είναι η αιμοσφαιρίνη. Το βασικό αποτέλεσμα της οξειδωσης είναι η καταστροφή της μεμβράνης και η λύση του κυττάρου. Οι τρόποι αντιμετώπισης της αποθηκευτικής βλάβης είναι αντικείμενο συνεχούς διερεύνησης. Οι πρόσφατες έρευνες επικεντρώνονται κυρίως στην πρόληψη της εμφάνισής τους. Η λευκαφαίρεση είναι μια διαδικασία, η οποία συμβάλλει στον περιορισμό εμφάνισης της κυστιδιοποίησης και χρησιμοποιείται εκτενώς. Μία νέα πρόταση, η οποία αντιμετωπίζεται με ιδιαίτερο ενδιαφέρον από την ιατρική κοινότητα, πραγματεύεται την αναερόβια αποθήκευση. Με τον τρόπο αυτό αντιμετωπίζει την οξειδωση στην πηγή της. Επίσης, η πιθανή χρήση του NO ως θεραπευτικό μέσο για διάφορες επιπτώσεις της αποθηκευτικής βλάβης, φαίνεται να έχει πολύ καλές προοπτικές. Τέλος, η πρωτεομική, σε συνδυασμό με άλλους τομείς της ομικής (π.χ.

λιπιδωμακή, γλυκομακή), αναμένεται να προσφέρει σημαντικά στην κατανόηση των αποθηκευτικών βλαβών, μέσω εκτεταμένης ανάλυσης της μεμβρανικής σύστασης του ερυθροκυττάρου.

Abstract

From ancient times, blood and its properties has been surrounded by legends and prejudice. The awe, with which all cultures across the world treated blood, did not take long to turn into recognition of its contribution to health and life. This way, blood crossed the path from myth to reality and from experimentation to thorough research. Through the acquired knowledge, the idea of transfusion emerged. Over the years, the utility of transfusion proved its value and is now established as a particularly useful clinical practice. Nowadays, a key part of the transfusion practice is the storage of blood. The main objective of the current research in the field of transfusion is to achieve the best possible quality of blood, specifically concerning red blood cells, after storage. The quality deterioration occurs due to the development of the so-called storage lesions. The erythrocyte storage lesion is defined as a set of morphological, metabolic, biochemical and functional changes. The majority of these changes are directly or indirectly associated with the erythrocyte membrane. Slowed metabolism with a decrease in ATP (adenosine triphosphate) concentration, impaired function of the Na^+/K^+ (sodium/potassium) pump with consequent reduction of intracellular potassium and sodium accumulation within the cytoplasm, a decrease in 2,3-DPG (2,3-diphosphoglycerate) concentrations affecting the hemoglobin and thus the transport and release of oxygen, loss of membrane through vesiculation, premature removal of red blood cells through eryptosis, clearance of NO (nitric oxide) by hemoglobin, and oxidative damage which leads to membrane structure changes and specifically to the band-3 protein, are some of the basic storage lesions of the erythrocytes. Mature red blood cells undergo senescence, limiting their life span to approximately 120 days. However, when put under stress, their senescence may accelerate, leading them to suicidal death (eryptosis). Oxidative stress is one of the main triggers of eryptosis, whose most important features are cell shrinkage and PS

(phosphatidylserine) exposure at the erythrocyte's membrane surface. During its storage, the red blood cell evolves into an echinocyte and ends up in the irreversible form of spherocytocyte. Vesicle shedding from the specula of the morphologically altered red blood cells causes loss of membrane. These vesicles contain a variety of proteins, which derive from the erythrocyte membrane and cytoskeleton. Their formation seems to be a way for viable cells to get rid of deleterious compounds, therefore serving as a protection mechanism. The erythrocyte acidosis observed during storage, contributes in many aspects of the red blood cell storage lesion. Although cytoskeletal proteins and membrane phospholipids are also oxidized, hemoglobin is a main target. Oxidation is characterized by membrane damage and cell lysis. Finding ways to deal with storage lesion is a matter of constant study and research, focusing on the prevention of their occurrence. Leukoreduction is a procedure extensively used in order to limit vesiculation and other adverse effects of storage. A recently proposed protocol, suggesting anaerobic storage of blood, has been treated with great interest by the medical community, as it tackles the problem of oxidation at its source. NO therapeutics also seems to show promising prospects in dealing with various effects of storage lesion. Finally, proteomics, in combination with other omics (e.g. lipidomics, glycomics), is expected to provide in depth understanding of the storage lesion, through a comprehensive analysis of the erythrocyte membrane composition.

Συντμήσεις

2,3-DPG	: 2,3-diphosphoglycerate, 2,3-διφωσφογλυκερίνη/ 2,3-διφωσφογλυκερινικό οξύ
$\alpha 2\beta 2$: τετραμερή σπεκτρίνης
α -Sp	: α -spectrin, α -σπεκτρίνη
β -93Cys	: β -93cysteine, β -93κυστεΐνη
β -Sp	: β -spectrin, β -σπεκτρίνη
Δ EK	: δικτυοερυθροκύτταρο
Σ E	: συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια
AA	: arachidonic acid, αραχιδονικό οξύ
ACD	: acid citrate – dextrose, κιτρικό οξύ – δεξτρόζη
Ar	: argon, αργό
ATP	: adenosine 5'-triphosphate, αδενοσινό 5'-τριφωσφορικό οξύ/ τριφωσφορική αδενοσίνη
BH ₄	: tetrahydrobiopterin, τετραϋδροβιοπτερίνη
Ca ²⁺	: calcium, ασβέστιο
CAII	: carbonic anhydrase II, καρβονική ανυδράση II
Cer	: ceramide, κεραμίδιο
cGK	: cyclic GMP dependent protein kinase, κυκλική GMP-εξαρτώμενη πρωτεΐνη κινάση
cGMP	: cyclic guanosine monophosphate, κυκλική γουανοσίνη
Cl ⁻	: chlorine, χλώριο
CO ₂	: carbon dioxide, διοξείδιο του άνθρακα
COX	: cyclooxygenase, κυκλοξυγενάση
CPD	: citrate – phosphate – dextrose, κιτρικό – φωσφορικό – δεξτρόζη
CPDA-1	: citrate – phosphate – dextrose – adenine – 1, κιτρικό – φωσφορικό – δεξτρόζη – αδενίνη – 1
CPDA-2	: citrate – phosphate – dextrose – adenine – 2, κιτρικό – φωσφορικό – δεξτρόζη – αδενίνη – 2
⁵¹ Cr	: chromium, χρώμιο
EIPA	: ethylisopropylamiloride, αιθυλοσοπροπυλαμίδη

emPAI	: exponentially modified protein abundance index, εκθετικά τροποποιημένος δείκτης ποσότητας πρωτεϊνών
eNOS	: endothelial nitric oxide synthase, ενδοθηλιακή συνθάση του νιτρικού οξειδίου
FDA	: Food and Drug Administration
Fe ²⁺	: ferrous iron, δισθενής σίδηρος
Fe ³⁺	: ferric iron, τρισθενής σίδηρος
GAPDH	: glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase, γλυκεραλδεϋδη 3-φωσφορική δεϋδρογενάση
GPA	: glycophorine A, γλυκοφορίνη A
GPB	: glycophorine B, γλυκοφορίνη B
GPC	: glycophorine C, γλυκοφορίνη C
GPD	: glycophorine D, γλυκοφορίνη D
GPE	: glycophorine E, γλυκοφορίνη E
GPI	: glycosylphosphatinositol, γλυκοζυλοφωσφατιδυλινοσιτόλη
GSH	: glutathione, γλουταθειόνη
GSSG	: glutathione disulfide, οξειδωμένη γλουταθειόνη
GTP	: guanosine 5'-triphosphate, γουανοσίνη 5'-τριφωσφορικό οξύ
H ₂	: hydrogen, υδρογόνο
H ₂ O	: water, νερό
H ₂ O ₂	: hydrogen peroxide, υπεροξείδιο του υδρογόνου
Hb	: hemoglobin, αιμοσφαιρίνη
HbA1c	: hemoglobin A1c, γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη
HbNO	: iron-nitrosyl-hemoglobin, σιδηρο-νιτροζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη
HBV	: hepatitis B virus, ιός της ηπατίτιδας B
HCO ₃ ⁻	: bicarbonate, διττανθρακικό
Hct	: hematocrite, αιματοκρίτης
HCV	: hepatitis C virus, ιός της ηπατίτιδας C
HIV	: human immunodeficiency virus, ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
Igs	: immunoglobulins, ανοσοσφαιρίνες
IgG	: immunoglobulin G, ανοσοσφαιρίνη G
INOBA	: insufficient nitric oxide bioavailability, ανεπαρκής βιοδιαθεσιμότητα νιτρικού οξειδίου
iNOS	: inducible nitric oxide synthase, επαγωγίμη συνθάση του νιτρικού οξειδίου
K ⁺	: potassium, κάλιο

KCl	: potassium chloride, χλωριούχο κάλιο
MCV	: mean corpuscular volume, μέσος όγκος ερυθροκυττάρων
met-Hb	: methemoglobin, μεθαιμοσφαιρίνη
Na ⁺	: sodium, νάτριο
NAD	: nicotinamide adenine dinucleotide, δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου – αδενίνης
nNOS	: neuronal nitric oxide synthase, νευρωνική συνθάση του νιτρικού οξειδίου
NO	: nitric oxide, νιτρικό οξύδιο/ μονοξείδιο του αζώτου
NO ²⁻	: nitrite, νιτρώδες
NOS	: nitric oxide synthase, συνθάση του νιτρικού οξειδίου
O ₂	: oxygen, οξυγόνο
O ₂ ⁻	: hyperoxide/ superoxide, υπεροξείδιο
·OH ⁻	: hydroxyl radical, ρίζα υδροξυλίου
OH-	: hydroxyl, υδροξύλιο
PAF	: platelet activating factor, παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
PC	: phosphatidylcholine, φωσφατιδυλοχολίνη
PFK	: phosphofructokinase, φωσφοφρουκτοκινάση
PGE ₂	: prostaglandin E ₂ , προσταγλανδίνη E ₂
PKC	: protein kinase C, πρωτεΐνη κινάση C
PLA	: phospholipase A, φωσφολιπάση A
PLT	: platelets, αιμοπετάλια/ θρομβοκύτταρα
pO ₂	: oxygen pressure, πίεση οξυγόνου
PS	: phosphatidylserine, φωσφατιδυλοσερίνη
PTMs	: post-translational modifications, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις
RBC	: red blood cell, ερυθρό αιμοσφαίριο/ ερυθροκύτταρο
Rh	: Rhesus
ROS	: reactive oxygen species, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
SAGM	: sodium-adenine-glucose-mannitol, νάτριο-αδενίνη-γλυκόζη-μαννιτόλη
SCA	: senescent cell-specific autoantigens, ειδικά κυτταρικά αυτοαντιγόνα γήρανσης
SCR	: scramblase, σκραμπλάση
SDS	: sodium dodecyl sulfate, δωδεκυλοθειικού νατρίου
sGC	: soluble guanylate cyclase, διαλυτή γουανλική κυκλάση
SM	: sphingomyelin, σφιγγομυελίνη
SMase	: sphingomyelinase, σφιγγομυελινάση

- SNO-Hb : S-nitrosothiol-hemoglobin, S-νιτροζοθειόλη-αιμοσφαιρίνη
- SO₂ : sulfur dioxide, διοξείδιο του θείου
- SOD : superoxide dismutase, δισμουτάση του υπεροξειδίου
- TRALI : transfusion related acute lung injury, σύνδρομο οξείας βλάβης των πνευμόνων
- WBC : white blood cell, λευκό αιμοσφαίριο/λευκοκύτταρο

*Ευχαριστούμε πολύ τις οικογένειές μας για την υποστήριξη που πάντα μας
προσφέρουν.*

Τους φίλους μας για την κατανόηση που έδειξαν το τελευταίο εξάμηνο.

*Και τον εισηγητή μας κ. Κριεμπάρδη Αναστάσιο για την πολύτιμη συνεργασία και
καθοδήγησή του.*

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Ιστορική Αναδρομή	1
1. 1. Ιστορική αναφορά στη μετάγγιση αίματος	1
1. 2. Ιστορική αναφορά στα αντιπηκτικά	6
1. 3. Η αιμοδοσία μέχρι σήμερα	11

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Ερυθροκύτταρο και Ερυθροκυτταρική Μembrάνη	12
2. 1. Ερυθρό αιμοσφαίριο	13
2. 1. 1. Ρόλος	13
2. 1. 2. Μορφή	14
2. 1. 3. Άλλες ιδιότητες	15
2. 2. Ερυθροκυτταρική μεμβράνη	16
2. 2. 1. Ρόλος	16
2. 2. 2. Σύνθεση	17
2. 2. 3. Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες	19
2. 2. 4. Περιφερειακές πρωτεΐνες	23
2. 2. 5. Κυτταροσκελετός	25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Η Αποθηκευτική Βλάβη του Ερυθροκυττάρου	28
3. 1. Μορφολογικές μεταβολές	30
3. 2. Μεταβολικές – Βιοχημικές μεταβολές	35
3. 3. Οξειδωτική βλάβη	40

3. 4.	Μεταφορά και απελευθέρωση οξυγόνου	43
3. 5.	Επιμολύνσεις	47
3. 6.	Πρωτόκολλα	50

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πρωτεομική Ανάλυση		51
4. 1.	Πρωτεομική ανάλυση κατά την αποθήκευση	51
4. 2.	Αιμοσφαιρίνη	55
4. 3.	Πρωτεΐνη-ζώνη 3	57
4. 4.	Ανοσοσφαιρίνες	58
4. 5.	Η σημασία και η χρησιμότητα της πρωτεομικής	59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Η Γήρανση των Ερυθροκυττάρων		60
5. 1.	Σχέση γήρανσης – αποθήκευσης	62
5. 2.	Η in vivo γήρανση των ερυθροκυττάρων	63
5. 3.	Η κυστιδιοποίηση σε συνάρτηση με τη γήρανση	65
5. 4.	Το οξειδωτικό στρες και η πρωτεΐνη-ζώνη 3 στη γήρανση	66
5. 5.	Ερύπτωση	73
5. 5. 1.	<i>Μηχανισμοί που πυροδοτούν και συμβάλλουν στην ερύπτωση</i>	75
5. 5. 2.	<i>Μηχανισμοί που αναστέλλουν την ερύπτωση</i>	78
5. 5. 3.	<i>Συνέπειες της ερύπτωσης</i>	80

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Κυστιδιοποίηση		81
6. 1.	Η κυστιδιοποίηση στα ερυθροκύτταρα	82
6. 2.	Ο μηχανισμός της κυστιδιοποίησης	83
6. 3.	Η κυστιδιοποίηση in vivo	87

6. 4.	Η κυστιδιοποίηση in vitro	89
6. 5.	Η κυστιδιοποίηση στους ασκούς αίματος	90
6. 6.	Σχέση κυστιδιοποίησης – οξείδωσης	93
6. 7.	Η λευκαφαίρεση ως ένα μέσο αποφυγής της κυστιδιοποίησης	94
6. 8.	Συμπεράσματα ως προς την κυστιδιοποίηση	95

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Λευκαφαίρεση 96

7. 1.	Η λευκαφαίρεση στην αποθήκευση των ερυθροκυττάρων	96
7. 2.	Τα εναπομείναντα λευκοκύτταρα στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και κυστιδιοποίηση	99

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Νιτρικό Οξείδιο 104

8. 1.	NO προερχόμενο από την αιμοσφαιρίνη και υποξική αγγειοδιαστολή	108
8. 2.	Μηχανισμοί παραγωγής NO από την αιμοσφαιρίνη	108
8. 3.	Εκκαθάριση NO από την αιμοσφαιρίνη	111
8. 4.	Εισπνεόμενο NO	114

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

Οξείδωση 117

9. 1.	Μηχανισμοί της οξειδωτικής βλάβης στα ερυθροκύτταρα	117
9. 1. 1.	Η οξείδωση της αιμοσφαιρίνης και τα μονοπάτια της οξειδωτικής βλάβης	118
9. 1. 2.	Αυτό-οξείδωση της αιμοσφαιρίνης κάτω από συνθήκες μερικής έλλειψης οξυγόνου	121
9. 1. 3.	Η επίδραση της οξειδωτικής βλάβης στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα	121
9. 2.	Πρόληψη των οξειδωτικών βλαβών κατά την αποθήκευση	124
9. 3.	Αναερόβια αποθήκευση	126

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

Συμπεράσματα και Μελλοντικές Προοπτικές **130**

10. 1.	Συμπεράσματα	130
10. 2.	Σημασία διάρκειας αποθήκευσης	131
20. 3.	Μελλοντικές προοπτικές – Ομική	132

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

Βιβλιογραφία **135**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ιστορική Αναδρομή

1. 1. Ιστορική αναφορά στη μετάγγιση αίματος

Από την αρχή της ανθρωπότητας το αίμα αντιμετωπιζόταν με δέος από τους ανθρώπους, καθώς ήταν κοινή πεποίθηση πως εμπεριείχε τη ζωτική ουσία, την ψυχή και το χαρακτήρα κάθε έμψυχου όντος. Από πολύ νωρίς είχε αναγνωριστεί πως η απώλεια αίματος οδηγούσε συχνά σε αδυναμία ή και θάνατο. Απόδειξη της συνειδητοποίησης αυτής αποτελούσαν οι αρχαίοι Ρωμαίοι και Έλληνες, που αυτοκτονούσαν κόβοντας τις φλέβες των καρπών τους. Αρχικές προσπάθειες αντιμετώπισης της αιμορραγίας περιλάμβαναν πόση αίματος. Το αίμα όμως φαίνεται να χρησιμοποιούταν για πολλούς «ιατρικούς» σκοπούς. Αιγύπτιοι φαραώ και ευγενείς έκαναν μπάνιο με αίμα, για να αντιμετωπίσουν διάφορες ασθένειες (π.χ. την ελεφαντίαση¹!) ή να αναζωογονηθούν. Οι Έλληνες και οι Ρωμαίοι επίσης λούζονταν με αίμα ή και το έπιναν. Την εποχή των μονομάχων οι θεατές έπιναν το αίμα των ετοιμοθάνατων μαχητών προκειμένου να αποκτήσουν κι εκείνοι το θάρρος και τη δύναμή τους, όπως περιγράφει ο Gaius Plinius Secundus, ο οποίος επίσης αναφέρει πως η επάλειψη με αίμα ανακούφιζε από τον πόνο και η πόση του θέραινε την επιληψία², ενώ την ίδια εποχή ο Γαληνός³ ισχυρίζεται πως η πόση αίματος σκύλου ή νυφίτσας θέραινε τη λύσσα. Παρομοίως, οι αρχαίοι Νορβηγοί έπιναν αίμα φάλαινας και φώκιας για να θεραπεύσουν την επιληψία και

¹ Η ελεφαντίαση είναι πάθηση με διάχυτη πάχυνση του δέρματος και του υποδορίου ιστού που οφείλεται σε υπερτροφία, σε συνδυασμό με λεμφοίδημα, κυρίως των άκρων του ανθρωπίνου σώματος ή άλλων περιφερειακών τμημάτων (οσχέου, μαστών, αιδοίου) με συνέπεια την παραμόρφωση αυτών δίνοντας την εικόνα άκρων του ελέφαντα, εξ ου και η ονομασία της πάθησης.

² Επιληψία είναι μια οικογένεια από διαφορετικές διαταραχές, που έχουν ως κοινό σημείο τους επαναλαμβανόμενους παροξυσμούς με αιφνίδια, υπέρμετρη και ανώμαλη εκφόρτιση εγκεφαλικών νευρώνων. Οι επιληπτικοί παροξυσμοί μπορεί να προκαλούν σπασμούς (εάν συμμετέχει ο κινητικός φλοιός) ή και οπτικές, ακουστικές ή οσφρητικές ψευδαισθήσεις (εάν συμμετέχει ο βρεγματικός ή ο ινιακός φλοιός).

³ Ο Κλαύδιος Γαληνός (Πέργαμος 129 μ.Χ. – Ρώμη 199 μ.Χ.) ήταν ο δεύτερος σπουδαιότερος ιατρός της αρχαιότητας μετά τον Ιπποκράτη και ο τελευταίος χρονικά από όλους τους σημαντικούς ιατρούς του ελληνορωμαϊκού κόσμου.

το σκορβούτο⁴ [1, 2]. Μια μορφή «μετάγγισης» εμφανίζεται στην αρχαία ελληνική μυθολογία, όταν η Μήδεια για να αναζωογονήσει τον γέρο πατέρα του Ιάσονα, αφαιρεί όλο το «γερασμένο» αίμα και ξαναγεμίζει τα στεγνά πλέον αγγεία με ένα «φίλτρο», όπως περιγράφει ο Publius Ovidius Naso στο βιβλίο του «Μεταμορφώσεις». Μια άλλη «μετάγγιση» αίματος πραγματοποιήθηκε (ως θεραπεία), σύμφωνα με ένα αρχαίο εβραϊκό κείμενο, στον μολυσμένο με λεπρά βασιλιά της Συρίας, από τον οποίο αφαιρέθηκε το αίμα από τις φλέβες του για να αντικατασταθεί με αίμα άλλου ατόμου [3, 4].

Η πρώτη «μετάγγιση» περιγράφεται από τον Ιταλό ιστορικό και πολιτικό Pasquale Villari (1827-1917). Πραγματοποιήθηκε στον Πάπα Innocent VIII το 1492, ο οποίος, με τις σημερινές γνώσεις, εικάζεται ότι έπασχε από χρόνια νεφρική νόσο. Μετά από άκαρπες προσπάθειες αναζωογόνησής του, ένας αμφιβόλου φήμης ιατρός, ονομαζόμενος Abraham Menre, προχώρησε σε μετάγγιση αίματος στον Πάπα. Ως «δότες» επιλέχθηκαν τρία δεκάχρονα αγόρια (στα όποια είχαν υποσχεθεί αμοιβή ενός δουκάτου). Τα τρία παιδιά πέθαναν λίγο μετά τη «μετάγγιση», ενώ και ο Πάπας πέθανε αργότερα, πιθανώς από την ασθένειά του. Η περιγραφή της «μετάγγισης» αυτής όμως, θεωρείται πως πρόκειται για λανθασμένη μετάφραση των αρχικών κείμενων και πως στην πραγματικότητα ο Πάπας συμβουλευτήκε να πει το αίμα, όπως υποστηρίζει και ο χρονικογράφος του 15^{ου} αιώνα Stefano Infessura [3, 4].

Μέχρι τις αρχές του 17^{ου} αιώνα εμφανίζονται λίγες αξιόλογες εξελίξεις πάνω στις μεταγγίσεις. Γύρω στο 1600, ο Hieronymus Fabricius ab Acquapendente (1533-1619) περιγράφει τις βαλβίδες των φλεβών, χωρίς όμως να αναγνωρίζει τη λειτουργία τους [2]. Ο μαθητής του, ιατρός William Harvey (1578-1657), περίπου την περίοδο 1613-1616, πραγματοποίησε μια σειρά πειραμάτων και το 1628 εξέδωσε τα αποτελέσματα της μελέτης του σε ένα βιβλίο, που αναγνωρίστηκε

⁴ Το σκορβούτο είναι ασθένεια που προκαλείται από έλλειψη στον οργανισμό της βιταμίνης C. Εκδηλώνεται με αιμορραγίες από το δέρμα και τους βλεννογόνους, ιδιαίτερα τα ούλα, τα εσωτερικά όργανα, τα κόκκαλα, τις αρθρώσεις. Συνοδεύεται και από γενικά συμπτώματα, όπως κακουχία, δεκατική πυρετική κίνηση, ανορεξία και αναιμία.

ευρέως και επηρέασε τον ιατρικό κόσμο, με τίτλο «Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus». Σε αυτό, περιέγραψε αναλυτικά το κυκλοφοριακό σύστημα του ανθρώπου, το ρόλο της καρδιάς, των βαλβίδων της καρδιάς και των βαλβίδων των φλεβών, συνεχίζοντας το έργο του δάσκαλου του, συμπεραίνοντας πως η αρτηριακή πίεση οφείλεται στο αίμα (Εικόνα 1). Παρόλα αυτά δεν ανακάλυψε το σύστημα των τριχοειδών αγγείων⁵, το οποίο ανακαλύφθηκε λίγο αργότερα από τον ιταλό ιατρό Marcello Malpighi (1628-1694). Το έργο του Harvey αποτέλεσε το εφαλτήριο νέων ερευνών, οι οποίες ήταν πλέον στηριγμένες σε σωστά επιστημονικά δεδομένα [1, 3, 4]. Εδώ όμως πρέπει να σημειωθεί, πως υπήρχαν προγενέστερες αναφορές στα ζητήματα αυτά, όπως η περιγραφή της μικρής κυκλοφορίας⁶ του αίματος, από τον άραβα λόγιο, μαθηματικό και φυσιολόγο-ιατρό Ibn-al-Nafis, ήδη από το 1260 [2].

Στα χρόνια που ακολούθησαν μετά τις δημοσιεύσεις του Harvey, πολλοί ισχυρίστηκαν πως ήταν οι πρώτοι που πραγματοποίησαν μετάγγιση αίματος. Το 1615, ο Andreas Libavius (1555-1616), διακεκριμένος χημικός της περιόδου, καθώς και το 1628, ο Giovanni Francisco Colle da Belluno (1558-1631), καθηγητής στο πανεπιστήμιο της Padua, υποστήριξαν τη χρήση της μετάγγισης ως μέσο βελτίωσης της υγείας και επιμήκυνσης της ζωής και περιέγραψαν τέτοιου τύπου διαδικασίες, χωρίς όμως να προβούν σε περαιτέρω πειράματα ή έρευνες [1, 2, 4]. Ο Francesco Folli (1624-1685) περιγράφει το 1654, με ιδιαίτερη παραστατικότητα, τη συσκευή, τη μέθοδο και τη διαδικασία της μετάγγισης που ποτέ όμως δεν πραγματοποίησε (όπως και ένας Γάλλος μοναχός ονομαζόμενος Robert des Gabets (1610-1678)). Ο μόνος που φέρεται να έκανε απόπειρα πρακτικής εφαρμογής της μετάγγισης αίματος είναι ο Francis Potter (1594-1678) το 1639, ο οποίος ισχυρίστηκε πως

⁵ Τα τριχοειδή αγγεία έχουν λεπτά τοιχώματα που επιτρέπουν την ανταλλαγή ουσιών μεταξύ αίματος και κυττάρων. Έχουν τα λεπτότερα τοιχώματα από όλα τα άλλα αγγεία και είναι τα αγγεία με τη μικρότερη διάμετρο. Δεν έχουν βαλβίδες, συνδέουν τα αρτηρίδια με τα φλεβίδια και γίνεται ανταλλαγή ουσιών μεταξύ αίματος και ιστών.

⁶ Η κυκλοφορία του αίματος στο σώμα μας χωρίζεται σε δύο κύριες διαδρομές, τη μεγάλη και τη μικρή κυκλοφορία. Μικρή κυκλοφορία ονομάζεται η κυκλοφορία του αίματος από την καρδιά προς τους πνεύμονες και αντίστροφα.

επιχείρησε μετάγγιση αίματος από ένα κοτόπουλο σε ένα άλλο, εγχείρημα που μάλλον κατέληξε σε αποτυχία [2].

Ο επιστήμονας που θεωρείται ότι πρώτος πρότεινε και παρουσίασε την ενδοφλέβια χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών (σε φλέβες σκύλων και άλλων ζώων) είναι ο γνωστός αρχιτέκτονας, αστρονόμος και ιατρός Sir Christopher Wren (1632-1723) (*Εικόνα 1*). Τα πειράματα που πραγματοποίησε με τη συμμετοχή του βοηθού του Timothy Clerk, είχαν τόσο θετικά, όσο και αρνητικά αποτελέσματα [1, 2, 3, 4]. Τα πειράματά του περιγράφηκαν αναλυτικά από τον γνωστό χημικό και ιατρό Robert Boyle (1627-1691), σε βιβλίο που εκδόθηκε το 1663. Ο ίδιος ο Boyle συνέχισε τα πειράματα του Wren με εγχύσεις «υγρών», όπως μπύρας, κρασιού και οπίου, στις φλέβες ζώων, ακόμα και «εθελοντών» κρατουμένων φυλακών. Τη συνέχεια στα πειράματα αυτά έδωσε ο ιατρός Richard Lower (1631-1691), σκεπτόμενος, πως εφόσον είναι εφικτή η έγχυση κρασιού και μπύρας στις φλέβες, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και αίμα. Το Φεβρουάριο του 1665 πραγματοποίησε την πρώτη επιτυχημένη μετάγγιση αίματος σε σκύλο, που αφού τον αφαίμαξε σχεδόν σε σημείο θανάτου, του μετάγγισε το αίμα άλλου, μεγαλύτερου σκύλου, συνδέοντας την αρτηρία του με τη φλέβα του πρώτου (αν και στην αρχή επιχειρήθηκε άμεση μετάγγιση από φλέβα σε φλέβα, που απέτυχε, καθώς το αίμα έπηξε μέσα στην ασημένια σωλήνωση που χρησιμοποιήθηκε). Αργότερα, το Νοέμβριο του 1667, ο Lower με τη βοήθεια του Edmund King, προσπάθησε να πραγματοποιήσει την πρώτη μετάγγιση σε άνθρωπο, τον Arthur Coga (*Εικόνα 1*). Στον «ασθενή», ο οποίος παρουσίαζε ψυχολογικές διαταραχές και η μετάγγιση θεωρήθηκε πιθανή θεραπεία, μεταγγίστηκε αίμα πρόβατου [2, 4].

Δεν ήταν όμως αυτή η πρώτη φορά που έγινε απόπειρα μετάγγισης σε άνθρωπο, καθώς λίγους μήνες πριν το πείραμα των Lower και King, ένας αξιοσημείωτος Γάλλος επιστήμονας και ιατρός στην αυλή του βασιλιά Λουδοβίκου XIV, ο Jean Baptiste Denis (1640-1704), φέρεται να μετάγγισε αίμα σε άνθρωπο (*Εικόνα 1*). Έχοντας διαβάσει τη δουλειά του Lower, προχώρησε σε πολλές δοκιμές μετάγγισης αίματος σε σκύλους. Τον Ιούνιο του 1667, ζητήθηκε από τον Denis να

θεραπεύσει ένα 15χρονο αγόρι, που είχε υψηλό πυρετό για μήνες. Στο παιδί μεταγγίστηκε αίμα από την καρωτίδα προβάτου. Τα αρχικά αποτελέσματα χαρακτηρίστηκαν εντυπωσιακά, καθώς φάνηκε βελτίωση στην κατάσταση του παιδιού, αν και καταγράφηκε «έντονο αίσθημα θερμότητας στο χέρι κατά τη μετάγγιση», που σήμερα γνωρίζουμε πως είναι ένδειξη της ασύμβατης μετάγγισης. Ακολούθησαν κι άλλες φαινομενικά επιτυχημένες μεταγγίσεις από τον Denis, μέχρι που το 1668, ένας ασθενής με ψυχολογικές διαταραχές ονομαζόμενος Antoine Mauroy πέθανε, αφού είχε μεταγγιστεί με αίμα προβάτου (για τρίτη φορά σε διάστημα λίγων μηνών). Ο Denis και ο συνεργάτης του Paul Emmerez κατηγορήθηκαν για φόνο (αν και τελικά αθωώθηκαν, καθώς αποδείχτηκε πως η σύζυγος του Mauroy τον δηλητηρίασε με αρσενικό!). Η περίπτωση αυτή λειτούργησε ως αφορμή για την απαγόρευση των μεταγγίσεων, αρχικά στη Γαλλία και στη συνέχεια σε Αγγλία και Ευρώπη (μάλιστα ο ίδιος ο Πάπας υποστήριξε την απαγόρευσή τους) [1, 2, 3, 4].

Μετά από μια μακρά περίοδο, κατά την οποία λίγοι τόλμησαν έστω και να αναφερθούν στη μετάγγιση αίματος, εμφανίζεται στο Λονδίνο ο αξιόλογος ιατρός, φυσιολόγος και μαιευτήρας James Blundell (1790-1877), ο οποίος συνειδητοποίησε την ασυμβατότητα της μετάγγισης αίματος ζώων σε ανθρώπους και εκτέλεσε πρώτος μετάγγιση από άνθρωπο σε άνθρωπο το 1818 (*Εικόνα 1*). Στη συνειδητοποίηση αυτή συνέβαλε η επιρροή του έργου του αμερικανού φυσιολόγου John Henry Leacock (1729-1802), που τοποθετήθηκε εναντίον της «ανάμειξης» αίματος διαφορετικών ειδών κατά τη μετάγγιση. Οι περισσότερες μεταγγίσεις που πραγματοποίησε ο Blundell ήταν για την αντιμετώπιση της αιμορραγίας μετά τον τοκετό. Κατασκεύασε επίσης διάφορες συσκευές που εμπόδιζαν την πήξη του αίματος. Σήμερα ο Blundell θεωρείται από πολλούς ο «πατέρας της σύγχρονης μετάγγισης αίματος» [1, 2, 3, 4].

Τα κυρία προβλήματα με τα οποία ήταν αντιμετώπι οι επιστήμονες που επιχειρούσαν μεταγγίσεις, ήταν η συμβατότητα του αίματος του δοτή με αυτό του

δέκτη, η θρόμβωση του αίματος, αλλά και σε ποιες περιπτώσεις μια μετάγγιση αποτελούσε τη σωστή επιλογή για θεραπεία.

Ο Karl Landsteiner (1868-1943/ βραβείο Νόμπελ 1930) το 1900 έδωσε απάντηση στο πρόβλημα της συμβατότητας του αίματος δότη-δέκτη, διαχωρίζοντας το αίμα των ανθρώπων σε τρεις ομάδες (ομάδα Α, ομάδα Β, ομάδα Ο) και υποστηρίζοντας την επιλογή των δοτών με βάση την ομάδα στην οποία ανήκουν (*Εικόνα 1*). Η τετάρτη ομάδα (ομάδα ΑΒ) ανακαλύφθηκε το 1902 από δύο μαθητές του Landsteiner, τους De Castello και Sturli. Παρόλα αυτά, η ιδέα του έλεγχου ΑΒΟ συμβατότητας δότη-δέκτη πριν τη μετάγγιση δεν εφαρμόστηκε, παρά μόνο το 1907, μετά από πρόταση δύο αμερικανών χειρουργών, των Reuben Totenberg και Schultz. Το 1927, ο Landsteiner και ο Levin ανακάλυψαν τα Pp αντιγόνα⁷ του συστήματος ομάδας αίματος Ρ, ενώ την ίδια χρονιά πρότειναν ένα νέο σύστημα ομάδας αίματος, μετά την αναγνώριση δυο νέων γονιδίων, των Μ και Ν. Το σύστημα αυτό επεκτάθηκε το 1947 από τους Sanger και Race, που αναγνώρισαν τα σχετιζόμενα γονίδια S και s. Η ομάδα Rhesus (Rh) περιγράφηκε από τους Landsteiner και Alexander Wiener το 1940 [1, 2, 3, 4].

1. 2. Ιστορική αναφορά στα αντιπηκτικά

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, η πρακτική της μετάγγισης είχε αρχίσει να καθιερώνεται. Οι έρευνες που γίνονταν, πλέον στόχευαν κυρίως στη βελτίωση της τεχνικής, ενώ βάρος δινόταν στην αποθήκευση του αίματος, καθώς και στην ποιότητά του μετά από αυτή.

Έτσι, το πρόβλημα της πήξης του αίματος, που απασχολούσε τους ερευνητές από την αρχή των προσπαθειών για επίτευξη της μετάγγισης, επανέρχεται δριμύτερο στο προσκήνιο. Αρχικά, έναν από τους κύριους τρόπους αποφυγής της πήξης, αποτέλεσε η σύνδεση αρτηρίας-φλέβας κατά τη μετάγγιση. Για τον ίδιο σκοπό κατασκευάστηκαν από πολλούς επιστήμονες (π.χ. από τον

⁷ Τα αντιγόνα είναι ουσίες ικανές να επάγουν ειδική ανοσιακή απάντηση, δηλαδή να κινητοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα.

Blundell, James Hobson Gaveling (1828-1892) κ.α.) διάφορες συσκευές, που παρεμπόδιζαν τη θρόμβωση⁸ με τη βοήθεια μεθόδων που μεταχειρίζονταν πίεση, βαρύτητα κ.τ.λ. Πολλοί επίσης υποστήριξαν τη χρήση αίματος από το οποίο, με διάφορες μεθόδους ανάδευσης και διήθησης, είχε αφαιρεθεί ο αιμοπεταλιακός θρόμβος⁹. Οι πρώτες αναφορές και πειράματα πάνω στη χρήση αντιπηκτικών ουσιών έγιναν από τους Prevost και Dumas, οι οποίοι χρησιμοποίησαν καυστικό νάτριο. Τα αποτελέσματα δεν ήταν ιδιαίτερα επιτυχημένα, αλλά τα πειράματα αυτά αποτέλεσαν ένα βήμα προς την σωστή κατεύθυνση. Ο ιατρός και μαιευτήρας John Braxton Hicks (1823-1897) αναφέρει πως ήδη από το 1839 είχε χρησιμοποιηθεί φωσφορικό νάτριο και πρότεινε και ο ίδιος χρήση μικρής ποσότητάς του ως αντιπηκτικό, ενώ ο ιατρός Richardson πρότεινε απειροελάχιστες ποσότητες αμμωνίας [5]. Το 1913, ο Roger Lee παρουσίασε τη χρήση κιτρικών αλάτων νατρίου ως αντιπηκτικό, ενώ το 1914 και 1915 γίνονταν διαδοχικές δημοσιεύσεις από διάφορους άλλους επιστήμονες που υποστήριζαν και αυτοί τη χρήση κιτρικών αλάτων νατρίου ως αντιπηκτικό [3]. Αυτός όμως που φαίνεται πως χρησιμοποίησε πρώτος κιτρικά άλατα νατρίου για την αποφυγή θρόμβωσης στον άνθρωπο, ήταν ο Βέλγος Albert Hustin, παρουσιάζοντας την εργασία του τον Απρίλιο του 1914, την οποία εξέδωσε το Μάιο του ίδιου έτους. Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξε και ο Luis Agote από την Αργεντινή. Το 1915, ο αμερικανός φυσιολόγος Richard Lewisohn (1875-1961) υπολόγισε τη βέλτιστη συγκέντρωση κιτρικών αλάτων νατρίου που μπορεί να αναμιχθεί με το αίμα του δότη ώστε να αποτραπεί η πήξη, χωρίς ταυτόχρονα να είναι επιβλαβής για το δέκτη (*Εικόνα 1*). Τον ίδιο χρόνο, ο ιατρός Richard Weil υπολόγισε ότι αίμα με κιτρικά άλατα νατρίου ως αντιπηκτικό μπορεί να αποθηκευτεί στο ψυγείο για μερικές ημέρες και έπειτα να μεταγγιστεί με ασφάλεια. Το 1916, οι Francis Peyton

⁸ Είναι ο σχηματισμός ενός θρόμβου αίματος μέσα σε ένα αγγείο, που εμποδίζει τη ροή του αίματος στο κυκλοφορικό σύστημα. Όταν ένα αιμοφόρο αγγείο τραυματίζεται, το σώμα χρησιμοποιεί αιμοπετάλια (θρομβοκύτταρα) και ινώδες για να σχηματίσει ένα θρόμβο αίματος και να αποφευχθεί η απώλεια αίματος. Ακόμη και όταν ένα αιμοφόρο αγγείο δεν υφίσταται ζημία όμως, θρόμβοι αίματος μπορεί να σχηματιστούν στο σώμα παρουσία κατάλληλων συνθηκών.

⁹ Τα αιμοπετάλια (ή θρομβοκύτταρα) είναι κύτταρα του αίματος, σημαντικά για την ομαλή πήξη. Όταν κάποιο αγγείο υποστεί τραυματισμό με τομή ή ρήξη, κινητοποιείται ο μηχανισμός της αιμόστασης και σχηματίζεται αιμοπεταλιακός θρόμβος.

Rous και Joseph R. Turner, πρότειναν την προσθήκη γλυκόζης (δεξτρόζης)¹⁰ για την ικανοποίηση των ενεργειακών αναγκών των ερυθροκυττάρων και καταλήγουν πως ανθρώπινο, ολικό αίμα με κιτρικό νάτριο, μπορεί να αποθηκευτεί σε διάλυμα δεξτρόζης για έως και τέσσερις εβδομάδες [1, 6]. Επίσης, πειράματα σε κουνέλια έδειξαν πως ερυθρά αιμοσφαίρια αποθηκευμένα για 14 ημέρες σε διάλυμα κιτρικού νατρίου – δεξτρόζης, μπορούν να μεταγγιστούν με ασφάλεια, παραμένοντας και λειτουργώντας, χωρίς πρόβλημα μάλιστα, στην κυκλοφορία [7].

Το 1917, ο ιατρός Oswald Robertson (1886-1966) ισχυρίστηκε πως η αποθήκευση ερυθρών αιμοσφαιρίων σε γυάλινα μπουκάλια με διάλυμα κιτρικού νατρίου και γλυκόζης, είναι ασφαλής για μετάγγιση και το αποθηκευμένο αυτό αίμα θα μπορούσε να σώσει τις ζωές πολλών τραυματισμένων στρατιωτών. Έτσι, θεωρείται ο πρώτος που αποθήκευσε ποσότητα αίματος (το 1918), δημιουργώντας την πρώτη τράπεζα αίματος (*Εικόνα 1*). Με τον τρόπο αυτό, η μετάγγιση αίματος δεν αποτελούσε πλέον μια απελπισμένη ιατρική κίνηση, αλλά εξελίχθηκε σε οργανωμένη και λογική κλινική πρακτική [3, 8, 9].

Τη δεκαετία του 1930, αρχίζουν σιγά-σιγά να δημιουργούνται τράπεζες αίματος σε πολλές χώρες ανά τον κόσμο. Το 1943, οι John F. Loutit και Patrick L. Mollison παρατήρησαν ότι μειώνοντας το pH¹¹ του αντιπηκτικού στο 5,5, παρεμποδίζεται η καραμελοποίηση των σακχάρων, που προκαλούταν κατά την αποστείρωση σε υψηλές θερμοκρασίες. Παρουσίασαν έτσι ένα νέο αντιπηκτικό για ολικό αίμα [3], το κιτρικό οξύ – δεξτρόζη (acid citrate-dextrose, ACD), το οποίο επίσης μειώνει τον όγκο του αντιπηκτικού που χρησιμοποιείται, επιτρέποντας μεταγγίσεις μεγαλύτερου όγκου αίματος και καθιστά δυνατή την αποθήκευση για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, έως και 21 ημέρες (*Εικόνα 1*) [10]. Το 1944

¹⁰ Η γλυκόζη ή δεξτρόζη (glucose ή dextrose), είναι ένα πολύ σημαντικό σάκχαρο. Ανήκει στις εξόζες, με δομή αλδόζης, το οποίο απαντάται σε δύο μορφές: ως γλυκόζη Α και ως γλυκόζη Β. Η γλυκόζη αποτελεί τη πρωταρχική μητρική οργανική ένωση όλων των οργανικών ενώσεων αφού είναι προϊόν της φωτοσύνθεσης, όπου και πραγματοποιείται η μοναδική βιολογική διεργασία της μετατροπής του ανόργανου άνθρακα σε οργανικό.

¹¹ Εκφράζει το πόσο όξινο (pH < 7) ή βασικό (pH > 7) είναι ένα διάλυμα, αποτελεί δηλαδή ένα μέτρο της οξύτητας αυτού.

επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός του αίματος σε πλάσμα και ερυθρά αιμοσφαίρια από τον Edwin Cohn, έτσι ώστε το πλάσμα να καταψύχεται ξεχωριστά. Αργότερα αναπτύχθηκαν και τεχνικές κατάψυξης του αίματος [3].

Στα χρόνια που ακολούθησαν, ανακαλύφθηκε πως τα αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια χάνουν φωσφορικά άλατα¹² και καταβολίζουν αδενίνη¹³, οπότε η αναπλήρωση αυτών επιμηκύνει το χρόνο αποθήκευσης. Το πρόβλημα της αιμόλυσης¹⁴ των ερυθροκυττάρων που παρατηρήθηκε κατά την αποθήκευση, βελτιώθηκε με την προσθήκη μαννιτόλης¹⁵ (δημιουργία SAGM (sodium-adenine-glucose-mannitol, νάτριο-αδενίνη-γλυκόζη-μαννιτόλη)) [3, 8, 11].

Το 1957, το ACD αντικαταστάθηκε από ένα νέο αντιπηκτικό, το CPD (citrate-phosphate-dextrose, κιτρικό-φωσφορικό-δεξτρόζη), το οποίο επιτρέπει την αποθήκευση του αίματος έως και 28 ημέρες. Η εισαγωγή του αντιπηκτικού CPDA-1 (citrate-phosphate-dextrose-adenine-1, κιτρικό-φωσφορικό-δεξτρόζη-αδενίνη-1) γίνεται το 1978, παρατείνοντας τη διάρκεια αποθήκευσης (έως 35 ημέρες), ενώ τη δεκαετία του 1980 δημιουργήθηκε το CPDA-2 (citrate-phosphate-dextrose-adenine-2, κιτρικό-φωσφορικό-δεξτρόζη-αδενίνη-2) που διατηρεί το αίμα για έως και 42 ημέρες [8, 10, 11].

Η ανακάλυψη των πλαστικών ασκών συλλογής και αποθήκευσης αίματος και η καθιέρωση της χρήσης τους τις δεκαετίες 1960-1970, αποτέλεσε σημαντική

¹² Τα φωσφορικά άλατα είναι συστατικά των οστών και παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του pH των υγρών του οργανισμού. Η μέτρηση των επιπέδων τους στο αίμα και τα ούρα βοηθάει στη διάγνωση ορμονικών παθήσεων, καθώς και παθήσεων των οστών και των νεφρών.

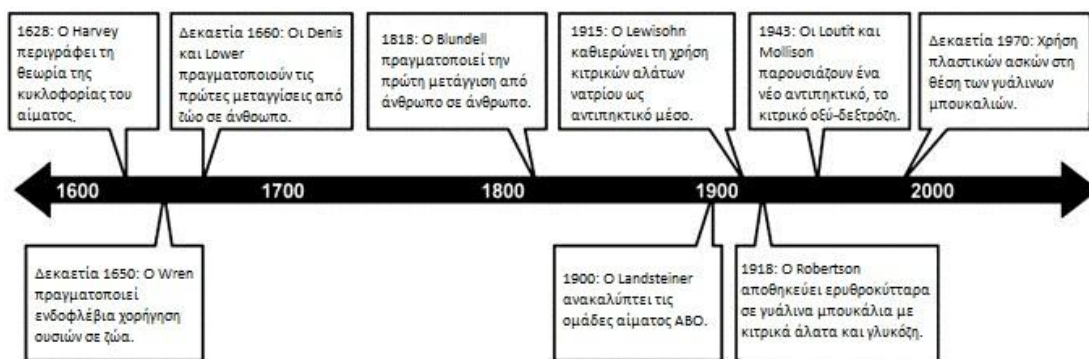
¹³ Η αδενίνη (με διεθνές σύμβολο A), είναι η μία από τις δύο βάσεις πουρίνες (η άλλη είναι η γουανίνη) που συμμετέχουν στη δομή των νουκλεοτιδίων των νουκλεϊκών οξέων DNA και RNA. Απαντάται ελεύθερη σε προϊόντα εκκρίσεως του οργανισμού (π.χ. ούρα).

¹⁴ Είναι η καταστροφή των ερυθροκυττάρων και η έξοδος της αιμοσφαιρίνης από αυτά. Μπορεί να προκληθεί από την ελάττωση της ωσμωτικής πίεσης του αίματος, από διάφορες φυσικές, χημικές ή τοξικές αιτίες, από αντισώματα, από ελαττωματικά ερυθροκύτταρα κ.α. Φυσιολογικά τα ερυθροκύτταρα έχουν μέση ζωή 120 ημερών και καθημερινά, υπό φυσιολογικές συνθήκες, το 1% από αυτά λύεται.

¹⁵ Η μαννιτόλη είναι μια αλκοόλη σακχάρου. Πιο συγκεκριμένα, είναι ένα ισομερές της σορβιτόλης και σήμερα παράγεται από την υδρογόνωση της γλυκόζης.

εξέλιξη τόσο στην αποθήκευση, όσο και στο χειρισμό του αίματος και των παραγώγων του (Εικόνα 1) [3, 11].

Ο οργανισμός FDA (Food and Drug Administration)¹⁶, υιοθέτησε ένα σύστημα ελέγχου των αποθηκευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων, που βασίζεται σε μετρήσεις της *in vivo*¹⁷ επιβίωσης και αιμόλυσής τους. Συγκεκριμένα, το 1978, τα πρότυπα που υιοθετήθηκαν, απαιτούσαν 70% *in vivo* ανάκτηση σε διάστημα 24 ωρών από τη μεταγγιση, μέτρηση που πραγματοποιήθηκε μετά από επισήμανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με ⁵¹Cr (χρώμιο), ενώ η αιμόλυση δεν έπρεπε να ξεπερνάει το 1% στο τέλος της «ημερομηνίας λήξης» της αποθήκευσης. Με βάση αυτά τα πρότυπα, καθιερώθηκε το CPDA-1 για αποθήκευση 5 εβδομάδων. Το 1983, το ποσοστό ανάκτησης αυξήθηκε στο 75% [8].



Εικόνα 1: Χρονοδιάγραμμα κύριων γεγονότων στην εξέλιξη των μεταγγίσεων [3].

¹⁶ Ο FDA (ή USFDA) είναι μια υπηρεσία του Υπουργείου Υγείας και Ανθρωπίνων Υπηρεσιών των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής. Είναι αρμόδιος για την προστασία και προαγωγή της δημόσιας υγείας μέσω της ρύθμισης και της εποπτείας της ασφάλειας των τροφίμων, των φαρμακευτικών προϊόντων, των μεταγγίσεων αίματος κ.α.

¹⁷ Η έκφραση *in vivo* χρησιμοποιείται για την περιγραφή μιας βιολογικής διαδικασίας όταν αυτή πραγματοποιείται σε ένα ζωντανό οργανισμό.

1. 3. Η αιμοδοσία μέχρι σήμερα

Από τη δεκαετία του 1940 και μετά οι εξελίξεις στο χώρο της αιμοδοσίας ήταν συνεχείς. Έγιναν διαδοχικές βελτιώσεις στα υλικά και τα μέσα που χρησιμοποιούνταν καθ' όλη τη διαδικασία, από τις βελόνες και τους ασκούς, μέχρι τα αντιπηκτικά και τα ψυγεία αποθήκευσης. Άρχισε να δίνεται πλέον ιδιαίτερη βαρύτητα στην ασφάλεια και την ποιότητα των παραγώγων του αίματος. Καθορίστηκε ο ποιοτικός έλεγχος του αίματος και ο έλεγχος για μια σειρά νοσημάτων. Η αποθήκευση επαρκών ποσοτήτων ελεγμένου και απολύτως ασφαλούς αίματος εξελίχθηκε σε ζήτημα εθνικής σημασίας της κάθε χώρας. Η προσέλκυση αιμοδοτών αποτέλεσε ένα καινούριο στοίχημα, καθώς η αιμοδοσία ήταν μια νέα ιδέα για το ευρύ κοινό και η ασφάλειά της απασχολούσε τους εθελοντές. Χρειάστηκαν πολλά χρόνια για να καθιερωθεί στη συνείδηση των ανθρώπων η χρησιμότητα των μεταγγίσεων. Ακόμα και μετά από τους δύο παγκόσμιους πολέμους, καθώς και τον ισπανικό εμφύλιο, όπου πολλές ζωές σώθηκαν χάρη στην έγκαιρη μετάγγιση αίματος, μεγάλο μέρος του κόσμου κρατούσε επιφυλακτική στάση, γεγονός που απαίτησε πολύ χρόνο, πολλή προσπάθεια, ή και κάποιες συγκυρίες, για να αλλάξει. Για παράδειγμα, μεγάλη, θετική αλλαγή στην αντιμετώπιση της αιμοδοσίας από τον ιαπωνικό λαό παρατηρήθηκε το 1930, όταν η ζωή του πρωθυπουργού της Ιαπωνίας, Osachi Hamaguchi, σώθηκε χάρη σε μία μετάγγιση αίματος [12]. Ακόμα και σήμερα, αν και πλέον δεν μπορεί να αμφισβητηθεί η χρησιμότητα και η ασφάλεια των μεταγγίσεων, το ποσοστό των εθελοντών-αιμοδοτών είναι μικρό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ερυθροκύτταρο και Ερυθροκυτταρική Μembrάνη

Το αίμα είναι ο υγρός ιστός του ανθρώπινου οργανισμού. Αποτελείται από κύτταρα (ερυθροκύτταρα (red blood cells, RBCs), λευκοκύτταρα (white blood cells, WBCs)¹⁸, θρομβοκύτταρα (platelets, PLTs)¹⁹, δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ)²⁰) και από μεσοκυττάρια ουσία (πλάσμα²¹). Τα κύτταρα του αίματος αιωρούνται μέσα στο πλάσμα του και ονομάζονται αιμοσφαίρια [13].

Το ερυθρό αιμοσφαίριο είναι το κύριο κυτταρικό συστατικό του αίματος. Η συγκέντρωσή του είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτή των άλλων κυττάρων του αίματος [13].

¹⁸ Τα λευκοκύτταρα, ή λευκά αιμοσφαίρια, είναι κύτταρα του αίματος επιφορτισμένα με το ρόλο της άμυνας του οργανισμού έναντι σε λοιμώξεις και ξένα αντικείμενα. Υπάρχουν πέντε κύριοι τύποι λευκών αιμοσφαιρίων, αλλά όλα παράγονται και προέρχονται από πολυδύναμα κύτταρα στο μυελό των οστών, γνωστά ως πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα. Ζουν για περίπου 3 έως 4 ημέρες στο μέσο ανθρώπινο σώμα. Λευκοκύτταρα υπάρχουν σε όλο το σώμα, συμπεριλαμβανομένου του αίματος και του λεμφικού συστήματος.

¹⁹ Τα αιμοπετάλια είναι τα μικρότερα από τα έμμορφα στοιχεία του αίματος. Ονομάζονται και θρομβοκύτταρα, επειδή βασική τους αποστολή στον οργανισμό είναι η εξασφάλιση της αιμόστασης.

²⁰ Κατά την ωρίμανση του ερυθροκυττάρου, αποτελεί το στάδιο ακριβώς πριν από το ώριμο ερυθροκύτταρο. Είναι κύτταρο απύρρηνο, λίγο μεγαλύτερο σε όγκο και διάμετρο (7-9 μm) από το ώριμο ερυθροκύτταρο, επειδή είναι πιο άωρο, δηλαδή νεότερο κύτταρο, το οποίο δεν έχει ακόμα αποκτήσει το σχήμα του αμφίκιουλου δίσκου. Παραμένει δύο ημέρες περίπου στο μυελό των οστών και κατόπιν εισέρχεται στην κυκλοφορία, όπου μετά από 1-2 ημέρες μετατρέπεται σε ώριμο ερυθρό αιμοσφαίριο.

²¹ Το πλάσμα είναι ένα υποκίτρινο υγρό που αποτελεί τη βάση του συνδετικού ιστού του κυκλοφορικού συστήματος, ως άμορφο συστατικό, "υδαρή μήτρα", του αίματος. Το πλάσμα περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες πλάσματος, νερό κατά 90% περίπου και διάφορους διαλύτες.

2. 1. Ερυθρό αιμοσφαίριο

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια ταξιδεύουν σε όλο το σώμα άπειρες φορές κατά τη διάρκεια των 120 ημερών ζωής τους, πριν να εξαλειφθούν τελικά από τον σπλήνα [14]. Φυσιολογικά, ένας ενήλικας άνδρας έχει περίπου 5.000.000 RBCs ανά μL (ολικού) αίματος και μια ενήλικη γυναίκα έχει περίπου 4.500.000 RBCs ανά μL (ολικού) αίματος. Τα ερυθροκύτταρα αποτελούνται, στο μεγαλύτερο μέρος τους, από νερό, αιμοσφαιρίνη (hemoglobin, Hb) και μικρά ποσά λιπιδίων [13].

Η **Hb** είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του οξυγόνου (O_2) σε όλους τους ιστούς του σώματος, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα του ερυθροκυττάρου και, καθώς είναι χρωστική ουσία, είναι υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα του [13]. Αποτελεί το μοναδικό μεταφορέα αερίων. Επίσης, η Hb, αποτελεί το 97% της διαλυτής άνυδρης ερυθροκυτταρικής πρωτεϊνικής μάζας και το 35% της συνολικής μάζας του ερυθροκυττάρου. Λόγω του ότι είναι αμφολύτης²², συσσωρεύεται στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη κατά τη διάρκεια της λύσης. Έτσι, διακυβεύεται ο εντοπισμός των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση, κάτι που δεν αφορά μόνο τα διαλυτά τμήματα [14].

2. 1. 1. Ρόλος

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι ιδιαίτερα «δυναμικά» συστατικά του αίματος που δε συμμετέχουν μόνο στη μεταφορά αερίων, αλλά και στην αλληλεπίδραση με άλλα κύτταρα του αίματος, ενδοθηλιακά κύτταρα²³ και πρωτεΐνες του πλάσματος [14].

Η κυριότερη λειτουργία τους είναι η μεταφορά του οξυγόνου σε όλο το σώμα, καθώς τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι οι μοναδικοί μεταφορείς οξυγόνου στον ανθρώπινο οργανισμό [13]. Άλλες λειτουργίες τους είναι: α) η έκλυση του ενζύμου ανθρακική ανυδράση, που επιτρέπει στο νερό (H_2O) του αίματος τη

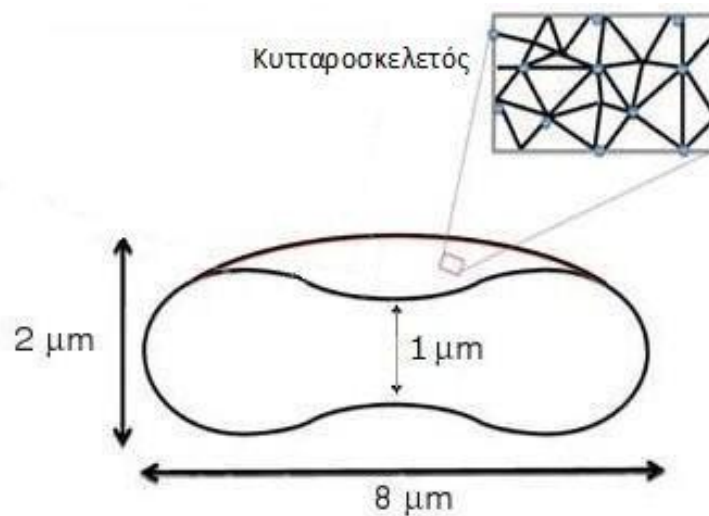
²² Αμφολύτες ονομάζονται οι ουσίες που συμπεριφέρονται και ως οξέα, αλλά και ως βάσεις στα διαλύματά τους.

²³ Είναι πολυλειτουργικά, πεπλατυσμένα επιθηλιακά κύτταρα με υψηλή εξειδίκευση, τα οποία βρίσκονται στο αγγειακό ενδοθήλιο και έρχονται σε επαφή με το αίμα.

μεταφορά του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) στους πνεύμονες, και β) ο έλεγχος του pH, κάτι που επιτυγχάνουν συμπεριφερόμενα σαν οξεοβασικό ρυθμιστικό διάλυμα²⁴ [13].

2. 1. 2. Μορφή

Τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι τα μοναδικά ευκαρυωτικά κύτταρα²⁵ (στα θηλαστικά), που είναι απύρρηνα και δεν έχουν οργανίδια στο κυτταρόπλασμα [13, 14, 15]. Το μέγεθός τους είναι περίπου 8 μm διάμετρος και 2 μm πάχος (1 μm στο κέντρο και 1,9-2,5 μm στην περιφέρεια) (Εικόνα 2). Το σχήμα τους θυμίζει αμφίκοιλους δίσκους και καθορίζεται από τις ιδιότητες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και του υποκείμενου κυτταροσκελετικού δικτύου (Εικόνα 2) [13, 14]. Αυτό το ασυνήθιστο αμφίκοιλο σχήμα είναι απαραίτητο για να επιτευχθεί η μεταφορά των αερίων [14].



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του σχήματος και των διαστάσεων ενός υγιούς ερυθροκυττάρου. Το πλέγμα αναπαριστά το δίκτυο σπекτρίνης στον κυτταροσκελετό. Πιο συγκεκριμένα, κάθε εξάγωνο πλέγμα αντιπροσωπεύει 6 μόρια σπекτρίνης και οι γαλάζιες κουκίδες αντιπροσωπεύουν τα μόρια αγκυρίνης [16].

²⁴ Ρυθμιστικά ονομάζονται τα διαλύματα στα οποία αν προστεθεί μικτή, αλλά υπολογίσιμη, ποσότητα ισχυρού οξέος ή ισχυρής βάσης, το pH τους πρακτικά δεν μεταβάλλεται.

²⁵ Ονομάζονται τα κύτταρα τα οποία έχουν πλήρες σχηματισμένο πυρήνα (αρχαία ελληνικά «κάρυον»), εξ ου και η ονομασία τους, σε αντιδιαστολή με τα κύτταρα που δεν έχουν σχηματισμένο πυρήνα, τα λεγόμενα προκαρυωτικά κύτταρα.

Όμως, επειδή η διάμετρος των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι μεγαλύτερη από αυτή κάποιων τριχοειδών αγγείων (3μm), παραμορφώνονται έτσι ώστε να περάσουν μέσα από αυτά και έπειτα επανέρχονται στην κανονική τους μορφή (παραμορφωσιμότητα). Η παραμόρφωση αυτή είναι εφικτή χάρη στην ελαστικότητα του ερυθροκυττάρου, η οποία οφείλεται στη μεμβράνη [13, 14, 17].

Ο όγκος του ερυθροκυττάρου ρυθμίζεται μέσω: α) της ενεργής μεμβρανικής μεταφοράς (π.χ. αντλίες), β) της καθοδηγούμενης από την κλίση, παθητικής μεταφοράς και γ) ενός αριθμού καναλιών [13].

2. 1. 3. Άλλες ιδιότητες

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια βρίσκονται διαρκώς σε κίνηση στην κυκλοφορία του αίματος. Επίσης, το γεγονός ότι στην ώριμη μορφή τους δεν έχουν οργανίδια συνδεδεμένα με τη μεμβράνη, απλοποιεί την πρωτεομική ανάλυση της μεμβράνης [13]. Γενικά, το ερυθρό αιμοσφαίριο, σε σύγκριση με πολλά άλλα είδη κυττάρων, μπορεί εύκολα να απομονωθεί *ex vivo*²⁶ [14, 15].

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι πρώιμοι στόχοι της οξειδωτικής καταστροφής, καθώς είναι μεταφορείς οξυγόνου [14].

Το ερυθροκύτταρο περιέχει περίπου 1578 διαφορετικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες [18]. Από αυτές, 340 έχουν αναγνωριστεί ως μεμβρανικές πρωτεΐνες [13, 18].

²⁶ Είναι ο όρος της βιολογίας που αναφέρεται σε ό,τι λαμβάνει χώρα έξω από τον οργανισμό. Στη βιολογία, αναφέρεται σε πειραματισμούς που πραγματοποιούνται πάνω σε ζωντανούς ιστούς, ή σε τεχνητό περιβάλλον έξω από τον οργανισμό.

2. 2. Ερυθροκυτταρική μεμβράνη

2. 2. 1. Ρόλος

Η μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων ήταν και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη ως μοντέλο για μελέτες της μεμβρανικής δομής . Είναι η βιολογική μεμβράνη που έχει μελετηθεί εκτενέστερα, καθώς τα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν περιέχουν πυρήνα ή εσωτερικά οργανίδια και έτσι αντιπροσωπεύουν μια πηγή από την οποία μπορεί εύκολα να απομονωθεί «καθαρή» πλασματική μεμβράνη [15, 19]. Αποτελεί μόλις το 1% του βάρους του ερυθροκυττάρου, αλλά παρόλα αυτά ο ρόλος της είναι ιδιαίτερης σημασίας για τη διατήρηση της ακεραιότητάς του [13, 14, 17].

Πιο συγκεκριμένα, η ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι υπεύθυνη για τις εξής λειτουργίες:

- Το διαχωρισμό των περιεχομένων του κυττάρου από το πλάσμα [15].
- Τη διατήρηση του χαρακτηριστικού σχήματος του ερυθροκυττάρου [13, 14, 17].
- Τη ρύθμιση της συγκέντρωσης των ενδοκυττάρων κατιόντων²⁷ [14].
- Τις αλληλεπιδράσεις του ερυθροκυττάρου με τα άλλα κύτταρα και γενικά την επικοινωνία του με το γύρω περιβάλλον, μέσω υποδοχέων που βρίσκονται στην επιφάνεια της μεμβράνης [13, 14].

Η ικανότητα του ερυθροκυττάρου να ανταποκρίνεται όταν προκύπτει ανάγκη παραμόρφωσης, εξαρτάται από τη μεμβράνη του [13, 14, 17]. Όταν ασκείται πίεση στο ερυθρό αιμοσφαίριο, τότε τα μόρια της σπεκτρίνης υφίστανται αναστρέψιμη αλλαγή στη δομή τους. Στην περίπτωση πολύ έντονης ή παρατεταμένης πίεσης, η μεμβράνη παρουσιάζει μόνιμη – πλαστική παραμόρφωση. Η παραμόρφωση μπορεί να ελαττωθεί με αυξήσεις των ενώσεων μεταξύ των πρωτεϊνών του σκελετού, ή μεταξύ των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών του σκελετού [13, 17].

²⁷ Τα κατιόντα είναι ιόντα που έχουν θετικό ηλεκτρικό φορτίο.

Γενικά, το αμφίκυκλο σχήμα του ερυθρού αιμοσφαιρίου προκύπτει από την αλληλεπίδραση της λιπιδικής διπλοστιβάδας με τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Η οσμωτικότητα²⁸ και το εμβαδόν επιφανείας ως προς τον όγκο, το pH και οι αποκλίσεις των συγκεντρώσεων των κατιόντων (χαμηλά επίπεδα καλίου (K^+), υψηλά επίπεδα νατρίου (Na^+) και ασβεστίου (Ca^{2+})), η απόκλιση της φόρτισης μεταξύ των επιφανειών της μεμβράνης, όλα είναι βασικές παράμετροι για την εξασφάλιση της ρευστότητας και της παραμορφωσιμότητας της μεμβράνης. Τα παραπάνω επιτρέπουν στο ερυθροκύτταρο να ανταποκρίνεται γρήγορα στις μεταβολές του περιβάλλοντος, όπως π.χ. στα διάφορα μεγέθη των τριχοειδών αγγείων [13, 14].

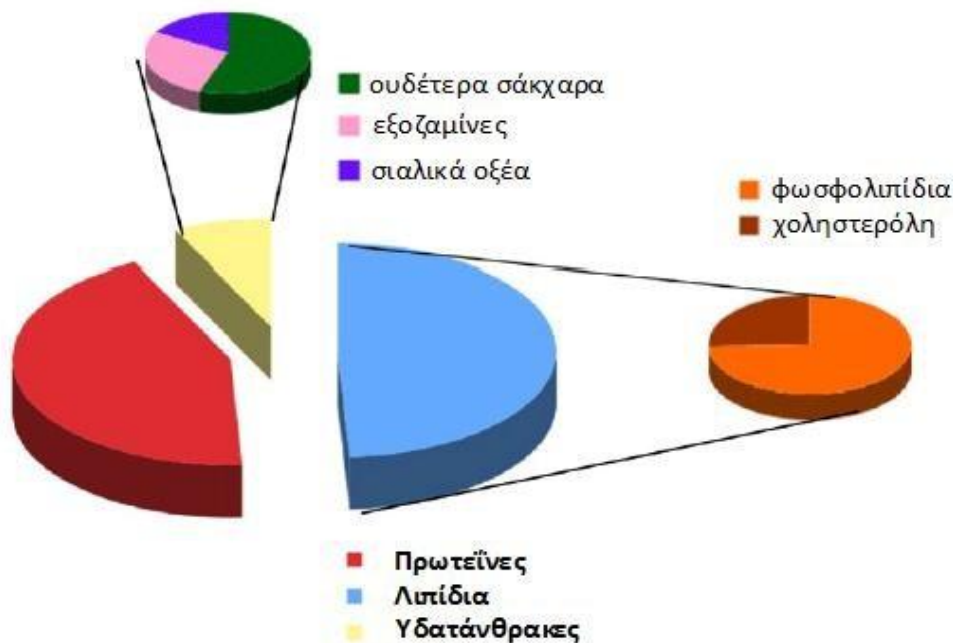
2. 2. 2. Σύνθεση

Η θεμελιώδης δομή της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης είναι η φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα [15]. Πιο συγκεκριμένα, η ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι μία ασύμμετρη λιπιδική διπλοστιβάδα, η οποία αποτελείται από πρωτεΐνες, λιπίδια και υδατάνθρακες που σχετίζονται στενά αναμεταξύ τους. Ενώ ένας αριθμός πρωτεϊνών διαπερνά τη μεμβράνη (διαμεμβρανικές πρωτεΐνες), αρκετές πρωτεΐνες (π.χ. γλυκολυτικά ένζυμα²⁹, πρωτεΐνες του κυτταροσκελετικού δικτύου) συνδέονται με τη μεμβράνη μόνο μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα μεμβρανικά συστατικά. Το είδος, και κατ' επέκταση οι δυνάμεις των αλληλεπιδράσεων, εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών (π.χ. ιοντικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου) [13, 14]. Συνοψίζοντας, η ερυθροκυτταρική μεμβράνη αποτελείται από μία διπλοστιβάδα λιπιδίων και ένα σκελετό, ο οποίος είναι ένα κλειστό, δύο διαστάσεων δίκτυο από τετραμερή σπεκτρίνης [19].

²⁸ Οσμωτικότητα είναι η ικανότητα όσμωσης. Όσμωση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο έχουμε μετακίνηση καθαρού διαλύτη από ένα διάλυμα χαμηλότερης συγκέντρωσης (αραιό διάλυμα), σε ένα διάλυμα υψηλότερης συγκέντρωσης (πυκνό διάλυμα) μέσω ημιπερατής μεμβράνης.

²⁹ Ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις γλυκόλυσης.

Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη αποτελείται από πρωτεΐνες (49%), λιπίδια (44%), εκ των οποίων το 33% είναι φωσφολιπίδια³⁰ και το 11% χοληστερόλη³¹, και υδατάνθρακες (7%), εκ των οποίων το 4% είναι ουδέτερα σάκχαρα, το 2% εξοζαμίνες³² και το 1% σιαλικά οξέα³³ (Εικόνα 3) [13,15].



Εικόνα 3: Τα ποσοστά των κύριων συστατικών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης [13].

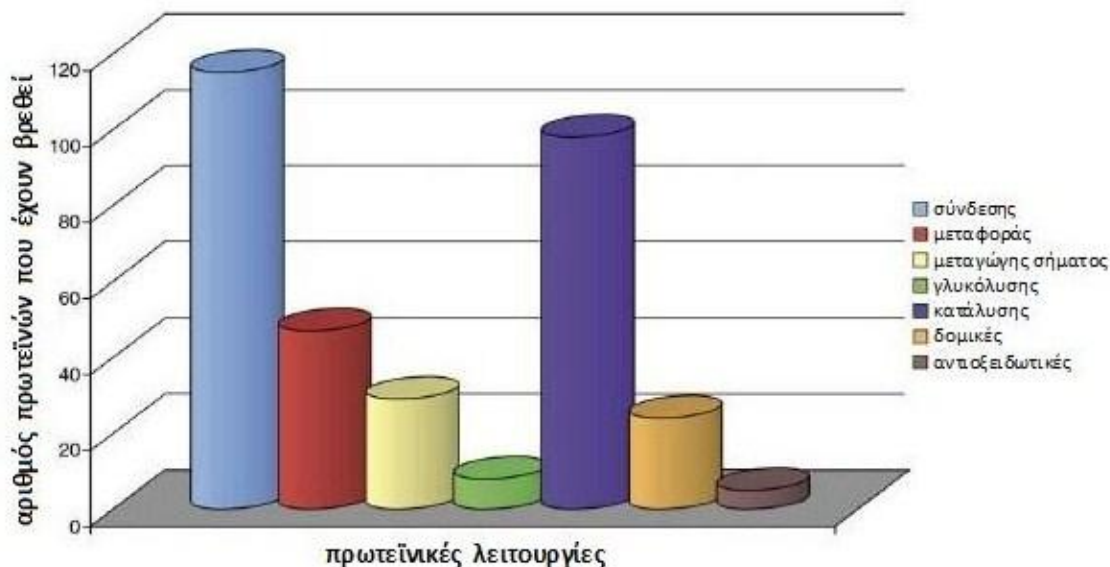
Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι πλούσια σε λιπίδια [13]. Όμως, παρόλο που τα λιπίδια είναι τα βασικά δομικά στοιχεία της, οι πρωτεΐνες είναι αυτές που είναι υπεύθυνες για τη διεκπεραίωση συγκεκριμένων λειτουργιών της (Εικόνα 4) [15].

³⁰ Φωσφολιπίδια είναι οποιαδήποτε λιπίδια περιέχουν φωσφόρο. Αποτελούν τα βασικά δομικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης. Συμβάλουν στο λειτουργικό της ρόλο, κυρίως εξαιτίας της ιδιότητάς τους να διαθέτουν μια υδρόφιλη κεφαλή και μια υδρόφοβη ουρά.

³¹ Η χοληστερίνη ή χοληστερόλη είναι κηρώδης στερόλη που βρίσκεται στη μεμβράνη των κυττάρων όλων των ιστών του σώματος, και στο πλάσμα του αίματος όλων των ζώων.

³² Η εξοζαμίνη είναι ένα σάκχαρο με 6 άτομα άνθρακα που περιέχει και άζωτο.

³³ Το σιαλικό οξύ παίζει ζωτικό ρόλο στην επικοινωνία των κυττάρων. Συγκεκριμένα, λειτουργεί ως υποδοχέας στην επιφάνεια των κυττάρων.



Εικόνα 4: Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης [13].

Οι πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης διαχωρίζονται σε δύο ομάδες, τις διαμεμβρανικές και τις περιφερειακές [15]. Εκτός από αυτόν το διαχωρισμό, υπάρχει και μια πιο λειτουργική κατάταξη, σύμφωνα με την οποία οι μεμβρανικές πρωτεΐνες αναγνωρίζονται ως: α) κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, π.χ. σπεκτρίνη και ακτίνη, οργανωμένες σε ένα δίκτυο, β) διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, π.χ. πρωτεΐνη-ζώνη 3, γλυκοφορίνες, ενσωματωμένες στη λιπιδική διπλοστιβάδα, ή γ) συνδετικές πρωτεΐνες, π.χ. αγκυρίνη, πρωτεΐνη 4.2 [13].

2. 2. 3. Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες

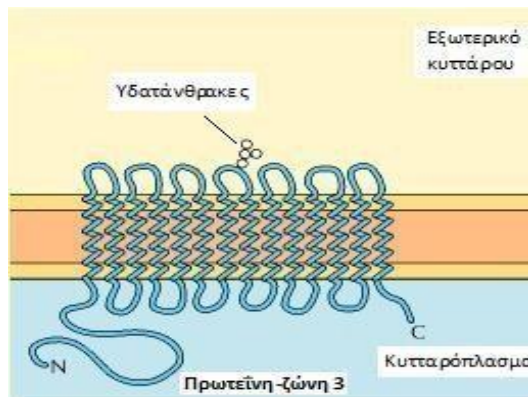
Διαμεμβρανικές ονομάζονται οι πρωτεΐνες, τμήματα των οποίων εισχωρούν στη διπλοστιβάδα των λιπιδίων. Οι κυριότερες εξ αυτών είναι η πρωτεΐνη-ζώνη 3 και οι γλυκοφορίνες (A, B, C, D, E) [15].

α) Πρωτεΐνη-ζώνη 3

Η πρωτεΐνη-ζώνη 3 (band 3) είναι η κύρια διαμεμβρανική πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων [15, 18]. Είναι ένα ιδιαίτερα υδρόφοβο συστατικό της μεμβράνης, όπου βρίσκεται σε αφθονία [14, 15]. Ειδικότερα, έχει υπολογιστεί ότι

υπάρχουν ένα εκατομμύριο αντίγραφα της σε κάθε κύτταρο, κάτι που την κάνει να αποτελεί το 30% του μεμβρανικού πρωτεόματος³⁴ [14].

Η λειτουργία της πρωτεΐνης-ζώνης 3 έχει κατανοηθεί επαρκώς. Αυτή η πρωτεΐνη, είναι ο μεταφορέας ανιόντων³⁵ που είναι υπεύθυνος για τη διαμεμβρανική μεταφορά των ιόντων³⁶ όξινου ανθρακικού (ή αλλιώς διττανθρακικά ανιόντα, bicarbonate, HCO_3^-)³⁷ και χλωρίου (Cl^-)³⁸ στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η πολυπεπτιδική της αλυσίδα³⁹ αποτελείται από 929 αμινοξέα⁴⁰. Μέσα στη μεμβράνη, τα διμερή της πρωτεΐνης-ζώνης 3 σχηματίζουν σφαιρικές δομές που περιέχουν εσωτερικά κανάλια, μέσω των οποίων τα ιόντα μπορούν να περνούν μέσα από τη λιπιδική διπλοστιβάδα (Εικόνα 5) [15].



Εικόνα 5: Αναπαράσταση της πρωτεΐνης-ζώνης 3 (σχηματισμός μπλε χρώματος), που διαπερνά τη λιπιδική διπλοστιβάδα (κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα). N: αμινοτελικό άκρο, C: καρβοξυλικό άκρο [15].

³⁴ Ως πρωτέομα χαρακτηρίζεται το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζονται από έναν οργανισμό, έναν ιστό ή ένα κύτταρο.

³⁵ Τα ανιόντα είναι ιόντα που έχουν αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο.

³⁶ Είναι είτε φορτισμένα άτομα (μονοατομικά ιόντα), είτε φορτισμένα συγκροτήματα ατόμων (πολυατομικά ιόντα).

³⁷ Τα διττανθρακικά (bicarbonate, HCO_3^-) αποτελούν το κυριότερο ενδοκυττάριο ανιόν.

³⁸ Το χλώριο (Cl^-) αποτελεί το κυριότερο ανιόν του εξωκυττάρου υγρού (και επομένως του αίματος).

³⁹ Δύο αμινοξέα μπορούν να ενωθούν μεταξύ τους με πεπτιδικό δεσμό (ομοιοπολικός) και με ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού. Με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα διπεπτίδιο. Πολλά αμινοξέα ενωμένα με αυτό τον τρόπο σχηματίζουν ένα πολυπεπτίδιο ή πολυπεπτιδική αλυσίδα. Τα πολυπεπτίδια μπορεί να αποτελούνται από λίγα, μέχρι χιλιάδες μονομερή.

⁴⁰ Αμινοξέα ονομάζονται οι χημικές ενώσεις που περιέχουν μία τουλάχιστον καρβονική ομάδα (από τα καρβονικά οξέα (RCOOH) και μία τουλάχιστον αμινομάδα ($-\text{NH}_2$). Τα αμινοξέα αποτελούν τα βασικά δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών που καθορίζουν και τις χαρακτηριστικές ιδιότητές τους.

Η διατήρηση της ιοντικής ισορροπίας επιτυγχάνεται κυρίως χάρη στην πρωτεΐνη-ζώνη 3 [14]. Χωρίς αμφιβολία, η πρωτεΐνη-ζώνη 3, είναι ο σημαντικότερος ερυθροκυτταρικός μεταφορέας. Δρα ως ανιοντοανταλλάκτης, δηλαδή έχει την ικανότητα να ανταλλάσσει ταχύτατα HCO_3^- και Cl^- , ενώ τα μεγαλύτερα ανιόντα (π.χ. θειικά ανιόντα, φωσφορικά ανιόντα) μεταφέρονται με πιο αργούς ρυθμούς [13, 14].

Επιπλέον, η πρωτεΐνη-ζώνη 3, είναι σημαντικό σημείο σύνδεσης για τον κυτταροσκελετό και για άλλες πρωτεΐνες του ερυθροκυττάρου. Συνδέει τη λιπιδική διπλοστιβάδα με τον υποκείμενο κυτταροσκελετό της μεμβράνης. Αυτό το επιτυγχάνει, κατά πρώτον αλληλεπιδρώντας με την αγκυρίνη και την πρωτεΐνη 4.2 και κατά δεύτερον μέσω σύνδεσής της με την πρωτεΐνη 4.1 [13, 15].

β) Γλυκοφορίνες

Οι γλυκοφορίνες (glycophorines), αν τις υπολογίσουμε όλες μαζί, είναι οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες του ερυθροκυττάρου που βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση [13]. Είναι μικρές γλυκοπρωτεΐνες αποτελούμενες από 131 αμινοξέα. Το μοριακό τους βάρος⁴¹ είναι περίπου 30.000, μισό από το οποίο είναι πρωτεΐνη και μισό υδατάνθρακας [15]. Επίσης, έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε σιαλικό οξύ (σιαλογλυκοπρωτεΐνες) [13].

Μπορούν να διαιρεθούν σε δύο υποομάδες βάσει της ομοιότητάς τους στη γονιδιακή τους δομή. Οι γλυκοφορίνες A, B και E (GPA, GPB, GPE) προέρχονται από συγγενή γονίδια, ενώ οι γλυκοφορίνες C και D (GPC, GPD) προκύπτουν από μία ενιαία περιοχή (μέσω εναλλασσόμενου ματίσματος⁴² του mRNA⁴³) [13].

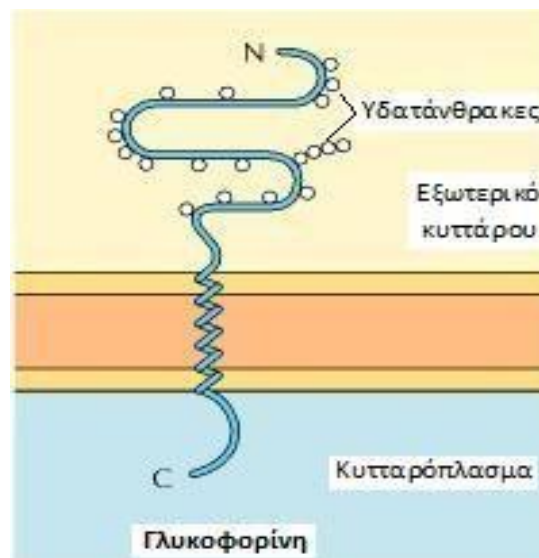
⁴¹ Μοριακό βάρος, ή σχετική μοριακή μάζα, χημικής ουσίας λέγεται ο αριθμός που δείχνει πόσες φορές είναι μεγαλύτερη η μάζα του μορίου του στοιχείου ή της χημικής ένωσης από το 1/12 της μάζας του ατόμου του άνθρακα – 12. (Στην πράξη είναι το άθροισμα των ατομικών βαρών των στοιχείων που αποτελούν ένα μόριο).

⁴² Το μάτισμα, ή συναρμογή, αποτελεί το στάδιο επεξεργασίας του RNA κατά το οποίο απομακρύνονται τα εσόνια και συνενώνονται τα εξώνια.

⁴³ Είναι ένα από τα τέσσερα είδη των μορίων RNA που παράγονται με τη μεταγραφή. Ονομάζεται αγγελιαφόρο (messenger) RNA. Τα μόρια αυτά (τα mRNA) μεταφέρουν την πληροφορία του DNA για την παραγωγή μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Η **GPA** είναι υπεύθυνη για την αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια του ερυθροκυττάρου. Επίσης, υποδεικνύεται ότι μπορεί να έχει μια λειτουργία, πέραν του δομικού της ρόλου στην επιφάνεια του ερυθροκυττάρου, ως πρωτεΐνη-συναδός⁴⁴ κατά την μετακίνηση της πρωτεΐνης-ζώνης 3 προς την ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Η λειτουργία της **GPB** δεν είναι ξεκάθαρη. Η **GPC** είναι σημαντική για τη σύνδεση του κυτταροσκελετικού δικτύου στη μεμβράνη. Η **GPD** μεταφράζεται από το ίδιο mRNA που μεταφράζεται και η GPC, αλλά υπολείπεται των 30 πρώτων καταλοίπων. Το προϊόν του γονιδίου ονομαζόμενο **GPE** δεν έχει αναγνωριστεί ακόμα [13].

Παρόλο που οι γλυκοφορίνες είναι οι πρώτες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που χαρακτηρίστηκαν, η ακριβής τους λειτουργία παραμένει αδιευκρίνιστη (Εικόνα 6) [15].



Εικόνα 6: Αναπαράσταση της γλυκοφορίνης, που διαπερνά τη λιπιδική διπλοστιβάδα (κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα). N: αμινοτελικό άκρο, C: καρβοξυλικό άκρο [15].

⁴⁴ Συναδός πρωτεΐνη ονομάζεται η πρωτεΐνη που βοηθά στη σωστή διαμόρφωση των πρωτεϊνών- στόχων τους στο χώρο του κυτταροπλάσματος. Επίσης, οι πρωτεΐνες συναδοί, προάγουν την επανάκτηση της δραστηρότητας των μετουσιωμένων πρωτεϊνών.

2. 2. 4. Περιφερειακές πρωτεΐνες

Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης είναι περιφερειακές πρωτεΐνες. Περιφερειακές ονομάζονται οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και λιπίδια στη μεμβρανική επιφάνεια, αλλά δεν εισχωρούν στο υδρόφοβο εσωτερικό της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Αντί αυτού, συνδέονται έμμεσα με τη μεμβράνη μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Επίσης, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με σκοπό το σχηματισμό του κυτταροσκελετού [15].

α) Σπεκτρίνη

Η περιφερειακή πρωτεΐνη που βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στα ερυθροκύτταρα είναι η σπεκτρίνη (spectrin), η οποία είναι η κύρια κυτταροσκελετική πρωτεΐνη [15]. Η σπεκτρίνη αποτελεί το 75% του κυτταροσκελετού. Ειδικότερα, υπάρχουν 100.000 αντίγραφα της σε κάθε κύτταρο [14].

Τα μόρια της σπεκτρίνης είναι ραβδοειδή και πολύ ελαστικά, καθώς είναι οργανωμένα σε μία ιδιαίτερα σπειροειδή, ελικοειδή κατάσταση. Έτσι, τους προσδίδονται ιδιότητες ελατηρίου και η ικανότητα να διαστέλλονται και να συστέλλονται [13].

Δομικά, η σπεκτρίνη, αποτελείται από δύο διακριτά μέρη, την α-σπεκτρίνη (α -Sp) και τη β-σπεκτρίνη (β -Sp). Είναι δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες περιπλέκονται μεταξύ τους για το σχηματισμό διμερών, που με τη σειρά τους σχηματίζουν τετραμερή. Τα τετραμερή της σπεκτρίνης ($\alpha_2\beta_2$) είναι τα συστατικά «κλειδιά» του κυτταροσκελετικού δικτύου, που ρυθμίζουν το σχήμα του κυττάρου, την παραμορφωσιμότητα της μεμβράνης, τη σταθερότητα της μεμβράνης και την πλευρική κινητικότητα της πρωτεΐνης-ζώνης 3 [13].

β) Ακτίνη

Μια άλλη περιφερειακή πρωτεΐνη είναι η ακτίνη (actin), η οποία είναι μια πρωτεΐνη σφαιρικού σχήματος. Αποτελείται από ομοιόμορφα νημάτια, μικρού μήκους, τα οποία συμβάλλουν στη σύνδεσή της με τα άκρα της α-σπεκτρίνης και της β-σπεκτρίνης [13, 14, 15].

Η ακτίνη συμμετέχει στο κομβικό σύμπλεγμα. Ο ρόλος της σε αυτό είναι σημαντικός, καθώς ο λόγος της πολυμερισμένης⁴⁵ προς τη μη πολυμερισμένη ακτίνη ελέγχει την ελαστικότητα της μεμβράνης, που αυξάνεται όταν ο πολυμερισμός της ακτίνης αναστέλλεται. Ο στενός έλεγχος γύρω από αυτήν την αναλογία διενεργείται από τέσσερις δευτερεύουσες, κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, την τροπομοντουλίνη, την τροπομουσίνη, τα ετεροδιμερή της αβ-αντουσίνης και τη δεματίνη (πρωτεΐνη 4.9). Τα συμπλέγματα τροπομοντουλίνης – τροπομουσίνης σταθεροποιούν τα κοντά νημάτια της ακτίνης, που ενισχύουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ σπεκτρίνης και ακτίνης. Η δεματίνη τυλίγει τα νημάτια της ακτίνης υπό μορφή «καλωδίων», ενώ οι αντουσίνες συμμετέχουν τόσο στην προσαρμογή, όσο και στο τύλιγμα των νηματίων της ακτίνης. Επίσης, οι αντουσίνες, παίζουν ένα ρόλο στην έγκαιρη συναρμολόγηση των συμπλεγμάτων σπεκτρίνης – ακτίνης, σχηματίζοντας ένα τριμερές σύμπλεγμα σπεκτρίνης – ακτίνης – αντουσίνης [13].

γ) Πρωτεΐνη 4.1

Η πρωτεΐνη 4.1 έχει σφαιρικό σχήμα και παρέχει έναν επιπλέον δεσμό μεταξύ της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού. Αυτό το επιτυγχάνει συνδεόμενη στα σημεία ένωσης της σπεκτρίνης και της ακτίνης, αλλά και στις γλυκοφορίνες A και C και στην πρωτεΐνη-ζώνη 3 [15]. Επίσης, η πρωτεΐνη 4.1, διαμορφώνει την αλληλεπίδραση της σπεκτρίνης, μέσω της αγκυρίνης, με την ερυθροκυτταρική

⁴⁵ Έχει υποστεί πολυμερισμό. Πολυμερισμός ονομάζεται η συνένωση μικρών μορίων, που ονομάζονται μονομερή, προς σχηματισμό ενός μεγαλύτερου μορίου, που ονομάζεται πολυμερές.

μεμβράνη. Από την άλλη, η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης 4.1 με τη γλυκοφορίνη C, ρυθμίζεται από την p55⁴⁶ [13].

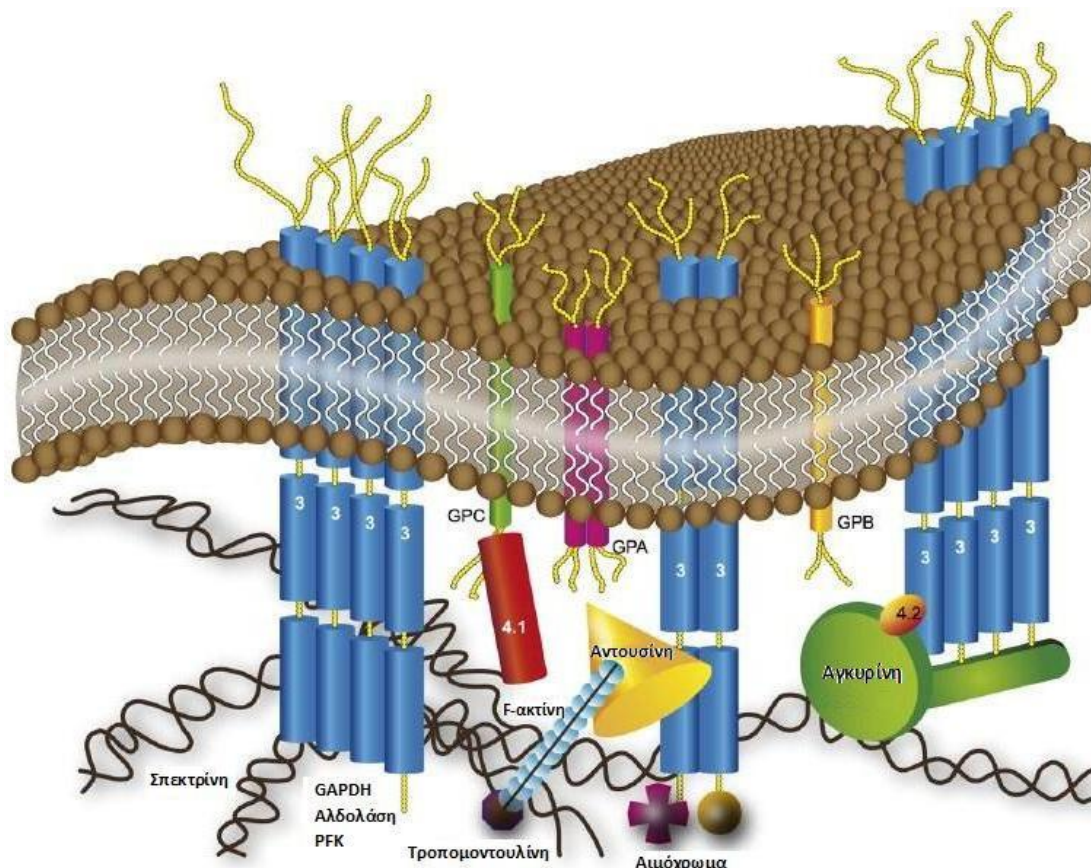
δ). Αγκυρίνη

Η αγκυρίνη (ankyrin) είναι μια περιφερειακή πρωτεΐνη πυραμιδοειδούς σχήματος και μεγάλου μεγέθους. Λειτουργεί ως ο κύριος σύνδεσμος μεταξύ της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού, καθώς συνδέεται με τα τετραμερή της σπεκτρίνης και με την πρωτεΐνη-ζώνη 3. Ουσιαστικά, συνδέει τον σκελετό της μεμβράνης (κυτταροσκελετό) με τη λιπιδική διπλοστιβάδα [15].

2. 2. 5. Κυτταροσκελετός

Ο κυτταροσκελετός βρίσκεται κάτω από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη και καθορίζει το σχήμα του κυττάρου (*Εικόνα 7*) [15]. Είναι ένα οργανωμένο δίκτυο πρωτεϊνών που περιλαμβάνει κύρια (π.χ. σπεκτρίνη, ακτίνη, πρωτεΐνη 4.1, αγκυρίνη) και δευτερεύοντα συστατικά (π.χ. πρωτεΐνη 4.2, δεματίνη, αντουσίνη, τροπομουσίνη, τροπομοντουλίνη, κ.α.), πολλά από τα οποία αλληλεπιδρούν όχι μόνο μεταξύ τους, αλλά και με πρωτεΐνες και λιπίδια της μεμβράνης (*Εικόνα 7*) [13]. Τα ερυθροκυτταρικά πρωτεόματα επιβεβαιώνουν την παρουσία όλων των ήδη γνωστών, κύριων πρωτεϊνών και υποδεικνύουν την παρουσία ενός αριθμού κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών χαμηλής συγκέντρωσης (π.χ. μουσίνη, μοεσίνη, εζρίνη, ραδιξίνη, κ.α.), η φυσιολογική λειτουργία των οποίων παραμένει απροσδιόριστη [14].

⁴⁶ Μέλος της, σχετιζόμενης με τη μεμβράνη, οικογένειας των γουανιλικών κινασών.



Εικόνα 7: Μοντέλο της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και του υποκείμενου κυτταροσκελετού. Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της μεμβράνης και του (υποκείμενου) κυτταροσκελετού [13].

Οι λειτουργίες του κυτταροσκελετικού δικτύου ρυθμίζονται από το είδος και την έκταση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (post-translational modifications, PTMs)⁴⁷. Η αναδιάταξη του κυτταροσκελετικού δικτύου, που ακολουθεί την παραμόρφωση της μεμβράνης, είναι δυνατή χάρη στην καθεαυτή δομική της διάταξη και στις δυναμικές μεταβολές μεταξύ εκτεταμένων και συμπιεσμένων διαμορφώσεων. Η σύνδεση του κυτταροσκελετικού δικτύου στη μεμβράνη προκαλείται από τις αλληλεπιδράσεις των σπεκτρίνη – αγκυρίνη – πρωτεΐνη-ζώνη 3 και των σπεκτρίνη – πρωτεΐνη 4.1 – γλυκοφορίνη C [13].

⁴⁷ Οι λειτουργίες του κυτταροσκελετικού δικτύου ρυθμίζονται από το είδος και την έκταση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (post-translational, PTMs). Οι γνωστές κυτταροσκελετικές PTMs περιλαμβάνουν τη φωσφορυλίωση, τη μεθυλίωση, κ.α.

Όπως επισημάνθηκε, η πλαστικότητα του κυτταροσκελετού ρυθμίζεται από τις PTMs και κυρίως από την κατάσταση φωσφορυλίωσης⁴⁸ των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών, οι οποίες με τη σειρά τους σχετίζονται με τη μηχανική σταθερότητα της μεμβράνης, όπου η αυξημένη φωσφορυλίωση μειώνει τη σταθερότητα της μεμβράνης [13].

⁴⁸ Γενικά, ως φωσφορυλίωση (phosphorylation) χαρακτηρίζεται η διαδικασία (χημική αντίδραση) κατά την οποία μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες (φωσφορυλομάδα) PO_3^{2-} προστίθενται σε ένα μόριο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Η Αποθηκευτική Βλάβη του Ερυθροκυττάρου

Η αποθήκευση των ερυθροκυττάρων οδήγησε σε ένα νέο ζήτημα, αυτό της ποιότητάς τους κατά τη διάρκεια και μετά την αποθήκευση. Ακόμα και με τα πολύ καλά αντιπηκτικά και συντηρητικά διαλύματα που είναι διαθέσιμα, τα ερυθροκύτταρα δεν παραμένουν στην ίδια κατάσταση, αλλά επηρεάζονται από τη διαδικασία και τις συνθήκες αποθήκευσής τους [3]. Κατά την αποθήκευση παρατηρούνται μορφολογικές, βιοχημικές, μεταβολικές και λειτουργικές μεταβολές στα ερυθρά αιμοσφαίρια, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως αποθηκευτικές βλάβες του ερυθροκυττάρου (red blood cell storage lesions). Οι αποθηκευτικές βλάβες είναι πολύπλευρες και περιλαμβάνουν μορφολογικές αλλαγές, αλλαγές στο μεταβολισμό και τη ρεολογία⁴⁹, απώλεια υδατανθράκων, λιπιδίων και πρωτεϊνών από τη μεμβράνη, απώλεια μεμβράνης, οξειδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών (με αλλαγές στη δομή της πρωτεΐνης-ζώνης 3), επιδράσεις στη δέσμευση και μεταφορά O₂, συγκόλληση των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ενδοθηλιακά κύτταρα, μειωμένη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων, όπως και δευτερεύοντες κινδύνους λόγω συσσώρευσης καλίου, ενεργών πρωτεϊνών, λιπιδίων και μικροκυστιδίων, και λόγω βακτηριακών επιμολύνσεων [8]. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, ο μεταβολισμός⁵⁰ γίνεται πιο αργός, έχουμε μείωση του ATP (adenosine 5'-triphosphate, αδενοσίνη 5'-τριφωσφορικό οξύ)⁵¹, η γλυκόζη στο αποθηκευμένο

⁴⁹ Είναι η επιστήμη που είναι αφιερωμένη στη μελέτη της παραμόρφωσης και της ροής της ύλης.

⁵⁰ Στη βιολογία με τον όρο μεταβολισμός χαρακτηρίζεται το σύνολο των βιοχημικών διεργασιών που γίνονται στα κύτταρα ενός ζωικού ή φυτικού οργανισμού κατά τις οποίες είτε αποθηκεύεται ενέργεια (διαδικασία αναβολισμού), είτε απελευθερώνεται από τα βιομόρια ενέργεια (περίπτωση καταβολισμού).

⁵¹ Το ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη ή ορθότερα αδενοσίνη 5'-τριφωσφορικό οξύ), ονομάζεται στη βιοχημεία το μόριο που αποτελείται από αδενίνη και το σάκχαρο ριβόζη (η ένωση των οποίων δημιουργεί την αδενοσίνη), στο οποίο έχουν προσκολληθεί τρεις φωσφορικές ομάδες (φωσφορυλομάδες), που ενώνονται με δεσμούς υψηλής ενέργειας. Η υδρόλυση αυτών των ειδικών δεσμών έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενέργειας.

αίμα καταναλώνεται και παρατηρείται οξέωση, με ταυτόχρονη ελάττωση των επιπέδων 2,3-DPG (2,3-diphosphoglycerate, 2,3-διφωσφογλυκερινικό οξύ)⁵². Λόγω της απενεργοποίησης της αντλίας νατρίου-καλίου (Na^+/K^+)⁵³ (που είναι συνήθως παροδική), η συγκέντρωση καλίου εξωκυτταρικά αυξάνεται, ενώ ενδοκυτταρικά συσσωρεύεται νάτριο. Σαν αποτέλεσμα, έχουμε απώλεια μεμβράνης από το ερυθροκύτταρο (μέσω της μικροκυστιδιοποίησης), που οδηγεί σε αλλαγές στη ρεολογία. Η αλλοίωση αυτή των ερυθρών αιμοσφαιρίων έχει ως συνέπεια την αιμόλυση και τη δημιουργία μικροκυστιδίων (microvesicles/ microparticles), τα οποία ίσως συμβάλλουν σε επιπλοκές που σχετίζονται με τη μετάγγιση [20, 21]. Ορισμένες από αυτές τις βλάβες συμβαίνουν μόλις τις πρώτες ώρες της αποθήκευσης, όπως η μείωση του pH και η αύξηση του καλίου, ενώ άλλες συμβαίνουν ύστερα από ημέρες ή και εβδομάδες [21].

Όλες αυτές οι αλλαγές που παρατηρούνται, μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των μεταγγίσεων με μακροχρονίως αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα [21]. Οι παρατηρήσεις αυτές (σε μοριακό επίπεδο) υποστηρίζονται από πολλές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στις κλινικές επιπτώσεις, οι οποίες ίσως εμφανιστούν μετά από τέτοιες μεταγγίσεις. Αρκετές από αυτές καταδεικνύουν δυσμενή κλινικά αποτελέσματα σε ασθενείς που μεταγγίστηκαν με μακροχρόνια αποθηκευμένο αίμα, συσχετίζοντάς τα με τις ερυθροκυτταρικές βλάβες, και υποστηρίζουν πως η χρήση φρέσκου αίματος ίσως είναι προτιμότερη [22, 23, 24]. Παρόλα αυτά, υπάρχουν και μελέτες που αδυνατούν να προχωρήσουν σε τέτοιους συσχετισμούς [25, 26]. Έτσι, αν και οι συνιστώσες της αποθηκευτικής βλάβης έχουν περιγραφεί σε ιδιαίτερα

Το ATP μπορεί να δημιουργηθεί είτε κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αναπνοής, είτε κατά τη γλυκόλυση στο κυτταρόπλασμα, είτε δια του κύκλου του Κρεμπς.

⁵² Το 2, 3-διφωσφογλυκερινικό οξύ είναι μια ουσία που παράγεται κατά την αναερόβια γλυκόλυση και παρέχει ενέργεια στα ερυθροκύτταρα. Σχετίζεται με τη δεσμευτική ικανότητα της αιμοσφαιρίνης προς το οξυγόνο.

⁵³ Η αντλία νατρίου/ καλίου (Na^+/K^+), είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη αντλία που συνδυάζει την είσοδο ιόντων καλίου με την Έξοδο ιόντων νατρίου από το κύτταρο. Η άντληση αυτή γίνεται με την υδρόλυση ATP σε ADP. Η αντλία δουλεύει κυκλικά και παίζει κεντρικό ρόλο στην κατανάλωση ενέργειας στο κύτταρο, καθώς υπολογίζεται ότι ευθύνεται τουλάχιστον για το 30% της συνολικής κατανάλωσης ATP.

ικανοποιητικό βαθμό, η κλινική σημασία αυτών των σχετικών με την αποθήκευση μεταβολών, παραμένει αβέβαιη [8, 10, 20, 21].

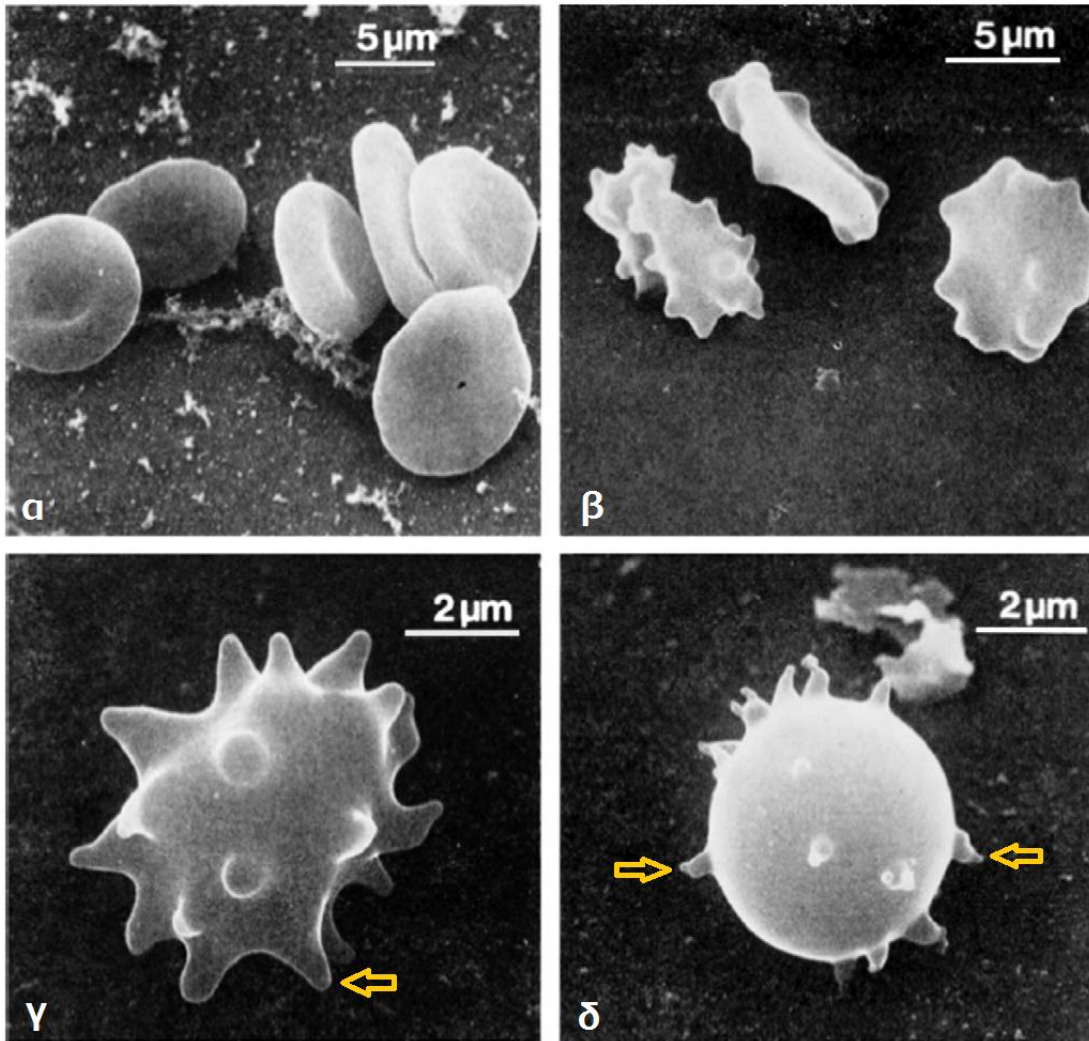
3. 1. Μορφολογικές μεταβολές

Το σχήμα των ερυθροκυττάρων κατά την αποθήκευση, έχει παρατηρηθεί πως υποβαθμίζεται γραμμικά [3]. Από λείοι, αμφίκυκλοι δίσκοι (*Εικόνα 8α*), μετατρέπονται σταδιακά σε ελαφρώς ανώμαλους δίσκους (με εξογκώματα) (*Εικόνα 8β*) και στη συνέχεια σε ιδιαίτερα έντονα ανώμαλες σφαίρες, που ονομάζονται σφαιροεχινοκύτταρα (*Εικόνα 8γ, 8δ*) [8, 10, 27, 28]. Η μετατροπή αυτή του σχήματος σχετίζεται με ρεολογικές μεταβολές, αυξημένο ιξώδες⁵⁴ και μειωμένη κυκλοφορία στα τριχοειδή [3, 8, 29]. Δίνει, επίσης, στα ερυθρά αιμοσφαίρια την τάση να συναθροίζονται, αυξάνοντας την πιθανότητα αποκλεισμού της μικροκυκλοφορίας⁵⁵, οδηγώντας πιθανώς σε ισχαιμία⁵⁶ του ιστού [10].

⁵⁴ Γενικά, με τον όρο ιξώδες στη χημεία και στη φυσική χαρακτηρίζεται μία από τις ιδιότητες της ύλης, ιδίως των υγρών (αλλά και των αερίων), και συγκεκριμένα η αντίσταση που παρουσιάζουν κατά τη ροή τους.

⁵⁵ Είναι το μεγαλύτερο και σημαντικότερο λειτουργικό κομμάτι του κυκλοφορικού συστήματος στον ανθρώπινο οργανισμό και αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την υγεία. Δραστηριοποιείται στο λεπτότερο εκτεταμένο δίκτυο των μικρότερων αιμοφόρων αγγείων. Στον άνθρωπο, η κυκλοφορία των μικρότερων αγγείων, η μικροκυκλοφορία, πληροί βασικές προϋποθέσεις ζωτικής μεταφοράς. Τροφοδοτεί με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά τους ιστούς και τα όργανα, διαθέτει υποπροϊόντα και υποστηρίζει το ανοσοποιητικό σύστημα.

⁵⁶ Ελάττωση της κυκλοφορίας του αίματος σε ορισμένο όργανο ή ιστό του σώματος.



Εικόνα 8: Η εξέλιξη της μορφολογίας ενός μέρους των ερυθροκυττάρων κατά την αποθήκευση. Τα ερυθροκύτταρα μετατρέπονται από λείοι αμφίκυκοι δίσκοι (α) σε εχινόκυτταρα (β) και στη συνέχεια γίνονται σφαιροεχινόκυτταρα, παίρνοντας σφαιροειδές σχήμα με προεξοχές (βέλη) (γ και δ). Οι τέσσερις εικόνες (α, β, γ, δ) προέρχονται από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Στις εικόνες α και β το μήκος της γραμμής στην πάνω δεξιά γωνία αντιστοιχεί σε 5μm πραγματικών διαστάσεων, ενώ αντίστοιχα στις εικόνες γ και δ το μήκος της, αντιστοιχεί σε 2μm [27].

Παρόλα αυτά, η μεταβολή αυτή στη μορφολογία των ερυθροκυττάρων είναι σε γενικές γραμμές αναστρέψιμη με τη μέθοδο της αναζωογόνησης, διαδικασία που επιτυγχάνεται με θέρμανση των κυττάρων μέσα σε μίγμα θρεπτικών στοιχείων με ουδέτερο pH [3, 30]. Αναγκαία κρίνεται όμως, και η παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης του ATP και του 2,3- DPG [8].

Μετά το στάδιο του σφαιροεχινοκυττάρου, τα ερυθροκύτταρα αρχίζουν να χάνουν μεμβράνη, μέσω της δημιουργίας μικροκυστιδίων από τις άκρες των «ακανθωτών» απολήξεων των μεμβρανικών ανωμαλιών (Εικόνα 8γ, 8δ: βέλη). Η απώλεια μεμβράνης κάνει τα ερυθρά αιμοσφαίρια λιγότερο ελαστικά, ώστε δυσκολεύονται πλέον να περάσουν μέσα από στενά τριχοειδή [3]. Οι αλλοιώσεις αυτές είναι μη αναστρέψιμες. Αν και τα μικροκυστίδια αυτά φαίνεται πως δημιουργούνται από τα ερυθροκύτταρα (αλλά και από άλλα κύτταρα του οργανισμού) μέσω μιας ελεγχόμενης διαδικασίας, οι λειτουργίες τους δεν είναι ακόμα απόλυτα γνωστές [27]. Θεωρούνται, ίσως, αποτέλεσμα της φυσιολογικής διαδικασίας της ωρίμανσης και του κυτταρικού θανάτου (ερύπτωση ή ερυθρόπτωση), ο οποίος «αποκαλύπτεται» από τη μείωση της συγκέντρωσης του ATP κατά την αποθήκευση [3, 8]. Μπορεί επίσης, να πρόκειται για ξεχωριστό μηχανισμό, μέσω του οποίου δημιουργούνται κυστίδια που μεταφέρουν και αποβάλλουν από το κύτταρο οξειδωμένα λιπίδια και κατεστραμμένες πρωτεΐνες [8, 31]. Με την αποβολή των επιβλαβών ουσιών με τον τρόπο αυτό, αποτρέπεται η πιθανή πυροδότηση άλλων βλαβών ή η στόχευση των ερυθροκυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα (πυροδότηση της εκκαθάρισης). Τα μικροκυστίδια είναι γενικά, κυστίδια πλούσια σε φωσφολιπίδια, μικρότερα από 0,5μm [27]. Κυστίδια που συλλέχθηκαν από το υπερκείμενο αποθηκευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων, ανάλογα με το μέγεθός τους, φέρονται να έχουν διαφορετικές ιδιότητες. Ορισμένα είναι πλούσια σε οξειδωμένα λιπίδια, εκθέτουν φωσφατιδυλοσερίνη (phosphatidylserine, PS)⁵⁷, η οποία φυσιολογικά βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, ή έχουν ανεπάρκεια πρωτεϊνών προσκολλημένων στον κυτταροσκελετό. Τα αρνητικά φορτισμένα λιπίδια που βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια των κυστιδίων αυτών, μπορούν να τα κάνουν προφλεγμονώδη και προθρομβωτικά [3, 8].

⁵⁷ Ανήκει σε μια κατηγορία λιποδιαλυτών ουσιών, τα φωσφολιπίδια, τα οποία είναι απαραίτητα συστατικά των μεμβρανών. Η φωσφατιδυλοσερίνη εξασφαλίζει τη ρευστότητα, την ελαστικότητα και τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Επίσης, διεγείρει την απελευθέρωση διαφόρων νευροδιαβιβαστών (π.χ. ακετυλοχολίνη).

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, η μείωση του ATP αποκαλύπτει την διαδικασία της ερύπτωσης. Αντιστρόφως, η προγραμματισμένη πορεία του κυτταρικού θανάτου των ερυθροκυττάρων, φυσιολογικά, κρατείται υπό έλεγχο με υψηλές συγκεντρώσεις ATP και GTP (Guanosine-5'-triphosphate, γουανοσίνη-5'-τριφωσφορικό οξύ)⁵⁸ [32]. Οι υψηλές συγκεντρώσεις ATP συντηρούν τη λειτουργία της αμινοφωσφολιπιδικής τρανσλοκάσης (aminophospholipid translocase)⁵⁹, η οποία κρατάει την PS στη φυσιολογική της θέση, στο εσωτερικό των ερυθροκυττάρων. Έτσι, καταστέλλεται τουλάχιστον μία από τις μορφές της μικροκυστιδιοποίησης (microvesiculation). Οι υψηλές συγκεντρώσεις GTP είναι απαραίτητες για την καταστολή μιας τρανσγλουταμινάσης⁶⁰, που όταν ενεργοποιηθεί προκαλεί τυχαία συγκόλληση μεταξύ πρωτεϊνών. Όσο περνάει ο χρόνος, όλο και περισσότερα από τα αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια γίνονται ευπαθή προς αυτές τις διαδικασίες [8].

Η αλλαγή στο σχήμα και τη δομή κατά την αποθήκευση, όπως προαναφέρθηκε, συνδέεται με ρεολογικές αλλαγές, αυξημένο ιξώδες και μειωμένη κυκλοφορία στα συστήματα των τριχοειδών [3, 8, 29]. Τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα έχουν μεγαλύτερο ολικό ιξώδες και η μειωμένη ροή τους μπορεί να παρουσιαστεί τόσο σε τεχνητά, όσο και σε φυσικά τριχοειδή. Η απώλεια της μεμβράνης μέσω της μικροκυστιδιοποίησης, οδηγεί σε σκληρότερα, λιγότερο εύκαμπτα κύτταρα, που δεν μπορούν να περάσουν με την ίδια ευκολία μέσα από τα τριχοειδή αγγεία [3]. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μετά από αποθήκευση, διεισδύουν σε μικρότερο βάθος σε τεχνητά, λεπτά τριχοειδή και διαπερνούν λιγότερα μικροαγγεία, όπως παρατηρήθηκε σε *survival* μικροσκόπηση⁶¹. Η

⁵⁸ Το GTP συμμετέχει στη μεταφορά ενέργειας εντός του κυττάρου, καθώς χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας για τη σύνθεση των πρωτεϊνών και τη γλυκονογένεση.

⁵⁹ Οι αμινοφωσφολιπιδικές τρανσλοκάσες μεταφέρουν φωσφατιδυλοσερίνη και φωσφατιδυλεθανολαμίνη από τη μία πλευρά της διπλοστιβάδας στην άλλη.

⁶⁰ Η τρανσγλουταμινάση (transglutaminase) είναι ένα ένζυμο, που σχηματίζεται με διάσπαση και ενεργοποίηση της προτρανσγλουταμινάσης και σταθεροποιεί τους ομοιοπολικούς δεσμούς του ινώδους. Είναι η ενεργοποιημένη μορφή του παράγοντα πήξης XIII.

⁶¹ Η *survival* χρώση είναι μια μέθοδος χρώσης που χρησιμοποιείται στη μικροσκόπηση για την εξέταση ζωντανών κυττάρων που έχουν αφαιρεθεί από έναν οργανισμό.

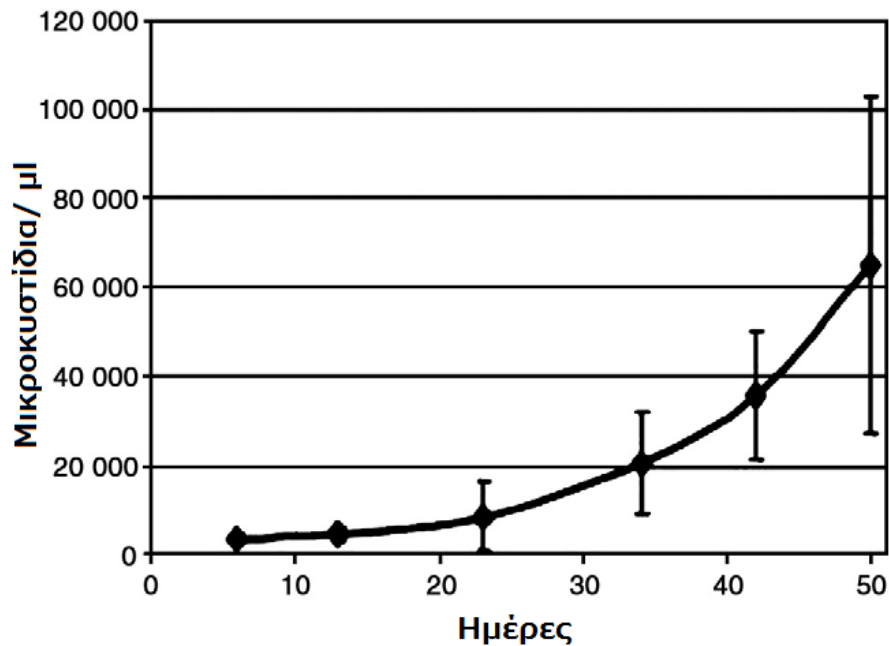
ερμηνεία αυτών των παρατηρήσεων δυσκολεύει, καθώς αυτές οι μορφολογικές αλλαγές είναι, σε μεγάλο βαθμό, αναστρέψιμες με αναζωογόνηση των ερυθροκυττάρων και αποτρέψιμες με χρήση σχετικά καλύτερων συστημάτων αποθήκευσης. Τα ερυθροκύτταρα φαίνεται πως μπορούν να αντισταθμίσουν τις επιπτώσεις της αποθήκευσης όταν το pH επιστρέψει σε φυσιολογικές τιμές και η συγκέντρωση του ATP φτάσει και παραμείνει στα αναγκαία και επιθυμητά επίπεδα [8].

Κάποιες μεταβολές όμως, είναι μη αναστρέψιμες. Η απώλεια μεμβράνης είναι μια τέτοια μεταβολή, καθώς αν συμβεί, το κύτταρο δεν μπορεί να αναπληρώσει τη χαμένη μεμβράνη. Όσο παρατείνεται ο χρόνος της αποθήκευσης, τόσο περισσότερα μικροκυτίδια δημιουργούνται και συνεπώς, η απώλεια μεμβράνης διαρκώς αυξάνεται (Εικόνα 9). Όταν τα λευκά αιμοσφαίρια που υπάρχουν μέσα στο αποθηκευμένο αίμα σπάσουν, απελευθερώνουν ένζυμα που περιέχουν γλυκοσιδάσες⁶², λιπάσες⁶³ και πρωτεάσες⁶⁴. Τα ένζυμα αυτά επιτίθενται στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αφαιρώντας ανοσοπροστατευτικά σάκχαρα, αποαλκυλιωτικά λιπίδια και διασπώντας πρωτεΐνες [8, 33]. Η λευκαφαίρεση πριν την αποθήκευση μπορεί να αποτελέσει λύση πρόληψης αυτών των βλαβών και να βελτιώσει την ποιότητα των προς αποθήκευση ερυθροκυττάρων, αυξάνοντας την μετά τη μετάγγιση επιβίωσή τους και μειώνοντας την αιμόλυση [8]. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν τη λευκαφαίρεση του αίματος που προορίζεται για αποθήκευση, έναντι της αποθήκευσης μη λευκαφαιρεμένου ολικού αίματος. Σε λευκαφαιρεμένα συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια (ΣΕ), δε βρέθηκε αξιοσημείωτη παραμόρφωση στα ερυθροκύτταρα μετά από αποθήκευση 6 εβδομάδων [10, 34].

⁶² Ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των γλυκοζιδίων (γλυκοζίδιο: γλυκοσίδη, δηλαδή ένωση όπου ένα σάκχαρο ενώνεται με ένα οργανικό μόριο, όπου το σάκχαρο είναι γλυκόζη). Χωρίζονται σε α και β γλυκοσιδάσες.

⁶³ Ένζυμα που διασπούν τα λίπη.

⁶⁴ Ένζυμα που διασπούν τις πρωτεΐνες.



Εικόνα 9: Η αύξηση της συγκέντρωσης των μικροκυστιδίων με το πέρασμα των ημερών, κατά την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων σε CPD-SAGM, στους 4°C [27].

3. 2. Μεταβολικές - Βιοχημικές μεταβολές

Ενώ οι μορφολογικές και δομικές αλλαγές παρατηρούνται στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, καθώς ο χρόνος της αποθήκευσης προάγεται, στο εσωτερικό των κυττάρων έχουμε μεταβολικές και βιοχημικές μεταβολές. Οι μεταβολικές αλλαγές που απαντώνται κατά την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων είναι αυτές που έχουν μελετηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό, και αφορούν μειώσεις σε ενζυμικές και ενεργειακές συγκεντρώσεις, οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργία των κυττάρων [10].

Ο καλύτερος μεταβολικός δείκτης για την *in vivo* ανάκτηση/ επιβίωση των ερυθροκυττάρων, θεωρείται πως είναι η συγκέντρωση του ATP σε αυτά, το οποίο (ATP) παράγεται μέσω της γλυκόλυσης⁶⁵ [3, 8]. Η διαδικασία της γλυκόλυσης αποτελεί τη μοναδική πηγή ενέργειας για τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Κατά την πραγματοποίησή της, έχουμε διάσπαση γλυκόζης προς δημιουργία ATP και, ως

⁶⁵ Η γλυκόλυση (σύμφωνα με το νόμο των Embden-Meyerhof) είναι η μετατροπή ενός μορίου γλυκόζης, υπό αναερόβιες συνθήκες, σε δύο μόρια γαλακτικού οξέος, με ταυτόχρονη παροχή της ενέργειας σε μορφή ATP.

αποτέλεσμα, παραγωγή λακτικού οξέος⁶⁶ και πρωτονίων⁶⁷. Τα πρωτόνια που συσσωρεύονται κάνουν το διάλυμα αποθήκευσης όλο και πιο όξινο, επιβραδύνοντας τη γλυκόλυση, μέσω της αναστολής της λειτουργίας της φωσφοφρουκτοκινάσης (phosphofructokinase, PFK)⁶⁸. Έτσι, με την πάροδο του χρόνου, η παραγωγή ATP κατά την αποθήκευση μειώνεται συνεχώς [3, 8].

Η γλυκόλυση επηρεάζεται επίσης και από τη θερμοκρασία, καθώς σε θερμοκρασία 3°C πραγματοποιείται δέκα φορές πιο αργά, από ότι σε θερμοκρασία 25°C [8]. Όταν τα ερυθροκύτταρα αποθηκεύονται σε CPD στους 4°C για 35 ημέρες, καταναλώνουν σχετικά λίγη γλυκόζη (περίπου 3mmol) και παράγουν 6mmol πρωτονίων, που μειώνουν το pH του διαλύματος. Ο μεταβολισμός τελικά σταματά όταν το pH στον ασκό φτάσει στο 6,4 [3]. Έτσι, έχει καθιερωθεί η αποθήκευση των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε θερμοκρασίες 1 – 6°C, ώστε να μην παγώνουν, κάτι που γίνεται στους -0,5°C, αλλά και να μην οδηγούνται σε ταχύτερη κατανάλωση και εξάντληση των αποθεμάτων θρεπτικών ουσιών, γεγονός που συμβαίνει σε αυξημένες θερμοκρασίες [8].

Από τη θερμοκρασία εξαρτάται και η λειτουργία της αντλίας Na⁺/K⁺ στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, η οποία είναι εξαρτημένη και από τη συγκέντρωση ATP [8]. Σε θερμοκρασία 4°C, η αντλία Na⁺/K⁺ απενεργοποιείται, έχοντας ως αποτέλεσμα εισροή Na⁺ στα ερυθροκύτταρα και μεγάλη απώλεια K⁺ στο διάλυμα αποθήκευσης [27, 35]. Το K⁺ δεν μπορεί να επανεισχωρήσει στο κύτταρο και έτσι η συγκέντρωση του καλίου στον εξωκυττάριο χώρο (στο μέσο αποθήκευσης του ασκού) αυξάνεται με ρυθμό περίπου 1mEq την ημέρα [3, 8]. Μετά τη μετάγγιση του αποθηκευμένου αίματος, συνήθως χρειάζονται 24 ώρες για την ανάκτηση της φυσιολογικής συγκέντρωσης Na⁺ μέσα στο ερυθροκύτταρο, ενώ

⁶⁶ Το γαλακτικό οξύ ή 2-υδροξυπροπανικό οξύ ή α-υδροξυπροπανικό οξύ, είναι μια χημική ένωση που έχει σημαντικό ρόλο σε αρκετές βιοχημικές διεργασίες. Το φυσικό L-γαλακτικό οξύ, βρίσκεται ως κανονικό συστατικό των μυών. Σχηματίζεται κατά τη ζύμωση του γλυκογόνου (γλυκόλυση).

⁶⁷ Είναι θετικά φορτισμένα υποατομικά σωματίδια (νουκλεόνια) που συνθέτουν, μαζί με άλλα υποατομικά σωματίδια, τον πυρήνα.

⁶⁸ Η φωσφοφρουκτοκινάση είναι μία κινάση, δηλαδή ένζυμο που καταλύει τη μεταφορά φωσφορικής ομάδας και συγκεκριμένα φωσφορυλιώνει τη φωσφορική-6 φρουκτόζη κατά τη γλυκόλυση.

η ομαλοποίηση των επιπέδων του K^+ μπορεί να διαρκέσει έως και 5 ημέρες [27]. Μετάγγιση μακροχρονίως αποθηκευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων, με υψηλές συγκεντρώσεις K^+ εξωκυτταρικά, εάν μεταγγιστούν με γρήγορο ρυθμό ροής σε κύρια αγγεία, ή χρησιμοποιηθούν σε ασθενείς με καρδιακά προβλήματα, ή και μετά από bypass (αορτοστεφανιαία παράκαμψη/ μπάι-πας)⁶⁹, μπορούν να προκαλέσουν αρρυθμία⁷⁰ ή και αιφνίδιο θάνατο [3, 8]. Επικίνδυνη χαρακτηρίζεται μια τέτοια μετάγγιση και σε νεογνά [27].

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια συλλέγονται από φλεβικό αίμα με pH περίπου 7,35 και αποθηκεύονται σε διάλυμα CPD, με pH 5,5 – 5,8. Το ελαιώρημα που προκύπτει έχει pH γύρω στο 7,1, αν και το pH μπορεί να εξαρτάται, λίγο ή πολύ, από τη συγκέντρωση της Hb και τον όγκο του αίματος του δότη, αλλά και από την κατάσταση του δότη κατά την αιμοδοσία (εάν ήταν ήρεμος και ανέπνεε φυσιολογικά, προς αποφυγή υπεραερισμού) [8]. Στο pH αυτό, η εξαρτώμενη από το pH αναστολή της φωσφοφρουκτοκινάσης, αυξάνει την ποσότητα της 6-φωσφορικής γλυκόζης (βασικό ενδιάμεσο που σχηματίζεται από τη γλυκόζη και το ATP κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού της γλυκόζης), η οποία είναι διαθέσιμη για τη μετατροπή της φωσφορικής πεντόζης⁷¹ και τη διατήρηση της αντιοξειδωτικής γλουταθειόνης (glutathione, GSH)⁷² σε υψηλές συγκεντρώσεις [8]. Έτσι, η αναστολή της φωσφοφρουκτοκινάσης καθυστερεί τη γλυκόλυση, που σε συνδυασμό με τη χαμηλή θερμοκρασία, οδηγούν σε περαιτέρω μείωση του pH. Αν το pH φτάσει στο 6,4 ο μεταβολισμός μειώνεται [3].

⁶⁹ Η αορτοστεφανιαία παράκαμψη (bypass) είναι μια επέμβαση, η οποία βοηθάει στη βελτίωση της ροής του αίματος στις στεφανιαίες αρτηρίες της καρδιάς στα άτομα με σοβαρή στεφανιαία νόσο.

⁷⁰ Η καρδιά, φυσιολογικά, διεγείρεται από τον φλεβόκομβο. Το ερέθισμα μετά διαχέεται στους κόλπους και τους ερεθίζει (κολπική συστολή). Μετά μέσω του κολποκοιλιακού κόμβου διαχέεται στις κοιλίες που τις διεγείρει και αυτές (κοιλιακή συστολή). Εάν για κάποια αιτία αυτή η ρυθμική διέγερση της καρδιάς διακοπεί, λέμε ότι εμφανίζεται αρρυθμία.

⁷¹ Τα ένζυμα της οδού της φωσφορικής πεντόζης, είναι αντιοξειδωτικά ένζυμα. Καταλύουν τις βιοχημικές αντιδράσεις της μεταβολικής οδού της φωσφορικής πεντόζης, η οποία αποτελεί την κύρια ενδοκυττάρια πηγή της NADPH.

⁷² Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο με πολλαπλές λειτουργίες. Έχει σημασία για το μεταβολισμό του σιδήρου και είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό. Όμως δεν είναι απαραίτητο θρεπτικό συστατικό δεδομένου ότι μπορεί να συντεθεί στο σώμα από τα αμινοξέα L-κυστεΐνη, L-γλουταμινικό οξύ και γλυκίνη.

Η αποθήκευση του αίματος σε όξινο διάλυμα CPD ευνοεί την αποδόμηση του 2,3-DPG, κάτι που οδηγεί σε αρχική έκρηξη παραγωγής ATP, κατά τις πρώτες 10 ημέρες της αποθήκευσης [3, 8]. Το 2,3-DPG μέσα σε μία με δύο εβδομάδες μειώνεται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα [3, 10, 27]. Το 2,3-DPG είναι ο μεταβολίτης⁷³ και ο ενζυμικός ρυθμιστής της Hb, που συνδέεται σε αυτή και ρυθμίζει τη συγγένειά της με το O₂ και κατ' επέκταση, την απελευθέρωση του O₂ στους ιστούς. Υψηλές συγκεντρώσεις 2,3-DPG ευνοούν την απελευθέρωση του οξυγόνου από την Hb, ενώ αντίθετα, χαμηλές συγκεντρώσεις αυξάνουν τη συγγένεια της Hb με το O₂, δηλαδή ουσιαστικά, δεν το αφήνει εύκολα να αποδεσμευθεί από αυτή. Έτσι, η εξαφάνιση του 2,3-DPG από τα ερυθροκύτταρα μειώνει την ικανότητα της Hb να μεταφέρει και να διανέμει O₂, κυρίως στους περιφερικούς ιστούς [10, 27]. Σε ερυθρά αιμοσφαίρια με έλλειψη του 2,3-DPG, η επαναφορά του σε φυσιολογικά επίπεδα πραγματοποιείται μέσα σε 72 ώρες από τη μετάγγισή τους, ενώ δε φαίνεται να έχει παρατηρηθεί κάποια μη αναστρέψιμη επίδραση στη λειτουργία των κυττάρων [10]. Πιο συγκεκριμένα, ο ρυθμός ανάκτησης των φυσιολογικών επιπέδων 2,3-DPG μετά από μετάγγιση, τυπικά είναι 25-30% μετά από μια ώρα, 50% μετά από 24 ώρες και 100% μετά από 72 ώρες [27]. Λαμβάνοντας υπ' όψιν την καθυστέρηση της πλήρους ανάκτησης της ιδανικής ενζυμικής λειτουργίας και της σωστής μεταφοράς και εναπόθεσης O₂ στον περιφερικό ιστό, η επιθυμητή αύξηση της διανομής O₂ μετά από μετάγγιση, δεν είναι άμεση, αλλά πιθανώς καθυστερεί μέχρι τα επίπεδα 2,3-DPG να ομαλοποιηθούν ενδοκυτταρικά [10].

Το ATP δεν αποτελεί μόνο ενδοκυτταρική πηγή ενέργειας για το κύτταρο. Τελευταίες μελέτες το συνδέουν με αγγειοδιαστολή. Σε στρεσογόνες συνθήκες ή συνθήκες υποξίας⁷⁴, τα ερυθροκύτταρα εκκρίνουν ATP. Με τη σειρά του, το αγγειακό ενδοθήλιο⁷⁵ εκκρίνει νιτρικό οξείδιο ή μονοξείδιο του αζώτου (nitric

⁷³ Όλες οι μεταβολικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε διάφορα χρονικά στάδια, όπου δημιουργούνται ή διασπώνται βαθμιαία χημικές ενώσεις. Το τελικό προϊόν κάθε τέτοιας αντίδρασης ονομάζεται μεταβολίτης.

⁷⁴ Είναι παθολογική κατάσταση κατά την οποία είτε το σώμα ως σύνολο (γενικευμένη/ generalized υποξία), είτε μία περιφέρεια του οργανισμού (υποξία ιστών) στερείται επαρκούς οξυγόνωσης.

⁷⁵ Το ενδοθήλιο αποτελεί τον εσωτερικό από τους τρεις χιτώνες του τοιχώματος των αγγείων. Επιπλέον, με τη βοήθεια ενός μεγάλου αριθμού ουσιών που παράγει, διαδραματίζει κεντρικό ρόλο τόσο στη ρύθμιση της κινητικότητας των αγγείων, όσο και στον τρόπο που αυτά αλληλεπιδρούν με τα συστατικά του αίματος.

oxide, NO), το οποίο προκαλεί αγγειοδιαστολή [3, 10, 36]. Όταν τα επίπεδα του ATP ελαττώνονται κατά την αποθήκευση, η ενεργή μεταφορά, οι αντιοξειδωτικές αντιδράσεις, η φωσφολιπιδική κατανομή στη μεμβράνη, αλλά και άλλες κυτταρικές λειτουργίες που απαιτούν ενέργεια, μειώνονται. Αυτό κάνει το κύτταρο πιο ευαίσθητο και ευπαθές σε ένα στρεσογόνο περιβάλλον. Μελέτες έχουν δείξει πως σε διαστήματα αποθήκευσης άνω των πέντε εβδομάδων, η μείωση του ATP ενδοκυτταρικά φτάνει το 60% [10, 36]. Αυξάνοντας τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του ATP φαίνεται πως αυξάνεται η ικανότητα οξυγόνωσης, υποδηλώνοντας ότι η συγκέντρωση του ATP (και έμμεσα ο χρόνος αποθήκευσης), επηρεάζει την ικανότητα μεταφοράς και διανομής O₂ [10, 34].

Σε καταστάσεις στρες ή υποξίας, τα ερυθροκύτταρα αποκρίνονται με έκκριση ATP, που οδηγεί στην έκκριση NO από το ενδοθήλιο των αγγείων, προκαλώντας αγγειοδιαστολή, για να καλυφθούν οι ανάγκες σε O₂ [3, 10, 27, 36]. Το NO αντιδρά με την Hb, νιτροζυλιώνοντας (nitrosylate)⁷⁶ την β-93 Cys (β-93 cysteine, β-93 κυστεΐνη)⁷⁷, οδηγώντας έτσι στην παραγωγή SNO-Hb (S-nitrosothiol-haemoglobin). Όταν η SNO-Hb αποξυγονώνεται (deoxygenated), ελευθερώνει NO γρηγορότερα, πιθανώς επιτρέποντάς του να ασκήσει την επίδρασή του στο ενδοθήλιο [3]. Η παρατήρηση πως η SNO-Hb αυξάνεται στην αρτηριακή ροή και μειώνεται στη φλεβική, οδήγησε στη βásiμη υπόθεση πως η SNO-Hb εμπλέκεται στην παραγωγή NO από τα ερυθροκύτταρα [27]. Αν και κάποιες έρευνες διαφωνούν με την υπόθεση αυτή [37], υπάρχει σχετική ομοφωνία στο ότι η SNO-Hb παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία NO από τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Την ίδια στιγμή, υπάρχουν σαφείς αποδείξεις πως τα επίπεδα της SNO-Hb μειώνονται ραγδαία κατά τις πρώτες ημέρες της αποθήκευσης (μόλις την 3^η ημέρα τα επίπεδα της είναι πλέον μη ανιχνεύσιμα [3]), και πως η μείωση αυτή της SNO-Hb σχετίζεται

⁷⁶ Νιτροζυλίωση είναι η προσθήκη ενός ιόντος NO⁻ σε ένα μέταλλο (π.χ. σίδηρο, οδηγώντας στο σχηματισμό νιτροζυλιωμένου σιδήρου (Fe-NO)).

⁷⁷ Η κυστεΐνες (cysteines) είναι βιολογικά σημαντικά αμινοξέα, τα οποία μπορούν να συντεθούν στον ανθρώπινο οργανισμό (βιοσυντιθέμενα). Λόγω της θειόλης που έχουν στην αλυσίδα τους, συμμετέχουν συχνά σε ενζυμικές αντιδράσεις. Επίσης, η θειόλη οξειδώνεται εύκολα, οδηγώντας στη δημιουργία κυστίνης, που παίζει σημαντικό δομικό ρόλο σε πολλές πρωτεΐνες.

με απώλεια της αγγειοδιασταλτικής δραστηριότητας των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων, κάτι που αποτελεί απάντηση στη μειωμένη pO_2 (πίεση O_2). Η SNO-Hb, παρόλα αυτά, επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα στην κυκλοφορία μόλις μερικές ώρες μετά τη μετάγγιση. Επίσης, φαίνεται πως η συμμετοχή της SNO-Hb δεν είναι απαραίτητη για την εξαρτώμενη από τα ερυθροκύτταρα υποξική αγγειοδιαστολή [38].

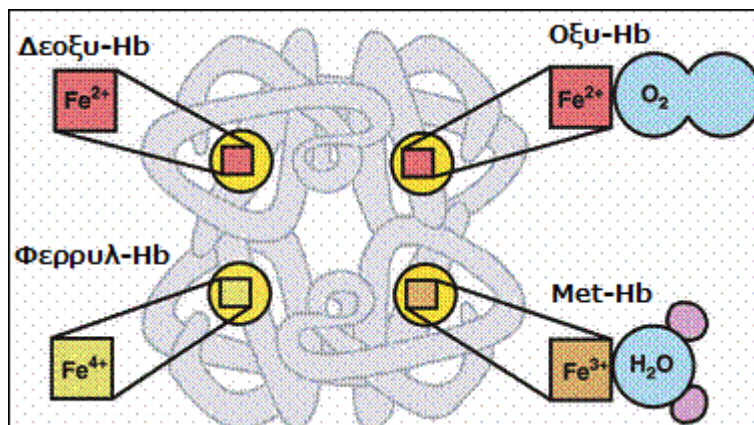
3. 3. Οξειδωτική βλάβη

Κατά την αποθήκευση, η οξειδωτική βλάβη σε λιπίδια και πρωτεΐνες συμβάλλει σε βλάβες στα ερυθροκύτταρα [3, 8]. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που συλλέγονται από φλεβικό αίμα έχουν περίπου 75% κορεσμό σε O_2 . Μόρια O_2 φεύγουν συνεχώς από τα σιδηρούχα (Fe^{2+}) μόρια Hb (Εικόνα 10), μπαίνουν στο διάλυμα και στη συνέχεια συνδέονται με άλλα μόρια Hb. Μερικές φορές, το O_2 κατά τον αποχωρισμό του παίρνει μαζί του ηλεκτρόνια⁷⁸ από την αίμη⁷⁹, μετατρέποντας την Hb στην οποία προσδένονται, σε σιδηρική/ τρισθενή (Fe^{3+}) μεθαιμοσφαιρίνη (methemoglobin, met-Hb)⁸⁰ (Εικόνα 10) και παράγοντας ρίζες υπεροξειδίου [3].

⁷⁸ Τα ηλεκτρόνια (e) είναι σωματίδια με αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο, με μάζα περίπου κατά 1800 φορές μικρότερη από τη μάζα των νουκλεονίων. Έχουν ίσο και αντίθετο φορτίο από αυτό των πρωτονίων, κινούνται σε καθορισμένες από την κβαντική θεωρία τροχιές, τάξης μεγέθους 10^{-8} cm και είναι ισάριθμα με τα πρωτόνια του πυρήνα, ώστε το άτομο να εμφανίζεται ηλεκτρικά ουδέτερο.

⁷⁹ Τέσσερις μονάδες αίμης ενώνονται με τις σφαιρινικές αλυσίδες για να δημιουργήσουν το μόριο της Hb. Τα κυριότερα όργανα σύνθεσης της αίμης (ως συστατικό της Hb) είναι ο μυελός των οστών και το ήπαρ, ενώ μικρότερα ποσά συνθέτουν και πολλά άλλα όργανα. Όλα τα κύτταρα της ερυθράς σειράς συνθέτουν αίμη, εκτός από τα ώριμα ερυθροκύτταρα.

⁸⁰ Η μεθαιμοσφαιρίνη σχηματίζεται από μια ήπια οξείδωση, στην οποία ο σίδηρος στις ομάδες της αίμης γίνεται τρισθενής. Σε αυτή τη μορφή δεν μπορεί να δεσμεύσει O_2 και λειτουργικά είναι άχρηστη. Περίπου το 0,5-3% της ολικής Hb μετατρέπεται καθημερινά σε μεθαιμοσφαιρίνη.



Εικόνα 10: Διαφορετικές καταστάσεις οξείδωσης του σιδήρου της αίμης. Καθεμιά από τις τέσσερις αλυσίδες σφαιρίνης του μορίου της Hb περιέχει μια ομάδα αίμης με ένα άτομο σιδήρου στο κέντρο του. Η οξείδωση της Hb μπορεί να περιλαμβάνει αλλαγές στην οξειδωτική κατάσταση του σιδήρου και συνεπώς, μετατροπές στη συνδεσιμότητά του. Η σιδηρούχα μορφή (Fe^{2+} , κόκκινο χρώμα) επιτρέπει τη σύνδεση του οξυγόνου (O_2) στη δεοξυαιμοσφαιρίνη (δεοξυ-Hb) (μορφή T) σε φυσιολογικές συνθήκες. Η προκύπτουσα οξυγονωμένη Hb (οξυ-Hb) (μορφή R) μπορεί να οξειδωθεί σε μεθαιμοσφαιρίνη (met-Hb), στην οποία ο σίδηρος της αίμης βρίσκεται στη σιδηρική του μορφή (Fe^{3+} , καφέ χρώμα). Η met-Hb μπορεί να δεσμεύσει νερό (H_2O), όχι όμως O_2 κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Η φερρυλική μορφή (Fe^{4+} , πράσινο χρώμα) (φερρυλ-Hb) μπορεί να αποκτηθεί μετά από οξείδωση της Hb με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και μπορεί να οδηγήσει σε μετουσίωση της Hb [39].

Σε φυσιολογικές καταστάσεις, η δισμουτάση του υπεροξειδίου (superoxide dismutase, SOD) και η ρεδοκτάση της μεθαιμοσφαιρίνης (ενζυματικοί εκκαθαριστές που δρουν καταλύοντας τη διάσπαση των οξειδωτικών και των ελεύθερων ριζών), που βρίσκονται στα ερυθρά αιμοσφαίρια, επιδιορθώνουν γρήγορα το πρόβλημα. Παρόλα αυτά, όσο αυξάνεται ο χρόνος αποθήκευσης, η ροή μέσω της γλυκολυτικής οδού μειώνεται και η συγκέντρωση της γλουταθειόνης (ένας σημαντικός συμπαραγόντας των αντιδράσεων αυτών, επίσης ενζυμικός εκκαθαριστής) ελαττώνεται. Έτσι, οι βλάβες εξακολουθούν να υφίστανται, καθώς αυξάνονται οι πιθανότητες ρίζες υπεροξειδίου και νερό να συναντηθούν παρουσία

ελεύθερου σιδήρου ή αίμης, ώστε μέσω της αντίδρασης Fenton⁸¹ (Αντιδράσεις 1 & 2) να δημιουργηθούν ρίζες υδροξυλίου και ιόντα υπεροξειδίου [40, 41].



Αντίδραση 1



Αντίδραση 2

Οι ρίζες υδροξυλίου και τα ιόντα υπεροξειδίου που προκύπτουν, μπορούν να προκαλέσουν με τη σειρά τους, λιπόλυση φωσφολιπιδίων, υπεροξειδωση λιπιδίων και βλάβες σε υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Οι βλάβες που παρατηρούνται, μπορεί να είναι ακίνδυνες, όπως η οξειδωτική δέσμευση της γλυκόζης στην Hb προς δημιουργία γλυκοζυλιωμένης Hb (hemoglobin A1c, HbA1c)⁸², ή και πιο σοβαρές, όπως οι οξειδωτικές βλάβες στην πρωτεΐνη-ζώνη 3, που οδηγούν σε σχηματισμό νεοαντιγόνων και εκκαθάριση ερυθρών αιμοσφαιρίων [3, 8]. Οξειδωτικές βλάβες στα λιπίδια έχουν ως πιθανά αποτελέσματα το σύνδρομο οξείας βλάβης των πνευμόνων από μετάγγιση (transfusion related acute lung injury, TRALI)⁸³ και θρομβωτικά επεισόδια [3, 8, 42]. Εκτός από τα οξειδωμένα λιπίδια στα ερυθροκύτταρα, τα μικροκυστίδια που δημιουργούνται για την απομάκρυνσή τους, συμβάλλουν επίσης σε μεγάλο βαθμό στον κίνδυνο θρομβωτικών επεισοδίων μετά τη μετάγγιση [8].

⁸¹ Είναι μια προχωρημένη διαδικασία οξείδωσης, που βασίζεται στη δημιουργία των δραστικών ριζών του υδροξυλίου (OH[·]).

⁸² Η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη προέρχεται από τη χημική ένωση της αιμοσφαιρίνης με τη γλυκόζη. Η αντίδραση λέγεται μη ενζυματική γλυκοζυλίωση (γιατί λαμβάνει χώρα χωρίς την παρουσία ενζύμου) και συμβαίνει σε όλο το χρόνο ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

⁸³ Η οξεία πνευμονική βλάβη που σχετίζεται με τη μετάγγιση είναι σπάνια και εκδηλώνεται με έντονη αναπνευστική δυσχέρεια, υποξαιμία, υπόταση και πυρετό, λίγες ώρες μετά τη μετάγγιση (συγχέεται συχνά με εικόνα καρδιακής κάμψης). Οφείλεται σε αντι-HLA ή αντιουδετεροφιλικά αντισώματα στο αίμα του δότη κυρίως, και σπάνια του ασθενούς. Απαιτεί εντατική θεραπεία με χορήγηση O₂, κορτικοστεροειδών και μηχανική υποστήριξη της αναπνοής.

Παρόλα αυτά, συνήθως, όλες αυτές οι οξειδωτικές μεταβολές συμβαίνουν στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα σε μικρότερο βαθμό από ότι σε κύτταρα μέσα στον οργανισμό, λόγω της χαμηλότερης θερμοκρασίας. Επίσης, καθώς η αποθήκευση των ερυθροκυττάρων διαρκεί έως 42 ημέρες σε CPD-SAGM, διάστημα μικρό σε σχέση με το χρόνο ζωής τους στον οργανισμό, που είναι 120 ημέρες, το οξειδωτικό στρες που συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης θεωρείται πως είναι σχετικά μικρό. Το πρόβλημα όμως φαίνεται πως έγκειται στο γεγονός, ότι όλο αυτό το φορτίο στρες μεταφέρεται στον οργανισμό συσσωρευμένο και όλο μαζί κατά τη μετάγγιση, και σε περίπτωση μαζικής μετάγγισης μάλιστα, επαναλαμβανόμενα [8].

3. 4. Μεταφορά και απελευθέρωση οξυγόνου

Μια από τις κύριες λειτουργίες των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι να μεταφέρουν O_2 από τους πνεύμονες στους ιστούς. Το O_2 περνά από τις κυψελίδες⁸⁴ μέσα στα πνευμονικά τριχοειδή, δεσμεύεται στην Hb των ερυθροκυττάρων, διαλύεται στο πλάσμα και μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στο δίκτυο των τριχοειδών αγγείων, όπου αποδεσμεύεται από την Hb και διαπερνώντας τα τοιχώματα των τριχοειδών, των προτριχοειδικών αρτηριδίων⁸⁵ και των τριχοειδών φλεβίων, φτάνει στα κύτταρα των ιστών. Για να διατηρηθεί η ικανοποιητική αιμάτωση του δικτύου των τριχοειδών, το ερυθροκύτταρο θα πρέπει να είναι ικανό να παραμορφώνεται συνεχώς σε φυσιολογικά υψηλές τιμές αιματοκρίτη (hematocrite, Hct)⁸⁶, κάτω από διάφορες καταστάσεις και σε αγγεία με διαμέτρους από 3-8 μm (τριχοειδή) έως 50-100 μm (αρτηρίδια και φλεβίδια). Η διατήρηση της ικανότητας των ερυθροκυττάρων να παραμορφώνονται σε τέτοιες περιπτώσεις είναι επομένως κρίσιμη για τη σωστή

⁸⁴ Οι διακλαδώσεις των βρόγχων καταλήγουν στις κυψελίδες των πνευμόνων, όπου γίνεται η ανταλλαγή των αερίων.

⁸⁵ Αρτηρίδια είναι οι μικρότεροι κλάδοι του αρτηριακού δένδρου. Η διάμετρός τους κυμαίνεται από 30-400 μm .

⁸⁶ Αιματοκρίτης (Hct) καλείται η εκατοστιαία αναλογία του όγκου των έμμορφων συστατικών (δηλαδή, πλειοψηφικά, των ερυθρών αιμοσφαιρίων), προς το συνολικό όγκο του αίματος.

λειτουργία των ερυθροκυττάρων, και συνεπώς για τη μεταφορά και διανομή του O_2 [38].

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν επίσης να «αντιληφθούν» την κατάσταση οξυγόνωσης των τοπικών ιστών και να ρυθμίσουν έτσι τη μεταφορά και την απελευθέρωση O_2 , ρυθμίζοντας την τοπική κυκλοφορία του αίματος στο δίκτυο των τριχοειδών, μέσω τριών πιθανών μηχανισμών στους οποίους μεσολαβεί το NO. Οι τρεις αυτοί μηχανισμοί είναι οι εξής: α) απελευθέρωση ATP, ώστε να προκληθεί η παραγωγή NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τοιχωμάτων των αγγείων, β) απελευθέρωση NO από SNO-Hb, μετά από αποξυγόνωση της Hb, και γ) μετατροπή των νιτρικών (NO_2^-) που βρίσκονται στην κυκλοφορία σε NO, από τη δεοξυαιμοσφαιρίνη (δεοξυ-Hb) ⁸⁷ (Εικόνα 10). Τα αγγεία διαστέλλονται ανταποκρινόμενα στην απελευθέρωση του NO, μεταβάλλοντας το ρυθμό της κυκλοφορίας του αίματος. Έτσι, οποιαδήποτε μεταβολή στους μηχανισμούς αυτούς μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην οξυγόνωση, αν και λόγω της πολυπλοκότητας και της συμμετοχής πολλών διαφορετικών μηχανισμών στις διαδικασίες αυτές, οι αλλαγές που επέρχονται επηρεάζουν ελάχιστα ή και καθόλου την τελική μεταφορά του O_2 και την οξυγόνωση [38].

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το 2,3-DPG βρίσκεται μέσα στα ερυθροκύτταρα με αναλογία λίγο πάνω από ένα μόριο 2,3-DPG για κάθε τετραμερές Hb. Στη δεοξυαιμοσφαιρίνη, η κεντρική κοιλότητα που φυσιολογικά παρατηρείται στη μορφολογία του τετραμερούς μεγαλώνει, επιτρέποντας στο 2,3-DPG να εισέλθει σε αυτό και να σταθεροποιήσει τη δεόξυ μορφή της (δεοξυ-Hb). Η διαδικασία αυτή με τη σειρά της μεταβάλλει την ισορροπία της δέσμευσης του O_2 , αυξάνοντας το P50⁸⁸ [8]. Άρα, καθώς το 2,3-DPG χάνεται κατά την αποθήκευση, το P50 μειώνεται, κάτι που σημαίνει πως το O_2 συνδέεται πιο ισχυρά και άρα

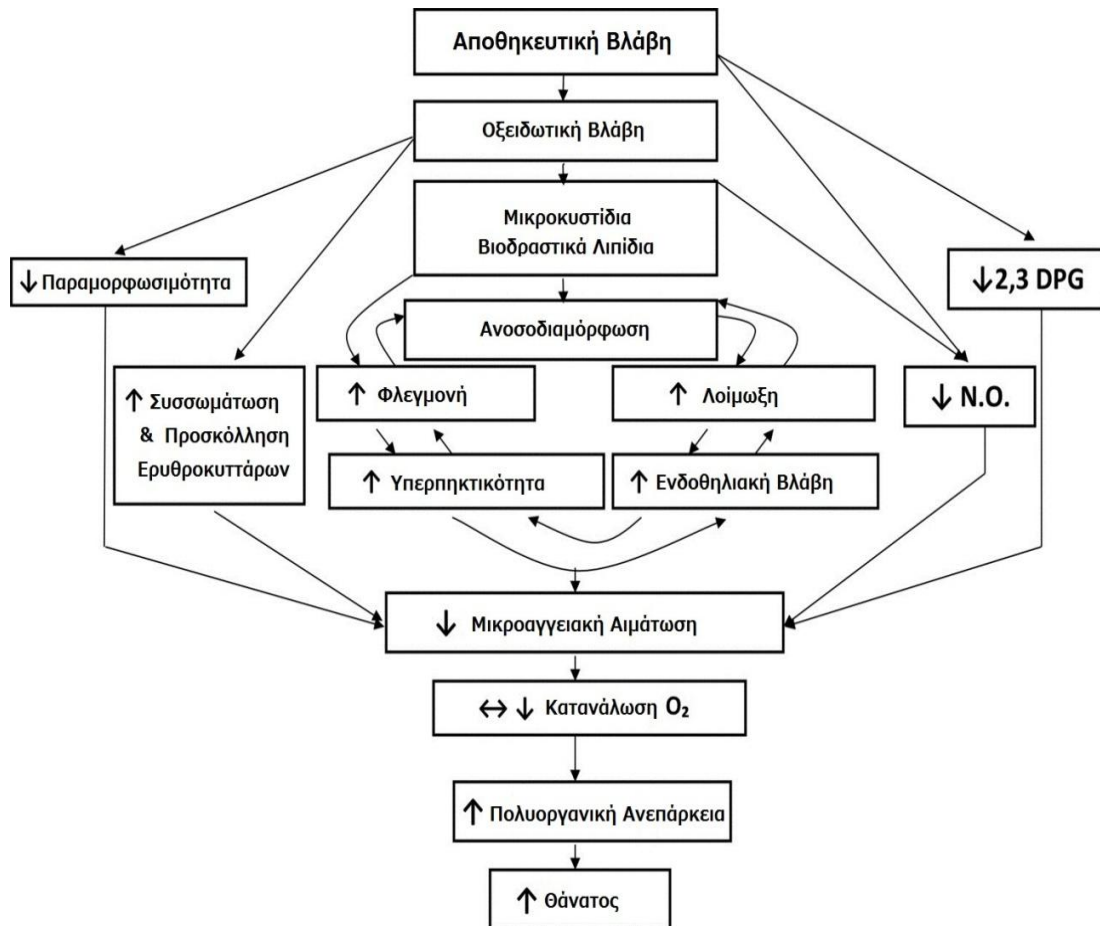
⁸⁷ Στις δύο ακραίες μορφές της, η Hb, απαντάται ως δεοξυαιμοσφαιρίνη (δεοξυ-Hb), όταν δεν περιέχει κανένα μόριο O_2 , ή ως οξυαιμοσφαιρίνη (HbO₂), όταν περιέχει τέσσερα μόρια O_2 . Το άτομο του Fe^{2+} στη δεοξυαιμοσφαιρίνη βρίσκεται σε πεντασυναρμοσμένο σύμπλοκο (κατάσταση υψηλού spin), ενώ στην οξυαιμοσφαιρίνη βρίσκεται σε εξασυναρμοσμένο σύμπλοκο (κατάσταση χαμηλού spin).

⁸⁸ Είναι ένας δείκτης που υποδεικνύει την πίεση που είναι απαραίτητη ώστε ένα αέριο να επιτύχει 50% ενζυμικό κορεσμό. Η τιμή του P50 έχει αρνητικό συσχετισμό με τη συγγένεια, δηλαδή μείωση των τιμών του P50 αντικατοπτρίζεται σε αύξηση της συγγένειας, και το αντίστροφο.

αποδεδειγμένα δυσκολότερα ώστε να διατεθεί προς οξυγόνωση ιστών και οργάνων. Το γεγονός αυτό αποτελεί επιχείρημα που υπερασπίζεται τη σύνδεση των μειωμένων τιμών P50 με επιπλοκές στη μεταφορά O₂. Πιθανότατα κάτι τέτοιο ισχύει σε περιπτώσεις χαμηλών συγκεντρώσεων Hb ή σε ιστούς με κακή αιμάτωση. Παρόλα αυτά, φαίνεται πως η επίδραση της μεταβολής του P50 είναι αμελητέα στις περισσότερες καταστάσεις ή ακόμα και μηδαμινή [8].

Ερυθροκύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες φέρονται να προσκολλούνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μια διαδικασία που είναι πιο εμφανής σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία⁸⁹. Παρομοίως, αλλά σε μικρότερη έκταση, τέτοιου είδους συγκόλληση παρατηρείται και στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα. Όμως, παρόλο που η συγκόλληση κατά την αποθήκευση είναι ελαττωμένη, ο συνδυασμός της μετάγγισης αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων με άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις, που μπορεί να εμφανιστούν στους μεταγγιζόμενους ασθενείς, ίσως να έχει ανεπιθύμητα αποτελέσματα (Εικόνα 11) [8].

⁸⁹ Η δρεπανοκυτταρική αναιμία (drepanocytosis) είναι μια δια βίου διαταραχή του αίματος, η οποία χαρακτηρίζεται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια που λαμβάνουν ένα δρεπανοειδές σχήμα και γίνονται άκαμπτα. Η δρεπάνωση μειώνει την ευελιξία των κυττάρων και οδηγεί σε κίνδυνο εκδήλωσης διαφόρων επιπλοκών. Η δρεπάνωση παρουσιάζεται εξαιτίας μιας μετάλλαξης στο γονίδιο της Hb.



Εικόνα 11: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ερυθροκυττάρων του δότη και του μεταγγιζόμενου, μετά από μετάγγιση με αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια που έχουν υποστεί αποθηκευτικές βλάβες. Απεικονίζονται οι επιπτώσεις της αποθηκευτικής βλάβης στους αλληλοσυνδεόμενους μηχανισμούς της μεταφοράς O_2 , της ρεολογίας των ερυθροκυττάρων, της φυσιολογίας τους και τις ανοσολογικές απόκρισής τους [47].

3. 5. Επιμολύνσεις

Οι επιμολύνσεις οι οποίες πιθανώς παρατηρούνται στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα, είναι ένα κομμάτι των αποθηκευτικών βλαβών που έχει μείνει στο περιθώριο, κυρίως τα τελευταία χρόνια. Αυτό βέβαια, έχει συμβεί λόγω της πολύ καλής αντισηψίας και των άριστων συνθηκών αιμοδοσίας-αιμοληψίας, καθώς και των άρτιων συστημάτων λήψης και αποθήκευσης, που έχουν περιορίσει σε πολύ μεγάλο βαθμό το πρόβλημα, επιτρέποντας στους ερευνητές να στρέψουν το ενδιαφέρον τους σε ανεξερεύνητες πτυχές της αιμοδοσίας και των αποθηκευτικών βλαβών. Παρόλα αυτά, οι μολύνσεις που μεταφέρονται μέσω του αποθηκευμένου αίματος συνεχίζουν να είναι ένα σημαντικό ζήτημα για την υγεία του μεταγγιζόμενου [43, 44].

Από την εποχή που το αίμα αποθηκευόταν σε γυάλινα μπουκάλια, είχαν παρατηρηθεί περιπτώσεις σήψης⁹⁰ λόγω επιμολύνσεων. Με τη χρήση των κλειστών, στείρων συστημάτων λήψης και αποθήκευσης του αίματος, η παρατήρηση τέτοιων περιπτώσεων έχει μειωθεί δραστικά, δεν έχει όμως εξαλειφθεί. Ακόμα και μετά την εισαγωγή των πλαστικών ασκών, η μετάδοση βακτηρίων έχει παραμείνει σχετικά σταθερή, σε αντίθεση με την αξιοσημείωτη μείωση που παρατηρήθηκε σε μετάδοση ιών, όπως ο HIV (ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, human immunodeficiency virus)⁹¹, ο HBV (ιός της ηπατίτιδας Β, hepatitis B virus)⁹² και ο HCV (ιός της ηπατίτιδας C, hepatitis C virus)⁹³, λόγω του διεξοδικού ελέγχου για ιούς που πλέον πραγματοποιείται. Επί του παρόντος, τα

⁹⁰ Σήψη καλείται το σύνολο των μεταβολών στο μεταβολισμό και την αιμοδυναμική, που είναι αποτέλεσμα γενικευμένης φλεγμονώδους αντίδρασης του ανθρώπινου οργανισμού σε λοιμώδη παράγοντα (βακτήριο, ιό, μύκητα ή παράσιτο). Έχει συχνή κατάληξη το θάνατο μέσω ανεπάρκειας πολλών οργάνων (σύνδρομο πολυοργανικής ανεπάρκειας) και μη αναστρέψιμης πτώσης της αρτηριακής πίεσης (σηπτικό σοκ).

⁹¹ Προκαλεί το σύνδρομο της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS, acquired immune deficiency syndrome). Ανήκει στην κατηγορία των ρετροϊών, είναι δηλαδή RNA ιός. Μεταδίδεται μέσω του αίματος και με σεξουαλική επαφή.

⁹² Προκαλεί την ηπατίτιδα Β. Μεταδίδεται μέσω του αίματος και με σεξουαλική επαφή. Αναπαράγεται στα ηπατικά κύτταρα.

⁹³ Προκαλεί την ηπατίτιδα C. Είναι RNA ιός και μεταδίδεται με το αίμα. Εδρεύει κυρίως στα ηπατικά κύτταρα και στα λεμφοκύτταρα.

περιστατικά βακτηριακής σήψης αποτελούν μεγαλύτερη απειλή από τους μεταδιδόμενους, μέσω της μετάγγισης, ιούς [43, 44].

Ο οργανισμός FDA αναφέρει πως η βακτηριακή σήψη μετά από μετάγγιση είναι η τρίτη πιο συχνή αιτία, σχετιζόμενου με μετάγγιση, θανάτου [45]. Εδώ όμως, πρέπει να σημειωθεί, ότι οι περισσότερες περιπτώσεις βακτηριακής μόλυνσης αφορούν μετάγγιση αιμοπεταλίων και όχι μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων, καθώς η θερμοκρασία δωματίου στην οποία διατηρούνται τα αιμοπετάλια αποτελεί ευνοϊκό περιβάλλον ανάπτυξης για πολλά βακτήρια [44, 45]. Θανατηφόρα περιστατικά έχουν αναφερθεί να συμβαίνουν σε μία στις 50.000 – 500.000 μονάδες αιμοπεταλίων, ενώ στις μονάδες ΣΕ το ποσοστό ανέρχεται σε μία στις 8.000.000 μονάδες [44].

Τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα μπορούν να αποτελέσουν το υπόστρωμα για την ανάπτυξη κάποιων βακτηρίων, τα οποία, δεδομένων κατάλληλων συνθηκών, μπορούν να πολλαπλασιαστούν μέχρι να φτάσουν τον αριθμό των 10^8 βακτηρίων περίπου, αριθμός που είναι ικανός να προκαλέσει σηπτικό επεισόδιο στον ασθενή που θα μεταγγιστεί με τον ασκό. Ένα βακτήριο διαιρείται συνήθως μία φορά την ημέρα, άρα τυπικά χρειάζονται τουλάχιστον 19 ημέρες για να δημιουργηθούν 10^8 μικροοργανισμοί [8]. Τα περισσότερα όμως βακτήρια δεν αντέχουν στις χαμηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και δεν επιβιώνουν. Γι' αυτό και το μεγαλύτερο ποσοστό, περίπου 80%, των περιπτώσεων σήψεως που αναφέρονται αφορούν ψυχρόφιλους⁹⁴ μικροοργανισμούς, ή μικροοργανισμούς ικανούς να ζουν και να αναπτύσσονται σε συνθήκες ψυγείου [8, 44]. Οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται πιο συχνά σε περιστατικά σήψης από μετάγγιση ΣΕ είναι οι: *Yersinia enterocolitica* (46%), *Pseudomonas spp.* (25%), *Serratia spp.* (11%), με όλους τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς να καταλαμβάνουν το ποσοστό του 18% [44]. Γενικά, οι κατά

⁹⁴ Ψυχρόφιλοι ονομάζονται οι οργανισμοί που έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 20°C αλλά και σε ακόμα χαμηλότερες).

Gram αρνητικοί⁹⁵ μικροοργανισμοί εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό μόλυνσης ερυθροκυττάρων και έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό περιστατικών σήψης που οδήγησαν σε θάνατο, τόσο σε μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων, όσο και αιμοπεταλίων [43]. Ένας μικροοργανισμός που έχει συνδεθεί με θανατηφόρα περιστατικά σήψης από ασκό ερυθροκυττάρων, είναι η *Klebsiella pneumoniae*, η οποία, αν και είναι σπάνια στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα (αλλά πιο συχνή σε ασκούς αιμοπεταλίων), όταν εμφανίζεται έχει ως συχνότερη κατάληξη θανατηφόρα σήψη [44, 45]. Για την *Yersinia enterocolitica*, οι ασκοί ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελούν ιδανικό περιβάλλον, καθώς για να αναπτυχθεί χρησιμοποιεί κιτρικά άλατα και χρειάζεται πηγή σιδήρου, που οι ασκοί της παρέχουν σε αφθονία [44]. Υπάρχουν, όμως, ενδείξεις από μελέτες πως η λευκαφαίρεση πριν την αποθήκευση έχει την ικανότητα να εμποδίσει την ανάπτυξή της σε θερμοκρασίες 1-6°C. Πλέον, η αποτελεσματικότητα της λευκαφαίρεσης σε αυτό το ζήτημα θεωρείται επιβεβαιωμένη [44, 46].

Όπως είναι αναμενόμενο, αντιδράσεις από μολυσμένες μονάδες ΣΕ και αιμοπεταλίων έχουν σχετιστεί άμεσα με τον παρατεταμένο χρόνο αποθήκευσης [43]. Για την αποτροπή σηπτικών αντιδράσεων, η τήρηση όλων των πρωτοκόλλων που αφορούν την αποθήκευση και όλες τις παραμέτρους της, είναι απαραίτητη. Όμως βάρος πρέπει να δοθεί και στην πρόληψη της μόλυνσης, πηγές της οποίας μπορεί να είναι το δέρμα, το περιβάλλον, τα υλικά, ή και το ίδιο το αίμα, και κυρίως στην ανάπτυξη και υιοθέτηση νέων μεθόδων επεξεργασίας, ανίχνευσης και αναφοράς, που να συμπεριλαμβάνουν και τις βακτηριακές μολύνσεις [43, 44].

⁹⁵ Χρώση κατά Γκραμ (Gram stain) ονομάζεται μια απλή μέθοδος χρώσης, η οποία κατατάσσει τα είδη των βακτηρίων σε δύο μεγάλες ομάδες, τα "θετικά κατά Gram" και τα "αρνητικά κατά Gram". Στην πρώτη περίπτωση τα βακτήρια διατηρούν το μπλε-ιώδες χρώμα της πρώτης χρώσης που χρησιμοποιείται, ενώ στη δεύτερη λαμβάνουν ερυθρό χρώμα, οφειλόμενο στη δεύτερη χρώση.

3. 6. Πρωτόκολλα

Το πρωτόκολλο για την αποθήκευση ερυθρών αιμοσφαιρίων που χρησιμοποιείται ευρύτερα σήμερα, ορίζει ως μέγιστο χρόνο αποθήκευσης τις 42 ημέρες, με το αίμα να συλλέγεται σε ασκούς με αντιπηκτικό διάλυμα (τυπικά CPD). Τα ΣΕ προετοιμάζονται με αφαίρεση του πλάσματος και, σε ορισμένες περιπτώσεις, λευκαφαίρεση. Το παράγωγο αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 2°C έως 6°C, σε ελαφρώς υπέρτονο⁹⁶ διάλυμα, συνηθέστερα το συντηρητικό διάλυμα SAGM (376 mOsm/L) [11, 21].

Οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται ώστε να εγκριθεί ένα συντηρητικό διάλυμα και το αίμα στο οποίο προστίθεται να θεωρείται κατάλληλο προς μετάγγιση, βασίζονται σε δύο παραμέτρους. Η πρώτη παράμετρος είναι το επίπεδο της αιμόλυσης. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής το όριο ορίστηκε στο 1% αιμόλυση, ενώ στην Ευρώπη ορίζεται πως η αιμόλυση δεν πρέπει να ξεπερνά το 0,8% [48]. Πρόσφατα όμως, ο οργανισμός FDA πρόσθεσε έναν ακόμη όρο, όσων αφορά την αιμόλυση, τον «κανόνα του 95/95». Σύμφωνα με αυτόν, πρέπει το 95% των μονάδων ΣΕ να πληρούν τις καθορισμένες προϋποθέσεις, και να το αποδεικνύουν με 95% στατιστική ακρίβεια [48]. Η δεύτερη παράμετρος αφορά την επιβίωση/ ανάκτηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων του δότη μέσα στην κυκλοφορία του δέκτη, 24 ώρες μετά τη μετάγγιση. Ο δείκτης επιβίωσης πρέπει να είναι πάνω από 75%. Αυτό υπολογίζεται μέσω της μέτρησης της ημιζωής⁹⁷ των ερυθροκυττάρων, τα οποία σημάνθηκαν πριν τη μετάγγιση με Cr⁵¹. Παρόλα αυτά, οι όροι αυτοί είναι γενικοί και αρκετά εύκολα μπορούν να επηρεαστούν από τη βιολογική μεταβλητότητα μεταξύ των δοτών, δεδομένου ότι αίμα από διαφορετικούς δότες έχει διαφορετική αντοχή στις συνθήκες της αποθήκευσης [21].

⁹⁶ Υπέρτονο είναι ένα διάλυμα που έχει μεγαλύτερη οσμωτική πίεση σε σχέση με κάποιο άλλο.

⁹⁷ Ημιζωή ονομάζεται η περίοδος της αντίδρασης της μισής ποσότητας των ενεργών αντιδρώντων, όπου η αντίδραση μπορεί να είναι χημική ή πυρηνική.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Πρωτεομική Ανάλυση

Αν και πολλά ήταν γνωστά για την ερυθροκυτταρική μεμβράνη πριν την εισαγωγή των πρωτεομάτων, η χρήση τους παρέχει πρωτοφανές βάθος ανάλυσης για την επιβεβαίωση και την επέκταση των προηγηθέντων ευρημάτων [13].

4. 1. Πρωτεομική ανάλυση κατά την αποθήκευση

Έχουν αναγνωρισθεί 257 διαφορετικές πρωτεΐνες στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και στα κυστίδια που έχουν απομονωθεί από μανάδες ερυθροκυττάρων. Μία σύγκριση της συνολικής σύνθεσης των τμημάτων της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, δείχνει ότι η μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων υφίσταται ποικίλες μεταβολές κατά την αποθήκευση. Μία κύρια μεταβολή είναι η μείωση του συνολικού αριθμού διαφορετικών πρωτεϊνών, κυρίως στο πρώτο μέρος της αποθηκευτικής περιόδου, μεταξύ 3^{ης} και 21^{ης} ημέρας (Πίνακας 1). Αυτό προκαλείται, κατά κύριο λόγο, από μια ελάττωση στον αριθμό των συνοδών πρωτεϊνών, των συστατικών του πρωτεοσώματος⁹⁸ και των μικρών πρωτεϊνών G⁹⁹. Αντιθέτως, οι αριθμοί αυτών των πρωτεϊνών στα κυστίδια αυξάνονται με την αποθήκευση. Επίσης, η πρωτεϊνική σύνθεση των κυστιδίων διαφέρει, από αυτή των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών, καθώς τα κυστίδια περιέχουν χαμηλότερο αριθμό μεμβρανικών πρωτεϊνών, υψηλότερο αριθμό μεταβολικών ενζύμων¹⁰⁰ (Πίνακας 1) και υψηλότερη περιεκτικότητα σε Hb [46].

⁹⁸ Το σύμπλεγμα με τα περισσότερα μέλη (17 πρωτεΐνες) είναι το πρωτεόσωμα που βρίσκεται δίπλα σε έναν αριθμό άλλων ερυθροκυτταρικών πρωτεϊνών.

⁹⁹ Αλλιώς ονομάζονται GTPάσες. Αποτελούν μία τάξη σηματοδοτικών πρωτεϊνών G. Οι μικρές πρωτεΐνες G ανακυκλώνονται μεταξύ μιας ενεργού (GTP) και μιας ανενεργού (GDP) μορφής, ενώ διαφέρουν από τις πρωτεΐνες G στο ότι έχουν μικρότερη μοριακή μάζα και είναι μονομερείς.

¹⁰⁰ Τα μεταβολικά ένζυμα καταλύουν τις διάφορες χημικές αντιδράσεις εντός των κυττάρων, όπως την παραγωγή ενέργειας και την αποτοξίνωση από παθογόνες ή βλαπτικές διεργασίες.

Η πρωτεϊνική σύνθεση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και των κυστιδίων κατά την αποθήκευση									
Κατηγορίες πρωτεϊνών	Μέρες αποθήκευσης								
	Ερυθρά αιμοσφαίρια			Κυστίδια			Νανοκυστίδια		
	3η	21η	42η	3η	21η	42η	3η	21η	42 ^η
Μεμβρανικές	26	28	27	22	21	28	13	10	5
Κυτταροσκελετικές	22	22	20	22	24	26	9	9	11
Hb	3	3	3	5	6	5	5	5	5
Μεταβολικά ένζυμα	22	19	14	51	52	71	21	16	22
Συνοδοί	17	12	9	8	7	13	2	4	4
Πρωτεοσωμικές	19	1	2	18	12	24	15	15	16
Οξειδώσεως	3	6	5	6	6	10	5	5	5
Μεταγωγείς σήματος	15	10	8	15	13	24	2	2	2
Μικρές πρωτεΐνες G	28	22	16	13	17	27	11	8	5
Λιπιδικών σχεδιών	4	4	4	4	4	4	5	4	3
DNA/ RNA	17	4	6	9	7	14	2	2	2
Άλλες	22	14	9	44	35	31	112	128	66
Ανώνυμες	17	12	8	15	18	29	17	18	15
Σύνολο	205	157	131	232	212	306	219	226	161

Πίνακας 1: Οι αριθμοί εκφράζουν το πλήθος των διαφορετικών πρωτεϊνών σε κάθε κατηγορία. Οι αναγνωρισμένες πρωτεΐνες κατηγοριοποιήθηκαν με ένα συνδυασμό ενδείξεων στη μοριακή λειτουργία, τη βιολογική διαδικασία και τα κυτταρικά συστατικά. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας, αφού πρώτα διαχωρίστηκαν μέσω πηκτώματος SDS (μίας διάστασης), σε έξι «τμήματα» μοριακού βάρους. Όλες οι αναλύσεις έγιναν σε 5μg (συνολικής) πρωτεΐνης [49].

Μία ημιποσοτική ανασκόπηση των μεταβολών στο μεμβρανικό/κυτταροσκελετικό δίκτυο των ερυθρών αιμοσφαιρίων δείχνει μία μείωση στην περιεκτικότητα των σπεκτρίνης, αγκυρίνης και πρωτεΐνης-ζώνης 3 των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών, ιδίως μεταξύ της 21^{ης} και της 42^{ης} ημέρας της αποθήκευσης. Αντιθέτως, η συγκέντρωση του μεταφορέα της γλυκόζης¹⁰¹ αυξάνεται (Πίνακας 2). Η σπεκτρίνη και η αγκυρίνη βρίσκονται σε πολύ χαμηλές ποσότητες στα κυστίδια, αλλά η πρωτεΐνη-ζώνη 3 παρουσιάζει μία σχετιζόμενη με την αποθήκευση αύξηση σε αυτά (Πίνακας 2). Γενικά, αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ειδικών διαδικασιών, οι οποίες επηρεάζουν την οργάνωση της μεμβράνης. Επίσης, δείχνουν ότι αυτές οι διαδικασίες δεν ενεργούν μόνο στο τέλος, αλλά ήδη από τις πρώτες εβδομάδες της αποθηκευτικής περιόδου [49].

¹⁰¹ Οι μεταφορείς της γλυκόζης είναι μια μεγάλη ομάδα μεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες διευκολύνουν τη μεταφορά της γλυκόζης μέσω της μεμβράνης.

Αλλαγές στις κύριες μεμβρανικές πρωτεΐνες κατά την αποθήκευση ΣΕ									
Πρωτεΐνες	Μέρες αποθήκευσης								
	Ερυθρά αιμοσφαίρια			Κυστίδια			Νανοκυστίδια		
	3η	21η	42η	3η	21η	42η	3η	21η	42η
Σπεκτρίνη	79	91	22	5	4	4	0	1	0
Αγκυρίνη	65	53	16	7	10	18	1	1	1
Πρωτεΐνη-ζώνη 3	150	141	65	79	93	125	18	8	11
Μεταφορέας γλυκόζης	16	41	62	15	16	19	7	5	5
Πρωτεΐνη 4.1	11	9	8	10	9	21	1	1	1
Πρωτεΐνη 4.2	55	16	27	16	16	13	1	1	1
Πρωτεΐνη 4.9	6	6	5	1	0	0	1	0	0
Ακτίνη	225	104	55	18	6	6	1	1	1

Πίνακας 1: Οι αριθμοί εκφράζουν τις τιμές emPAI. Οι τιμές emPAI υπολογίζονται με έναν ειδικό τύπο, μετά από μέτρηση των πεπτιδίων που παρατηρούνται ανά πρωτεΐνη. Όλες οι αναλύσεις έγιναν σε 5μg (συνολικής) πρωτεΐνης[49].

Η έντονη, σχετιζόμενη με την αποθήκευση, μείωση του συνολικού αριθμού των πρωτεϊνών στην ερυθροκυτταρικής μεμβράνης δημιουργείται κυρίως, από μία μείωση στον αριθμό των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη μεμβράνη, όπως είναι διάφορα ένζυμα, πρωτεΐνες διαφόρων οδών μεταγωγής σήματος, μικρές πρωτεΐνες G, διάφορες πρωτεΐνες συνοδοί και συστατικά του πρωτεοσώματος. Πρόσφατα, πρωτεομικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η έντονη, σχετιζόμενη με την αποθήκευση, μείωση των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού (σπεκτρίνη, αγκυρίνη, πρωτεΐνη 4.2 και ακτίνη) (Πίνακας 2) στη μεμβράνη, μπορεί να προκαλούνται από αποδόμηση. Από την άλλη, η αύξηση της συγκέντρωσης του

μεταφορέα της γλυκόζης στα αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια (Πίνακας 2), μπορεί να οφείλεται στη σχετική του αντίσταση στην αποδόμηση. Την ελάττωση των συνοδών πρωτεϊνών μπορεί να ακολουθήσουν μεταβολές, σχετιζόμενες με την αποθήκευση, στη δομή των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Τα αίτια ή/ και τα αποτελέσματα αυτών των μεταβολών στη μεμβρανική σύνδεση του πρωτεοσώματος παραμένουν άγνωστα, αλλά εξίσου ενδιαφέροντα. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι αυτές οι μεταβολές στα συστατικά του πρωτεοσώματος και στις πρωτεΐνες συνοδούς της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών αποθήκευσης, αντανακλούν τις προκλήσεις και τις συνακόλουθες μεταβολές στην πρωτεϊνική διάρθρωση, που επιβάλλονται από τη συλλογή αίματος και από τις διαδικασίες επεξεργασίας της τράπεζας αίματος. Αυτό υποστηρίζεται από το εύρημα ότι τα μεμβρανικά τμήματα προσφάτως απομονωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων, σε αντίθεση με τις μεμβράνες των ΣΕ, μετά βίας περιέχουν κάποιες πρωτεοσωμικές πρωτεΐνες. Οι ειδικές μεταβολές στη σύνδεση με τη μεμβράνη των μεταβολικών ενζύμων, των πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος και των μικρών πρωτεϊνών G, υποδεικνύουν την παρουσία και λειτουργικών μεταβολών. Αυτό υποστηρίζεται από την πρόσφατη παρατήρηση ότι η απουσία των μικρών πρωτεϊνών G Rac1 και Rac2 (σε ποντίκια) οδηγεί σε μη φυσιολογικού σχήματος ερυθροκύτταρα, σε μειωμένη παραμορφωσιμότητα και σε αιμόλυση [49, 50, 51].

4. 2. Αιμοσφαιρίνη

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ΣΕ, η Hb σχετίζεται με το τμήμα της μεμβράνης, εν μέρει σε μια διασυνδεδεμένη μορφή που δε μειώνεται. Αυτή η σχέση έχει θεωρηθεί πως προκαλεί την παραγωγή νεοαντιγόνων γήρανσης που πυροδοτούν την ανοσολογική αναγνώριση και εκκαθάριση των γηραιών ή/ και κατεστραμμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι ένας τέτοιος συσχετισμός παρουσιάζεται ήδη, νωρίτερα κατά την αποθηκευτική περίοδο και ότι στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη το ποσό της Hb στις υψηλότερου

μοριακού βάρους περιοχές των πηκτωμάτων¹⁰² αυξάνεται ανάλογα με το χρόνο αποθήκευσης. Έτσι, υποδεικνύεται μία, συσχετιζόμενη με την αποθήκευση, αύξηση της συσσωμάτωσης ή/ και αυξημένος συσχετισμός υψηλής χημικής συγγένειας¹⁰³ με άλλες πρωτεΐνες. Τα κυστίδια περιέχουν μεγάλα ποσά Hb, σε διαλυτή κατάσταση ως επί το πλείστον, με τα πεπτίδια¹⁰⁴ σφαιρίνης¹⁰⁵ να αποτελούν το 30-50% του συνόλου των πεπτιδίων (σε αυτά τα δείγματα). Το ποσό της Hb στις υψηλότερου μοριακού βάρους περιοχές των πηκτωμάτων αυξάνεται ανάλογα με το χρόνο αποθήκευσης και στην περίπτωση των κυστιδίων [49, 51].

Με βάση αυτές τις μεταβολές, που θεωρείται ότι επηρεάζουν την ακεραιότητα των ερυθροκυττάρων κατά την αποθήκευση και την επιβίωσή τους μετά τη μετάγγιση, επιβεβαιώνεται η ήδη γνωστή, σχετιζόμενη με την αποθήκευση, αύξηση στη σύνδεση της Hb με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Τα δεδομένα της μελέτης των *Bosman et al.* [49], δείχνουν επίσης μία, εξαρτώμενη από το χρόνο αποθήκευσης, συσσωμάτωση της Hb, ή/ και μία αυξημένη σύνδεση σε άλλες πρωτεΐνες. Μια άλλη υπόθεση που έχει γίνει, είναι ότι η σχετιζόμενη με τη μεμβράνη Hb βρίσκεται σε ένα μετουσιωμένο στάδιο. Όντως, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα οξειδωτικά τροποποιημένης Hb τόσο στα ερυθρά αιμοσφαίρια, όσο και στα κυστίδια, μετά από μόλις τρεις μέρες αποθήκευσης [49].

Η μετουσιωμένη Hb έχει μία υψηλή χημική συγγένεια με την κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης-ζώνη 3. Η σύνδεση της Hb φαίνεται να προκαλεί τη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης-ζώνη 3 και κατ' επέκταση, τη σύνδεση

¹⁰² Ο ηλεκτροφοριστικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πήκτωμα (gel) και όχι σε διάλυμα, επειδή το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακός ηθμός, καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων. Επιπλέον, καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας, προϋπόθεση απαραίτητη για το σωστό διαχωρισμό των μορίων.

¹⁰³ Στη χημεία, με τον όρο χημική συγγένεια χαρακτηρίζεται γενικά η δύναμη που φέρεται να συγκρατεί ενωμένα τα άτομα μιας χημικής ένωσης.

¹⁰⁴ Τα πεπτίδια είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν δύο, τρία, ή έως 25 αμινοξέα, που συνδέονται μεταξύ τους με τον πεπτιδικό δεσμό.

¹⁰⁵ Αποτελεί το πρωτεϊνικό μέρος της αιμοσφαιρίνης. Ανήκει στις ιστόνες, δηλαδή στη μεταβατική βαθμίδα μεταξύ των πρωταμινών και των μεγαλομοριακών λευκωμάτων. Ως πρωτεΐνη, αποτελείται από τέσσερις αλυσίδες αμινοξέων, τα οποία, συνδεόμενα μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς, σχηματίζουν τις πεπτιδικές αλυσίδες.

των ανοσοσφαιρινών (immunoglobulins, Igs)¹⁰⁶ και τη συσσώρευση του συμπληρώματος¹⁰⁷ [49].

Επομένως, αυτά τα πρωτεομικά δεδομένα, πάνω στις, σχετιζόμενες με την αποθήκευση, μεταβολές της Hb και της πρωτεΐνης-ζώνη 3 όχι μόνο επιβεβαιώνουν, αλλά επίσης επεκτείνουν τα μέχρι τώρα δεδομένα. Αυτό συμβαίνει επειδή είναι ανεξάρτητα της εκλεκτικότητας και της ειδικότητας των αντισωμάτων [49].

4. 3. Πρωτεΐνη-ζώνη 3

Οι μεταβολές στη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης-ζώνη 3 σχετίζονται με τη γήρανση των ερυθροκυττάρων *in vivo* και *in vitro*¹⁰⁸. Για αυτό το λόγο, η πρωτεΐνη-ζώνη 3 εξετάστηκε διεξοδικά. Μία ανάλυση της κατανομής των πεπτιδίων της πρωτεΐνης-ζώνη 3 σε πήκτωμα, έδειξε ότι συσσωματωμένες και αποδομημένες μορφές της εντοπίζονται κυρίως στα κυστίδια, όπου η περιεκτικότητα σε συσσωματωμένη πρωτεΐνη-ζώνη 3 αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης. Αυτό απαντάται μόνο στην πρωτεΐνη-ζώνη 3, επειδή τέτοιες μεταβολές δεν εντοπίζονται για τον δομικά συσχετιζόμενο μεταφορέα της γλυκόζης [49].

Οι σχετιζόμενες με την αποθήκευση μεταβολές στη συσσωμάτωση και στην αποδόμηση της πρωτεΐνης-ζώνη 3, έχουν αναφερθεί και παλαιότερα και έχουν συσχετιστεί με την απώλεια της μεταβολικής ικανότητας και με την παραγωγή ειδικών ερυθροκυτταρικών νεοαντιγόνων γήρανσης. Τα σημερινά δεδομένα επιβεβαιώνουν μια προσφάτως αναφερθείσα μείωση στην περιεκτικότητα της

¹⁰⁶ Είναι ένα είδος μορίων που χρησιμοποιείται από το ανοσιακό σύστημα για την ειδική αναγνώριση των αντιγόνων. Μπορούν να αναγνωρίζουν μεγάλο εύρος αντιγονικών δομών, έχουν μεγάλη ικανότητα να διακρίνουν διαφορετικά αντιγόνα και έχουν μεγαλύτερη ισχύ σύνδεσης με αυτά. Παράγονται από τα B-κύτταρα ως μεμβρανικές πρωτεΐνες.

¹⁰⁷ Το συμπλήρωμα είναι το πολυπλοκότερο από τα συστήματα πρωτεασών ή συστήματα ενεργοποίησης, τα οποία, σε συνεργασία και αλληλεξάρτηση μεταξύ τους, συμβάλλουν καθοριστικά στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού.

¹⁰⁸ Η έκφραση *in vitro* χρησιμοποιείται για την περιγραφή μιας βιολογικής διαδικασίας όταν αυτή πραγματοποιείται στο δοκιμαστικό σωλήνα.

εγχώριας πρωτεΐνης-ζώνη 3 κατά την αποθήκευση, και δείχνουν μία αύξηση στη συσσωμάτωσή της κατά την αποθήκευση [49].

4. 4. Ανοσοσφαιρίνες

Τα πρωτεομικά δεδομένα, ενισχύουν προηγούμενα δεδομένα που δείχνουν τη σύνδεση των ανοσοσφαιρινών¹⁰⁹ και τη μερική ενεργοποίηση του συμπληρώματος κατά την αποθήκευση. Το πιο πιθανό είναι πηγή αυτών των πρωτεϊνών να αποτελεί το πλάσμα που έχει απομείνει στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η παρουσία ειδικών, αυτοδραστικών ανοσοσφαιρινών πιθανολογείται να είναι ο πιο καθοριστικός παράγοντας της ταχείας εκκαθάρισης των ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία, μετά τη μετάγγιση, και ιδίως των σχετιζόμενων με την αποθήκευση κυστιδίων, όπως έχει παρατηρηθεί στα κυστίδια *in vivo*. Το μικρό ποσό της πρωτεΐνης C3¹¹⁰ στην περιοχή υψηλού μοριακού βάρους των πηκτωμάτων, υποδεικνύει ότι ο σχηματισμός των συμπλεγμάτων C3 – IgG (ανοσοσφαιρίνες G)¹¹¹, είναι πολύ πιθανό να παράγεται κατά τον οψωνισμό¹¹² των κατεστραμμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων, παρουσιάζεται (μετά βίας) κατά την αποθήκευση [49].

¹⁰⁹ Το αντίσωμα (ή αλλιώς ανοσοσφαιρίνη) είναι ένα μεγάλο, σχήματος Y, πρωτεϊνικό μόριο που χρησιμοποιείται από το ανοσοποιητικό σύστημα για να αναγνωρίσει και να ακινητοποιήσει ξένα προς αυτό αντικείμενα, όπως είναι τα βακτήρια και οι ιοί. Το αντίσωμα αναγνωρίζει ένα μοναδικό κομμάτι του εισβολέα που ονομάζεται αντιγόνο. Η παραγωγή αντισωμάτων είναι η κύρια λειτουργία της χημικής ανοσίας.

¹¹⁰ Η πρωτεΐνη C3 είναι ο βιολογικά σημαντικότερος παράγοντας του συμπληρώματος (το συμπλήρωμα είναι το πολυπλοκότερο από τα συστήματα πρωτεασών ή ενεργοποίησης, τα οποία σε αλληλεξάρτηση και συνεργασία, διατηρούν την ομοιόσταση του οργανισμού). Η ενεργοποίησή του κατέχει σημαντική θέση στη λειτουργία του συστήματος του συμπληρώματος.

¹¹¹ Οι IgG είναι η κύρια ανοσοσφαιρίνη του ορού και η μόνη που διέρχεται τον πλακούντα. Ενεργοποιεί την κλασική οδό του συμπληρώματος. Οι τάξεις των IgG διακρίνονται σε 4 υποτάξεις: τις IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4.

¹¹² Οψωνισμός (ή αντισωματικός οψωνισμός) είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα παθογόνο επισημαίνεται ώστε να αναγνωριστεί και να φαγοκυτταρωθεί από τα φαγοκύτταρα. Για να γίνει αυτό, μια οψωνίνη (π.χ. αντίσωμα) πρέπει να συνδεθεί σε κάποιον υποδοχέα στη μεμβράνη του παθογόνου. Μετά τη σύνδεση αυτή, τα φαγοκύτταρα αναγνωρίζουν και καταστρέφουν το παθογόνο.

4. 5. Η σημασία και η χρησιμότητα της πρωτεομικής

Πρόσφατες δημοσιεύσεις συνοψίζουν τη συμβολή της πρωτεομικής στον τομέα των μεταγγίσεων και προτείνουν μία πιθανή προσέγγιση υπό τη μορφή μιας σειράς εργασιών για την καταγραφή της ποιότητας των θεραπειών που βασίζονται στο αίμα, μέσω της πρωτεομικής [14].

Η σύγκριση των πρωτεομάτων προσφέρει την πιθανότητα μελέτης των μεταβολών στην πρωτεϊνική σύσταση των ερυθροκυττάρων σε φυσιολογικές καταστάσεις και σε καταστάσεις νόσου. Πιο συγκεκριμένα, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση των μηχανισμών της αναιμίας και των διαφορών μεταξύ των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων από ασθενείς που έχουν συγκεκριμένες μορφές αναιμίας. Επιπλέον, η σύγκριση των πρωτεομάτων προσφέρει πολύ καλές προοπτικές στη μελέτη των μεταβολών των ερυθροκυττάρων και στη μελέτη των διαφορών εντός του ίδιου είδους, κάτι που θα είναι καθοριστικής σημασίας για την επίτευξη της μετάβασης από τα πειράματα σε ζώα στις κλινικές δοκιμές [14, 52].

Όλες οι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες του ερυθροκυττάρου παρουσιάζονται σε ισομορφές¹¹³ που είναι συνέπεια του εναλλακτικού ματίσματος. Ενώ οι συμβατικές πρωτεομικές μέθοδοι μπορούν να παρέχουν κάποιες πληροφορίες πάνω στη σύνδεση των ισομορφών στον ερυθροκυτταρικό κυτταροσκελετό, οι ισομορφές μπορεί να μην ανιχνευθούν, όταν οι διαφορές μεταξύ τους είναι ανεπαίσθητες, ή όταν βρίσκονται σε περιοχές που δεν έχουν χαρακτηριστικά και σημαντικού μεγέθους θρυπτικά πεπτίδια¹¹⁴. Σε τέτοιες περιπτώσεις, οι στοχευμένες πρωτεομικές προσεγγίσεις προσφέρουν μία καλύτερη ευκαιρία να εντοπιστούν ειδικές ισομορφές, υπεύθυνες για μη φυσιολογική ερυθροκυτταρική μορφή και λειτουργία και κατ' επέκταση, για νόσο [13].

¹¹³ Μία πρωτεϊνική ισομορφή είναι μία από τις πολλές διαφορετικές μορφές της ίδιας πρωτεΐνης. Διαφορετικές μορφές της ίδιας πρωτεΐνης μπορούν να παραχθούν από συγγενή γονίδια, ή να προέλθουν από το ίδιο γονίδιο μέσω εναλλακτικού ματίσματος.

¹¹⁴ Η θρυψίνη ή τρυψίνη, είναι μία πρωτεάση σερίνης που βρίσκεται στο πεπτικό σύστημα πολλών σπονδυλωτών, όπου υδρολύει πρωτεΐνες. Θρυψίνη παράγεται στο πάγκρεας ως ανενεργό προένζυμο του τρυψινογόνου. Η θρυψίνη διασπά πεπτιδικές αλυσίδες. Χρησιμοποιείται για πολλές βιοτεχνολογικές διεργασίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Η Γήρανση των Ερυθροκυττάρων

Ο μέσος χρόνος ζωής των ερυθροκυττάρων του ανθρώπου είναι, φυσιολογικά, 120 ± 4 ημέρες, από τη στιγμή που εμφανίζονται στην κυκλοφορία του αίματος, καθώς, αφού ωριμάσουν, υφίστανται γήρανση [53, 54, 55]. Η διαδικασία αυτή εμφανίζεται ως λογικό επακόλουθο, αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν έχουν την ικανότητα σύνθεσης πρωτεϊνών και επομένως, η φυσιολογία τους στηρίζεται στις πρωτεΐνες και τα ένζυμα που έχουν απομείνει μετά την ωρίμανσή τους από δικτυοερυθροκύτταρα [27]. Είναι επίσης εμφανές, λόγω της χρονικής συνέπειας που παρατηρείται στην, υπό φυσιολογικές συνθήκες, γήρανση των ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία, ότι η διεργασία αυτή πραγματοποιείται μέσω αυστηρώς ρυθμιζόμενων μηχανισμών. Αυτοί οι μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για τον προγραμματισμό της διάρκειας ζωής των κυττάρων και για την μη-τυχαία αποβολή τους, όταν επέλθει η γήρανση [54].

Η γήρανση των ερυθροκυττάρων χαρακτηρίζεται από συσσώρευση μορφολογικών, μεταβολικών και λειτουργικών μεταβολών. Η συρρίκνωση των κυττάρων, η αναδιαμόρφωση της μεμβράνης, η μικροκυστιδιοποίηση και η έκθεση στην επιφάνειά τους δεικτών εκκαθάρισης, που προκαλούν την φαγοκυττάρωση των ερυθροκυττάρων, είναι κάποιες από τις τυπικές αλλαγές που παρατηρούνται σε γερασμένα ερυθρά αιμοσφαίρια [56]. Κατά τη γήρανση τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro*, τα ερυθροκύτταρα εμφανίζουν σήματα εκκαθάρισης [57]. Τέτοια ισχυρά σήματα για την απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η παρουσίαση της PS και η σύνδεση αυτόλογων IgGs¹¹⁵ σε ειδικά νεοαντιγόνα γήρανσης, που προέρχονται από δομικές αλλαγές στην πρωτεΐνη-ζώνη 3 και πυροδοτούν τη

¹¹⁵ IgGs του ίδιου του οργανισμού.

φαγοκυττάρωση¹¹⁶ αυτών των ερυθροκυττάρων (που εμφανίζουν τα νεοαντιγόνα) [56, 57]. Η γήρανση φέρεται επίσης να σχετίζεται με μια διαδικασία παρόμοια με αυτή της απόπτωσης¹¹⁷, αποκαλούμενη ερύπτωση, η οποία μπορεί να προκαλείται από εισροή Ca^{2+} στο κύτταρο, ενώ μπορεί να αποτραπεί από αναστολείς καλπαΐνης¹¹⁸ και κασπάσης¹¹⁹. Η ενεργοποίηση των κασπασών 3 και 8, θεωρείται σήμερα σημάδι της *in vitro* γήρανσης των ερυθροκυττάρων. Η επαγωγή του, καθοδηγούμενου από την Fas¹²⁰/ κασπάση, προγραμματισμένου θανάτου των ερυθρών αιμοσφαιρίων, έχει συνδεθεί με τον κατακερματισμό και την συσσωμάτωση (ομοδιμερισμό) της πρωτεΐνης-ζώνη 3. Πρόσφατες έρευνες επίσης καταδεικνύουν την *in vivo* ενεργοποίηση κασπασών, σε κυκλοφορούντα γηρασμένα ερυθρά [56]. Σημαντική ένδειξη γήρανσης αποτελεί και η μικροκυστιδιοποίηση, με τη δημιουργία κυστιδίων τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro* [57]. Η διαδικασία αυτή πιθανώς αποτελεί ένα μηχανισμό μεταφοράς στον εξωκυττάριο χώρο (αποβολής από το κύτταρο) σημάτων απομάκρυνσης-εκκαθάρισης, αποτελώντας στην ουσία έναν μηχανισμό αναβολής, της τελικά αναπόφευκτης εξάλειψης των, κατά τα άλλα υγιών, ερυθροκυττάρων [56].

¹¹⁶ **Φαγοκυττάρωση** ονομάζεται η ικανότητα των κυττάρων να συλλαμβάνουν και να ενσωματώνουν στο κυτταρόπλασμά τους μικροοργανισμούς ή σωματίδια. Στον ανθρώπινο οργανισμό φαγοκυτταρικές ιδιότητες διαθέτουν τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, που χαρακτηρίζονται και ως μικροφάγα και το σύστημα των μονοκυττάρων-μακροφάγων.

¹¹⁷ Η απόπτωση είναι μια διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης το κύτταρο συρρικνώνεται, το ίδιο και η χρωματίνη, η μιτοχονδριακή μεμβράνη διαρρηγνύεται και το κύτταρο αποδομείται και σχηματίζει αποπτωτικά σώματα, τα οποία φαγοκυτταρώνονται, χωρίς φλεγμονή.

¹¹⁸ Η καλπαΐνη είναι μία πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των Ca^{2+} εξαρτώμενων πρωτεϊνών κυστεΐνης (πρωτεολυτικά ένζυμα).

¹¹⁹ Οι κασπάσες είναι μια εξελικτικά συντηρητική πρωτεϊνική οικογένεια κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και διακρίνονται από: α) την παρουσία κυστεΐνης στο ενεργό τους κέντρο, β) τη υψηλή συγγένεια σύνδεσης με κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος στα υποστρώματα στόχους. Η μετατροπή του προ-ενζύμου σε ενεργό μέσω πρωτεόλυσης αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα γεγονότα έναρξης της απόπτωσης.

¹²⁰ Ο υποδοχέας Fas (γνωστός ως Apo-1 ή CD95) προσδένει τον συνδέτη Fas (FasL), μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη.

5. 1. Σχέση γήρανσης-αποθήκευσης

Κατά την αποθήκευσή τους, τα ερυθροκύτταρα υποβάλλονται σε μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές, οι οποίες πιθανότατα συνδέονται με την «εξαφάνιση» μέχρι και του 30% των ερυθρών αιμοσφαιρίων μέσα σε 24 ώρες από τη μετάγγιση, οδηγώντας ίσως σε παρενέργειες μετά τη μετάγγιση. Έχει προταθεί ότι η επιταχυνόμενη ή/ και μη φυσιολογική γήρανση των ερυθροκυττάρων συμβάλλει στην αποθηκευτική βλάβη τους και αποτελεί μέρος αυτής [55]. Φυσικά, δεν μπορεί να θεωρηθεί πως η γήρανση των ερυθροκυττάρων κάτω από συνθήκες αποθήκευσης είναι ανάλογη της φυσιολογικής, *in vivo* διαδικασίας γήρανσης. Αν και τα μονοπάτια που θεωρείται πως εμπλέκονται στη σηματοδότηση της γήρανσης αναμένεται να παραμείνουν σχετικά ίδια σε συνθήκες *in vitro*, είναι λογική η ελαφρά αναπροσαρμογή τους, δεδομένων των σημαντικών μεταβολών στο περιβάλλον. Μια χρονική περίοδος αποθήκευσης 35-42 ημερών στους 4°C, είναι λογικό να μην αποτελεί ιδανικό περιβάλλον για τη διαδικασία της ωρίμανσης και σίγουρα δεν αποτελεί μια χρονική περίοδο που θα μπορούσε να αγνοηθεί, συγκρινόμενη με το χρόνο ζωής των ερυθροκυττάρων [54]. Έτσι, κατά την αποθήκευση, ένα κομμάτι των ερυθρών αιμοσφαιρίων σταδιακά εκφράζει μερικά από τα τυπικά σημάδια της γήρανσης και της ερυθροφαγοκυττάρωσης, όπως ο σχηματισμός συσσωματωμάτων πρωτεΐνης-ζώνη 3 με IgG, η έκθεση PS, και η σφαιροεχινοκυττάρωση. Όμως, η αυξανόμενη συσσώρευση επιδράσεων της γήρανσης σε ένα κομμάτι των αποθηκευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων συμβάλλει, όχι μόνο στην ταχεία απομάκρυνσή τους μετά τη μετάγγιση, αλλά και σε διάφορες παρενέργειες που σχετίζονται με αυτή [56]. Με τη δραστική αλλαγή στο φυσικό τους περιβάλλον, τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα δε γερνούν κάτω από τις συνθήκες για αυτά συνθήκες, καθώς πλέον δε συμβιούν με άλλα κύτταρα ή πλάσμα, από όπου τους παρέχονταν παράγοντες και σήματα επιβίωσης, αλλά είναι υποχρεωμένα να διαβιούν και να μοιράζονται τον ίδιο χώρο με τα δικά τους, αλλά και άλλων κυττάρων, απόβλητα. Λόγω του ότι οι μηχανισμοί εκκαθάρισης δε φαίνεται να λειτουργούν κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, τα γηρασμένα ερυθρά αιμοσφαίρια πιθανώς καταδικάζονται να «επιβιώσουν» για μεγαλύτερα

χρονικά διαστήματα από ότι είναι προγραμματισμένα [54]. Αν και υπάρχουν ενδείξεις πως η αποθήκευση διαταράσσει τη φυσιολογική πορεία της γήρανσης των ερυθροκυττάρων [31, 56, 57, 58], η βάση του μηχανισμού για τη διαδικασία της γήρανσης μέσα στη μονάδα αίματος (ασκό) και η λειτουργική δραστηριότητα των τροποποιημένων ερυθρών αιμοσφαιρίων όταν μεταγγιστούν, παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ανεξιχνίαστες [54].

Με βάση τα δεδομένα και τα αποτελέσματα που έχουν εξαχθεί από διάφορες μελέτες για τη γήρανση των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων, όπως επίσης και τα «τυφλά σημεία» που υπάρχουν πάνω στο θέμα, κρίνεται σκόπιμο να αναλυθεί όχι μόνο τη γήρανση *in vitro* (κατά την αποθήκευση), αλλά και η *in vivo* γήρανσή τους.

5. 2. Η *in vivo* γήρανση των ερυθροκυττάρων

Κατά τη διαδικασία της γήρανσής τους, τα ερυθρά αιμοσφαίρια υποβάλλονται σε διάφορες και συνεχείς μεταβολικές, μορφολογικές και άλλες μεταβολές, όπως είναι η (μικρο)κυστιδιοποίηση της μεμβράνης, μεταβολές στην Hb και σταδιακή βλάβη στην ομοιόσταση και στην αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων [54]. Η διαλεύκανση όμως της ακριβούς λειτουργίας του φυσιολογικού μηχανισμού που ρυθμίζει τη γήρανση στα ερυθρά αιμοσφαίρια αποτέλεσε, και συνεχίζει να αποτελεί, μια περίπλοκη προσπάθεια [57]. Για τον σκοπό αυτό, δηλαδή την προσπάθεια κατανόησης της πορείας που ακολουθεί η ερυθροκυτταρική γήρανση, πολλοί ερευνητές στράφηκαν στη μελέτη δεικτών, οι οποίοι ίσως αποτελούν μετρήσιμες ενδείξεις της. Η αύξηση της πυκνότητας των ερυθροκυττάρων, η μη ενζυμική γλυκοζυλίωση¹²¹ Hb και η απαμίνωση¹²² της

¹²¹ Ενζυμική διαδικασία κατά την οποία μία γλυκάνη (ένας πολυσακχαρίτης ή ένας ολιγοσακχαρίτης) προσδένεται σε πρωτεΐνες, λιπίδια, ή άλλα οργανικά μόρια. Αποτελεί σημαντική μετα-μεταφραστική ρύθμιση που λαμβάνει χώρα κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

¹²² Χημική μεταβολή, κατά την οποία αφαιρείται η αμινική ομάδα ή αμινομάδα (-NH₂) από ένα οργανικό μόριο. Τρόποι απαμίνωσης υπάρχουν στο πεδίο τόσο της κλασικής οργανικής χημείας, όσο και της βιοχημείας, όπου αποτελούν ένα σημαντικό κεφάλαιο του μεταβολισμού των πρωτεϊνών. Η απαμίνωση είναι μια βασική διαδικασία με την οποία πραγματοποιείται η διάσπαση των αμινοξέων.

πρωτεΐνης 4.1b σε 4.1a, χρησιμοποιούνται ως τέτοιοι δείκτες. Επίσης, σημαντικοί δείκτες γήρανσης, καθώς εμπλέκονται λειτουργικά στη ρύθμιση της ομοιόστασης και της διάρκειας ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων, είναι πολλές μετα-μεταφραστικές πρωτεϊνικές τροποποιήσεις, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η φωσφορυλίωση, η οξειδωση και η συγκόλληση - συνάθροιση των ερυθροκυττάρων [54].

Η έκφραση των δεικτών της γήρανσης, φαίνεται πως δε γίνεται σταδιακά στα κύτταρα, αλλά εμφανίζεται ως μία απότομη, ταχεία και μη γραμμική, αλληπάλληλη σειρά γεγονότων, στο τελικό στάδιο της διαδικασίας της γήρανσης, πιθανώς λίγο πριν την απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα¹²³. Δεδομένου ότι τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν έχουν την ικανότητα να συνθέσουν νέες πρωτεΐνες, οι αναγνωρίσιμοι δείκτες θα πρέπει να προέρχονται από τροποποιήσεις που πραγματοποιούνται σε προϋπάρχοντα κύτταρα. Η δημιουργία τους είναι πιθανότατα το αποτέλεσμα περισσότερων από μίας οδών σηματοδότησης της γήρανσης, που λειτουργούν σε ένα εξελιγμένο πλαίσιο μοριακής αλληλεπίδρασης [54].

Οι σχετιζόμενες με την ερυθροκυτταρική γήρανση μεταβολές, μπορούν πλέον με σχετική σιγουριά να συνοψιστούν στην παρατήρηση της μείωσης της μεταβολικής δραστηριότητας, στη σταδιακή μεταβολή του σχήματος και της μορφολογίας του κυττάρου, στην αναδιαμόρφωση της μεμβράνης, καθώς και στο οξειδωτικό τραύμα, στη μικροκυστιδιοποίηση και στην έκθεση επιφανειακών σημάτων απομάκρυνσης. Το μόνο κοινό στοιχείο των μετατροπών αυτών είναι ότι όλοι, έμμεσα ή άμεσα, πυροδοτούν τη φαγοκυττάρωση των ερυθροκυττάρων [54].

¹²³ Το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα είναι ένα ετερογενές άθροισμα κυττάρων που διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, όσον αφορά τους μορφολογικούς χαρακτήρες και την τοπογραφική κατανομή. Η κοινή ιδιότητα που ενώνει τα κύτταρα αυτά σε ένα σύστημα, είναι η ικανότητά τους να συλλαμβάνουν και να καταστρέφουν σωματίδια ξένα προς τον οργανισμό, κυρίως μικροοργανισμούς, μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης. Είναι ένα σύστημα με καλώς καθορισμένες λειτουργίες, σε συνεχή δραστηριότητα και, υπό φυσιολογικές συνθήκες, είναι υπεύθυνο για την ανταλλαγή νερού, λιπών, πρωτεϊνών με σχηματισμό αντισωμάτων, την επεξεργασία αιμοσφαιρίνης, σιδήρου και κατεστραμμένων κυττάρων.

5. 3. Η κυστιδιοποίηση σε συνάρτηση με την γήρανση

Η μικροκυστιδιοποίηση της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων αποτελεί ένα βασικό κομμάτι στον κύκλο ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων που απασχόλησε, και απασχολεί, σε μεγάλο βαθμό τους ερευνητές που ψάχνουν απαντήσεις σε διάφορους τομείς της ερυθροκυτταρικής λειτουργίας. Παίζει σημαντικό ρόλο στο μέτωπο της γήρανσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, καθώς αποτελεί μέρος της ωρίμανσής τους, αντιπροσωπεύοντας μια καλά ρυθμισμένη διεργασία, η οποία επιταχύνεται στα μεγαλύτερης ηλικίας ερυθρά αιμοσφαίρια. Η μικροκυστιδιοποίηση φέρεται να συμβάλλει τόσο σε θετικές (απομάκρυνση βλαβερών ουσιών ή ουσιών-σημάτων, που ίσως οδηγούσαν αργότερα σε βλάβες), όσο και σε αρνητικές για το κύτταρο μεταβολές (μη αναστρέψιμες απώλειες μεμβράνης ή/ και Hb), ανάλογα με την περίσταση [54]. Πολλές μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η κυστιδιοποίηση αποτελεί ένα μηχανισμό, ο οποίος, μέσω της αποβολής τμημάτων ερυθροκυτταρικής μεμβράνης που περιέχουν μόρια-σήματα απομάκρυνσης (γήρανσης) ή/ και άχρηστες, μη λειτουργικές πρωτεΐνες, αναβάλλει την, τελικά αναπόφευκτη, εξάλειψη κατά τα άλλα υγιών ερυθρών αιμοσφαιρίων. Όμως, δεν προστατεύει μόνο τα ερυθροκύτταρα από πρόωρο θάνατο, αλλά δίνει και μια αξιόλογη πληροφορία, καθώς υποδηλώνει ότι τα ίδια σήματα αναγνώρισης-απομάκρυνσης διαμεσολαβούν για την ταχεία απομάκρυνση, από την κυκλοφορία, των γηρασμένων ερυθροκυττάρων και κυστιδίων [58]. Παρόλα αυτά, με τη συνεχή αποβολή κυστιδίων, οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες¹²⁴ αλλάζουν στην πορεία της γήρανσης (μείωση των τιμών του δείκτη MCV (mean corpuscular volume, μέσος όγκος ερυθροκυττάρων)¹²⁵, κάτι που είναι απόλυτα λογικό, αφού το ερυθροκύτταρο

¹²⁴ Γνωρίζοντας τον αριθμό των ερυθροκυττάρων, τον αιματοκρίτη και την αιμοσφαιρίνη, μπορεί να γίνει αναγωγή σε ορισμένες σταθερές ερυθροκυττάρων, που είναι ανεξάρτητες από αυθαίρετες τιμές και μπορούν να θεωρηθούν ως τιμές «απόλυτες», δηλαδή ως απόλυτοι δείκτες (δείκτες του Wintrobe), και ονομάζονται ερυθροκυτταρικοί δείκτες. Τέτοιοι είναι οι εξής: ο μέσος όγκος ερυθροκυττάρων (MCV, mean corpuscular volume), η μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης ανά ερυθρό αιμοσφαίριο (MCH, mean corpuscular hemoglobin), η μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration), το εύρος κατανομής του όγκου των ερυθροκυττάρων (RDW, red cell distribution width).

¹²⁵ Ο ερυθροκυτταρικός δείκτης MCV (mean corpuscular volume, μέσος όγκος ερυθροκυττάρων) δείχνει το μέσο μέγεθος των ερυθροκυττάρων. Υπολογίζεται διαιρώντας τον αιματοκρίτη με τον ολικό αριθμό των

χάνει συνεχώς μεμβράνη, άρα συρρικνώνεται) και η πυκνότητα των κυττάρων αυξάνεται σταδιακά, με ταυτόχρονη μείωση της ελαστικότητας της μεμβράνης τους. Οι μεταβολές αυτές αξιολογούνται ως καθοριστικοί παράγοντες της πρόωρης *in vivo* απομάκρυνσης των ερυθροκυττάρων [54].

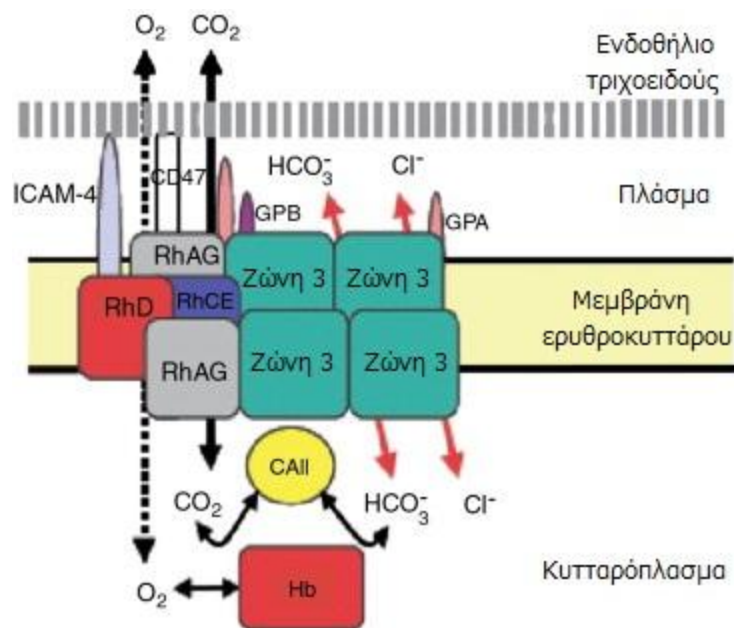
5. 4. Το οξειδωτικό στρες και η πρωτεΐνη-ζώνη 3 στη γήρανση

Τα τελευταία χρόνια θεωρείται πλέον κοινώς αποδεκτό, ότι η δέσμευση φυσιολογικών αυτοαντισωμάτων¹²⁶ σε γηρασμένα ερυθροκύτταρα σχετίζεται και πυροδοτείται από μεταβολές στην πρωτεΐνη-ζώνη 3 (κύρια πρωτεΐνη της μεμβράνης και ανταλλάκτης ανιόντων του ερυθρού αιμοσφαιρίου). Η πρωτεΐνη-ζώνη 3 βρίσκεται στο κέντρο ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες Rhesus, τις σχετιζόμενες με τις πρωτεΐνες Rhesus, πρωτεΐνες CD47¹²⁷, και τον μεταφορέα γλυκόζης (Εικόνα 12) [55]. Η πρωτεΐνη-ζώνη 3 έχει, γενικά, ρόλο «κλειδί» στη ρύθμιση της δομής και της λειτουργίας του ερυθρού αιμοσφαιρίου [27].

ερυθροκυττάρων και πολλαπλασιάζοντας το αποτέλεσμα με 10. Φυσιολογικές θεωρούνται οι τιμές MCV από 80 fL έως 99 fL.

¹²⁶ Αντισώματα που εμφανίζονται χωρίς την παρουσία (ξένων) αντιγόνων και «επιτίθενται» στους ιστούς του ίδιου του οργανισμού.

¹²⁷ Το CD47 βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα. Η λειτουργία της δεν έχει διευκρινιστεί, αλλά σχετίζεται με το σύστημα Rhesus.



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση του συμπλέγματος πρωτεΐνης-ζώνης 3 – Rh. Τα τετραμερή της πρωτεΐνης-ζώνη 3 λειτουργούν ως ανιόντοανταλλάκτες και οι πρωτεΐνες της οικογένειας Rh ως διάλυοι $\text{CO}_2 - \text{O}_2$. Το CO_2 μετατρέπεται σε HCO_3^- από την CAII (carbonic anhydrase II, καρβονική ανυδράση II) [27].

Η γήρανση των ερυθροκυττάρων σχετίζεται με αλλαγές στη λειτουργία της πρωτεΐνης-ζώνη 3, όπως είναι η μείωση στην ικανότητα μεταφοράς θειικών αλάτων και οι μεταβολές στα χαρακτηριστικά σύνδεσης της αγκυρίνης και στη συνδεσιμότητα της GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, γλυκεραλδεΐδη 3-φωσφορική δεϋδρογενάση)¹²⁸ [27]. Μελέτες πάνω στην αναστολή πεπτιδίων δείχνουν πως αλλαγές στη διαμόρφωση σχετικά μικρών περιοχών αμινοξέων στις περιοχές N-terminal (αμινοτελικό άκρο)¹²⁹ και C-terminal (καρβοξυτελικό άκρο)¹³⁰ του μεμβρανικού τμήματος της πρωτεΐνης-ζώνη 3,

¹²⁸ Είναι ένα κρίσιμο ένζυμο στη διαδικασία της γλυκόλυσης. Πιο συγκεκριμένα, το GAPDH (ή G3PDH) είναι ένα από τα βασικά μεταβολικά προϊόντα του καταρράκτη της γλυκόλυσης, μετατρέποντας την γλυκόζη σε ενέργεια και μόρια άνθρακα. Εκτός από τη γνωστή και σημαντική της μεταβολική λειτουργία, πρόσφατα έχει συσχετιστεί και με μη μεταβολικές διεργασίες, όπως η ενεργοποίηση της μεταγραφής και η σηματοδότηση της απόπτωσης.

¹²⁹ Αμινοτελικό άκρο μιας πεπτιδικής αλυσίδας είναι το άκρο της που φέρει την αμινομάδα.

¹³⁰ Καρβοξυτελικό άκρο μιας πεπτιδικής αλυσίδας είναι το άκρο της που φέρει την ελεύθερη α-καρβοξυλική ομάδα.

δημιουργούν ένα συγκεκριμένο νεοαντιγόνο (αντιγόνο γήρανσης των κυττάρων), το οποίο αναγνωρίζεται από αυτόλογες IgGs. Μορφές της πρωτεΐνης-ζώνη 3 ή συμπλεγμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη-ζώνη 3, μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες αντιδρούν με αντισώματα, έχουν περιγραφεί ως ειδικές για γηρασμένα ερυθροκύτταρα [55]. Παρόλα αυτά, τα παραπάνω δεδομένα δε θεωρούνται επαρκή ώστε να αιτιολογηθεί αν οι κρίσιμες αλλαγές που οδηγούν σε δραστηριοποίηση των αντιγόνων γήρανσης των κυττάρων, προκαλούνται από την αποδόμηση της πρωτεΐνης-ζώνη 3 ή από τη σύνδεσή της με άλλα μόρια [27, 55].

Πολλές έρευνες υποστηρίζουν την παρατήρηση ότι, σε γηρασμένα ερυθροκύτταρα, η πρωτεΐνη-ζώνη 3 σχηματίζει συμπλέγματα, τα οποία αναγνωρίζονται από τα αντισώματα που παρατηρούνται φυσιολογικά [27]. Ο μηχανισμός του σχηματισμού των συμπλεγμάτων αυτών δεν είναι ακόμα απολύτως κατανοητός, φαίνεται όμως να οφείλεται στις οξειδωτικές βλάβες και στο σχηματισμό και πολυμερισμό αιμοχρωμάτων (hemichromes)¹³¹ με το κυτταροπλασματικό τμήμα της πρωτεΐνης-ζώνη 3 [27, 59].

Το ερυθρό αιμοσφαίριο είναι συνεχώς εκτεθειμένο σε μια εισροή οξυγόνου. Κατά τη δέσμευσή του, ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται από το μόριο του σιδήρου στο δεσμευμένο οξυγόνο, ώστε να σχηματισθεί ένα ανιοντικό σύμπλοκο σιδηρούχου υπεροξειδίου. Το ηλεκτρόνιο αυτό κανονικά επιστρέφει στο σίδηρο μετά την απελευθέρωση του οξυγόνου, όμως κάποιες φορές, και κάτω από ορισμένες συνθήκες, το ηλεκτρόνιο δεσμεύεται από οξυγόνο, σχηματίζοντας O_2^- (υπεροξειδίου) και αφήνοντας το σίδηρο με ένα ηλεκτρόνιο λιγότερο στη τρισθενή του μορφή, μετατρέποντας την Hb σε met-Hb [3]. Αυτή η αυτό-οξείδωση της Hb μετατρέπει περίπου το 2% της Hb σε met-Hb κάθε ημέρα [27]. Η met-Hb, η οποία περιέχει ένα ιόν Fe^{3+} , κανονικά μετατρέπεται πάλι στη λειτουργική μορφή της Hb, μέσω του μηχανισμού της met-Hb ρεδοκτάσης, ένα NAD/NADH¹³² βασιζόμενο

¹³¹ Συμπλέγματα σιδήρου-πορφυρίνης, τα οποία προέρχονται από την Hb.

¹³² Το δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου-αδενίνης (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) είναι ένα συνένζυμο που βρίσκεται σε όλα τα ζωντανά κύτταρα. Στο μεταβολισμό εμπλέκεται σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, μεταφέροντας ηλεκτρόνια από τη μία αντίδραση στην άλλη. Για το λόγο αυτό, το συνένζυμο βρίσκεται σε δύο μορφές στα κύτταρα. Το NAD είναι ένας οξειδωτικός παράγοντας, ο οποίος δέχεται ηλεκτρόνια από άλλα

σύστημα. Παρόλα αυτά, η met-Hb μπορεί επίσης να συσσωρευτεί στο εσωτερικό της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, όπου μπορεί να συμβάλλει στην περαιτέρω δημιουργία ελεύθερων ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species - ROS)¹³³ μέσω των αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss¹³⁴. Αυτή η τοπική παραγωγή ROS μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα επιβλαβής για τις πρωτεΐνες, οδηγώντας στην εκκαθάρισή τους ή στη μετάλλαξή τους, ενώ μπορεί να επιδράσει και στην ίδια τη μεμβράνη, μέσω της υπεροξειδωσής λιπιδίων. Η διαδικασία αυτή μπορεί να ταυτοποιηθεί εύκολα με την ανίχνευση αιμοχρωμάτων σε καθαρή, απομονωμένη ερυθροκυτταρική μεμβράνη (ghosts) (δηλαδή μέσω της ανίχνευσης προϊόντων που προέρχονται από την Hb, τα οποία βρίσκονται συνδεδεμένα στην εσωτερική επιφάνεια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης) [27].

Το σύστημα της met-Hb ρεδουκτάσης συμπληρώνεται από ένα περίπλοκο αντιοξειδωτικό σύστημα, είτε ενζυμικό, είτε μεταβολικό. Το ένζυμο που είναι κυρίως υπεύθυνο για την αντιοξειδωτική άμυνα του ερυθροκυττάρου, είναι η καταλάση¹³⁵, η οποία μετατρέπει το H₂O₂ (υπεροξειδίο του υδρογόνου), που προέρχεται από την αυθόρμητη ή ενζυματικά καταλυμένη οξειδοαναγωγή του O₂⁻ σε O₂ και H₂O [27]. Η καταλάση ανακυκλώνεται και είναι ανεξάρτητη από άλλους παράγοντες, όμως μπορεί να απενεργοποιηθεί μετά από αντίδραση με περίσσεια O₂⁻. Η SOD καταλύει την μετατροπή του O₂⁻ σε H₂O₂ και O₂. Η SOD επίσης ανακυκλώνεται κατά την καταλυτική διαδικασία. Οι υπεροξυρεδουξίνες

μόρια. Αυτή η αντίδραση σχηματίζει το NADH, το οποίο μπορεί να δώσει ηλεκτρόνια. Αυτές οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι η βασική λειτουργία του NAD/NADH. Ωστόσο, χρησιμοποιείται και σε άλλες κυτταρικές διαδικασίες. Η σημαντικότερη είναι ότι αποτελεί υπόστρωμα των ενζύμων, που προσθέτουν ή αφαιρούν χημικές ομάδες από πρωτεΐνες, κατά τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

¹³³ Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παράγονται ως υποπροϊόντα, κατά τη διάρκεια παραγωγής ενέργειας με τη χρήση οξυγόνου. Είναι μόρια με ένα ασύζευκτο, υψηλά ενεργό, ηλεκτρόνιο. Για να εξισορροπήσουν τη δομή τους, αποσπούν ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια, μετατρέποντας τα μόρια αυτά σε ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα να ξεκινούν μια καταστρεπτικά ενεργή αλυσίδα και να προκαλούν έτσι βλάβη σε μεγάλης σημασίας κυτταρικές δομές (πρωτεΐνες, κυτταρική μεμβράνη, DNA).

¹³⁴ Τα στοιχεία μετάπτωσης (κυρίως ο σίδηρος, ο χαλκός, το χρώμιο, το βανάδιο και το κοβάλτιο) μπορούν να λειτουργήσουν ως οξειδοαναγωγικοί παράγοντες, προσλαμβάνοντας ή προσφέροντας ηλεκτρόνια σε άλλα μόρια. Η δράση αυτή καταλύει το σχηματισμό αντιδραστικών ριζών, στις οποίες ανήκουν και οι ROS. Η πιο σημαντική αντίδραση, γνωστή ως αντίδραση Haber-Weiss, είναι αυτή κατά την οποία η ρίζα υδροξυλίου παράγεται από ανηγμένο σίδηρο και υπεροξειδίο του υδρογόνου: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH$.

¹³⁵ Ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του διοξειδίου του άνθρακα σε νερό και οξυγόνο. Το ένζυμο αυτό ανευρίσκεται σε όλους τους οργανισμούς που χρησιμοποιούν οξυγόνο, εκτός από λίγα αναερόβια βακτήρια.

(peroxiredoxins) καταλύουν τη μείωση του H₂O₂ και ορισμένων οξέων. Υπάρχουν δύο τάξεις υπεροξυρεδοξινών, οι 1-Cys υπεροξυρεδοξίνες, που ανακυκλώνονται από σουλφιρεδοξίνες με NAD/NADH εξαρτώμενο τρόπο, και οι 2-Cys υπεροξυρεδοξίνες, που αυτοανακυκλώνονται κατά τη διάρκεια της καταλυτικής διαδικασίας με NAD/NADH εξαρτώμενο τρόπο. Οι υπεροξυρεδοξίνες μπορούν να απενεργοποιηθούν μη αναστρέψιμα από περίσσεια ROS. Τέλος, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης¹³⁶ καταλύει τη μετατροπή του H₂O₂ σε νερό και ανακυκλώνεται από το σύστημα γλουταθειόνης – ρεδοκτάσης, με NADH εξαρτώμενο τρόπο [27].

Μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές άμυνες σχετίζονται κυρίως με τη γλουταθειόνη, η οποία αντιδρά με ROS προς σχηματισμό οξειδωμένης γλουταθειόνης (glutathione disulfide, GSSG)¹³⁷, και άρα αποτελούν μία οξειδοαναγωγική «δικλείδα ασφαλείας» για όλα τα κύτταρα. Η GSSG ανακυκλώνεται πάλι σε GSH από το σύστημα της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης, με NADPH εξαρτώμενο τρόπο. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ισορροπία GSH/GSSG ευνοεί την GSH, προσδίδοντας στο κύτταρο αποτελεσματική προστασία κατά της οξείδωσης. Με διαφοροποίηση όμως των συνθηκών, ο λόγος GSH/GSSG μειώνεται, κάτι που δείχνει πως το οξειδωτικό στρες έχει υπερβεί τις αντιοξειδωτικές άμυνες. Άλλη μία σημαντική συνιστώσα του μη ενζυμικού αντιοξειδωτικού συστήματος είναι το ασκορβικό οξύ¹³⁸, το οποίο μειώνει ορισμένες ελεύθερες ρίζες και ανακυκλώνεται μέσω πολλών ενζυμικών συστημάτων, με GSH ή NADH εξαρτώμενο τρόπο [27].

Όπως περιγράφηκε, τα ερυθρά αιμοσφαίρια βρίσκονται συνεχώς κάτω από καταστάσεις οξειδωτικού στρες, λόγω της μεγάλης εισροής οξυγόνου και των

¹³⁶ Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που προστατεύει τις ενδοκυτταρικές δομές από την επιβλαβή οξειδωτική δράση των ελεύθερων ριζών.

¹³⁷ Τόσο η ενζυμική (δια των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης), όσο και η μη ενζυμική αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών από την αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH) οδηγεί σε παραγωγή οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG). Η GSSG απομακρύνεται από το κύτταρο, με αποτέλεσμα μείωση της ολικής ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης. Προκειμένου η γλουταθειόνη να εκπληρώσει το ρόλο της ως αντιοξειδωτική ουσία, απαιτείται η διατήρηση υψηλής ενδοκυτταρικής αναλογίας αναχθείσας (GSH) προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG).

¹³⁸ Είναι η βιταμίνη C. Είναι μια υδατοδιαλυτή ουσία, που μοιάζει με υδαάνθρακα και λαμβάνει μέρος σε διαδικασίες του μεταβολισμού, κυρίως των ζωικών οργανισμών.

αυτοοξειδωτικών διαδικασιών. Το κύριο και άμεσα εμφανές χαρακτηριστικό των οξειδωμένων ερυθροκυττάρων είναι η συσσώρευση οξειδωμένης, μετουσιωμένης Hb στην εσωτερική πλευρά της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Αυτές οι προερχόμενες από τις Hb ενώσεις, θεωρούνται διασταυρωμένα τμήματα Hb, αναστρέψιμα ή μη αναστρέψιμα συνδεδεμένα με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως η σπεκτρίνη. Επομένως, ο σχηματισμός αυτών των αιμοχρωμάτων είναι άμεσα υπεύθυνος για μεταβολές της πλαστικότητας του κυτταροσκελετού και αυξημένη ακαμψία του ερυθροκυττάρου [27].

Τα αιμοχρώματα επίσης θεωρείται πως προάγουν το σχηματισμό συσσωματωμάτων πρωτεΐνης-ζώνη 3. Το κυτταροπλασματικό μέρος της πρωτεΐνης-ζώνη 3 είναι κύριο κέντρο οργάνωσης για τα ερυθροκύτταρα και σημείο σύνδεσης για μια σειρά πρωτεϊνών που σχετίζονται με την μεμβράνη (όπως η πρωτεΐνες 4.1 και 4.2), για γλυκολυτικά ένζυμα (όπως η γλυκεραλδεΐδη 3-φωσφορική δεϋδρογενάση, η φωσφοφρουκτοκινάση και η αλδολάση¹³⁹), καθώς και για αιμοχρώματα, για την Hb και τις ορισμένες πρωτεΐνες. Οι επιβλαβείς ιδιότητες των αιμοχρωμάτων οδηγούν στο σχηματισμό πολυμερών, τα οποία προάγουν τη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης-ζώνη 3 στη μεμβράνη. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη-ζώνη 3 φαίνεται πως υπάρχει στη μεμβράνη του ερυθρού αιμοσφαιρίου ως ένα τετραμερές μαζί με πρωτεΐνες Rh (*Εικόνα 12*) [27].

Όταν τα αιμοχρώματα συσσωρεύονται και συνδέονται με την πρωτεΐνη-ζώνη 3, τότε παρατηρείται συσσωμάτωση της πρωτεΐνης με τη μεμβράνη [27]. Ο ρόλος αυτών των συσσωματωμάτων στη γήρανση και στην εκκαθάριση των ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία του αίματος, έχει περιγραφεί από πολλούς ερευνητές [27, 60–68]. Τα μοντέλα που εμφανίζονται πιο ολοκληρωμένα υποστηρίζουν πως η συσσωμάτωση της πρωτεΐνης-ζώνη 3 αναγνωρίζεται από αυτοαντισώματα, τα οποία εμφανίζονται φυσικά στο αίμα. Αυτές οι IgGs φαίνεται πως έχουν χαμηλή συγγένεια με την φυσιολογική πρωτεΐνη-ζώνη 3, αλλά πολλή

¹³⁹ Η αλδολάση είναι ένα ένζυμο, που βοηθά στη μετατροπή της γλυκόζης σε ενέργεια. Βρίσκεται σε όλο το σώμα, αλλά σε υψηλά επίπεδα απαντάται κυρίως στον μυϊκό ιστό.

μεγαλύτερη (περίπου 3 φορές) συγγένεια με τη συσσωματωμένη πρωτεΐνη, πιθανότατα λόγω των μορφολογικών αλλαγών που έχουν υποστεί τα εξωκυτταρικά τμήματα της πρωτεΐνης-ζώνη 3 μετά τη διαδικασία της συσσωμάτωσης [27]. Ένα μοντέλο που έχει προταθεί, υποστηρίζει πως τα αυτοαντισώματα αυτά, τα οποία δε βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες, δεν είναι ικανά από μόνα τους να προκαλέσουν οψωνισμό, αλλά χρειάζονται την ταυτόχρονη εναπόθεση συμπληρώματος C3b για να τον πραγματοποιήσουν [27, 69–72].

Το οξειδωτικό στρες θεωρείται πως παίζει και άλλο ρόλο στη γήρανση των ερυθροκυττάρων. Μελέτες υποστηρίζουν ότι το οξειδωτικό στρες μπορεί άμεσα να ενεργοποιήσει προ-αποπτωτικούς πρωτεολυτικούς¹⁴⁰ μηχανισμούς, όπως είναι οι μηχανισμοί των κασπασών. Έχει όντως αποδειχθεί πως τα ερυθροειδή προγονικά κύτταρα είναι εξοπλισμένα με ένα λειτουργικό μηχανισμό κασπασών, ο οποίος συμμετέχει στον τερματισμό της διαφοροποίησης των ερυθροκυττάρων [27]. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών δε βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία. Ορισμένες μελέτες, ενώ ανίχνευσαν την ύπαρξη κασπασών 3 και 8 (για παράδειγμα), σε ώριμα ερυθροκύτταρα, δεν κατάφεραν να καταγράψουν κάποια δραστηριότητά τους στα γηρασμένα ερυθρά αιμοσφαίρια [27, 73–77]. Αντίθετα, άλλες έρευνες φέρονται να ανίχνευαν δραστηριότητα των κασπασών, όπως για παράδειγμα η μελέτη των *Ficarra et al.* [78], η οποία έδειξε πως ενεργή κασπάση 3 επέδρασε στην κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης-ζώνη 3, οδηγώντας σε μεταβολές στη μεταφορά ανιόντων, καθώς και σε τροποποιήσεις της μεμβράνης [27, 78].

Συνοψίζοντας, ο σχηματισμός αιμοχρωμάτων στη ερυθροκυτταρική μεμβράνη προκαλεί συσσωμάτωση της πρωτεΐνης-ζώνη 3, τα συσσωματώματα της οποίας αναγνωρίζονται από αυτοαντισώματα που έχουν υποδοχέα¹⁴¹ για την

¹⁴⁰ Με τον όρο πρωτεόλυση ή πρωτεϊνόλυση (proteolysis) χαρακτηρίζεται στη βιοχημεία το σύνολο των αντιδράσεων αποδόμησης των συμπλόκων πρωτεϊνικών ουσιών. Η διάσπαση αυτή των μορίων της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών τους. Στο ζωντανό κύτταρο η πρωτεϊνόλυση εξασφαλίζεται από ειδικά ένζυμα που εξ αυτού και ονομάζονται πρωτεολυτικά ένζυμα (ενδοπεπτιδάσες και εξωπεπτιδάσες).

¹⁴¹ Οι μεμβρανικοί υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες συνδέονται σε ορισμένη θέση (που βρίσκεται στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης).

πρόσδεση του C3b και άρα ενεργοποιούν το εναλλακτικό μονοπάτι εκκαθάρισης του συμπληρώματος. Η τελική εκκαθάριση των ερυθροκυττάρων πραγματοποιείται μέσω της φαγοκυττάρωσης. Άλλοι μηχανισμοί γήρανσης και εκκαθάρισης έχουν προταθεί, ερευνηθεί και συνεχίζουν να μελετώνται, όπως η αποδόμηση της πρωτεΐνης-ζώνη 3 στο κυτταροπλασματικό τμήμα της μεμβράνης, μέσω της ενεργοποίησης κασπασών, ως αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες [27].

5. 5. Ερύπτωση

Η εισαγωγή του όρου ερύπτωση ή ερυθρόπτωση έγινε μόλις πριν λίγα χρόνια και περιγράφει μία σειρά μηχανισμών που λειτουργούν μέσα στα ερυθροκύτταρα, ως απάντηση σε διάφορες στρεσογόνες καταστάσεις. Αυτοί οι μηχανισμοί φέρουν πολλές ομοιότητες με τα κλασικά μονοπάτια της απόπτωσης [27, 79, 80]. Τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια υποβάλλονται σταδιακά σε γήρανση, με αποτέλεσμα την τελική εκκαθάρισή τους, έτσι ώστε ο χρόνος ζωής τους να διαρκεί περίπου 120 ημέρες [79]. Όμως, κάποιες φορές και κάτω από ορισμένες συνθήκες, πριν τη γήρανση τα ερυθροκύτταρα οδηγούνται, υπό μία έννοια, σε «αυτοκτονία» μέσω του μηχανισμού της ερύπτωσης [53, 79]. Η διαδικασία αυτή μοιάζει με αυτή της απόπτωσης. Παρόλα αυτά, καθώς τα ερυθρά αιμοσφαίρια δε διαθέτουν πυρήνα και μιτοχόνδρια, οργανίδια βασικά για την εκτέλεση της απόπτωσης, αρκετά χαρακτηριστικά της απόπτωσης δεν εμφανίζονται κατά την ερύπτωση [79]. Όμως, η απόπτωση και η ερύπτωση, μοιράζονται άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά, όπως είναι η συρρίκνωση των κυττάρων, η αποδόμηση και κυστιδιοποίηση της μεμβράνης και η έκθεση PS στην επιφάνεια του κυττάρου [53, 79, 80]. Η σήμανση της ερύπτωσης συμπεριλαμβάνει το σχηματισμό E₂ προσταγλανδίνης (prostaglandin E₂, PGE₂)¹⁴², με επακόλουθη ενεργοποίηση των

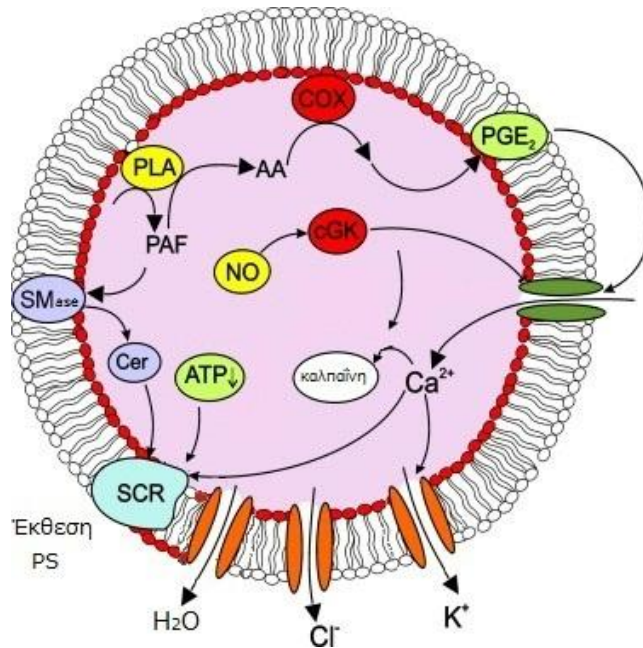
¹⁴² Σε περίπτωση ασθένειας τα λευκά αιμοσφαίρια στέλνουν χημικές ουσίες, τις κυτταροκίνες, να ελέγξουν τις άμυνες του οργανισμού. Οι αγγελιαφόροι αυτοί δίνουν εντολή στα αιμοφόρα αγγεία του εγκεφάλου να παράξουν νέα ορμόνη, την προσταγλανδίνη E₂. (Είναι γνωστό ότι η προσταγλανδίνη E₂ δρα στον υποθάλαμο, μια περιοχή του εγκεφάλου που ελέγχει βασικές λειτουργίες, όπως την κατανάλωση φαγητού και ποτού, τη σεξουαλική λειτουργία, τη θερμοκρασία σώματος κτλ).

διαύλων κατιόντων και την είσοδο στο κύτταρο Ca^{2+} ή/ και απελευθέρωση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet activating factor, PAF)¹⁴³, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της σφινγομυελινάσης (sphingomyelinase, SMase)¹⁴⁴ και το σχηματισμό κεραμιδίου (ceramide, Cer)¹⁴⁵ [27, 80]. Το Ca^{2+} και το κεραμίδιο αποτελούν ερέθισμα για την αποδόμηση της κυτταρικής μεμβράνης. Το Ca^{2+} ενεργοποιεί, ευαίσθητους στο Ca^{2+} , διαύλους K^+ , οδηγώντας σε απώλεια χλωριούχου καλίου (KCl) από το κύτταρο, με ταυτόχρονη οσμωτική έξοδο νερού και συνεπώς συρρίκνωση του κυττάρου. Επίσης, διεγείρει την πρωτεάση καλπαΐνη, με αποτέλεσμα την αποδόμηση του κυτταροσκελετού [53, 80]. Η έκθεση της PS οφείλεται στην φωσφολιπιδική αποδόμηση της μεμβράνης, η οποία πιθανώς είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης ευαίσθητων στο Ca^{2+} ενζύμων αποδόμησης ή/ και αναστολής μίας, ευαίσθητης στο Ca^{2+} και εξαρτημένης από το ATP, αμινοφωσφολιπιδικής τρανσλοκάσης [80]. Τα διαπερατά από το Ca^{2+} κανάλια κατιόντων ενεργοποιούνται από την οξείδωση, άρα η ερύπτωση είναι ευαίσθητη στο οξειδωτικό στρες [53]. Μια συνοπτική, σχηματική περιγραφή των αλληλεπιδράσεων αυτών παρουσιάζεται στην [Εικόνα 13]. Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε ΣΕ που περιείχαν ένα μείγμα τόσο νέων, όσο και γηρασμένων κυττάρων. Έτσι, δεν είναι αποδεδειγμένο εάν τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα (και κατά συνέπεια και τα αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια) είναι πιο ευαίσθητα σε σήματα ερύπτωσης. Παρόλα αυτά, υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι όντως η ερύπτωση είναι αυξημένη σε γηρασμένα ερυθροκύτταρα [53].

¹⁴³ Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων αποτελεί λιποειδική ένωση που ανήκει στην τάξη των φωσφολιπιδίων. Είναι ένας πανίσχυρος ενεργοποιητής και μεσολαβητής πολλών λειτουργιών των λευκών αιμοσφαιρίων. Προκαλεί συγκόλληση των αιμοπεταλίων, διαστολή των αιμοφόρων αγγείων, ερεθισμό και αναφυλαξία. Επιπλέον, συμμετέχει στους μηχανισμούς της αιμόστασης.

¹⁴⁴ Η σφινγομυελινάση (sphingomyelinase, SMase) είναι ένα υδρολυτικό ένζυμο, που συμμετέχει στις αντιδράσεις μεταβολισμού των σφινγολιπιδίων. Είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση της σφινγομυελίνης (SM) σε φωσφοχολίνη και κεραμίδιο.

¹⁴⁵ Λιπίδιο που αποτελείται από σφινγοσίνη και ένα λιπαρό οξύ. Τα κεραμίδια αποτελούν σημαντικό συστατικό των μεμβρανών με ρόλο και στη μεταφορά μηνυμάτων από τη μεμβράνη στο εσωτερικό του κυττάρου.



Εικόνα 13: Η σηματοδότηση της διέγερσης ή αναστολής της ερύπτωσης. Η σήμανση περιλαμβάνει σχηματισμό PGE₂, με ακόλουθη αύξηση της εισόδου Ca²⁺ και απελευθέρωση PAF, κάτι που ενεργοποιεί την SMase και το Cer. Το Cer, το Ca²⁺ και η μείωση του ATP ενεργοποιούν την SCR (scramblase, σκραμπλάση) και άρα την έκθεση PS. Το Ca²⁺ οδηγεί σε απώλεια K⁺ και Cl⁻, με ταυτόχρονη οσμωτική έξοδο H₂O και επίσης διεγείρει την καλπαΐνη, οδηγώντας σε συρρίκνωση του κυττάρου και αποδόμηση του κυτταροσκελετού αντίστοιχα. Στις διαδικασίες επίσης συμμετέχουν: το AA (arachidonic acid, αραχιδονικό οξύ), cGK (cyclic GMP dependent protein kinase type I, κυκλική GMP-εξαρτώμενη πρωτεΐνη κινάση τύπου I), COX (cyclooxygenase, κυκλοξυγενάση), NO, PLA (phospholipase A, φωσφολιπάση A) [81, 82].

5. 5. 1. Μηχανισμοί που πυροδοτούν και συμβάλλουν στην ερύπτωση

α) Ασβέστιο

Η ερύπτωση προκαλείται από μία αύξηση στη δραστηριότητα του Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα. Το Ca²⁺ αποτελεί ερέθισμα για την κυστιδιοποίηση της μεμβράνης [80]. Προκαλεί αποδόμηση της μεμβράνης και ενεργοποιεί την καλπαΐνη της κυστεΐνης ενδοπεπτιδάσης, ένα ένζυμο που αποδομεί πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και άρα προκαλεί κυστιδιοποίηση της μεμβράνης [79, 80]. Το Ca²⁺ επίσης ενεργοποιεί Ca²⁺-ευαίσθητα κανάλια K⁺, με συνέπεια την εκροή K⁺, την

υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και την απώλεια Cl⁻ από το κύτταρο, λόγω του αυξημένου ηλεκτρικού φορτίου (gradient) [79]. Η απώλεια KCl από το εσωτερικό του κυττάρου ακολουθείται από έξοδο H₂O, λόγω όσμωσης. Συνεπώς, έχουμε συρρίκνωση του ερυθροκυττάρου [79, 80].

Η αύξηση της δραστηριότητας του Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα ίσως είναι αποτέλεσμα ενεργοποίησης μη επιλεκτικών καναλιών κατιόντων, που μεσολαβούν για την είσοδο Ca²⁺ στο κύτταρο [79, 80]. Η μοριακή ταυτότητα αυτών των καναλιών κατιόντων δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστή, φαίνεται όμως πως ενεργοποιούνται από μία μεγάλη ποικιλία παραγόντων, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται το οσμωτικό σοκ¹⁴⁶, το οξειδωτικό στρες και η απώλεια Cl⁻ [79]. Το υπεροσμωτικό σοκ επηρεάζεται, τουλάχιστον εν μέρει, από τη διέγερση της κυκλοξυγενάσης (cyclooxygenase, COX)¹⁴⁷, με αποτέλεσμα τη δημιουργία προσταγλανδίνης E₂, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί το κανάλι κατιόντων [Εικόνα 13] [79].

β) Κεραμίδιο

Η ευαισθησία που παρουσιάζει η αποδόμηση και η συρρίκνωση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης στο Ca²⁺, ενισχύεται από το κεραμίδιο, το οποίο παρομοίως αποτελεί ερέθισμα για την ερυθρόπτωση. Το κεραμίδιο μπορεί να παράγεται από τη σφιγγομυελίνη¹⁴⁸ της κυτταρικής μεμβράνης, μέσω της σφιγγομυελινάσης, η οποία έχει την ικανότητα είτε να εκφράζεται στα ερυθροκύτταρα, είτε να απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και να δρα από τον εξωκυττάριο χώρο [79]. Ο σχηματισμός του κεραμιδίου μπορεί να διεγερθεί από

¹⁴⁶ Είναι η αιφνίδια αραίωση του διαλύματος που περιέχει τα κύτταρα με καθαρό νερό. Προκαλεί διαφορά πίεσης, που οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση αλάτων στο εσωτερικό των κυττάρων, ροή νερού στο εσωτερικό και διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος με την ταυτόχρονη έκλυση των συστατικών του κυττάρου.

¹⁴⁷ Η παραγωγή των προσταγλανδινών εξαρτάται απόλυτα από την κυκλοξυγενάση. Η κυκλοξυγενάση είναι ένα ένζυμο που αποτελείται από έναν εσωτερικό υδρόφοβο κεντρικό δίαυλο του οποίου η μία άκρη διαθέτει είσοδο που βλέπει προς την κυτταρική μεμβράνη, ενώ η άλλη καταλήγει σε κάμψη. Η κυκλοξυγενάση αποτελείται από τρία διαφορετικά τμήματα: α) το N-τελικό τμήμα, β) το τμήμα που συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη και γ) το C-τελικό τμήμα που περιέχει τις δραστικές περιοχές της. Στο κέντρο βρίσκεται ένας δακτύλιος αίμης.

¹⁴⁸ Είναι φωσφολιπίδιο, του οποίου η αλκοόλη είναι η σφιγγοσίνη και η βάση η χολίνη. Βρίσκεται στον εγκέφαλο και στα ερυθρά αιμοσφαίρια.

τον PAF, ο οποίος με τη σειρά του σχηματίζεται από λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, από την φωσφολιπάση [79, 80]. Η φωσφολιπάση ενεργοποιείται και με τον τρόπο αυτό απελευθερώνεται PAF, μετά από οσμωτική συρρίκνωση του ερυθροκυττάρου. Καθώς τα ερυθρά αιμοσφαίρια εκφράζουν υποδοχείς PAF, η ταυτόχρονη παρουσία ερυθροκυττάρων και PAF διεγείρει το σχηματισμό κεραμιδίου. Πειράματα σε ποντίκια έχουν αποδείξει το μηχανισμό αυτό, καθώς γενετικά τροποποιημένα ποντίκια με έλλειψη υποδοχέων PAF, δεν παρουσιάζουν ευαισθησία στην επίδραση του PAF στο σχηματισμό κεραμιδίου και στην ερύπτωση [79]. Η ερύπτωση, μετά από εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων, συμπεριλαμβάνει την ενεργοποίηση PKC (protein kinase C, πρωτεΐνη κινάση C)¹⁴⁹ και PKC-εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών της μεμβράνης, επιτρέποντας την είσοδο Ca^{2+} [80].

γ) Οξειδωτικό στρες

Η ερύπτωση ενεργοποιείται περαιτέρω μετά από οξειδωτικό στρες ή μετά από βλάβη στην αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου [79]. Η οξείδωση ενεργοποιεί τα διαπερατά από το Ca^{2+} κανάλια κατιόντων, άρα αποτελεί ερέθισμα για την είσοδο Ca^{2+} στο κύτταρο. Επίσης, ενεργοποιεί τα κανάλια Cl^- του ερυθροκυττάρου, συμβάλλοντας στη συρρίκνωση του κυττάρου και κατά συνέπεια στην ερύπτωση. Επιπλέον, η οξείδωση ενεργοποιεί κασπάσες ευαίσθητες σε αυτήν, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν διέγερση της ερύπτωσης, αν και δεν είναι απαραίτητες για την πραγματοποίησή της μετά την είσοδο του Ca^{2+} στο κύτταρο [79, 80].

δ) Άλλοι μηχανισμοί

Μια μεγάλη ποικιλία άλλων μηχανισμών συμμετέχουν στην πυροδότηση και στη ρύθμιση της ερύπτωσης. Το οσμωτικό σοκ, το οξειδωτικό στρες και η μείωση των ενεργειακών αποθεμάτων αποτελούν γνωστά σήματα ερύπτωσης,

¹⁴⁹ Η πρωτεΐνη κινάση C (protein kinase C, PKC) είναι μια οικογένεια πρωτεΐνης-κινάσης ενζύμων, που συμμετέχουν στον έλεγχο της λειτουργίας άλλων πρωτεϊνών, μέσω της φωσφορυλίωσης των υδρόξυ-ομάδων της σερίνης και της θρεονίνης των πρωτεϊνών αυτών. Τα PKC ένζυμα ενεργοποιούνται μέσω σημάτων, όπως η αύξηση στη συγκέντρωση Ca^{2+} κ.α. Γι' αυτό και τα PKC ένζυμα έχουν σημαντικό ρόλο σε μια σειρά μηχανισμών σηματοδότησης.

όπως και μια σειρά φαρμακευτικών ουσιών, περιβαλλοντικών ρύπων και ενδογενών ουσιών [80].

Η ερύπτωση υποκινείται από την εξάντληση των αποθεμάτων ενέργειας, κάτι που εν μέρει επηρεάζεται από ενεργοποίηση της PKC [79].

Ρύθμιση της ερύπτωσης πραγματοποιείται μέσω μιας σειράς κινασών¹⁵⁰, όπως η cGMP εξαρτώμενη πρωτεΐνη κινάση τύπου I, η AMP-ενεργοποιούμενη κινάση και η Janus κινάση 3 [79].

5. 5. 2. Μηχανισμοί που αναστέλλουν την ερύπτωση

α) Ερυθροποιητίνη

Τα διαπερατά από Ca^{2+} κανάλια, και κατ' επέκταση η ερύπτωση, αναστέλλονται από την ερυθροποιητίνη¹⁵¹, η οποία βελτιώνει το χρόνο ζωής των κυκλοφορούντων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η ορμόνη αυτή αυξάνει τον αριθμό των κυκλοφορούντων ερυθροκυττάρων, όχι μόνο μέσω της αναστολής της απόπτωσης των προγονικών κυττάρων των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αλλά και καθυστερώντας την εκκαθάριση των ώριμων ερυθροκυττάρων. Έκπληξη προκλήθηκε όταν σε πειράματα με ποντίκια, τα οποία χαρακτηρίζονταν από υπερέκκριση ερυθροποιητίνης, παρατηρήθηκε πως τα ερυθρά αιμοσφαίριά τους «πέθαιναν» γρηγορότερα σε ex vivo συνθήκες. Η ερυθροποιητίνη πιθανώς να αποτελεί διεγερτικό ερέθισμα για την έκφραση γονιδίων σε προγονικά κύτταρα, τα οποία ενισχύουν την ερύπτωση και επομένως επισπεύδουν τον ερυθροκυτταρικό θάνατο όταν μειωθεί η συγκέντρωση της ερυθροποιητίνης. Με τον τρόπο αυτό, σε περίπτωση υπέρμετρου αριθμού ερυθροκυττάρων, καθίσταται δυνατή η άμεση και γρήγορη απομάκρυνσή τους, όταν και εάν δεν είναι πλέον χρήσιμα. Σε διαφορετική

¹⁵⁰ Κατηγορία ενζύμων που ανήκουν στις τρανσφεράσες, δηλαδή σε εκείνη την ομάδα ενζύμων που καταλύουν τη μεταφορά λειτουργικών ομάδων μεταξύ ενώσεων που είναι δότες και άλλων ενώσεων που είναι δέκτες. Οι κινάσες είναι υπεύθυνες για τη φωσφορυλίωση, μέσω της μεταφοράς μιας φωσφορικής ομάδας συνήθως από το ATP.

¹⁵¹ Η ερυθροποιητίνη είναι μια ορμόνη που εκκρίνεται από τους νεφρούς και ρυθμίζει την ταχύτητα παραγωγής των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

περίπτωση, τα ερυθροκύτταρα θα παραμείνουν στην κυκλοφορία για περίπου 120 ημέρες [80].

β). Άλλες ουσίες-αναστολείς

Επίσης, τα διαπερατά από Ca^{2+} κανάλια, και κατ' επέκταση η ερύπτωση, αναστέλλονται από μια σειρά ουσιών, όπως είναι η αμιλορίδη (amiloride), η αιθυλισοπροπυλαμίδη (ethylisopropylamiloride, EIPA), καθώς και από τις κατεχολαμίνες, ντοπαμίνη, ισοπροτερενόλη και επινεφρίνη. Επιπροσθέτως, αναστολείς της ερύπτωσης αποτελούν: το φλουφεναμικό οξύ, η αδενοσίνη και το νιτρικό οξείδιο [80].

γ). Νιτρικό Οξείδιο

Το NO είναι ένας ισχυρός αναστολέας της ερύπτωσης. Καθιστά το ερυθροκύτταρο μερικώς ανθεκτικό στην αυξημένη δραστηριότητα του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , η οποία αποτελεί ερέθισμα της ερύπτωσης [79]. Η επίδραση που έχει το NO, οφείλεται μερικώς στην ενεργοποίηση της G κινάσης, η οποία είναι σημαντική για την ερυθροκυτταρική επιβίωση. Μελέτες σε καταλλάγως γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, επιβεβαιώνουν την επιτάχυνση της ερύπτωσης κατά τη μείωση της G κινάσης. Τα ερυθροκύτταρα έχουν την ικανότητα να αποθηκεύουν και να απελευθερώνουν NO, το οποίο δεσμεύεται συνήθως από οξυγονωμένη Hb και απελευθερώνεται από μη οξυγονωμένη Hb [80].

Το ερυθροκυτταρικό NO συμμετέχει στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου¹⁵², με αποτέλεσμα, η διαταραχή σχηματισμού NO σε αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα, τα οποία στερούνται NO, να μπορεί να προκαλέσει αγγειοσυστολή και ισχαιμία μετά την μετάγγιση [80]. Διαταραχές στην απελευθέρωση NO στο ερυθροκύτταρο, μπορεί επιπλέον να συμβάλλουν στην εμφάνιση πνευμονικής υπέρτασης¹⁵³ και

¹⁵² Κατάσταση στην οποία βρίσκονται συνεχώς οι λείες μυϊκές ίνες του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων, η οποία χαρακτηρίζεται από συστολή, άλλοτε μεγαλύτερη και άλλοτε μικρότερη. Οι μεταβολές του αγγειακού τόνου προκαλούν αυξομειώσεις της αρτηριακής πίεσης και της αιμάτωσης διάφορων οργάνων.

¹⁵³ Είναι μια σπάνια πνευμονική διαταραχή, στην οποία η πίεση του αίματος στην πνευμονική αρτηρία αυξάνεται πολύ περισσότερο από τα φυσιολογικά επίπεδα. Ταυτόχρονα, όσο αυξάνεται η πίεση, τα τοιχώματα

διαταραχής στη μικροκυκλοφορία, σε περίπτωση δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, μια νόσος η οποία επίσης συνδέεται με μη φυσιολογική δραστηριότητα των καναλιών Gardos [80].

5. 5. 3. Συνέπειες της ερύπτωσης

Τα ερυθροκύτταρα που εκθέτουν PS, εκκαθαρίζονται γρήγορα από την κυκλοφορία του αίματος. Δεσμεύονται σε αντίστοιχους υποδοχείς των μακροφάγων¹⁵⁴, από τα οποία αφομοιώνονται και διασπώνται. Ως αποτέλεσμα, η υπέρμετρη ερύπτωση οδηγεί σε αναιμία, αν και η αυξημένη απώλεια ερυθροκυττάρων αντισταθμίζεται από παρομοίως αυξημένο σχηματισμό νέων ερυθροκυττάρων, κάτι που είναι εμφανές από τη μέτρηση του ποσοστού των δικτυοερυθροκυττάρων. Επομένως, η αυξημένη ερύπτωση μάλλον καταδεικνύεται εμφανέστερα από τη δικτυοερυθροκυττάρωση παρά από την αναιμία. Επίσης, τα ερυθροκύτταρα που εκθέτουν PS προσκολλούνται στο αγγειακό τοίχωμα και άρα μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα στη μικροκυκλοφορία [80].

των αιμοφόρων αγγείων (πνευμονικών αρτηριών) γίνονται παχύτερα. Η πνευμονική υπέρταση μπορεί να επέλθει με ή χωρίς ταυτοποιήσιμη ή γνωστή αιτία.

¹⁵⁴ Τα μακροφάγα είναι λευκοκύτταρα του αίματος μέσα στους ιστούς, που παράγονται από τη διαίρεση των μονοκυττάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Κυστιδιοποίηση

Η κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων αποτελεί μία από τις αποθηκευτικές βλάβες που σχετίζεται άμεσα με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Πιο συγκεκριμένα, τα ερυθροκύτταρα, αποβάλλοντας κυστίδια, χάνουν σταδιακά μεμβράνη. Αυτό συμβαίνει, υπό συγκεκριμένες συνθήκες in vivo, in vitro και ex vivo κατά την αποθήκευση του αίματος. Υπολογίζεται ότι το αίμα ενός υγιούς ενήλικα περιέχει κατά μέσο όρο 169 κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης ανά μικρόλιτρο (mL) πλάσματος. Τα μικροκυστίδια είναι θραύσματα, τα οποία έχουν απορριφθεί από τη μεμβράνη (του πλάσματος) διεγερμένων ή αποπτωτικών κυττάρων. Σχετίζονται με διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της διακυτταρικής επικοινωνίας, της ομοιόστασης¹⁵⁵ και της ανοσίας¹⁵⁶. Γενικά, η αντίληψη που επικρατεί είναι ότι η κυστιδιοποίηση αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό εξάλειψης των προϊόντων των κυτταρικών αποβλήτων [31, 58, 83, 84].

Οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της έκτασης της κυστιδιοποίησης, είναι ο προσδιορισμός της ακετυλοχοληνεστεράσης¹⁵⁷ και η μέτρηση της απελευθέρωσης φωσφολιπιδίων [85].

¹⁵⁵ Ονομάζεται η ικανότητα του οργανισμού να διατηρεί σταθερές τις συνθήκες του εσωτερικού του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, συγκεντρώσεις διαφόρων συστατικών, κτλ), παρά τις εξωτερικές μεταβολές.

¹⁵⁶ Είναι η ικανότητα του οργανισμού να αμύνεται σε κάποιον εξωτερικό βλαπτικό παράγοντα και να μην υφίσταται τις συνέπειές του. Την ικανότητα αυτή την αναπτύσσει ο οργανισμός με τη βοήθεια ενός πολύπλοκου και πολύ σημαντικού συστήματος που λέγεται ανοσοποιητικό σύστημα.

¹⁵⁷ Είναι ένα ένζυμο που ανευρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η δραστηριότητα του είναι υψηλότερη σε νεαρά ερυθροκύτταρα και ελαττώνεται ταχέως με την ηλικία των ερυθροκυττάρων.

6. 1. Η κυστιδιοποίηση στα ερυθροκύτταρα

Το ερυθροκύτταρο ήταν πάντα ένα σημαντικό αντικείμενο στην έρευνα της σχέσης μεταξύ δομής και λειτουργίας της πλασματικής μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένου και του σχηματισμού κυστιδίων. Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον στην εντός και εκτός ερυθροκυτταρική κυστιδιοποίηση αυξήθηκε, από τη συνειδητοποίηση ότι η κυστιδιοποίηση παίζει ρόλο σε όλα τα στάδια της ζωής του ερυθροκυττάρου [83].

Κατά την ερυθροποίηση, ο σίδηρος μεταφέρεται μέσα στην ερυθροβλάστη¹⁵⁸ για τη σύνθεση της Hb με, διαμεσολαβούμενη από τον υποδοχέα, ενδοκυττάρωση κυστιδίων που περιέχουν συμπλέγματα υποδοχέων τρανσφερρίνης¹⁵⁹, τρανσφερρίνη και σίδηρο. Σε ένα μεταγενέστερο σημείο της τελικής ερυθροειδικής διαφοροποίησης, η κυστιδιοποίηση παίζει κρίσιμο ρόλο στην αναδιαμόρφωση της μεμβράνης του δικτυοερυθροκυττάρου, όταν ένας αριθμός διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα τρανσφερρίνης, αφαιρείται από την επιφάνεια του κυττάρου με εξωκυττάρωση. Τέλος, η κυστιδιοποίηση της πλασματικής μεμβράνης του ώριμου ερυθροκυττάρου δεν είναι μόνο ένα διαμεμβρανικό μέρος της φυσιολογικής διαδικασίας γήρανσης του ερυθροκυττάρου, αλλά αποτελεί και μία από τις αποθηκευτικές βλάβες του ερυθροκυττάρου στην τράπεζα αίματος. Επίσης, παίζει κάποιο ρόλο στην παθολογία των αιμοσφαιρινοπαθειών και των ερυθροκυτταρικών μεμβρανοπαθειών [83].

¹⁵⁸ Οι ερυθροβλάστες είναι πρόγονα κύτταρα των ερυθροκυττάρων. Αποτελούν το ενδιάμεσο στάδιο μεταξύ προερυθροβλαστών και δικτυοερυθροκυττάρων.

¹⁵⁹ Ο σίδηρος που κυκλοφορεί στο πλάσμα είναι συνδεδεμένος με μία β-σφαιρίνη, την τρανσφερρίνη, η οποία είναι η απαραίτητη ένωση για την ομοίωση του σιδήρου και του μεταβολισμού του.

6. 2. Ο μηχανισμός της κυστιδιοποίησης

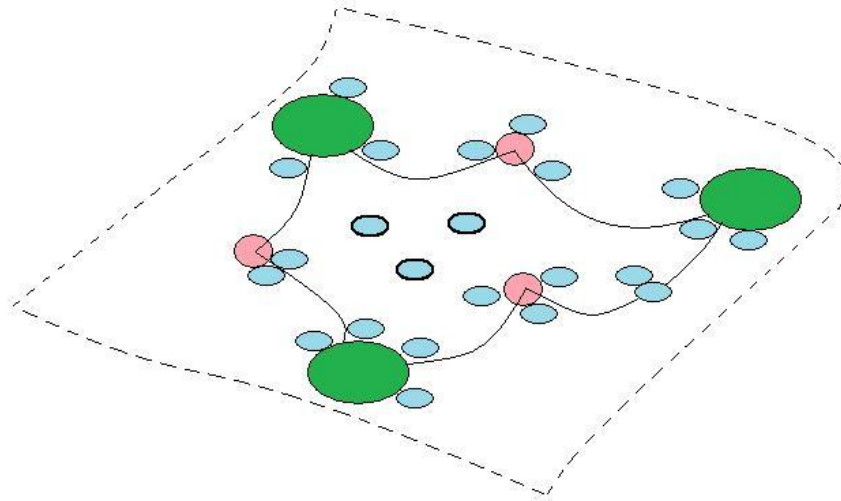
Όπως προαναφέρθηκε, η παραγωγή κυστιδίων από τα ερυθροκύτταρα γίνεται φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της ζωής τους *in vivo*, όταν υπάρχει κάποια νόσος (ίσως τότε είναι και πιο εκτεταμένη) και κατά την αποθήκευση υπό συνθήκες τράπεζας αίματος. Το κύριο χαρακτηριστικό όλων των κυστιδίων είναι η εικονική απουσία της σπεκτρίνης και της αγκυρίνης, δηλαδή των κύριων συστατικών του ερυθροκυτταρικού σκελετού, και ενός ακέραιου κυτταροσκελετικού δικτύου σπεκτρίνης-ακτίνης. Έχει παρατηρηθεί ότι οι μεμβράνες των κυστιδίων είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένες με μια ποικιλία πρωτεϊνών, σε σύγκριση με τη συγκέντρωσή τους στην άθικτη ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ της πρωτεϊνικής τους σύνθεσης και της διαδικασίας της κυστιδιοποίησης [83].

Γενικά, η κυστιδιοποίηση της μεμβράνης μπορεί να δημιουργηθεί είτε από μία ασυμμετρία στη σύνθεση της επιφάνειας της μεμβράνης, που ευνοεί την κύρτωσή της, είτε από την παραγωγή δυνάμεων (π.χ. από τον κυτταροσκελετό). Ενώ η λιπιδική σύνθεση της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων είναι πάντα ασύμμετρη, η αύξηση αυτής της ασυμμετρίας, για παράδειγμα υπό την επίδραση πρωτεϊνών όπως η φλιπάση, μπορεί να αυξήσει τις στερεοχημικές ροπές μέσα στη διπλοστιβάδα και να πυροδοτήσει το σχηματισμό κυστιδίων [83].

Ένα σημαντικό ρόλο στην ερυθροκυτταρική κυστιδιοποίηση είναι πιθανό να παίζει ο κυτταροσκελετός. Διαχωρίζοντας την ερυθροκυτταρική μεμβράνη σε τμήματα, ο κυτταροσκελετός επηρεάζει τόσο το ρυθμό διάχυσης των μεμβρανικών συστατικών, όσο και τη φυσική έκταση των ελεύθερων μεμβρανικών τμημάτων. Τα νημάτια σπεκτρίνης επηρεάζουν τις μεμβρανικές πρωτεΐνες απωθώντας τις στερεοχημικά¹⁶⁰, γεγονός που τείνει να διαχωρίσει κάποιες πρωτεΐνες μακριά από τα νημάτια, και με ελκτικές αλληλεπιδράσεις με άλλα μεμβρανικά συστατικά που, ως εκ τούτου, συσσωρεύονται κοντά στα νημάτια. Το αποτέλεσμα είναι ένα

¹⁶⁰ Η στερεοχημεία αποτελεί ιδιαίτερο κλάδο της χημείας με αντικείμενο τη μελέτη της δομής των μορίων και κυρίως τη διάταξη των ατόμων τους στο χώρο.

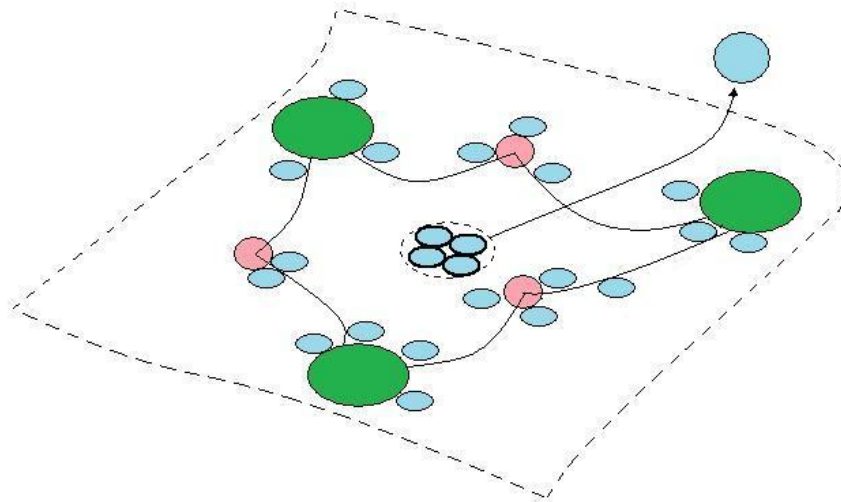
μωσαϊκό από μεμβρανικά συστατικά, το οποίο αντανακλά τη γεωμετρία του δικτύου του κυτταροσκελετού και τη χημική συγγένεια των μεμβρανικών συστατικών (Εικόνα 14) [83].



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση του ερυθροκυτταρικού κυτταροσκελετού και της μεμβράνης. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα άκρα της σπεκτρίνης που συνδέονται με το σύμπλεγμα ακτίνης – πρωτεΐνης-ζώνης 4, με ροζ χρώμα απεικονίζονται τα μεσοδιαστήματα του συνδεδεμένου συμπλέγματος πρωτεΐνης-ζώνης 3 – αγκυρίνης, οι μαύρες μη διακεκομένες γραμμές απεικονίζουν τα νημάτια της σπεκτρίνης, με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται διάφορες μεμβρανικές πρωτεΐνες και φορτισμένα λιπίδια που έλκονται από τον κυτταροσκελετό, με γαλάζιο χρώμα και έντονο περίγραμμα απεικονίζονται οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που απωθούνται από τον κυτταροσκελετό [83].

Η πιο προφανής διαδικασία που οδηγεί στο σχηματισμό κυστιδίων είναι η συσσώρευση συγκεκριμένων ειδών μεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν (κοινή) συγγένεια προς το σχηματισμό μεμβρανικών περιοχών. Μεμβρανικές περιοχές με αρκετά μεγάλο μέγεθος, θα δημιουργήσουν αυθορμήτως εξογκώματα στην επιφάνειά τους και θα αποσπαστούν ως κυστίδια. Για περιοχές και κυστίδια πολύ μικρού μεγέθους, συγκριτικά με το τυπικό μέγεθος των μονάδων του κυτταροσκελετού, η οδηγούμενη από τη συσσώρευση διαδικασία κυστιδιοποίησης μπορεί να προχωρήσει χωρίς απαραίτητα να επηρεάζεται από τον κυτταροσκελετό. Αυτή η διαδικασία, ενδεχομένως, να έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό

νανοκυστιδίων με διάμετρο περίπου 25nm. Σε αυτήν την περίπτωση, είναι αναμενόμενο ότι οι περιοχές (αλλά και τα κυστίδια που προέρχονται από αυτές) θα έχουν σύνθεση, η οποία θα διαφέρει, ανάλογα με το μέγεθος του κυστιδίου. Η σύνθεση αυτή, αντιστοιχεί στην αυθόρμητη κύρτωση του κάθε μεμβρανικού συστατικού που συμμετέχει στο σχηματισμό περιοχών, από τις οποίες θα προέλθει κυστιδιοποίηση. Με αυτόν τον τρόπο, θα μπορούσε να εξηγηθεί γιατί τα κυστίδια διαφορετικού μεγέθους έχουν πολύ διαφορετικές μεμβρανικές συστάσεις (Εικόνα 15) [18, 83].



Εικόνα 15: Τα κινητά συστατικά μπορεί να συσσωρευτούν και να σχηματίσουν τμήματα, τα οποία φεύγουν ως νανοκυστίδια ενιαίας σύστασης και ακτίνας, καθοριζόμενα από την αυθόρμητη κύρτωση τους. *Ισχύουν οι περιγραφές της Εικόνας 14* [83].

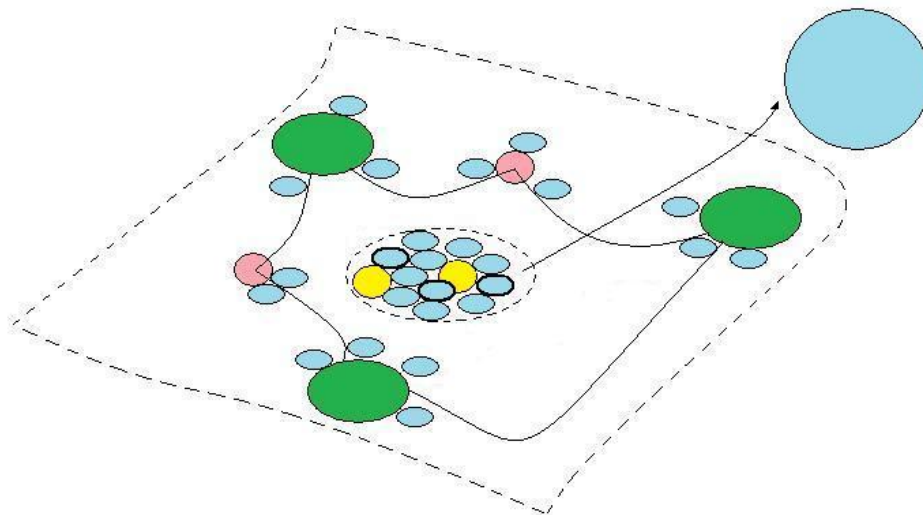
Οι επιδράσεις του κυτταροσκελετού στη διπλοστιβάδα μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες: α) τη χημική σύνδεση των νηματίων της σπεκτρίνης στα διαμεμβρανικά συστατικά της μεμβράνης και β) τη δύναμη συμπίεσης που ασκεί ο κυτταροσκελετός στη διπλοστιβάδα. Αυτές οι δύο επιδράσεις συνδέονται μεταξύ τους [83].

Όλα τα κυστίδια περιέχουν πρωτεΐνη-ζώνη 3, όμως, από ότι φαίνεται, σε μία κατάσταση που την καθιστά μη λειτουργική ως θέση σύνδεσης του

κυτταροσκελετού. Για αυτό το λόγο, το κύριο γεγονός στο σχηματισμό των κυστιδίων φαίνεται να είναι το σπάσιμο του συνδέσμου μεταξύ της πρωτεΐνης-ζώνη 3 και του δικτύου της σπεκτρίνης, δηλαδή η λεγόμενη κάθετη σύνδεση, και όχι οι οριζόντιες αλληλεπιδράσεις στο τριμερές σύμπλεγμα σπεκτρίνης – ακτίνης – πρωτεΐνης 4.1. Η διαδικασία που οδηγεί σε διάσπαση αυτής της σύνδεσης μπορεί να διαφέρει. Από τη στιγμή που ο κυτταροπλασματικός τομέας της πρωτεΐνης-ζώνη 3 έχει θέσει σύνδεσης υψηλής χημικής συγγένειας όχι μόνο για την αγκυρίνη, αλλά και για μετουσιωμένη Hb και για ένζυμα «κλειδιά» της γλυκόλυσης, τόσο η κατάσταση οξειδωσης, όσο και το ενεργειακό περιεχόμενο του ερυθροκυττάρου μπορεί επίσης να επηρεάζουν τη σύνδεση της αγκυρίνης στην πρωτεΐνη-ζώνη 3. Η σύνδεση και η δράση των γλυκολυτικών ενζύμων ρυθμίζεται από τις φωσφατάσες¹⁶¹ και τις κινάσες, υποδεικνύοντας ότι η μεταγωγή σήματος τόσο από ενδοκυττάρια, όσο και από εξωκυττάρια πυροδοτήσεις μπορεί να επηρεάσει την αλληλεπίδραση μεταξύ λιπιδικής διπλοστιβάδας και κυτταροσκελετού [83].

Όποιο και αν είναι το αίτιο της ύφεσης στην αλληλεπίδραση, έχει προταθεί ότι η αποδόμηση των συνδεδεμένων συμπλεγμάτων πρωτεΐνης-ζώνης 3 – αγκυρίνης οδηγεί σε αυξημένη συμπίεση και δυσκαμψία του κυτταροσκελετού, προκαλώντας κύρτωση της διπλοστιβάδας και καταλήγοντας στο σχηματισμό κυστιδίων. Αυτά τα κυστίδια θα βλαστάνουν από τα ελεύθερα μεμβρανικά τμήματα που περιορίζονται από το κυτταροσκελετικό δίκτυο (*Εικόνα 16*). Έτσι, θα έχουν πιο ετερογενή σύνθεση σε σύγκριση με τα ναοκυστίδια που σχηματίζονται, εξαιτίας μιας «καθαρής» διαδικασίας συσσώρευσης (*Εικόνα 15*). Επίσης, το «άνοιγμα» του δεσμού σπεκτρίνης – διπλοστιβάδας περιορίζει την άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των νηματίων της σπεκτρίνης και των μεμβρανικών συστατικών, κάνοντάς τα πιο ευκίνητα και ελευθέρως να συσσωρευτούν (*Εικόνα 16*) [83].

¹⁶¹ Είναι ένζυμα που υδρολύουν (υδρολάσες) τους φωσφορικούς εστερικούς δεσμούς.



Εικόνα 16: Το σπάσιμο των κεντρικών σημείων σύνδεσης πρωτεΐνης-ζώνης 3 – αγκυρίνης, απελευθερώνει κινητές πρωτεΐνες που σχηματίζουν ένα συσσωμάτωμα. Αυτό το συσσωμάτωμα, σε συνδυασμό με την αυξημένη τάση, οδηγεί σε εκβλάστηση και απόσπαση κυστιδίων μεγάλου μεγέθους. Ισχύουν οι περιγραφές της Εικόνας 14. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι αποικοδομημένη πρωτεΐνη-ζώνη 3 που προέρχεται από το σπασμένο σημείο σύνδεσης, η οποία είναι κινητή και ελεύθερη να συσσωματωθεί. [83].

6. 3. Η κυστιδιοποίηση *in vivo*

Κατά τη διάρκεια της ζωής του *in vivo*, το ώριμο ερυθροκύτταρο χάνει σταδιακά τον όγκο του και την περιεκτικότητά του σε Hb. Επίσης, ελαττώνονται η επιφάνειά του και η περιεκτικότητά του σε λιπίδια, κυρίως λόγω της απελευθέρωσης κυστιδίων που περιέχουν Hb. Αυτή η διαδικασία παρουσιάζεται κατά τη διάρκεια της ζωής του ερυθροκυττάρου, αν και επιταχύνεται στο δεύτερο μισό της (υπό την προϋπόθεση να υπάρχει σπλήνας και να είναι λειτουργικός). Τα κυστίδια απομακρύνονται ταχύτατα από το μονοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα¹⁶², ιδίως από τα κύτταρα Kupffer¹⁶³ στο ήπαρ. Η απομάκρυνσή τους, η

¹⁶² Τα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα αποτελούν το δεύτερο μεγάλο κυτταρικό πληθυσμό του ανοσιακού συστήματος πρόκειται για κύτταρα μυελικής προέλευσης, με κύρια λειτουργία τους τη φαγοκυττάρωση. Λόγω αυτών των κοινών χαρακτηριστικών τους, θεωρούνται ότι αποτελούν ενιαίο σύστημα, το σύστημα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων, στο οποίο συγκαταλέγονται οι διάφορες μορφές που παίρνουν αυτά τα κύτταρα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης και της ενεργοποίησής τους.

¹⁶³ Εξειδικευμένα μακροφάγα κύτταρα του ήπατος.

οποία επέρχεται ταχύτατα, προκαλείται από τους συνδεδεμένους με την PS υποδοχείς εκκαθάρισης και από αυτοαντισώματα (π.χ. αυτόλογες IgGs), τα οποία, πυροδοτούν την αναγνώριση και την απομάκρυνση των γηρασμένων ερυθροκυττάρων από τα μακροφάγα (στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα) [58, 83, 84].

Ο σχηματισμός κυστιδίων μπορεί να χρησιμεύει ως ένα μέσο εκκαθάρισης των πλέον άχρηστων τμημάτων της μεμβράνης. Έτσι, το ερυθρό αιμοσφαίριο αποβάλλει τις μη λειτουργικές πρωτεΐνες και τα ενδεχομένως επιβλαβή αυτοαντιγόνα¹⁶⁴ και συγχρόνως, «σώζεται» από πρόωρο θάνατο. Τα ειδικά κυτταρικά αυτοαντιγόνα γήρανσης (senescent cell-specific autoantigens, SCA) προέρχονται από την πρωτεΐνη-ζώνη 3. Πιθανολογείται ότι η παραγωγή των SCA ενεργοποιείται από τη σύνδεση μετουσιωμένης Hb στην κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης-ζώνη 3, προκαλώντας έτσι τη συσσωμάτωση ή/ και την αποδόμησή της. Τόσο η συσσωμάτωση, όσο και η αποδόμηση, ενδέχεται να οδηγήσουν σε σχηματισμό νεοαντιγόνων γήρανσης [58, 83].

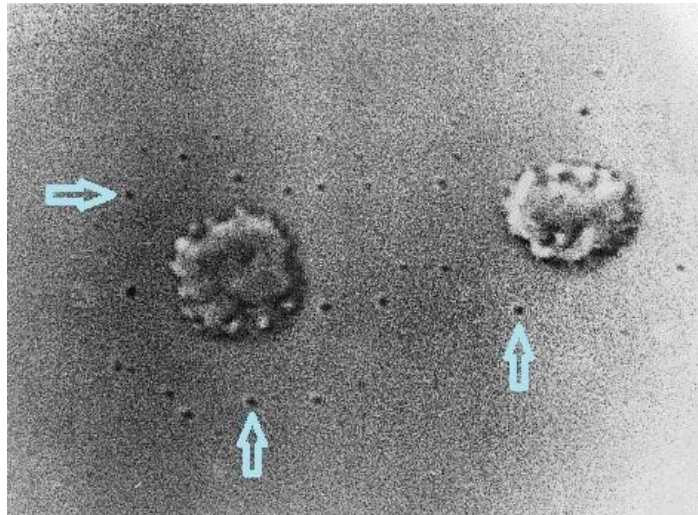
Τα κυστίδια που προέρχονται από ερυθροκύτταρα πρόσφατα ληφθέντος πλάσματος υγείων δοτών, ποικίλουν σε μέγεθος (200-800nm) και περιέχουν όλα τα συστατικά της Hb σε ένα μοτίβο ίδιο με αυτό των γηραιών ερυθροκυττάρων. Γενικά, από πρωτεομικές αναλύσεις προκύπτει ότι τα κυστίδια περιέχουν πολυκακρισμένη κυτταροπλασματική Hb, όπως και πολυκακρισμένη μεμβρανική πρωτεΐνη-ζώνη 3. Η παρουσία σημάτων εκκαθάρισης, όπως γηρασμένων κυτταρικών αντιγόνων και PS, είναι πιθανόν να ευθύνεται για την ταχύτατη απομάκρυνση των κυστιδίων [18, 83].

¹⁶⁴ Μόρια που αναγνωρίζονται ως ξένη ύλη από τον οργανισμό, αλλά προέρχονται από αυτόν.

6. 4. Η κυστιδιοποίηση *in vitro*

Η απόπτωση κυστιδίων παρατηρείται επίσης και κάτω από άλλες συνθήκες, *in vitro*, οι οποίες προκαλούν τη (σχηματική) μετάβαση από δισκοκύτταρο σε εχινοκύτταρο. Τέτοιες είναι η εξάντληση του ATP και η υπερφόρτωση Ca^{2+} . Σε αυτές τις συνθήκες, έχει περιγραφεί πως παρουσιάζεται απόπτωση κυστιδίων στο άκρο των μεμβρανικών θραυσμάτων. Επίσης, πολλές μεμβρανοδραστικές ενώσεις (π.χ. απορρυπαντικά) που διαταράσσουν την οργάνωση των λιπιδίων της μεμβράνης, ή παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταφορά των ιόντων δια μέσου της μεμβράνης, επάγουν το σχηματισμό κυστιδίων [83, 84].

Όπως προαναφέρθηκε, κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , το σχήμα του ερυθροκυττάρου αλλάζει. Έχουμε δηλαδή, τη μετάβαση από δισκοκύτταρο σε εχινοκύτταρο. Επιπλέον, μικροκυστίδια απορρίπτονται από τις μικρολαχνωειδείς προσεκβολές των εχινοκυττάρων (Εικόνα 17). Τα κυστίδια που προκαλούνται από το Ca^{2+} δεν περιέχουν φωσφατιδυλοχολίνη (phosphatidylcholine, PC)¹⁶⁵, σπεκτρίνη, ακτίνη και γλυκοφορίνη, ενώ παρατηρούνται συγκεντρώσεις πρωτεΐνης-ζώνης 3 και ακετυλχολινεστεράσης [83].



Εικόνα 17: Κυστιδιοποίηση σε ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια. Παρατηρούνται (έξω)κυστίδια (βέλη) γύρω από τα γονεϊκά ερυθροκύτταρα [86].

¹⁶⁵ Είναι ένα φωσφολιπίδιο σημαντικό για τη δομική ακεραιότητα και τη λειτουργία των μεμβρανών του κυττάρου.

Υπάρχει ένας αρνητικός συσχετισμός μεταξύ της ερυθροκυτταρικής περιεκτικότητας σε ATP και της ποσότητας των κυστιδίων. Η εξάντληση του ATP προκαλεί τις ίδιες μορφολογικές αλλαγές με την αύξηση Ca^{2+} , όμως οι πρωτεϊνικές συνθέσεις των κυστιδίων που προκαλούνται από εξάντληση του ATP, αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} και αποθήκευση, διαφέρουν. Αν στα παραπάνω συμψηφιστούν τόσο οι διαφορές στην πρωτεϊνική και φωσφολιπιδική σύσταση, όσο και αυτές στο μέγεθος και το σχήμα των κυστιδίων που προκαλούνται από ποικίλες μεμβρανοδραστικές ενώσεις (π.χ. αμφιφιλίνες, λυσοφωσφατιδικό οξύ), τότε συμπεραίνεται ότι η σύνθεση των κυστιδίων διαφέρει ανάλογα με τον τρόπο παραγωγής τους. Επίσης, υποστηρίζεται η θεωρία ότι πολλαπλά μονοπάτια σηματοδότησης είναι πιθανόν να εμπλέκονται στο μηχανισμό παραγωγής τους [83].

6. 5. Η κυστιδιοποίηση στους ασκούς αίματος

Η κυστιδιοποίηση παρατηρείται και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ΣΕ. Λόγω της έλλειψης αποτελεσματικών μηχανισμών εξάλειψης, σαν αυτούς που λειτουργούν *in vivo*, τα κυστίδια, κατά την «ωρίμανσή» τους, φαίνεται να υφίστανται αντιδράσεις αποδόμησης και επιβλαβείς επιδράσεις, οι οποίες δεν προέρχονται μόνο από τα ΣΕ, αλλά και από τα υπολείμματα λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων που υπάρχουν στους ασκούς. Ως αποτέλεσμα, παρατηρείται συσσώρευση κυστιδίων στα προς μετάγγιση ΣΕ, μη αναστρέψιμες αλλαγές στο σχήμα του κυττάρου και μεμβρανικές μεταβολές. Το δύσκολα παραμορφώσιμο σφαιροκύτταρο που προκύπτει, απομακρύνεται γρήγορα από την κυκλοφορία μετά τη μετάγγιση [31, 83, 84, 85, 87].

Τα αποτελέσματα διάφορων ερευνών υποδεικνύουν ότι τα κυστίδια αντιπροσωπεύουν ένα μικροπεριβάλλον υψηλού οξειδωτικού στρες, ή συγκέντρωσης κατεστραμμένων από την οξείδωση πρωτεϊνών και ότι έχουν τον ίδιο μηχανισμό αναγνώρισης με τα γονεϊκά ή/ και γηραιά ερυθρά αιμοσφαίρια. Αυτός ο μηχανισμός αναγνώρισης συμπεριλαμβάνει τη σύνδεση μη φυσιολογικής

Hb στη μεμβράνη, τη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης-ζώνη 3, τη σύνδεση των αυτοαντισωμάτων και τη φαγοκυττάρωση από τους υποδοχείς εκκαθάρισης. Επιπλέον, φαίνεται πως τα κυστίδια έχουν περισσότερα από ένα σήματα που σχετίζονται με τη φαγοκυττάρωση [84]. Η λιπιδική σύσταση των κυστιδίων μπορεί να αποτελεί το ερέθισμα για την ενεργοποίηση των γονιδίων που οδηγούν σε φλεγμονή στα λευκοκύτταρα του δέκτη, κάτι που είναι πιθανό να οδηγήσει σε πολλαπλή οργανική ανεπάρκεια. Επίσης, τα σήματα εκκαθάρισης των εκτενέστερα κατεστραμμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων και των κυστιδίων που προέρχονται από την αποθήκευσή τους, μπορεί να οδηγήσουν σε υπερφόρτωση του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος και κατ' επέκταση σε καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, μία συγκέντρωση δομικά αλλοιωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως η πρωτεΐνη-ζώνη 3, στα κυστίδια που βρίσκονται στους προς μετάγγιση ασκούς ΣΕ, μπορεί να δημιουργήσει μη φυσιολογικά νεοαντιγόνα γήρανσης, τα οποία με τη σειρά τους μπορεί να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα του δέκτη. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή (από το ανοσοποιητικό σύστημα του δέκτη) αλλοαντισωμάτων¹⁶⁶ ή/ και αυτοαντισωμάτων, που θα οδηγηθούν σε αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία¹⁶⁷, ιδιαίτερα σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς [58, 83].

Προσφάτως, ένας συνδυασμός πρωτεομικών και ανοσοχημικών ερευνών παρέχει μία ανανεωμένη δομική και λειτουργική καταγραφή των κυστιδίων που προέρχονται από την επεξεργασία και την αποθήκευση των ΣΕ. Αυτές οι έρευνες επιβεβαιώνουν, εν μέρει, προηγούμενα δεδομένα, όπως είναι η αύξηση της συνολικής Hb των κυστιδίων, που σχετίζεται με την αποθήκευση, και η αύξηση της συνολικής και αποδομημένης πρωτεΐνης-ζώνη 3 στις μεμβράνες των κυστιδίων. Το μέγεθος των κυστιδίων ενδεχομένως να ποικίλει ανάλογα με το χρόνο και το μέσο αποθήκευσης, όμως η διάμετρος των περισσότερων κυμαίνεται μεταξύ 80nm και

¹⁶⁶ Όταν σχηματίζονται αντισώματα έναντι ξένου αντιγόνου (του ίδιου είδους), τα αντισώματα αυτά ονομάζονται αλλοαντισώματα (σε αντιδιαστολή με τα αυτοαντισώματα που σχηματίζονται κατά των ιδίων αντιγόνων του ατόμου).

¹⁶⁷ Οι (αυτο)άνοσες αιμολυτικές αναιμίες χαρακτηρίζονται από επιταχυνόμενη καταστροφή (αιμόλυση) των ερυθροκυττάρων από ένα αντίσωμα που προσκολλάται στην επιφάνεια του ερυθροκυττάρου.

200nm [18, 83]. Γενικά, η διάρκεια της αποθήκευσης των ΣΕ επηρεάζει την ποσότητα της συνολικής κυστιδιακής πρωτεΐνης που συσσωρεύεται στο πλάσμα που έχει απομείνει (στον ασκό), το μέγεθος, τη δομή, την κατάσταση της οξείδωσης και την πρωτεϊνική σύσταση των κυστιδίων [84].

Έχει παρατηρηθεί ότι τα κυστίδια, που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια αποθήκευσης ΣΕ, είναι πλούσια σε Hb και ακετυλοχοληνεστεράση. Επιπλέον, περιέχουν λιπίδια, πρωτεΐνη-ζώνη 3, GPA και ακτίνη, αλλά ουσιαστικά, δεν περιέχουν καθόλου σπεκτρίνη και αγκυρίνη [18, 31, 84, 88]. Πιο συγκεκριμένα, είναι σπάνιο να περιέχουν κύριες διαμεμβρανικές και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, με εξαίρεση την πρωτεΐνη-ζώνη 3 και την πρωτεΐνη 4.1. Η συγκέντρωση των καρβονυλικών ομάδων¹⁶⁸ μέσα στα κυστίδια, αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης σε σχέση με αυτήν των ερυθρομεμβρανικών πρωτεϊνών, υποδεικνύοντας τη συσσώρευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών, εκ των οποίων κάποιες αναγνωρίζονται ως πρωτεΐνη-ζώνη 3, ακτίνη και στοματίνη. Έχει επίσης περιγραφεί, ότι τα κυστίδια των αποθηκευμένων ΣΕ περιέχουν πρωτεΐνες που είναι μέρος μιας διαδοχικής σειράς σημάτων απόπτωσης, όπως η Fas και η κασπάση 3. Επιπλέον, είναι εμπλουτισμένα με στοματίνη, αλλά περιέχουν μικρότερη ποσότητα από τις άλλες πρωτεΐνες των λιπιδικών σχεδίων, φλοτιλλίνη-1 (flotillin-1) και φλοτιλλίνη-2 (flotillin-2). Επίσης, εκθέτουν PS και περιέχουν IgG. Η μεγαλύτερη ποσότητα στοματίνης και σχεδόν όλες οι φλοτιλλίνες συνδέονται με λιπιδικές σχεδίες. Το ίδιο ισχύει και για τις συνδεδεμένες στην γλυκοζυλοφωσφατιδυλινοσιτόλη (glycosylphosphatidylinositol, GPI)¹⁶⁹ πρωτεΐνες, την ακετυλοχοληνεστεράση και το CD55¹⁷⁰ των κυστιδίων. Αντιθέτως, η πρωτεΐνη-

¹⁶⁸ Η καρβονυλική ομάδα C=O είναι η σημαντικότερη λειτουργική ομάδα της οργανικής χημείας. Καρβονυλικές ομάδες βρίσκονται παντού στη φύση. Τέτοιες είναι, π.χ. αλδεΐδες, κετόνες, καρβοξυλικά οξέα, εστέρες, κ.α.

¹⁶⁹ Η γλυκοζυλοφωσφατιδυλινοσιτόλη (GPI) είναι ένα γλυκολιπίδιο, το οποίο μπορεί να συνδεθεί στο καρβοξυλικό άκρο μίας πρωτεΐνης, κατά τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

¹⁷⁰ Λευκοκυτταρικό αντιγόνο 55. Κυτταρική κατανομή → Αιμοποιητικά και μη αιμοποιητικά κύτταρα. (Λειτουργίες → Μεμβρανική πρωτεΐνη του συμπληρώματος. Συνδέεται με το C3b και προκαλεί αποδόμηση της κομμεράσης των C3/C5).

ζώνη 3 και τα αντιγόνα του συστήματος Duffy¹⁷¹ που είναι παρόντα στις λιπιδικές σχεδίες των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών, απουσιάζουν από τις λιπιδικές σχεδίες των κυστιδίων. Τέλος, τα υπάρχοντα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η φωσφολιπιδική οργάνωση της μεμβράνης του κυστιδίου διαφέρει από αυτή του ερυθροκυττάρου και ότι ποικίλει ανάλογα με το μέσο και το χρόνο αποθήκευσης (π.χ. η κυστιδιοποίηση επιβραδύνεται όταν το αντιπηκτικό διάλυμα είναι CPDA) [31, 83, 85, 87, 88, 89].

6. 6. Σχέση κυστιδιοποίησης – οξείδωσης

Παρόλο που η πρωτεϊνική οξείδωση φαίνεται να αποτελεί μέρος της γήρανσης των ερυθροκυττάρων και της αποθηκευτικής βλάβης, δεν έχει επιβεβαιωθεί η σχέση μεταξύ οξείδωσης και κυστιδιοποίησης κατά την αποθήκευση (ΣΕ), εκτός από μία μελέτη, η οποία αναφέρει το ρόλο επίδρασης της οξείδωσης της σπεκτρίνης σε σχέση με την έκταση της κυστιδιοποίησης που προκαλείται από την αποθήκευση (ΣΕ) [85]. Η έρευνα των *Kriebardis et al.* [84], παρέχει περισσότερες ενδείξεις για το ότι αυτές οι δύο διαδικασίες συνδέονται [84, 85]. Πιο συγκεκριμένα, αν και η ελαφρώς οξειδωμένη σπεκτρίνη ενδέχεται να εμπλέκεται στη διαδικασία της κυστιδιοποίησης, ξεκάθαρη είναι η σχέση της σοβαρά οξειδωμένης σπεκτρίνης με την κυστιδιοποίηση. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο παρουσιάζεται είναι άγνωστος. Όμως, είναι αντιληπτό ότι όσο η σπεκτρίνη σε μία μικρή περιοχή της μεμβράνης καταστρέφεται, λόγω της οξείδωσης, οι τοπικές αλληλεπιδράσεις σπεκτρίνης – λιπιδίων διαταράσσονται και η επηρεασμένη μεμβράνη βλαστάνει και αποχωρίζεται ως ένα ελεύθερο κυστίδιο, το οποίο δεν περιέχει σπεκτρίνη [85].

Οι εκτεταμένες μεταβολές σε μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών, που βρίσκονται μέσα στα κυστίδια, είναι αναμενόμενο να επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα (μέσω της συνδεσιμότητας του κυτταροσκελετού) την πρωτεϊνική κατανομή μέσα

¹⁷¹ Τα ερυθροκύτταρα διαθέτουν μεγάλο αριθμό αντιγόνων επιφανείας, τα οποία ανήκουν σε διάφορα συστήματα ομάδων αίματος. Ένα από αυτά είναι και το σύστημα Duffy.

σε αυτά. Επιπλέον, η συγκέντρωση των οξειδωτικών ερυθροκυτταρικών πρωτεϊνών μέσα στα κυστίδια, υποδεικνύει ότι η κυστιδιοποίηση λειτουργεί ως ένας αποτελεσματικός τρόπος εξάλειψης κατεστραμμένων πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν παραχθεί από οξειδωτικό στρες, που σχετίζεται με την αποθήκευση στους ασκούς ΣΕ [84].

6. 7. Η λευκαφαίρεση ως ένα μέσο αποφυγής της κυστιδιοποίησης

Όπως προαναφέρθηκε, τα κυστίδια που απελευθερώνονται μέσα στα αποθηκευμένα ΣΕ, ενδέχεται να συμβάλλουν τουλάχιστον σε κάποιες από τις δυσμενείς επιπτώσεις της μετάγγισης που ενίοτε παρουσιάζονται. Όμως, δεν προέρχονται όλα τα κυστίδια από ερυθρά αιμοσφαίρια, αλλά και από άλλα κύτταρα του αίματος που βρίσκονται στο πλάσμα που έχει απομείνει στους ασκούς [84, 87].

Δεν έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στην παρουσία άλλων ειδών κυστιδίων, όπως κυστίδια αιμοπεταλιακής ή λευκοκυτταρικής προέλευσης, στα αποθηκευμένα ΣΕ. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι πολλαπλά είδη κυστιδίων παράγονται κατά την αποθήκευση μη λευκαφαιρεμένων ΣΕ. Έτσι, παρόλο που επικρατούν τα κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης, (κατά την αποθήκευση) παράγεται και ένα σημαντικό ποσό άλλων ειδών κυστιδίων. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν αυξανόμενες, (αναλογικά) με τη πάροδο του χρόνου αποθήκευσης, προφλεγμονώδεις και προθρομβωτικές δυνατότητες [87, 90].

Ωστόσο, έρευνες δείχνουν ότι η λευκαφαίρεση του ολικού αίματος πριν την αποθήκευση μειώνει σημαντικά τον αριθμό των κυστιδίων ερυθροκυτταρικής προέλευσης που ανιχνεύονται μετά την αποθήκευση. Έτσι, η λευκαφαίρεση όχι μόνο απομακρύνει τα ανοσογόνα λευκοκύτταρα, αλλά επίσης μειώνει την παραγωγή κυστιδίων κατά την αποθήκευση. Αυτή η επίδραση μπορεί να αποφέρει επιπρόσθετα πλεονεκτήματα στην ελάττωση των κινδύνων της μετάγγισης [31, 87, 91].

6. 8. Συμπεράσματα

Τα παραπάνω υποστηρίζουν την επικρατούσα άποψη ότι η απελευθέρωση των κυστιδίων, που περιέχουν επιβλαβή και με δυνατότητα υψηλής σηματοδότησης συστατικά, ενδέχεται να προλαμβάνει την πρόωρη εκκαθάριση υγιών και λειτουργικών, κατά τα άλλα, ερυθροκυττάρων [31, 58, 84].

Ο μηχανισμός με τον οποίο η ερυθροκυτταρική μεμβράνη κυστιδιοποιείται είναι ιδιαίτερης σημασίας σε ότι αφορά τα ΣΕ, από τη στιγμή που η βιωσιμότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων μετά τη μετάγγιση φαίνεται να είναι περιορισμένη, λόγω μείωσης της κυτταρικής επιφάνειας. Είναι πιθανό, η κυστιδιοποίηση της μεμβράνης και η επακόλουθη παραμόρφωση να είναι αυτή η αποθηκευτική βλάβη που περιορίζει τη βιωσιμότητα του αποθηκευμένου αίματος (συνήθως ΣΕ) [85].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Λευκαφαίρεση

7. 1. Η λευκαφαίρεση στην αποθήκευση των ερυθροκυττάρων

Η εισαγωγή της λευκαφαίρεσης πριν την αποθήκευση, κατά την προετοιμασία των πρότυπων ερυθρών αιμοσφαιρίων που προορίζονται για μετάγγιση, βελτίωσε σημαντικά την ποιότητα των ασταθών προϊόντων, καθώς και τη βιωσιμότητα και τα αποτελέσματά τους μετά τη μετάγγιση [46].

Οι *D' Amici et al.* [50] μελέτησαν, πρωτίστως, τις μεταβολές στο πρωτέομα των λευκαφαιρεμένων ασκών ολικού αίματος και ανακάλυψαν ότι η παρουσία του O₂ στους αποθηκευμένους ασκούς προωθούσε την αύξηση των αποθηκευτικών βλαβών, που μπορούσαν, εν μέρει, να προληφθούν με την προσθήκη αναστολέων της πρωτεάσης [14, 50]. Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν από μία μελέτη, η οποία έδειξε ότι τα προϊόντα των λευκαφαιρεμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων απελευθέρωναν κυρίως καρβονική ανυδράση¹⁷² και θειορεδόξινη περοξειδάση Β από την 28^η ημέρα, σε σύγκριση με πάνω από εκατό πρωτεΐνες από προϊόντα μη λευκαφαιρεμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων [14, 92, 93]. Σε μία άλλη μελέτη βρέθηκε ότι κατά την αποθήκευση λευκαφαιρεμένων ΣΕ, απελευθερώνονταν πρωτεΐνες υπό τη μορφή κυστιδίων και νανοκυστιδίων, πλούσιων σε ολιγομερισμένη πρωτεΐνη-ζώνη 3, υποδεικνύοντας μία προνομιακή απελευθέρωση κατεστραμμένων κυτταρικών συστατικών από κατά τα άλλα λειτουργικά ερυθροκύτταρα [14, 49].

Σήμερα, η αποτελεσματική *ex vivo* αποθήκευση των ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση της ιατρικής των μεταγγίσεων.

¹⁷² Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται σε πολλούς ιστούς του σώματος και καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση που περιλαμβάνει την ενυδάτωση του διοξειδίου του άνθρακα και την αφυδάτωση του ανθρακικού οξέος. Βρίσκεται σε μεγάλη αναλογία στο ερυθροκύτταρο, όπου αποτελεί το δεύτερο σε ποσότητα, μετά την αιμοσφαιρίνη, πρωτεϊνικό συστατικό του, και διευκολύνει την πρόσληψη διοξειδίου του άνθρακα από το πλάσμα.

Τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα υφίστανται μία σειρά χρονοεξαρτώμενων, φυσιολογικών, δομικών και βιοχημικών αλλοιώσεων, οι οποίες είναι μόνο εν μέρει αναστρέψιμες. Στο πλαίσιο της αποθηκευτικής βλάβης των ερυθροκυττάρων έχουν χαρακτηριστεί εκτενώς φυσιολογικά σημαντικές διαταραχές στο μεταβολισμό της ενέργειας, στις ιδιότητες της ρεολογίας (σχήμα, παραμορφωσιμότητα, ικανότητα συσσωμάτωσης, ενδοκυτταρικό ιξώδες), στο οξειδωτικό/ καρβονυλιακό στρες και τέλος, στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης. Οι αλλοιώσεις της μεμβρανικής επιφάνειας και του κυτταροσκελετού συμβάλλουν στην καταστροφή και στην εκκαθάριση των ερυθρών αιμοσφαιρίων [46].

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα για την προετοιμασία των προτύπων προϊόντων των ερυθρών αιμοσφαιρίων, περιλαμβάνουν φιλτράρισμα του αίματος πριν την αποθήκευση, με σκοπό την απομάκρυνση λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων του δότη, που μπορεί να προκαλέσουν επιμόλυνση [46]. Για να μεγιστοποιηθεί η εξάλειψη αυτών των κυττάρων, σε κάθε πλύσιμο το buffy coat¹⁷³ των ΣΕ απομακρύνεται μαζί με το υπερκείμενο. Παρόλο που η αποτελεσματική απομάκρυνση των λευκών αιμοσφαιρίων μπορεί να επιτευχθεί με επαναλαμβανόμενη χρήση κατάλληλων φίλτρων λευκαφαίρεσης (ιδανικά: πάνω από 5 φορές) [13, 94], μπορεί να παραμείνει ένας μικρός αριθμός κοκκιοκυττάρων¹⁷⁴. Αυτά εξαλείφονται μόνο μέσω διαβαθμισμένης φυγοκέντρησης¹⁷⁵ [13, 95], ή με τη βοήθεια προσαρμοσμένων διχτυών [13, 96]. Τα δικτυοερυθροκύτταρα αντιπροσωπεύουν μόνο το 1% (περίπου) του φυσιολογικού ανθρώπινου αίματος, όμως η παρουσία τους μπορεί να επηρεάσει την πρωτεϊνική σύσταση των ώριμων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Αυτό συμβαίνει επειδή το

¹⁷³ Είναι το τμήμα ενός δείγματος αίματος με αντιπηκτικό που περιέχει το μεγαλύτερο μέρος των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων. Μετά από φυγοκέντρηση, γίνονται εμφανή τρία «στρώματα». Πάνω βρίσκεται μια στιβάδα διαυγούς υγρού, το πλάσμα, κάτω βρίσκονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια και ενδιάμεσα η λεπτή στιβάδα που σχηματίζεται αποτελεί το buffy coat.

¹⁷⁴ Είναι τα λευκά αιμοσφαίρια που στο κυτταρόπλασμά τους περιέχουν ειδικά κοκκία. Αλλιώς ονομάζονται και πολυμορφοπύρρηνα. Διακρίνονται σε ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα.

¹⁷⁵ Η φυγοκέντρηση είναι μία διαδικασία διαχωρισμού μιγμάτων κατά την οποία γίνεται χρήση της φυγοκέντρου δυνάμεως. Κατά τη φυγοκέντρηση, τα βαρέα στοιχεία του μίγματος πηγαίνουν στο πυθμένα του σωληναρίου όπου αυτό βρίσκεται ενώ τα ελαφρύτερα παραμένουν πάνω από τον πυθμένα.

πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο διαφέρει σημαντικά από αυτό των ώριμων ερυθροκυττάρων [13, 97].

Παρόλη την αντιπαράθεση μεταξύ κλινικών δοκιμών πάνω στα πλεονεκτήματα ή στα ουδέτερα αποτελέσματα του φιλτραρίσματος, η εισαγωγή της λευκαφαίρεσης πριν την αποθήκευση παρέχει σημαντική βελτίωση στις μεταγγίσεις. Πιο συγκεκριμένα, μειώθηκε η συχνότητα εμφάνισης μετάδοσης ιών και οι περιστασιακές, αλλά σοβαρές, δυσμενείς κλινικές επιδράσεις (αλλοανοσοποίηση¹⁷⁶, φλεγμονώδεις αντιδράσεις, ανοσοκαταστολή, κ.α.), που είχαν συσχετιστεί με την αυξημένη παθητική νοσηρότητα ή/ και θνησιμότητα. Επιπλέον, η λευκαφαίρεση παρουσιάζει ένα ευεργετικό αποτέλεσμα στην αποθηκευτική βλάβη των ερυθροκυττάρων, βελτιώνοντας τόσο την αιμόλυση, όσο και την μετά τη μετάγγιση αποκατάσταση των λευκαφαιρεμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα ενεργά, τα αποπτωτικά, ή τα εκφυλισμένα λευκοκύτταρα μπορούν εξίσου να πυροδοτήσουν δυσμενείς αντιδράσεις στη μετάγγιση και ζημιά σχετιζόμενη με την αποθήκευση, από τη στιγμή που αποτελούν μία πηγή βιοενεργών παραγόντων, όπως είναι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι κυτταροκίνες¹⁷⁷ και τα ένζυμα [46].

Ωστόσο, η λευκαφαίρεση πριν την αποθήκευση δεν έχει εξαλείψει όλες τις σχετιζόμενες με τα λευκά αιμοσφαίρια αντιδράσεις, ούτε τις βιοχημικές και μορφολογικές μεταβολές που εμφανίζονται στα ερυθρά αιμοσφαίρια ως συνέπεια της γήρανσης και της αποθήκευσης [46].

Τα νέα αιματολογικά, βιοχημικά και πρωτεομικά δεδομένα, υποδεικνύουν ότι τα εναπομείναντα λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια αποτελούν έναν επιπλέον

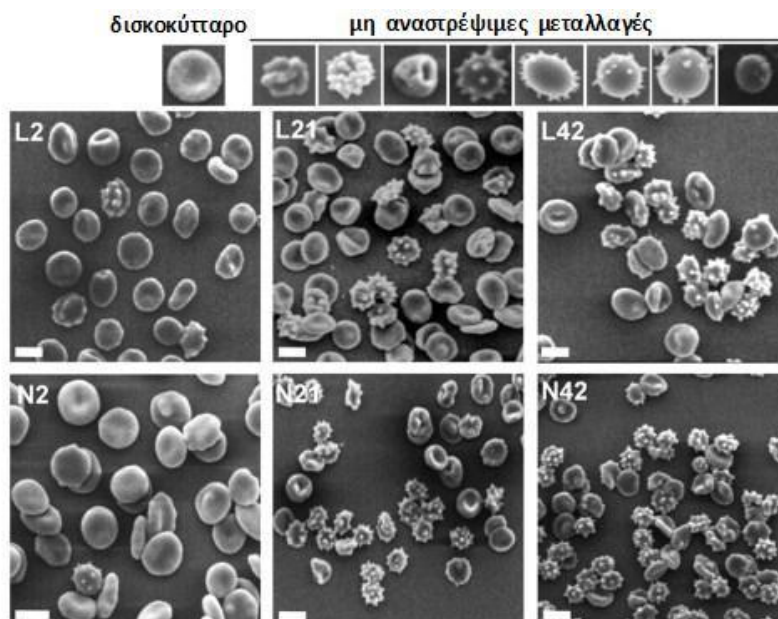
¹⁷⁶ Όταν αντισώματα σχηματίζονται έναντι ξένου αντιγόνου (του ιδίου είδους), η διαδικασία καλείται αλλοανοσοποίηση και τα αντισώματα αλλοαντισώματα (σε αντιδιαστολή με τα αυτοαντισώματα που σχηματίζονται κατά των ιδίων αντιγόνων του ατόμου). Αλλοανοσοποίηση έναντι ερυθρών είναι ο σχηματισμός αντισώματος (ή αντισωμάτων) από τον δέκτη (ασθενή) έναντι ερυθροκυτταρικών αντιγόνων από προηγούμενη μετάγγιση ή κύηση.

¹⁷⁷ Αποτελούν ετερογενή ομάδα μικρομοριακών πρωτεϊνών, οι οποίες παράγονται από διάφορα κύτταρα του οργανισμού και διεγείρουν ή αναστέλλουν τη λειτουργία των κυττάρων δρώντας επ' αυτών κατά αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο. (Περισσότερες από εκατό δομικά και γενετικά διαφορετικές κυτταροκίνες έχουν αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα).

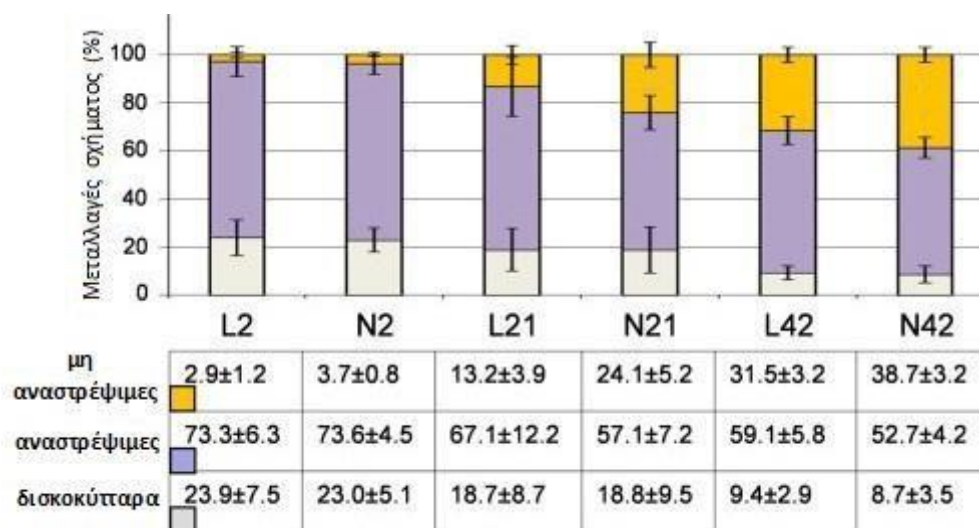
στρεσογόνο παράγοντα για τα αποθηκευμένα ΣΕ, επηρεάζοντας σχεδόν όλους τους μηχανισμούς σηματοδότησης προς εκκαθάριση των ερυθροκυττάρων και κατ' επέκταση τη δομική και λειτουργική ακεραιότητά τους [46].

7. 2. Τα εναπομείναντα λευκοκύτταρα στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και κυστιδιοποίηση

Από την έρευνα των *Antonelou et al.* [46] προκύπτει ότι η μορφολογία των ΣΕ επιδεινώνεται με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης, είτε έχει προηγηθεί λευκαφαίρεση, είτε όχι (*Εικόνα 18*). Ωστόσο, ενώ στην αρχή της αποθήκευσης οι δύο ομάδες (λευκαφαιρεμένα ΣΕ και μη λευκαφαιρεμένα ΣΕ) παρουσίαζαν ένα ίδιο ποσοστό σχηματικών μεταβολών (*Εικόνα 19*), από την 21^η ημέρα και έπειτα υπήρξε μια σημαντική αύξηση στις μη αναστρέψιμες μεταβολές στα μη λευκαφαιρεμένα ΣΕ, συγκριτικά με τα λευκαφαιρεμένα ΣΕ. Αυτό το εύρημα είναι πιθανό να σχετίζεται με την έκταση της κυστιδιοποίησης και την απώλεια της μεμβράνης, που παρατηρείται στα μη λευκαφαιρεμένα ερυθροκύτταρα μετά τη δεύτερη εβδομάδα της αποθήκευσης. Προς το τέλος της αποθηκευτικής περιόδου, η διαφορά στα ποσοστά των μη αναστρέψιμων μεταβολών μεταξύ των δύο ομάδων περιορίστηκε (παρέμεινε όμως σημαντική) [46].

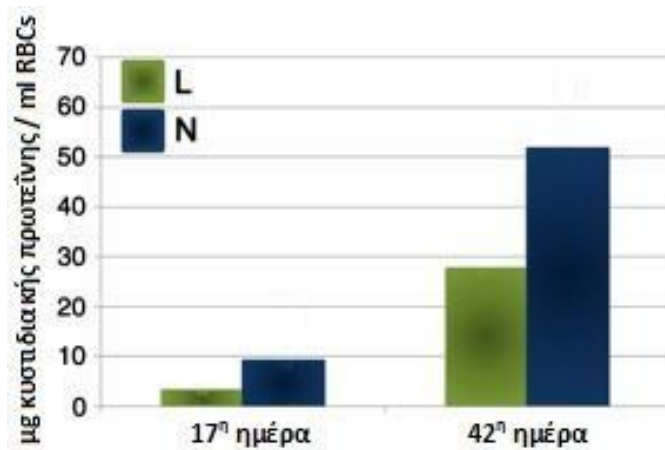


Εικόνα 18: Αντιπροσωπευτικές ηλεκτρονικές μικρογραφίες 2ης, 21ης και 42ης ημέρας. Μορφολογική εκτίμηση των λευκαφαιρεμένων (L) και των μη λευκαφαιρεμένων (N) ερυθρών αιμοσφαιρίων, από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, κατά τη διάρκεια αποθήκευσης σε CPD-SAGM [46].



Εικόνα 19: Μέγιστο ποσοστό δισκοκυττάρων, αναστρέψιμων και μη αναστρέψιμων μεταβολών. Μορφολογική εκτίμηση των λευκαφαιρεμένων (L) και των μη λευκαφαιρεμένων (N) ερυθρών αιμοσφαιρίων, από μικροσκόπιο σάρωσης, κατά τη διάρκεια αποθήκευσης σε CPD-SAGM, με μετρήσεις τη 2η, 21η και 42η ημέρα [46].

Όπως προαναφέρθηκε, η κυστιδιοποίηση αυξάνεται και στις δύο ομάδες με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης (Εικόνα 20). Ωστόσο, κατά την έρευνα των Antonelou et al. [46], υπήρξε μία στατιστικώς σημαντική αύξηση στην ποσότητα των κυστιδιακών πρωτεϊνών που συλλέχθηκαν από τα υπερκείμενα υγρά των μη λευκαφαιρεμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων, σε σύγκριση με τα λευκαφαιρεμένα, την 17^η ημέρα. Αυτή η αύξηση, μεγιστοποιήθηκε στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου [46, 84].



Εικόνα 20: Βαθμός κυστιδιοποίησης των λευκαφαιρεμένων (L) και των μη λευκαφαιρεμένων (N) ερυθρών αιμοσφαιρίων. Συγκριτική εκτίμηση του μέσου όρου του συνολικού περιεχομένου σε κυστιδιακές πρωτεΐνες ανά τον όγκο των ΣΕ, οι οποίες συλλέχθηκαν από το υπερκείμενο και των δύο ομάδων την 17^η και την 42^η ημέρα της αποθήκευσης [46].

Κατά την αποθήκευση, τα ερυθροκύτταρα υφίστανται μια βαθμιαία μεταβολή στο σχήμα τους. Πιο συγκεκριμένα, μεταβάλλονται από δισκοκύτταρα σε εχινοκύτταρα και τελικά σε σφαιρικά και εκφυλιστικά διαμορφωμένα κύτταρα. Αυτή η μεταβολή είναι στενά συνδεδεμένη με την απώλεια της μεμβράνης υπό τη μορφή κυστιδίων. Παρόλο που τα περισσότερα αποθηκευμένα κύτταρα φαίνονται ικανά να αντισταθμίσουν μία μέτρια απώλεια μεμβράνης ακολουθώντας την αντικατάσταση του εχινοκυτταρικού μέσου (αναστρέψιμα τροποποιημένα κύτταρα), το τελικό σφαιροεχινοκυτταρικό στάδιο είναι ένα μη αναστρέψιμο

αποτέλεσμα [46, 98]. Όντως, τα σφαιροεχινοκύτταρα είναι κύτταρα που πεθαίνουν, ή που πρόκειται να πεθάνουν, με πολύ μικρό προσδόκιμο ζωής και μικρή βιωσιμότητα μετά τη μετάγγιση [46].

Η μεμβρανική κυστιδιοποίηση έχει, αποδεδειγμένα, ως αποτέλεσμα την κλινικά σημαντική συσσώρευση περισσότερων κυστιδίων στους ασκούς με μη λευκαφαιρεμένα ΣΕ, συγκριτικά με αυτούς που περιέχουν λευκαφαιρεμένα ΣΕ. Αναμφισβήτητα, στην περίπτωση των ασκών με λευκαφαιρεμένα ΣΕ, τα κυστίδια που παράγονται, προέρχονται σχεδόν αποκλειστικά από τα αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια. Έτσι, αντιπροσωπεύουν ένα άμεσο μέτρο της απώλειας της μεμβρανικής επιφάνειας. Ωστόσο, στην περίπτωση των ασκών με μη λευκαφαιρεμένα ΣΕ, αναπόφευκτα το ίζημα περιέχει και κυστίδια που προέρχονται από τα εναπομείναντα λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια. Γενικά, επικρατεί η άποψη ότι η συντριπτική πλειοψηφία των κυστιδίων προέρχεται από την κυστιδιοποίηση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Αυτή η άποψη επικρατεί λόγω: α) του υψηλού ποσοστού των ερυθροκυττάρων έναντι αυτού των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων (στο τέλος της αποθηκευτικής περιόδου ανιχνεύεται 1 λευκό αιμοσφαίριο ανά 2000 ερυθροκύτταρα), β) παλαιότερων μελετών που δείχνουν ότι η πλειοψηφία των κυστιδίων, που συλλέχθηκαν από ασκούς μη λευκαφαιρεμένων ΣΕ, περιέχουν Hb και γ) της σημαντικά αυξημένης εχينوκυττάρωσης των μη λευκαφαιρεμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων, συγκριτικά με αυτά που έχουν υποστεί λευκαφαίρεση (*Εικόνες 18 & 19*). Είναι απίθανο η δύο ή τρεις φορές αυξημένη κυστιδιακή πρωτεΐνη, που ανιχνεύεται στους ασκούς που δεν έχουν υποστεί λευκαφαίρεση, να αποδίδεται στην κυστιδιοποίηση των κυττάρων που έχουν απομείνει στους ασκούς. Αντί για αυτό, μάλλον αντιπροσωπεύει την αρνητική επίπτωση των λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων, που έχουν απομείνει, στη διατήρηση της μεμβράνης των μη λευκαφαιρεμένων ερυθροκυττάρων [46].

Η κυστιδιοποίηση της μεμβράνης συμβάλλει στην αποβολή οξειδωμένων, κατεστραμμένων και δραστικών συστατικών σηματοδότησης, από τα ερυθροκύτταρα [46, 58]. Την ίδια στιγμή, η κυστιδιοποίηση και η μη αναστρέψιμη

παραμόρφωση είναι μέρος του φαινοτύπου¹⁷⁸ γήρανσης του ερυθροκυττάρου, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Οι μεταβολές του σχήματος των αποθηκευμένων κυττάρων συνδέονται με τις μεταβολές στην ικανότητα ροής, το αυξημένο ιξώδες και τη μειωμένη ροή στα τριχοειδικά συστήματα [46, 98]. Οι εκφυλιστικές μεταβολές του σχήματος και η απώλεια της μεμβρανικής επιφάνειας συμβάλλουν στις βλάβες της παραμόρφωσης που απειλούν τη βιωσιμότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων μετά τη μετάγγιση. Επίσης, έχουν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση κυστιδίων πλούσιων σε οξειδωμένα υλικά, που διαμεσολαβούν στη σηματοδότηση θανάτου και εξωτερίκευση (έκθεση στη μεμβράνη) PS. Αυτή η συγκεκριμένη σύνθεση των κυστιδίων, τα καθιστά ιδιαίτερα προφλεγμονώδη και προθρομβωτικά, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης σοβαρών αντιδράσεων μετά τη μετάγγιση. Συνεπώς, ο βαθμός της κυστιδιοποίησης και της μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης των αποθηκευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων χρησιμοποιείται ως μέσο μέτρησης της ποιότητας της αποθήκευσης. Παρόλα αυτά, η ταυτότητα των αποθηκευτικών παραμέτρων που επιβραδύνουν ή προωθούν την κυστιδιοποίηση, προς το παρόν, δεν έχει καθοριστεί. Τόσο η εχνοκυττάρωση, όσο και η κυστιδιοποίηση, *in vitro*, προωθούνται από την ενδοκυτταρική αύξηση του Ca^{2+} και τη μείωση του ATP. Όμως, κατά τη συμβατική αποθήκευση, αυτός ο συσχετισμός είναι αδύναμος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας των *Antonelou et al.* [46], η ελλιπής συντήρηση των πρωτεϊνών που συμβάλλει στην αποτελεσματική προσκόλληση του κυτταροσκελετού στη λιπιδική διπλοστιβάδα, φαίνεται να είναι μια πιθανή εναλλακτική εξήγηση. Επιπλέον, η επίδραση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών στην επιδεκτικότητα της κυστιδιοποίησης των αποθηκευμένων κυττάρων, έχει αναφερθεί και παλαιότερα από τους *Wagner et al.* [46, 85]. Τέλος, η συγκριτική ανάλυση των λευκαφαιρεμένων και μη λευκαφαιρεμένων ομάδων δείχνει ότι, τα εναπομείναντα λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια, συνηγορούν έναντι της δομικής ακεραιότητας και της διατήρησης της μεμβράνης των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων [46].

¹⁷⁸ Τα παρατηρούμενα βιοχημικά, φυσιολογικά, ή μορφολογικά χαρακτηριστικά ενός οργανισμού, που καθορίζονται από την αλληλεπίδραση του γονότυπου με το περιβάλλον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Νιτρικό Οξείδιο

Το νιτρικό οξείδιο (NO) είναι ένα ουδέτερο μόριο, το οποίο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε διάφορους τομείς της φυσιολογίας του ανθρώπινου οργανισμού [20, 99]. Λειτουργεί ως νευροδιαβιβαστικό μόριο και ως, προερχόμενο από τα μακροφάγα, μόριο άμυνας του ξενιστή, αναστέλλει τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και την έκφραση μορίων που προσκολλούνται στο ενδοθήλιο. Είναι αντιοξειδωτικό μόριο και έχει ισχυρή αγγειοδιασταλτική δράση [99]. Είναι επίσης κύριος παράγοντας χαλάρωσης που προέρχεται από το ενδοθήλιο. Παράγεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και παίζει μείζονα ρόλο στη ρύθμιση της ροής του αίματος, επηρεάζοντας τη χαλάρωση των παρακείμενων στα αιμοφόρα αγγεία λείων μυών¹⁷⁹ [20]. Η σύνθεσή του γίνεται από την αργινίνη¹⁸⁰ με τη βοήθεια της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (nitric oxide synthase, NOS)¹⁸¹ στα ενδοθηλιακά κύτταρα και διαχέεται ταχύτατα στα κύτταρα των λείων μυών, όπου μπορεί να ενεργοποιήσει τη διαλυτή γουανυλική κυκλάση (soluble guanylate cyclase, sGC)¹⁸², η οποία μετατρέπει GTP σε cGMP (cyclic guanosine monophosphate, κυκλική γουανοσίνη)¹⁸³, δημιουργώντας έναν καταρράκτη σηματοδότησης που οδηγεί σε χαλάρωση των λείων μυών και τελικά σε αγγειοδιαστολή [20, 99, 100]. Ένας

¹⁷⁹ Οι λείοι μύς βρίσκονται στο τοίχωμα των σπλάχνων (για αυτό λέγονται και σπλαχνομύς) και των αγγείων, στη βάση των τριχών στο δέρμα και στο εσωτερικό του ματιού. Έχουν μυϊκές ίνες χωρίς εγκάρσιες γραμμώσεις και εκτελούν ακούσιες κινήσεις.

¹⁸⁰ Η αργινίνη είναι ένα από τα 20 πιο βασικά αμινοξέα.

¹⁸¹ Η NOS είναι μια οικογένεια ενζύμων, που καταλύει την παραγωγή NO από την αργινίνη.

¹⁸² Η γουανυλική κυκλάση, και μάλιστα η διαλυτή μορφή της (soluble guanylate cyclase, sGC), αποτελεί τον κυριότερο υποδοχέα του νιτρικού οξειδίου και βρίσκεται μέσα στο κυτταρόπλασμα. Η sGC αποτελεί ένα ετεροδιμερές που δομείται από δυο διαφορετικές υπομονάδες την α και τη β και μόνο δύο ισομορφές αυτής (α1β1 και α2β1) έχουν βρεθεί σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Στο ένζυμο είναι επίσης συνδεδεμένη μια αίμη ως προσθετική ομάδα, η οποία είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του NO.

¹⁸³ Η cGMP είναι ένα κυκλικό νουκλεοτίδιο, που προέρχεται από το GTP. Η cGMP πιθανότατα δρα ως σηματοδότης της ενεργοποίησης των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών κινασών. Αποτελεί ρυθμιστή της κυτταρικής απόπτωσης, της γλυκογενόλυσης κ.α. Επίσης δρα στους λείους μύες ως σήμα χαλάρωσης και οδηγεί σε αγγειοδιαστολή.

μεσολαβητής της λειτουργίας της NOS με ιδιαίτερη σημασία είναι η τετραϋδροβιοπτερίνη (tetrahydrobiopterin - BH₄)¹⁸⁴. Όταν τα επίπεδα της BH₄ είναι πολύ χαμηλά, το ένζυμο αποσυνδέεται και παράγει υπεροξειδίο αντί για NO, αυξάνοντας την οξειδωτική βλάβη. Τελευταία, η αιμόλυση έχει συνδεθεί με την αποσύνδεση της NOS. Γενικά, η αιμόλυση σχετίζεται με αυξημένη οξειδωτική βλάβη, κάτι που μπορεί εν μέρει να οφείλεται στην αυτο-οξείδωση και στις αντιδράσεις Fenton που πραγματοποιούνται με βάση την αίμη, καθώς και στη μειωμένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα του NO. Λόγω των πολλαπλών ρόλων της NOS, η αποκατάσταση της βιοδιαθεσιμότητάς της (η οποία χάνεται κατά την μετάγγιση αποθηκευμένου αίματος) φέρεται να είναι ικανή να ελαττώσει πολλές επιπλοκές που αποδίδονται στις αποθηκευτικές βλάβες, όπως φλεγμονώδη, θρομβωτικά και αγγειοδραστικά περιστατικά [99].

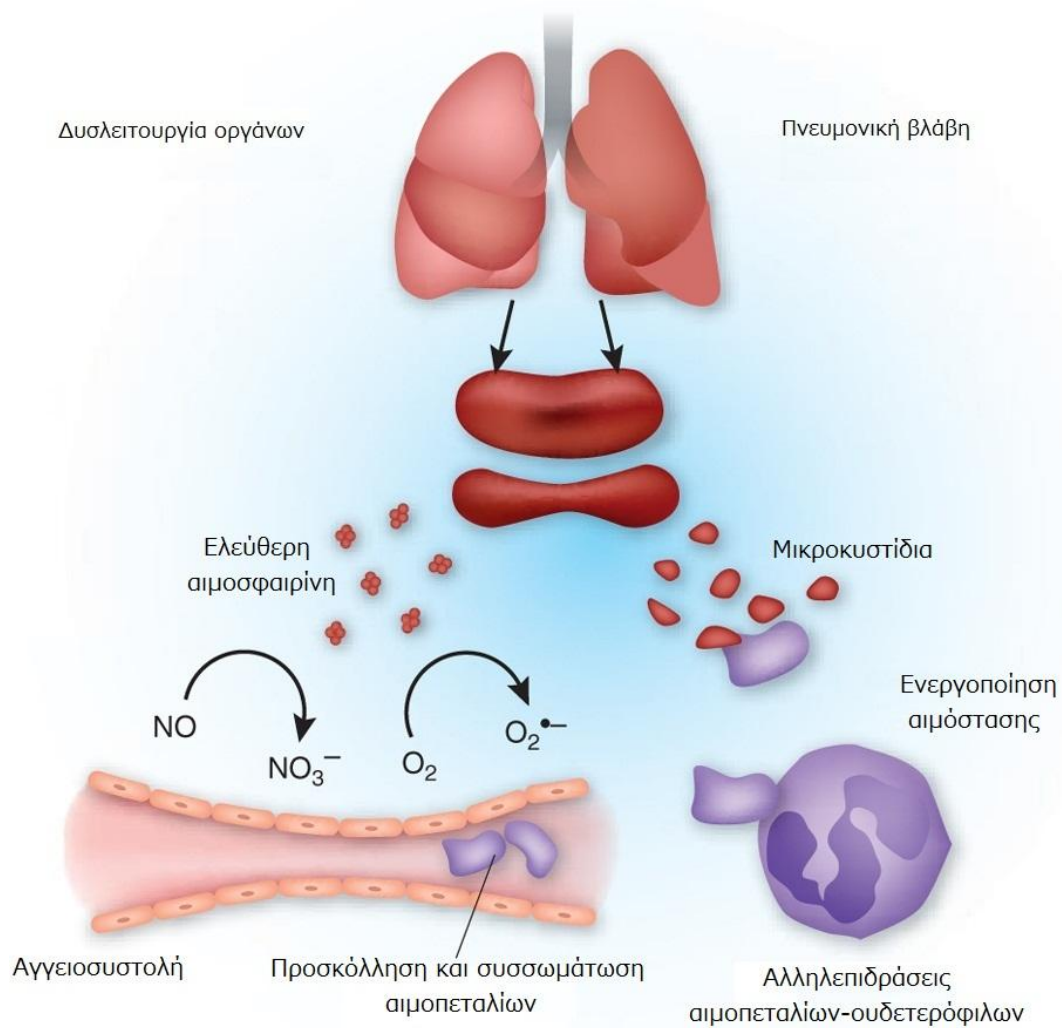
Έχουν περιγραφεί τρεις ισομορφές NOS : η ενδοθηλιακή (endothelial NOS, eNOS), η νευρωνική (neuronal NOS, nNOS) και η επαγώγιμη (inducible NOS, iNOS) [20, 100]. Η ενδοθηλιακή NOS ελέγχει τη σηματοδότηση της παραγωγής NO από το ενδοθήλιο, κάτι που περιγράφεται ως παρακρινής ρύθμιση¹⁸⁵ του αγγειακού τόνου. Αν και η ενδοθηλιακή NOS θεωρείται πως αποτελεί την κύρια πηγή NO για τη ρύθμιση της λειτουργίας των αγγείων, η νευρωνική NOS, αλλά πιθανά και η επαγώγιμη NOS, μπορούν να παίξουν κάποιο ρόλο. Επίσης, υπάρχουν και ενδοκρινείς¹⁸⁶ σηματοδοτήσεις NO που περιλαμβάνουν παραγωγή NO από πρωτεΐνες του αίματος, κυρίως από την Hb [100]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η τελευταία παρατήρηση ερευνών, που υποστηρίζει την ύπαρξη ερυθροκυτταρικής NOS [20]. Έτσι το ερυθροκύτταρο, εκτός από τη μεταφορά O₂ και CO₂, φέρεται να ελέγχει και τις τοπικές συγκεντρώσεις NO και συνεπώς μπορεί να έχει ιδιαίτερα σημαντική συμμετοχή στη ρύθμιση της ροής του αίματος στη μικροκυκλοφορία [100]. Επιπλέον, το NO, μέσω της ενδοθηλιακής NOS, μέσω των άλλων δύο

¹⁸⁴ Η BH₄ είναι ένας συμπαράγοντας για την παραγωγή NO από τις NO συνθάσες, καθώς και συμπαράγοντας για την παραγωγή μίας σειράς άλλων ουσιών.

¹⁸⁵ Η παρακρινής ρύθμιση αναφέρεται σε δράση μίας ορμόνης σε παρακείμενα κύτταρα.

¹⁸⁶ Η ενδοκρινής ρύθμιση αναφέρεται σε έκκριση μίας ορμόνης στην κυκλοφορία.

ισομορφών (της νευρωνικής NOS και της επαγωγίμης NOS), αλλά και μέσω άλλων πιθανών μηχανισμών σχηματισμού του, συμμετέχει και επηρεάζει την ομοιόσταση. Αυτό πραγματοποιείται με αναστολή της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων. Επίσης, λειτουργεί ως τοξικός παράγοντας στην άμυνα του ξενιστή, μειώνει την έκφραση μορίων προσκόλλησης και έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Έτσι, το NO φαίνεται να συνεισφέρει σε πολλές λειτουργίες που θα μπορούσαν να συνδεθούν με τις αποθηκευτικές βλάβες, περιλαμβάνοντας την ροή του αίματος, πιθανή φλεγμονή ή και θρόμβωση (Εικόνα 21) [20].



Εικόνα 21: Μηχανισμοί που συνεισφέρουν στην αποθηκευτική βλάβη. Η αποδόμηση των ερυθροκυττάρων (μέσω της αιμόλυσης) καταλήγει σε απελευθέρωση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης και δημιουργία μικροκυστιδίων. Αυτά προκαλούν εκκαθάριση του NO, οδηγώντας σε αγγειοσυστολή, ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και συγκόλλησή τους, καθώς και φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Η μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO (που εκκαθαρίζεται από την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και την αιμοσφαιρίνη των μικροκυστιδίων) προκαλεί τόσο απώλεια αγγειοδιασταλτικών ερεθισμάτων και δημιουργία ριζών οξυγόνου, όσο προσκόλληση και συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, δυσχεραίνοντας περαιτέρω την ήδη επιβαρυσμένη μικροκυκλοφορία. Τα μικροκυστίδια με εκφρασμένη PS στην επιφάνειά τους, μπορούν να προωθήσουν την ενεργοποίηση αιμοστατικών διαδικασιών και συγκολλήσεις αιμοπεταλίων-ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων λευκών αιμοσφαιρίων [20].

8. 1. NO προερχόμενο από την αιμοσφαιρίνη ή τα ερυθροκύτταρα και η υποξική αγγειοδιαστολή

Είναι γνωστό ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια στηρίζουν τον κυτταρικό μεταβολισμό μεταφέροντας O_2 στους ιστούς και CO_2 από αυτούς. Ωστόσο, λιγότερο διαδεδομένο είναι το γεγονός ότι τα ερυθροκύτταρα μπορούν επίσης να ελέγχουν την οξυγόνωση των ιστών σε ένα άλλο επίπεδο. Εγγενείς ρυθμιστικοί μηχανισμοί των ερυθροκυττάρων φέρονται να ελέγχουν την τοπική ροή του αίματος, ώστε να αιματώνουν, πρωτίστως, τους υποξικούς ιστούς (και άρα να τους παρέχουν το απαραίτητο O_2). Η διαδικασία αυτή έχει οριστεί ως υποξική αγγειοδιαστολή, εννοώντας τη χαλάρωση των αγγειακών λείων μυών με αύξηση στη ροή του αίματος, ως απόκριση στη χαμηλή pO_2 . Η δράση αυτή των ερυθρών αιμοσφαιρίων, λειτουργώντας σε δύο διαφορετικά επίπεδα με στόχο τον έλεγχο της οξυγόνωσης, ελκύει φυσικά το ενδιαφέρον, καθώς τα ερυθροκύτταρα είναι ιδανικά για να επωμιστούν τη ρύθμιση και την παρακολούθηση του O_2 και καθώς οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να δουλέψουν συνεργατικά, ώστε να αυξήσουν σημαντικά τη διανομή του O_2 σε ιστούς με έλλειψη οξυγόνου. Παρόλο που η απελευθέρωση NO από τα ερυθροκύτταρα δεν έχει ακόμα κατανοηθεί πλήρως σε βιοχημικό επίπεδο, η διαδικασία αυτή φαίνεται να αποτελεί το πιθανότερο αίτιο της σηματοδότησης της, προερχόμενης από τα ερυθροκύτταρα, υποξικής αγγειοδιαστολής. Με βάση το σημαντικό του ρόλο στην αιμάτωση και στην οξυγόνωση των ιστών, το NO έχει περιγραφεί ως «το τρίτο αναπνευστικό αέριο της φύσης» [100].

8. 2. Μηχανισμοί παραγωγής NO από την αιμοσφαιρίνη

Σε αντίθεση με την παραγωγή NO από το ενδοθήλιο, οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους η Hb ή τα ερυθρά αιμοσφαίρια παράγουν NO δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί και αποτελούν θέμα μελέτης και συζήτησης. Πρόσφατες έρευνες υποδηλώνουν πως η SNO-Hb ρυθμίζει την υποξική αγγειοδιαστολή από τα ερυθροκύτταρα [100]. Στο μοντέλο αυτό, το NO δεσμεύεται από την β -93 Cys στην

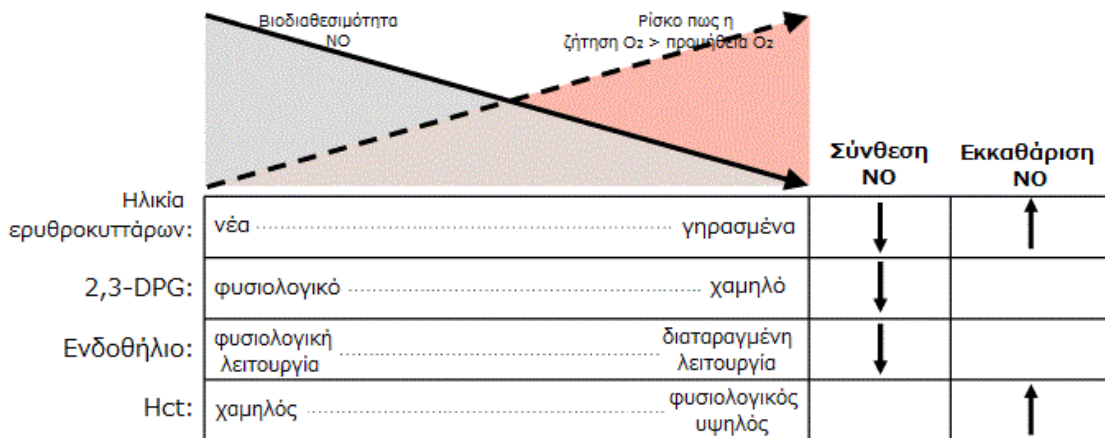
R (relaxed, οξυγονωμένη) μορφή της Hb, σχηματίζοντας SNO-Hb. Η SNO-Hb μπορεί με τη σειρά της να απελευθερώσει NO, όταν η pO_2 μειωθεί και η Hb επιστρέψει στην T (αποξυγονωμένη) μορφή της. Άρα, τα ερυθροκύτταρα μπορούν να λειτουργούν ως αποθήκη NO, σχηματίζοντας SNO-Hb κάτω από οξυγονωμένες συνθήκες, με επακόλουθη απελευθέρωση NO για την προώθηση της αγγειοδιαστολής, όταν τα επίπεδα O_2 είναι χαμηλά (συνθήκες υποξίας). Επειδή η SNO-Hb μειώνεται ταχέως κατά την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων, πιθανολογείται πως η αποθηκευτική βλάβη των ερυθροκυττάρων είναι η αιτία, τουλάχιστον εν μέρει, της ανεπάρκειας SNO-Hb. Παρόλα αυτά, γνωστές επιδράσεις του 2,3-DPG εγείρουν ερωτήματα για το μοντέλο αυτό. Το 2,3-DPG σταθεροποιεί τη δεοξυ-Hb, κάτι που θα έπρεπε να προωθεί την απελευθέρωση NO, ενώ μειωμένα επίπεδα 2,3-DPG θα έπρεπε να προωθούν το σχηματισμό SNO-Hb. Όμως, τόσο το 2,3-DPG, όσο και η SNO-Hb μειώνονται κατά την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων, αν και με πολύ διαφορετική κινητική¹⁸⁷ [100].

Με βάση τόσο χημικές, όσο και ποσοτικές αναλύσεις, υπάρχουν επίσης επιχειρήματα, που υποστηρίζουν πως η SNO-Hb δεν μπορεί να μετατραπεί σε αγγειοδραστικό NO, αλλά ακόμα και αν μπορούσε, η ποσότητά της στα ερυθροκύτταρα δεν θα ήταν αξιόλογη. Ως εναλλακτικός μηχανισμός, έχει παρατηρηθεί από ερευνητές ότι, νιτρώδη άλατα (που βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο πλάσμα) μπορούν να μετατραπούν σε NO από την Hb και ότι η SNO-Hb σχηματίζεται μόνο ως παρενέργεια αυτής της διαδικασίας. Στο μοντέλο αυτό, η δεοξυ-Hb δεσμεύει νιτρώδη και ένα πρωτόνιο για να σχηματίσει NO και met-Hb. Μετά, το NO μπορεί να φύγει από το ερυθροκύτταρο, προκαλώντας αγγειοδιαστολή, ή μπορεί να δεσμεύσει μια δεύτερη δεοξυ-Hb, σχηματίζοντας σιδηρο-νιτροζυλιωμένη Hb (iron-nitrosyl-Hb, $HbFe^{2+}\text{-NO}$ / $HbNO$). Με την προώθηση της απελευθέρωσης O_2 και της σταθεροποίησης της δεοξυ-Hb, το 2,3-DPG διευκολύνει την παραγωγή NO μέσω αυτής της οδού [100]. Άρα, τα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα με εξαντλημένα αποθέματα 2,3-DPG, ίσως έχουν μειωμένη ικανότητα σύνθεσης NO [100]. Ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση πως

¹⁸⁷ Η μελέτη των συντελεστών και των μηχανισμών των χημικών αντιδράσεων.

η χρονική πορεία της εξάντλησης του 2,3-DPG (περίπου 14 ημέρες μετά την έναρξη της αποθήκευσης), συσχετίζεται με τα ευρήματα ερευνών που δείχνουν πως μετάγγιση με αίμα αποθηκευμένο για πάνω από 14 ημέρες, έχει περισσότερες πιθανότητες πρόκλησης νοσηρότητας ή και θανάτου στον μεταγγιζόμενο [22, 35, 100]. Και με τους δύο μηχανισμούς που περιγράφηκαν, το NO πρέπει να εγκαταλείψει το ερυθροκύτταρο για να δράσει στους λείους μύς και να προκαλέσει αγγειοδιαστολή, αν και ο μηχανισμός με τον οποίο τελικά φεύγει από το ερυθροκύτταρο δεν είναι ακόμα σαφής [100].

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως το αποθηκευμένο αίμα, το οποίο χαρακτηρίζεται από την εξάντληση των αποθεμάτων NO, διαταράσσει το φυσιολογικό αγγειακό τόνο, καθώς φαίνεται πως τα αρτηριακά αγγεία (τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro*) εμφανίζουν μειωμένη διαστολή στην παρουσία αποθηκευμένου αίματος. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να αντιστραφούν εν μέρει με αναπλήρωση του NO του αίματος πριν τη μετάγγιση. Η μειωμένη διασταλτικότητα των αγγείων έχει ως επακόλουθο τη μειωμένη ροή του αίματος και την επίσης μειωμένη μεταφορά και διανομή O₂. Η προκύπτουσα υποξία μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια του μυοκαρδίου και άλλων οργάνων. Επίσης μπορεί να ευθύνεται για τα δυσμενή αποτελέσματα που παρατηρούνται σε κλινικές έρευνες μετά από μετάγγιση με αποθηκευμένο αίμα, όπως προτείνει η υπόθεση INOBA (*insufficient nitric oxide bioavailability*, ανεπαρκής βιοδιαθεσιμότητα νιτρικού οξειδίου). Σύμφωνα με αυτή, όταν τα συσσωρευμένα αποτελέσματα των μεταγγίσεων με ερυθροκύτταρα, καθώς και με παράγοντες του μεταγγιζόμενου, μειώσουν την τοπική βιοδιαθεσιμότητα του NO σε επίπεδα κάτω από ένα ορισμένο κρίσιμο όριο, τότε η αιμάτωση του ιστού είναι ανεπαρκής και δεν μπορεί να ανταποκριθεί στις μεταβολικές απαιτήσεις, οδηγώντας σε νοσηρότητα ή και θνησιμότητα στον μεταγγιζόμενο (Εικόνα 22) [100].



Εικόνα 22: Η υπόθεση INOVA. Η INOVA ίσως είναι ο συνδετικός κρίκος που ενώνει μια σειρά διαφορετικών συνιστωσών που σχετίζονται με τις αποθηκευτικές βλάβες και τα δυσμενή κλινικά αποτελέσματα μετά από μεταγγίσεις με αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα: το χρόνο αποθήκευσης(ηλικία ερυθροκυττάρων), τα επίπεδα 2,3-DPG, τη λειτουργία του ενδοθηλίου και τις τιμές του Hct μετά τη μετάγγιση [100].

8. 3. Εκκαθάριση NO από την αιμοσφαιρίνη

Αποτελώντας έναν εναλλακτικό μηχανισμό για τον έλεγχο της τοπικής βιοδιαθεσιμότητας του NO, η Hb μπορεί επίσης να εκκαθαρίσει NO που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο μηχανισμός αυτός δεν είναι αμοιβαία αποκλειόμενος από άλλους μηχανισμούς σύνθεσης NO, για την ακρίβεια μάλιστα, η Hb ή/ και τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν να ρυθμίσουν τις τοπικές συγκεντρώσεις NO τόσο μέσω της σύνθεσης, όσο και μέσω της εκκαθάρισης του NO. Παρόλα αυτά, στις περισσότερες περιπτώσεις, η εκκαθάριση φαίνεται πως δεν παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς ο εγκλεισμός της Hb μέσα στα ερυθροκύτταρα φέρεται να αποτρέπει την εκκαθάριση του NO. Επιπλέον, σε φυσιολογικές συνθήκες, κατά την κυκλοφορία του αίματος στα αγγεία, η πλειοψηφία των ερυθροκυττάρων συγκεντρώνεται στο κέντρο της ροής και έτσι δημιουργείται μία ζώνη, ελεύθερη κυττάρων, παρακείμενη του ενδοθηλίου (φαινόμενο Fahreus¹⁸⁸)

¹⁸⁸ Η εξάρτηση του ιξώδους του ανθρώπινου αίματος στα τριχοειδή όπου ρέει, αναγνωρίζεται ως φαινόμενο Fåhræus-Lindqvist. Υπάρχει επίσης ένα συσχετιζόμενο αλλά διαφορετικό φαινόμενο, που ονομάζεται Fåhræus effect. Αυτό περιγράφει τη μείωση της μέσης συγκέντρωσης των ερυθροκυττάρων στο ανθρώπινο αίμα, καθώς μειώνεται η διάμετρος των σωληνώσεων στις οποίες ρέει. Με άλλα λόγια, στα αγγεία

[100]. Αντιθέτως, κάτω από συνθήκες όπου είναι παρούσα ελεύθερη Hb (π.χ. μετά από μετάγγιση αποθηκευμένου αίματος που έχει υποστεί μερική αιμόλυση), ή σε περιπτώσεις όπου τα ερυθροκύτταρα είναι πιο κοντά στα τοιχώματα των αγγείων (π.χ. σε αυξημένες τιμές αιματοκρίτη), η εκκαθάριση του προερχόμενου από το ενδοθήλιο NO, από την Hb, ίσως γίνει φυσιολογικά και κλινικά σημαντική, οδηγώντας σε σημαντικές μειώσεις των επιπέδων του βιοδιαθέσιμου NO [100].

Η Hb εκκαθαρίζει το NO, κυρίως, μέσω της κλασικής αντίδρασης αποξυγόνωσης, κατά την οποία το NO αντιδρά με την οξυ-Hb προς το σχηματισμό met-Hb και νιτρικών (*Αντίδραση 3*) [99].



Η αντίδραση αυτή, κατά την οποία έχουμε οξείδωση του σιδήρου της αίμης, καταλήγοντας στη σιδηρική του μορφή (Fe^{3+}), από την αρχική σιδηρούχα μορφή (Fe^{2+}), συμβαίνει με μεγάλη ταχύτητα, μη επιτρέποντας την επαρκή διάχυση του NO (καθώς το NO διαχέεται με πιο αργούς ρυθμούς). Το NO επίσης αντιδρά με την δεοξυ-Hb, καθώς δεσμεύεται στην αίμη, σχηματίζοντας HbNO (*Αντίδραση 4*) [99].

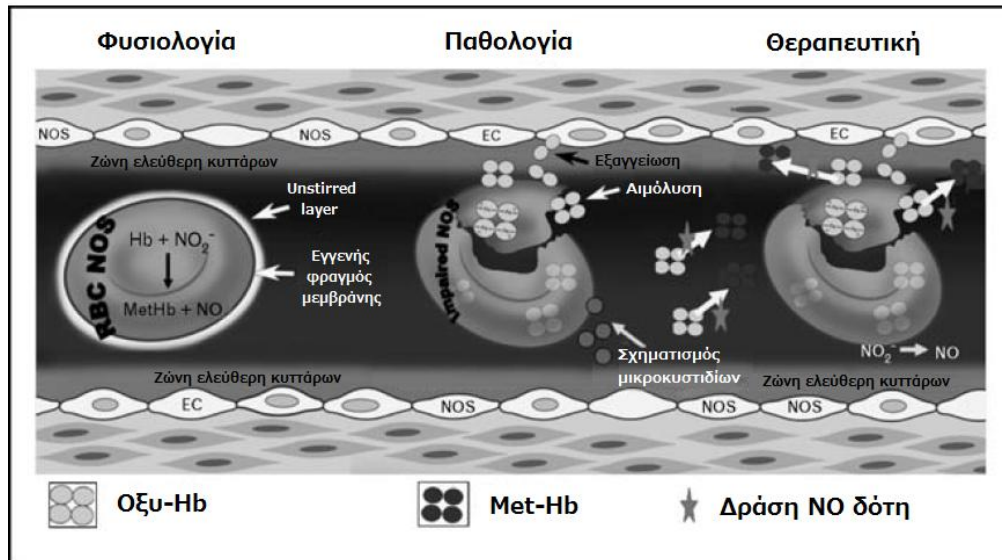


Η αντίδραση αυτή μπορεί να διατηρεί προσωρινά τη δραστηριότητα του NO υπό τη μορφή HbNO, όμως ο ρυθμός αποδέσμευσης του NO από την Hb είναι πολύ αργός με αποτέλεσμα, ουσιαστικά, ο σχηματισμός HbNO να περιορίζει τελικά τη βιοδιαθεσιμότητα του NO. Επιπλέον, όταν το NO απελευθερώνεται από την HbNO στο εσωτερικό των ερυθροκυττάρων, πρέπει να αποφεύγει τη δέσμευσή του από την Hb (στην αίμη), κάτι που είναι πολύ δύσκολο [99].

με διάμετρο κάτω από 500μm, ο αιματοκρίτης μειώνεται όσο μειώνεται η διάμετρος των τριχοειδών. Το φαινόμενο Fåhræus σίγουρα επηρεάζει το φαινόμενο Fåhræus-Lindqvist, όμως το Fåhræus δεν είναι η μόνη αιτία του Fåhræus-Lindqvist.

Ο λόγος για τον οποίο το προερχόμενο από το ενδοθήλιο NO δεν υποβάλλεται στην αντίδραση αποξυγόνωσης (*Αντίδραση 3*) σε μεγάλο βαθμό (όπως προέβλεπαν οι αρχικοί υπολογισμοί), είναι ότι η Hb, η οποία βρίσκεται κλεισμένη μέσα στο ερυθροκύτταρο, αντιδρά με το NO με πολύ πιο αργούς ρυθμούς σε σύγκριση με την ελεύθερη Hb [99, 100]. Τρεις μηχανισμοί συνεισφέρουν στη μειωμένη εκκαθάριση του NO από τα ερυθροκύτταρα (*Εικόνα 23*): α) ο ρυθμός της αντίδρασης περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την εξωτερική διάχυση του NO στο ερυθροκύτταρο, β) η διάχυση του NO παρεμποδίζεται μερικώς από ένα φυσικό φραγμό κατά μήκους της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (unstirred layer¹⁸⁹ ή/ και εγγενής φραγμός μεμβράνης) και γ) η Hb, που είναι εγκλεισμένη στο ερυθροκύτταρο, είναι περιορισμένη στον αυλό που δημιουργείται από τη ροή του αίματος (φαινόμενο Fahreus) και δεν εξαγγειώνεται στο ενδοθήλιο [99, 101].

¹⁸⁹ Ως unstirred layer ορίζεται η εξωτερική στιβάδα της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου.



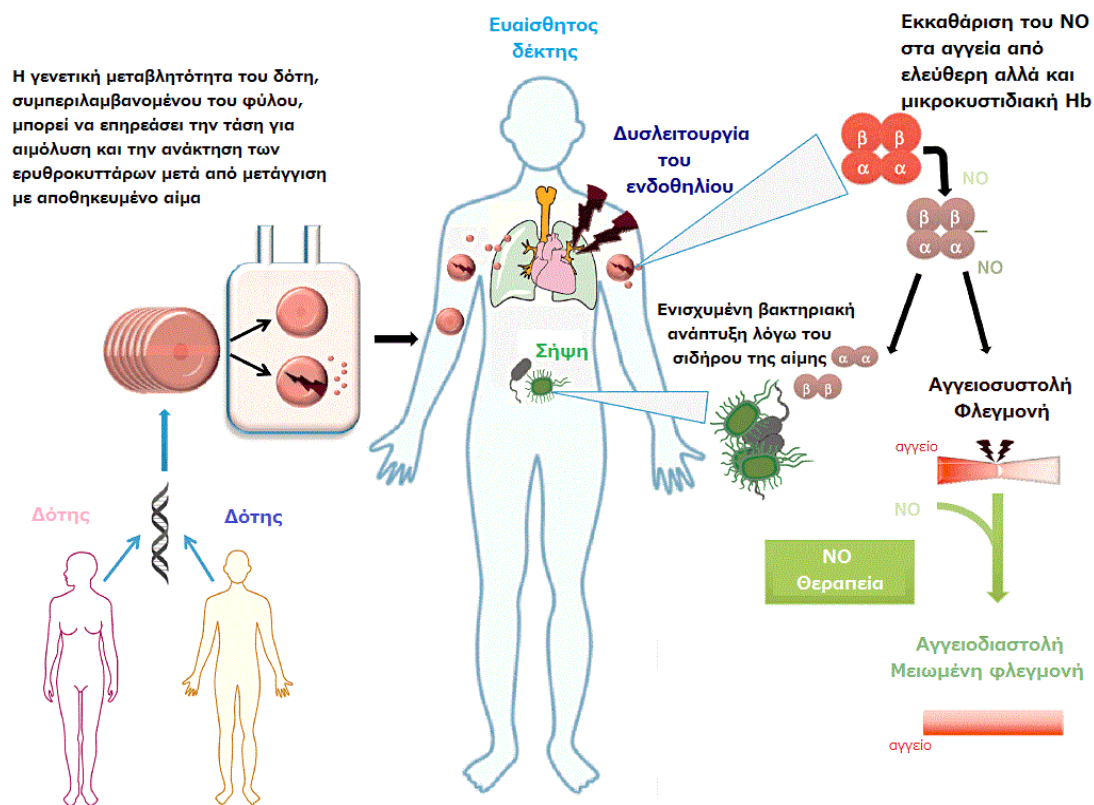
Εικόνα 23: Τα ερυθροκύτταρα βρίσκονται σε ένα αγγείο, του οποίου το ενδοθήλιο περιέχει NOS και το οποίο περιβάλλεται από κύτταρα λείων μυών, τα οποία περιέχουν διαλυτή sGC. Οι παράγοντες που συμμετέχουν στη μείωση της εκκαθάρισης του NO από τα ερυθροκύτταρα είναι: η ελεύθερη από ερυθροκύτταρα ζώνη, η unstirred layer και ο εγγενής μεμβρανικός φραγμός. Ο σχηματισμός του NO στα ερυθροκύτταρα επιτυγχάνεται από τη NOS και από τη μείωση των νιτρικών από την δεοξυ-Hb. Το ερυθροκύτταρο στο κέντρο της εικόνας παρουσιάζει τη παθολογία που συνδέεται με συνθήκες αιμόλυσης και σχηματισμού μικροκυστιδίων, που αποτελούν κομμάτι της αποθηκευτικής βλάβης. Η Hb απελευθερώνεται στο διάλυο της ροής του αίματος, προκαλώντας εκκαθάριση NO μέσα στην ελεύθερη από κύτταρα ζώνη και (μέσω της εξαγγείωσης) πέρα από αυτή (στο ενδοθήλιο). Τα μικροκυστίδια επίσης διαταράσσουν την ομοιόσταση του NO. Έτσι, υπάρχει περίπτωση να επηρεαστεί η δραστηριότητα της NOS. Το ερυθροκύτταρο στα δεξιά της εικόνας, δείχνει τη θεραπευτική δράση ουσιών που αντιδρούν με την οξυ-Hb σχηματίζοντας met-Hb, η οποία είναι λιγότερο αποτελεσματική στην εκκαθάριση NO [99].

8. 4. Εισπνεόμενο NO

Μέσω της εκκαθάρισης NO από την ελεύθερη Hb και την Hb των μικροκυστιδίων, η αιμόλυση, που παρατηρείται μετά από μεταγγίσεις, παίζει σημαντικό ρόλο στην προώθηση της υπέρτασης, συμπέρασμα που προέκυψε από την ερευνητική εργασία του *Donadee et al.* [102, 103]. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζονται και από τις μελέτες του *Yu et al.* [104], που δείχνουν, ότι οι αντιδράσεις υπέρτασης κατά τη μετάγγιση παλαιού αίματος σχετίζονται με

αυξημένα επίπεδα αιμόλυσης και συσσώρευση ελεύθερης Hb ή/ και Hb εγκλεισμένης μέσα στα μικροκυστίδια, στο υπερκείμενο. Επίσης παρατήρησαν πως η υπέρταση λόγω αιμόλυσης μπορούσε να προληφθεί με τη χορήγηση εισπνεόμενου NO σε πειραματόζωα με υπέρταση [102]. Παρομοίως, έρευνες του *Roback et al.* [100] παρουσιάζουν την ικανότητα των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων (28-42 ημέρες) να ανταγωνίζονται την προκληθείσα από NO αγγειοδιαστολή σε πειράματα σε επίμυες [102, 105]. Ο συσχετισμός μεταξύ της, σχετιζόμενης με την αιμόλυση, έλλειψης NO και των βλαβών λόγω μετάγγισης (αποθηκευτικών βλαβών), κυρίως σε ασθενείς που πάσχουν από ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, έχει ενθαρρύνει τις έρευνες για μεθόδους βελτίωσης της βιοδιαθεσιμότητας του NO στην κυκλοφορία [102].

Η πιθανή χρήση του NO ως θεραπευτικό μέσο προσελκύει, τα τελευταία χρόνια, συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον, με πολυάριθμες μελέτες, τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα, με θετικά αποτελέσματα της χρήσης NO για διάφορες παθολογικές καταστάσεις (*Εικόνα 24*) [102]. Το εισπνεόμενο NO, μία ασφαλής μέθοδος χορήγησης NO, φέρεται να εμποδίζει την αγγειοσυστολή που προκαλείται από την Hb [104, 106]. Επίσης, χορήγηση πρόδρομων του NO ουσιών (νιτρώδη, νιτρικά άλατα) ή και εισπνοή αερίου NO φαίνεται πως είναι αποτελεσματική στην προστασία κατά των βλαβών λόγω ισχαιμίας, των ελκών στομάχου, των εμφραγμάτων του μυοκαρδίου και των βακτηριακών λοιμώξεων [102]. Στο χώρο των μεταγγίσεων, η χρήση της θεραπείας με NO για την αποκατάσταση των φυσιολογικών μηχανισμών σηματοδότησης NO και της φυσιολογικής ροής του αίματος μετά από μετάγγιση, έχει πολύ καλές προοπτικές, παρόλο που περαιτέρω μελέτες κρίνονται απαραίτητες [102].

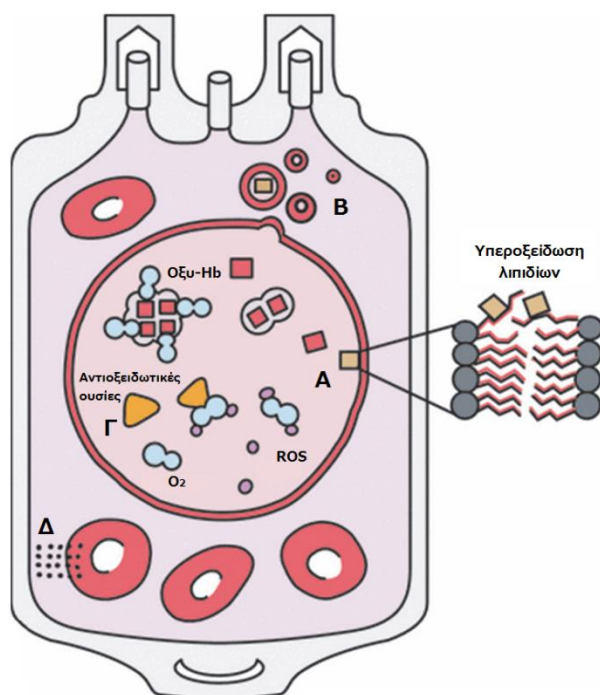


Εικόνα 24: Η γενετική μεταβλητότητα του δότη, συμπεριλαμβανομένου του φύλου (καθώς φαίνεται πως τα ερυθροκύτταρα των γυναικών είναι πιο ανθεκτικά στην αιμόλυση, κάτω από διάφορες στρεσογόνες συνθήκες [102]), μπορεί να επηρεάσει την τάση προς αιμόλυση καθώς και την ανάκτηση των ερυθροκυττάρων μετά από μετάγγιση με αποθηκευμένο αίμα. Η αποθηκευτική βλάβη των ερυθροκυττάρων μπορεί να περιλαμβάνει μετατροπές στη δομή της μεμβράνης, οδηγώντας σε αιμόλυση και απελευθέρωση μικροκυστιδίων. Μαζική μετάγγιση μονάδων αίματος ή μετάγγιση αίματος σε ασθενείς που εμφανίζουν δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, κάποια λοίμωξη ή/και άλλες παθολογικές καταστάσεις (ευαίσθητοι δέκτες), μπορεί να παρουσιάσουν επιδείνωση, με φλεγμονή, αγγειοσυστολή και υπέρταση, καταλήγοντας σε πολυοργανική δυσλειτουργία. Επιπλέον, η αιμόλυση μπορεί να επιδεινώσει τη σήψη, λόγω της απελευθέρωσης σιδήρου από τις μετουσιωμένες μορφές Hb. Η θεραπεία NO πιθανώς μπορεί να μετριάσει σχετιζόμενες με τη μετάγγιση βλάβες σε ασθενείς που πάσχουν από ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, μέσω της βελτίωσης της βιοδιαθεσιμότητας του NO, που είναι απαραίτητη για την αγγειοδιαστολή και τη σωστή λειτουργία του ενδοθηλίου [102].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Οξειδωση

9. 1. Μηχανισμοί της οξειδωτικής βλάβης στα ερυθροκύτταρα

Η οξειδωτική βλάβη - οξείδωση/ υπεροξείδωση και αλληλεπίδραση λιπιδίων και πρωτεϊνών από ROS, όπως ρίζες υδροξυλίου, υπεροξυλίου και αλκοξυλίου - είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση αποθηκευτικών βλαβών στα ερυθροκύτταρα. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια περιέχουν, σε μεγάλη συγκέντρωση, ένα μείγμα σιδήρου (στην Hb) και οξυγόνου (διαλυμένο στο κυτταρόπλασμα και δεσμευμένο στην Hb), το οποίο αντιδρά εύκολα κάτω από ορισμένες συνθήκες. Τα άτομα του σιδήρου στην Hb πρέπει να παραμένουν στην σιδηρούχο κατάστασή τους (Fe^{2+}) ώστε να δεσμεύουν και να αποδεσμεύουν το O_2 . In vivo, ο Fe^{2+} στην Hb προστατεύεται από την οξείδωση μέσα στο ερυθροκύτταρο, όμως, όταν τα κύτταρα αφαιρούνται από τον οργανισμό και αποθηκεύονται σε συνθήκες ψυγείου, οι μηχανισμοί που προστατεύουν τα ερυθροκύτταρα παύουν να λειτουργούν σωστά και η Hb γίνεται ευάλωτη στην οξείδωση (Εικόνα 25) [38].



Εικόνα 3: Επιλεγμένα ευρήματα της οξειδωτικής βλάβης των ερυθροκυττάρων κατά την αποθήκευσή τους. Η παρατεταμένη αποθήκευση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μετουσίωση της Hb και την οξείδωση του σιδήρου της αίμης. (Α) Προϊόντα της μετουσίωσης της Hb είναι ικανά να σχηματίσουν σύμπλοκα με φωσφολιπίδια της μεμβράνης και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, οδηγώντας σε οξείδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. (Β) Σύμπλοκα Hb-μεμβράνης μπορούν να συμβάλουν στην απελευθέρωση κυστιδίων κατά την αποθήκευση, τα οποία περιέχουν Hb. (Γ) Η αυξημένη οξειδωτική βλάβη είναι επίσης συνέπεια της μη σωστής αντιοξειδωτικής προστασίας (από διάφορες ουσίες, π.χ. γλουταθειόνη, καταλάση), καθώς και της παρουσίας μοριακού O_2 που είναι διαθέσιμο για αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. (Δ) Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ερυθροκυττάρων και των συστατικών του υλικού κατασκευής των ασκών αποθήκευσης, μπορούν να προωθήσουν οξειδωτικές βλάβες [39].

9. 1. 1. Η οξείδωση της Hb και τα μονοπάτια της οξειδωτικής βλάβης

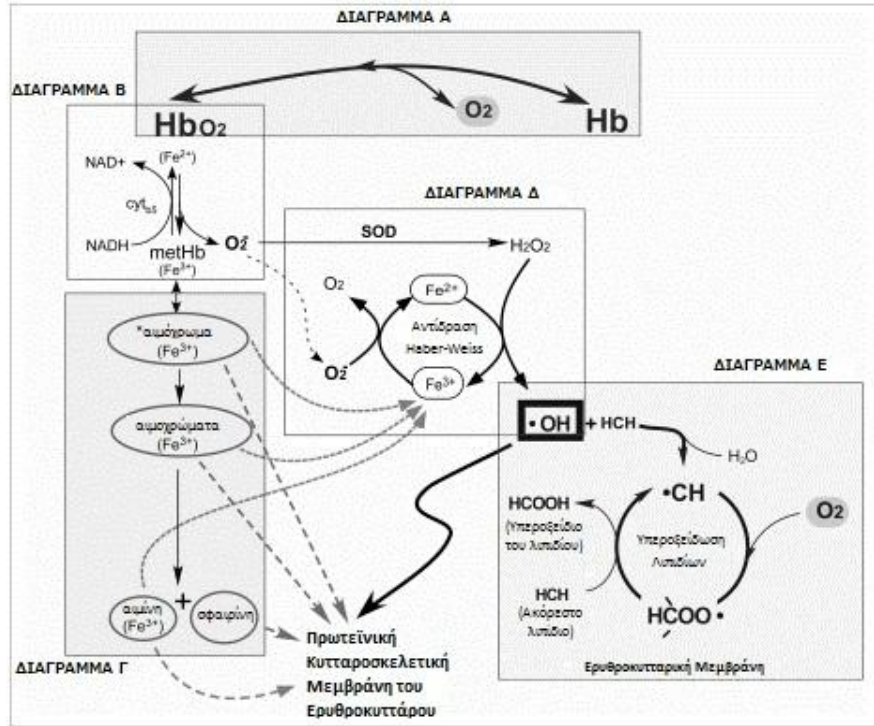
Η Hb και τα προϊόντα της μετουσίωσής της παίζουν σημαντικό ρόλο στην οξειδωτική βλάβη των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων, καθώς λειτουργούν ως καταλύτες αυτών των διαδικασιών [38].

Η Hb περιέχει, όπως έχει προαναφερθεί, τέσσερα σιδηρούχα ιόντα, ένα σε καθεμιά από τις υπομονάδες τις. Για την πραγματοποίηση των φυσιολογικών λειτουργιών τους, κάθε μόριο δεοξυαιμοσφαιρίνης δεσμεύει τέσσερα μόρια O₂ (τα οποία φυσικά μπορούν στη συνέχεια να αποδεσμευτούν), χωρίς να ανταλλάσουν ηλεκτρόνια (Εικόνα 26, Διάγραμμα Α). Στο κυτταρόπλασμα των ερυθροκυττάρων, το περιβάλλον που διατηρείται προστατεύει τη σιδηρούχο μορφή του σιδήρου. Επίσης, με τη βοήθεια ενζύμων επιτυγχάνεται και η αντιστροφή της οξειδωσης [38].

Ένα μικρό ποσοστό Hb παρόλα αυτά, αυτοοξειδώνεται, προς σχηματισμό σιδηρικής (Fe³⁺) met-Hb και ανιόντος υπεροξειδίου (O₂⁻). Στην κυκλοφορία, η σιδηρική met-Hb μετατρέπεται πάλι σε σιδηρούχο Hb από την NADH εξαρτώμενη κυττοχρωμική b₅ ρεδοκτάση. Όμως, κατά την αποθήκευση, η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται καθυστερημένα ή και καθόλου, ενώ ταυτόχρονα, ο σχηματισμός met-Hb ενισχύεται στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα με μερικώς οξυγονωμένη Hb (Εικόνα 26, Διάγραμμα Β). Από τη στιγμή που η met-Hb σχηματίζεται, είναι εγγενώς ασταθής, καθώς μετουσιώνεται πολύ εύκολα, πρώτα σε αναστρέψιμα αιμοχρώματα, στη συνέχεια σε μη-αναστρέψιμα αιμοχρώματα και τελικά σε σφαιρίνη και ελεύθερη αίμη (αιμίνη) (Εικόνα 26, Διάγραμμα Γ). Η σταθερότητα της met-Hb μπορεί να επηρεαστεί περαιτέρω σε θερμοκρασίες αποθήκευσης, παρόμοια με τη χαμηλής θερμοδυναμικής σταθερότητας met-μυοσφαιρίνη, στους 4°C (κρύα μετουσίωση) [38].

Ο Fe³⁺ στα αιμοχρώματα, η ελεύθερη αίμη και ο σίδηρος που απελευθερώνεται από την αίμη μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιδραστήρια Fenton στο κύκλο Haber-Weiss, ο οποίος τροφοδοτείται από H₂O₂ για να παράγει ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες αντιδρούν πολύ εύκολα (Εικόνα 26, Διάγραμμα Δ). Οι ρίζες υδροξυλίου (·OH) «επιτίθενται» στις πρωτεΐνες και (με την παρουσία O₂) προκαλούν την εκκίνηση ενός κύκλου υπεροξειδωσης των λιπιδίων στη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Εικόνα 26, Διάγραμμα Ε) [38]. Οι ρίζες OH· έχουν ως στόχο τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στα λιπίδια, σχηματίζοντας ρίζες λιπιδίων, οι

οποιές στη συνέχεια σχηματίζουν υδροπεροξυ-ρίζες με το οξυγόνο, που με τη σειρά τους στοχεύουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ολοκληρώνοντας τον κύκλο. Ο κύκλος αυτός συνεχίζεται παρουσία O_2 , μέχρι δύο ρίζες να αντιδράσουν ώστε να τερματιστεί η αντίδραση, καταλήγοντας σε αλληλεπίδραση λιπιδίων [38].



Εικόνα 26: Η αιμοσφαιρίνη και τα μονοπάτια της οξειδωτικής βλάβης στα ερυθροκύτταρα. Διάγραμμα Α: Η φυσιολογική λειτουργία της αντιστρέψιμης δέσμησης του O_2 στη σιδηρούχα (Fe^{2+}) αίμη της Hb(δεοξυ-Hb). Διάγραμμα Β: Αυτο-οξείδωση της οξυ-Hb σε met-Hb (Fe^{3+}) με παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου (O_2^-). Σε μια σταθερή κατάσταση, 1-2% της Hb βρίσκεται σε μορφή met-Hb στην κυκλοφορία. Η met-Hb μετατρέπεται πάλι σε Fe^{2+} Hb μέσω της NADH-συνδεόμενης κυττοχρωμικής b₅ met-Hb ρεδουκτάσης (cyt_{b5}). Διάγραμμα Γ: Μετουσίωση της met-Hb. Η met-Hb μετουσιώνεται πρώτα σε «αντιστρέψιμα αιμοχρώματα» (*αιμόχρωμα), στα οποία οι αλλοιώσεις είναι μικρές και μπορούν ακόμα να επιδιορθωθούν. Τα αντιστρέψιμα αιμοχρώματα μετουσιώνονται περαιτέρω σε «μη αναστρέψιμα αιμοχρώματα», τα οποία στη συνέχεια διασπώνται σε σφαιρίνες και αιμίνη. Διάγραμμα Δ: Η αντίδραση Haber-Weiss παράγει ρίζες υδροξυλίου ($\cdot OH$). Ανιόντα υπεροξειδίου, που δημιουργούνται κατά την παραγωγή της met-Hb, μετατρέπονται σε ανιόντα υπεροξειδίου (H_2O_2) από τη δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD). Ρίζες υδροξυλίου παράγονται μαζί με H_2O_2 και Fe^{2+} από τα μετουσιωμένα προϊόντα met-Hb, λειτουργώντας ως αντιδραστήρια Fenton. Ο Fe^{3+} επιστρέφει σε Fe^{2+} από H_2O_2 . Ρίζες υδροξυλίου

οξειδώνουν πρωτεΐνες των ερυθροκυττάρων που βρίσκονται κοντά τους και αλληλεπιδρούν με αυτές. Διάγραμμα Ε: Κύκλος υπεροξειδωσής λιπιδίων. Ρίζες υδροξυλίου στη μεμβράνη επιτίθενται σε ακόρεστα λιπίδια προς σχηματισμό ριζών λιπιδίων, που στη συνέχεια συνδυάζονται με μοριακό O_2 για να σχηματίσουν ρίζες υπεροξυλίου των λιπιδίων, οι οποίες με τη σειρά τους επιτίθενται σε ακόρεστα λιπίδια για να ολοκληρώσουν τον κύκλο [38].

9. 1. 2. Αυτο-οξείδωση της Hb κάτω από συνθήκες μερικής έλλειψης οξυγόνου

Το H_2O_2 αποτελεί υπόστρωμα για την αντίδραση Haber-Weiss, που παράγει ρίζες υδροξυλίου, και είναι επίσης προϊόν της αντίδρασης της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) με ανιόντα υπεροξειδίου, τα οποία είναι υποπροϊόντα της αυτό-οξείδωσης της Hb (Εικόνα 26, Διαγράμματα Β & Γ). Επειδή η met-Hb σχηματίζεται όταν η οξυ-Hb αυτό-οξειδώνεται, η συγκέντρωση του διαλυμένου O_2 αποτελεί σημαντικό παράγοντα στον καθορισμό του ρυθμού σχηματισμού της met-Hb. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο ρυθμός σχηματισμού met-Hb και παραγωγής υπεροξειδίου φτάνει στα ανώτερα επίπεδά του όταν η Hb είναι μόνο μερικώς κατειλημμένη από O_2 σε κατάσταση υποξίας (SO_2 περίπου 60%), παρά όταν είναι πλήρως οξυγονωμένη σε υψηλά επίπεδα pO_2 . Με βάση αυτά τα στοιχεία, η τεχνική συλλογής και επεξεργασίας του φλεβικού αίματος που χρησιμοποιείται αυτή τη στιγμή, κατά την οποία το αίμα αποθηκεύεται σε αρχικά επίπεδα SO_2 περίπου 60% και αφήνεται στη συνέχεια να οξυγονωθεί περαιτέρω, μέχρι να φτάσει περίπου σε επίπεδα 100% κατά την διάρκεια των έξι εβδομάδων της αποθήκευσης, καθώς το οξυγόνο σταθερά διαχέεται, διαπερνώντας την πλαστική επιφάνεια των ασκών, κατά πάσα πιθανότητα επιδεινώνει την οξειδωτική βλάβη που εμφανίζεται στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα [38].

9. 1. 3. Η επίδραση της οξειδωτικής βλάβης στα αποθηκευμένα ερυθροκύτταρα

Πριν την εφαρμογή των ιδιαίτερα ευαίσθητων και ειδικών πρωτεομικών τεχνικών, η απόκτηση σαφών και άμεσων αποδείξεων της επιβλαβούς επίδρασης της οξείδωσης στα ερυθρά αιμοσφαίρια, κατά την αποθήκευση, αποτελούσε ένα

δύσκολο εγχείρημα. Για παράδειγμα, μια απλή μέτρηση των επιπέδων της met-Hb μπορεί να μην αντικατοπτρίζει ακριβώς το ρυθμό σχηματισμού της met-Hb ή την έκταση της οξειδωτικής βλάβης κατά την αποθήκευση, εξαιτίας της ασταθούς φύσης της met-Hb [38]. Ένα μικρό ποσοστό ερυθροκυττάρων που βρίσκεται στο στάδιο της γήρανσης τη στιγμή της αιμοληψίας, όπως και ερυθροκύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες, μπορούν να προκαλέσουν ψευδώς αυξημένες τιμές ελεύθερης Hb, αίμης και άλλων υποπροϊόντων της οξείδωσης. Έτσι, οι διαθέσιμες αποδείξεις, όσον αφορά τους μηχανισμούς της Hb-μεσολαβούμενης οξειδωτικής βλάβης και της επίδρασής της στη φυσιολογική λειτουργία των ερυθροκυττάρων, αποκτήθηκαν είτε από *in vitro* πειράματα, κατά τα οποία τα ερυθροκύτταρα εκτέθηκαν σε οξειδωτικό στρες, είτε μέσω της μελέτης ερυθροκυττάρων από ασθενείς με διάφορες αιμοσφαιρινοπάθειες¹⁹⁰ (όπως η θαλασσαιμία¹⁹¹ ή η δρεπανοκυτταρική αναιμία) ή και άλλες ασθένειες (όπως μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο¹⁹²) [38].

Κατά τη διάρκεια της συμβατικής αποθήκευσης (αεροβίως), παρατηρείται μια αύξηση στην οξείδωση των πρωτεϊνών [38]. Τα αποτελέσματα της έρευνας των *D'Amici et al.* [50] υποδήλωσαν μειωμένο ρυθμό οξείδωσης των πρωτεϊνών του ερυθροκυττάρου κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Χρησιμοποιώντας καθιερωμένες πρωτεομικές τεχνικές αναγνώρισαν επίσης πρωτεΐνες, οι οποίες είχαν τροποποιηθεί νωρίς και με O₂ εξαρτώμενο τρόπο, περιλαμβανομένων των πρωτεϊνών 4.2, 4.1, ζώνη 3 και σπεκτρίνη [38, 50]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί

¹⁹⁰ Οι αιμοσφαιρινοπάθειες (παθολογική αιμοσφαιρίνη) είναι καταστάσεις που προκαλούνται από ποιοτικές διαταραχές των πολυπετιδικών αλυσίδων της σφαιρίνης, ως αποτέλεσμα της εναλλαγής του γενετικού κώδικα και των αλυσίδων. Οι διαταραχές αυτές μπορεί να συνοδεύονται ή όχι από κλινικά ή εργαστηριακά παθολογικά ευρήματα. (Οι κληρονομικές διαταραχές της β-αλυσίδας είναι συχνότερες, ενώ οι αντίστοιχες των α, γ και δ-αλυσίδων είναι πιο σπάνιες).

¹⁹¹ Έτσι ονομάζονται οι παθολογικές καταστάσεις (ομάδα αναιμιών) που χαρακτηρίζονται από ποσοτική γενετική διαταραχή της σύνθεσης της φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης. (Περιλαμβάνουν μειωμένη παραγωγή της α, β, γ και δ-αλυσίδας. Η γενετική ανωμαλία μεταβιβάζεται σύμφωνα με τους νόμους του Mendel και απαντά τόσο στην ομόζυγη, όσο και στην ετερόζυγη μορφή (στίγμα)).

¹⁹² Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) (myelodysplastic syndromes, MDS) αποτελούν μια ομάδα ετερογενών επίκτητων νεοπλασματικών κλωνικών νοσημάτων των αρχέγονων πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων με ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά (μη αποδοτική αιμοποίηση στο μυελό των οστών και κυτταροπενία στο περιφερικό αίμα).

μείωση των επιπέδων της GSH, καθώς και μείωση της δραστηριότητας της GSH εξαρτώμενης υπεροξειδάσης κατά την αποθήκευση [38].

Μετά την αυτο-οξειδωση της Hb σε met-Hb, η met-Hb μετουσιώνεται σε αιμοχρώματα, τα οποία εναποτίθενται πάνω στα λιπίδια και τον κυτταροσκελετό της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων. Ο ομοδιμερισμός (συσσωμάτωση) της πρωτεΐνης-ζώνη 3 που ακολουθεί εξαιτίας αυτής της εναπόθεσης αιμοχρωμάτων, επιτρέπει στο ανοσοποιητικό σύστημα του δέκτη να αναγνωρίσει και να απομακρύνει τα μεταγγιζόμενα ερυθρά αιμοσφαίρια από την κυκλοφορία του αίματος. Τα εναποτιθέμενα αιμοχρώματα μπορούν επίσης να διαταράξουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ άλλων πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού (σπεκτρίνη, ακτίνη και πρωτεΐνη 4.1). Τα αιμοχρώματα υφίστανται περαιτέρω μετουσίωση προς σχηματισμό αιμίνης, σφαιρίνης και ελεύθερου μοριακού σιδήρου, προϊόντα που εύκολα διαχωρίζονται σε λιπιδικές διπλοστιβάδες. Η ελεύθερη αίμη αποτελεί πιθανό αιμολυτικό παράγοντα, και επίσης, όπως και ο ελεύθερος μοριακός σίδηρος, μπορεί να λειτουργήσει ως αντιδραστήριο Fenton για την παραγωγή ριζών υδροξυλίου, τα οποία με τη σειρά τους εκκινούν αντιδράσεις λιπιδικής και πρωτεϊνικής υπεροξειδωσης. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης καταλήγει σε αυξημένη τάση απώλειας κατιόντων, αυξημένη έκθεση PS, κυστιδιοποίηση και αιμόλυση. Όλες αυτές οι αλλαγές ευνοούν την ερύπτωση και την εκκαθάριση των ερυθρών αιμοσφαιρίων από την κυκλοφορία του αίματος. Η υπέρμετρη κυστιδιοποίηση λόγω της οξειδωσης, οδηγεί σε δυσανάλογα μεγάλη απώλεια επιφάνειας της μεμβράνης σε σχέση με τον όγκο του κυττάρου, και έτσι, καθώς ο λόγος επιφάνειας-όγκου μειώνεται, τα ερυθρά αιμοσφαίρια αλλάζουν σχήμα, πλησιάζοντας τελικά το σχήμα σφαίρας. Οι μεταβολές στην μορφολογία και η αλληλεπίδραση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών της μεμβράνης του κυτταροσκελετού, που προκαλούνται από τις ρίζες υδροξυλίου, συμβάλλουν στην σημαντική μείωση της ελαστικότητας των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων και, δηλαδή, της ικανότητάς τους να «παραμορφώνονται» όταν χρειάζεται (κυκλοφορία αίματος στα τριχοειδή αγγεία) [38].

9. 2. Πρόληψη των οξειδωτικών βλαβών κατά την αποθήκευση

Οι πιθανές προσεγγίσεις για τη μείωση των οξειδωτικών βλαβών κατά την αποθήκευση είναι δύο: η προσθήκη αντιοξειδωτικών στα διαλύματα αποθήκευσης, ή η απομάκρυνση οξειδωτικών παραγόντων από τα εναιωρήματα των ερυθρών αιμοσφαιρίων [38].

Η μείωση της οξείδωσης με την προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών ή πρόδρομων μορίων, ώστε να ενισχυθεί η λειτουργία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των ίδιων των ερυθροκυττάρων, αποτελεί μια ελκυστική προσέγγιση, η οποία έχει δείξει την αποτελεσματικότητά της στην βελτίωση βιοχημικών παραμέτρων των ερυθροκυττάρων που έχουν μετρηθεί *in vitro* [38]. Για παράδειγμα, η ομάδα του *Dumaswala et al.* [107] πρότεινε τον εμπλουτισμό του πρόσθετου διαλύματος αποθήκευσης με GSH πρόδρομα αμινοξέα (γλουταμίνη, γλυκίνη και N-ακετυλ-L-κυστεΐνη), ώστε να παρεμποδιστεί η σταδιακή μείωση των επιπέδων της GSH κατά την αποθήκευση και ώστε να διατηρηθεί ένα αναγωγικό περιβάλλον στο κυτταρόπλασμα. Παρόλο που παρατηρήθηκε ενίσχυση των επιπέδων της GSH και άλλων βιοχημικών παραμέτρων, ο πραγματικός αντίκτυπος των αλλαγών αυτών σε καταστάσεις *in vivo* δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί πλήρως [36, 92]. Παρόλα αυτά, οποιαδήποτε μεταποίηση των διαλυμάτων αποθήκευσης που χρησιμοποιούνται σήμερα (κυρίως όταν πρόκειται για προσθήκη νέων ουσιών σε αυτά), απαιτεί διεξοδικές μελέτες για την ασφάλειά τους, πριν καταφέρουν να κερδίσουν την έγκριση για την χρήση τους από τις εκάστοτε αρχές [38]. Επίσης, για να αντιμετωπιστεί το οξειδωτικό στρες, έχει προταθεί η χορήγηση αντιοξειδωτικών (βιταμίνες E και C, β-καροτένιο) στους δότες, αν και η αγωγή αυτή τείνει απλά να μειώσει τα αποτελέσματα του οξειδωτικού στρες παρά να τα εμποδίσει [21].

Μια εναλλακτική προσέγγιση της μείωσης της οξειδωτικής βλάβης είναι η απομάκρυνση του O₂ από τα εναιωρήματα των ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά την έναρξη όπως και κατά την διάρκεια της αποθήκευσης, κλείνοντας έτσι το μονοπάτι μετουσίωσης της Hb και σταματώντας όλες τις οξειδωτικές αντιδράσεις που τροφοδοτούνται με O₂ (Εικόνα 26) [38]. Αυτή η προσέγγιση είναι εφικτή χάρη σε

ένα μοναδικό χαρακτηριστικό των ερυθροκυττάρων, τα οποία, σε αντίθεση με άλλα φυσιολογικά ευκαρυωτικά κύτταρα, στηρίζονται αποκλειστικά στην αναερόβια γλυκόλυση για τις ενεργειακές τους, μεταβολικές ανάγκες (και όχι στην οξειδωτική φωσφορυλίωση που διενεργείται στα μιτοχόνδρια) [38].

Η έρευνα των *Högman et al.* [108] αναφέρθηκε στα *in vitro* χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων κατά την αποθήκευσή τους σε δοχείο με N₂ ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση του φλεβικού αίματος κατά την διάρκεια των 6 εβδομάδων της αποθήκευσης [38, 108]. Στη μελέτη αυτή, τα ερυθροκύτταρα προετοιμάστηκαν με τον συμβατικό τρόπο (σε μη από-οξυγονωμένες συνθήκες) [38]. Με την αποφυγή της οξυγόνωσης της Hb δια μέσου των τοιχωμάτων του ασκού πολυβινυλοχλωριδίου¹⁹³ (που συμβαίνει με αργούς ρυθμούς κατά την διάρκεια της συμβατικής μεθόδου αποθήκευσης), και ταυτόχρονα επιτρέποντας σταδιακή εξισορρόπηση των επιπέδων O₂ και N₂ στο δοχείο, παρατηρήθηκε μείωση του SO₂ από το αρχικό 60% (περίπου) στο 32% μέσα στη περίοδο των 6 εβδομάδων, ενώ κατά το ίδιο χρονικό διάστημα αποθήκευσης με την συμβατική μέθοδο τα επίπεδα του SO₂ αυξάνονταν σχεδόν στο 100% [38, 108]. Στην έρευνα αυτή καταγράφηκαν υψηλότερα επίπεδα ATP και αυξημένη ικανότητα των ερυθροκυττάρων να παραμορφώνονται όταν χρειάζεται (ελαστικότητα), όμως δε συλλέχθηκαν *in vivo* δεδομένα [38]. Παρόλα αυτά, καθώς ο ρυθμός της αυτό-οξείδωσης της Hb φτάνει στα ανώτερα επίπεδα όταν το SO₂ ανέρχεται περίπου στο 60%, φαίνεται αμφίβολο η διαδικασία που χρησιμοποίησαν κατά την έρευνα αυτή να αποτελεί τη βέλτιστη προσέγγιση για τη μείωση της οξειδωτικής βλάβης [38].

Η μέθοδος αποφυγής της οξείδωσης που φέρεται να έχει περισσότερες προοπτικές, κρίνοντας από την επιτυχία των ερευνών και την θερμή υποδοχή που δέχτηκαν από την επιστημονική κοινότητα, είναι η αποθήκευση των ερυθροκυττάρων κάτω από αυστηρώς αναερόβιες συνθήκες. Η μελέτες των *Yoshida et al.* [38, 109, 110, 111] αποτελούν σημαντική παρακαταθήκη προς την

¹⁹³ Το πολυβινυλοχλωρίδιο (polyvinyl chloride, PVC) είναι ένα θερμοπλαστικό πολυμερές, δηλαδή μπορεί να μορφοποιηθεί ως τήγμα σε καλούπια. Μπορεί να δώσει προϊόντα με μεγάλη ποικιλία μηχανικών ιδιοτήτων (από εύκαμπτα έως και σκληρά), διαθέτει χημική αντοχή και αναφλέγεται δύσκολα.

διερεύνηση της περίπτωσης η αναερόβια αποθήκευση να αποτελέσει τη μελλοντική, καθιερωμένη μέθοδο αποθήκευσης, αν και περαιτέρω, διεξοδικές μελέτες, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, είναι απαραίτητες.

9. 3. Αναερόβια αποθήκευση

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, ή είναι σε εξέλιξη, θέτουν ερωτήματα πάνω στο εάν τα ισχύοντα πρωτόκολλα για την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων είναι όντως τα σωστά, ή εάν πρέπει να τεθούν σε χρήση εναλλακτικά πρότυπα [21]. Εάν τα δεδομένα των μελετών αυτών, καθώς και τα αποτελέσματα μελλοντικών ερευνών, επαληθευτούν, η στρατηγική που ακολουθείται σήμερα για την αποθήκευση θα αλλάξει τον προσανατολισμό της, εστιάζοντας στην αποφυγή των πιθανών παρενεργειών της παρατεταμένης αποθήκευσης [21].

Από μοριακής άποψης, οι περισσότερες μεταβολές που παρατηρούνται κατά την αποθήκευση είναι ήδη γνωστές. Ορισμένες από αυτές είναι αναστρέψιμες, μέσω της προσθήκης διαλυμάτων συντήρησης ή αναζωογόνησης, ενώ άλλες είναι μη αναστρέψιμες και άρα πρέπει να προληφθεί η εμφάνισή τους [21]. Οι πρώτες, περιλαμβάνουν μεταβολές στα επίπεδα συγκέντρωσης μικρών μορίων, όπως το ATP, το 2,3-DPG, το K^+ , το Na^+ και μεταβολές στο pH. Οι μη αναστρέψιμες αλλαγές περιλαμβάνουν ανεπανόρθωτες διαδικασίες μετουσίωσης των πρωτεϊνών, ακολουθούμενες από κατακερματισμό και συσσωμάτωσή τους, διεργασίες που καταλύονται από ελεύθερες ρίζες. Η υποκείμενη αιτία των φαινομένων αυτών είναι το παρατεταμένο οξειδωτικό στρες στο οποίο τα ερυθροκύτταρα είναι εκτεθειμένα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης [21].

Η ερευνητική ομάδα του *Yoshida et al.* [109, 110, 111], πρότεινε την εφαρμογή ενός άλλου πρωτοκόλλου αποθήκευσης, το οποίο αντιμετώπιζε το πρόβλημα στην πηγή του. Προτάθηκε η αποθήκευση απευθείας σε συνθήκες ειδικής ατμόσφαιρας, δηλαδή σε χώρο με αδρανές αέριο με $pO_2 < 4\%$,

χρησιμοποιώντας μια μέθοδο που οι ίδιοι κατοχυρώσανε και αποτελεί δική τους ευρεσιτεχνία (WO/1996/039026) [21]. Πιο συγκεκριμένα, με στόχο την μείωση της οξειδωσης των ερυθροκυττάρων, επιχειρήθηκε η μείωση του SO₂ στην αρχή της αποθήκευσης, σε επίπεδα όσο ήταν δυνατό πιο χαμηλά, και ακολούθως τα επίπεδα του SO₂ διατηρήθηκαν (και μάλιστα μειώθηκαν περαιτέρω) κατά τη συνολική διάρκεια της αποθηκευτικής περιόδου [38]. Αυτό επιτεύχθηκε αρχικά με την εξισορρόπηση του εναιωρήματος των ερυθροκυττάρων με τη χρήση αερίου Ar (αργό), το οποίο διοχετευόταν συνεχώς για μία ώρα πριν την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων στο ψυγείο (διαδικασία που οδήγησε σε μείωση του SO₂ κάτω από 3,6%), και στη συνέχεια τα ερυθροκύτταρα αυτά αποθηκεύτηκαν στους συμβατικούς ασκούς μέσα σε αεροστεγή δοχεία με Ar και H₂ (9:1) και με έναν καταλύτη παλλαδίου (ο οποίος ελάττωνε περαιτέρω το O₂ κατά την διάρκεια των 6 με 9 εβδομάδων της αποθήκευσης) [38, 111].

Οι επιπτώσεις της αφαίρεσης του O₂, και συνεπώς η μείωση του SO₂ σε πολύ χαμηλά επίπεδα νωρίς στην αποθήκευση μπορεί να περιορίσει την έκταση της οξειδωτικής βλάβης, που συσσωρεύεται στα ερυθροκύτταρα, μέσω των ακολούθων, πιθανών μηχανισμών: α) ελαττώνοντας τη συγκέντρωση της οξυ-Hb και άρα ελαττώνοντας τη συγκέντρωση της met-Hb, η οποία παράγεται από την αυτό-οξείδωση της οξυ-Hb (*Εικόνα 26, Διαγράμματα A & B*) [38], β) αποτρέποντας τη διάσπαση της μεμβράνης και κυτταροσκελετού που προκαλείται από τα αιμοχρώματα, την αιμίνη και τη σφαιρίνη (προϊόντα της μετουσίωσης της met-Hb) και άρα μειώνοντας την αιμόλυση και την ερύπτωση (*Εικόνα 26, Διάγραμμα Γ*) [38], γ) αποτρέποντας την παραγωγή ελεύθερης αίμης και σιδήρου (που αποτελούν αντιδραστήρια Fenton στην αντίδραση Haber-Weiss για την παραγωγή ριζών υδροξυλίου) [38], δ) μειώνοντας την παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου, τα οποία τροφοδοτούν την αντίδραση Haber-Weiss με δύο τρόπους: ως υπόστρωμα για την μείωση της σιδηρικής μορφής του σιδήρου, και ως πρόδρομη ουσία για τον σχηματισμό του H₂O₂ (*Εικόνα 26, Διάγραμμα Δ*) [38], μειώνοντας την παραγωγή ριζών υδροξυλίου και της επικείμενης αλληλεπίδρασης των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, για να αποτραπεί η μείωση της ελαστικότητας των ερυθροκυττάρων

(Εικόνα 26, Διάγραμμα Δ) [38], περιορίζοντας αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης (σε $SO_2=4\%$, η συγκέντρωση του ελεύθερου O_2 μειώνεται σε ποσοστό κάτω από το 1% του κορεσμένου σε αέρα αίματος στους $4^\circ C$) (Εικόνα 26, Διάγραμμα Ε), ώστε να μειωθεί η αιμόλυση και η ερύπτωση [38].

Τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών με τη χρήση αυτού του πρωτοκόλλου ακολούθησαν τα καθιερωμένα πρότυπα που χρησιμοποιούνται πάντα για τον έλεγχο των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων (αιμόλυση και επιβίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων 24 ώρες μετά την μετάγγιση), έχοντας θετικά αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε επίσης καθυστέρηση της μείωσης των επιπέδων του ATP και του 2,3-DPG. Επιπλέον, επισημάνθηκε πως προσθήκη ενός τυπικού διαλύματος αναζωογόνησης την 63^η ημέρα της αποθήκευσης, ήταν ικανή να αποκαταστήσει τα επίπεδα του ATP και του 2,3-DPG, κάνοντας την αποθήκευση για 120 ημέρες θεωρητικά πιθανή [21].

Υποστηρίζοντας την ίδια στρατηγική, αλλά πραγματοποιώντας ανεξάρτητες μελέτες, η ερευνητική ομάδα των *D'Amici et al.* [50] επίσης επεξεργάστηκε ένα αναερόβιο μοντέλο αποθήκευσης, χρησιμοποιώντας κλασικές πρωτεομικές μεθόδους για να συγκρίνει το συνολικό πρωτέομα των αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων που ακολουθούσαν το αναερόβιο πρωτόκολλο, με αυτό των μονάδων ερυθροκυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, καθώς είχαν αποθηκευτεί σύμφωνα με τα καθιερωμένα πρότυπα [21]. Κατά το μεσοδιάστημα της αποθήκευσης σε αδρανές αέριο¹⁹⁴ (μέσα στις 2 πρώτες εβδομάδες), δε εμφανίστηκαν σημάδια διάσπασης ή συσσωμάτωσης των πρωτεϊνών, φαινόμενα που παρουσιάστηκαν, αν και σε μικρή έκταση, κατά το τέλος της αποθηκευτικής περιόδου των 42 ημερών. Κατά συνέπεια, το αίμα που είχε αποθηκευτεί αναεροβίως, από μοριακής άποψης, ήταν καλύτερης ποιότητας από αυτό που είχε αποθηκευτεί με τις πρότυπες μεθόδους [21]. Πρέπει όμως να υπογραμμιστεί πως τα αποτελέσματα αυτά προέρχονται από τα αρχικά στάδια των αντίστοιχων

¹⁹⁴ Αδρανή ή ευγενή αέρια είναι τα: ήλιο (He), νέο (Ne), αργό (Ar), κρυπτό (Kr), ξένο (Xe) ραδόνιο (Rn) και βρίσκονται στην όγδοη ομάδα του περιοδικού πίνακα. Ονομάζονται αδρανή γιατί δεν ενώνονται με άλλα στοιχεία ούτε μεταξύ τους, αφού έχουν ήδη συμπληρωμένη την εξωτερική τους στιβάδα με οκτώ ηλεκτρόνια.

μελετών και κατά συνέπεια είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μοριακές και κλινικές δοκιμές¹⁹⁵.

Δεδομένου ότι η αναερόβια αποθήκευση φαίνεται πως είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος πρόληψης της πραγματοποίησης των προαναφερθέντων μη αναστρέψιμων φαινομένων διάσπασης ή/ και συσσωμάτωσης πρωτεϊνών και επίσης φέρεται να επιβραδύνει τη μείωση ATP και 2,3-DPG (αν και τα επίπεδα ATP και 2,3-DPG μπορούν εύκολα να επανέλθουν σε φυσιολογικές τιμές με την προσθήκη οποιουδήποτε διαλύματος αναζωογόνησης), μια τέτοια μορφή αποθήκευσης μπορεί να αποτελέσει μία εξαιρετική λύση στα κλινικά προβλήματα που παρατηρούνται σε διάφορες μελέτες πάνω στην αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια των πρωτοκόλλων αποθήκευσης αίματος που χρησιμοποιούνται σήμερα, καθώς αναμένονται τα οριστικά αποτελέσματα των μελετών και ερευνών που ήδη είναι σε εξέλιξη ή θα πραγματοποιηθούν στο άμεσο μέλλον και θα δώσουν αδιαμφισβήτητα δεδομένα, προς την επίτευξη ενός ιδανικότερου τρόπου αποθήκευσης. Αυτό που απομένει είναι να γεφυρωθεί το χάσμα μεταξύ βασικής έρευνας και μεγάλης κλίμακας εφαρμογής αυτών των αποτελεσμάτων, στόχος ο οποίος καλείται να πραγματοποιηθεί μέσω της εφαρμοσμένης έρευνας, ώστε η αναερόβια αποθήκευση να υιοθετηθεί στην αιμοδοσία [21].

¹⁹⁵ Η κλινική δοκιμή είναι ένα ιατρικό πείραμα κατά το οποίο σε συγκεκριμένο αριθμό εθελοντών δοκιμάζεται μια θεραπευτική αγωγή για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητά της και να προσδιοριστεί η τοξικότητά της (ανεκτικότητα). Στρατηγικές δοκιμές γίνονται για να καθοριστούν οι καλύτεροι τρόποι χορήγησης ενός φαρμάκου σε συνδυασμό με άλλες ουσίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: Συμπεράσματα και Μελλοντικές Προοπτικές

10. 1. Συμπεράσματα

Κατά την αποθήκευση, τα ερυθροκύτταρα υφίστανται πολύπλοκες δομικές και βιοχημικές μεταβολές. Σήμερα, το επίπεδο της γνώσης πάνω στο φυσιολογικό μηχανισμό μέσω του οποίου τα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται στο τέλος της φυσιολογικής διάρκειας ζωής τους, παρέχει το πλαίσιο για την αναγνώριση ποικίλων σημαντικών διαδικασιών: α) τη φυσιολογική διαδικασία γήρανσης του ερυθροκυττάρου, δηλαδή τα κρίσιμα βήματα, τα οποία οδηγούν σε διαταραχή της λειτουργίας του με ταυτόχρονη παραγωγή σημάτων εκκαθάρισης *in vivo*, β) τη διαδικασία που οδηγεί στην εμφάνιση των ερυθροκυτταρικών αποθηκευτικών βλαβών και γ) τη διαδικασία που καθορίζει το μέλλον των ερυθροκυττάρων μετά τη μετάγγιση, συμπεριλαμβανομένου του ρόλου του (αυτο)ανοσοποιητικού συστήματος, σε συνδυασμό με τη συμμετοχή των αποθηκευτικών βλαβών στις σοβαρές παρενέργειες μετά τη μετάγγιση [112].

Η παρατήρηση του ρόλου «κλειδί» της πρωτεΐνης-ζώνη 3 στη διατήρηση της ερυθροκυτταρικής δομής και λειτουργίας, της διευκρίνισης των μονοπατιών που ελέγχουν τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης-ζώνης 3 κατά την αποθήκευση, μπορεί να οδηγήσουν σε νέες προσεγγίσεις σε ότι αφορά τη διατήρηση της συγκέντρωσης του ATP και την κυτταρική ακεραιότητα. Επιπλέον, υπάρχει μία ταχεία αύξηση στον αριθμό των δεδομένων που υποδεικνύουν ένα σημαντικό ρόλο για το σχηματισμό κυστιδίων στην ομοιόσταση του ερυθροκυττάρου κατά τη γήρανση, *in vivo* και *in vitro*. Τα συμπεράσματα αυτά διευκρινίζουν την ανάγκη να χαρτογραφηθούν οι λειτουργικές οδοί μεταγωγής σήματος στο ερυθροκύτταρο, ιδιαίτερα αυτές που ελέγχουν τον κυτταρικό θάνατο.

Πιο συγκεκριμένα, η αναγνώριση του τελευταίου μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση του γιατί έως και το 30% των ερυθρών αιμοσφαιρίων εξαφανίζονται από την κυκλοφορία λίγο μετά τη μετάγγιση. Επίσης, διάφορες οδοί μεταγωγής σήματος του κυτταρικού θανάτου μπορεί να πυροδοτήσουν την απελευθέρωση κυστιδίων, τα οποία είναι πολύ πιθανό να συνεισφέρουν σε πολλές σοβαρές παρενέργειες μετά τη μετάγγιση [112].

Η αναγνώριση αυτών των διαδικασιών αποτελεί μια κύρια πρόκληση της σύγχρονης έρευνας στον τομέα των μεταγγίσεων και της ιατρικής, επειδή θα προσφέρει χρήσιμα εργαλεία για την αξιολόγηση και την πρόγνωση της ερυθροκυτταρικής ομοιόστασης *in vivo* και *in vitro*. Με αυτόν τον τρόπο, θα συνεισφέρει στην ανάπτυξη κατάλληλων πρωτοκόλλων μετάγγισης για διάφορες κατηγορίες ασθενών [112].

10. 2. Σημασία διάρκειας αποθήκευσης

Δεν είναι γνωστό, σε μεγάλο βαθμό, το πως αυτές οι αποθηκευτικές βλάβες επηρεάζουν τη λειτουργία και την επιβίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην κυκλοφορία μετά τη μετάγγιση, αλλά οι περισσότερες από αυτές τις μεταβολές παρουσιάζονται *in vivo*. Έτσι, κάποιος μπορεί να υποθέσει ότι η αποθήκευση προκαλεί μία επιτάχυνση της φυσιολογικής διαδικασίας γήρανσης των ερυθροκυττάρων. Απομένει να καθοριστεί αν αυτές οι μεταβολές μεταφράζονται σε λειτουργικές διαταραχές στον μεταγγιζόμενο [113].

Μέχρι σήμερα, δεν είναι γνωστό αν τα κλινικά αποτελέσματα επηρεάζονται από την ηλικία του αίματος που χρησιμοποιήθηκε για μετάγγιση και μια αβεβαιότητα παραμένει σε ότι αφορά τη σημασία της διάρκειας αποθήκευσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και το πότε το φρέσκο αίμα γίνεται πολυκαιρισμένο [113].

Παρά τις πολυάριθμες δημοσιεύσεις, η αβεβαιότητα ως προς το αν το πιο φρέσκο προς μετάγγιση αίμα είναι περισσότερο, λιγότερο, ή το ίδιο ωφέλιμο όσο το πολυκαιρισμένο προς μετάγγιση αίμα. Όντως, πολλές από τις μελέτες ήταν

ιδιαίτερα δύσκολο να ερμηνεύσουν τα υπάρχοντα δεδομένα. Έτσι, τα σημερινά δεδομένα είναι ανεπαρκή για τον καθορισμό του αν η μετάγγιση πολυκαιρισμένων μονάδων αίματος σχετίζεται είτε με βραχυπρόθεσμες, είτε με μακροπρόθεσμες, σοβαρές εκβάσεις μετά τη μετάγγιση [113].

10. 3. Μελλοντικές προοπτικές – Ομική

Ωστόσο, πρόσφατα ευρήματα που προέρχονται από την πρωτεομική ανάλυση, συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων της συγκριτικής πρωτεομικής, απέδωσαν απροσδόκητα δεδομένα, τα οποία άνοιξαν νέους τομείς βιολογικών ερωτημάτων πάνω στις νόσους που μπορεί να σχετίζονται με τα ερυθροκύτταρα, ή να έχουν επιπτώσεις στο πρωτόμα τους. Υπάρχουν πολύ καλές δυνατότητες για μεταγενέστερες προσεγγίσεις, οδηγώντας αυτήν την έρευνα πέρα από την πρωτεομική, σε τομείς όπως η αλληλεπιδρομικά, η γλυκομική και η λιπιδομική και, φυσικά, σε λεπτομερείς βιολογικές μελέτες [13].

Πάντως, κατά κύριο λόγο, η ιδέα των πρωτεϊνικών βάσεων δεδομένων έχει πολύ μεγάλη αξία και πρέπει να επιδιωχθεί. Ο συνδυασμός τους με τις προσεγγίσεις της ομικής των αλληλεπιδράσεων και της βιοπληροφορικής, έχει τεράστιες δυνατότητες να επεκτείνει τη σημερινή κατανόηση των αλληλεπιδράσεων του ερυθροκυττάρου με το περιβάλλον του [13].

Σήμερα, έχει φανεί πλέον, ότι η πρωτεομική και οι άλλοι «Omics» (επιστημονικοί) κλάδοι και, πιο συγκεκριμένα, η ομική του μεταβολισμού, υποδεικνύονται ως οι πιο κατάλληλοι υποψήφιοι για το βραβείο «νέου καλύτερου ρόλου» στον τομέα των μεταγγίσεων και της κλινικής βιοχημείας. Με τον όρο «Omics» κλάδοι, η επιστημονική κοινότητα αναφέρεται στους κλάδους που χαρακτηρίζονται από μία ολιστική, παρά από μια περιοριστική προσέγγιση, μέσω της έρευνας συγκεκριμένων τάξεων βιομορίων. Οι τάξεις των βιομορίων περιλαμβάνουν για παράδειγμα πρωτεΐνες (στην πρωτεομική), mRNAs (στη μεταγραφομική), κτλ. Η ανεκτίμητη γνώση που έχει συσσωρευτεί μετά από

δεκαετίες ερευνών, θα καταλήξει λίαν συντόμως στην εφαρμογή νέων τεχνολογιών ανάλυσης στους τομείς της μετάγγισης και της κλινικής βιοχημείας [114].

Για παράδειγμα, ο Sparrow προβλέπει ότι η πρωτεομική και η ομική του μεταβολισμού, εκτός από τη συμβολή τους στο σχεδιασμό και τον έλεγχο νέων συστημάτων αποθήκευσης ΣΕ, θα παίξουν κύριο ρόλο στην ανάλυση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας των υπαρχόντων προσθετικών διαλυμάτων, αλλά και των νέων πειραματικών διαλυμάτων. Όπως συμπεραίνει και ο Sparrow: «τώρα είναι η κατάλληλη στιγμή να αξιοποιηθεί η δύναμη των τεχνολογιών της ομικής. Έτσι, θα βρεθούν απαντήσεις και διορθωτικά μέσα για κάποια από τα συγκεκριμένα επιστημονικά ζητήματα και προβληματισμούς, που αφορούν τα προς μετάγγιση αποθηκευμένα ΣΕ» [114].

Οι Zolla and D'Alessandro [114] προβλέπουν ένα ρόλο για την πρωτεομική και τη μεταβολισμική στην ανάλυση των μεταβολών στη δομή της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, η οποία συνοδεύει την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων και έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτατη απομάκρυνση, από την κυκλοφορία του αίματος του δέκτη, ενός σημαντικού ποσοστού των κυττάρων που έχουν μεταγγιστεί [114].

Η ομική του μεταβολισμού και οι άλλοι κλάδοι της ομικής, φαίνεται να εξυπηρετούν άριστα τον σκοπό αυτό και υπόσχονται να προσφέρουν ανταγωνισμό στην πρόκληση για βελτίωση τεσσάρων βασικών τομέων, συγκεκριμένα τη νανοτεχνολογία, την προγνωστική ιατρική, την φαρμακοδιατροφική και την αναγεννητική ιατρική, και να προωθήσουν την αρχή μιας νέας εποχής για την κλινική βιοχημεία [114].

Η πρωτεομική και η ομική του μεταβολισμού θα έχουν καθοριστική σημασία στην ανάλυση των μεταβολών της μεμβρανικής δομής που θα ακολουθήσει. Η βασική πρόκληση είναι η ανάπτυξη βιολογικώς σχετικών συστημάτων ανάγνωσης, και η μετάβαση της έρευνας στην τράπεζα αίματος από τον έλεγχο ποιότητας στον ασκό, στον έλεγχο ποιότητας στον ασθενή [115].

Οι επιστήμονες που ασχολούνται με την πρωτομική και οι ειδικοί των μεταγγίσεων «κάθονται πλέον στο ίδιο τραπέζι» και έχουν αρχίσει να «δίνουν τα χέρια», με κοινό στόχο τη βελτίωση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας του συνόλου του τομέα των μεταγγίσεων παγκοσμίως, πάντα με έναν πιο επιστημονικά βασισμένο και έγκυρο τρόπο [114].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: Βιβλιογραφία

1. Hajdu SI. Blood transfusion from antiquity to the discovery of the Rh factor. *Ann Clin Lab Sci* 2003; 33: 471-3.
2. Learoyd P. A short history of blood transfusion. *NBS-Scientific & Technological Training (STT)* 2006; 042: 1-18.
3. Pavenski K, Saidenberg E, Lavoie M, Tokessy M, Branch DR. Red blood cell storage lesions and related transfusion issues: a Canadian Blood Services research and development symposium. *Transfus Med Rev* 2012; 26: 68-84.
4. Sturgis CC. The history of blood transfusion. *Bull Med Libr Assoc* 1942; 30: 105–112.
5. Madge HM. On transfusion of blood. *Br Med J* 1874; 1: 42-4.
6. Rous P, Turner JR. The preservation of living red blood cells in vitro: I. methods of preservation. *J Exp Med* 1916; 23: 219-37.
7. Rous P, Turner JR. The preservation of living red blood cells in vitro: II. the transfusion of kept cells. *J Exp Med* 1916; 23: 239-48.
8. Hess JR. Red cell storage. *J Proteomics* 2010; 73: 368-73.
9. Hess JR, Schmidt PJ. The first blood banker: Oswald Hope Robertson. *Transfusion* 2000; 40: 110-3.
10. Vandromme MJ, McGwin G Jr, Weinberg JA. Blood transfusion in the critically ill: does storage age matter? *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2009; 17: 35.
11. Hess JR. An update on solutions for red cell storage. *Vox Sang* 2006; 91: 13-9.
12. Miura AB. History of blood transfusion--development and future of blood transfusion in Japan. *Nihon Rinsho* 1997; 55: 2189-94.
13. Pasini EM, Lutz HU, Mann M, Thomas AW. Red blood cell (RBC) membrane proteomics--Part I: Proteomics and RBC physiology. *J Proteomics*. 2010; 73: 403-20.
14. Pasini EM, Mann M, Thomas AW. Red blood cell proteomics. *Transfus Clin Biol* 2010; 17: 151-64.
15. Cooper GM. Structure of plasma membrane. *Sinauer Associates* 2000; *The Cell* 2nd edition a molecular approach.
16. Diez-Silva M, Dao M, Han J, Lim CT, Suresh S. Shape and biomechanical characteristics of human red blood cells in health and disease. *MRS Bull* 2010; 35: 382-388.

17. Svetina S. Red blood cell shape and deformability in the context of the functional evolution of its membrane structure. *Cell Mol Biol Lett* 2012; 17: 171-81.
18. Hess JR, Grazzini G. Blood proteomics and transfusion safety. *J Proteomics* 2010; 73: 365-7.
19. Svelc T, Svetina S. Stress-free state of the red blood cell membrane and the deformation of its skeleton. *Cell Mol Biol Lett* 2012; 17: 217-27.
20. Kim-Shapiro DB, Lee J, Gladwin MT. Storage lesion: role of red blood cell breakdown. *Transfusion* 2011; 51: 844-51.
21. D'Alessandro A, Liunbruno G, Grazzini G, Zolla L. Red blood cell storage: the story so far. *Blood Transfus* 2010; 8: 82-8.
22. Koch CG, Li L, Sessler DI, Figueroa P, Hoeltge GA, Mihaljevic T, Blackstone EH. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *N Engl J Med* 2008; 358: 1229-39.
23. Edgren G, Kamper-Jørgensen M, Eloranta S, Rostgaard K, Custer B, Ullum H, Murphy EL, Busch MP, Reilly M, Melbye M, Hjalgrim H, Nyrén O. Duration of red blood cell storage and survival of transfused patients (CME). *Transfusion* 2010; 50: 1185-95.
24. Weinberg JA, McGwin G Jr, Vandromme MJ, Marques MB, Melton SM, Reiff DA, Kerby JD, Rue LW 3rd. Duration of red cell storage influences mortality after trauma. *J Trauma* 2010; 69: 1427-31.
25. Klein HG, Spahn DR, Carson JL. Red blood cell transfusion in clinical practice. *Lancet* 2007; 370: 415-26.
26. Klein HG. Getting older is not necessarily getting better. *Anesthesiology* 2003; 98: 807-8.
27. Lion N, Crettaz D, Rubin O, Tissot JD. Stored red blood cells: a changing universe waiting for its map(s). *J Proteomics* 2010; 73: 374-85.
28. Lockwood WB, Hudgens RW, Szymanski IO, Teno RA, Gray AD. Effects of rejuvenation and frozen storage on 42-day-old AS-3 RBCs. *Transfusion* 2003; 43: 1527-32.
29. Relevy H, Koshkaryev A, Manny N, Yedgar S, Barshtein G. Blood banking-induced alteration of red blood cell flow properties. *Transfusion* 2008; 48: 136-46.
30. Högman CF, de Verdier CH, Ericson A, Hedlund K, Sandhagen B. Studies on the mechanism of human red cell loss of viability during storage at +4 degrees C in vitro. I. Cell shape and total adenylate concentration as determinant factors for posttransfusion survival. *Vox Sang* 1985; 48: 257-68.

31. Salzer U, Zhu R, Luten M, Isobe H, Pastushenko V, Perkmann T, Hinterdorfer P, Bosman GJ. Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin. *Transfusion* 2008; 48: 451-62.
32. Lang F, Gulbins E, Lerche H, Huber SM, Kempe DS, Foller M. Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell Physiol Biochem* 2008; 22: 373-80.
33. Sparrow RL, Veale MF, Healey G, Payne KA. Red blood cell (RBC) age at collection and storage influences RBC membrane-associated carbohydrates and lectin binding. *Transfusion* 2007; 47: 966-8.
34. Raat NJ, Verhoeven AJ, Mik EG, Gouwerok CW, Verhaar R, Goedhart PT, de Korte D, Ince C. The effect of storage time of human red cells on intestinal microcirculatory oxygenation in a rat isovolemic exchange model. *Crit Care Med* 2005; 33: 39-45.
35. Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A, Telen MJ, Ortel TL, Reid TS, Mulherin MA, Zhu H, Buck RD, Califf RM, McMahon TJ. Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 17063-8.
36. Raat NJ, Ince C. Oxygenating the microcirculation: the perspective from blood transfusion and blood storage. *Vox Sang* 2007; 93: 12-8.
37. Isbell TS, Sun CW, Wu LC, Teng X, Vitturi DA, Branch BG, Kevil CG, Peng N, Wyss JM, Ambalavanan N, Schwiebert L, Ren J, Pawlik KM, Renfrow MB, Patel RP, Townes TM. SNO-hemoglobin is not essential for red blood cell-dependent hypoxic vasodilation. *Nat Med* 2008; 14: 773-7.
38. Yoshida T, Shevkoplyas SS. Anaerobic storage of red blood cells. *Blood Transfus* 2010; 8: 220-36.
39. Kanas T, Acker JP. Biopreservation of red blood cells--the struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J* 2010; 277: 343-56.
40. Huling SG, Hwang S, Fine D, Ko S. Fenton-like initiation of a toluene transformation mechanism. *Water Res* 2011; 45: 5334-42.
41. Hwang S, Huling SG, Ko S. Fenton-like degradation of MTBE: Effects of iron counter anion and radical scavengers. *Chemosphere* 2010; 78: 563-8.
42. Dotis J, Stampouli S, Violaki A, Vogiatzi L, Mitroudi M, Ekonomou M, Kotsiou M. Transfusion related acute lung injury (TRALI). *Paediatr N Gr* 2009; 21: 336-339.
43. Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, Gregory KR, Elder KV, Schreiber GB, Arduino MJ, Holt SC, Carson LA, Banerjee SN, Jarvis WR. Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion* 2001; 41: 1493-9.

44. Wagner SJ. Transfusion-transmitted bacterial infection: risks, sources and interventions. *Vox Sang* 2004; 86: 157-63.
45. Niu MT, Knippen M, Simmons L, Holness LG. Transfusion-transmitted *Klebsiella pneumoniae* fatalities, 1995 to 2004. *Transfus Med Rev* 2006; 20: 149-57.
46. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: A time-course evaluation from shape to proteome. *J Proteomics* 2012; in press.
47. Doctor A, Spinella P. Effect of processing and storage on red blood cell function in vivo. *Semin Perinatol* 2012; 36: 248-59.
48. Hess JR, Sparrow RL, van der Meer PF, Acker JP, Cardigan RA, Devine DV. Red blood cell hemolysis during blood bank storage: using national quality management data to answer basic scientific questions. *Transfusion* 2009; 49: 2599-603.
49. Bosman GJ, Lasonder E, Lutén M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Novotný VM, Bos H, De Grip WJ. The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions. *Transfusion* 2008; 48: 827-35.
50. D'Amici GM, Rinalducci S, Zolla L. Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage. *J Proteome Res* 2007; 6: 3242-55.
51. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 148-55.
52. Pasini EM, Lutz HU, Mann M, Thomas AW. Red blood cell (RBC) membrane proteomics—Part II: Comparative proteomics and RBC pathophysiology. *J Proteomics* 2010; 73: 421-35.
53. Ghashghaieinia M, Cluitmans JC, Akel A, Dreischer P, Toulany M, Köberle M, Skabytska Y, Saki M, Biedermann T, Duszenko M, Lang F, Wieder T, Bosman GJ. The impact of erythrocyte age on eryptosis. *Br J Haematol* 2012; 157: 606-14.
54. Antonelou MH, Kriebardis AG, Papassideri IS. Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood Transfus* 2010; 8: 39-47.
55. Bosman GJ, Werre JM, Willekens FL, Novotný VM. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion. *Transfus Med* 2008; 18: 335-47.

56. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. *Transfusion* 2010; 50: 376-89.
57. Bosman GJ, Lasonder E, Groenen-Döpp YA, Willekens FL, Werre JM, Novotný VM. Comparative proteomics of erythrocyte aging in vivo and in vitro. *J Proteomics* 2010; 73: 396-402.
58. Bosman GJ, Lasonder E, Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Novotný VM, Bos H, De Grip WJ. The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions. *Transfusion* 2008; 48: 827-35.
59. Mannu F, Arese P, Cappellini MD, Fiorelli G, Cappadoro M, Giribaldi G, Turrini F. Role of hemichrome binding to erythrocyte membrane in the generation of band-3 alterations in beta-thalassemia intermedia erythrocytes. *Blood* 1995; 86: 2014-20.
60. Kay MMB, Goodman SR, Sorensen K. Senescent cell antigen is immunologically related to band 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1631-5.
61. Kay MMB. Localization of senescent cell antigen on band 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 5753-7.
62. Kay MMB, Flowers N, Goodman J, Bosman G. Alteration in membrane protein band 3 associated with accelerated erythrocyte aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5834-8.
63. Kay MMB, Wyant T, Goodman J. Autoantibodies to band 3 during aging and disease in aging interventions. *Ann NY Acad Sci* 1994; 719: 419-47.
64. Low PS, Westfall MA, Allen DP, Appell KC. Characterization of the reversible conformational equilibrium of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *J Biol Chem* 1984; 259: 13070-6.
65. Christian JA, Rebar AH, Boon GD, Low PS. Senescence of canine biotinylated erythrocytes: increased autologous immunoglobulin binding occurs on erythrocytes aged in vivo for 104 to 110 days. *Blood* 1993; 82: 3469-73.
66. Lutz HU, Stringaro-Wipf G. Senescent red cell-bound IgG is attached to band 3 protein. *Biomedica Biochimica Acta* 1983; 42: 117-21.
67. Lutz HU, Flepp R, Stringaro-Wipf G. Naturally occurring autoantibodies to exoplasmic and cryptic regions of band 3 protein, the major integral membrane protein of human red blood cells. *J Immunol* 1984; 133: 2610-8.

68. Hornig R, Lutz HU. Band 3 protein clustering on human erythrocytes promotes binding of naturally occurring anti-band 3 and anti-spectrin antibodies. *Exp Gerontol* 2000; 35: 1025-44.
69. Lutz HU, Stammler P, Fasler S. How naturally occurring anti-band 3 antibodies stimulate C3b deposition to senescent and oxidatively stressed red blood cells. *Biomed Biochim Acta* 1990; 49: S224-9.
70. Lutz HU, Stammler P, Koch D, Taylor RP. Opsonic potential of C3b-anti-band 3 complexes when generated on senescent and oxidatively stressed red cells or in fluid phase. *Adv Exp Med Biol* 1991; 307: 367-76.
71. Lutz HU, Nater M, Stammler P. Naturally occurring anti-band 3 antibodies have a unique affinity for C3. *Immunology* 1993; 80: 191-6.
72. Jelezarova E, Lutz HU. IgG naturally occurring antibodies stabilize and promote the generation of the alternative complement pathway C3 convertase. *Mol Immunol* 2005; 42: 1393-403.
73. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulin G binding, lipid raft rearrangement, and caspase activation. *Transfusion* 2007; 47: 1212-20.
74. Berg CP, Engels IH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, et al. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; 8: 1197-206.
75. Mandal D, Moitra PK, Saha S, Basu J. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett* 2002; 513: 184-8.
76. Mandal D, Baudin-Creuzat V, Bhattacharyya A, Pathak S, Delaunay J, Kundu M, et al. Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (Band 3). *J Biol Chem* 2003; 278: 52551-8.
77. Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem* 2005; 280: 39460-7.
78. Ficarra S, Tellone E, Giardina B, Scatena R, Russo A, Misiti F, Clementi ME, Colucci D, Bellocco E, Laganà G, Barreca D, Galtieri A. Derangement of erythrocytic AE1 in beta-

- thalassemia by caspase 3: pathogenic mechanisms and implications in red blood cell senescence. *J Membr Biol* 2009; 228: 43-9.
- 79.** Lang F, Qadri SM. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif* 2012; 33: 125-30.
- 80.** Lang F, Gulbins E, Lerche H, Huber SM, Kempe DS, Foller M. Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell Physiol Biochem* 2008; 22: 373-80.
- 81.** Lang E, Qadri SM, Lang F. Killing me softly - suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44: 1236-43.
- 82.** Föller M, Huber SM, Lang F. Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life* 2008; 60: 661-8.
- 83.** Gov N, Cluitmans J, Sens P, Bosman GJCGM. Cytoskeletal Control of Red Blood Cell Shape: Theory and Practice of Vesicle Formation. *Adv in Plan Lip Bil and Lipos* 2009; 10.
- 84.** Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. *Transfusion* 2008; 48: 1943-53.
- 85.** Wagner GM, Chiu DT, Qju JH, Heath RH, Lubin BH. Spectrin oxidation correlates with membrane vesiculation in stored RBCs. *Blood* 1987; 69: 1777-81.
- 86.** Kralj-Iglič V, Iglič A, Bobrowska-Hägerstrand M, Hägerstrand H. Tethers connecting daughter vesicles and parent red blood cell may be formed due to ordering of anisotropic membrane constituents. *Coll and Surf A* 2001; 179: 57-64.
- 87.** Jy W, Ricci M, Shariatmadar S, Gomez-Marin O, Horstman LH, Ahn YS. Microparticles in stored red blood cells as potential mediators of transfusion complications. *Transfusion* 2011; 51: 886-93.
- 88.** Greenwalt TJ, Bryan DJ, Dumaswala UJ. Erythrocyte membrane vesiculation and changes in membrane composition during storage in citrate-phosphate-dextrose-adenine-1. *Vox Sang* 1984; 47: 261-70.
- 89.** Müller H, Lutz HU. Binding of autologous IgG to human red blood cells before and after ATP-depletion. Selective exposure of binding sites (autoantigens) on spectrin-free vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1983; 729: 249-57.
- 90.** Jy W, Bidot C Jr, Johansen ME, Horstman L, Shariatmadar S, Ricci M, et al. Red-cell microparticles released from stored packed cells: Possible contributing factor to adverse responses to transfusion. Presented, 52nd American Society of Hematology Annual Meeting; Orlando, FL. *Blood* 2010; 116: 154.

91. Sugawara A, Nollet KE, Yajima K, Saito S, Ohto H. Preventing platelet-derived microparticle formation--and possible side effects--with prestorage leukofiltration of whole blood. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 771-5.
92. Anniss AM, Glenister KM, Killian JJ, Sparrow RL. Proteomic analysis of supernatants of stored red blood cell products. *Transfusion*. 2005; 45: 1426-33.
93. Queloz PA, Thadikaran L, Crettaz D, Rossier JS, Barelli S, Tissot JD. Proteomics and transfusion medicine: future perspectives. *Proteomics* 2006; 6: 5605-14.
94. Pasini EM, Kirkegaard M, Mortensen P, Lutz HU, Thomas AW, Mann M. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood* 2006; 108: 791-801.
95. McCarthy DM, Skacel P, Raja K, Martin F, Peters T, Goldman JM. Granulocytic cryopreservation: further studies on the pathogenesis of impaired cellular function. *Br J Haematol* 1984; 56: 45-54.
96. Vettore L, De Matteis MC, Zampini P. A new density gradient system for the separation of human red blood cells. *Am J Hematol* 1980; 8: 291-7.
97. Prenni JE, Avery AC, Olver CS. Proteomics: a review and an example using the reticulocyte membrane proteome. *Vet Clin Pathol* 2007; 36: 13-24.
98. Hess JR. Red cell changes during storage. *Transfus Apher Sci* 2010; 43: 51-9.
99. Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. Storage lesion in banked blood due to hemolysis-dependent disruption of nitric oxide homeostasis. *Curr Opin Hematol* 2009; 16: 515-23.
100. Roback JD, Neuman RB, Quyyumi A, Sutliff R. Insufficient nitric oxide bioavailability: a hypothesis to explain adverse effects of red blood cell transfusion. *Transfusion* 2011; 51: 859-66.
101. Stapley R, Owusu BY, Brandon A, Cusick M, Rodriguez C, Marques MB, Kerby JD, Barnum SR, Weinberg JA, Lancaster JR Jr, Patel RP. Erythrocyte storage increases rates of NO- and nitrite scavenging: implications for transfusion-related toxicity. *Biochem J* 2012; 446: 499-508.
102. Kanas T, Gladwin MT. Nitric oxide, hemolysis, and the red blood cell storage lesion: interactions between transfusion, donor, and recipient. *Transfusion* 2012; 52: 1388-92
103. Donadee C, Raat NJ, Kanas T, Tejero J, Lee JS, Kelley EE, Zhao X, Liu C, Reynolds H, Azarov I, Frizzell S, Meyer EM, Donnenberg AD, Qu L, Triulzi D, Kim-Shapiro DB, Gladwin MT. Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation* 2011; 124: 465-76.

104. Yu B, Lei C, Baron DM, Steinbicker AU, Bloch KD, Zapol WM. Diabetes augments and inhaled nitric oxide prevents the adverse hemodynamic effects of transfusing syngeneic stored blood in mice. *Transfusion* 2012; 52: 1410-22.
105. Roback JD. Vascular effects of the red blood cell storage lesion. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011; 2011: 475-9.
106. Yu B, Raheer MJ, Volpato GP, Bloch KD, Ichinose F, Zapol WM. Inhaled nitric oxide enables artificial blood transfusion without hypertension. *Circulation* 2008; 117: 1982-90.
107. Dumaswala UJ, Wilson MJ, Wu YL, et al. Glutathione loading prevents free radical injury in red blood cells after storage. *Free Radic Res* 2000; 33: 517-29.
108. Högman CF, de Verdier CH, Ericson A, et al. Effects of oxygen on red cells during liquid storage at +4 degrees C. *Vox Sang* 1986; 51: 27-34.
109. Dumont LJ, Yoshida T, AuBuchon JP. Anaerobic storage of red blood cells in a novel additive solution improves in vivo recovery. *Transfusion* 2009; 49: 458-64.
110. Yoshida T, AuBuchon JP, Dumont LJ, Gorham JD, Gifford SC, Foster KY, Bitensky MW. The effects of additive solution pH and metabolic rejuvenation on anaerobic storage of red cells. *Transfusion* 2008; 48: 2096-105.
111. Yoshida T, AuBuchon JP, Tryzelaar L, Foster KY, Bitensky MW. Extended storage of red blood cells under anaerobic conditions. *Vox Sang* 2007; 92: 22-31.
112. Bosman GJ, Werre JM, Willekens FL, Novotný VM. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion. *Transfus Med* 2008; 18: 335-47.
113. Grazzini G, Vaglio S. Red blood cell storage lesion and adverse clinical outcomes: post hoc ergo propter hoc? *Blood Transfus* 2012; 10 Suppl 2:s4-6.
114. Zolla L, D'Alessandro A. Shaking hands with the future through omics application in transfusion medicine and clinical biochemistry. *Blood Transfus* 2012; 10 Suppl 2:s1-3.
115. Cluitmans JC, Hardeman MR, Dinkla S, Brock R, Bosman GJ. Red blood cell deformability during storage: towards functional proteomics and metabolomics in the Blood Bank. *Blood Transfus* 2012; 10 Suppl 2:s12-8.

