



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών  
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μικροκυστιδιοποίηση ερυθρών αιμοσφαιρίων σε  
φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις**

POST GRADUATE THESIS

**Red blood cell microvesiculation under physiological and pathological  
conditions**

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

**Ασημένια Κουριότη**  
Asimenia Kourioti

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

**Χαρά Γεωργατζάκου**  
Hara Georgatzakou

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022



Faculty of Health and Caring Professions  
Department of Biomedical Sciences  
Postgraduate program:  
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

**Red blood cell microvesiculation under physiological and pathological conditions**

ASIMENIA KOURIOTI

Dml20009

minakrt@hotmail.com

FIRST SUPERVISOR

HARA GEORGATZAKOU

SECOND SUPERVISOR

ANASTASIOS KRIEBARDIS

AIGALEO 2022



## Επιτροπή εξέτασης

3 Οκτωβρίου 2022

Ονόματα εξεταστών

Υπογραφή

1<sup>ος</sup> Εξεταστής Χαρά Γεωργατζάκου

2<sup>ος</sup> Εξεταστής Αναστάσιος Κριεμπάρδης

## **Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας**

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Ασημένια Κουριότη του Αλεξάνδρου, με αριθμό μητρώου dml20009, φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

## Περίληψη

Κάτω από φυσιολογικές, αλλά και παθολογικές καταστάσεις, διάφοροι τύποι κυττάρων απελευθερώνουν μικρές σφαιρικές δομές, γνωστές ως κυτταρικά κυστίδια ή εξωκυττάρια κυστίδια (EVs). Έχει επικρατήσει τα κυστίδια αυτά να ταξινομούνται, ανάλογα με το μέγεθος και την προέλευσή τους, σε εξωσώματα, μικροκυστίδια (MVs) και αποπτωτικά σωμάτια. Τα μικροκυστίδια, με τα οποία θα ασχοληθεί η παρούσα εργασία, παράγονται από τα κύτταρα είτε λόγω διαφόρων τύπων κυτταρική ενεργοποίηση είτε στα αρχικά στάδια της απόπτωσης. Τις τελευταίες δεκαετίες τα εξωκυττάρια κυστίδια έχουν μελετηθεί εκτενώς, καθώς έπαψαν να θεωρούνται απλά ψευδενδείξεις (artifacts) ή προϊόντα του μηχανισμού εκκαθάρισης του κυττάρου. Στο αίμα περιέχεται αφθονία εξωκυττάρων κυστιδίων, από διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων, κυρίως αιμοπεταλίων, ερυθροκυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων και λευκών αιμοσφαιρίων. Τα επιστημονικά δεδομένα συγκλίνουν στο ότι η μικροκυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων αποτελεί προστατευτικό μηχανισμό του ερυθροκυττάρου, που αποσκοπεί στην αποφυγή της πρόωρης απομάκρυνσής του από την κυκλοφορία. Επιπλέον, ιδιαίτερης σημασίας για την ομοιόσταση του ερυθροκυττάρου και συνεπώς ολόκληρου του οργανισμού, φαίνεται να είναι οι προθρομβωτικές και προφλεγμονώδεις ιδιότητες των μικροκυστιδίων των ερυθροκυττάρων. Αυξημένες ποσότητες τέτοιων μικροκυστιδίων παρατηρούνται σε προθρομβωτικές καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρωση, το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και η παροξυσμική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία. Πολυάριθμες μελέτες καταδεικνύουν την αυξημένη παρουσία τους, καθώς επίσης και την πιθανή χρήση τους ως βιοδεικτών, σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε καρδιοπνευμονική παράκαμψη αλλά και στη διάγνωση καρδιαγγειακών παθήσεων, όπως το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, το έμφραγμα μυοκαρδίου με ανάσπαση του ST και η στηθάγχη. Τέλος, διαταραγμένη παραγωγή μικροκυστιδίων από ερυθροκύτταρα (λ.χ. αυξημένες ή μειωμένες ποσότητες, αλλαγές στη σύστασή τους κλπ) παρατηρείται σε ασθένειες που σχετίζονται με παθήσεις του ερυθροκυττάρου, όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία, οι θαλασσαιμίες, η κληρονομική σφαιροκυττάρωση, η κληρονομική ελλειπτοκυττάρωση, η κληρονομική στοματοκυττάρωση, η έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), καθώς και η μόλυνση με *Plasmodium Falciparum* (Ελονοσία).

## Abstract

Under physiological as well as pathological conditions, various cell types release small spherical structures known as cellular vesicles or extracellular vesicles (EVs). It has prevailed to classify these vesicles, depending on their size and origin, into exosomes, microvesicles (MVs) and apoptotic bodies. Microvesicles, which will be dealt with in this thesis, are produced by cells either due to various types of cellular activation or in the initial stages of apoptosis. In recent decades, extracellular vesicles have been extensively studied, as they ceased to be considered as mere artifacts or products of the cell's clearance mechanism. Blood contains an abundance of extracellular vesicles, from different cell populations, mainly platelets, erythrocytes, endothelial cells and white blood cells. Scientific data converges on the fact that the microvesiculation of erythrocytes is a protective mechanism of the erythrocyte, which aims to prevent its premature removal from the circulation. In addition, the prothrombotic and proinflammatory properties of erythrocyte microvesicles seem to be of particular importance for the homeostasis of the erythrocyte and therefore of the entire organism. Increased amounts of such microvesicles are observed in prothrombotic conditions such as atherosclerosis, hemolytic uremic syndrome and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Numerous studies demonstrate their increased presence, as well as their possible use as biomarkers in patients who underwent cardiopulmonary bypass, but also in the diagnosis of cardiovascular diseases, such as acute myocardial infarction, ST-elevation myocardial infarction and angina pectoris. Finally, disturbed production of microvesicles by erythrocytes (e.g. increased or decreased amounts, changes in their composition, etc.) is observed in conditions related to erythrocyte diseases, such as sickle cell anemia, thalassemias, hereditary spherocytosis, hereditary elliptocytosis, hereditary stomatocytosis, the lack of the enzyme glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), as well as infection with *Plasmodium Falciparum* (Malaria).

## Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	1
1. Το ερυθροκύτταρο.....	1
1.1. Παραγωγή των ερυθροκυττάρων.....	1
1.2. Μορφολογία και ρόλος.....	2
1.3. Η κυτταρική μεμβράνη του ερυθροκυττάρου .....	4
1.4. Γήρανση.....	7
2. Εξωκυττάρια Κυστίδια.....	9
2.1. Ιστορική Αναδρομή .....	10
2.1.1. Εξωκυττάρια Κυστίδια.....	10
2.1.2. Εξωκυττάρια κυστίδια ερυθροκυτταρικής σειράς.....	11
2.2. Κατηγοριοποίηση Εξωκυττάρων Κυστιδίων .....	12
3. Μικροκυστίδια Ερυθρών Αιμοσφαιρίων .....	13
3.1. Σύσταση Μικροκυστιδίων Ερυθρών Αιμοσφαιρίων .....	15
3.1.1. Πρωτεΐνες.....	15
3.1.2. Λιπίδια .....	16
3.1.3. Νουκλεϊκά Οξέα.....	17
3.2. Μηχανισμός Μικροκυστιδιοποίησης .....	17
3.2.1. Μοντέλο Συσσωμάτωσης Πρωτεΐνης Ζώνης 3 (Band-3 model) .....	18
3.2.2. Μοντέλο της συσώρευσης ιόντων ασβεστίου (Calcium Model).....	19
3.3. Παράγοντες πρόκλησης κυστιδιοποίησης .....	20
3.4. Φυσιολογικός Ρόλος Μικροκυστιδιοποίησης Ερυθροκυττάρων .....	22
4. Μικροκυστίδια Ερυθρών Αιμοσφαιρίων σε Παθολογικές Καταστάσεις .....	23
4.1. Θρόμβωση, Φλεγμονή, Ομοιόσταση Μονοξειδίου του Αζώτου .....	23
4.2. Κληρονομικές Αιμολυτικές Αναιμίες .....	26
4.2.1. Κληρονομικές Μεμβρανοπάθειες .....	26
4.2.2. Κληρονομικές Ενζυμοπάθειες .....	30
4.2.3. Κληρονομικές Αιμοσφαιρινοπάθειες.....	32
4.3. Μυελοδυσπλαστικά και Μυελοϋπερπλαστικά Νοσήματα .....	33
4.4. Παροξυσμική Νυκτερινή Αιμοσφαιρινουρία.....	35
4.5. Αθηροσκλήρωση .....	35
4.6. Καρδιαγγειακές Διαταραχές.....	36
4.7. Νόσος Parkinson .....	37



<b>4.8 Μόλυνση με <i>Plasmodium falciparum</i></b> .....	37
<b>4.9 Άλλα Νοσήματα</b> .....	38
<b>5. Συμπεράσματα</b> .....	40
<b>Αναφορές</b> .....	41
<b>Πηγές Εικόνων</b> .....	63

## Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
<b>EVs</b>	Extracellular Vesicles	Εξωκυττάρια Κυστίδια
<b>MVBs</b>	Multivesicular Bodies	Πολυκυστικά Σώματα
<b>MVs</b>	Microvesicles	Μικροκυστίδια
<b>HUS</b>	Hemolytic Uremic Syndrome	Αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο
<b>G6PD</b>	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης
<b>STEMI</b>	ST-elevation myocardial infarction	Οξύ Έμφραγμα Μυοκαρδίου με Ανάσπαση S-T
<b>O<sup>2</sup></b>	Oxygene	Οξυγόνο
<b>CO<sub>2</sub></b>	Carbon dioxide	Διοξείδιο του άνθρακα
<b>CD47</b>	Cluster of Differentiation 47	Σύμπλεγμα Διαφοροποίησης 47
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species	Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superoxide	Σουπεροξειδίο
<b>GHS</b>	Glutathione	Γλουταθειόνη
<b>PRDX-2</b>	Peroxiredoxin-2	Υπεροξυδεροξίνη
<b>PS</b>	Phosphatidylserine	Φωσφατιδυλοσερίνη
<b>ILVs</b>	Intraluminal Vesicles	Ενδοαυλικά Κυστίδια
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium Cation	Κατιόν Ασβεστίου
<b>NO</b>	Nitric Oxide	Μονοξειδίου του Αζώτου
<b>PAF</b>	Platelet Activating Factor	Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων
<b>LPA</b>	Lysophosphatidic Acid	Λυσοφωσφατιδικό Οξύ
<b>ATP</b>	Adenosine Triphosphate	Τριφωσφορική Αδενοσίνη
<b>OHSt</b>	Overhydrated Hereditary Stomatocytosis	Υπερενυδατωμένη Κληρονομική Στοματοκυττάρωση
<b>DHSt</b>	Dehydrated Hereditary Stomatocytosis	Ξεροκυττάρωση
<b>GPI</b>	Glycophosphatidylinositol	Γλυκοφωσφατιδιδυλοϊνοσιτόλη
<b>PNH</b>	Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria	Παροξυσμική Νυκτερινή Αιμοσφαιρινουρία

# Εισαγωγή

## 1. Το ερυθροκύτταρο

Το αίμα είναι ένα από τα πιο καλά μελετημένα βιολογικά υγρά, κυρίως γιατί είναι πολύ εύκολα προσβάσιμο. Αποτελείται από πλάσμα, μέσα στο οποίο αιωρούνται κύτταρα: τα ερυθρά αιμοσφαίρια (Red Blood Cells, RBCs) ή ερυθροκύτταρα, τα λευκά αιμοσφαίρια (White blood cells, WBCs) ή λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια ή θρομβοκύτταρα. Το σώμα ενός ενήλικα περιέχει περίπου 4,5 με 5 λίτρα αίματος στο κυκλοφορικό του σύστημα. Τα ερυθροκύτταρα, έχοντας συγκέντρωση περίπου 4,5-5,9 εκατομμύρια ανά μικρόλιτρο αίματος, αποτελούν σχεδόν το 99% των έμμορφων συστατικών του (Motlagh et al., 2010). Συγκριτικά, τα λευκά αιμοσφαίρια αριθμούν περί τις 4 με 11 χιλιάδες και τα αιμοπετάλια 150 με 350 χιλιάδες (Vives Corrons et al., 2021). Τα ερυθροκύτταρα χρειάζονται περίπου 60 δευτερόλεπτα για να εκτελέσουν έναν πλήρη κύκλο του κυκλοφορικού συστήματος. (Diez-Silva et al., 2010).

### 1.1. Παραγωγή των ερυθροκυττάρων

Σε έναν ενήλικα παράγονται περίπου 2,4 εκατομμύρια καινούρια ερυθροκύτταρα κάθε δευτερόλεπτο (Bianconi et al., 2013). Είναι απαραίτητα σε όλα τα στάδια της ζωής-εμβρυϊκή, νεογνική, παιδική, εφηβική και ενήλικη (Khalifa & Sanz-Rubio, 2021). Παράγονται στον εμβρυϊκό σάκο κατά τις πρώτες εβδομάδες ζωής του εμβρύου, στον σπλήνα, τα λεμφογάγγλια και το ήπαρ κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης και στον μυελό των οστών τον μήνα πριν και μετά τον τοκετό. Ενώ παράγονται στον μυελό όλων των οστών του σώματος μέχρι την ηλικία των 5 ετών, μετά την ηλικία των 20 ετών παράγονται μόνο στον μυελό των οστών των σπονδύλων, του στέρνου, των πλευρών καθώς και του λαγόνιου οστού (Tombak, 2019). Η ερυθροποίηση ρυθμίζεται από την ορμόνη ερυθροποιητίνη, το 90% της οποίας προέρχεται από τους νεφρούς και το υπόλοιπο 10% από το ήπαρ (Vives Corrons et al., 2021). Η γενεαλογία όλων των κυκλοφορούντων ερυθροκυττάρων εντοπίζεται σε έναν τύπο κυττάρου, το πολυδύναμο αιμοποιητικό βλαστοκύτταρο του μυελού των οστών. Μεταξύ των απογόνων αυτού του κυττάρου βρίσκονται και τα κύτταρα της λεγόμενης μυελοειδούς κυτταρικής σειράς, από την οποία διαφοροποιούνται τα ερυθροκύτταρα. Το πρώτο κύτταρο της μυελοειδούς σειράς που μοιάζει με ερυθροκύτταρο είναι η προερυθροβλάστη, η οποία μέσα από

διαδοχικά στάδια ωρίμανσης μετατρέπεται σε ορθοχρωματική ερυθροβλάστη (Adewoyin et al., 2019). Μετά την απώλεια του πυρήνα, η όψιμη ερυθροβλάστη μετατρέπεται σε δικτυοερυθροκύτταρο, το οποίο και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος. Μέσα σε δύο μέρες από την απελευθέρωσή του το δικτυοερυθροκύτταρο ωριμάζει σε ερυθροκύτταρο (Vives Corrons et al., 2021).

## **1.2. Μορφολογία και ρόλος**

Τα ερυθροκύτταρα του ανθρώπου, έχουν σχήμα αμφίκιουλου δίσκου, με διάμετρο περίπου 7,5-8,7 μm, πάχος 1,7-2,2 μm και μέσο όγκο 90fl (Diez-Silva et al., 2010) (Klinken, 2002). Είναι απύρνηνα, δεν περιέχουν ενδοπλασματικό δίκτυο, ούτε ενδοκυττάρια οργανίδια και δεν είναι ικανά να συνθέτουν πρωτεΐνες. Επίσης, επειδή δεν διαθέτουν μιτοχόνδρια, δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν το οξυγόνο που μεταφέρουν, οπότε και το παραδίδουν όλο στους ιστούς, και επομένως βασίζονται αποκλειστικά σε αναερόβια αναπνοή. Θα μπορούσε κανείς να τα χαρακτηρίσει ως «σάκους αιμοσφαιρίνης», καθώς το κυτταρόπλασμά τους αποτελείται κατά 90% από αυτήν (Tombak, 2019).

Η αιμοσφαιρίνη, στην οποία οφείλεται το κόκκινο χρώμα του αίματος, είναι μια μεταλλοπρωτεΐνη, κάθε μόριο της οποίας αποτελείται από τέσσερα μόρια αίμης συνδεδεμένα με μία ομάδα σφαιρίνης, σχηματίζοντας μία τετράεδρη δομή. Η αίμη, η οποία αντιπροσωπεύει το 4% του βάρους της αιμοσφαιρίνης, συντίθεται από μία δακτυλιοειδή οργανική ένωση, την πορφυρίνη, στην οποία είναι συνδεδεμένο ένα άτομο σιδήρου. Στον σίδηρο γίνεται η σύνδεση του οξυγόνου, με σκοπό τη μεταφορά του από τους πνεύμονες στους ιστούς. Τέσσερα άτομα σιδήρου περιέχονται σε κάθε μόριο αιμοσφαιρίνης, άρα μπορεί να δεσμεύσει τέσσερα μόρια οξυγόνου. Η σφαιρίνη αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ανά δύο όμοιες, συνδεδεμένες μεταξύ τους. Το μόριο της αιμοσφαιρίνης σχηματίζει ασταθή, αντιστρεπτό δεσμό με το οξυγόνο. Η οξυγονωμένη της μορφή, ονομάζεται οξυαιμοσφαιρίνη και έχει ζωηρό χρώμα, ενώ η ανηγμένη της μορφή (που δεν προσδένει οξυγόνο), ονομάζεται ανθρακυλαιμοσφαιρίνη και έχει σκούρο κόκκινο χρώμα. Η οξειδωμένη μορφή της αιμοσφαιρίνης ονομάζεται μεθαιμοσφαιρίνη και δεν έχει την ικανότητα να δεσμεύει οξυγόνο. Αυξημένες συγκεντρώσεις της δίνουν στο αίμα καφετί χρώμα (Marengo-Rowe, 2006).

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια επιτελούν μία από τις πιο σημαντικές λειτουργίες του αίματος, τη -διαμεσολαβούμενη μέσω αιμοσφαιρίνης- μεταφορά οξυγόνου ( $O_2$ ) από τους πνεύμονες σε όλους τους ιστούς και κύτταρα και τη μεταφορά διοξειδίου του άνθρακα ( $CO_2$ ) από τους ιστούς πίσω στους πνεύμονες, όπου αποβάλλεται από τον οργανισμό με την εκπνοή (Schiffelers et al., 2013). Η παραπάνω διαδικασία είναι γνωστή ως ανταλλαγή αναπνευστικών αερίων και επιτυγχάνεται μέσω της αιμοσφαιρίνης. Επιπλέον, έχουν ενεργή συμμετοχή τόσο στην αρτηριακή όσο και τη φλεβική θρόμβωση (Tombak, 2017), ρυθμίζουν τη βιοδιαθεσιμότητα αγγειοενεργών συστατικών του πλάσματος (Kulandavelu et al., 2015), καθώς επίσης –μέσω μηχανισμών αλληλεπίδρασης με το ενδοθήλιο-συμμετέχουν στη ρύθμιση του καρδιαγγειακού συστήματος (Cortese-Krott & Kelm, 2014). Ένα μεγάλο κομμάτι της διαδρομής που διανύουν μέσα στο σώμα, περιλαμβάνει τη διέλευσή τους μέσα από τριχοειδή αγγεία με διάμετρο που κυμαίνεται από 3 έως 8  $\mu m$ , δηλαδή μικρότερη από τη διάμετρο του ίδιου του αιμοσφαιρίου (Vives Corrons et al., 2021). Επομένως, για να τροφοδοτούνται σωστά όλα τα κύτταρα του σώματος, τα ερυθροκύτταρα πρέπει να προσαρμόζουν το μέγεθός τους στο μέγεθος του εκάστοτε αγγείου (βλ. Εικ.1), αλλάζοντας το σχήμα τους και υφιστάμενα μία εξαιρετικά μεγάλη παραμόρφωση (Svetina, 2012).

Η ικανότητα αναστρέψιμης παραμόρφωσης του ερυθρού αιμοσφαιρίου είναι, λοιπόν, υψίστης σημασίας για τη φυσιολογική αιμάτωση του οργανισμού και είναι το αποτέλεσμα τριών παραγόντων, του ιδιαίτερου σχήματος του ερυθροκυττάρου, των δομικών χαρακτηριστικών και της σύστασης της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταροσκελετού, καθώς και του ιξώδους των περιεχομένων του, το οποίο καθορίζεται κατά βάση από τη συγκέντρωση σε αιμοσφαιρίνη (Pasricha, 2014). Το σχήμα του κυττάρου καθορίζεται από το λόγο της επιφάνειας του ερυθροκυττάρου προς τον όγκο του· στα φυσιολογικά δισκοειδή ερυθροκύτταρα ο λόγος αυτός είναι περίπου 1,56 (Vives Corrons et al., 2021). Αυτό σημαίνει ότι η επιφάνεια υπερτερεί κατά τι σε σχέση με τον όγκο του κυττάρου, επιτρέποντας έτσι μεγάλες παραμορφώσεις του χωρίς τραυματισμό της κυτταρικής μεμβράνης. Αξιοσημείωτο είναι ακόμη το γεγονός ότι το δισκοειδές σχήμα του ερυθροκυττάρου, σε συνδυασμό με την ελαστικότητα της κυτταρικής του μεμβράνης, το καθιστά ικανό να διπλασιάζει σχεδόν τον όγκο του, χωρίς ρήξη ή τραυματισμό της μεμβράνης (Klinken, 2002).



**Εικόνα 1** Παραμόρφωση ερυθροκυττάρων εντός τριχοειδούς. Πηγή: (Vives Corrons et al., 2021)

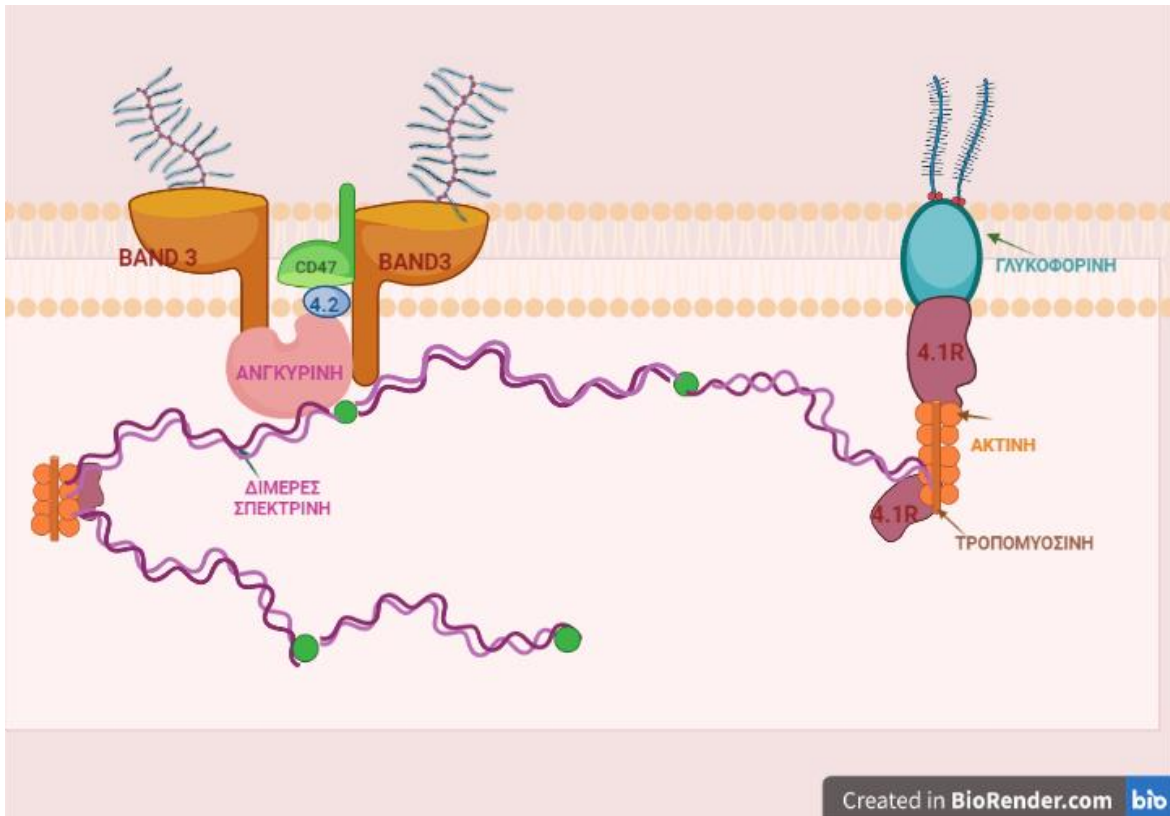
### **1.3. Η κυτταρική μεμβράνη του ερυθροκυττάρου**

Η μάζα της κυτταρικής μεμβράνης του ερυθροκυττάρου αποτελείται περίπου κατά 52% από πρωτεΐνες, κατά 40% από λιπίδια και κατά 8% από υδατάνθρακες (Pasricha, 2014). Περιέχει 20 κύριες πρωτεΐνες και τουλάχιστον 850 δευτερεύουσες (Pesciotta et al., 2012). Είναι βασικά μία δισδιάστατη δομή, που αποτελείται από έναν κυτταροσκελετό και μια διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων, συνδεδεμένα μεταξύ τους.

Ο κυτταροσκελετός είναι ένα δισδιάστατο ψευδοεξαγωνικό πλέγμα με πάχος 40-90nm, οι γωνίες του οποίου σχηματίζονται από «σύμπλοκα ζεύξης» συγκροτούμενα κυρίως από ινίδια ακτίνης και τροπομυοσίνης καθώς και πρωτεΐνες 4.1, 4.9, μοντουλίνης, δεματίνης και αδουσίνης, συνδεδεμένα με τετραμερή ινίδια σπεκτρίνης (Lux IV, 2016). Η διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων αποτελείται από διάφορους τύπους φωσφολιπιδίων, σφιγγολιπιδίων, χολοστερόλης και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως η πρωτεΐνη της ζώνης 3 και η γλυκοφορίνη (βλ. Εικ. 2). Τούτες οι δυο πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα σημαντικές, καθώς σε αυτές συνδέεται ο κυτταροσκελετός με την υπερκείμενη στοιβάδα φωσφολιπιδίων, με τους παρακάτω τρόπους· αφενός, η ανγκυρίνη συνδέει τα τετραμερή σπεκτρίνης στη μεμβράνη, μέσω επαφής με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη της ζώνης-3 (και όλο το σύμπλεγμα ολοκληρώνεται συνδεόμενο μεταξύ άλλων με τον «δείκτη του εαυτού» CD47). Αφετέρου, η πρωτεΐνη 4.1R σχηματίζει το δεύτερο σύμπλεγμα αγκύρωσης στη γλυκοφορίνη (Li & Lykotrafitis, 2014) (Pollet et al., 2018).

Στις συνεργικές ιδιότητες της φωσφολιπιδικής στοιβάδας και του κυτταροσκελετού οφείλονται, συνεπώς, το δισκοειδές σχήμα του υγιούς

ερυθροκυττάρου καθώς και οι ελαστικές και ρεολογικές ικανότητες της κυτταρικής μεμβράνης. Η διπλοστοιβάδα έχει μικρή αντοχή στη διάτμηση, αλλά συμβάλλει στην αντίσταση σε κάμψη και βοηθά στη διατήρηση της επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης. Το δίκτυο σπεκτρίνης του κυτταροσκελετού ισχυροποιεί τη διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων και χαρίζει στη μεμβράνη αντίσταση στη διάτμηση, ελαστικότητα και ανθεκτικότητα στις μεγάλες πιέσεις της κυκλοφορίας του αίματος καθώς επίσης εξασφαλίζει τη βέλτιστη μετακίνηση μέσω της μικροκυκλοφορίας (Diez-Silva et al., 2010).



**Εικόνα 2** Μοντέλο της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου (τα στοιχεία δεν απεικονίζονται σε κλίμακα). Δημιουργήθηκε στο Biorender.com

Όπως σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, έτσι και στα ερυθροκύτταρα, τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης είναι ασύμμετρα κατανομημένα. Παρατηρούνται δύο τύποι ασύμμετρης κατανομής λιπιδίων: η **εγκάρσια ασύμμετρία** (transversal symmetry) της διπλοστοιβάδας και η **διαμήκης ασύμμετρία** κάθε μεμονωμένης μονοστοιβάδας (lateral asymmetry).

Στην πρώτη περίπτωση τα φωσφολιπίδια είναι ασύμμετρα κατανομημένα στις δύο πλευρές (μονοστοιβάδες) της κυτταρικής μεμβράνης. Στην εξωτερική στοιβάδα απαντώνται κατά κύριο λόγο η σφιγγομυελίνη και η φωσφατιδυλοχολίνη, ενώ στην εσωτερική απαντώνται φωσφατιδυλοσερίνη, φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη και

φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (Haest, 2003). Το αρνητικό φορτίο της φωσφατιδυλοσερίνης και φωσφατιδυλοϊνσοσιτόλης αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με θετικά φορτισμένα ενδοκυτταρικά άκρα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, σταθεροποιώντας το σχήμα του κυττάρου και αυξάνοντας τη μηχανική σταθερότητα της μεμβράνης (Simak & Gelderman, 2006). Η ιδιαίτερη αυτή αρχιτεκτονική δομή ρυθμίζεται από τη δράση τριών ενζύμων: της φλιπάσης, της φλοπάσης και της σκραμπλάσης (Zwaal et al., 2005) (Zwaal & Schroit, 1997). Η φλιπάση ή αμινοφωσφολιπιδική τρανσλοκάση είναι ένα ATP-εξαρτώμενο ένζυμο, το οποίο μεταφέρει ειδικά φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και φωσφατιδυλοσερίνη από την εξωτερική στην εσωτερική πλευρά κυτταρικής μεμβράνης (Seigneuret & Devaux, 1984). Η φλοπάση, επίσης ATP-εξαρτώμενο ένζυμο, μεταφέρει λιπίδια από την εσωτερική στην εξωτερική στοιβάδα (Connor et al., 1992). Η σκραμπλάση επιτρέπει τη μετακίνηση φωσφολιπιδίων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης (Basse et al., 1996). Σε ενεργοποίηση του κυττάρου και αύξηση της συγκέντρωσης ενδοπλασματικού ασβεστίου, η δράση της φλιπάσης αναστέλλεται, ενώ προάγεται η δράση της φλοπάσης και της σκραμπλάσης, με αποτέλεσμα την απώλεια της ασύμμετρης κατανομής των φωσφολιπιδίων (Williamson et al., 1995). Σαν συνέπεια, διαταράσσονται οι σχέσεις των αμινοφωσφολιπιδίων της εσωτερικής στοιβάδας με τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, οπότε πλήττονται το σχήμα του κυττάρου και η μηχανική σταθερότητα της μεμβράνης (Simak & Gelderman, 2006).

Στη δεύτερη περίπτωση, παρατηρείται ανομοιογένεια στη σύσταση κάθε επιμέρους μονοστοιβάδας, καθώς απαντώνται τμήματά της έχοντα διαφορετική σύσταση και φυσικές ιδιότητες σε σχέση με γειτονικά τους τμήματα. Η ύπαρξη τέτοιων μικροπεριοχών, προτάθηκε για πρώτη φορά το 1997 (Simons & Ikonen). Αυτές οι «λιπιδικές σχεδίες», όπως ονομάστηκαν, σχηματίζονται παροδικά, είναι μικρές, δυναμικές και ιδιαίτερα εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη, σφιγγολιπίδια και πρωτεΐνες όπως συνεξίνη, σορσίνη, στοματίνη και φλοτιλίνη (Salzer & Prohaska, 2001) (Cocucci et al., 2009). Έχουν επιπροσθέτως τη δυνατότητα να επιπλέουν ελεύθερα και να κινούνται κατά μήκος της ρευστής μονοστοιβάδας διαμερισματοποιώντας πολλά κυτταρικά συστατικά. Ερευνητικά δεδομένα συμφωνούν στο ότι οι λιπιδικές σχεδίες επιτελούν εξειδικευμένες λειτουργίες, όπως την ενδοκυτταρική μεταφορά πρωτεϊνών και λιπιδίων από το κυτοσόλιο στην κυτταρική μεμβράνη, την ενδοκύτωση, τη μεταγωγή σήματος, τη



δράση τους ως πλατφόρμες διαλογής πρωτεϊνών καθώς και τον ρόλο τους στη μικροκυστιδιοποίηση (Ouweneel et al., 2019).

#### **1.4. Γήρανση**

Τα ερυθροκύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες επιβιώνουν στο αίμα περίπου 120 ημέρες και στη συνέχεια απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω φαγοκυττάρωσης από μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Φαγοκυτταρώνονται κατά προσέγγιση 5 εκατομμύρια ερυθροκύτταρα κάθε δευτερόλεπτο, σχεδόν όσα και η ανά μικρόλιτρο συγκέντρωσή τους στο αίμα (Thiagarajan et al., 2021). Κατά τη διάρκεια της ζωής τους εκτίθενται σε διαρκή φυσική και χημική καταπόνηση και ως εκ τούτου υφίστανται πολυάριθμες βιοχημικές αλλαγές. Αυτό συμβαίνει κυρίως σαν αποτέλεσμα δυσλειτουργίας του μεταβολισμού τους και περιλαμβάνει αλλαγές στη δομή της αιμοσφαιρίνης, κυστιδιοποίηση, καθώς και σταδιακή αποτυχία των μηχανισμών κυτταρικής ομοιόστασης και αντιοξειδωτικής άμυνας (Antonelou et al., 2010). Κάποιες από τις παραπάνω βιοχημικές αλλαγές δρουν ως δείκτες αναγνώρισής τους από μακροφάγα. Οι πιο επικρατούσες θεωρίες σχετικά με τους μηχανισμούς κάθαρσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η έκφραση νεοαντιγόνων στην επιφάνειά τους, η ελάττωση της παραμορφωσιμότητάς τους και η μείωση των αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Τα ερυθροκύτταρα υφίστανται διαρκώς την καταστρεπτική δράση ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species- ROS), ενδογενούς και εξωγενούς προελεύσεως. Ένα κλάσμα των ελεύθερων ριζών οξυγόνου με τη μορφή σουπεροξειδίου ή αλλιώς ανιόντος σουπεροξειδίου (superoxide- $O_2^-$ ), απελευθερώνεται από την αργή αντίδραση αυτοοξειδωσης της αιμοσφαιρίνης σε μεθαιμοσφαιρίνη (Mohanty et al., 2014). Επιπλέον, κυρίως στην μικροκυκλοφορία όπου και έρχονται σε στενή επαφή με το ενδοθήλιο, τα ερυθροκύτταρα προσλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες που παράγονται από ουδετερόφιλα, μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα (Abugo & Rifkind, 1994). Η διαρκής βλαπτική τους δράση στο ερυθροκύτταρο οδηγεί σε αλλοιώσεις της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος και, μεταξύ άλλων, σε αλλαγές στη δομή πρωτεϊνών (Fernandez Arias & Fernandez Arias, 2017).

Προκειμένου να εξουδετερώσει τις ελεύθερες ρίζες, το ερυθροκύτταρο διαθέτει ένα εκτενές αντιοξειδωτικό σύστημα, στο οποίο περιλαμβάνονται μη ενζυμικές μικρού

μοριακού βάρους ενώσεις, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η γλουταθειόνη (Glutathione, GHS) και το ασκορβικό οξύ (Gonzales et al., 1984 ), καθώς και ενζυμικές, όπως η καταλάση, η υπεροξειδάση γλουταθειόνης και η υπεροξυδεροξίνη (PRDX-2) (Barodka et al., 2014).

Στο πλαίσιο της καταστρεπτικής δράσης των ελεύθερων ριζών στις πρωτεΐνες παρατηρούνται:

α. Μετατροπή της αιμοσφαιρίνης σε αδιάλυτη μορφή, η οποία εσωκλείεται σε σωματία Heinz στο κυτταρόπλασμα. Τα σωματία αυτά προσκολλώνται στην κυτταρική μεμβράνη, καθιστώντας την περισσότερο άκαμπτη. Επιπλέον, κατά τη διέλευση των ερυθροκυττάρων μέσω του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος του σπληνός και του ήπατος, τα μακροφάγα απομακρύνουν τα σωματία από την κυτταρική μεμβράνη, δημιουργώντας ελλείμματα σε αυτή και επιβαρύνοντας περαιτέρω την ελαστικότητά της (Waugh & Low, 1985) (Thiagarajan et al., 2021).

β. Καταστροφή πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, με συνέπεια την ελαττωμένη παραμορφωσιμότητα του κυττάρου.

γ. Ανεπάρκεια των ενζυμικών και μη ενώσεων του αντιοξειδωτικού συστήματος του κυττάρου. Η συντήρηση της συνεχούς παρουσίας μιας «εφεδρείας» τέτοιων ουσιών στο κύτταρο, απαιτεί μεγάλη ποσότητα ενέργειας, την οποία αδυνατεί να παρέχει ο γηρασμένος μεταβολισμός του κυττάρου (Thiagarajan et al., 2021).

δ. Ανεπαρκής δραστηριότητα γλυκολυτικών ενζύμων, τα οποία καταλύουν αντιδράσεις παραγωγής ενέργειας στο ερυθροκύτταρο με αποτέλεσμα υπολειτουργία του μεταβολισμού τους (Haram et al., 1991) (D'Alessandro et al., 2013).

ε. Οξείδωση της αιμοσφαιρίνης και μετατροπή της σε μεθαιμοσφαιρίνη, η οποία δεν μπορεί να δεσμεύσει οξυγόνο (Mohanty et al., 2014). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η μεθαιμοσφαιρίνη θα μετατρέπεται ξανά στη λειτουργική της μορφή, μέσω του αντιοξειδωτικού συστήματος του κυττάρου. Κάτι τέτοιο, όμως, δεν είναι δυνατό στο γηρασμένο ερυθροκύτταρο, του οποίου τα αντιοξειδωτικά ένζυμα υπολειτουργούν.

στ. Δημιουργία νεοαντιγόνων γήρανσης. Η δράση των ROS οδηγεί σε δημιουργία αιμοχρωμάτων μέσω αργής μετουσίωσης της οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης (μεθαιμοσφαιρίνη) και συγκέντρωσή τους στο κυτταρόπλασμα. Τα αιμοχρώματα έχουν υψηλή συγγένεια και πολυμερίζουν το κυτταροπλασματικό τμήμα της διαμεμβράνικης πρωτεΐνης ζώνης-3, σχηματίζοντας ένα αδιάλυτο μακρομοριακό συσσωμάτωμα (Waugh

& Low, 1985). Εκτίθενται κατ' αυτόν τον τρόπο νεοαντιγόνα (συσσωμάτωμα πρωτεΐνης ζώνης-3/αιμοχρώματος), τα οποία αναγνωρίζονται από τα φυσιολογικά κυκλοφορούντα αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης ζώνης-3, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και την καταστροφή του κυττάρου από μακροφάγα (Arese et al., 2005).

ζ. Μετατροπή της πρωτεΐνης 4.1b σε πρωτεΐνη 4.1a. Η πρώτη είναι η μορφή που απαντάται στο αίμα νεαρών ατόμων. Ο λόγος 4.1a/4.1b έχει δειχθεί ότι αυξάνεται κατά τη γήρανση του ερυθροκυττάρου *in vivo*. Πλέον χρησιμοποιείται ευρέως ως ευαίσθητος δείκτης της ηλικίας του ερυθροκυττάρου (Mueller et al., 1987) (Vives Corrons et al., 2021).

Συγκεντρωτικά, ο φαινότυπος του γηρασμένου ερυθροκυττάρου συσχετίζεται με **μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα, οξειδωτικές βλάβες, μικροκυστιδιοποίηση και έκφραση** στην κυτταρική μεμβράνη **δεικτών απομάκρυνσής** του (Antonelou et al., 2010).

Τέλος, βλάβες του ερυθροκυττάρου λόγω ελλείμματος σε ενέργεια ή σε οξειδωτικά ένζυμα οδηγούν σε εξωτερίκευση στην κυτταρική μεμβράνη φωσφατιδυλοσερίνης, η οποία δρα σαν δείκτης αναγνώρισης και απομάκρυνσης από φαγοκύτταρα (Lang et al., 2006). Έχει προταθεί ότι η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και ο «δείκτης του εαυτού» CD47, δρώντας σαν σήματα «φάε με» και «μη με φας» αντίστοιχα, αποτελούν κύριους διαμεσολαβητές της φαγοκυττάρωσης του ερυθροκυττάρου και ειδικότερα ότι συμμετέχουν σε έναν μοριακό αλγόριθμο, ο οποίος καθορίζει τη στιγμή της φαγοκυττάρωσης (Fernandez Arias & Fernandez Arias, 2017) (Bosman et al., 2010). Τα φαγοκύτταρα αναγνωρίζοντας, για παράδειγμα, μία μείωση σημάτων «μη με φας», ή μία αύξηση σημάτων «φάε με», επιτίθενται στο κύτταρο και το καταστρέφουν.

## 2. Εξωκυττάρια Κυστίδια

Όλο και περισσότερα είναι τα επιστημονικά δεδομένα που συνηγορούν στο ότι η απελευθέρωση εξωκυττάρων κυστιδίων αποτελεί μία καλά διατηρημένη εξελικτικά διαδικασία (György et al., 2011). Η παρουσία τους έχει αποδειχθεί στο σύνολο των οργανισμών του δέντρου της ζωής, τόσο σε ευκαρυώτες, όσο και προκαρυώτες (van Niel et al., 2018): βακτήρια, αρχαία, μύκητες, πρωτόζωα (Deatherage & Cookson, 2012), φυτά (Zhou et al., 2022) (Robinson et al., 2015) και ζώα. Η τόσο ευρεία παρουσία τους

σημαίνει πιθανότατα την κρισιμότητα της συμμετοχής τους στη λειτουργία των οργανισμών. Μελέτες των τελευταίων δεκαετιών αποδεικνύουν ότι τα εξωκυττάρια κυστίδια μετέχουν σε πολυάριθμες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού· συμμετέχουν στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, όντας ικανά να μεταφέρουν το βιολογικό τους φορτίο σε κύτταρα στόχους, τροποποιώντας τη λειτουργία τους, δρουν ως μεσολαβητές της φλεγμονής, διεγείρουν ανοσολογικές αντιδράσεις, προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση, παίζοντας ενεργό ρόλο στην αποκατάσταση και αναγέννηση των ιστών (Ramoso et al., 1996) (Théry et al., 2002) (Valadi et al., 2007) (Ramachandra et al., 2010). Επίσης, συμμετέχουν στην καρκινογένεση, υποβοηθώντας τη μετανάστευση καρκινικών κυττάρων και τη νεοαγγείωση του όγκου, αλλά έχει επίσης δειχθεί και αντικαρκινική τους δράση (Skog et al., 2008). Άξιος να αναφερθεί σε αυτό το σημείο είναι ο ρόλος των εξωκυττάρων κυστιδίων που εκκρίνονται από βακτήρια στα ζώα-ξενιστές, τόσο σε μηχανισμούς παθογένεσης (μεταφορά τοξινών και ενζύμων, επικοινωνία μεταξύ των παθογόνων) όταν πρόκειται για παθογόνα βακτήρια (Deatherage & Cookson, 2012), όσο και σε προστατευτικούς μηχανισμούς (αποτροπή αποικισμού νέων παθογόνων, ανοσορρυθμιστικές απαντήσεις, ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών), όταν πρόκειται για βακτήρια της μικροβιακής χλωρίδας του ζώου-ξενιστή (Tarashi et al., 2022) (Kern et al., 2021) (Kuipers et al., 2018).

## **2.1. Ιστορική Αναδρομή**

### **2.1.1. Εξωκυττάρια Κυστίδια**

Πρώτος υπέθεσε την παρουσία ομοιαζόντων με εξωκυττάρια κυστίδια σωματιδίων ο Horder (1899) όταν, εξετάζοντας μία σταγόνα αίματος στο μικροσκόπιο, παρατήρησε ότι ορισμένα «κοκκία», ενώ αρχικά βρίσκονταν στο εσωτερικό των λευκοκυττάρων, στη συνέχεια εξωκυτταρώθηκαν, «χορεύοντας» μαζί με άλλα παρόμοια κοκκία στο πλάσμα του αίματος. Στη συνέχεια, η ύπαρξη μικροκυστιδίων στο πλάσμα υποτέθηκε, όταν αναγνωρίστηκε ένας παράγοντας που επιταχύνει την παραγωγή θρομβίνης σε αίμα απαλλαγμένο από αιμοπετάλια (Chargaff & West, 1946). Έπειτα, ο Wolf (1967) περιέγραψε την παρουσία στο πλάσμα και στον ορό του αίματος υποκυτταρικών σωματιδίων εμπλουτισμένων σε λιπίδια, τα οποία προέρχονται από αιμοπετάλια και

έχουν πηκτική δράση. Τα ονόμασε «σκόνη αιμοπεταλίων». Παρατήρησε, μάλιστα, ότι υπήρχε μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτών των σωματιδίων σε ασθενείς με πολυκυτταραιμία λόγω υψηλής συγκέντρωσης αιμοπεταλίων. Αργότερα, δημοσιεύτηκε η πρώτη μελέτη πάνω στη λειτουργία των εξωσωμάτιων κυστιδίων, στην οποία περιγράφηκε η προαγωγή της κινητικότητας του σπέρματος από προστατοσώματα, δηλαδή εξωκυττάρια κυστίδια παραγόμενα από κύτταρα του προστάτη (Stegmayr & Ronquist, 1982). Οι Raposo et al. (1996), έδειξαν ότι εξωκυττάρια κυστίδια προερχόμενα από Β-λεμφοκύτταρα έχουν αντιγονοπαρουσιαστικές ιδιότητες και διεγείρουν ανοσολογικές αποκρίσεις. Ήταν αυτή η ανάδειξη του βιολογικού τους ρόλου που έστρεψε το βλέμμα της επιστημονικής κοινότητας πάνω τους.

### **2.1.2. Εξωκυττάρια κυστίδια ερυθροκυτταρικής σειράς**

Μία από τις πιο πρώιμες περιγραφές μικροσωματιδίων, προήλθε από τη μελέτη φυσιολογικών ερυθροκυττάρων καθώς και δρεπανοκυττάρων. Ο Auer (1933) ορμώμενος από μελέτες συναδέλφων του, όπως ο Kyte το 1914 και ο Edelman το 1931, οι οποίοι ανέφεραν την παραγωγή «ιδιόμορφων νηματίων» και «κινητοσωμάτων», αντίστοιχα, από ζωντανά ερυθροκύτταρα, προχώρησε σε προσπάθεια καταγραφής των χαρακτηριστικών, της προέλευσης και των λειτουργιών τους. Στη μελέτη του περιέγραψε την παρουσία νημάτων, είτε συνδεδεμένων με «χάντρες» είτε χωρίς, τα οποία δημιουργούνται από ερυθροκύτταρα, δρεπανοκύτταρα και αιμοπετάλια και τελικά ενώνονται σε ένα και μοναδικό μικροσωματίδιο. Στη συνέχεια, όπως παραθέτουν οι Westerman και Porter (2016), οι Bessis και Mandon το 1972, περιέγραψαν με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου την εμφάνιση εκβλαστήσεων σε ερυθροκύτταρα και την παρουσία εξωκυττάρων νηματίων και μικροσωματιδίων. Η παραγωγή μικροσωματιδίων παραγόμενων από ερυθροκύτταρα μαγνητοσκοπήθηκε για πρώτη φορά το 1973 (Padilla et al., 1973). Ακολούθησαν μελέτες των Allan και Mitchell (1975) (1975), στις οποίες οι ερευνητές απομόνωσαν και έδωσαν λεπτομερή περιγραφή μικροσωματιδίων φυσιολογικών ερυθροκυττάρων. Τέλος, δύο ανεξάρτητες ομάδες ερευνητών ανέφεραν την απελευθέρωση εξωκυττάρων κυστιδίων μέσω εξωκύττωσης πολυκυστιδικών σωμάτων, κατά την ωρίμανση των δικτυοερυθροκυττάρων (Harding et al., 1983) (Pan & Johnstone, 1983).

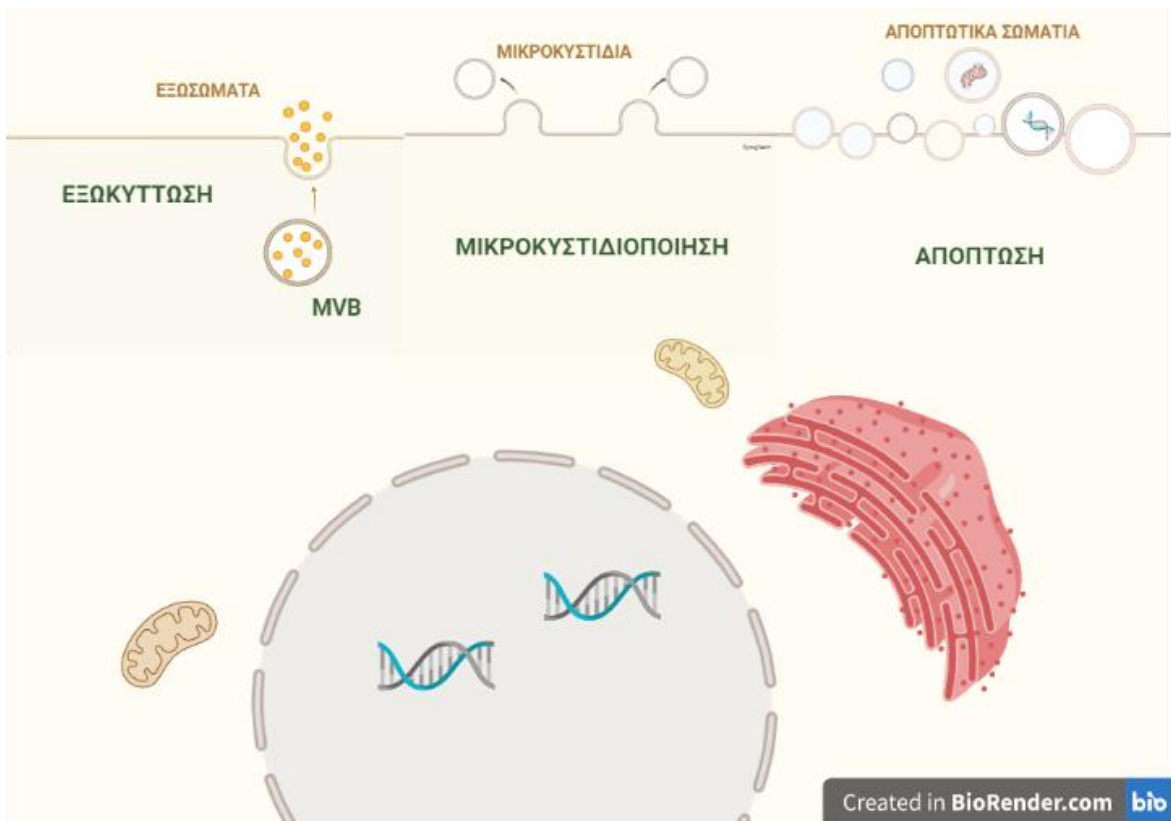
## 2.2. Κατηγοριοποίηση Εξωκυττάρων Κυστιδίων

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα εξωκυττάρια κυστίδια ταξινομούνται ανάλογα με το μέγεθος και τον μηχανισμό βιογένεσής τους σε τρεις κατηγορίες, τα εξωσώματα, τα αποπτωτικά σωμάτια και τα μικροκυστίδια (βλ. Εικ. 3). Παρόλο που και οι τρεις τύποι κυστιδίων ουσιαστικά αποτελούνται από μία μεμβράνη-διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων, η οποία εσωκλείει ένα φορτίο βιομορίων, όπως π.χ. πρωτεΐνες, κυτταρικά θραύσματα και RNA, το μέγεθος και το φορτίο τους ποικίλουν σημαντικά.

Τα εξωσώματα (διάμετρος 40-100 nm) σχηματίζονται ενδοκυτταρικά. Αρχικά εγκοιλπώνεται η μεμβράνη ενδοσωμάτων στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα τη σταδιακή συσώρευση ενδοαυλικών κυστιδίων (Intraluminal Vesicles- ILVs) μέσα σε μεγάλα πολυκυστιδικά σωμάτια (MVBs). Στη συνέχεια, τα MVBs συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη και απελευθερώνουν τα IVLs στον εξωκυττάριο χώρο, όπου πλέον αποτελούν τα εξωσώματα (Cocucci & Meldolesi, 2015).

Τα αποπτωτικά σωμάτια (διάμετρος 1- 5  $\mu\text{m}$ ) είναι ένας ετερογενής πληθυσμός κυστιδίων, τα οποία απελευθερώνονται από κύτταρα που υφίστανται εκκαθάριση μέσω προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-απόπτωσης (Ihara et al., 1998). Η βιογένεση των μικροκυστιδίων (διάμετρος 50-2000nm), με τα οποία θα ασχοληθεί η παρούσα εργασία, προκύπτει από την απευθείας εξόγκωση και σχάση της κυτταρικής μεμβράνης (Inal et al., 2013).

Όλα τα παραπάνω μαζί με δεξωσώματα (εξωσώματα δεντριτικών κυττάρων), προστατοσώματα (κυστίδια του προστάτη), κυστίδια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (των οστών, των χόνδρων και των αθηροσκληρωτικών πλακών), συναπτικά κυστίδια (νευρώνων) και σωματίδια που ομοιάζουν με ρετροϊό (90-100 nm, μη λοιμώδη σωματίδια, που περιέχουν ρετροϊικές πρωτεΐνες), συναποτελούν το εξωκυττάριο κυστιδιακό διαμέρισμα του οργανισμού (Antonelou & Seghatchian, 2016) (György et al., 2011).



**Εικόνα 3** Αναπαράσταση τύπων μικροκυτταρικών κυστιδίων. (MVB: Πολυκυστικό σωματίο). Δημιουργήθηκε στο Biorender.com

### 3. Μικροκυστίδια Ερυθρών Αιμοσφαιρίων

Ο ρυθμός παραγωγής μικροκυστιδίων διαφέρει ανάλογα με το είδος του κυττάρου, αλλά ακόμα και κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας, αποβάλλουν MVs με σταθερό αργό ρυθμό (Kalra et al., 2016). Τα ερυθροκύτταρα αποτελούν το 40% του συνολικού όγκου του αίματος και έναν από τους κυριότερους παραγωγούς MVs στο αίμα. Κάτω από φυσιολογικές καταστάσεις τα μικροκυστίδια των ερυθροκυττάρων (RBC-MVs) αντιπροσωπεύουν κατά προσέγγιση το 7,3% του συνόλου των εξωκυττάρων κυστιδίων στο αίμα· τα υπόλοιπα παράγονται από μονοκύτταρα (10,4%) ενδοθηλιακά κύτταρα (43,8%) και αιμοπετάλια (38,5%) (Shah et al., 2008). Παρόλο που τα δικτυοερυθροκύτταρα και τα ανώριμα ερυθροκύτταρα αποβάλλουν και εξωσώματα κατά τη διαδικασία ωρίμανσής τους (Spinella et al., 2011), τα ώριμα ερυθροκύτταρα απελευθερώνουν κατ' αποκλειστικότητα μικροκυστίδια, καθώς δεν διαθέτουν δίκτυο ενδοσωμάτων (de Vooght et al., 2013). Κάθε ένα RBC υπολογίζεται ότι παράγει περί τα 230 μικροκυστίδια στη διάρκεια της ζωής του (Said et al., 2018) και σε κάθε δεδομένη

στιγμή κυκλοφορούν στο αίμα υγιών ατόμων περίπου 169 RBC-MVs ανά μικρόλιτρο πλάσματος (Willekens et al., 2008) (Bosman et al., 2008).

Η μικροκυστιδιοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελεί κεντρικό μηχανισμό της ομοιόστασής τους και είναι αναπόσπαστο κομμάτι της φυσιολογίας τους, που συνοδεύει την ωρίμανση και τη γήρανσή τους. Κατά τις 120 ημέρες που επιβιώνουν στην κυκλοφορία, συσσωρεύονται είτε στο εσωτερικό είτε στη μεμβράνη τους, τοξικοί παράγοντες όπως μετουσιωμένη αιμοσφαιρίνη, νεοαντιγόνα γήρανσης της πρωτεΐνης ζώνης-3, σύμπλεγμα C5b-9 του συμπληρώματος και αντισωμάτα IgG (Willekens et al., 2008). Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να ενεργοποιήσουν ανεπιθύμητες αιμοστατικές ή ανοσολογικές αντιδράσεις, καθώς και να δράσουν ως δείκτες για την αναγνώρισή τους από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα, με αποτέλεσμα την πρόωρη απομάκρυνσή τους από την κυκλοφορία (Willekens et al., 2005). Με την μικροκυστιδιοποίηση, όμως, η οποία μάλιστα επιταχύνεται κατά το δεύτερο μισό της ζωής του κυττάρου (Willekens et al., 2003) το ερυθροκύτταρο αποβάλλει όλες αυτές τις τοξικές ουσίες και καταφέρνει να «κρυφτεί» από τα μακροφάγα, κερδίζοντας μια παράταση ζωής (Willekens et al., 2008). Η μικροκυστιδιοποίηση προστατεύει και με έναν ακόμη τρόπο το κύτταρο από εκκαθάριση· η απώλεια κυτταρικής μεμβράνης με μορφή κυστιδίων, οδηγεί στην αλλαγή του λόγου της επιφάνειας προς τον όγκο του κυττάρου, καθιστώντας δυνατή την αναδιαμόρφωση της μεμβράνης και προστατεύοντας την παραμορφωσιμότητά της και άρα τη ακεραιότητά της.

Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι το πυκνότερο 1% των κυκλοφορούντων ερυθροκυττάρων (δηλαδή αυτών που διανύουν την τελευταία ημέρα της ζωής τους) εμφανίζει μειωμένη κατά 17% επιφάνεια κυτταρικής μεμβράνης, μειωμένο όγκο κατά 25% περίπου και μειωμένη κατά 20% αιμοσφαιρίνη (Waugh et al., 1992). Σε συμφωνία με τα παραπάνω είναι το γεγονός ότι μικροκυστίδια απομονωμένα από πλάσμα φρέσκου αίματος περιέχουν μη αναστρέψιμα τροποποιημένες μορφές αιμοσφαιρίνης (HbA1c και HbA1e2) σε ποσοστό αντίστοιχο με το ποσοστό που λείπει από τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα (Willekens et al., 2003).

Η απελευθέρωση κυστιδίων φαίνεται όμως να δρα και με αντίθετο τρόπο, επιταχύνοντας την απομάκρυνση των κατεστραμμένων ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία. Αυτό συμβαίνει γιατί με τη μικροκυστιδιοποίηση απομακρύνεται από την επιφάνεια των ερυθροκυττάρων η ιντεγκρίνη CD47, η οποία φυσιολογικά,



αναγνωριζόμενη από τα μακροφάγα ως «σήμα εαυτού», αποτρέπει τη φαγοκυττάρωσή τους. Η απώλειά της, συνεπώς, δρα σαν «μαρκάρισμα» εκείνων των κατεστραμμένων ή πολύ γηρασμένων ερυθροκυττάρων, τα οποία δεν επιδέχονται επιπλέον διόρθωσης και πρέπει να καταστραφούν από φαγοκύτταρα (Pollet et al., 2018).

### **3.1. Σύσταση Μικροκυστιδίων Ερυθρών Αιμοσφαιρίων**

Μορφολογικά, τα μικροκυστίδια μπορούν να πάρουν τρία σχήματα: σφαιρικό (95% των κυστιδίων), σωληνοειδές ή σχήμα μεγάλου θραύσματος (Arraud et al., 2014). Παρόλο που γεννώνται από τα ερυθροκύτταρα, διαφέρουν δομικά και λειτουργικά από αυτά. Τα συστατικά τους προέρχονται από διάφορα μέρη του κυττάρου, όπως το κυτταρόπλασμα, την κυτταρική μεμβράνη και τον πυρήνα και ποικίλουν ανάλογα με το ερέθισμα που οδήγησε στην παραγωγή τους, καθώς και την ενδοατομική μεταβλητότητα (Théry et al., 2009) (Bastos-Amador et al., 2012; Alaarg et al., 2013).

#### **3.1.1. Πρωτεΐνες**

Όσον αφορά το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο, οι μελέτες του μικροκυστιδιακού πρωτεώματος έχουν καταλήξει στα εξής:

- **Πρωτεΐνες πλάσματος:** Περιέχουν ένα μεγάλο κλάσμα «άλλων πρωτεϊνών», δηλαδή πρωτεϊνών που δεν ανιχνεύονται στο πρωτέωμα των ερυθροκυττάρων, αλλά αντιθέτως προέρχονται από το πλάσμα του αίματος. Τέτοιες είναι διάφορες ανοσοσφαιρίνες, α2-μακροσφαιρίνη και Αννεξίνη A1 και A2 (Bosman et al., 2012).
- **Πρωτεΐνες κυτοσολίου:** Είναι εμπλουτισμένα με μεγάλες ποσότητες μη αντιστρεπτά τροποποιημένης αιμοσφαιρίνης, η οποία αδυνατεί πλέον να δεσμεύσει οξυγόνο, στο ίδιο μοτίβο με τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα (Willekens et al., 2008).
- **Μεμβρανικές πρωτεΐνες:** Δεν περιέχουν πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (σπεκτρίνη και ανγκυρίνη), καθώς και τις συνδεδεμένες με αυτές πρωτεΐνες, όπως πρωτεΐνες 4.1, 4.2 και 4.9 (Bosman et al., 2012). Αντίθετα, φέρουν πολύ μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης της ζώνης-3 και ακτίνης (Tissot et al., 2013) καθώς και πρωτεΐνες-μεταφορείς γλυκόζης (π.χ Glut1) (Johnstone et al., 1987) και γλυκοφορίνη A (Chiangjong et al., 2021).

- **Ένζυμα:** Περιέχουν ένζυμα του αντιοξειδωτικού συστήματος του ερυθροκυττάρου, όπως η γλουταθειόνη, υπεροξυδεροξίνη1 και 2. γεγονός που υποδεικνύει σύνδεση μεταξύ της οξειδωσης πρωτεϊνών και της κυστιδιοποίησης. Φέρουν επίσης μεγάλες ποσότητες υπομονάδων προτεασώματος και της πρωτεΐνης ουβικιτίνης (Bosman et al., 2012), τα οποία συμμετέχουν στην πρωτεόλυση άχρηστων ή κατεστραμμένων πρωτεϊνών (Wang & Maldonado, 2006).
- **Πρωτεΐνες-Σήματα:** Φέρουν στην επιφάνεια τους πρωτεΐνες που είτε προστατεύουν το κύτταρο από καταστροφή, είτε αντίθετα δρουν σαν δείκτες για την αναγνώριση και καταστροφή του. Στις πρώτες περιλαμβάνονται η ιντεγκρίνη CD47 και η γλυκοπρωτεΐνη SHPS1 (Signal-regulatory protein alpha), οι οποίες αποτρέπουν τη φαγοκυττάρωση. Στην επιφάνεια ανιχνεύονται επίσης οι γλυκοπρωτεΐνες CD55 (Complement Decay Accelerator Factor ή DAF) και CD59, οι οποίες δρουν σαν αναστολείς του συμπληρώματος και επίσης προστατεύουν από λύση. Επιπρόσθετα, ταυτοποιούνται επάνω τους ανοσοσφαιρίνες καθώς και νεοαντιγόνα γήρανσης της πρωτεΐνης ζώνης-3, η αναγνώριση των οποίων από κύτταρα του ανοσοποιητικού, σηματοδοτεί καταστροφή (Nguyen et al., 2017) (Khalyfa & Sanz-Rubio, 2021).

### 3.1.2. Λιπίδια

Παρόλο που τα λιπίδια αποτελούν το βασικό δομικό συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης, είναι από τα λιγότερο μελετημένα στοιχεία. Η φωσφολιπιδική σύνθεση των μικροκυστιδίων είναι παρόμοια με αυτή των μητρικών τους κυττάρων, με εξαίρεση το φωσφατιδικό οξύ, το οποίο είναι αυξημένο, και τη φωσφατιδυλαιθολαμίνη, η οποία εντοπίζεται σε ελαφρώς μειωμένη ποσότητα. Επίσης, περιέχουν διακυλογλυκερόλη και χοληστερόλη. Σε κάθε περίπτωση, ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των μικροκυστιδίων είναι ότι εκφράζουν στην επιφάνειά τους, το αρνητικά φορτισμένο φωσφολιπίδιο φωσφατιδυλοσερίνη (György et al., 2011) (Westerman & Porter, 2016), η αναγνώριση της οποίας από μακροφάγα οδηγεί σε γρήγορη καταστροφή τους. Έχει δειχθεί, παρόλα αυτά, ότι δεν εκφράζουν όλα τα RBC-MVs φωσφατιδυλοσερίνη (Nguyen et al., 2011), γεγονός που πιθανότατα υποδηλώνει ότι κάποια μικροκυστίδια σχηματίζονται σε ειδικές περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, με διαφορετική σύνθεση από την υπόλοιπη

μεμβράνη. Τις τελευταίες δεκαετίες μελέτες επιβεβαιώνουν ότι τα μικροκυστίδια δημιουργούνται σε ειδικές περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης (Lutz et al., 1976) (Pollet et al., 2018), τις λιπιδικές σχεδίες. Το γεγονός ότι τα μικροκυστίδια προεκβάλλουν από αυτές τις σχεδίες, ενισχύεται και από το ότι περιέχουν σε μεγάλες ποσότητες ειδικά συνδεδεμένες με αυτές πρωτεΐνες, όπως η σορσίνη, η στοματίνη και η συνεξίνη (Salzer et al., 2002).

### **3.1.3. Νουκλεϊκά Οξέα**

Για μεγάλο χρονικό διάστημα η απουσία νουκλεϊκών οξέων στα μικροκυστίδια θεωρείτο δεδομένη, καθώς τα ερυθροκύτταρα δεν περιέχουν πυρήνα και οργανίδια. Μελέτες του μεταγραφώματος των μικροκυστιδίων, ωστόσο, έδειξαν την παρουσία 78 διαφορετικών miRNAs (Huang et al., 2019). Τα miRNAs είναι μία κλάση μικρών RNAs, με μήκος 20-30 νουκλεοτίδια, τα οποία συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες του οργανισμού, όπως στην κυτταρική διαφοροποίηση, ανάπτυξη και απόπτωση, καθώς και στην αιμοποίηση, την καρκινογένεση κ.α. Τα ερυθροκύτταρα εμπλέκονται στον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων, μέσω αποδόμησης mRNAs καθώς και αναστολής της μετάφρασης (Hamilton, 2010). Από τα 78 miRNAs που ανιχνεύθηκαν, σταθερή παρουσία σε όλα τα δείγματα αίματος είχαν τρία: τα miR-125-b-5p, Mir-4454 και miR-451a. Από αυτά το miR-125-b-5p συμμετέχει σε ανοσορρυθμιστικές διαδικασίες. Μερικά από τα αναφερόμενα miRNAs είτε ρυθμίζονται προς τα πάνω, είτε προς τα κάτω κατά τη διάρκεια υποξίας (Huang et al., 2019). Επιπλέον, τα RBC-MVs περιέχουν μεγάλο αριθμό μη κωδικοποιησίων RNAs, αλλά καθόλου DNA (Nguyen et al., 2016).

### **3.2. Μηχανισμός Μικροκυστιδιοποίησης**

Η παραγωγή και απελευθέρωση μικροκυστιδίων από τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία, από την οποία εξαρτάται και η επιλεκτική φόρτωσή τους με βιοενεργά συστατικά (Kriebardis et al., 2012). Έχουν προταθεί δύο μη αμοιβαία αποκλειόμενοι μηχανισμοί παραγωγής μικροκυστιδίων, ο πρώτος σχετιζόμενος με την πρωτεΐνη ζώνης 3 (βλ. Παράγραφο 3.2.1) και ο δεύτερος με τη συσσώρευση ιόντων ασβεστίου (βλ. Παράγραφο 3.2.2) (Pollet et al., 2018).

### 3.2.1. Μοντέλο Συσσωμάτωσης Πρωτεΐνης Ζώνης 3 (Band-3 model)

Η παρουσία πρωτεΐνης ζώνης 3 και ακτίνης στα μικροκυτίδια σε συνδυασμό με την απουσία σχεδόν όλων των υπόλοιπων διαμεμβρανικών και κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι για να επιτευχθεί κυστιδιοποίηση, πρέπει με κάποιον τρόπο να επέλθει ρήξη της σύνδεσης κυτταροσκελετού-μεμβράνης (Bosman et al., 2012) (Leal et al., 2018). Σε συμφωνία με τα παραπάνω οι Zue et al. (2017) έδειξαν ότι για την επιτυχή παραγωγή μικροκυστιδίων είναι απαραίτητη μια σημαντική μείωση της τοπικής πυκνότητας αγκύρωσης και μείωση της σταθερότητας του κυτταροσκελετού. Η κυτταροσκελετική αστάθεια από μόνη της όμως, δεν είναι το κύριο γεγονός που οδηγεί στην κυστιδιοποίηση, καθώς ο εμπλουτισμός των μικροκυστιδίων σε αντιοξειδωτικά ένζυμα, σε μη αντιστρεπτά οξειδωμένη αιμοσφαιρίνη, όπως και η εκτεταμένη πρωτεϊνική αποικοδόμηση στα γηραιότερα ερυθροκύτταρα, καταδεικνύουν ότι σημαίνοντα ρόλο στη μικροκυστιδιοποίηση διαδραματίζουν επίσης οι οξειδωτικές βλάβες του ερυθροκυττάρου. Οι Bosman et. al. διατύπωσαν την υπόθεση ότι η οξειδωτική βλάβη αποτελεί και το βασικό ερέθισμα της μικροκυστιδιοποίησης (2012).

Το οξειδωτικό stress φαίνεται ότι οδηγεί σε ομαδοποίηση και συσσωμάτωση της ζώνης-3 μέσω δύο μηχανισμών (βλ. Εικ. 4). Πρώτον, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ενεργοποιούν την τυροσινική κινάση<sup>1</sup>, η οποία οδηγεί σε φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης ζώνης-3. Η φωσφορυλίωση αποδεδειγμένα παρατηρείται κατά τη γήρανση και την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων και οδηγεί σε διαχωρισμό της πρωτεΐνης ζώνης-3 από την ανγκυρίνη (Azouzi et al., 2018) (Ferru et al., 2011). Δεύτερον, οι ελεύθερες ρίζες οδηγούν σε παραγωγή αιμοχρωμάτων, τα οποία αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες ζώνης-3, ευνοώντας επίσης τη ρήξη της σύνδεσής τους με τον κυτταροσκελετό και τη συσσωμάτωσή τους. Τα παραπάνω οδηγούν σε χαλάρωση του κυτταροσκελετού και αυθόρμητη κάμψη της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα τη δημιουργία προεκβολών και μικροκυστιδιοποίηση (Bosman et al., 2012).

---

<sup>1</sup> Το κυτταροπλασματικό τμήμα της πρωτεΐνης ζώνης 3 αποτελεί το κύριο υπόστρωμα της τυροσινικής κινάσης, η οποία είναι μια πρωτεϊνική κινάση που φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες και δρα ως διακόπτης «on-off» για διάφορες κυτταρικές διεργασίες (Ferru et al., 2011).

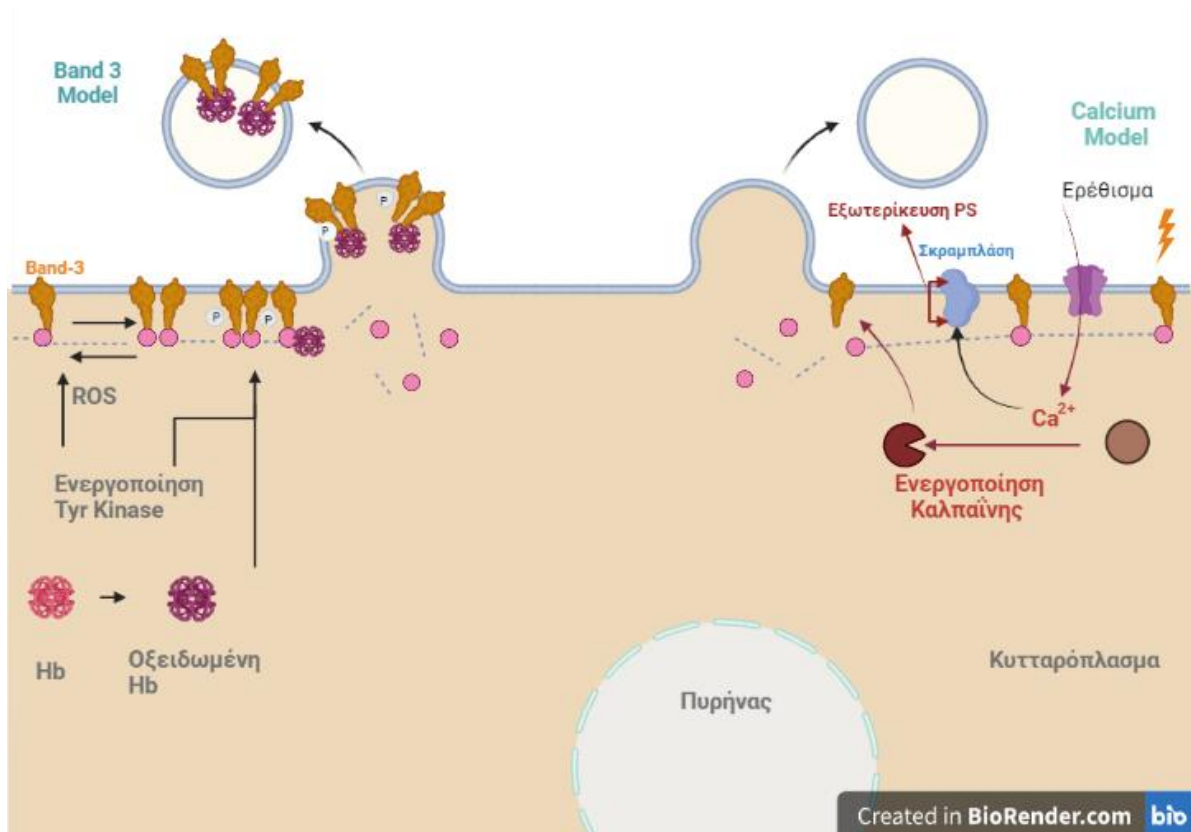
### 3.2.2. Μοντέλο της συσσώρευσης ιόντων ασβεστίου (Calcium Model)

Ένα εναλλακτικό μοντέλο στο προαναφερθέν, βασίζεται στην αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης κατιόντων ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (βλ. Εικ. 4). Η αύξηση αυτή παρατηρείται κατά τη φυσιολογική γήρανση των ερυθροκυττάρων, και προκύπτει εν μέρει από ελαττωμένη ικανότητα εξόδου  $\text{Ca}^{2+}$  από το κύτταρο, λόγω συσσώρευσης οξειδωτικού stress. Ακόμα, η εισροή  $\text{Ca}^{2+}$  στο κύτταρο από εξωκυτταρικές πηγές, σε απάντηση διαφόρων ερεθισμάτων, είτε η απελευθέρωσή τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο προκαλούν την ενεργοποίηση του ενζύμου **καλπαΐνη**, ενός πρωτεολυτικού ενζύμου που αποικοδομεί τα νημάτια χρωματίνης του κυτταροσκελετού, οδηγώντας σε αναδιοργάνωσή του και διευκόλυνση αποβολής μικροκυστιδίων (Inal et al., 2013). Επιπλέον, η ενδοκυτταρική αύξηση  $\text{Ca}^{2+}$  επηρεάζει τη λειτουργία ενζύμων που εμπλέκονται στη διατήρηση της λιπιδικής ασυμμετρίας της φωσφολιπιδικής μεμβράνης. Συγκεκριμένα, ενεργοποιεί τα ένζυμα **σκραμπλάση** και **φλοπάση** και απενεργοποιεί τη **φλιπάση**, με αποτέλεσμα την απώλεια της ασυμμετρίας και τη μετατόπιση φωσφατιδυλοσερίνης από την εσωτερική στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης (βλ. Παράγραφο 1.3.).

Επιπρόσθετα, η αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης  $\text{Ca}^{2+}$ , συνδέεται με την εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης μέσω των παρακάτω γεγονότων. Αρχικά, ενεργοποιεί κανάλια διόδου **κατιόντων καλίου** ( $\text{K}^2$ ) προκαλώντας απώλεια χλωριούχου καλίου και νερού και επακόλουθη συρρίκνωση του κυττάρου (Lang et al., 2003). Ακόμα, ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση Ca (PKCa) καθώς και μη επιλεκτικά κανάλια κατιόντων, τα οποία μεσολαβούν στην επιπλέον εισροή  $\text{Ca}^{2+}$ . Η PKC είναι μία πρωτεϊνική κινάση, η οποία ρυθμίζει τη λειτουργία άλλων πρωτεϊνών. Η ενεργοποίησή της προκαλεί εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων του ερυθροκυττάρου (Lang & Quadri, 2012) και συνεπώς απώλεια της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας (de Jong et al., 2002), διότι η δράση των τρανσλοκασών σκραμπλάση, φλιπάση και φλοπάση είναι ενεργοεξαρτώμενη.

Η απώλεια του αρνητικού φορτίου της φωσφατιδυλοσερίνης από την εσωτερική στοιβάδα, δημιουργεί μία ανισορροπία της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς διαρρηγνύονται οι ηλεκτροστατικοί δεσμοί της με θετικά φορτισμένα στοιχεία του κυτταροσκελετού (Comfurius et al., 1989). Σαν αποτέλεσμα, η φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα καμπυλώνεται προς τα έξω. Αν η δραστηριότητα της σκραμπλάσης είναι εξαιρετικά αυξημένη, η δημιουργούμενη καμπυλότητα αρκεί από μόνη της για να

προκληθεί «σχάση» μικροκυστιδίων από τη μεμβράνη (Kalra et al., 2016). Οι Bosman et. al., βασιζόμενοι στην παρατήρηση ότι η πρωτεϊνική σύνθεση διέφερε ανάμεσα σε μικροκυστίδια που απελευθερώθηκαν μέσω διέγερσης ερυθροκυττάρων in vitro με ιονοφόρο<sup>2</sup>  $Ca^{2+}$  και σε μικροκυστίδια απελευθερωμένα λόγω γήρανσης ή αποθήκευσης, υπέθεσαν ότι οι διακυμάνσεις στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση  $Ca^{2+}$ , δεν είναι ο πρωταρχικός παράγοντας μικροκυστιδιοποίησης in vivo και σε τράπεζες αίματος (2012).



Εικόνα 4 Μοντέλα Μικροκυστιδιοποίησης. (PS: Φωσφατιδυλοσερίνη). Δημιουργήθηκε στο Biorender.com

### 3.3. Παράγοντες πρόκλησης κυστιδιοποίησης

Μικροκυστιδιοποίηση συμβαίνει καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ερυθροκυττάρου (Willekens et al., 2008). Όπως προεκτέθηκε, αποτελεί έναν ομοιοστατικό μηχανισμό των υγιών ατόμων, που ενεργοποιείται in vivo σε απάντηση επίδρασης ποικίλων ερεθισμάτων στο ερυθροκύτταρο ή στα αρχικά στάδια της απόπτωσης. Τα ερυθροκύτταρα, όμως, έχουν επιπρόσθετα την ικανότητα να παράγουν

<sup>2</sup> Το ιονοφόρο  $Ca^{2+}$  ή A23187 είναι μία φαρμακευτική ουσία - μεταφορέας ιόντων, που σχηματίζει ισχυρά σύμπλοκα με δισθενή ιόντα.

μικροκυστίδια κάτω από ποικίλες πειραματικές συνθήκες *in vitro*, αλλά και κατά την αποθήκευση σε τράπεζες αίματος. Μία πληθώρα ερεθισμάτων όπως η ενεργοποίηση του συμπληρώματος (Moskovich & Fishelson, 2007), το μηχανικό stress [όπως η άσκηση τάσης διάτμησης στη μεμβράνη (Inal et al., 2013)], το οξειδωτικό (Sudnitsyna et al., 2020) και ενεργειακό stress [όπως η εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων (ATP)], η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C, η θέρμανση, η αύξηση και η μείωση του pH καθώς και η επίδραση εξωγενών ενώσεων και φαρμάκων (Nguyen et al., 2011) (Prudent et al., 2015) (Nguyen et al., 2016), μπορούν να οδηγήσουν σε μικροκυστιδιοποίηση. Κάποια από τα ερεθίσματα μπορεί να δρουν σωρευτικά ή ακόμα και συνεργικά (Simak & Gelderman, 2006).

Πρόσφατες μελέτες υπέθεσαν την ύπαρξη μιας σειράς μονοπατιών σηματοδότησης σχετιζόμενα με ενεργειακή απορρύθμιση, τα οποία προάγουν τη συρρίκνωση του κυττάρου και τη μικροκυστιδιοποίηση, και περιλαμβάνουν υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνη G (G protein-coupled receptors- GPCRs), το μονοπάτι της φωσφατιδυλοϊνοσιτιδικής-3 κινάσης (PI3K)-Πρωτεϊνικής Κινάσης B (Akt), τον μεταγωγέα σήματος της Janus κινάσης (JAK), καθώς και την επαγωγή της μικροκυστιδιοποίησης μέσω του VGFR-2 (Vascular vascular endothelial growth factor receptor 2) (Kostova et al., 2015).

Έχει δειχθεί ότι η έκθεση ερυθροκυττάρων σε ιονοφόρο  $Ca^{2+}$ , λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA- Lysophosphatidic acid) ή φορβολ-12-μυριστικό-13-οξικό (PMA- phorbol-12-myristate-13-acetate) οδηγεί σε εξωτερίκευση PS και μικροκυστιδιοποίηση (Nguyen et al., 2011) (Kaestner et al., 2012) (Chung et al., 2007). Αξίζει να επισημανθεί ότι έκθεσή τους σε PMA, απουσία  $Ca^{2+}$ , οδήγησε επίσης σε μικροκυστιδιοποίηση (Nguyen et al., 2011) (Wagner-Britz et al., 2013) με ένα μονοπάτι ανεξάρτητο από τη συγκέντρωση  $Ca^{2+}$ , το οποίο σχετίζεται με τη δραστηριότητα της πρωτεϊνικής κινάσης Cζ (PKCζ)<sup>3</sup>.

Επιπροσθέτως, η θέρμανση ερυθροκυττάρων κοντά στη θερμοκρασία μετουσίωσης της σπεκτρίνης (45°C) προκαλεί γένεση μικροκυστιδίων μεγάλης διαμέτρου (0–1.0 nm), τα οποία δεν περιέχουν στοιχεία του κυτταροσκελετού, και μάλιστα, η διαδικασία εντείνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας (Moore et al., 2013). Έκθεση σε διαφορετικές του φυσιολογικού τιμές pH, προκαλεί αλλαγή του σχήματος των

---

<sup>3</sup> Η δράση της PKCζ δεν εξαρτάται από την ύπαρξη  $Ca^{2+}$

ερυθροκυττάρων<sup>4</sup> και μικροκυστιδιοποίηση: υψηλό (αλκαλικό) pH τα μετατρέπει σε εχινοκύτταρα και χαμηλό (όξινο) pH σε στοματοκύτταρα (Gedde et al., 1995). Επίσης, τα μικροκυστίδια που απελευθερώνονται είναι απαλλαγμένα κυτταροσκελετικών συστατικών (Iglıc et al., 1998) (Bobrowska-Hägerstrand et al., 1998). Οι Iglıc et al, υπέθεσαν ότι η αλλαγές που παρατηρούνται σε υψηλό pH (=11) μπορούν να εξηγηθούν με την ύπαρξη εξαιρετικά μεγάλης διαφοράς επιφάνειας μεταξύ εσωτερικής και εξωτερικής μονοστοιβάδας φωσφολιπιδίων και συνεπώς με ρήξη των συνδέσεων κυτταροσκελετού και διπλοστοιβάδας φωσφολιπιδίων (1998). Το χαμηλό pH του αίματος στα τριχοειδή αγγεία, συμβάλλει πιθανότατα στη διαδικασία της μικροκυστιδιοποίησης (Westerman & Porter, 2016).

### **3.4. Φυσιολογικός Ρόλος Μικροκυστιδιοποίησης Ερυθροκυττάρων**

Τα μικροκυστίδια αποτελούν μέρος ενός πολύπλοκου δικτύου αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο ερυθροκύτταρο και τον οργανισμό. Εκτός από τον αποδεδειγμένο ρόλο τους στην προστασία της ακεραιότητας των ερυθροκυττάρων και στην επιμήκυνση της διάρκειας ζωής τους, συμμετέχουν και μέσω άλλων μηχανισμών στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού.

Αρχικά, έχει δειχθεί ότι μικροκυστίδια που κυκλοφορούν στο αίμα υγιών ατόμων ασκούν αντιπηκτική δράση. Οι Koshıar et al, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη S, την οποία προσδένουν τα μικροκυστίδια στην επιφάνειά τους (Lane et al., 1994 ), υποστηρίζει την ενεργοποίηση του συστήματος της πρωτεΐνης C (2014). Το σύστημα αυτό, σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη S ασκεί αντιπηκτική δράση, απενεργοποιώντας τους παράγοντες πήξης του αίματος VIIIa και Va, οι οποίοι συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του παράγοντα X και της προθρομβίνης, αντίστοιχα (Guinto & Esmoη, 1984) (Stern et al., 1986). Η αντιπηκτική δράση των μικροκυστιδίων οφείλεται, επίσης, και στο γεγονός ότι προάγουν την παραγωγή μικρών ποσοτήτων θρομβίνης στο αίμα υγιών ατόμων (Berckmans et al., 2001). Η θρομβίνη, συνδεόμενη με τη θρομβομοντουλίνη -μια πρωτεΐνη υποδοχέα των ενδοθηλιακών κυττάρων των αιμοφόρων αγγείων- ενεργοποιεί την πρωτεΐνη C, προάγοντας την αντιπηκτική της δράση (Esmoη & Owen, 1981).

---

<sup>4</sup> Στο φυσιολογικό pH 7,4 του αίματος, τα ερυθροκύτταρα έχουν δισκοειδές σχήμα (Bobrowska-Hägerstrand et al., 1998)



Επιπλέον, ασκούν σημαντική αιμοστατική δραστηριότητα ενισχύοντας τόσο την πρωτογενή (αιμοπεταλιακός θρόμβος) αιμόσταση όσο και τη δευτερογενή (πήξη). Συγκεκριμένα, σε μία μελέτη των Johansen et al, τα μικροκυστίδια των ερυθροκυττάρων βελτίωσαν ή και διόρθωσαν τα αιμοστατικά ελλείμματα στο πλάσμα ασθενών με διαταραχές των αιμοπεταλίων και των παραγόντων πήξης. Η δράση τους αυτή καθίσταται δυνατή μέσω τριών διαδικασιών (Johansen et al., 2013). Πρώτον, μέσω της έκθεσης στην επιφάνειά τους φωσφατιδυλοσερίνης, η οποία προάγει το μηχανισμό πήξης, αποτελώντας περιοχή σύνδεσης των παραγόντων πήξης και οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή θρομβίνης. Δεύτερον, μέσω παραγωγής θρομβίνης με ενεργοποίηση του παράγοντα πήξης XIIa (Van Der Meijden et al., 2012) και τρίτον, ενισχύοντας τη λειτουργία των αιμοπεταλίων (Johansen et al., 2013).

Τέλος, έχει προταθεί, αλλά δεν έχει αποδειχθεί, ότι τα μικροκυστίδια των ερυθροκυττάρων συμβάλλουν στις φυσιολογικές προσαρμοστικές αποκρίσεις του οργανισμού κατά τη διάρκεια υποξίας. Συγκεκριμένα, είναι φορείς παραγόντων υπεύθυνων για την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (Nitric Oxide, NO), το οποίο οδηγεί σε χαλάρωση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων και αγγειοδιαστολή και συνεπώς σε βελτίωση της κυκλοφορίας του αίματος και της οξυγόνωσης των κυττάρων (Thangaraju et al., 2020).

## **4. Μικροκυστίδια Ερυθρών Αιμοσφαιρίων σε Παθολογικές Καταστάσεις**

### **4.1. Θρόμβωση, Φλεγμονή, Ομοιόσταση Μονοξειδίου του Αζώτου**

Εκτός από τη συμμετοχή τους σε φυσιολογικές διαδικασίες διατήρησης της ομοιόστασης του οργανισμού, τα μικροκυστίδια των ερυθροκυττάρων μετέχουν, επίσης, σε πολυάριθμες παθοφυσιολογικές διεργασίες.

Αρχικά, έναν από τους πιο καλά μελετημένους ρόλους τους, αποτελεί η προθρομβωτική δραστηριότητά τους. Αυξημένα επίπεδά τους στο πλάσμα έχουν συνδεθεί με δοσο- και χρονο- εξαρτώμενη αύξηση παραγωγής θρομβίνης καθώς και μείωση του χρόνου πήξης του αίματος, γεγονός που υποδεικνύει ότι ενισχύουν τη δημιουργία μιας κατάστασης υπερπηκτικότητας του αίματος (Kim et al., 2018). Η δράση τους αυτή οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία στην επιφάνειά τους αρνητικά

φορτισμένων φωσφολιπιδίων (κυρίως φωσφατιδυλοσερίνης), πάνω στα οποία συνδέονται κατιονικές περιοχές πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σύνθεση των συμπλεγμάτων τενάσης και προθρομβινάσης, τα οποία οδηγούν σε έκρηξη παραγωγής θρομβίνης (Zwaal et al., 1998) (Owens, III & Mackman, 2011). Στις πρωτεΐνες πήξης που περιέχουν τέτοιες κατιονικές περιοχές περιλαμβάνονται οι παράγοντες πήξης VIII, IX και X, και η προθρομβίνη (Atkins & Ganz, 1992) (Lim et al., 1977). Επιπροσθέτως, τα μικροκυστίδια των ερυθροκυττάρων πιθανόν προάγουν τον σχηματισμό θρόμβων εκθέτοντας στην επιφάνειά τους ιστικό παράγοντα (Tissue Factor), τον κύριο εκκινητή της πήξης (Nemerson, 1988) (Biró et al., 2003). Έχει, όμως, δειχθεί και έναρξη της πήξης, μέσω ενός μονοπατιού εξαρτώμενου από τον παράγοντα πήξης XII, χωρίς την παρουσία ιστικού παράγοντα (Van Der Meijden et al., 2012).

Επιπλέον, τα μικροκυστίδια των ερυθροκυττάρων ασκούν ανοσορρυθμιστική δράση στον οργανισμό. Αρχικά, αναφορικά με τη δράση τους στα ουδετερόφιλα, οι Zecher et al παρατήρησαν ότι σε φλεγμονώδεις καταστάσεις του οργανισμού (όπως συμβαίνει σε διάφορες ασθένειες, σε λοιμώξεις και στις αποθηκευμένες μονάδες αίματος) τα μικροκυστίδια των ερυθροκυττάρων ενισχύουν τόσο την κινητοποίηση και ανακατανομή ουδετερόφιλων από την κυκλοφορούσα στην περιθωριακή δεξαμενή, όσο και την εμφάνιση ουδετεροπενίας στην κυκλοφορία, καθώς επίσης προκαλούν αύξηση της συγκέντρωσης κυτοκινών<sup>5</sup> στον ορό του αίματος (2014). Υπέθεσαν ότι η δράση τους αυτή οφείλεται στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος, μέσω της παραγόμενης από αυτά θρομβίνης. Ακόμα, οι Cardo et al., πρότειναν ότι τα μικροκυστίδια των ερυθροκυττάρων συμβάλλουν στη διατήρηση των ουδετερόφιλων σε μια κατάσταση ετοιμότητας (priming) (Cardo et al., 2008). Η έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνειά τους τα καθιστά κατάλληλο υπόστρωμα για τη δράση της φωσφολιπάσης A2 (Fourcade et al., 1995), ένα ένζυμο με προφλεγμονώδη δράση, το οποίο υδρολύει φωσφολιπίδια της μεμβράνης σε αραχιδονικό οξύ και λυσοφωσφολιπίδια (Harris et al., 2001). Το μεν αραχιδονικό οξύ και οι μεταβολίτες του αποτελούν μεσολαβητές της φλεγμονής, τα δε λυσοφωσφολιπίδια έχουν δομή παρόμοια με τον παράγοντα

---

<sup>5</sup> Οι κυτοκίνες είναι μικρές πρωτεΐνες, οι οποίες εκκρίνονται από σχεδόν όλους τους τύπους κυττάρων και συμμετέχουν στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Η απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, οδηγεί στην ενεργοποίηση των κυττάρων της ανοσίας καθώς και στην επιπλέον παραγωγή και απελευθέρωση κυτοκινών (Scharper & Rose-John, 2015).

ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor-PAF) και είναι αυτά που κατά πάσα πιθανότητα ευθύνονται για το priming των ουδετερόφιλων. Η φωσφολιπάση A2 έχει δειχθεί ότι οδηγεί στη σύνθεση στην επιφάνεια των μικροκυστιδίων λυσοφωσφατιδικού οξέος (Lysophosphatidic Acid-LPA), ενός φωσφολιπιδίου με προφλεγμονώδεις ιδιότητες, όπως η παραγωγή κυτοκινών (Fang et al., 2004) (Cummings et al., 2004) (Ullmer et al., 2016). Τέλος, όπως απέδειξαν οι Belizaire et al. τα ουδετερόφιλα, υπό την επίδραση μικροκυστιδίων των ερυθροκυττάρων, επιδεικνύουν αυξημένη ικανότητα φαγοκυττάρωσης καθώς και παραγωγής υπεροξειδίου (2012). Όσον αφορά την επίδρασή τους σε άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, αποτελέσματα διαφόρων μελετών αποδεικνύουν την αύξηση παραγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών από μακροφάγα και μονοκύτταρα, μετά από έκθεσή τους σε μικροκυστίδια ερυθροκυττάρων, καθώς και αύξηση παραγωγής κυτταροτοξικών και βοηθητικών T λεμφοκυττάρων (Danesh et al., 2014) (Fischer et al., 2017).

Σημαντικός είναι ο ρόλος τους και στη διατήρηση της ομοιόστασης του Μονοξειδίου του Αζώτου (Nitric Oxide-NO). Το NO είναι ένα μόριο σηματοδότησης, το οποίο συμμετέχει σε πολυάριθμες φυσιολογικές διαδικασίες του οργανισμού και, μεταξύ άλλων, ρυθμίζει τον αγγειακό τόνο, εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών των αγγείων, καθώς επίσης αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Azuma et al., 1986) (Kiff et al., 1994) (Moncada & Higgs, 2006). Παρόλο που και το ίδιο αποτελεί ελεύθερη ρίζα, έχει εκλεκτική δραστικότητα και αντιδρά με άλλες ρίζες, όπως ο σίδηρος των ομάδων αίμης της αιμοσφαιρίνης και το ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^-$ ). Η οξυαιμοσφαιρίνη οξειδώνεται από το NO και παράγει μεθαιμοσφαιρίνη και νιτρικά (Hess et al., 1993) (Lee et al., 1995) (Lieberthal et al., 1987) (Yoshida et al., 1980) (Pietraforte et al., 1995) (Wennmalm et al., 1992). Παράλληλα, η δεοξυαιμοσφαιρίνη παρουσιάζει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με το NO, στο μόριο σιδήρου της αίμης, επηρεάζοντας τη βιοδιαθεσιμότητά του και συνεπώς επηρεάζοντας την ομοιόσταση του  $O_2$  και την αγγειορρύθμιση (Doherty et al., 1998). Τα μικροκυστίδια των ερυθρών αιμοσφαιρίων ενισχύουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών, οι οποίες δεσμεύουν το NO, διαταράσσοντας τη βιοδιαθεσιμότητά του και οδηγώντας σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (Poisson et al., 2020). Επιπλέον, όντας ουσιαστικά ασκοί πλήρεις αιμοσφαιρίνης, τα μικροκυστίδια δεσμεύουν και απενεργοποιούν το κυκλοφορούν NO, μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά του. Μάλιστα απενεργοποιούν το NO ταχύτερα σε

σχέση με τα ακέραια ερυθροκύτταρα (Donadee et al., 2011) (Liu et al., 2013). Επομένως, τα μικροκυστίδια των ερυθροκυττάρων δρουν αγγειοσυσταλτικά, αυξάνουν τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων και προκαλούν ενδοθηλιακή βλάβη.

Αυξομειώσεις στον αριθμό των παραγόμενων μικροκυστιδίων από ερυθροκύτταρα έχουν παρατηρηθεί σε αιματολογικά σύνδρομα, όπως οι κληρονομικές αιμολυτικές αναιμίες, ορισμένα μυελοδυσπλαστικά και μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα και η παροξυσμική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία, καθώς και μη αιματολογικά νοσήματα όπως η αθηροσκλήρωση, η καρδιαγγειακή νόσος, η νόσος Parkinson, το σύνδρομο αποφρακτικής άπνοιας στον ύπνο, η ελονοσία, το μεταβολικό σύνδρομο, το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και το σύνδρομο Scott.

## **4.2. Κληρονομικές Αιμολυτικές Αναιμίες**

Οι αιμολυτικές αναιμίες μη ανοσολογικής αρχής οφείλονται σε ενδογενείς διαταραχές του ερυθροκυττάρου, οι οποίες συνήθως εντοπίζονται σε γονίδια που κωδικοποιούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, κάποιο ένζυμο απαραίτητο για μεταβολικές αντιδράσεις του κυττάρου ή την αιμοσφαιρίνη (Dhaliwal et al., 2004). Έχει δειχθεί αύξηση του αριθμού των κυκλοφορούντων μικροκυστιδίων από ερυθροκύτταρα ασθενών οι οποίοι πάσχουν από κάποια από τις κληρονομικές αιμολυτικές αναιμίες (Barcellini et al., 2021). Ο φαινότυπος της εκάστοτε αιμολυτικής αναιμίας ποικίλει από την κλινικά ασυμπτωματικό νόσο έως την απειλητική για τη ζωή του ατόμου κατάσταση.

### **4.2.1. Κληρονομικές Μεμβρανοπάθειες**

Οι πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της μηχανικής σταθερότητας του κυττάρου, της ικανότητας παραμόρφωσής του καθώς και για τον βαθμό ενυδάτωσης του κυττάρου. Διαταραχές στην παραγωγή τους οδηγεί σε αστάθεια της κυτταρικής μεμβράνης του ερυθροκυττάρου, ακαμψία και ανώμαλη ενυδάτωσή του. Οι ανωτέρω διαταραχές έχουν συνήθως ως αποτέλεσμα μορφολογικές αλλαγές στα ερυθροκύτταρα, καθώς και μειωμένο χρόνο ζωής τους στην κυκλοφορία του αίματος (Wiley, 1970) (Li et al., 2018) (Thiagarajan et al., 2021).

## **Κληρονομική Σφαιροκυττάρωση**

Η Κληρονομική Σφαιροκυττάρωση είναι η πιο συχνά κληρονομούμενη αιμολυτική αναιμία με μία περίπτωση ανά 2000 άτομα, αν και πιθανότατα ο επιπολασμός της είναι ακόμα υψηλότερος, καθώς ήπιες μορφές της νόσου συνήθως μένουν αδιάγνωστες (Da Costa et al., 2013). Παρόλο που διαγιγνώσκεται συχνότερα στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική, έχουν αναφερθεί περιστατικά και σε άλλες ηπείρους. Περίπου το 75% των περιπτώσεων κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και οι υπόλοιπες συμβαίνουν λόγω αυτοσωμικού υπολειπόμενου γονιδίου ή τυχαίας μετάλλαξης (Agre et al., 1986) (Eber et al., 1996) (Miraglia del Giudice et al., 1998) (Rocha et al., 2005). Η ασθένεια προκύπτει από έλλειψη σε μία ή περισσότερες πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης, όπως η πρωτεΐνη ζώνης-3, η ανγκυρίνη, η α-σπεκτρίνη, η β-σπεκτρίνη και η πρωτεΐνη 4.2 (Agre et al., 1985) (Eber et al., 1996) (Miraglia del Giudice et al., 1996) (Jarolim et al., 1996) (Eber & Lux, 2004) (Mariani et al., 2008).

Το αίμα ασθενών με σφαιροκυττάρωση περιέχει υψηλότερα επίπεδα κυκλοφορούντων μικροκυστιδίων παραγόμενων από ερυθροκύτταρα σε σύγκριση με το αίμα υγιών ατόμων (Mullier et al., 2012). Έλλειψη των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών δημιουργεί ασταθείς περιοχές της μεμβράνης, οι οποίες δεν υποστηρίζονται από τον υποκείμενο κυτταροσκελετό, οδηγώντας σε μικροκυστιδιοποίηση (Li et al., 2018). Επίσης, έλλειψη σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως η πρωτεΐνη ζώνης-3, πλήττει την ακεραιότητα της μεμβράνης και οδηγεί επίσης σε μικροκυστιδιοποίηση (Peters et al., 1996). Απώλεια κυτταρικής μεμβράνης κατ' αυτόν τον τρόπο έχει σαν συνέπεια τη σφαιροποίηση του κυττάρου, λόγω αδυναμίας διατήρησης του φυσιολογικού δισκοειδούς σχήματος. Τα σφαιροκύτταρα παγιδεύονται επιλεκτικά, καταστρέφονται και απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος κατά τη διέλευσή τους από τον σπλήνα, ο ρόλος του οποίου είναι καθοριστικός για την κλινική εκδήλωση της νόσου (Bolton-Maggs et al., 2012). Η καταστροφή αυτή είναι και το αίτιο της αναιμίας και της σπληνομεγαλίας στους πάσχοντες από σφαιροκυττάρωση.

Έχει δειχθεί ότι η σύνθεση των μικροκυστιδίων ποικίλει ανάλογα με το υποκείμενο μοριακό έλλειμμα. Συγκεκριμένα, μικροκυστίδια που γεννώνται από σφαιροκύτταρα με ανεπάρκεια σπεκτρίνης/ανγκυρίνης φέρουν στην επιφάνειά τους μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών ζώνης-3. Αντίθετα, σφαιροκύτταρα με ανεπάρκεια σε πρωτεΐνη ζώνης-3, διατηρούν στη μεμβράνη τους τον μικρό αριθμό που καταφέρνουν να

παράξουν (Reliene et al., 2002). Στην ίδια μελέτη αποδείχθηκε επιπρόσθετα ότι η παραπάνω διαφορά σύστασης έχει αντίκτυπο και στη βιωσιμότητα του μητρικού σφαιροκυττάρου· η απώλεια πρωτεϊνών ζώνης-3 από τα σφαιροκύτταρα με ανεπάρκεια σπεκτρίνης-αγκυρίνης, έχει ως απόρροια ελαττωμένη σύνδεση των φυσικών ανοσοσφαιρινών έναντι των πρωτεϊνών της ζώνης-3 και άρα μειωμένη οψωνινοποίηση και καταστροφή τους, μια διαδικασία την οποία υφίστανται, αντίθετα, τα σφαιροκύτταρα με ανεπάρκεια πρωτεϊνής ζώνης-3, που διατηρούν στην κυτταρική τους μεμβράνη τις πρωτεΐνες τούτες (Reinhardt et al., 2001) (Li et al., 2018).

### **Κληρονομική Ελλειπτοκυττάρωση**

Η κληρονομική ελλειπτοκυττάρωση (Hereditary Elliptocytosis-HE) είναι μια ακόμη ετερογενής ομάδα κληρονομικών διαταραχών της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων, που μεταδίδονται με αυτοσωματικό επικρατή τρόπο, με εξαίρεση την πυροποικιλοκυττάρωση (HPP), μια σοβαρή μορφή ελλειπτοκυττάρωσης, η οποία γενικά μεταδίδεται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο (Hunter & Adams, 1929) (Hunter, 1932) (Lecomte et al., 1987). Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου ποικίλουν από την ασυμπτωματική νόσο έως την απειλητική για τη ζωή αναιμία (Silveira et al., 1997). Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου είναι η απώλεια της μηχανικής σταθερότητας της μεμβράνης των RBC λόγω διαταραχών στις πρωτεΐνες της μεμβράνης που διατηρούν τους πλευρικούς δεσμούς μεταξύ των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού των ερυθροκυττάρων (Da Costa et al., 2013). Οι διαταραχές αυτές περιλαμβάνουν ποιοτικά ή/και ποσοτικά ελλείμματα στις πρωτεΐνες α-σπεκτρίνη, β-σπεκτρίνη και πρωτεΐνη 4.1 (Conboy et al., 1986) (Gallagher et al., 1992) (Miraglia del Giudice et al., 1992) (Glele-Kakai et al., 1996). Ανάλυση του πρωτεοσώματος των ερυθροκυττάρων των ασθενών αποκάλυψε ότι η βασική διαταραχή είναι η αδυναμία των διμερών σπεκτρίνης να συνδεθούν μεταξύ τους σε τετραμερή σπεκτρίνης, δηλαδή στο βασικό δομικό υλικό του κυτταροσκελετού. Στα φυσιολογικά άτομα το ποσοστό των διμερών σπεκτρίνης στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι μικρότερο του 5%. Στους πάσχοντες από ελλειπτοκυττάρωση ή πυροποικιλοκυττάρωση το ποσοστό αυτό μπορεί να φτάνει το 60-80%, γεγονός που συνδέεται με σοβαρή κλινική εκδήλωση της νόσου (Lecomte et al., 1987) (Lecomte et al., 1993) (Silveira et al., 1997) (Tse & Lux, 1999). Επιπροσθέτως, η μεγάλη παρουσία διμερών συχνά συνυπάρχει με κάποιου βαθμού έλλειψη σπεκτρίνης

(Hanspal et al., 1993). Ως αποτέλεσμα των παραπάνω τα ερυθροκύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στη δράση δυνάμεων διάτμησης με επακόλουθη απώλεια μεμβράνης μέσω μικροκυστιδιοποίησης (Alaarg et al., 2013) και προσδευτική αλλαγή στο σχήμα του ερυθροκυττάρου από δισκοειδές σε ελλειπτικό. Τα ελλειπτοκύτταρα, όπως και τα σφαιροκύτταρα έχουν μειωμένο χρόνο ζωής, καθώς παγιδεύονται και καταστρέφονται στον σπλήνα (Li et al., 2018).

### **Κληρονομική Στοματοκυττάρωση**

Η κληρονομική στοματοκυττάρωση περιλαμβάνει μία ομάδα συνδρόμων κληρονομούμενων κατά αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, στα οποία η κυτταρική μεμβράνη παρουσιάζει «διαρροή» μονοσθενών ιόντων νατρίου ( $\text{Na}^+$ ) και καλίου ( $\text{K}^+$ ) (Stewart & Turner, 1999). Σε επιχρίσματα περιφερικού αίματος ασθενών, τα ερυθροκύτταρα υιοθετούν σχήμα στόματος. Η διαρροή κατιόντων τροποποιεί την οσμωτική πίεση που ασκείται κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης και επηρεάζει τον όγκο του ερυθροκυττάρου και την ικανότητα παραμόρφωσής του. Αυτές οι αλλαγές οδηγούν σε μείωση της διάρκειας ζωής του κυττάρου και αυξάνουν την παγίδευση και καταστροφή στον σπλήνα (Da Costa et al., 2013). Απαντώνται δύο κύριες κατηγορίες κληρονομικής σφαιροκυττάρωσης, η υπερενυδατωμένη (Overhydrated Hereditary Stomatocytosis-OHSt) και η αφυδατωμένη μορφή (Dehydrated Hereditary Stomatocytosis- DHSt) ή Ξεροκυττάρωση (Delaunay, 2004). Στην OHSt, τα ερυθροκύτταρα διαθέτουν μειωμένες ποσότητες στοματίνης σε σχέση με τα φυσιολογικά. Οι Wilkinson et.al. έδειξαν ότι διαταραχές στη σύνδεση ακτίνης-στοματίνης μπορεί να επηρεάσουν την κατακόρυφη σύνδεση μεταξύ κυτταροσκελετού και διπλοστοιβάδας φωσφολιπιδίων και άρα την μικροκυστιδιοποίηση (2008). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, απέδειξαν ότι μετά από έκθεση OHSt-ερυθροκυττάρων με έλλειψη στοματίνης σε ασβέστιο, ακολουθεί διαταραχή της μικροκυστιδιοποίησης και συγκεκριμένα τα παραγόμενα μικροκυστίδια διαφέρουν σε σχήμα, μέγεθος, αριθμό και σύνθεση σε σχέση με αυτά των φυσιολογικών ερυθροκυττάρων. Όσον αφορά την DHSt, οι Snyder et al. έδειξαν ότι ο βαθμός της αύξησης της μικροκυστιδιοποίησης συνδέεται με το προσδόκιμο ζωής των ερυθροκυττάρων· η Ξεροκύττωση με ήπια αναιμία και μέση επιβίωση των ερυθροκυττάρων τις 15,5 ημέρες παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση

κυκλοφορούντων μικροκυστιδίων, ενώ αντίθετα, ασθενείς με το μικρότερο χρόνο ζωής ερυθροκυττάρων, διαθέτουν και τη μικρότερη ποσότητα μικροκυστιδίων (1978).

#### **4.2.2. Κληρονομικές Ενζυμοπάθειες**

Τα ερυθροκύτταρα κυκλοφορούν στο αίμα για περίπου 120 ημέρες, χωρίς πυρήνα και μιτοχόνδρια. Φέρουν τα συστατικά που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία και την επιβίωσή τους ήδη από τη στιγμή που φτάνουν σε ηλικία ώριμου κυττάρου. Συνεπώς, είναι ικανά για την εκτέλεση περιορισμένης μεταβολικής δραστηριότητας, μέσω της οποίας καταφέρνουν να διατηρούν το δισκοειδές σχήμα, την ελαστικότητά τους, καθώς επίσης τα διάφορα ένζυμα και την αιμοσφαιρίνη που περιέχουν, στην ενεργή, ανηγμένη τους μορφή, επιτελώντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη βασική λειτουργία τους, δηλαδή την οξυγόνωση των ιστών. Οι δύο κύριες μεταβολικές οδοί του ερυθροκυττάρου είναι η οδός Embden-Meyerhof (Embden Meyerhof Pathway-EMP) και ο κύκλος των εξοζών (Hexose Monophosphate Shunt- HMS) (van Wijk & van Solinge, 2005).

Καθώς το ερυθροκύτταρο δεν διαθέτει μιτοχόνδρια, δεν είναι σε θέση να παράξει ενέργεια μέσω αερόβιας γλυκόλυσης, οπότε καταφεύγει στο αναερόβιο γλυκολυτικό μονοπάτι Embden-Meyerhof, μέσω του οποίου το 90% της ενδοκυτταρικής γλυκόζης μεταβολίζεται σε γαλακτικό οξύ και τριφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine Triphosphate-ATP). Το παραγόμενο ATP είναι ζωτικής σημασίας για τις βιολογικές λειτουργίες του ερυθροκυττάρου, καθώς και για τη διατήρηση της δομής του. Αρχικά, είναι απαραίτητο για τη λειτουργία των ενζύμων που διατηρούν τη φωσφολιπιδική ασυμμετρία της κυτταρικής μεμβράνης, και συνεπώς για τη διατήρηση του φυσιολογικού σχήματος του κυττάρου (βλ. Παράγραφο 1.3) Επίσης, το ATP είναι σημαντικό για τη φυσιολογική πραγματοποίηση αντιδράσεων των κινασών, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού και επομένως για τη διατήρηση της ακεραιότητας και της ικανότητας παραμόρφωσης του ερυθροκυττάρου (Betz et al., 2009) (Alaarg et al., 2013). Εκτός από τη δημιουργία ATP, η οδός Embden-Meyerhof παράγει την ανηγμένη μορφή του νικοτιναμιδο-αδενινοδινουκλεοτιδίου (NADH), ενός μορίου απαραίτητου για τη μετατροπή της μεθαιμοσφαιρίνης σε αιμοσφαιρίνη<sup>6</sup>. Μια διακλάδωση εντός της οδού γλυκόλυσης,

---

<sup>6</sup> Δηλαδή τη μορφή που μπορεί να δεσμεύει οξυγόνο.



γνωστή ως η παράκαμψη Rapoport-Luebering, είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό του 2,3-διφωσφογλυκερικού (2,3-BPG), ενός σημαντικού συμπαράγοντα για τη ρύθμιση της συγγένειας της αιμοσφαιρίνης με το O<sup>2</sup> για τη βέλτιστη παροχή O<sup>2</sup> στους ιστούς (Benesch & Benesch, 1967) (Benesch et al., 1969) (van Wijk & van Solinge, 2005).

Τα ερυθροκύτταρα καταναλώνουν το υπόλοιπο 10% της ενδοκυτταρικής γλυκόζης μέσω του κύκλου των εξοζών. Ο κύριος ρόλος της μεταβολικής αυτής οδού είναι η παραγωγή της ανηγμένης μορφής του φωσφορικού νικοτιναμιδο-αδενινουκλεοτιδίου (NADPH). Το ερυθροκυτταρικό NADPH μετατρέπει την οξειδωμένη γλουταθειόνη στην ανηγμένη της μορφή, η οποία αποτελεί το κύριο αντιοξειδωτικό ένζυμο του κυττάρου, μειώνοντας τις επιπτώσεις των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα λιπίδια και τις πρωτεΐνες του κυττάρου (Deneke & Fanburg, 1989) (Dumaswala et al., 2000) (Alaarg et al., 2013). Κατ' αυτόν τον τρόπο η γλουταθειόνη την αιμοσφαιρίνη του ερυθροκυττάρου από την οξειδωτική βλάβη, διατηρώντας την στην ενεργή της μορφή (Harley, 1965).

Είναι πολυάριθμα τα ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στις παραπάνω μεταβολικές οδούς και έλλειψή τους έχει καταστροφικές συνέπειες στη λειτουργία του ερυθροκυττάρου. Η επικρατέστερη κληρονομική ενζυμοπάθεια προκύπτει από την ανεπάρκεια αφυδρογονάσης της 6-Φωσφορικής Γλυκόζης (G6PD).

### **Ανεπάρκεια Αφυδρογονάσης της 6-Φωσφορικής Γλυκόζης (G6PD)**

Η G6PD είναι ένζυμο που ελέγχει τον κύκλο των εξοζών. Καταλύει την πρώτη αντίδραση της οδού, η οποία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση υψηλών επιπέδων NADPH στο ερυθροκύτταρο, άρα και γλουταθειόνης (Alaarg et al., 2013). Η ανεπάρκεια G6PD είναι η πιο συχνή ενζυμοπάθεια παγκοσμίως (Frank, 2005). Αποτελεί φυλοσύνδετη γενετική ασθένεια, που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη G6PD, με αποτέλεσμα παραλλαγές πρωτεΐνης με διαφορετικά επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας, που σχετίζονται με ένα ευρύ φάσμα βιοχημικών και κλινικών φαινοτύπων. Άτομα που πάσχουν από την ασθένεια, έχουν συνεπώς χαμηλά επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης και είναι πιο ευαίσθητα στην καταστροφική δράση των συσσωρευμένων ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Cappellini & Fiorelli, 2008). Συνεπεία της οξειδωτικής βλάβης σε ασθενείς με ανεπάρκεια G6PD, έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη όπως οξείδωση και συσσωμάτωση πρωτεϊνών, δημιουργία αιμοχρωμάτων και

σύνδεσή τους στο εσωτερικό της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας, όπως επίσης και αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης (Turrini et al., 1985) (Caprari et al., 1991) (Johnson et al., 1994) (Beutler, 2008). Η αυξημένη ευαισθησία των ερυθροκυττάρων σε οξειδωτικές βλάβες οδηγούν σε μικροκυστιδιοποίηση (Pantaleo et al., 2011) και μάλιστα έχει δειχθεί ότι οι πάσχοντες από την ενζυμοπάθεια έχουν αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων μικροκυστιδίων παραγόμενα από ερυθροκύτταρα σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα, καθώς και ότι η συγκέντρωση των μικροκυστιδίων πιθανότατα συσχετίζεται αρνητικά με τη δραστηριότητα της G6PD (Nantakomol et al., 2012).

#### **4.2.3. Κληρονομικές Αιμοσφαιρινοπάθειες**

Οι κληρονομικές αιμοσφαιρινοπάθειες είναι ασθένειες οι οποίες προκύπτουν από ποσοτικά είτε ποιοτικά διαταραγμένη παραγωγή αιμοσφαιρίνης. Οι ποιοτικές διαταραχές οφείλονται στην παραγωγή μιας δομικά τροποποιημένης μορφής αιμοσφαιρίνης, η οποία παρουσιάζει ανώμαλες φυσικές και χημικές ιδιότητες. Παράδειγμα μιας τέτοιας ποιοτικής διαταραχής αποτελεί η δρεπανοκυτταρική αναιμία. Αντίθετα, οι ποσοτικές αιμοσφαιρινοπάθειες, όπως η α- και η β- θαλασσαιμία, οφείλονται σε μειωμένη παραγωγή καθόλα φυσιολογικών μορφών αιμοσφαιρίνης (Alaarg et al., 2013). Τόσο στη δρεπανοκυτταρική αναιμία, όσο και στη θαλασσαιμία έχει δειχθεί αύξηση της συγκέντρωσης, στο αίμα των ασθενών, μικροκυστιδίων από ερυθροκύτταρα (Westerman et al., 2008). Η αύξηση αυτή συχνά συνοδεύεται από μείωση της ικανότητας παραμόρφωσης των ερυθροκυττάρων και αιμόλυση, τα οποία αποτελούν παράγοντες κινδύνου για εκδήλωση θρομβώσεων (Leal et al., 2018).

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία αποτελεί μία διαταραχή του αίματος, κληρονομούμενη κατά αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο, η οποία οφείλεται σε σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-σφαιρίνη. Η μετάλλαξη αυτή οδηγεί στην παραγωγή μιας παθολογικής μορφής αιμοσφαιρίνης (Sickle Hemoglobin-HbS). Σε καταστάσεις υποξίας, η HbS πολυμερίζεται και αποκτά μορφή γέλης, με μεγάλο ιξώδες (Steinberg et al., 2018). Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που περιέχουν την πολυμερισμένη HbS, χάνουν το φυσιολογικό σχήμα αμφίκουλου δίσκου που τα καθιστά ικανά να διέρχονται των τριχοειδών αγγείων. Αντίθετα, υιοθετούν το δύσκαμπτο και ακανόνιστο σχήμα δρεπανιού, γεγονός που συχνά οδηγεί σε έμφραξη αγγείων και συνεπώς σε αδυναμία οξυγόνωσης ιστών (Wang & Zennadi, 2021). Κυριότερα

συμπτώματα της ασθένειας αποτελούν η αιμολυτική αναιμία, οι επαναλαμβανόμενες επώδυνες κρίσεις, οι χρόνιες βλάβες οργάνων όπως ο νεφρός και ο σπλήνας και το μειωμένο προσδόκιμο ζωής (Dong et al., 1992) (Lu et al., 2016). Το οξειδωτικό stress που ασκείται στα ερυθροκύτταρα είναι αυξημένο στην δρεπανοκυτταρική αναιμία και αυξάνεται επιπλέον κατά τις επώδυνες αγγειοεμφρακτικές κρίσεις (Hierso et al., 2017). Το οξειδωτικό stress οδηγεί σε μικροκυστιδιοποίηση των δρεπανοκυττάρων, πρώτον, μέσω της δράσης των αιμοχρωμάτων στην πρωτεΐνη ζώνης-3 (βλ. Παράγραφο 3.2.1.) της κυτταρικής μεμβράνης (Westerman et al., 2008) (Mannu et al., 1995), δεύτερον, μέσω διαταραχών της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης  $Ca^{2+}$  (βλ. Παράγραφο 3.3.2.) και τρίτον, οξειδώνοντας κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες όπως η σπεκτρίνη, η ακτίνη και η πρωτεΐνη 4.1, διαριγνύοντας κατ'αυτόν τον τρόπο τη σύνδεση κυτταροσκελετού-κυτταρικής μεμβράνης (Schwartz et al., 1987) (Mokken et al., 1992). Επιπροσθέτως, σε μικροκυστιδιοποίηση οδηγούν και οι επαναλαμβανόμενες μεταμορφώσεις του σχήματος του ερυθροκυττάρου, από δρεπανοκύτταρο υπό κατάσταση υποξίας σε φυσιολογικό αμφίκυκλο δίσκο και αντίστροφα (Allan et al., 1982).

Τα παραγόμενα μικροκυστίδια συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της νόσου μέσω ποικίλων μηχανισμών. Αρχικά, έχειδειχθεί ότι η περιεχόμενη σε αυτά αιμοσφαιρίνη μπορεί να δεσμεύει μονοξειδίο του αζώτου (Donadee et al., 2011), οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τα μικροκυστίδια αποτελούν μέρος του μηχανισμού που παρεμβαίνει στην ομαλή λειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων κατά την ασθένεια (βλ. Παράγραφο 4.1). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι τα μικροκυστίδια είναι ικανά να μεταφέρουν αίμη στα ενδοθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες και απόπτωσή τους, καθώς και σε αγγειαπόφραξη (Camus et al., 2015). Ακόμα, αρκετές είναι οι μελέτες που συνδέουν την αυξημένη παρουσία μικροκυστιδίων στο αίμα ασθενών με την κατάσταση υπερπηκτικότητας και τη θρομβογένεση (Shet et al., 2003) (van Beers et al., 2009) (Gerotziapas et al., 2012).

### **4.3. Μυελοδυσπλαστικά και Μυελοϋπερπλαστικά Νοσήματα**

Αρκετές είναι οι μελέτες της τελευταίας δεκαετίας οι οποίες συσχετίζουν την αύξηση ή μείωση της συγκέντρωσης των κυκλοφορούντων μικροκυστιδίων από ερυθροκύτταρα με

ορισμένα μυελοδυσπλαστικά και μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, ή αποδεικνύουν τη συμμετοχή τους στην παθοφυσιολογία των παραπάνω.

Για παράδειγμα, οι Enjeti et al. έδειξαν ότι σε σχέση με τα υγιή άτομα, ασθενείς με μυελοδυσπλασία παρουσιάζουν μειωμένες συγκεντρώσεις των κυκλοφορούντων μικροκυστιδίων από ερυθροκύτταρα, τα οποία μετέφερον σημαντικά διαφορετικό φορτίο miRNA και διαθέτουν ελαττωμένη αιμοστατική ικανότητα (2019). Η Μυελοδυσπλασία (ή Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο) χαρακτηρίζεται από διαταραχές στην αιμοποίηση, μειωμένο αριθμό ερυθροκυττάρων, λευκοκυττάρων και θρομβοκυττάρων (Montalban-Bravo & Garcia-Manero, 2018) και αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας (Enjeti et al., 2019). Από την άλλη μεριά, οι Fernández Bello et al. παρατήρησαν αυξημένο αριθμό μικροκυστιδίων ερυθροκυττάρων σε ασθενείς με μυελοδυσπλασία και μάλιστα υπέθεσαν ότι τα μικροκυστίδια των ερυθροκυττάρων προστατεύουν τους ασθενείς με θρομβοκυτταροπενία από την εκδήλωση αιμορραγιών, ασκώντας αιμοστατική δράση μέσω της φωσφατιδυλοσερίνης που εκθέτουν στην επιφάνειά τους (2018).

Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί αυξημένος αριθμός μικροκυστιδίων ερυθροκυττάρων στο αίμα ατόμων που πάσχουν από BCR/ABL-αρνητικά Μυελοϋπερπλαστικά Νοσήματα, καθώς και αυξημένη προθρομβωτική δράση τους (Aswad et al., 2019). Οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι η προθρομβωτική αυτή δράση συμμετέχει στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου, στο οποίο επικρατεί αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης θρομβώσεων. Επιπλέον, οι Poisson et al. υπέθεσαν τη συμβολή των μικροκυστιδίων παραγόμενων από ερυθροκύτταρα στην παθοφυσιολογία του JAK2<sup>V617F</sup> Μυελοϋπερπλαστικού Συνδρόμου (2020). Στο σύνδρομο αυτό μία από τις κύριες αιτίες θανάτου των ασθενών είναι τα αρτηριακά καρδιαγγειακά συμβάντα (Marchioli et al., 2005) και κυρίως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, ενώ σαν μηχανισμός πρόκλησής τους έχει προταθεί η τοπική εμφάνιση έντονης αγγειοσύσπασης (Davies, 2000). Οι ερευνητές απέδειξαν ότι τα μικροκυστίδια των JAK2<sup>V617F</sup>-ερυθροκυττάρων παράγουν υπερπολλαπλάσιες ποσότητες ελεύθερων ριζών οξυγόνου σε σύγκριση με φυσιολογικά άτομα, οδηγώντας σε μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του Νιτρικού Οξειδίου και αγγειοσύσπαση. Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί ότι μια μελέτη απέδειξε την αύξηση του αριθμού των μικροκυστιδίων από ερυθροκύτταρα ποντικών με πολλαπλό μύελωμα (Benameur et al., 2013).

#### **4.4. Παροξυσμική Νυκτερινή Αιμοσφαιρινουρία**

Η Παροξυσμική Νυκτερινή Αιμοσφαιρινουρία (Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria-PNH) είναι μία διαταραχή των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, η οποία εκδηλώνεται με αιμολυτική αναιμία, θρόμβωση και ανεπάρκεια του μυελού των οστών, με τη θρομβοεμβολή να αναγνωρίζεται ως η πιο συχνή αιτία θανάτου (Socié et al., 1996) (Nishimura et al., 2004). Προκαλείται από μια μετάλλαξη που οδηγεί σε έλλειψη των συνδεδεμένων με γλυκοφωσφατιδιδυλοϊνοσιτόλη (Glycophosphatidylinositol-GPI) πρωτεϊνών (GPI-anchored proteins), CD55(Complement Decay Accelerator Factor ή DAF) και CD59 (Kinoshita et al., 1995), οι οποίες φυσιολογικά δρουν σαν αναστολείς του συμπληρώματος και προστατεύουν το ερυθροκύτταρο από λύση. Κατά συνέπεια, απουσία της προστατευτικής δράσης των παραπάνω πρωτεϊνών προκαλείται διαμεσολαβούμενη από το συμπλήρωμα αιμόλυση και αιμοσφαιρινουρία (Rosse, 1990) (Nishimura et al., 2004). Οι GPI-anchored proteins εμπλέκονται στο σχηματισμό λιπιδικών σχεδίων (Sargiacomo et al., 1993) (Danielsen, 1995) (βλ. Παράγραφο 1.3) και η απουσία τους σχετίζεται πιθανότατα με την απελευθέρωση σχετικά υψηλών αριθμών μικροκυστιδίων με προθρομβωτικές ιδιότητες (εξωτερικευμένη φωσφατιδυλοσερίνη) από ερυθροκύτταρα ασθενών με PNH (Hugel et al., 1999) (Kozuma et al., 2011) (Devalet et al., 2014) (Leal et al., 2018). Επίσης, έχει προταθεί η συμβολή των μικροκυστιδίων αυτών στη θρομβογένεση και την υπερπηκτικότητα του αίματος σε κρίσεις PNH (Ninomiya et al., 1999) (Kozuma et al., 2011).

#### **4.5. Αθηροσκλήρωση**

Η Αθηροσκλήρωση είναι μία χρόνια φλεγμονώδης νόσος των αρτηριών και το υποκείμενο αίτιο περίπου του 50% των θανάτων στον Δυτικό Κόσμο. Αποτελεί μία ενεργό φλεγμονώδη διαδικασία η οποία ξεκινάει με τη συσσώρευση χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών και υπολείμματα λιποπρωτεϊνικών σωμάτων σε εστιακές περιοχές των αρτηριών και ιδιαίτερα σε περιοχές με στροβιλώδη ροή σε σημεία καμπής των αρτηριών. Οι αρχικές λιπώδεις γραμμώσεις δύναται να εξελιχθούν, με την πάροδο του χρόνου και με την επίδραση αιμοδυναμικών συνιστωσών (υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, κάπνισμα) σε ινώδεις πλάκες και τέλος σε πολύπλοκες αθηροσκληρωτικές βλάβες με υψηλό κίνδυνο ρήξης. Η ρήξη του θρόμβου, μπορεί να οδηγήσει σε έμφρακτο του

μυοκαρδίου και εγκεφαλικό. Επίσης, η επέκταση της βλάβης στο εσωτερικό του αγγείου δημιουργεί στενώση ή/και έμφραξη του και προκαλεί οξεία ή χρόνια οργανική ισχαιμία (Ross & Harker, 1976) (Stary et al., 1995) (van Diepen et al., 2013) (Abedinzadeh et al., 2015).

Η παραγωγή θρομβίνης έχει αναφερθεί πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια σχηματισμού του αθηρώματος καθώς και στην εξέλιξη της βλάβης, την αποσταθεροποίηση και ρήξη της (Hatton et al., 1989) (Barry et al., 1996) (Coughlin, 2005) (Badimon & Vilahur, 2014). Η αθηροσκλήρωση θεωρείται το αποτέλεσμα φλεγμονικών και ανοσολογικών απαντήσεων στη συσσώρευση λιποπρωτεϊνών και λιπιδίων στο αρτηριακό τοίχωμα. Η διαταραχές προσκόλλησης έχουν, επίσης, ιδιαίτερη σημασία στην παθογένεση της νόσου (Pant et al., 2014).

Έχει δειχθεί αυξημένη συγκέντρωση μικροκυστιδίων παραγόμενων από ερυθροκύτταρα σε αθηρωματικές πλάκες (Leroyer et al., 2007) (Mayr et al., 2009), όπου ασκούν παθοφυσιολογικό ρόλο έχοντας προθρομβωτικές, ανοσορρυθμιστικές και προφλεγμονώδεις ιδιότητες. Συγκεκριμένα, και όσον αφορά τον προθρομβωτικό τους ρόλο, πέραν των όσων αναφέρθηκαν στην παράγραφο 4.1., τα μικροκυτίδια από ερυθροκύτταρα σε αθηρωματικές πλάκες επιδεικνύουν παραγωγή θρομβίνης κατά πολύ υψηλότερη σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μικροκυτίδια μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων (Leroyer et al., 2007). Επίσης, όταν επέρχεται ρήξη του αθηρώματος, τα μικροκυτίδια αντιδρούν με παράγοντες πήξης, οδηγώντας στην παραγωγή θρομβίνης (Amabile et al., 2005). Σχετικά με τον προφλεγμονώδη ρόλο τους, συμπληρωματικά σε όσα έχουν ήδη αναφερθεί στην παράγραφο 4.1., έχει αποδειχθεί ότι εκκρίνουν κυτοκίνες μετά την αλληλεπίδρασή τους με αιμοπετάλια (Xiong et al., 2011) και ενισχύουν την έκκριση παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor-TNF) (Canault et al., 2006) (Canault et al., 2007). Τέλος, εμπλεκόμενα στην ομοίωση του NO οδηγούν σε διαταραχές του τόνου των αγγείων (βλ. παράγραφο 4.1).

#### **4.6.Καρδιαγγειακές Διαταραχές**

Αυξημένες ποσότητες μικροκυστιδίων παραγόμενων από ερυθροκύτταρα έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με καρδιαγγειακές διαταραχές. Αρχικά, σε δύο πρόσφατες μελέτες παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα μικροκυστιδίων παραγόμενα από

ερυθροκύτταρα σε ασθενείς με έμφραγμα μυοκαρδίου με ανάσπαση ST (STEMI) και η παρουσία τους συσχετίστηκε, μάλιστα, με δυσμενή έκβαση της ασθένειας (Giannopoulos et al., 2014) (Li et al., 2016). Επίσης, αρκετές μελέτες απέδειξαν παρουσία υψηλών επιπέδων τους σε περιφερικό αίμα ασθενών μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (Matsuda et al., 2003) (Yuan et al., 2020), στηθάγχη (Mallat et al., 2000) (Amabile et al., 2012), αλλά και σε άτομα που υποβλήθηκαν σε καρδιοπνευμονική παράκαμψη (bypass) (Nieuwland et al., 1997).

#### **4.7. Νόσος Parkinson**

Η Νόσος Parkinson είναι μια νευροεκφυλιστική ασθένεια του κεντρικού νευρικού συστήματος, η οποία χαρακτηρίζεται από συμπτώματα κινητικά (τρόμο, ακαμψία, βραδυκινησία και δυσχέρεια στη βάδιση) και μη (Fahn, 2003). Το κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό της είναι η συσσώρευση μιας αδιάλυτης πρωτεΐνης, της α-συνουκλεΐνης, σε αποθηκευτικά σωμάτια γνωστά ως σώματα Lewy. Έχει αποδειχθεί ότι μικροκυτίδια παραγόμενα από ερυθροκύτταρα περιέχουν υψηλότερα επίπεδα α-συνουκλεΐνης σε σχέση με υγιή άτομα (Matsumoto et al., 2017) (Lamontagne-Proulx et al., 2019). Επιπλέον, τα μικροκυτίδια είναι ικανά να διέρχονται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σε πειραματικά μοντέλα με ποντίκια και φτάνοντας στον εγκέφαλο να προάγουν την παραγωγή συσσωματωμάτων α-συνουκλεΐνης (Stuendl et al., 2016) (Sheng et al., 2020). Τέλος, η συγκέντρωσή τους στα αστροκύτταρα, διαταράσσει την πρόσληψη γλουταμικού (Sheng et al., 2020), η ομοίωσή του οποίου είναι ιδιαίτερης σημασίας για την παθοφυσιολογία της ασθένειας (Butchbach, 2004) (Holmera et al., 2005).

#### **4.8 Μόλυνση με *Plasmodium falciparum***

Έχει δειχθεί ότι σε ασθενείς μολυσμένους με *P. Falciparum*, τα ερυθροκύτταρα, τόσο τα μολυσμένα με το παράσιτο, όσο και τα υγιή, υφίστανται αυξημένο οξειδωτικό stress (Huber et al., 2002) (Omodeo-Salè et al., 2003) (Yazar et al., 2004) (Percário et al., 2012), με αυξημένη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών της ζώνης-3 (Pantaleo et al., 2010) και κατά συνέπεια αυξημένη μικροκυστιδιοποίηση (Nantakomol et al., 2011) (Sahu et al., 2013). Μάλιστα, ο αριθμός τους είναι ανάλογος με τη σοβαρότητα της νόσου (Nantakomol et al., 2011). Οι Mantel et al. απέδειξαν ότι τα μικροκυτίδια από

μολυσμένα ερυθροκύτταρα περιέχουν αντιγόνα των παρασίτων παρουσιάζουν ισχυρές προφλεγμονώδεις ιδιότητες, καθώς μετά από φαγοκυττάρωσή τους, προάγουν την απελευθέρωση κυταροκινών από μακροφάγα και μονοκύτταρα και επιπλέον προάγουν τη μετανάστευση ουδετερόφιλων (Mantel et al., 2013). Ένας ακόμα παθοφυσιολογικός τους ρόλος κατά τη μόλυνση με *P.falciparum* είναι η πρόκληση δυσλειτουργίας στο ενδοθήλιο των αγγείων, μέσω μεταφοράς συμπλεγμάτων miRNA και τροποποίησης της έκφρασης γονιδίων των κυττάρων στόχων (Mantel et al., 2016). Στον αντίποδα των παραπάνω δράσεων, έχει δειχθεί ότι τα μικροκυστίδια μολυσμένων ερυθροκυττάρων εισερχόμενα στα παράσιτα και τροποποιώντας την έκφραση γονιδίων, μειώνουν την παραγωγή σημαντικών αντιγόνων του, χαρίζοντας στον οργανισμό έμφυτη αντίσταση στη λοίμωξη (Wang et al., 2017).

#### **4.9 Άλλα Νοσήματα**

Αύξηση στη συγκέντρωση μικροκυστιδίων παραγόμενα από ερυθροκύτταρα έχει παρατηρηθεί και στο αίμα ασθενών με μεταβολικό σύνδρομο (Helal et al., 2011), μίας νόσου η οποία χαρακτηρίζεται από ήπιες μεταβολικές διαταραχές, όπως η κοιλιακή παχυσαρκία, η ινσουλινική αντίσταση, η υπερλιπιδαιμία, η μειωμένη HDL χοληστερόλη και η υπέρταση (Swarup et al., 2022).

Έχει αναφερθεί, επίσης, αύξηση της μικροκυστιδιοποίησης από ερυθροκύτταρα ασθενών με σύνδρομο αποφρακτικής άπνοιας στον ύπνο (Obstructive Sleep Apnea-OSA), καθώς και εμπλοκή τους στην παθοφυσιολογία της ασθένειας. Η OSA είναι μία διαταραχή του ύπνου, η οποία χαρακτηρίζεται από επεισόδια μερικής ή ολικής απόφραξης του αεραγωγού, με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαλείπουσας υποξίας (Dewan et al., 2015). Η υποξία αυτή οδηγεί σε παραγωγή ROS, οι οποίες μέσω του μηχανισμού αύξησης της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης  $Ca^{2+}$ , καθώς και της επίδρασης τους στη συσσωμάτωση πρωτεϊνών ζώνης-3 οδηγούν σε μικροκυστιδιοποίηση (Khalifa & Sanz-Rubio, 2021). Οι ασθενείς με OSA πάσχουν σε μεγάλο ποσοστό από υπέρταση, και η διαταραγμένη λειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων είναι μία από τις κύριες αιτίες της (Brooks et al., 1997) (Nieto et al., 2000) (Farooqui et al., 2017). Τα μικροκυστίδια των ερυθροκυττάρων πιθανότατα οδηγούν σε υπέρταση και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, διαταράσσοντας το ένζυμο Ενδοθηλιακή Συνθάση του Νιτρικού Οξειδίου



(Endothelial nitric oxide synthase- eNOS) (Peng et al., 2021) και κατά συνέπεια διαταράσσοντας την ομοίωση του NO.

Το Αιμολυτικό Ουραιμικό Σύνδρομο (Hemolytic Uremic Syndrome-HUS) που ακολουθεί λοίμωξη του οργανισμού προκαλούμενη από την τοξίνη Shiga (Shiga Toxin-Stx) του *Escherichia Coli* (Stx-Producing *E.Coli*), είναι ένα ακόμα σύνδρομο το οποίο έχει συνδεθεί με αύξηση της συγκέντρωσης των μικροκυστιδίων από ερυθροκύτταρα (Arvidsson et al., 2015). Το HUS χαρακτηρίζεται από την ταυτόχρονη εμφάνιση μη αυτοάνοσης αιμολυτικής αναιμίας, θρομβοκυτταροπενίας και οξείας νεφρικής ανεπάρκειας. Τα μικροκυτίδια που απελευθερώνονται από ερυθροκύτταρα μετά από μόλυνση με Stx-Producing *E.Coli* ασκούν παθολογικό δράση μέσω δύο μηχανισμών. Αφενός έχει αποδειχθεί ότι μεταφέρουν Stx στα ενδοθηλιακά κύτταρα των νεφρών νεκρώνοντάς τα (Ståhl et al., 2015) και αφετέρου ότι εναποτίθενται στην επιφάνειά τους τα συστατικά C3 και C9 του συμπληρώματος, οπότε προκαλούν διαμεσολαβούμενη μέσω συμπληρώματος αιμόλυση στον ασθενή (Arvidsson et al., 2015).

Διαταραγμένη είναι η μικροκυστιδιοποίηση και σε ερυθροκύτταρα ασθενών με Σύνδρομο Scott, μία σπάνια γενετική αιμορραγική διαταραχή στην οποία παρατηρείται μειωμένη έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων του αίματος (Rosing et al., 1985) (Toti et al., 1996), και άρα αδυναμία απώλειας της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας, η οποία φυσιολογικά αποτελεί απαραίτητο βήμα του μηχανισμού της μικροκυστιδιοποίησης (βλ. Παράγραφο 3.2). Το παραπάνω γεγονός είναι συμβατό με την παρατηρούμενη μείωση της μικροκυστιδιοποίησης, καθώς και με τη μειωμένη δράση του συμπλέγματος της προθρομβινάσης<sup>7</sup> στην επιφάνεια τόσο των ερυθροκυττάρων, όσο και των μικροκυστιδίων τους, η οποία συνδέεται με απώλεια της αιμοστατικής τους δράσης (Rosing et al., 1985) (Bervers et al., 1992) (Munnix et al., 2003).

---

<sup>7</sup> Όπως προεκτέθηκε στην Παράγραφο 4.1, η φωσφατιδυλοσερίνη αποτελεί σημείο στο οποίο συντίθεται το σύμπλεγμα της προθρομβινάσης.

## 5. Συμπεράσματα

Από τη θεώρησή τους ως κυτταρικά «σκουπίδια» στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, τα εξωκυττάρια κυστίδια και συγκεκριμένα τα μικροκυστίδια των ερυθρών αιμοσφαιρίων, μέσα σε λίγες δεκαετίες αναδείχθηκαν σε συστατικά στοιχεία του μηχανισμού ομοιόστασης του κυττάρου, τα οποία αποτρέπουν την πρόωρη απομάκρυνσή του και εξασφαλίζουν την ομαλή γήρανση και ωρίμανσή του. Επιπλέον, διαθέτοντας ανοσορρυθμιστικές, προθρομβωτικές, αγγειορρυθμιστικές και προφλεγμονώδεις ιδιότητες αποτελούν όλο και συχνότερα αντικείμενο μελέτης της επιστημονικής κοινότητας. Είναι αποδεδειγμένη, πλέον, η εμπλοκή τους στην παθογένεση όχι μόνο ασθενειών του αίματος, αλλά και πολυάριθμων συστηματικών νοσημάτων, και ως εκ τούτου στο μέλλον πιθανότατα θα αναδειχθούν σε πολύτιμο διαγνωστικό εργαλείο. Για την πιο εκτενή μελέτη και μελλοντική εκμετάλλευσή τους στη διάγνωση είναι αναγκαίο να υπερκεραστούν οι δυσκολίες που αντιμετωπίζουν οι σύγχρονοι ερευνητές στην απομόνωση των μικροκυστιδίων από το σύνολο του «εξωκυττάριου κυστιδιακού διαμερίσματος του οργανισμού».

## Αναφορές

- Abedinzadeh, N. et al., 2015. A histopathological analysis of the epidemiology of coronary atherosclerosis: an autopsy study. *Diagnostic Pathology*, 10, p.87.
- Abugo, O.O. & Rifkind, J.M., 1994. Oxidation of hemoglobin and the enhancement produced by nitroblue tetrazolium. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(40), pp.24845-53.
- Adewoyin, A.S., Adeyemi, O., Davies, N.O. & Ogbenna, A.A., 2019. Erythrocyte Morphology and Its. In *Erythrocyte*. London: IntachOpen. p.176.
- Agre, P., Asimos, A., Casella, J.F. & McMillan, C., 1986. Inheritance pattern and clinical response to splenectomy as a reflection of erythrocyte spectrin deficiency in hereditary spherocytosis. *The New England Journal of Medicine*, 315(25), pp.1579-83.
- Agre, P. et al., 1985. Partial deficiency of erythrocyte spectrin in hereditary spherocytosis. *Nature*, 314(6009), pp.380-83.
- Akers, C. et al., 2013. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*, 113(1), pp.1-11.
- Alaarg, A., Schiffelers, R.M., van Solinge, W.W. & van Wijk, , 2013. Red blood cell vesiculation in hereditary hemolytic anemia. *Frontiers in Physiology*, 4.
- Allan, D., Limbrick, A.R., Thomas, P. & Westerman, M.P., 1982. Release of spectrin-free spicules on reoxygenation of sickled erythrocytes. *Nature*, 295, p.612–613.
- Allan, D. & Michell, R., 1975. Accumulation of 1,2-diacylglycerol in the plasma membrane may lead to echinocyte transformation of erythrocytes. *Nature*, 258(5533), pp.348-49.
- Allan, D. & Michell, R., 1975. Elevation of Intracellular Calcium Ion Concentration Provokes Production of 1,2-Diacylglycerol and Phosphatidate in Human Erythrocytes. *Biochemical Society Transactions*, 3(5), p.751–752.
- Amabile, N. et al., 2012. Increased levels of circulating endothelial microparticles and erythrocytes degradation products in microvascular angina. *European Heart Journal*, 33, p.26.
- Amabile, N. et al., 2005. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(11), pp.3381-88.
- Antonelou, M.H., Kriebardis, A.G. & Papassideri, I.S., 2010. Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood Transfusion*, 3, pp.39-47.
- Antonelou, M.H. & Seghatchian, , 2016. Update on extracellular vesicles inside red blood cell storage units: Adjust the sails closer to the new wind. *Transfusion and Apheresis Science*, 55(1), pp.92-104.

- Arese, P., Turrini, & Schwarzer, , 2005. Band 3/Complement-mediated Recognition and Removal of Normally Senescent and Pathological Human Erythrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 16, pp.133-46.
- Arraud, N. et al., 2014. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12, p.614–627.
- Arvidsson, I. et al., 2015. Shiga Toxin-Induced Complement-Mediated Hemolysis and Release of Complement-Coated Red Blood Cell-Derived Microvesicles in Hemolytic Uremic Syndrome. *Journal of Immunology*, 194(5), pp.2309-18.
- Aswad, M.H. et al., 2019. High Level of Circulating Microparticles in Patients with BCR/ABL Negative Myeloproliferative Neoplasm - a Pilot Study. *Klinicka Onkologie*, 32(2), pp.109-16.
- Atkins, J.S. & Ganz, P.R., 1992. The association of human coagulation factors VIII, IXa and X with phospholipid vwsicles involves both electrostatic and hydrophobic interactions. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 112(1).
- Auer, J., 1933. The structure and function of filaments produced by living red corpuscles. *The American Journal of the Medical Sciences*, 186(6), p.12.
- Azouzi, S. et al., 2018. Band 3 phosphorylation induces irreversible alterations of stored red blood cells. *American Journal of Hematology*, 93(5), pp.110-12.
- Azuma, H., Ishikawa, M. & Sekizazi, S., 1986. *British Journal of Pharmacology*, 88, pp.411-15.
- Badimon, L. & Vilahur, G., 2014. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *Journal of Internal Medicine*, 276(6), pp.618-32.
- Barcellini, W. et al., 2021. Circulating extracellular vesicles and cytokines in congenital and acquired hemolytic anemias. *American Journal of Hematology*, 96(4), pp.129-32.
- Barodka, V.M. et al., 2014. New insights provided by a comparison of impaired deformability with erythrocyte oxidative stress for sickle cell disease. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 52(4), pp.230-35.
- Barry, W.L. et al., 1996. Arterial thrombin activity after angioplasty in an atherosclerotic rabbit model: time course and effect of hirudin. *Circulation*, 94(1), pp.88-93.
- Basse, F., Stout, J.G., Sims, P.J. & Wiedmer, , 1996. Isolation of an Erythrocyte Membrane Protein that Mediates Ca<sup>2+</sup>- dependent Transbilayer Movement of Phospholipid. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(29), p.17205–17210.
- Bastos-Amador, P. et al., 2012. Proteomic analysis of microvesicles from plasma of healthy donors reveals high individual variability. *Journal of Proteomics*, 75(12), pp.3574-84.

- Bebelman, M.P., Smit, M.J., Pegtel, D.M. & Baglio, S.R., 2018. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 188, pp.1-11.
- Becker, P.S., Morrow, J.S. & Lux, S.E., 1987. Abnormal oxidant sensitivity and beta-chain structure of spectrin in hereditary spherocytosis associated with defective spectrin-protein 4.1 binding. *Journal of Clinical Investigation*, 80(2), pp.557-65.
- Belizaire, R.M. et al., 2012. Microparticles from Stored Red Blood Cells Activate Neutrophils and Cause Lung Injury after Hemorrhage and Resuscitation. *Journal of the American College of Surgeons*, 214(4), pp.648-55.
- Benameur, T. et al., 2013. Plasma cells release membrane microparticles in a mouse model of multiple myeloma. *Micron*, 54-55, pp.75-81.
- Benesch, R. & Benesch, R.E., 1967. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 26(2), pp.162-67.
- Benesch, R.E., Benesch, R. & Yu, C.I., 1969. The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic strength, and hemoglobin concentration. *Biochemistry*, 8(6), pp.2567-71.
- Berckmans, R.J. et al., 2001. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thrombosis and Haemostasis*, 85(4), pp.639-46.
- Betz, T., Lenz, M., Joanny, J.-F. & Sykes, , 2009. ATP-dependent mechanics of red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), p.15320–15325.
- Beutler, E., 2008. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood*, 111, p.16–24.
- Bevers, E.M. et al., 1992. Defective Ca<sup>2+</sup>-Induced Microvesiculation and Deficient Expression of Procoagulant Activity in Erythrocytes From a Patient With a Bleeding Disorder: A Study of the Red Blood Cells of Scott Syndrome. *Blood*, 79(2), pp.380-88.
- Bianconi, E. et al., 2013. An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Biology*, 40(6), pp.463-71.
- Biró, E. et al., 2003. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(12), pp.2561-68.
- Bobrowska-Hägerstrand, M., Hägerstrand, & Iglic, , 1998. Membrane skeleton and red blood cell vesiculation at low pH. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1371(1), pp.123-28.
- Bolton-Maggs, P.H.B. et al., 2012. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis--2011 update. *British Journal of Hematology*, 156(1), pp.37-49.
- Bosman, G.J.C.G.M. et al., 2008. The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions. *Transfusion*, 48(5), pp.827-35.

- Bosman, G.J.C.G.M. et al., 2012. The proteome of erythrocyte-derived microparticles from plasma: new clues for erythrocyte aging and vesiculation. *Journal Proteomics*, 76, pp.203-10.
- Bosman, G.J.C.G.M. et al., 2010. Comparative proteomics of erythrocyte aging in vivo and in vitro. *Journal of Proteomics*, 73(3), pp.396-402.
- Brooks, D. et al., 1997. Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(1), p.106–109.
- Butchbach, M.E.R., 2004. Association of Excitatory Amino Acid Transporters, Especially EAAT2, with Cholesterol-rich Lipid Raft Microdomains. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), pp.34388-96.
- Camus, S.M. et al., 2015. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. *Blood*, 125(24), p.3805–3814.
- Canault, M. et al., 2007. Microparticles of Human Atherosclerotic Plaques Enhance the Shedding of the Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme/ADAM17 Substrates, Tumor Necrosis Factor and Tumor Necrosis Factor Receptor-1. *The American Journal of Pathology*, 171(5), pp.1713-23.
- Canault, M. et al., 2006. The TNF alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) is expressed in the atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice: Possible contribution to elevated plasma levels of soluble TNF alpha receptors. *Atherosclerosis*, 187(1), pp.82-91.
- Cappellini, M.D. & Fiorelli, G., 2008. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*, 371, p.64–74.
- Caprari, P. et al., 1991. Membrane alterations in G6PD- and PK-deficient erythrocytes exposed to oxidizing agents. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 45(1), pp.16-27.
- Caprari, P. et al., 1995. Junctional sites of erythrocyte skeletal proteins are specific targets of tert-butylhydroperoxide oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, pp.243-58.
- Cardo, L.J., Wilder, & Salata, , 2008. Neutrophil priming, caused by cell membranes and microvesicles in packed red blood cell units, is abrogated by leukocyte depletion at collection. *Transfusion and Apheresis Science*, 38(2), pp.117-25.
- Chargaff, E. & West, R., 1946. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *The Journal of biological chemistry*, 166 1, pp.189-97.
- Chiangjong, W., Netsirisawan, , Hongeng, & Chutipongtanate, , 2021. Red Blood Cell Extracellular Vesicle-Based Drug Delivery: Challenges and Opportunities. *Frontiers in Medicine*, 8.

- Chung, S.-M. et al., 2007. Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 27(2), pp.414-21.
- Cocucci, E. & Meldolesi, J., 2015. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular. *Trends in Cell Biology*, 25(6), pp.364-72.
- Cocucci, E., Racchetti, G. & Meldolesi, J., 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in Cell Biology*, 19(2), pp.43-51.
- Comfurius, P., Bevers, E.M. & Zwaal, R.F.A., 1989. Interaction between phosphatidylserine and the isolated cytoskeleton of human blood platelets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 983(1989), p.212-216.
- Conboy, J., Mohandas, N., Tchernia, G. & Kan, Y.W., 1986. Molecular basis of hereditary elliptocytosis due to protein 4.1 deficiency. *New England Journal of Medicine*, 315(11), pp.680-85.
- Connor, J., Pak, C.H., Zwaal, R.F. & Schroit, A.J., 1992. Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *Journal of Biological Chemistry*, 267(27), pp.19412-17.
- Cortese-Krott, M.M. & Kelm, , 2014. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: Key to a new erythrocrine function? *Redox Biology*, 2, pp.251-58.
- Coughlin, S.R., 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8), pp.1800-14.
- Cummings, R. et al., 2004. Protein kinase C $\delta$  mediates lysophosphatidic acid-induced NF- $\kappa$ B activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), pp.41085-94.
- Da Costa, L., Galimand, , Fenneteau, & Mohandas, , 2013. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Reviews*, 27(4), pp.167-78.
- D'Alessandro, A. et al., 2013. Red blood cell subpopulations in freshly drawn blood: application of proteomics and metabolomics to a decades-long biological issue. *Blood Transfusion*, 11(1), pp.75-87.
- Danesh, A. et al., 2014. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro. *Blood*, 123(5), pp.687-96.
- Danielsen, E.M., 1995. A transferrin-like GPI-linked iron-binding protein in detergent-insoluble noncaveolar microdomains at the apical surface of fetal intestinal epithelial cells. *Biochemistry*, 34, p.1596-1605.
- Davies, M.J., 2000. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart*, 83(3), p.361-366.

- de Jong, K., Rettig, M.P., Low, P.S. & Kuypers, F.A., 2002. Protein Kinase C Activation Induces Phosphatidylserine Exposure on Red Blood Cells. *Biochemistry*, 41, pp.12562-67.
- de Vooght, K.M.K. et al., 2013. Extracellular vesicles in the circulation: are erythrocyte microvesicles a confounder in the plasma haemoglobin assay? *Biochemical Society Transactions*, 41(1), pp.288-92.
- Deatherage, L. & Cookson, T., 2012. Membrane vesicle release in Bacteria, Eukaryotes and Archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infection and Immunity*, 80(6), p.1948–1957.
- Delaunay, J., 2004. The hereditary stomatocytoses: genetic disorders of the red cell membrane permeability to monovalent cations. *Seminars in Hematology*, 41(2), pp.165-72.
- Deneke, S.M. & Fanburg, B.L., 1989. Regulation of cellular glutathione. *The American Journal of Physiology*, 257(4 Pt 1), pp.163-73.
- Devalet, B. et al., 2014. The central role of extracellular vesicles in the mechanisms of thrombosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a review. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3.
- Dewan, N.A., Nieto, F.J. & Somers, V.K., 2015. Intermittent Hypoxemia and OSA. *Chest*, 147(1), p.266–274.
- Dhaliwal, G., Cornett, P.A. & Tierney Jr, L.M., 2004. Hemolytic Anemia. *American Family Physician*, 69(11), pp.2599-606.
- Diez-Silva, M. et al., 2010. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bulletin*, 35, p.382–388.
- Doherty, D.H., Doyle, M.P. & Curry, S.R., 1998. Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nature Biotechnology*, 16(7), pp.672-76.
- Donadee, C. et al., 2011. Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation*, 124(4), pp.465-76.
- Dong, C., Chadwick, R.S. & Schechter, A.N., 1992. Influence of sickle hemoglobin polymerization and membrane properties on deformability of sickle erythrocytes in the microcirculation. *Biophysical Journal*, 63(3), pp.774-83.
- Dumaswala, U.J. et al., 2000. Glutathione loading prevents free radical injury in red blood cells after storage. *Free Radical Research*, 33(5), pp.517-29.
- Eber, S.W. et al., 1996. Ankyrin-1 mutations are a major cause of dominant and recessive hereditary spherocytosis. *Nature Genetics*, 13(2), pp.214-18.
- Eber, S.W. & Lux, S.E., 2004. Hereditary spherocytosis--defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. *Seminars in Hematology*, 41(2), pp.118-41.



- Enjeti, A.K. et al., 2019. Circulating microvesicles are less procoagulant and carry different miRNA cargo in myelodysplasia. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 74, pp.37-43.
- Esmon, C.T. & Owen, W.G., 1981. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(4), pp.2249-52.
- Fahn, S., 2003. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991, pp.1-14.
- Fang, X. et al., 2004. Mechanisms for lysophosphatidic acid-induced cytokine production in ovarian cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), pp.9653-61.
- Farooqui, F.A. et al., 2017. Endothelial function and carotid intima media thickness in obstructive sleep apnea without comorbidity. *Sleep and Breathing*, 21(1), pp.69-76.
- Fernandez Arias, & Fernandez Arias, , 2017. How do red blood cells know when to die? *Royal Society Open Science*, 4(4).
- Fernández Bello, I. et al., 2018. Factors Involved in Maintaining Haemostasis in Patients with Myelodysplastic Syndrome. *Thrombosis and Hemostasis*, 118(4), pp.734-44.
- Ferru, E. et al., 2011. Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood*, 117(22), pp.5998-6006.
- Fibach, E. & Rachmilewitz, E., 2008. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. *Current Molecular Medicine*, 8(7), pp.609-19.
- Fischer, D. et al., 2017. Microparticles from stored red blood cells enhance procoagulant and proinflammatory activity. *Transfusion*, 57(11), pp.2701-11.
- Fourcade, O. et al., 1995. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell*, 80(6), pp.919-27.
- Frank, J.E., 2005. Diagnosis and Management of G6PD Deficiency. *American Family Physician*, 72(7), pp.1277-82.
- Gallagher, P.G. et al., 1992. A common type of the spectrin alpha I 46-50a-kD peptide abnormality in hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis is associated with a mutation distant from the proteolytic cleavage site. Evidence for the functional importance of the triple helical. *Journal Of Clinical Investigation*, 89(3), pp.892-98.
- Gedde, M.M., Yang, E. & Huestis, W.H., 1995. Shape response of human erythrocytes to altered cell pH. *Blood*, 86(4), pp.1595-99.
- Gerotziafas, G.T. et al., 2012. The acceleration of the propagation phase of thrombin generation in patients with steady-state sickle cell disease is associated with circulating erythrocyte-derived microparticles. *Thrombosis and Haemostasis*, 107(6), pp.1044-52.

- Ghoti, H. et al., 2011. Oxidative stress contributes to hemolysis in patients with hereditary spherocytosis and can be ameliorated by fermented papaya preparation. *Annals of Hematology*, 90(5), pp.509-13.
- Giannopoulos, G. et al., 2014. Red blood cell and platelet microparticles in myocardial infarction patients treated with primary angioplasty. *International Journal of Cardiology*, 176(1), pp.145-50.
- Glele-Kakai, C. et al., 1996. Epidemiological studies of spectrin mutations related to hereditary elliptocytosis and spectrin polymorphisms in Benin. *British Journal of Hematology*, 95(1), pp.57-66.
- Gonzales, et al., 1984. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Research*, 44(9), pp.4137-9.
- Guinto, E.R. & Esmon, C.T., 1984. Loss of prothrombin and of factor Xa-factor Va interactions upon inactivation of factor Va by activated protein C. *Journal of Biological Chemistry*, 259(22), pp.13986-92.
- Gwozdziński, K., Peniażek, A. & Gwozdziński, , 2021. Reactive Oxygen Species and Their Involvement in Red Blood Cell Damage in Chronic Kidney Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021.
- György, B. et al., 2011. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, p.2667–2688.
- Haest, C.W.M., 2003. Distribution and Movement of Membrane Lipids. In *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp.1-25.
- Hamilton, A.J., 2010. MicroRNA in erythrocytes. *Biochemical Society Transactions*, 38(1), pp.229-31.
- Hankins, H.M., Baldrige, R.D., Xu, & Graham, T.R., 2015. Role of Flippases, Scramblases and Transfer Proteins in Phosphatidylserine Subcellular Distribution. *Traffic*, 16(1), pp.35-47.
- Hanspal, M. et al., 1993. Molecular Basis of Spectrin Deficiency in Hereditary Pyropoikilocytosis. *Blood*, 82(5), pp.1652-60.
- Haram, S., Carderò, , Seaman, & Piomelli, , 1991. The Mechanism of Decline of Age-Dependent Enzymes in the Red Blood Cell. *Enzyme*, 45, pp.47-53.
- Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P., 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, 97(2), pp.329-39.
- Harley, J.D., 1965. Role of Reduced Glutathione in Human Erythrocytes. *Nature*, 206, p.1054–1055.

- Harris, F.M., Smith, S.K. & Bell, J.D., 2001. Physical Properties of Erythrocyte Ghosts That Determine Susceptibility to Secretory Phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), pp.22722-31.
- Hatton, M.W., Moar, S.L. & Richardson, M., 1989. Deendothelialization in vivo initiates a thrombogenic reaction at the rabbit aorta surface. Correlation of uptake of fibrinogen and antithrombin III with thrombin generation by the exposed subendothelium. *The American Journal of Pathology*, 135(3), pp.499-508.
- Helal, O. et al., 2011. Increased levels of microparticles originating from endothelial cells, platelets and erythrocytes in subjects with metabolic syndrome: relationship with oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21(9), pp.665-71.
- Hess, J.R., Macdonald, V.W. & Brinkley, W.W., 1993. Systemic and Pulmonary Hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. *Journal Of Applied Physiology*, 74, pp.1769-78.
- Hierso, R. et al., 2017. Exacerbation of oxidative stress during sickle vaso-occlusive crisis is associated with decreased anti-band 3 autoantibodies rate and increased red blood cell-derived microparticle level: a prospective study. *British Journal of Haematology*, 176(5), pp.805-13.
- Holder, E.G., 1899. Blood dust or blood granules: a new constituent of the blood? *Lancet*, 154, p.1015.
- Huang, H. et al., 2019. MicroRNA Profiling of Exosomes Derived from Red Blood Cell Units: Implications in Transfusion-Related Immunomodulation. *BioMed Research International*, (2045915).
- Huber, S.M. et al., 2002. Plasmodium falciparum activates endogenous Cl<sup>-</sup> channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *The EMBO Journal*, 21(1-2), pp.22-30.
- Hugel, B. et al., 1999. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood*, 93(10), pp.3451-56.
- Hunter, W.C., 1932. Further study of a white family showing elliptical erythrocytes. *Annals of Internal Medicine*, 6, pp.775-81.
- Hunter, W.C. & Adams, R.B., 1929. Hematologic Study of Three Generations of a White Family Showing Elliptical Erythrocytes. *Annals of Internal Medicine*, 2(11), p.1162.
- Iglic, A., Hägerstrand, , Kralj-Iglic, & Bobrowska-Hägerstrand, , 1998. A possible physical mechanism of red blood cell vesiculation obtained by incubation at high pH. *Journal of biomechanics*, 31(2), pp.151-56.
- Ihara, T. et al., 1998. The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. *Virchows Archiv*, 433(5), pp.443-47.

- Inal, J.M. et al., 2013. Blood/plasma secretome and microvesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834(11), pp.2317-25.
- Jarolim, P. et al., 1996. Characterization of 13 novel band 3 gene defects in hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. *Blood*, 88(11), pp.4366-74.
- Johansen, M.E., Bidot, , Horstman, L.L. & Ahn, Y.S., 2013. Red cell-derived microparticles (RMP) as haemostatic agent. *Thrombosis and Haemostasis*, 110(4), pp.751-60.
- Johnson, R.M., Ravindranath, Y., el-Alfy, M. & Goyett, G.J., 1994. Oxidant damage to erythrocyte membrane in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: correlation with in vivo reduced glutathione concentration and membrane protein oxidation. *Blood*, 83(4), p.1117–1123.
- Johnstone, R.M. et al., 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The journal of Biological Chemistry*, 262(19), pp.9412-20.
- Kaestner, L. et al., 2012. Lysophosphatidic acid induced red blood cell aggregation in vitro. *Bioelectrochemistry*, 87, pp.89-95.
- Kalra, H., Drummen, G.P.C. & Mathivanan, , 2016. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), p.170.
- Karpman, D. et al., 2015. Complement Interactions with Blood Cells, Endothelial Cells and Microvesicles in Thrombotic and Inflammatory Conditions. In *Immune Responses to Biosurfaces*. Springer, Cham. pp.19-42.
- Kern, L., Abdeen, S.K., Kolodziejczyk, A.A. & Elinav, , 2021. Commensal inter-bacterial interactions shaping the microbiota. *Current Opinion in Microbiology*, 63, pp.158-71.
- Khalyfa, A. & Sanz-Rubio, , 2021. The Mystery of Red Blood Cells Extracellular Vesicles in Sleep Apnea with Metabolic Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), p.4301.
- Khalyfa, & Sanz-Rubio, , 2021. The Mystery of Red Blood Cells Extracellular Vesicles in Sleep Apnea with Metabolic Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), p.4301.
- Kiff, R.J., Moss, D.W. & Moncada, , 1994. Effect of nitric oxide gas on the generation of nitric oxide by isolated blood vessels: implications for inhalation therapy. *British Journal of Pharmacology*, 113(2), pp.496-98.
- Kim, Y. et al., 2018. Microparticles from stored red blood cells promote a hypercoagulable state in a murine model of transfusion. *Surgery*, 163(2), pp.423-29.
- Kinoshita, T., Inoue, N. & Takeda, J., 1995. Defective glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Advances in Immunology*, 60, pp.57-103.

- Klinken, S.P., 2002. Cells in focus: Red blood cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34, p.1513–1518.
- Koshiar, R.L., Somajo, , Norström, & Dahlbäck, , 2014. Erythrocyte-Derived Microparticles Supporting Activated Protein C-Mediated Regulation of Blood Coagulation. *PLoS One*, 9(8), p.e104200.
- Kostova, E.B. et al., 2015. Identification of signalling cascades involved in red blood cell shrinkage and vesiculation. *Bioscience Report*, 35(2 (00187)).
- Kozuma, Y. et al., 2011. Procoagulant properties of microparticles released from red blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British Journal of Hematology*, 152(5), pp.631-39.
- Kriebardis, A., Antonelou, M., Stamoulis, K. & Papassideri, , 2012. Cell-derived microparticles in stored blood products: innocent-bystanders or effective mediators of post-transfusion reactions? *Blood Transfusion*, 10(2), p.25–38.
- Kuipers, M.E., Hokke, C.H., Smits, H.H. & Nolte-'t Hoen, E.N.M., 2018. Pathogen-Derived Extracellular Vesicle-Associated Molecules That Affect the Host Immune System: An Overview. *Frontiers in Microbiology*, 9, p.2182.
- Kulandavelu, S., Balkan, & Hare, J.M., 2015. Regulation of oxygen delivery to the body via hypoxic vasodilation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, p.6254–6255.
- Lamontagne-Proulx, J. et al., 2019. Portrait of blood-derived extracellular vesicles in patients with Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 124, pp.163-75.
- Lane, P.A., O'Connell, J.L. & Marlar, R.A., 1994. Erythrocyte membrane vesicles and irreversibly sickled cells bind protein S. *American Journal of Hematology*, 47(4), pp.295-300.
- Lang, F. et al., 2006. Mechanisms and Significance of Eryptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(7-8), pp.1183-92.
- Lang, F. et al., 2003. Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte. *Pflügers Archiv: European journal of Physiology*, 447, pp.121-25.
- Lang, F. & Quadri, S.M., 2012. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purification*, 33(1-3), pp.125-30.
- Leal, K.F., Adjobo-Hermans, J.W. & Bosman, J.C.G.M., 2018. Red Blood Cell Homeostasis: Mechanisms and Effects of Microvesicle Generation in Health and Disease. *Frontiers in Physiology*, 9(703).
- Lecomte, M.C. et al., 1987. Hereditary pyropoikilocytosis and elliptocytosis in a Caucasian family. Transmission of the same molecular defect in spectrin through three generations with different clinical expression. *Human Genetics*, 77(4), pp.329-34.

- Lecomte, M.C. et al., 1993. Molecular basis of clinical and morphological heterogeneity in hereditary elliptocytosis (HE) with spectrin alpha I variants. *British Journal of Haematology*, 85(3), pp.584-95.
- Lee, R., Neya, K., Svizzero, T.A. & Vlahakes, G.J., 1995. Limitations of the efficacy of hemoglobin-based oxygen-carrying solutions. *Journal of Applied Physiology*, 79, pp.236-42.
- Leroyer, A.S. et al., 2007. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(7), pp.772-77.
- Lieberthal, W. et al., 1987. Hemodynamic effects of different preparations of stroma free hemolysates in the isolated perfused rat kidney. *Life Sciences*, 41(23), pp.2525-33.
- Li, H. et al., 2018. Mechanics of diseased red blood cells in human spleen and consequences for hereditary blood disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(38), pp.9574-79.
- Li, H. & Lykotrafitis, , 2014. Erythrocyte Membrane Model with Explicit Description of the Lipid Bilayer and the Spectrin Network. *Biophysical Journal*, 107, p.642–653.
- Lim, T.K., Bloomfield, V.A. & Nelsestuen, G.L., 1977. Structure of the prothrombin- and blood clotting factor X-membrane complexes. *Biochemistry*, 16(19), pp.4177-81.
- Liu, C. et al., 2013. Nitric oxide scavenging by red cell microparticles. *Free Radical Biology & Medicine*, 65, pp.1164-73.
- Li, K.-Y., Zheng, , Wang, & Hu, Y.-W., 2016. Characteristics of erythrocyte-derived microvesicles and its relation with atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 255, pp.140-44.
- Lutz, H.U., Barber, & McGuire, R.F., 1976. Glycoprotein-enriched vesicles from sheep erythrocyte ghosts obtained by spontaneous vesiculation. *The journal of biological Chemistry*, 251(11), pp.3500-10.
- Lu, X., Wood, D.K. & Higgins, J.M., 2016. Deoxygenation Reduces Sickle Cell Blood Flow at Arterial Oxygen Tension. *Biophysical Journal*, 110(12), pp.2751-58.
- Lux IV, S.E., 2016. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood*, 127(2), p.187–199.
- Mallat, Z. et al., 2000. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 101(8), pp.841-43.
- Mannu, F. et al., 1995. Role of hemichrome binding to erythrocyte membrane in the generation of band-3 alterations in beta-thalassemia intermedia erythrocytes. *Blood*, 86(5), pp.2014-20.

- Mantel, P.-Y. et al., 2016. Infected erythrocyte-derived extracellular vesicles alter vascular function via regulatory Ago2-miRNA complexes in malaria. *Nature Communications*, 7, p.12727.
- Mantel, P.-Y. et al., 2013. Malaria-Infected Erythrocyte-Derived Microvesicles Mediate Cellular Communication within the Parasite Population and with the Host Immune System. *Cell Host and Microbe*, 13(5), pp.521-34.
- Marchioli, R. et al., 2005. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *Journal of Clinical Oncology*, 23(10), pp.2224-32.
- Marengo-Rowe, A.J., 2006. Structure-function relations of human hemoglobins. *Proceedings (Baylor University Medical Center)*, 19(3), p.239–245.
- Margetis, P. et al., 2007. Physiologically important secondary modifications of red cell membrane in hereditary spherocytosis-evidence for in vivo oxidation and lipid rafts protein variations. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 38(3), pp.210-20.
- Mariani, M. et al., 2008. Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect. *Haematologica*, 93(9), pp.1310-17.
- Matsuda, R. et al., 2003. ReClinical significance of measurement of plasma annexin V concentration of patients in the emergency room. *Resuscitation*, 57(2), pp.171-77.
- Matsumoto, J. et al., 2017. Transmission of  $\alpha$ -synuclein-containing erythrocyte-derived extracellular vesicles across the blood-brain barrier via adsorptive mediated transcytosis: another mechanism for initiation and progression of Parkinson's disease? *Acta Neuropathologica Communications*, 5(1), p.71.
- Mayr, M. et al., 2009. Proteomics, metabolomics, and immunomics on microparticles derived from human atherosclerotic plaques. *Circulation. Cardiovascular Genetics*, 2(4), pp.379-88.
- Miraglia del Giudice, E. et al., 1992.  $\alpha$ /65 Hereditary elliptocytosis in Southern Italy: Evidence for an African origin. *Human Genetics*, 89, p.553–556.
- Miraglia del Giudice, E.M. et al., 1998. High frequency of de novo mutations in ankyrin gene (ANK1) in children with hereditary spherocytosis. *The Journal Of Pediatrics*, 132(1), pp.117-20.
- Miraglia del Giudice, E.M. et al., 1996. Ankyrin Napoli: a de novo deletional frameshift mutation in exon 16 of ankyrin gene (ANK1) associated with spherocytosis. *British Journal of Hematology*, 93(4), pp.828-34.
- Mohanty, J.G., Nagababu, & Rifkind, J.M., 2014. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in Physiology*, 5.
- Mokken, F.C. et al., 1992. The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorrheological parameter. *Annals of Haematology*, 64(3), pp.113-22.

- Moncada, S. & Higgs, , 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*, 147, p.193–201.
- Montalban-Bravo, G. & Garcia-Manero, G., 2018. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*, 93(1), pp.129-47.
- Moore, T. et al., 2013. Microscopic evaluation of vesicles shed by erythrocytes at elevated temperatures. *Microscopy Research and Technique*, 76(11), pp.1163-70.
- Moskovich, O. & Fishelson, , 2007. Live Cell Imaging of Outward and Inward Vesiculation Induced by the Complement C5b-9 Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 282(41), pp.29977-86.
- Motlagh, S.P. et al., 2010. Haematology, morphology and blood cells characteristics of male and female Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Comparative Clinical Pathology*, 21(1), pp.15-21.
- Mueller, T.J., Jackson, C.W., Dockter, M.E. & Morrison, , 1987. Membrane skeletal alterations during in vivo mouse red cell aging. Increase in the band 4.1a:4.1b ratio. *The journal of clinical investigation*, 79(2), pp.492-99.
- Mullier, F. et al., 2012. Quantification and characterisation of microvesicles: Applications in hereditary spherocytosis, type-II heparin-induced thrombocytopenia and cancer. *Belgian Journal of Hematology*, 3(4).
- Munnix, I.C.A. et al., 2003. Store-mediated calcium entry in the regulation of phosphatidylserine exposure in blood cells from Scott patients. *Thrombosis and Haemostasis*, 89(4), pp.687-95.
- Nantakomol, D. et al., 2011. Circulating Red Cell-derived Microparticles in Human Malaria. *Journal of Infectious Diseases*, 203(5), p.700–706.
- Nantakomol, D. et al., 2012. Red cell and platelet-derived microparticles are increased in G6PD-deficient subjects. *European Journal of Haematology*, 89, p.423–429.
- Nemerson, E., 1988. Tissue Factor and Hemostasis. *Blood*, 71, pp.1-8.
- Nguyen, D.B., Ly, T.B.T. & Bernhardt, , 2017. Microvesicles Released from Human Red Blood Cells: Properties and Potential Applications. In J. Wang, ed. *Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases*. IntechOpen. pp.137-61.
- Nguyen, D.B. et al., 2016. Characterization of Microvesicles Released from Human Red Blood Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38(3), pp.1085-99.
- Nguyen, D.B. et al., 2011. Regulation of Phosphatidylserine Exposure in Red Blood Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28(5), pp.847-56.



- Nieto, F.J. et al., 2000. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *JAMA*, 283(14), pp.1829-36.
- Nieuwland, R. et al., 1997. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation*, 96(10), pp.3534-41.
- Ninomiya, H., Kawashima, Y., Hasegawa, Y. & Nagasawa, T., 1999. Complement-induced procoagulant alteration of red blood cell membranes with microvesicle formation in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH): implication for thrombogenesis in PNH. *British Journal of Hematology*, 106(1), pp.224-31.
- Nishimura, J.-I. et al., 2004. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore)*, 83(3), pp.193-207.
- Omodeo-Salè, F. et al., 2003. Accelerated senescence of human erythrocytes cultured with *Plasmodium falciparum*. *Blood*, 102(2), pp.705-11.
- Ouweneel, A.B., Thomas, M.J. & Sorci-Thomas, M.G., 2019. The ins and outs of lipid rafts: functions in intracellular cholesterol homeostasis, microparticles, and cell membranes: Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts. *Journal of Lipid Research*, 61(5), pp.676-86.
- Owens, III, A.P. & Mackman, N., 2011. Microparticles in Hemostasis and Thrombosis. *Circulation Research*, 108(10), p.1284–1297.
- Padilla, F., Bromberg, P.A. & Jensen, W.N., 1973. The Sickle-Unsickle Cycle: A Cause of Cell Fragmentation Leading to Permanently Deformed Cells. *Blood*, 41, pp.653-60.
- Pan, B.T. & Johnstone, R.M., 1983. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3), pp.967-78.
- Pantaleo, A. et al., 2010. Analysis of changes in tyrosine and serine phosphorylation of red cell membrane proteins induced by *P. falciparum* growth. *Proteomics*, 10(19), pp.3469-79.
- Pantaleo, A. et al., 2011. Irreversible AE1 tyrosine phosphorylation leads to membrane vesiculation in G6PD deficient red cells. *PLoS One*, 6(1), p.15847.
- Pant, S. et al., 2014. Inflammation and atherosclerosis--revisited. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 19(2), pp.170-78.
- Pasricha, S.-R., 2014. The Red Cell Membrane, Part 1: The Role of the Red Cell Membrane. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, 12(8), pp.533-55.
- Peng, L. et al., 2021. Extracellular Vesicles Derived from Intermittent Hypoxia-Treated Red Blood Cells Impair Endothelial Function Through Regulating eNOS Phosphorylation and ET-1 Expression. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 35(5), pp.901-13.
- Percário, S. et al., 2012. Oxidative stress in malaria. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), pp.16346-72.

- Pesciotta, E.N. et al., 2012. A label-free proteome analysis strategy for identifying quantitative changes in erythrocyte membranes induced by red cell disorders. *Journal of Proteomics*, 76(Spec No.(0 0)), pp.194-202.
- Peters, L.L. et al., 1996. Anion Exchanger 1 (Band 3) Is Required to Prevent Erythrocyte Membrane Surface Loss but Not to Form the Membrane Skeleton. *Cell*, 86(6), pp.917-27.
- Pietraforte, D., Mallozzi, , Scorza, & Minetti, , 1995. Role of thiols in the targeting of S-nitroso thiols to red blood cells. *Biochemistry*, 34(21), pp.7177-85.
- Poisson, J. et al., 2020. Erythrocyte-derived microvesicles induce arterial spasms in JAK2V617F myeloproliferative neoplasm. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(5), pp.2630-43.
- Pollet, H., Conrard, , Cloos, A.-S. & Tyteca, , 2018. Plasma Membrane Lipid Domains as Platforms for Vesicle Biogenesis and Shedding? *Biomolecules*, 8(3), p.94.
- Prudent, M. et al., 2015. Differences between calcium-stimulated and storage-induced erythrocyte-derived microvesicles. *Transfusion and Apheresis Science*, 53, p.153–158.
- Ramachandra, L. et al., 2010. Mycobacterium tuberculosis synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing major histocompatibility complex class II molecules capable of antigen presentation. *Infection and Immunity*, 78(12), pp.5116-25.
- Raposo, G. et al., 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), pp.1161-1172.
- Raposo, et al., 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, 183(3), pp.1161-72.
- Reinhardt, D. et al., 2001. Increase in Band 3 Density and Aggregation in Hereditary Spherocytosis. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 27(2), pp.399-406.
- Reliene, R. et al., 2002. Splenectomy prolongs in vivo survival of erythrocytes differently in spectrin/ankyrin- and band 3-deficient hereditary spherocytosis. *Blood*, 100(6), pp.2208-15.
- Robinson, D.G., Ding, & Jiang, , 2015. Unconventional protein secretion in plants: a critical assessment. *Protoplasma*, 253(1), pp.31-43.
- Rocha, S. et al., 2005. Erythropoietin levels in the different clinical forms of hereditary spherocytosis. *British Journal of Haematology*, 131(4), pp.534-42.
- Rosing, J. et al., 1985. Impaired factor X and prothrombin activation associated with decreased phospholipid exposure in platelets from a patient with a bleeding disorder. *Blood*, 65(6), pp.1557-61.
- Rosse, W.F., 1990. Phosphatidylinositol-Linked Proteins and Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *The Journal of the American Society of Hematology*, 75(8).

- Ross, R. & Harker, L., 1976. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science*, 193, pp.1094-100.
- Sahu, U. et al., 2013. Association of TNF level with production of circulating cellular microparticles during clinical manifestation of human cerebral malaria. *Human Immunology*, 74(6), pp.713-21.
- Said, A.S., Rogers, S.C. & Doctor, , 2018. Physiologic Impact of Circulating RBC Microparticles upon Blood-Vascular Interactions. *Frontiers in Physiology*, 8, p.1120.
- Salzer, U. et al., 2002. Ca(++)-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin. *Blood*, 99(7), pp.2569-77.
- Salzer, U. & Prohaska, , 2001. Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood*, 97(4), pp.1141-43.
- Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z. & Lisanti, M., 1993. Signal transducing molecules and GPI-linked proteins from a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *Journal of Cell Biology*, 122, p.789–807.
- Schaper, & Rose-John, S., 2015. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 26(5), pp.475-87.
- Schiffelers, R.M., van Solinge, W.W., van Wijk, & Alaarg, A., 2013. Red blood cell vesiculation in hereditary hemolytic anemia. *Frontiers in Physiology*, 4.
- Schwartz, R.S., Rybicki, A.C., Heath, R.H. & Lubin, B.H., 1987. Protein 4.1 in sickle erythrocytes. Evidence for oxidative damage. *Journal of Biological Chemistry*, 262(32), pp.15666-72.
- Seigneuret, M. & Devaux, P.F., 1984. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(12), pp.3751-55.
- Shah , M.D. et al., 2008. Flow cytometric measurement of microparticles: pitfalls and protocol modifications. *Platelets*, 19(5), pp.365-72.
- Sheng, L. et al., 2020. Erythrocytic  $\alpha$ -synuclein contained in microvesicles regulates astrocytic glutamate homeostasis: a new perspective on Parkinson's disease pathogenesis. *Acta Neuropathologica Communications*, 8, p.102.
- Shet, A.S. et al., 2003. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*, 102(7), pp.2678-83.
- Silveira, P. et al., 1997. Red blood cell abnormalities in hereditary elliptocytosis and their relevance to variable clinical expression. *American Journal of Clinical Pathology*, 108(4), pp.391-99.

- Simak, J. & Gelderman, P., 2006. Cell Membrane Microparticles in Blood and Blood Products: Potentially Pathogenic Agents and Diagnostic Markers. *Transfusion Medicine Reviews*, 20(1), pp.1-26.
- Simons, K. & Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), pp.569-72.
- Skog, J. et al., 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10(12), p.1470–1476.
- Snyder, L.M. et al., 1978. Fragmentation and myelin formation in hereditary xerocytosis and other hemolytic anemias. *Blood*, 52(4), pp.750-61.
- Socié, G. et al., 1996. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology. *Lancet*, 348(9027), pp.573-77.
- Spinella, P.C., Sparrow, R.L., Hess, J.R.H. & Norris, P.J., 2011. Properties of stored RBCs: Understanding immune and vascular reactivity. *Transfusion*, 51(4), p.894–900.
- Ståhl, A.-I. et al., 2015. A novel mechanism of bacterial toxin transfer within host blood cell-derived microvesicles. *PLoS Pathogens*, 11(2).
- Stary, H.C. et al., 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 92(5), pp.1355-74.
- Stegmayr, B. & Ronquist, , 1982. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urological Research*, 10(5), pp.253-57.
- Steinberg, M.H., Benz Jr, E.J., Adewoye, A.H. & Ebert, B.L., 2018. Pathobiology of the Human Erythrocyte and Its Hemoglobins. In *Hematology*. 7th ed. pp.447-57.
- Stern, D.M., Nawroth, P.P., Harris, & Esmon, C.T., 1986. Cultured Bovine Aortic Endothelial Cells Promote Activated Protein C-Protein S-mediated Inactivation of Factor Va". *The Journal of Biological Chemistry*, 261(2), pp.713-18.
- Stewart, G.W. & Turner, E.J., 1999. The hereditary stomatocytoses and allied disorders: congenital disorders of erythrocyte membrane permeability to Na and K. *Bailliere's best practice & research. Clinical haematology*, 12(4), pp.707-27.
- Stuendl, A. et al., 2016. Induction of  $\alpha$ -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain*, 139(2), pp.481-94.
- Sudnitsyna, J. et al., 2020. Microvesicle formation induced by oxidative stress in human erythrocytes. *Antioxidants*, 9, p.929.

- Svetina, S., 2012. Red blood cell shape and deformability in the context of the functional evolution of its membrane structure. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 17, p.171–181.
- Swarup, S., Goyal, A., Grigorova, Y. & Zeltser, R., 2022. *Metabolic Syndrome*. StatPearls Publishing.
- Tarashi, S. et al., 2022. Commensal and Pathogenic Bacterial-Derived Extracellular Vesicles in Host-Bacterial and Interbacterial Dialogues: Two Sides of the Same Coin. *Journal of Immunology Research*, 2022.
- Thangaraju, K., Neerukonda, S.N., Katneni, & Buehler, P.W., 2020. Extracellular Vesicles from Red Blood Cells and Their Evolving Roles in Health, Coagulopathy and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), p.153.
- Théry, C. et al., 2002. Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature Immunology*, 3(12), pp.1156-62.
- Théry, C., Ostrowski, & Segura, , 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9, p.581–593.
- Thiagarajan, P., Parker, C.J. & Prchal, J.T., 2021. How Do Red Blood Cells Die? *Frontiers in Physiology*, 12.
- Tissot, J.-D. et al., 2013. Blood microvesicles: From proteomics to physiology. *Translational Proteomics*, pp.38-52.
- Tombak, A., 2017. Red blood cells and relation to thrombosis. In *Transfusion Medicine and Scientific Developments*. IntechOpen. p.128.
- Tombak, A., 2019. Introductory Chapter: Erythrocytes - Basis of Life. In *Erythrocyte*. London: IntechOpen. p.176.
- Toti, F. et al., 1996. Scott Syndrome, Characterized by Impaired Transmembrane Migration of Procoagulant Phosphatidylserine and Hemorrhagic Complications, Is an Inherited Disorder. *Blood*, 87(4), pp.1409-15.
- Tse, W.T. & Lux, S.E., 1999. Red blood cell membrane disorders. *British Journal of Haematology*, 104(1), pp.2-13.
- Turrini, F. et al., 1985. Increased red cell calcium, decreased calcium adenosine triphosphatase, and altered membrane proteins during fava bean hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient (Mediterranean variant) individuals. *Blood*, 66(2), pp.302-05.
- Ullmer, C., Zirwes, E.A. & Osterwald, , 2016. Lysophosphatidic acid (LPA) elicits pro-inflammatory responses in ARPE-19 cells via activation of LPA2 receptors. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(12), p.1746.
- Valadi, H. et al., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), pp.654-59.

- van Beers, E.J. et al., 2009. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica*, 94(11), pp.1513-19.
- Van Der Meijden, P.E.J. et al., 2012. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *Journal of Thrombosis and Hemostasis*, 10(7), pp.1355-62.
- van Diepen, J.A., Berbée, J.F.P., Havekes, L.M. & Rensen, P.C.N., 2013. Interactions between inflammation and lipid metabolism: Relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 228(2), pp.306-15.
- van Niel, G., D'Angelo, & Raposo, , 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Molecular Cell Biology*, 19, p.213–228.
- van Wijk, R. & van Solinge, W.W., 2005. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood*, 106(13), p.4034–4042.
- Vives Corrons, J.K., Berga Casafont, L. & Feliu Frasnado, E., 2021. Concise review: how do red blood cells born, live, and die? *Annals of Hematology*, 100, p.2425–2433.
- Wagner-Britz, L., Wang, , Kaestner, & Bernhardt, , 2013. Protein kinase Ca and P-type Ca channel CaV2.1 in red blood cell calcium signalling. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 31(6), pp.883-91.
- Wang, J. & Maldonado, M.A., 2006. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cellular and Molecular Immunology*, 3(4), pp.255-61.
- Wang, Z. et al., 2017. Red blood cells release microparticles containing human argonaute 2 and miRNAs to target genes of Plasmodium falciparum. *Emerging Microbes and Infections*, 6(8).
- Wang, Q. & Zennadi, R., 2021. The Role of RBC Oxidative Stress in Sickle Cell Disease: From the Molecular Basis to Pathologic Implications. *Antioxidants*, 10(10), p.1608.
- Waugh, S.M. & Low, P.S., 1985. Hemichrome binding to band 3: nucleation of Heinz bodies on the erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 24(1), pp.34-39.
- Waugh, S.M. & Low, P.S., 1985. Hemichrome binding to band 3: nucleation of Heinz bodies on the erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 24(1), pp.34-39.
- Waugh, R.E. et al., 1992. Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood*, 79(5), pp.1351-8.
- Wennmalm, A., Benthin, & Petersson, A.S., 1992. Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin. *British Journal of Pharmacology*, 106(3), pp.507-08.
- Westerman, M. et al., 2008. Microvesicles in haemoglobinopathies offer insights into mechanisms of hypercoagulability, haemolysis and the effects of therapy. *British Journal of Haematology*, 142(1), pp.126-35.

- Westerman, M. & Porter, J.B., 2016. Red blood cell-derived microparticles: An overview. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 59, pp.134-39.
- Wiley, J.S., 1970. Red cell survival studies in hereditary spherocytosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 49(4), pp.666-72.
- Wilkinson, D.K. et al., 2008. Membrane raft actin deficiency and altered Ca<sup>2+</sup>-induced vesiculation in stomatin-deficient overhydrated hereditary stomatocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(1), pp.125-32.
- Willekens, F.L.A. et al., 2005. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood*, 105(5), pp.2141-45.
- Willekens, F.L.A. et al., 2003. Hemoglobin loss from erythrocytes in vivo results from spleen-facilitated vesiculation. *Blood*, 101, p.747-751.
- Willekens, L.A. et al., 2008. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *British Journal of Haematology*, 141, p.549-556.
- Williamson, P. et al., 1995. Continuous analysis of the mechanism of activated transbilayer lipid movement in platelets. *Biochemistry*, 34(33), pp.10448-55.
- Wolf, P., 1967. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*, 13(3), pp.269-88.
- Xiong, Z. et al., 2011. Red blood cell microparticles show altered inflammatory chemokine binding and release ligand upon interaction with platelets. *Transfusion*, 51(3), pp.610-21.
- Yazar, S., Kilic, E., Saraymen, R. & Ozbilge, H., 2004. Serum malondialdehyde levels in patients infected with Plasmodium vivax. *The West Indian Medical journal*, 53(3), pp.147-49.
- Yoshida, K. et al., 1980. Metabolic Fate of Nitric Oxide. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 46, pp.71-77.
- Yuan, Y., Maitusong, M. & Muyes, N., 2020. Association of endothelial and red blood cell microparticles with acute myocardial infarction in Chinese: a retrospective study. *Annals of Palliative Medicine*, 9(4), pp.1564-70.
- Zecher, D., Cumpelik, & Schifferli, , 2014. Erythrocyte-Derived Microvesicles Amplify Systemic Inflammation by Thrombin-Dependent Activation of Complement. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 34(2), pp.313-20.
- Zhou, Q. et al., 2022. Extracellular vesicles: Their functions in plant-pathogen interactions. *Molecular Plant Pathology*, 23(6), pp.760-71.
- Zhu, Q., Salehyar, , Cabrales, & Asaro, R.J., 2017. Prospects for Human Erythrocyte Skeleton-Bilayer Dissociation during Splenic Flow. *Biophysical Journal*, 113(4), pp.900-12.
- Zwaal, R.F.A., Comfurius, & Bevers, E.M., 2005. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(9), pp.971-88.

Zwaal, R.F., Comfurius, & Bevers, E.M., 1998. Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1376(3), pp.433-53.

Zwaal, R.F.A. & Schroit, A.J., 1997. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *The Journal of The American Society of Hematology*, 89(4).



## Πηγές Εικόνων

Εικόνα 1: Vives Corrons, J.K., Berga Casafont, L. & Feliu Frasnado, E., 2021. Concise review: how do red blood cells born, live, and die? *Annals of Hematology*, 100, p.2425–2433.

Εικόνα 2: Δημιουργήθηκε στο BioRender.com

Εικόνα 3: Δημιουργήθηκε στο BioRender.com

Εικόνα 4: Δημιουργήθηκε στο BioRender.com

Εικόνα 5: Δημιουργήθηκε στο BioRender.com