

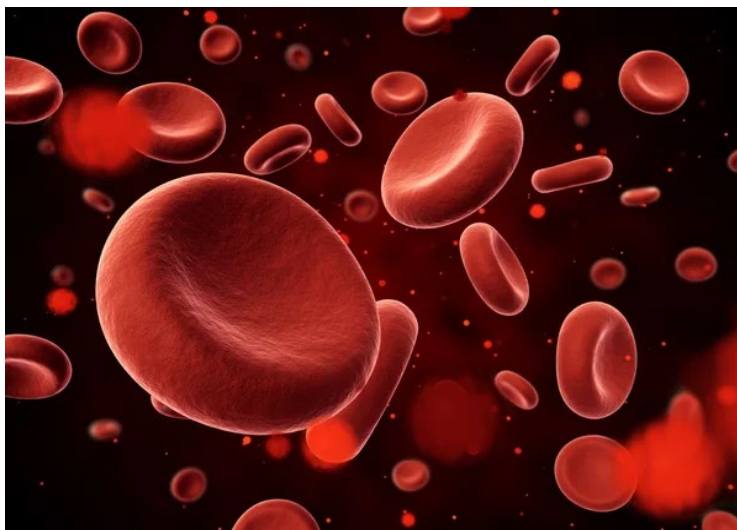


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΗΣ
ΕΡΥΘΡΟΚΥΥΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ MDS**



ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ:

ΚΟΣΜΑ ΜΑΡΙΑ-ΑΣΠΑΣΙΑ

A.M.:18678288

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Γεωργατζάκου Χαρά

Ακαδ. Υπότροφος ,ΠΑΔΑ

ΑΙΓΑΛΕΩ ,ΑΘΗΝΑ 2022

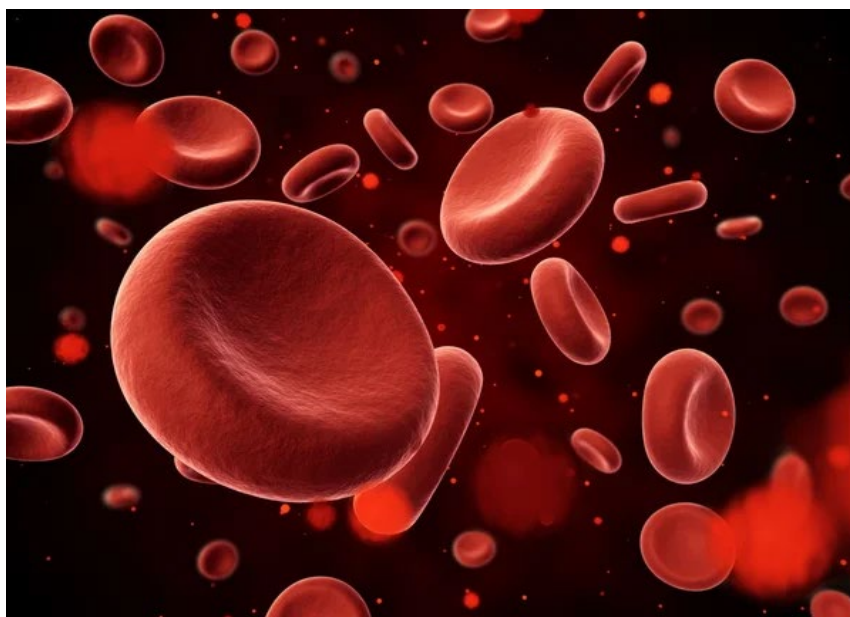


UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
DIVISION OF MEDICAL LABORATORIES



DIPLOMA THESIS

**DISORDERS OF PROTEIN COMPOSITION OF THE RED
CELL MEMBRANE
IN PATIENTS WITH MDS**



WRITER:

KOSMA MARIA-ASPASIA

Candidate number:18678288

SUPERVISOR:

Georgatzakou Hara

Acad. Assistant

AIGALEO, ATHENS 2022



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



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΗΣ
ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ MDS**

**ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΕΙΣΗΓΗΤΗ**

Η διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι εξεταστική επιτροπή:

ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΑΔΑ/ΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
ΧΑΡΑ ΓΕΩΡΓΑΤΖΑΚΟΥ	ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ	
ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ	
ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ ΕΥΣΤΑΘΙΑ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ - ΑΝΤΙΠΡΥΤΑΝΗΣ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη **ΚΟΣΜΑ ΜΑΡΙΑ ΑΣΠΑΣΙΑ** του **ΕΥΣΤΑΘΙΟΥ**, με αριθμό μητρώου **18678288** φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής **ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ** του Τμήματος **ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Εισηγήτρια : Γεωργατζάκου Χαρά
Ακαδημαϊκή Υπότροφος



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	9
ΣΥΧΝΕΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	10
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	11
A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
1 ^ο ΜΕΡΟΣ: RBCs.....	14
1)ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	14
2)ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ -RBCs.....	14
2.1)Ερυθροποίηση.....	14
2.2)Μορφολογία και λειτουργικότητα των RBCs	18
3.ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ.....	19
3.1)Ρόλος και χαρακτηριστικά της μεμβράνης.....	19
3.2)Πρωτεϊνική σύσταση ερυθροκυτταρικής μεμβράνης.....	20
3.3)Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες	20
3.3.1)Πρωτεΐνη Ζώνη 3-Διάυλος ανταλλαγής ανιόντων.....	20
3.3.2)PIEZO 1.....	23
3.3.3)Λοιπές πρωτεΐνες μεταφοράς.....	24
3.3.4)ICAM-4:Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης.....	24
3.3.5)Γλυκοφορίνες	25
3.4)Σκελετικές πρωτεΐνες.....	26
3.4.1)Σπεκτρίνη	26
3.4.2) Ακτίνη και συσχετιζόμενες με αυτή πρωτεΐνες.....	26
3.4.3) Πρωτεΐνη 4,1R	27
3.4.4) Αδουσίνη.....	29
3.4.5)Δεματίνη	29
3.4.6) Αγκυρίνη.....	29
3.4.7)Λοιπές σκελετικές πρωτεΐνες.....	30

3.5) Σύμπλοκα ερυθροκυτταρικής μεμβράνης.....	31
3.5.1) Σύμπλοκο αγκυρίνης ή ζώνης 3.....	31
3.5.2) Σύμπλοκο ζεύξης.....	31
3.5.3) Σύμπλοκο Rhesus.....	33
3.6) Λιπιδική σύσταση μεμβράνης.....	33
2° ΜΕΡΟΣ: ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ (MDS).....	34
1) ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ.....	34
1.1) Αιτιολογία.....	35
1.2) Δυσερυθροποίηση στα MDS.....	35
1.3) Γενετικές ανωμαλίες.....	36
1.4) Βασικά εργαστηριακά ευρήματα	37
1.5) Θεραπευτικές προσεγγίσεις	39
2. MDS ΚΑΙ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ	40
Β) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	44
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
2.1) Απομόνωση ερυθροκυτταρικών μεμβρανών	44
2.2) Υπολογισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δείγματος.....	45
2.3) Προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση.....	46
2.4) Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κατά Laemmli	46
2.5) Ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνών και των πηκτωμάτων	47
3. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	48
Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49
1. ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	49
2. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ	
ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ	50
Δ) ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	55

1.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	55
2.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	56
Ε) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε την περίοδο Μάιο – Σεπτέμβριο 2022 στα πλαίσια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας στο « Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία » που ανήκει στο τμήμα των Βιοϊατρικών Επιστημών του ΠΑΔΑ.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την εισηγήτρια και επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, **κ. Χαρά Γεωργατζάκου**, Ακαδημαϊκή Υπότροφο του τμήματος, για την πολύτιμη βοήθειά της και την ψυχολογική υποστήριξη -οποιαδήποτε στιγμή τη χρειαζόμουν – τόσο κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών όσο και κατά τη διάρκεια της συγγραφής της εργασίας μου.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή και Υπεύθυνο του εργαστηρίου, **κ. Αναστάσιο Γ. Κριεμπάρδη**, ο οποίος με τη σειρά του συνέβαλε στην εκπαίδευσή μου στον εργαστηριακό χώρο, στη συνεχή προμήθεια του πειραματικού υλικού και στη μεταλαμπάδευση του πνεύματος ενός «ερευνητή».

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την **κ. Παπαγεωργίου Έφη**, Καθηγήτρια και Αντιπρύτανη του τμήματος καθώς και διευθύντρια του εργαστηρίου, για τη συμμετοχή της στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

ΣΥΧΝΕΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

MDS	Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο (Myelodysplastic Syndrome)	TM	Τροπομυοσίνη (Tropomyosin)
RA	Ανθεκτική Αναιμία (Resistant Anemia)	TMD 1	Τροπομοντουλίνη 1 (Tropomodulin 1)
RBCs	Ερυθροκύτταρα (Red Blood Cells)	PS	Φωσφατιδυλοσερίνη (Phosphatidyloserine)
WBCs	Λευκά Αιμοσφαίρια (White Blood Cells)	Hb	Αιμοσφαιρίνη (Hemoglobin)
PLTs	Αιμοπετάλια (Platelets)	Hct	Αιματοκρίτης (Hematocrit)
AQP1	Υδατοπορίνη 1 (Aquaporin 1)	MCV	Μέσος όγκος ερυθροκυττάρων (Mean corpuscular volume)
GLUT 1	Μεταφορέας Γλυκόζης (Glucose Transporter)	MCH	Ποσότητα αιμοσφαιρίνης /RBC (Mean corpuscular hemoglobin)
ICAM 4	Διακυτταρικό Μόριο Προσκόλλησης (Intercellular Adhesion Molecule 4)	MCHC	Συγκέντρωση Hb /όγκο RBC(Mean corpuscular hemoglobin concentration)
HMA s	Παράγοντες Υπομεθυλίωσης	RDW	Εύρος κατανομής ερυθροκυττάρων (RBC distribution width)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάλυση της πρωτεϊνικής σύστασης της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Τα ερυθροκύτταρα είναι τα κύτταρα του αίματος που παράγονται με τη διαδικασία της ερυθροποίησης και υφίστανται πολλαπλές διαφοροποιήσεις μέχρι να αποκτήσουν την τελική ώριμη μορφή τους με την οποία παρατηρούνται φυσιολογικά στην κυκλοφορία του αίματος. Τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά του O₂ από τους πνεύμονες στους διάφορους ιστούς. Σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ερυθροκυττάρου διαδραματίζει η **ερυθροκυτταρική του μεμβράνη**, η οποία αποτελείται από μια διπλοστιβάδα λιπιδίων με ενσωματωμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και από ένα υπομεμβρανικό σκελετό που στηρίζει όλη τη μεμβράνη και αποτελείται από τις σκελετικές πρωτεΐνες. Βασικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες είναι η ζώνη 3 ή διάυλος ανταλλαγής ανιόντων (band 3), η υδατοπορίνη 1 (AQP1), ο μεταφορέας της γλυκόζης (GLUT1) κ.α., ενώ σημαντικές σκελετικές ή περιφερικές είναι σπεκτρίνη, η αγκυρίνη, η ακτίνη, οι πρωτεΐνες 4,1 R και 4,2 κ.α. Οι ασθενείς με **μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (Myelodysplastic Syndrome -MDS)** είναι το δεύτερο αντικείμενο παρατήρησης της συγκεκριμένης εργασίας. Τα σύνδρομα αυτά χαρακτηρίζονται από ελαττωματική αιμοποίηση στο μυελό των οστών που μπορεί να οφείλεται σε διάφορες γενετικές ανωμαλίες. Βασική αιτιολογία εμφάνισής τους αποτελεί η δυσερυθροποίηση και η κλινική εικόνα των ασθενών μπορεί να ξεκινάει από ήπια μορφή αναιμίας και βαθμιαία να παραπέμπει σε οξεία μυελογενή λευχαιμία.

Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε δείγματα ασθενών με MDS που στόχευαν στην αρχική απομόνωση των πρωτεϊνών τους μέχρι την τελική ημι-ποσοτική ανάλυση της βασικής πρωτεϊνικής σύστασης της μεμβράνης τους. Απώτερος σκοπός των πειραματικών αυτών διαδικασιών, υπήρξε ο εντοπισμός των αλλοιώσεων της βασικής αυτής πρωτεϊνικής σύστασης των δυσπλαστικών ερυθροκυττάρων των ασθενών, σε σύγκριση με την ανάλυση των δειγμάτων υγιών ατόμων. Συμπερασματικά λοιπόν τα αποτελέσματα της μελέτης υπέδειξαν το κλασικό αιματολογικό προφίλ ενός ασθενή με MDS με χαρακτηριστικά ήπιας αναιμίας, θρομβοπενίας και λευκοπενίας και μια σημαντική αύξηση του ερυθροκυτταρικού δείκτη RDW. Λιγότερο αυξημένες παρατηρήθηκαν οι τιμές MCH και MCV. Η ανάλυση της βασικής πρωτεϊνικής σύστασης της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης των ασθενών υπέδειξε σημαντική αύξηση στην κατανομή της βασικής διαμεμβρανικής πρωτεΐνης **ζώνη 3**. Η διαταραχή αυτή αποτελεί πιθανά μια αντισταθμιστική ικανότητα του κυττάρου με σκοπό της διατήρησης της φυσιολογικής του λειτουργίας.

ABSTRACT

The main purpose of this study is the analysis of the protein composition of the erythrocyte membrane of patients with MDS (Myelodysplastic Syndromes). Erythrocytes are the blood cells that are produced by the process of erythropoiesis and undergo multiple differentiations, until they acquire their terminal mature form in which they are normally observed in the bloodstream. These cells are responsible for the transport of O₂ from the lungs to the various tissues. The **erythrocyte membrane** plays an important role in the function of RBCs. It's consisted of a lipid bilayer with integrated transmembrane proteins and it also has a submembrane skeleton that supports the entire structure of the membrane. This skeleton contains the skeletal proteins. Band 3 or anion exchange channel, aquaporin 1, glucose transporter etc. are some of the main transmembrane proteins, while spectrin, ankyrin, actin, proteins 4,1R and 4,2 are the main skeletal ones. **Patients with MDS** is the second subject of observation of this study. These syndromes are linked to defective hematopoiesis in the bone marrow, which may be the result of genetic abnormalities. The main cause of their existence is dyserythropoiesis and the clinical portrait of the patients may start from a mild type of anemia and gradually develop into acute myeloid leukemia.

In this specific study, experiments were performed on samples of patients with MDS and aimed at the initial isolation of their proteins until the final semi-quantitative analysis of the basic protein composition of their membrane. The ultimate purpose of these experimental procedures has been the identification of the alterations of this basic protein composition of the patients' dysplastic erythrocytes, compared to the analysis of samples from healthy individuals. In conclusion, the results of this study indicated the classic hematological profile of a patient with MDS with features of mild anemia, thrombocytopenia, leukopenia and a major increase in the erythrocyte indicator RDW. MCH and MCV values have been less increased. Analysis of the basic protein composition of the erythrocyte membrane of the patients showed a significant increase in the distribution of the main transmembrane protein **band 3**. This membrane abnormality is a possible compensatory ability of the cell in order to maintain its normal function.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1º ΜΕΡΟΣ: RBCs

1)ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Το αίμα είναι ένας σημαντικός συνδετικός ιστός που συναντάται στον ανθρώπινο οργανισμό ,ο οποίος αποτελείται από πλάσμα και τα κύτταρα του αίματος .Τα κύτταρα του αίματος μπορούν να παρατηρηθούν διεξοδικά στο μικροσκόπιο ύστερα από την επίστρωση μιας μικρής σταγόνας αίματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα και την κατάλληλη χρώση αυτής .Η αιματολογική αυτή τεχνική σε συνδυασμό με τη χρήση του μικροσκοπίου παρουσιάζει ένα μικρόκοσμο κυττάρων, καθένα από τα οποία εμφανίζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και επιτελεί συγκεκριμένες λειτουργίες .Τα βασικά λοιπόν κύτταρα του αίματος είναι τα ακόλουθα: Τα **ερυθροκύτταρα** ,τα **λευκά αιμοσφαίρια** στα οποία ανήκουν τα **κοκκιοκύτταρα** (ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα ,ηωσινόφιλα και βασεόφιλα),τα **μονοκύτταρα** και τα **λεμφοκύτταρα** (Τ-λεμφοκύτταρα ,Β-λεμφοκύτταρα και κύτταρα «Φυσικοί Φονείς») και η τελευταία κατηγορία είναι τα **αιμοπετάλια**. Τα λεμφοκύτταρα είναι απαραίτητα για την άμυνα του οργανισμού ενώ τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στην αιμόσταση,

2) ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ -RBCs

Τα ερυθροκύτταρα είναι κύτταρα τα οποία υπόκεινται σε υψηλό βαθμό διαφοροποίησης μέχρι να πάρουν την τελική τους μορφή .Κατά τη διάρκεια αυτής της διαφοροποίησης τα RBCs χάνουν βασικά οργανίδια καθώς και ενδοκυττάρια ουσίες .(Pretini et al ,2019)

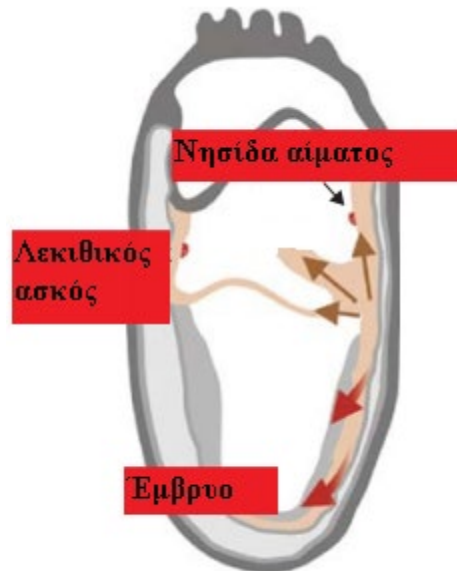
Η διαδικασία με την οποία τα ερυθροκύτταρα ωριμάζουν και αποκτούν τα τελικά τους μορφολογικά και κατ'επέκταση λειτουργικά τους χαρακτηριστικά ονομάζεται **ερυθροποίηση** και αποτελεί μέρος του πολύπλοκου φαινομένου της αιμοποίησης .

2.1) Ερυθροποίηση

Η παραγωγή των ερυθροκυττάρων όπως και των υπόλοιπων κυττάρων του αίματος πραγματοποιείται στο μυελό των οστών, όταν αρχέγονα στελεχιαία /προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα υφίστανται αλληπάλληλους πολλαπλασιασμούς και διαφοροποιήσεις έτσι ώστε τελικώς να φτάσουν στην ώριμη μορφή τους. (Dzierzak et Philipsen,2013)

Κατά την εμβρυϊκή περίοδο στο **λεκιθικό ασκό** παρατηρούνται τα πρώτα αιμοποιητικά κύτταρα της ερυθράς σειράς τα οποία θεωρείται ότι επιβιώνουν για μικρό χρονικό διάστημα. Έχει διαπιστωθεί ότι αυτά τα πρώιμα αιμοποιητικά κύτταρα μπορεί να εντοπιστούν και στην περιοχή της πρωτοεμβρυϊκής αορτής η οποία ονομάζεται **αορτή – γονάδες -μεσόνεφρος** και συμβολίζεται **AGM** .Τα κύτταρα αυτά λοιπόν προέρχονται από προγονικά κύτταρα με διττή φύση που ονομάζονται **αιμαγγειοβλάστες**. Αυτό σημαίνει ότι είτε αναπτύσσονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα είτε σε αιμοποιητικά .Τα δεύτερα θα ακολουθήσουν μια πορεία κυκλοφορίας προς τους διάφορους ιστούς. Οι αιμαγγειοβλάστες είναι κύτταρα που προέρχονται από κύτταρα του **μεσοδέρματος**, τα οποία δε βρίσκονται φυσιολογικά στο λεκιθικό ασκό αλλά μεταναστεύουν προς αυτόν. Κατά τη μετανάστευσή τους αυτή έρχονται

σε στενή επαφή με τα κύτταρα του **ενδοδέρματος**. Αυτή η άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφορετικών στρωμάτων του ασκού (**Εικόνα 1**), διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της ερυθροποίησης. Στο σημείο αυτό λοιπόν τα κύτταρα του μεσοδέρματος συμμετέχουν στο σχηματισμό των λεγόμενων νησίδων αίματος, οι οποίες αποτελούνται τόσο από ερυθροκύτταρα όσο και από ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ύπαρξη αυτών των κυττάρων στο λεκιθικό ασκό σηματοδοτεί και την παραγωγή των αιμαγγειοβλαστών. (Dzierzak et Philipsen, 2013)



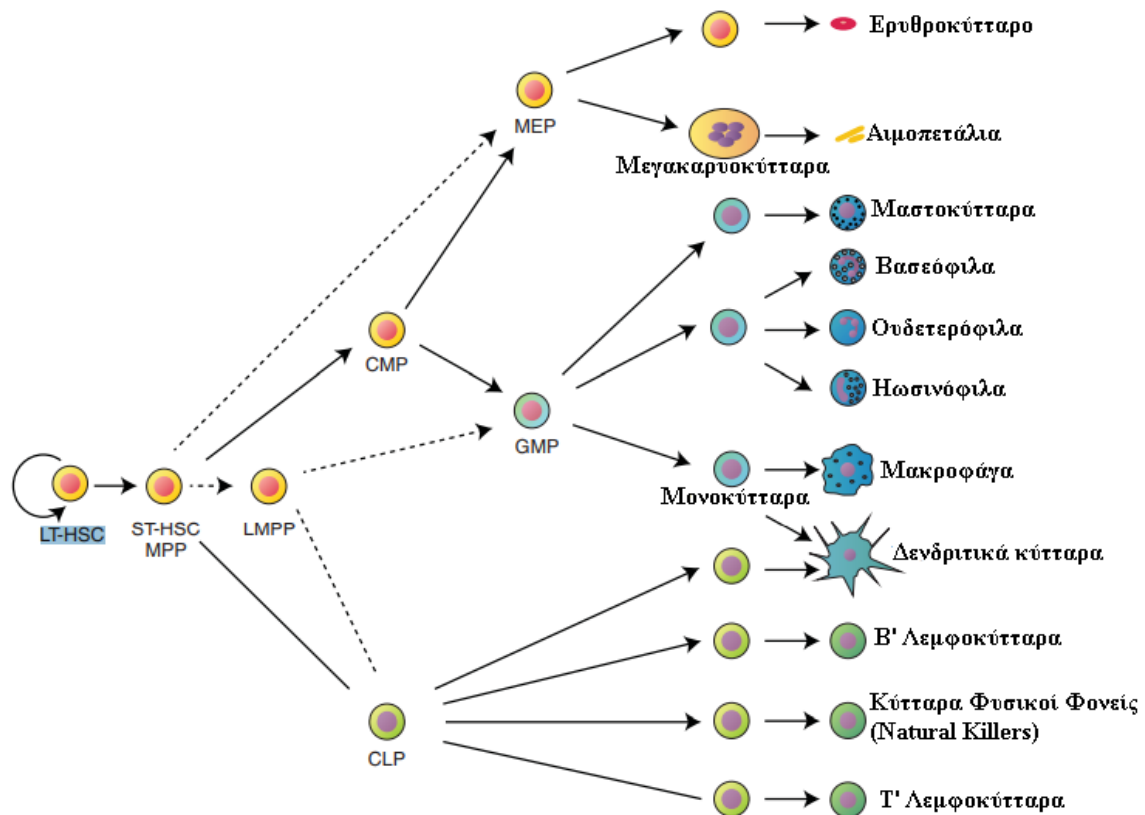
Εικόνα 1.: Απεικονίζεται ο λεκιθικός ασκός όπου με ανοιχτό πορτοκαλί χρώμα φαίνεται το μεσόδερμα και με γκρι το ενδόδερμα. Φαίνεται επίσης το σημείο στο οποίο η νησίδα αίματος θα οδηγήσει στην παραγωγή των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων που δεν είναι άλλα από τους **αιμαγγειοβλάστες**. (Ανατύπωση από Dzierzak et Philipsen, 2013)

Στην ενήλικη φάση της ζωής του ανθρώπου τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από τα στελεχειαία αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία συναντώνται με την ονομασία **Human Stem Cells-HSCs** (Dzierzak et Philipsen, 2013)

Συγκεκριμένα η ερυθροποίηση ξεκινάει από ένα **μη δεσμευμένο πολυδύναμο στελεχειαίο κύτταρο** το οποίο διαθέτει στην επιφάνειά του σημαντικές πρωτεΐνες -αντιγόνα (CD34, CD41, CD46, C-kit και sca -1) που το καθιστούν αναγνωρίσιμο. (Dzierzak et Philipsen, 2013, Minetti et al, 2018)

Το στελεχειαία αυτά κύτταρα βρίσκονται διαρκώς σε μια κατάσταση αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης έτσι ώστε φτάνουν να αναπτύσσονται σε πολυδύναμο προγονικά κύτταρα τα οποία με τη σειρά τους θα δώσουν μονοδύναμο προγονικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να ακολουθήσουν δυο διαφορετικές οδούς διαφοροποίησης, η πρώτη είναι, η **μυελοειδής σειρά (CMP)** και η δεύτερη είναι η **λεμφική σειρά (CLP)**. Στην πρώτη CMP ανήκουν η **ερυθρά σειρά** από την οποία προέρχονται τα ερυθροκύτταρα, η **κοκκιοκυτταρική** από την οποία τελικά θα παραχθούν τα κοκκιοκύτταρα και η **μεγακαρυοκυτταρική** από την οποία τελικώς προκύπτουν τα αιμοπετάλια. Στη δεύτερη σειρά CLP, ανήκει η **λεμφική σειρά** στην οποία τα κύτταρα διαφοροποιούνται σταδιακά σε λεμφοκύτταρα. Οι παραπάνω εξελικτικές

διεργασίες παρουσιάζονται σχηματικά στην **Εικόνα 2** και αξίζει να τονιστεί πως είναι επιτεύξιμες με τη συμβολή σημαντικών εξωγενών παραγόντων. (Dzierzak et Philipsen,2013,)

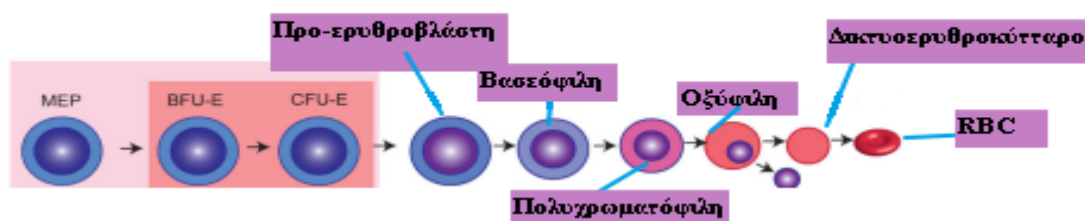


Εικόνα 2: Από τα αρχικά πολυδύναμα προγονικά κύτταρα ,προκύπτουν τα τελικά παράγωγα της κάθε οδούς αιμοποίησης. (Ανατύπωση από Dzierzak et Philipsen,2013)

Όσον αφορά την ερυθρά σειρά τα μονοδύναμα προγονικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν αποικίες ,δηλαδή σύνολα ομοειδών θυγατρικών κυττάρων. Στην ερυθροκυτταρική σειρά οι αποικίες αυτές διακρίνονται σε δύο κατηγορίες ,**BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid)**και **CFU-E(Colony Forming Unit -Erythroid)** αποικίες. Τις πρώτες τις σχηματίζουν τα λιγότερα ανεπτυγμένα κύτταρα ,τα λεγόμενα άωρα , ενώ τις τελευταίες τις δημιουργούν τα κύτταρα που βρίσκονται πλέον σε ώριμη κατάσταση. Τα κύτταρα των CFU-E αποικιών σταδιακά εξελίσσονται στις ευρύτερα γνωστές μορφές των βλαστών και συγκεκριμένα της **προερυθροβλάστης**. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω όλα αυτά επιτυγχάνονται με τη δράση διαφόρων παραγόντων .Οι ίδιοι εκφράζονται ως πρωτεϊνικοί υποδοχείς της μεμβράνης των κυττάρων της ερυθροκυτταρικής σειράς .Ο σημαντικότερος μεταξύ αυτών είναι η ερυθροποιητίνη (EPO) και ακολουθούν παράγοντες όπως GATA-2,GATA-1,FOG-1 και NF-E2. (Dzierzak et Philipsen,2013, Nandakumar et al,2016)

Μορφολογικά η εξέλιξη των κυττάρων της ερυθράς σειράς σε ώριμα ερυθροκύτταρα αρχίζει ,όπως προαναφέρθηκε ,από την πρώιμη μορφή της προερυθροβλάστης. Η σταδιακή διαμόρφωση των χαρακτηριστικών των κυττάρων αυτών στηρίζεται στα ακόλουθα :στη συνεχή ελάττωση του μεγέθους τους ,στη μείωση της ποσότητας του RNA και στην αύξηση

της αιμοσφαιρίνης ,στη σμίκρυνση του πυρήνα και στην ταυτόχρονη πύκνωση και τέλος στην απομάκρυνση του πυρήνα και διαφόρων οργανιδίων. Κατά την **πρεοερυθροβλάστη** το κύτταρο έχει το μεγαλύτερο μέγεθος και καθώς πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται αποκτά τη μορφή της **βασεόφιλης ερυθροβλάστης** που θα έχει συνεπώς μικρότερο μέγεθος και πυκνότερη σύσταση πυρήνα. Ακολουθεί η **πολυχρωματόφιλη** και στη συνέχεια η **οξύφιλη ερυθροβλάστη** ,μορφές στις οποίες το κυτταρόπλασμα γίνεται όλο και περισσότερο οξύφιλο καθώς υπερισχύει η ύπαρξη της αιμοσφαιρίνης.. Με την αποβολή του πυρήνα τα κύτταρα αποκτούν πλέον τη μορφολογία του **δικτυοερυθροκυττάρου** και αυτό γιατί ότι απομένει από τον πυρήνα φαίνεται στα κύτταρα σαν ένα δίκτυο. (*Nandakumar et al,2016*) Οι πρόωρες αυτές μορφές φαίνονται και στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 3**):



Εικόνα 3: Μορφολογική εξέλιξη των κυττάρων της ερυθράς σειράς από τις αρχικές αποικίες που σχηματίζουν μέχρι την τελική ωρίμανση του ερυθροκυττάρου. (Ανατύπωση από *Nandakumar et al,2016*)

Η ώριμη μορφή του **ερυθροκυττάρου** επέρχεται όταν απομακρυνθούν και τα τελευταία οργανίδια που είναι υπεύθυνα για την πρωτεϊνσύνθεση της αιμοσφαιρίνης ,δηλαδή τα ριβοσώματα και τα μιτοχόνδρια καθώς και όταν η τελευταία αποκτήσει τη θέση της περιμετρικά στο κύτταρο και έτσι το ώριμο πλέον ερυθροκύτταρο πάρει τη μορφή του αμφίκιουλου δίσκου.(*Pretini et al,2019, Nandakumar et al,2016*)

Στην τελική αυτή φάση της ωρίμανσης των κυττάρων τη ερυθράς σειράς σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν δομές γύρω από τις οποίες βρίσκονται συγκεντρωμένα τα κύτταρα αυτά και ονομάζονται **ερυθροβλαστικές νησίδες** .(**Εικόνα 4**) Κάθε τέτοια δομή διαθέτει ένα βασικό μακροφάγο γύρω από το οποίο εντοπίζονται τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς καθώς και ερυθροκύτταρα. Μεταξύ των πολλαπλών ρόλων του μακροφάγου είναι και η προσφορά του στην ερυθροποίηση. Η προσφορά αυτή αποδίδεται στα ακόλουθα :στην παροχή σιδήρου για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης ,στην έκφραση κυτταροκινών που ανήκουν στους εξωγενείς παράγοντες που προωθούν την ερυθροποίηση και τέλος στη φαγοκυττάρωση. Ο ρόλος της φαγοκυττάρωσης είναι πολύ σημαντικός για την ωρίμανση των κυττάρων της ερυθράς σειράς ,διότι καθώς το μακροφάγο φαγοκυτταρώνει τον πυρήνα της οξύφιλης ερυθροβλάστης ,τα RBCs αποκτούν την πρόωμη μορφή(δικτυοερυθροκύτταρο) τους και σταδιακά διαμορφώνουν τα τελικά ώριμά τους χαρακτηριστικά. (*Dzierzak et Philipsen,2013*)



Εικόνα 4: Η δομή μιας ερυθροβλαστικής νησίδας .Στη μέση βρίσκεται το μακροφάγο και γύρω από αυτό εντοπίζονται τα διαφοροποιητικά κύτταρα της ερυθράς σειράς (Ανατύπωση από *Dzierzak et Philipsen,2013*)

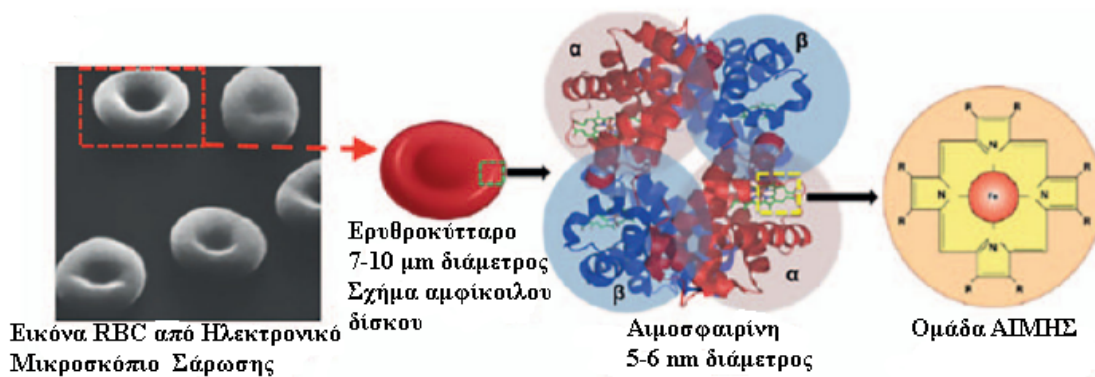
2.2) Μορφολογία και λειτουργικότητα των RBCs

Τα ερυθροκύτταρα είναι η πολυπληθέστερη κατηγορία κυττάρων που συναντάται στην κυκλοφορία του αίματος. (*Pretini et al,2019*) Στους άνδρες αριθμούνται $4,7-6,1 \times 10^6$ RBCs ενώ στη γυναίκα υπάρχει μια μικρή διαφοροποίηση στον αριθμό και παρατηρούνται $4,2-5,4 \times 10^6$ RBCs (*Dzierzak et Philipsen,2013*). Επιβιώνουν στον οργανισμό για 120 μέρες και έχει αποδειχθεί ότι ο ρυθμός παραγωγής τους είναι ιδιαίτερα αυξημένος. Υπολογίζεται ότι κάθε δευτερόλεπτο παράγονται και εντοπίζονται στο αίμα δύο εκατομμύρια ερυθροκύτταρα τα οποία αποπίπτουν με παρόμοιο ρυθμό. Όπως έχει αναλυθεί διεξοδικά τα ερυθροκύτταρα είναι απύρνηνα κύτταρα και υπολείπονται βασικών οργανιδίων. Η ιδιομορφία τους αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στις βασικές τους λειτουργίες. (*Pretini et al,2019*)

Ο πρωτεύων ρόλος των RBCs εντοπίζεται στη μεταφορά του O_2 από τους πνεύμονες στους διάφορους ιστούς. Ακόμη είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά και απομάκρυνση του CO_2 από τους ιστούς καθώς για τη μετακίνηση πρωτεϊνικών ανοσοσυμπλεγμάτων γλυκοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, PI. (*Bryk et Wisniewski,2017*) Η κύρια μεταφορά του O_2 επιτυγχάνεται με τη βοήθεια της αιμοσφαιρίνης που εντοπίζεται περιφερικά στα ερυθροκύτταρα. (**Εικόνα 5**) Η αιμοσφαιρίνη λοιπόν είναι μια τετραμερής πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ανά δύο όμοιες. Κάθε μία από αυτές φέρει ένα μόριο αίμης το οποίο διαθέτει μια θέση δέσμευσης ενός μορίου O_2 . Με τον τρόπο αυτό τα RBCs είναι ικανά να καλύπτουν τις ανάγκες των διάφορων ιστών σε οξυγόνο, όποτε αυτό είναι απαραίτητο, π.χ. σε καταστάσεις ιστικής υποξίας. (*Anirban,2019*) Συνεπώς τα ερυθροκύτταρα συμβάλλουν ενεργά στην ομαλή λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος. (*Pretini et al,2019*)

Η μορφολογία του ερυθροκυττάρου οφείλεται στις διεργασίες που πραγματοποιούνται κατά το τελικό στάδιο της ωρίμανσής του. Όταν τα δικτυοερυθροκύτταρα περνούν στην κυκλοφορία του αίματος υφίστανται τη μετατροπή που θα οδηγήσει στο τελικό ώριμο ερυθροκύτταρο. Αποβάλλεται το 20% της πλασματικής τους μεμβράνης, ριβοσώματα και μιτοχόνδρια και έτσι σταματά η παραγωγή αιμοσφαιρίνης, η οποία καταλαμβάνει τη θέση της περιμετρικά του

κυττάρου. Έτσι τα ώριμα RBCs στην κυκλοφορία του αίματος διαθέτουν το σχήμα αμφίκιουλου δίσκου και έχουν διάμετρο 7-10 μm . **(Εικόνα 5)**. (Anirban,2019, Pretini et al,2019). Βέβαια τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από μεγάλη ελαστικότητα και δυνατότητα παραμόρφωσης ,διότι καλούνται να διαπεράσουν τριχοειδή πολύ μικρότερης διαμέτρου κατά τη διαδρομή τους στην κυκλοφορία του αίματος. Τα χαρακτηριστικά αυτά οφείλονται στην ύπαρξη της **ερυθροκυτταρικής μεμβράνης** (Gurkan ,2021 Pretini et al,2019)



Εικόνα 5: Στην εικόνα φαίνεται το σχήμα του αμφίκιουλου δίσκου και η διάμετρος του μέσα από τη ματιά ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Επισημαίνεται επίσης η θέση της αιμοσφαιρίνης περιμετρικά ,η δομή της ίδιας καθώς και το μόριο αίμης το οποίο θα δεσμεύσει το μόριο O_2 . (Ανατύπωση από Anirban,2019)

3.ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

3.1) Ρόλος και χαρακτηριστικά της μεμβράνης

Η **ερυθροκυτταρική μεμβράνη** είναι μια δομή που αποτελείται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα με ενσωματωμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και έναν υπομεμβρανικό σκελετό αγκυρίνης -σπεκτρίνης που στηρίζει όλο αυτό το δομικό σύστημα. **(Εικόνα 6)** Πιο αναλυτικά η **πλασματική αυτή μεμβράνη** των λιπιδίων χαρακτηρίζεται από ίση αναλογία χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων και μαζί με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες δημιουργούν ισχυρά συμπλέγματα. Ακόμη συνδέεται με τον μεμβρανικό σκελετό με μία ομάδα πρωτεϊνών γνωστή ως σύμπλεγμα **αγκυρίνης -σπεκτρίνης** ή **σύμπλεγμα 4,1R** και έτσι η ερυθροκυτταρική μεμβράνη αποκτά μεγαλύτερη σταθερότητα. (Pretini et al ,2019) Όπως ήδη αναφέρθηκε η μεμβράνη του RBC συμβάλλει ενεργά στη διατήρηση της ακεραιότητάς του αλλά και στη δυνατότητα ελαστικότητας του καθ' όλη τη διάρκεια των 120 ημερών που βρίσκεται στην κυκλοφορία του αίματος. (Nandakumar et al,2016)

Η ακεραιότητα αυτή της μεμβράνης και γενικότερα η δομική της κατασκευή διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση του σχήματος του ερυθροκυττάρου αλλά και στην επιβίωση και προσαρμοστικότητα του κατά την κυκλοφορία του. (Samuel and Lux,2016) Η τελευταία δεν είναι άλλη από τη δυνατότητα του κυττάρου να διαπερνά τα αρκετά στενότερα τριχοειδή που συναντά στο πέρασμά του. Συνοψίζοντας λοιπόν η μεμβράνη προσδίδει στο

RBC ευελιξία ,ανθεκτικότητα και ανοχή. (Mohandas et Gallagher,2008)

3.2) Πρωτεϊνική σύσταση ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

Οι κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι πρωτεΐνες της μεμβράνης του RBC είναι τρεις :οι **διαμεμβρανικές** ,οι **περιφερειακές – σκελετικές** και οι **μεμβρανικές** πρωτεΐνες. Κυριότερες είναι οι δύο πρώτες κατηγορίες .

Διαμεμβρανικές λοιπόν χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που μπορούν να διαπερνούν τη διπλοστιβάδα των λιπιδίων και να εμφανίζουν αλληλεπιδράσεις με τον υδρόφιλο λιπιδικό πυρήνα. Οι πρωτεΐνες αυτές επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες και έτσι διακρίνονται σε πρωτεΐνες μεταφοράς ,προσκόλλησης σε άλλα κύτταρα του αίματος ή κύτταρα του ενδοθηλίου και τέλος σε πρωτεΐνες υποδοχείς ερεθισμάτων. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η πρωτεΐνη ζώνη 3 ή **διάυλος ανταλλαγής ανιόντων (band 3)** ,η **υδατοπορίνη 1(AQP1)** ,ο **μεταφορέας της γλυκόζης (GLUT1)** ,τα **αντιγόνα Kidd** ,η **γλυκοπρωτεΐνη του αντιγόνου Rhesus (RhAg)** ,οι **ΑΤΡάση $Na^+ - K^+$** και **ΑΤΡάση Ca^{2+}** .Η **γλυκοπρωτεΐνη Landsteiner-Weiner (LW)** και το **διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης 4 (ICAM-4)** συγκαταλέγονται στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες πρόσδεσης .Η τελευταία μάλιστα έχει την ικανότητα να αντιδράει με τα αντιγόνα Lutheran (Lu) αλλά και με υποδοχείς ιντεγκρίνης. Εξίσου σημαντικές πρωτεΐνες που διαπερνούν τη λιπιδική διπλοστιβάδα είναι οι **γλυκοφορίνες A ,B,C ,D**. (Pretini et al ,2019, Mohandas et Gallagher,2008) Αξίζει να αναφερθεί ότι οι πρωτεΐνες ζώνη 3 ,γλυκοφορίνη A και C ,RhAg καθώς και τα αντιγόνα Kell εμφανίζονται σε μεγαλύτερα ποσοστά στα ώριμα RBCs από ότι στην πρώιμη μορφή των δικτυοερυθροκυττάρων (Minetti et al ,2018) Έχουν αναγνωρισθεί περισσότερες από 50 διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ,οι μισές εκ των οποίων θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν ερυθροκυτταρική αντιγόνα (Mohandas et Gallagher,2008)

Οι περιφερειακές πρωτεΐνες δεν δύνανται να διεισδύσουν στο λιπιδικό πυρήνα αλλά αλληλεπιδρούν με άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες και λιπίδια. Ονομάζονται αλλιώς σκελετικές γιατί σχηματίζουν τον κυτταροσκελετό του RBC. Οι σημαντικότερες από αυτές τις πρωτεΐνες που απαρτίζουν το μεμβρανικό σκελετό είναι η **σπεκτρίνη** ,η **αγκυρίνη** ,η **ακτίνη** ,οι **πρωτεΐνες 4,1 R και 4,2** ,η **αδουσίνη** ,η **τροπομουσίνη** ,η **δεματίνη** και η **τροπομοντουλίνη** . (Mohandas et Gallagher,2008)

Τα χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες των σημαντικότερων πρωτεϊνών , συμπλεγμάτων και γενικότερα δομικών στοιχείων της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης θα αναλυθούν στη συνέχεια.

3.3) Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες

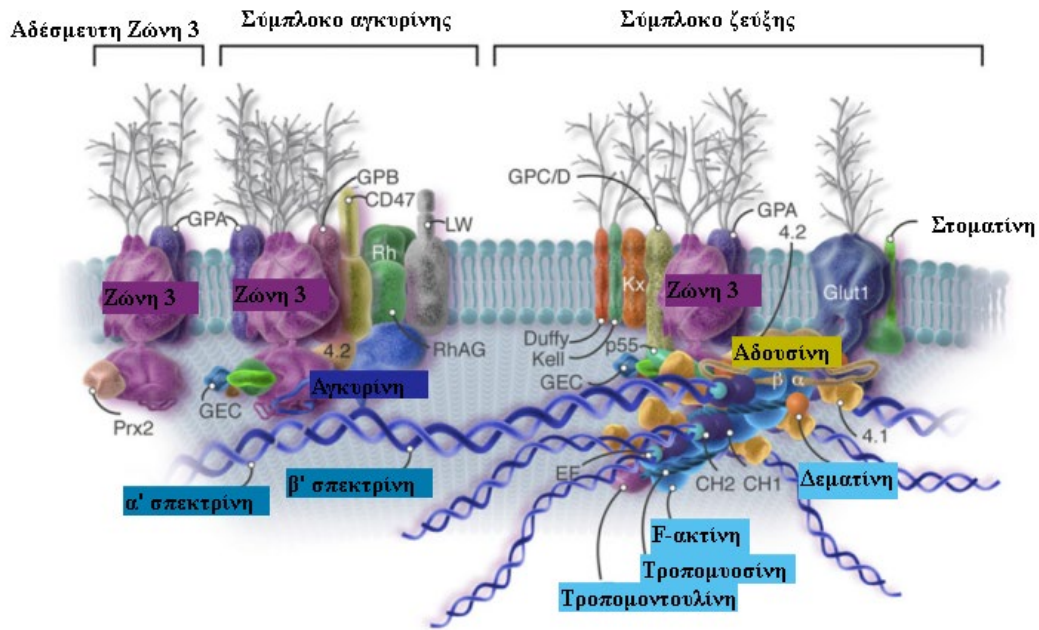
3.3.1) Πρωτεΐνη Ζώνη 3-Διάυλος ανταλλαγής ανιόντων

Η **πρωτεΐνη ζώνη 3(Εικόνα 6)** είναι η βασική διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης ,η οποία έχει το ρόλο του **διάυλου ανταλλαγής ανιόντων**. Ανήκει στην οικογένεια των διττανθρακικών μεταφορέων πρωτεϊνών ανταλλαγής ανιόντων (**SLC4A1**) και προσφέρει σημαντική σταθερότητα στη μεμβράνη όπως και οι υπόλοιποι ανταλλάκτες ανιόντων.(Reithmeir et al ,2016) Ως ρυθμιστής ανταλλαγής ανιόντων η ζώνη 3 μπορεί να διατηρεί την ισορροπία μεταξύ ενδοκυττάριας και εξωκυττάριας σύστασης της

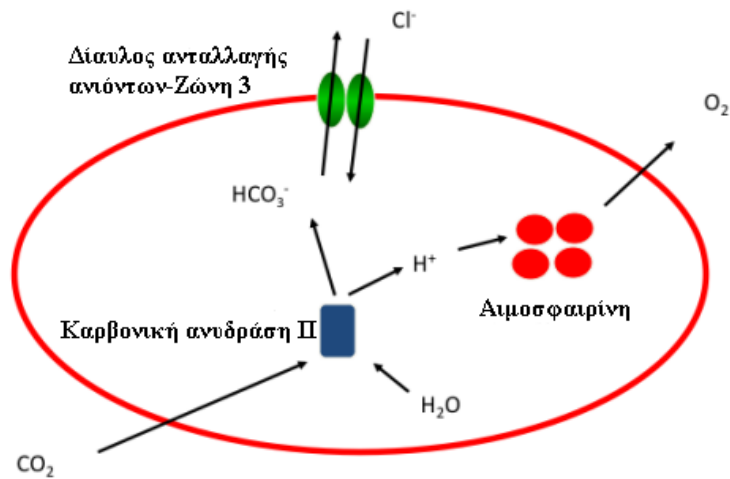
μεμβράνης του RBC συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στη διατήρηση της συνολικής ομοιόστασής του. (Pretini et al, 2019) Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη αυτή των 100kDa διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανταλλαγή ανιόντων χλωρίου και διττανθρακικών ανιόντων μεταξύ της πλασματικής ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, διαδικασία που καθορίζει την αποτελεσματική διαδικασία της αναπνοής. Στους διάφορους ιστούς η **καρβονική ανυδράση II (CAII)** επιδρά στο CO₂- που έχει διεισδύσει στο εσωτερικό του ερυθροκυττάρου -και το υδρογονώνει με αποτέλεσμα να παράγονται έτσι διττανθρακικά ανιόντα (HCO₃⁻). Αυτά μεταφέρονται έξω από το RBC μέσω της ανταλλαγής με ανιόντα χλωρίου (Cl⁻). Πιο συγκεκριμένα η ζώνη 3 συμμετέχει στον ακόλουθο κύκλο ανταλλαγής O₂ και CO₂ (**Εικόνα 7**): Το O₂ συνδέεται με την αιμοσφαιρίνη ενώ το CO₂ δεσμεύεται από τους ιστούς και μέσω της υδρογόνωσης του μετατρέπεται σε HCO₃⁻ και H⁺. Η ζώνη 3 λοιπόν απομακρύνει το δικαρβονικό ανιόν (HCO₃⁻) στο πλάσμα μέσω της ανταλλαγής με ανιόντα Cl⁻ όπως ήδη αναφέρθηκε και το πρωτόνιο προσδένεται στην αιμοσφαιρίνη προάγοντας έτσι την απελευθέρωση του O₂ στους ιστούς. (Reithmeir et al, 2016) Οποιαδήποτε μεταβολή στο μηχανισμό αυτό που καθορίζει το βαθμό ενυδάτωσης μεταξύ του ενδοκυττάρου και εξωκυττάρου χώρου της μεμβράνης, μπορεί να επηρεάσει και να διαφοροποιήσει τη γενικότερη λειτουργία του RBC. (Azouzi et al, 2018)

Η πρωτεΐνη ζώνη 3 αποτελείται από 911 επιμέρους αμινοξέα και κωδικοποιείται από το γονίδιο *SLC4A1*. Δομικά καθορίζεται από δύο τελικά πεδία: το **N-τελικό κυτταροπλασματικό πεδίο** και το **C-τελικό μεμβρανικό πεδίο**. Η επεξεργασία των ghost μεμβρανών των ερυθροκυττάρων -ερυθροκύτταρα που έχουν χάσει την αιμοσφαιρίνη τους- με πρωτεάση μπορεί να οδηγήσει στον ήπιο διαχωρισμό των δύο αυτών, χαρακτηριστικών για την πρωτεΐνη ζώνη 3, περιοχών. (Reithmeir et al, 2016) Η C-τελική μεμβρανική περιοχή είναι υπεύθυνη για την ικανότητα ανταλλαγής ανιόντων που διαθέτει η πρωτεΐνη, συνεπώς συμβάλλει στη μεταφορά του CO₂, όπως εξηγήθηκε παραπάνω. Από την άλλη η N-τελική κυτταροπλασματική περιοχή συμμετέχει στη σύνδεση της πρωτεΐνης με το μεμβρανικό σκελετό του RBC, στην πρόσδεση με γλυκολυτικά ένζυμα καθώς και στη δέσμευση της δεοξυαιμοσφαιρίνης. (Pretini et al, 2019) Γενικά η ζώνη 3 είναι ικανή να δημιουργεί συνδέσμους με τις γλυκοπρωτεΐνες A και B, το σύμπλεγμα Rh, τη GLUT1, τη στοματίνη καθώς και άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται με τη σπεκτρίνη μέσω της αγκυρίνης και της πρωτεΐνης 4,2R και με την ακτίνη μέσω της πρωτεΐνης 4,1R, 4,2R, p55, αδουσίνη και GLUT1. Ακόμη στην επιφάνεια της ζώνης 3 μπορεί να εντοπιστούν συνδεδεμένα και διάφορα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα. (Lux, 2016)

Αξίζει να αναφερθεί ότι ενώ σε ένα μεγάλο ποσοστό η ζώνη 3 εμφανίζεται με τη μορφή των διμερών, μπορεί να παρατηρηθεί και με τη μορφή τετραμερούς αλλά και ολιγομερούς. Σαν τετραμερές συνδέεται με τη σκελετική πρωτεΐνη 4,2 καθώς και με την αγκυρίνη. Τέλος σα μακροσύμπλοκο μπορεί και ενώνεται με σημαντικές πρωτεΐνες της μεμβράνης όπως η γλυκοφορίνη A, το RhAg ή το σύμπλεγμα Rh. (De Oliveira et Saldanha, 2010)



Εικόνα 6: Αναπαράσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης με έμφαση στις βασικές διαμεμβρανικές, σκελετικές και μεμβρανικές πρωτεΐνες καθώς και τη σύνδεση μεταξύ αυτών. (Ανατύπωση από Lux, 2016)

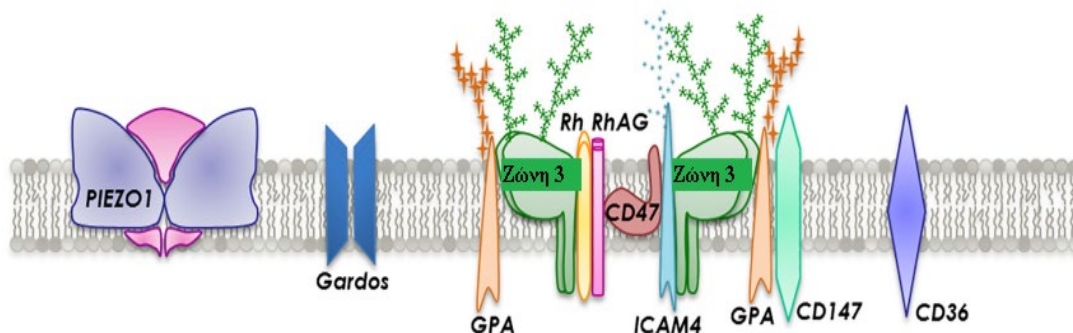


Εικόνα 7: Μηχανισμός ανταλλαγής HCO_3^- και Cl^- της ζώνης 3 που επιτυγχάνεται με τη δράση της καρβονικής ανυδράσης II. (Ανατύπωση από Reithmeir et al, 2016)

3.3.2) PIEZO 1

Ένα από τα πιο πρόσφατα συστατικά που έχει ανακαλυφθεί ότι παρατηρούνται στην επιφάνεια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης είναι το κανάλι κατιόντων **PIEZO 1**. (Εικόνα 8) Πρόκειται για μια μεγάλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από περίπου 2.500 αμινοξέα. Η οικογένεια των καναλιών PIEZO περιλαμβάνει τα κανάλια PIEZO 1 και 2, βέβαια στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη συναντάται μόνο το κανάλι PIEZO 1. Το κανάλι αυτό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του όγκου του ερυθροκυττάρου. Μεταλλάξεις που μπορεί να συμβούν στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του καναλιού PIEZO 1, οδηγούν σε μια κληρονομική ασθένεια που ονομάζεται χεροκυττάρωση, μια ενυδατωμένη μορφή της στοματοκυττάρωσης (Svetina et al, 2019). Οι γενετικές αυτές ανωμαλίες προκαλούν διαταραχές στην κινητική ικανότητα του καναλιού, στην ικανότητα απόκρισής του έναντι του οξειδωτικού στρες καθώς και στη συμβολή του στη μετακίνηση των μεμβρανών. (Glogowska et al, 2017)

Το κανάλι PIEZO 1 λειτουργεί υπό την επίδραση μηχανικών δυνάμεων. Ύστερα από μετρήσεις ηλεκτροφυσιολογικού χαρακτήρα έχει αποδειχθεί ότι η μηχανική αυτή επίδραση μεταφράζεται ως αυξημένη επιβολή έντασης στη μεμβράνη. Ένας βασικός μηχανισμός του καναλιού αυτού κατιόντων είναι η δραστική αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} η οποία ταυτόχρονα πυροδοτεί την αυξημένη εκροή του K^+ και όλα αυτά με την αντίστοιχη ενεργοποίηση του καναλιού Gardos (Cahalan et al, 2015) Πρόκειται για ένα κανάλι που ενεργοποιείται παρουσία Ca^{2+} και συναντάται σε μικρή ποσότητα στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Μία από τις βασικές του λειτουργίες λοιπόν είναι η ενεργοποίηση του καναλιού PIEZO1. (Pretini et al, 2019) Έχουν γίνει αρκετές υποθέσεις για το μηχανισμό δράσης του PIEZO1 και παρακάτω θα αναφερθούν οι επικρατέστερες. Ένας μηχανισμός δράσης αφορά τη λιπιδική σύσταση της μεμβράνης καθώς η μηχανική δύναμη που επιδρά σε αυτή μπορεί να προκαλέσει αναδιάταξη στη δομή της λιπιδικής στιβάδας της μεμβράνης και έτσι το κανάλι να ανοίξει. Αυτό είναι το λεγόμενο μοντέλο της «δύναμης από τα λιπίδια». Ένας άλλος μηχανισμός αποτυπώνεται στο μοντέλο της «δύναμης από τα νήματα». Το μοντέλο αυτό στηρίζεται στην αλληλεπίδραση και προσκόλληση του καναλιού είτε με το εξωκυτταρικό περιβάλλον είτε με τις πρωτεΐνες του σκελετού της μεμβράνης. (Murthy et al, 2017) Ο ακριβής τρόπος δράσης του καναλιού βρίσκεται ακόμη υπό διερεύνηση. Οι συνεχείς μελέτες υποδεικνύουν τη συμβολή του καναλιού στη γήρανση των ερυθροκυττάρων καθώς και στη ρύθμιση της κυκλοφορικής διατμητικής τάσης. Τέλος έχει διαπιστωθεί ότι το κανάλι PIEZO 1 σχετίζεται με την προσβολή του οργανισμού από το παράσιτο *Plasmodium Falciparum*. (Zuccala et al, 2016, Ma et al, 2018)



Εικόνα 8: Εικονική αναπαράσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης με την προσθήκη της θέσης του καναλιού PIEZO1 και με μια γενικότερη έμφαση στη θέση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών καθώς διαπερνούν τη στιβάδα των λιπιδίων. (Ανατύπωση από Pretini et al ,2019)

3.3.3) Λοιπές πρωτεΐνες μεταφοράς

Εκτός από τις ήδη αναφερθείσες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που έχουν το ρόλο του μεταφορέα υπάρχουν και άλλες σημαντικές πρωτεΐνες που παρατηρούνται στην επιφάνεια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης των οποίων οι λειτουργίες παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα. **(Πίνακας 1)** Για τις πρωτεΐνες αυτές δεν έχει ακόμη διαπιστωθεί αν έχουν την ικανότητα να ενισχύσουν την αλληλεπίδραση με άλλα κύτταρα. (Pretini et al ,2019)

Πίνακας 1: Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς και οι λειτουργίες τους (Pretini et al,2019)

GLUT1(Μεταφορέας γλυκόζης 1)	Μεταφορά και διακίνηση της γλυκόζης
ABCB6(Κασέττα δέσμευσης τριφωσφορικής αδενοσίνης)	Σύνθεση αίμης και μεταφορά πορφυρίνης
Μεταφορέας παθητικής ουρίας	Διατήρηση οσμωτικής σταθερότητας και σχηματικής ιδιομορφίας του κυττάρου
Υδατοπορίνη 1	Μεταφορά H ₂ O,συμβολή στο μεταβολισμό και στη μεταφορά του CO ₂

Υπάρχουν ακόμη κανάλια ρύθμισης όγκου του κυττάρου τα οποία διατηρούν τον όγκο του κυττάρου στα φυσιολογικά του επίπεδα και ονομάζονται VRAC(Volume Regulated Anion Channels). Ένα από αυτά είναι και το κανάλι κατιόντων PIEZO 1 που αναλύθηκε διεξοδικά προηγουμένως. Τέλος μια σημαντική πρωτεΐνη μεταφοράς είναι η ρυθμιστική μεμβρανική πρωτεΐνη **στοματίνη** η οποία αλληλεπιδρά με τα κανάλια VRAC (Rungaldier et al ,2013)

3.3.4) ICAM-4: Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης

Η πρωτεΐνη **ICAM-4** είναι διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη **(Εικόνα 8)** η οποία έχει την ικανότητα προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων και είναι επίσης συνυφασμένη με τις ονομασίες Landsteiner -Weiner και CD242. Αυτή η πρωτεΐνη λοιπόν εκτός από το να προσδένεται διακυτταρικά και να αλληλεπιδρά με τα διάφορα κύτταρα ,διαδραματίζει και ένα σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες του οργανισμού όπως η αιμόσταση και η θρόμβωση. (De Oliveira et Saldanha,2010) Η ICAM-4 σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τους υποδοχείς **ιντεγκρίνης** και δημιουργεί δεσμούς με αυτούς. Οι υποδοχείς αυτοί βρίσκονται στην επιφάνεια κυττάρων όπως τα λευκά αιμοσφαίρια (WBCs) και τα κύτταρα του ενδοθηλίου (ECs). Η ενεργοποίηση του διακυτταρικού αυτού μορίου είναι αποτέλεσμα της επίδρασης επινεφρίνης μέσω της οποίας μπορεί να συνδέεται άμεσα με τους υποδοχείς των ECs α,β3 ιντεγκρίνης. Όλα αυτά μέσω της cAMP-PKA οδού. Ακολουθεί ένας κύκλος μέσω του οποίου

η ICAM-4 ενεργοποιείται και συνδέεται με τα κύτταρα του ενδοθηλίου. Οι β_2 -αδρενεργικοί υποδοχείς των RBCs διεγείρονται από την ορμόνη επινεφρίνη ενώ με τη σειρά τους προκαλούν τη διέγερση της αδενικής κυκλάσης, η οποία λειτουργεί ως καταλύτης της αντίδρασης παραγωγής cAMP μέσω ATP. Η τελική φωσφορλίωση της ICAM-4 που οδηγεί στη σύνδεσή της με τους υποδοχείς $\alpha_v\beta_3$ ντεγκρίνης ξεκινάει από την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) από την ATP. Η διαδικασία αυτή γίνεται μέσω της εξωκυτταρικής κινάσης ρυθμιζόμενης από το σήμα 1/2 (ERK 1/2). Σε αυτό τον κύκλο αντιδράσεων οι πρωτεΐνες πρόσδεσης A-κινάσης (AKPs) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο καθώς βοηθούν την PKA να καταλάβει τη θέση της στο κύτταρο αλλά και ενισχύουν τη φωσφορλίωση υποδοχέων των RBCs που βρίσκονται κοντά στο κύτταρο. (Hermans et al., 2004, Du et al., 2014, Zhang et al., 2017)

Όπως ήδη αναφέρθηκε η πρωτεΐνη ICAM-4 συμμετέχει ενεργά στην αλληλεπίδραση RBCs και αιμοπεταλίων. Για το λόγο αυτό θεωρείται ότι συμμετέχουν σε λειτουργίες του οργανισμού όπως η αιμόσταση και η θρόμβωση. Η ICAM-4 μπορεί να συνδέεται με τον υποδοχέα $\alpha_{IIb}\beta_3$ (υποδοχέας ινωδογόνου) in vitro. Η σύνδεση του ινωδογόνου με αυτόν τον υποδοχέα μπορεί να αποφευχθεί με τη δράση ενός ειδικού πεπτιδίου της ICAM-4. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελαττωμένη εναπόθεση θρομβίνης και ινώδους καθώς και μικρότερο αριθμό παχύτερων ινών κατά το σχηματισμό θρόμβου. Όλα αυτά οδηγούν σε κλινικές επιπλοκές. (Hermans et al., 2004)

3.3.5) Γλυκοφορίνες

Πρόκειται για την οικογένεια αυτή των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν ενεργά στη ρύθμιση των μηχανικών ιδιοτήτων του ερυθροκυττάρου. Διακρίνονται σε γλυκοφορίνες **A, B, C, D και E (GPA-E)**. (Pretini et al., 2019, De Oliveira et Saldanha, 2010) Θεωρείται η πολυπληθέστερη ομάδα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης που αριθμεί χιλιάδες αντίγραφα ανά κύτταρο (Alenghat et Golan, 2013, Aoki, 2017) Αποτελούνται από τρεις περιοχές: την **κυτταροπλασματική περιοχή**, η οποία περιλαμβάνει τα τμήματα που βρίσκονται κοντά στην πλασματική μεμβράνη, την **υδροφοβική περιοχή** με μία μονή α έλικα που καταλήγει σε στιβάδα λιπιδίων και τέλος την **εξωκυτταρική περιοχή** με υψηλό βαθμό γλυκοζιλίωσης. (De Oliveira et Saldanha, 2010)

Οι γλυκοφορίνες είναι πρωτεΐνες που περιέχουν σιαλικά οξέα για αυτό και είναι γνωστές ως σιαλογλυκοπρωτεΐνες. Μεταξύ αυτών εκείνη που έχει σημαντική λειτουργία για την ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι η γλυκοφορίνη A. Συγκεκριμένα στη GPA οφείλεται το αρνητικό φορτίο της μεμβράνης, για το λόγο αυτό η εξωκυτταρική περιοχή είναι ισχυρά γλυκοζιλιομένη με γλυκάνες. (Poole, 2000, Pretini et al., 2019) Πρόκειται για μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 131 αμινοξέα και κατά τη βιοσύνθεση και μετακίνησή της στην πλασματική μεμβράνη παρουσιάζει μία αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη ζώνη 3 της μεμβράνης. Συγκεκριμένα η σύνθεση και σταθερότητα της GPA καθορίζονται σε σημαντικό βαθμό από τη ζώνη 3. (De Oliveira et Saldanha, 2010) Αξίζει ακόμη να αναφερθεί πως η περίπλοκη δομή της εξωκυτταρικής N-τελικής περιοχής που διαθέτει η GPA συνδέεται με τη σύσταση του **γλυκοκάλυκα**, μιας δομικής περιοχής που βρίσκεται στην περιφέρεια της κυτταρικής μεμβράνης. Τέλος η γλυκοφορίνη A επιτρέπει την πρόσδεση ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών στην επιφάνεια της μεμβράνης, εμποδίζοντας έτσι την γρήγορη εξάπλωσή τους στους υπόλοιπους ιστούς. Με τον γλυκοκάλυκα, τα μικρόβια αυτά που βρίσκονται συνδεδεμένα στη μεμβράνη δεν μπορούν να βλάψουν τον οργανισμό καθώς θα ακολουθήσουν τη φυσιολογική πορεία του ερυθροκυττάρου με την τελική καταστροφή του στο σπλήνα. (Morera et MacKenzie, 2011)

Τέλος η GPA μαζί με τις γλυκοφορίνες GPB και GPC έχει παρατηρηθεί ότι εμποδίζουν μια πιθανή προσβολή από παράσιτα που προκαλούν ελονοσία. Η ύπαρξη των σιαλογλυκοπρωτεϊνών στη μεμβράνη των RBCs αποτρέπουν την είσοδο των μεροζωϊτών (πρώιμη μορφή του παρασίτου) και κατ'επέκταση τον πολλαπλασιασμό του παρασίτου και τη μόλυνση του οργανισμού από αυτό. (Pretini et al ,2019)

3.4) Σκελετικές πρωτεΐνες

3.4.1) Σπεκτρίνη

Η κυριότερη πρωτεΐνη του υπομεμβρανικού σκελετού που θεωρείται και βασικό συστατικό του είναι η **σπεκτρίνη**. Είναι μια μακριά πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο αντιπαράλληλες αλυσίδες α' και β'σπεκτρίνης και χαρακτηρίζεται από θερμότητα και ελαστικότητα. Οι αλυσίδες αυτές με τη σειρά τους αποτελούνται από 106 αμινοξέα και από επαναλαμβανόμενα νημάτια τριπλής έλικας .Κάθε ένα από αυτά τα νημάτια δομείται από τριπλές έλικες τύπου α (A,B,C) και καταλήγουν να δημιουργούν ύστερα από δίπλωση μια τριπλή έλικα με τη μορφή του Z. Η αλυσίδα α σπεκτρίνης αποτελείται από 21 τέτοια επαναλαμβανόμενα νημάτια και ένα ξεχωριστό το α₀, ενώ η αλυσίδα β'σπεκτρίνης συντίθεται από 16 τέτοια νημάτια και το απομονωμένο β₁₇. Πάνω σε αυτά τα δομικά τμήματα υπάρχουν και σημαντικές λειτουργικές περιοχές .Η κεφαλή των τμημάτων είναι λειτουργικά σημαντική για τα διμερή-τετραμερή σπεκτρίνης αλλά και για την αγκυρίνη ενώ το τελικό άκρο για την πρόσδεση των πρωτεϊνών 4,1R , 4,2 ,νηματίων ακτίνης κ.α. Η σχέση της σπεκτρίνης με την ακτίνη ,που είναι μια εξίσου σημαντική πρωτεΐνη του υπομεμβρανικού σκελετού ,συνοψίζεται στο ότι 6 μόρια σπεκτρίνης συνδέονται ανά ένα νημάτιο ακτίνης σχηματίζοντας έτσι ένα ψευδοεξαγωνικό σκελετό. (Lux ,2016)

Στις αλυσίδες α'και β'σπεκτρίνης επιδρούν πλευρικές δυνάμεις και δημιουργείται έτσι ένα αντιπαράλληλο ετεροδιμερές. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές προέρχονται από τα νημάτια τριπλής έλικας 19 και 20 της α'σπεκτρίνης στο καρβοξυτελικό της άκρο και τα αντίστοιχα νημάτια 1 και 2 της β' σπεκτρίνης στο αμινοτελικό της άκρο. Από την άλλη αλληλεπιδράσεις του ενός διμερούς στη μια έλικα της α' σπεκτρίνης και συγκεκριμένα στο αμινοτελικό της άκρο με το άλλο διμερές της β'σπεκτρίνης στις δυο έλικες του καρβοξυτελικού της άκρου ,οδηγούν στο σχηματισμό του **τετραμερούς της σπεκτρίνης**. Το τετραμερές της σπεκτρίνης αποτελεί το θεμελιώδες δομικό στοιχείο του υπομεμβρανικού σκελετού και παρατηρείται σε αυτόν σε ένα ποσοστό 95% .(Lux ,2016, Mohandas et Gallagher,2008)

Η πρωτεΐνη αυτή λοιπόν χαρακτηρίζεται από μεγάλη ελαστικότητα ,χωρίς να υπάρχει μια εμπεριστατωμένη άποψη για την απόκτηση αυτής της σημαντικής ιδιότητας. Ωστόσο υπάρχει μια θεωρία που υποστηρίζει ότι τα επαναλαμβανόμενα νημάτια σπεκτρίνης μπορούν να αποδομούνται σε υψηλές θερμοκρασίες και στη συνέχεια να επανέρχονται στην αρχική τους μορφή ,με αποτέλεσμα να γίνεται μικρότερο το μήκος του συμπλέγματος σπεκτρίνης. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι ακόμη και σε φυσιολογικές θερμοκρασίες μπορεί να υπάρξει μια αναδίπλωση των νηματίων σπεκτρίνης σε περίπτωση παραμόρφωσης του RBC. Τα παραπάνω λοιπόν ενισχύουν την ελαστικότητα που διαθέτει η σπεκτρίνη.(Johnson et al., 2007)

3.4.2) Ακτίνη και συσχετιζόμενες με αυτή πρωτεΐνες

Η **ακτίνη** εμφανίζεται στη μεμβράνη με τη μορφή νηματίων .Τα νημάτια αυτά έχουν σχετικά μικρό μήκος , σχηματίζουν διπλή έλικα και είναι κυρίως μονομερή ακτίνης. Συναντώνται με τον όρο «πρωτονημάτια». Κάθε ερυθροκύτταρο διαθέτει περίπου 30.000-40.000

πρωτονημάτια ακτίνης τα οποία έχουν ανώμαλη κατεύθυνση .Ακόμη σε κάθε έλικα συναντώνται 6-8 μονομερή ακτίνης.. Τα μονομερή ακτίνης συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ολιγομερές F-ακτίνης. *(Lux ,2016)*

Η ακτίνη μπορεί να συνδεθεί με τη σπεκτρίνη μέσω της πρωτεΐνης 4,1R καθώς και με άλλες πρωτεΐνες του υπομεμβρανικού σκελετού όπως την αδουσίνη, δεματίνη και χωρεΐνη. Επιπλέον τα νημάτια ακτίνης σχηματίζουν δεσμούς με τις πρωτεΐνες **τροπομουσίνη** και **τροπομοντουλίνη 1** ,οι οποίες είναι άμεσα συσχετιζόμενες με αυτά.

Η **τροπομουσίνη (TM)** είναι ένα μακροσκελές διμερές που αποτελείται από α και γ ισομορφές τροπομουσίνης (hTM5b και hTM5 αντίστοιχα) κάθε μία από τις οποίες προσδένεται σε μία από τις δύο έλικες που δημιουργούν τα νημάτια της ακτίνης *(Mohandas et Gallagher, 2008)*. Οι ισομορφές της τροπομουσίνης έχουν την ικανότητα να δημιουργούν δεσμούς και με την τροπομοντουλίνη. Σημαντική προϋπόθεση για τη δημιουργία αυτών των δεσμών είναι η ύπαρξη μαγνησίου. Η πρωτεΐνη λοιπόν αυτή έχει το κατάλληλο μήκος (~34nm)έτσι ώστε να μπορεί να προσδένεται και με τα 7 μονομερή ακτίνης που βρίσκονται στην κάθε έλικα του ολιγομερούς F-ακτίνης. Για το λόγο αυτό η τροπομουσίνη έχει το διττό ρόλο της ρύθμισης και ενδυνάμωσης της δομής που δημιουργούν τα νημάτια ακτίνης. Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι η τροπομουσίνη προσδίδει σταθερότητα στο ερυθροκύτταρο καθώς έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα που υπολείπονται της TM χαρακτηρίζονται από ευθραυστότητα.*(An et al., 2007, Lux ,2016)*

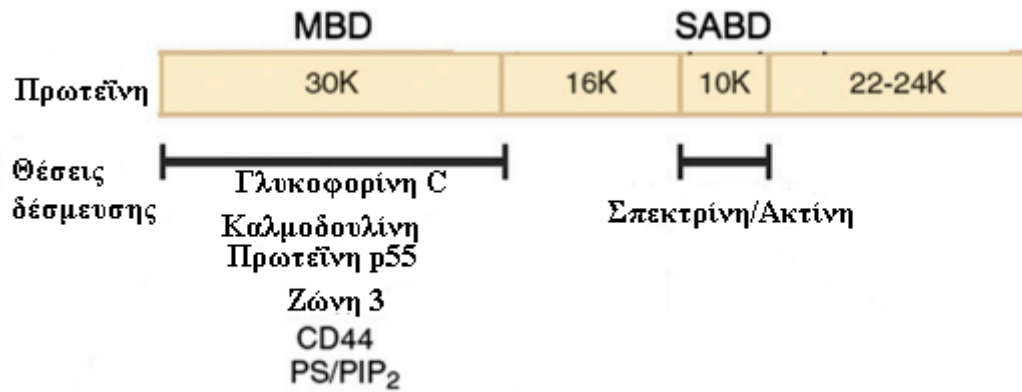
Η **τροπομοντουλίνη 1 (TMD 1)** είναι μια ακόμη πρωτεΐνη που σχετίζεται άμεσα με τη δομή των νηματίων της ακτίνης. Συναντάται 30.000 φορές σε κάθε ερυθροκύτταρο και 1 φορά στη δομή των νηματίων ακτίνης. Οι λειτουργίες αυτής της πρωτεΐνης συνοψίζονται στα παρακάτω :σηματοδοτεί το τερματικό σημείο επέκτασης των νηματίων ακτίνης, συγκεκριμένα το καλύπτει, καθορίζοντας έτσι το τελικό μήκος στο οποίο εκτείνονται καθώς και δεσμεύει την τροπομουσίνη. Μάλιστα η TM βοηθάει στην κάλυψη αυτών των σημείων. Έτσι τόσο τα διμερή TM όσο και τα νημάτια ακτίνης μπορούν να συνδεθούν με ένα μόριο TMD1. *(Moyer et al., 2010, Yamashiro et al., 2012, Sui et al., 2014)*

3.4.3) Πρωτεΐνη 4,1R

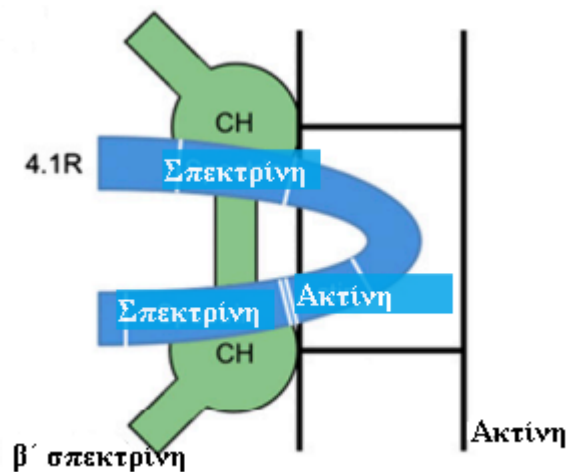
Η **πρωτεΐνη 4,1R** αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική πρωτεΐνη του υπομεμβρανικού σκελετού καθώς συμβάλλει στη δημιουργία δεσμών μεταξύ σπεκτρίνης και ακτίνης .Συγκεκριμένα καθιστά πιο ισχυρό το δεσμό σπεκτρίνης και F-ακτίνης δημιουργώντας έτσι ένα ισχυρό σύμπλεγμα. Ο δεσμός αυτός χωρίς την ύπαρξη της πρωτεΐνης 4,1R θα ήταν ιδιαίτερα ασθενής. Κατ'επέκταση ενισχύει τη σύνδεση της πλασματικής μεμβράνης του ερυθροκυττάρου με τον υπομεμβρανικό σκελετό. Συμπερασματικά λοιπόν λειτουργεί σα συμπάραγοντας για το σύμπλοκο σπεκτρίνης ακτίνης ,η θέση του οποίου βρίσκεται περίπου στη μέση της πρωτεΐνης 4,1R και καλύπτει μια περιοχή 10k-Da που συμβολίζεται SABD.**(Εικόνα 9)** Σε αυτή την περιοχή ένα διπλό μόριο σπεκτρίνης στην αμινοτελική περιοχή του δεσμεύει την ακτίνη **.(Εικόνα 10)** Η δομική αυτή σύσταση της πρωτεΐνης 4,1R προσδίδει μια σταθερότητα στο ερυθροκύτταρο *(Han et al., 2000, Gimm et al.,2002)*. Μία ακόμη σημαντική περιοχή της πρωτεΐνης αυτής θεωρείται το N-τελικό της άκρο το οποίο αποτελεί σημείο πρόσδεσης για άλλες πρωτεΐνες όπως η γλυκοφορίνη C, η πρωτεΐνη p55, η πρωτεΐνη ζώνη 3 κ.α .

Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη 4,1R παρουσιάζει ανταγωνιστική συμπεριφορά ως προς την αγκυρίνη για το ποια από τις δύο θα καταφέρει να συνδεθεί με την πρωτεΐνη ζώνη 3.*(Lux ,2016)*

Εκτός από την πρόσδεσή της σε άλλες πρωτεΐνες, η πρωτεΐνη 4,1R είναι γνωστή και για τη σύνδεση της με λιπίδια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Δημιουργεί λοιπόν δεσμούς με τη φωσφατιδυλοσερίνη και την 4,5διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP₂). Μάλιστα η τελευταία εντοπίζεται στην περιοχή ανάμεσα στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης 4,1R. (Baines, 2009)



Εικόνα 9: Δομική οργάνωση της πρωτεΐνης 4,1R με έμφαση στις θέσεις πρόσδεσης με πρωτεΐνες και λιπίδια. (Ανατύπωση από Lux, 2016)



Εικόνα 10: Σύμπλεγμα σπεκτρίνης -ακτίνης στη θέση SABD της πρωτεΐνης 4,1R. (Ανατύπωση από Lux, 2016)

3.4.4) Αδουσίνη

Η **αδουσίνη** είναι μια πολύπλοκη δομικά πρωτεΐνη που εμφανίζεται 30.000 φορές σε ένα ερυθροκύτταρο. Συνίσταται κυρίως από τις υπομονάδες α' ή β' και σπανιότερα από τις υπομονάδες γ'. Το αβ ετεροδιμερές, όμως είναι η μορφή με την οποία επικρατεί (Joshi et al., 1991, Kullman et al., 1996). Οι μορφές αυτές προσδίδουν στο μόριο της αδουσίνης μια σφαιρική κεφαλή και ένα εύκαμπτο, επιμήκες άκρο που σχηματίζει ουρά. Οι λειτουργίες της συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη γενικότερη λειτουργία του υπομεμβρανικού σκελετού. Συγκεκριμένα η αδουσίνη οριοθετεί την επέκταση των νηματίων της ακτίνης καθώς επίσης τοποθετεί και μόρια σπεκτρίνης γύρω από αυτή. Η «στρατολόγηση» αυτή των μορίων σπεκτρίνης ενισχύει τη σηματοδότηση των τερματικών σημείων ανάπτυξης της δομής των νηματίων της ακτίνης. Η καλμοδουλίνη και διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες συμβάλλουν στη ρύθμιση και των δύο παραπάνω λειτουργιών. (Matsuoka et al., 1996)

Σημαντικός είναι ο ρόλος της αδουσίνης στη σύνδεση του μεμβρανικού σκελετικού δικτύου με τη λιπιδική στιβάδα της πρωτεϊνικής μεμβράνης. Ενισχύει τη σύνδεση αυτή μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη ζώνη 3 και τον μεταφορέα της γλυκόζης 1 (GLUT1). Όσον αφορά στη ζώνη 3, στην ουρά των α' και β' υποομάδων αδουσίνης εντοπίζεται η θέση πρόσδεσής της. (Lux, 2016)

3.4.5) Δεματίνη

Η **δεματίνη** είναι μια πρωτεΐνη που διαθέτει δύο θέσεις δέσμευσης ακτίνης. Η μία από αυτές τις θέσεις εντοπίζεται στο τελικό άκρο του μορίου της πρωτεΐνης και η άλλη στην κεφαλή του. Στη φυσική του κατάσταση έχει τη μορφή του τριμερούς, αλλά μπορεί να υπάρχει στη μεμβράνη και σε μονομερές (Chen et al., 2013). Η αρχική λειτουργία της δεματίνης είχε αποδειχθεί ότι είναι η δημιουργία δεσμών με την ακτίνη και το πακετάρισμα της τελευταίας σε νημάτια συγκεκριμένου μήκους. Βέβαια πιο πρόσφατα έχει επικρατήσει η άποψη ότι στα ώριμα ερυθροκύτταρα η χρησιμότητα της δεματίνης για τον υπομεμβρανικό σκελετό οφείλεται σε δύο βασικές λειτουργίες. Η πρώτη λειτουργία αφορά στην ενίσχυση του δεσμού σπεκτρίνης - ακτίνης, η οποία επιτυγχάνεται με την ανεπηρέαστη μοριακή δομή της δεματίνης. Αξίζει να τονιστεί ότι η δράση της πρωτεϊνικής κινάσης A αναστέλλει τη σημαντική αυτή λειτουργία της δεματίνης. Η δεύτερη δράση της πρωτεΐνης αυτής που την καθιστά ιδιαίτερα λειτουργική είναι η ενίσχυση της πρόσδεσης της ακτίνης στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη μέσω της πρόσδεσης της δεματίνης στον μεταφορέα της γλυκόζης 1 (GLUT1). (Khan et al., 2008, Koshino et al., 2012)

3.4.6) Αγκυρίνη

Η **αγκυρίνη** είναι η πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση άλλων πρωτεϊνών στη λιπιδική στιβάδα της μεμβράνης καθώς και για τη σύνδεση της σπεκτρίνης στο σύμπλεγμα της ζώνης 3. Το μόριο της αγκυρίνης χωρίζεται σε τρεις ευδιάκριτες λειτουργικές περιοχές (Grey et al., 2012). Πολλά επαναλαμβανόμενα τμήματα αγκυρίνης συντελούν την περιοχή της μεμβράνης, η οποία χρησιμεύει για τη δέσμευση τετραμερών της πρωτεΐνης ζώνη 3. Υπάρχουν δύο εξηγήσεις για το πως προσδέονται αυτά τα τετραμερή, χωρίς να είναι γνωστό ποια από τις δύο επικρατεί ή αν απλά εναλλάσσονται. Η μία άποψη λοιπόν υποστηρίζει ότι η ζώνη 3 πλησιάζει την αγκυρίνη αφού έχει σχηματίσει αυθαίρετα τα τετραμερή της, τα οποία στη συνέχεια σταθεροποιούνται. Από την άλλη θεωρείται ότι δεσμεύονται δύο διμερή ζώνης 3 από την αγκυρίνη καθώς διαθέτει δύο αντίστοιχες θέσεις δέσμευσης. Τα διμερή αυτά αποκτούν σταδιακά τη μορφή του τετραμερούς. (Lux, 2016)

Η αγκυρίνη διαθέτει ακόμη μια περιοχή με την οποία συνδέεται με την σπεκτρίνη. Μια ειδική περιοχή, η οποία συντίθεται από το 14^ο και 15^ο επαναλαμβανόμενο νημάτιο της β΄ σπεκτρίνης ,συνδέεται με μια υποπεριοχή της αγκυρίνης που συμβολίζεται ως ZU5A. **(Εικόνα 11)** Ένα μόριο αγκυρίνης προσδένεται σε ένα τετραμερές β΄ σπεκτρίνης . Η αλληλεπίδραση αυτή της αγκυρίνης με τη σπεκτρίνη ενισχύεται και από τη σύνδεση της πρώτης με την πρωτεΐνη ζώνη 3. (Giorgi et al., 2001, Blanc et al., 2010).



Εικόνα 11 : Πρόσδεση ενός μορίου αγκυρίνης με το τετραμερές της β΄ σπεκτρίνης στην ειδική θέση πρόσδεσης ZUS5A. (Ανατύπωση από Lux ,2016)

3.4.7) Λοιπές σκελετικές πρωτεΐνες

Παραπάνω αναφέρθηκαν εκτενώς οι λειτουργίες σημαντικών σκελετικών πρωτεϊνών για τον υπομεμβρανικό σκελετό. Υπάρχουν όμως και άλλες πρωτεΐνες που ολοκληρώνουν και συμπληρώνουν τη δομή του υπομεμβρανικού σκελετικού δικτύου ,οι λειτουργίες των οποίων αναφέρονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα

Πίνακας 2:Λοιπές σκελετικές πρωτεΐνες και οι λειτουργίες τους(Lux ,2016)

p55	Πρόσδεση συμπλέγματος ακτίνης στη μεμβράνη με τη συμβολή των GPC/D και της πρωτεΐνης 4.1R. Συμμετοχή στη δομική οργάνωση της λιπιδικής στιβάδας
Παλλιδίνη (πρωτεΐνη 4.2)	Πρόσδεση στη ζώνη 3,στην αγκυρίνη και στο CD47 καθώς και στο σύμπλεγμα αγκυρίνης ζώνης 3. Σύνδεση με μια περιοχή της α΄ σπεκτρίνης

3.5) Σύμπλοκα ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

Τα σύμπλοκα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη σύνδεση του μεμβρανικού σκελετού σπεκτρίνης -ακτίνης με τη λιπιδική στιβάδα της μεμβράνης.. Δύο είναι τα βασικά σύμπλοκα που συμβάλλουν στην ολοκληρωμένη αυτή παρουσία της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και είναι τα εξής : Το **σύμπλοκο ζώνης 3** ή **σύμπλοκο αγκυρίνης** και το **σύμπλοκο ζεύξης**. Το έργο αυτών των σημαντικών δομικών στοιχείων της μεμβράνης συμπληρώνει το **σύμπλοκο Rhesus**. Οι θέσεις των συμπλόκων πάνω στη μεμβράνη παρουσιάζονται εμφανώς στην [Εικόνα 6](#).

3.5.1) Σύμπλοκο αγκυρίνης ή ζώνης 3

Οι βασικές πρωτεΐνες που συγκροτούν το **σύμπλοκο της αγκυρίνης (Εικόνα 12)** είναι η ζώνη 3 και η αγκυρίνη .Βέβαια υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτό. Αναλυτικά το σύμπλοκο της αγκυρίνης αποτελείται από ένα 1 μόριο αγκυρίνης , 1 τετραμερές της πρωτεΐνης ζώνη 3 , ετεροδιμερή ή διμερή της γλυκοφορίνης Α ή Β ,δύο μόρια πρωτεΐνης 4.2 και το **σύμπλοκο Rhesus** (το οποίο θα αναλυθεί διεξοδικά στη συνέχεια).Το σύμπλοκο Rhesus και το σύμπλοκο αγκυρίνης θα συνδεθούν μεταξύ τους δημιουργώντας στη μεμβράνη ένα **μακροσύμπλοκο**. Σε μικρότερες στοιχειομετρικές ποσότητες με συμμετοχή σε συγκεκριμένες υποπεριοχές του συμπλόκου εμφανίζονται τα ακόλουθα συστατικά : το ερυθροκυτταρικό αντιγόνο CD47 ,η Landsteiner-Weiner πρωτεΐνη και άλλες γλυκολυτικές πρωτεΐνες. Η θέση των συστατικών αυτών πάνω στη μεμβράνη και η συμβολή τους στη λειτουργία του συμπλόκου αποτελεί ακόμη αντικείμενο μελέτης των ερευνητών. (*Lux ,2016*)

Οι σχέσεις μεταξύ των πρωτεϊνών του συμπλόκου είναι αλληλένδετες ,γεγονός που συμβάλλει ενεργά στη λειτουργικότητά του. Συνεπώς η ελλιπής παρουσία της πρωτεΐνης ζώνη 3 από τη μεμβράνη συνεπάγεται και την ελλιπή παρουσία της πρωτεΐνης 4.2 και της γλυκοφορίνης Α. Αντίστοιχα η έλλειψη του CD47 αντιγόνου είναι αποτέλεσμα της έλλειψης της πρωτεΐνης 4.2. Οποιαδήποτε έλλειψη ισορροπίας μεταξύ αυτών των σχέσεων μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις του γονιδίου του συμπλόκου της αγκυρίνης και κατ'επέκταση σε κάποια δυσλειτουργική κατάσταση για το ίδιο το ερυθροκύτταρο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η κληρονομική σφαιροκυττάρωση ,η οποία προέρχεται από τη λανθασμένη σύσταση στη δομή του συμπλόκου της αγκυρίνης. Συγκεκριμένα προκύπτει από παραλλαγές στη δομή της σπεκτρίνης ,της αγκυρίνης ,της ζώνης 3 και της πρωτεΐνης 4.2.Οι περισσότερες παραλλαγές βέβαια αφορούν σε αυτές τις πρωτεΐνες. (*Bruce et al., 2002, Lux ,2016*)

3.5.2)Σύμπλοκο ζεύξης

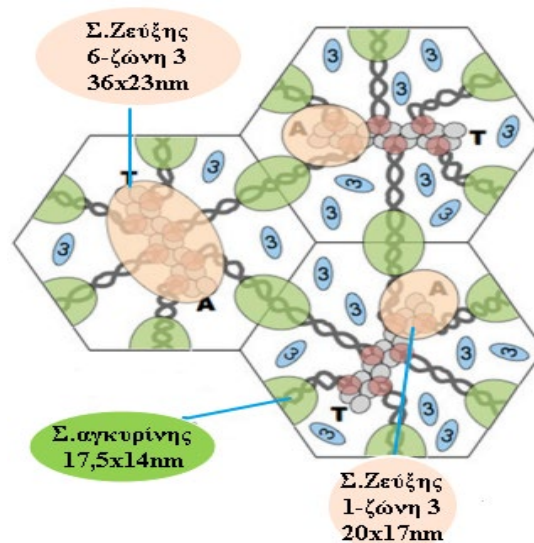
Το σύμπλοκο αυτό είναι γνωστό ως το **σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης. (Εικόνα 12)** Αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι το συγκροτούν αποκλειστικά και μόνο οι πρωτεΐνες 4.1R ,p55 και οι γλυκοφορίνες C και D με την καθεμία να επηρεάζει τη λειτουργία των άλλων 2 (*Han et al., 2000*). Σταδιακά αποδείχθηκε ότι η δομή αυτού του συμπλόκου είναι αρκετά πολυπλοκότερη και εκτός από τις προαναφερθείσες ,στο σχηματισμό του συμμετέχουν και άλλες πρωτεΐνες . Καθοριστικό ρόλο για το σύμπλοκο ζεύξης διαδραματίζει η ζώνη 3 με την οποία δύναται να συνδεθεί η πρωτεΐνη 4.1R του συμπλόκου και για το σκοπό αυτό ανταγωνίζεται με την αγκυρίνη ,καθώς η ζώνη 3 συμμετέχει ενεργά και στο σύμπλοκο αγκυρίνης .Το αποτέλεσμα αυτής της ανταγωνιστικής συμπεριφοράς είναι να συνδέονται σε διαφορετικούς πληθυσμούς της επιθυμητής πρωτεΐνης. Η σχέση της πρωτεΐνης 4.1R με τη ζώνη 3 είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών ειδών που έχουν τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης για

την πρωτεΐνη 4.1R. Επιπλέον η θέση δέσμευσης της ακτίνης στο τελικό άκρο της σπεκτρίνης προσδένει την πρωτεΐνη 4.2 η οποία είναι λειτουργική για τη μεμβράνη όταν συνδεθεί με την ζώνη 3. Και αυτή η σύνδεση αποτελεί μέρος του συμπλόκου. Μία ακόμη σχέση που επηρεάζει την παρουσία του συμπλόκου στη μεμβράνη είναι η σύνδεση της ζώνης 3 με την αδουσίνη. Με τον τρόπο αυτό επισημαίνεται ένας γειτονικός πληθυσμός ζώνης 3 για την ακτίνη του συμπλόκου. (Lux ,2016)

Η στοιχειομετρική αναλογία του συμπλόκου ερμηνεύεται ως εξής :1 μόριο ακτίνης δεσμεύει 6 μόρια σπεκτρίνης και 6 μόρια πρωτεΐνης 4.1R ,ενώ ταυτόχρονα υπάρχουν επαρκή ποσά των πρωτεϊνών ζώνη 3 ,γλυκοφορίνη A ,C και D ,GLUT1 και στοματινή έτσι ώστε γύρω από ένα νημάτιο ακτίνης να εντοπίζονται 6 σύμπλοκα. Σε αυτή τη δομική αλληλουχία και γύρω από το ίδιο νημάτιο ακτίνης προστίθεται 1 μόριο αδουσίνης και 3 μόρια δεματίνης σα μονομερές ή ένα μόριο σα τριμερές. Στο σύμπλοκο αυτό οι βασικές πρωτεΐνες 4.1R ,p55 και γλυκοφορίνη C/D εμφανίζονται σα τριπλέτα. Το σύμπλοκο ζεύξης ακόμη περιλαμβάνει και ορισμένα γλυκολυτικά ένζυμα όπως τα αντιγόνα Kx ,Kell και Duffy. (Kodippili et al., 2012)

Όσον αφορά στην παρουσία της ζώνης 3 στο σύμπλοκο ,οι απόψεις δίστανται. Από τη μία θεωρείται ότι η ζώνη 3 εμφανίζεται σα διμερές το οποίο έρχεται σε επαφή με τις βασικές πρωτεΐνες του συμπλόκου που είναι το πακέτο των έξι δυνάδων σπεκτρίνης και πρωτεΐνης 4.1R. Από την άλλη υποστηρίζεται ότι όλα τα μόρια σπεκτρίνης και πρωτεΐνης 4.1R μπορούν να αλληλεπιδράσουν με 3 ή 6 διμερή της ζώνης 3 σε ένα μεγαλύτερο σε μέγεθος σύμπλοκο ζεύξης. Και οι δύο αυτές εκδοχές είναι ενσωματωμένες στην **Εικόνα 12**. (Kodippili et al., 2012, Lux ,2016)

Τέλος σημαντική είναι η σχέση του συμπλόκου ζεύξης με το σύμπλοκο αγκυρίνης. Συχνότερα σε φάσεις ηρεμίας και σπανιότερα σε συνθήκες παραμόρφωσης του ερυθροκυττάρου τα σύμπλοκα βρίσκονται σε σύγκρουση καθώς η θέση τους πάνω στη μεμβράνη φαίνεται να είναι γειτονική. Η διαπίστωση αυτή για τη σχέση των συμπλόκων δημιουργεί την υποψία ότι ίσως οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν και προσδένονται και στα δύο σύμπλοκα να μπορούν να εναλλάσσουν μεταξύ τους τον τρόπο με τον οποίο επιδρούν στα σύμπλοκα. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι η ζώνη 3 , η πρωτεΐνη 4.1R ,η πρωτεΐνη 4.2 και η αδουσίνη οι οποίες πολλές φορές επιδεικνύουν ανταγωνιστική συμπεριφορά προκειμένου να προσδεθούν στην ίδια θέση. (Lux ,2016)



Εικόνα 12: Τα σύμπλοκα αγκυρίνης και ζεύξης και η σχέση μεταξύ τους. Στην εικόνα φαίνεται η δομή του συμπλόκου ζεύξης και με τις δύο εκδοχές παρουσίας της ζώνης 3 (Ανατύπωση από *Lux, 2016*)

3.5.3) Σύμπλοκο Rhesus

Το **σύμπλοκο Rhesus** είναι ένα τετραμερές που συντίθεται από τον συνδυασμό 2 Rhesus πεπτιδίων και 2 Rhesus γλυκοπρωτεϊνών (RhAg). Οι πρωτεΐνες του συμπλόκου συμβάλλουν ενεργά στην αποτελεσματικότητα των μεταγίσεων ,λόγω της ισχυρής εξειδίκευσης των αντιγονικών τους ιδιοτήτων. Η σταθερότητα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και η δομική της κατασκευή είναι ορισμένες ιδιότητες τις οποίες ενισχύει το σύμπλοκο Rhesus. Ακόμη οι Rh πρωτεΐνες του συμπλόκου χαρακτηρίζονται για τη συμμετοχή τους στη μεταφορά του μορίου NH_4^+ αλλά και στη διαπερατότητα που προσδίδουν κατά το ήμισυ στο CO_2 μαζί με τη συνεισφορά της υδατοπορίνης 1. Τέλος οι γλυκοπρωτεΐνες του συμπλόκου βοηθούν στην κυκλοφορία του CO_2 και της NH_3 ,μέσω της δημιουργίας ενός καναλιού διόδου αερίων. (Pretini et al,2019)

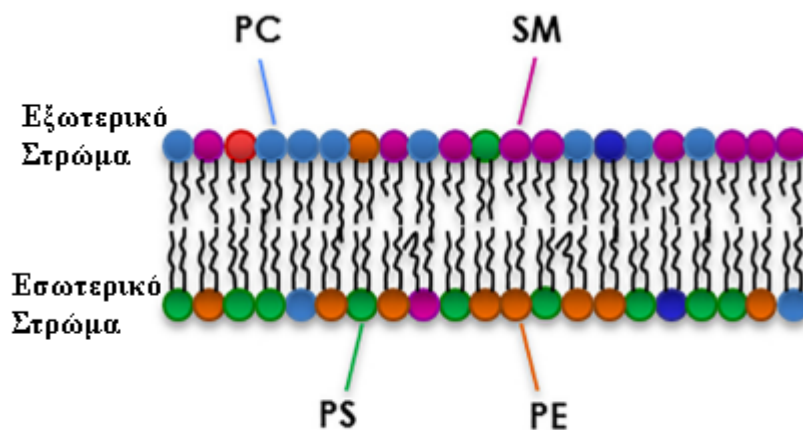
3.6) Λιπιδική σύσταση μεμβράνης

Τα μεμβρανικά λιπίδια που συναντώνται στα ερυθροκύτταρα είναι διαφορετικών ειδών και κατανέμονται έτσι στη μεμβράνη ώστε να υπάρχει ίση αναλογία χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων . Υπάρχουν 4 σημαντικά είδη φωσφολιπιδίων που καθορίζουν τη δομική σύσταση της λιπιδικής διπλοστιβάδας ,τα οποία είναι ασύμμετρα κατανεμημένα μεταξύ των δύο στρωμάτων.(**Εικόνα 13**) Αντίθετα η χοληστερόλη εμφανίζει ίση κατανομή. Στην εξωτερική στιβάδα κυριαρχεί η **φωσφατιδυλοχολίνη (PC)** οποία αποτελεί και το 27% των συνολικών φωσφολιπιδίων της μεμβράνης. Σε ένα σημαντικό ποσοστό στο εξωτερικό στρώμα βρίσκεται επίσης και η **σφιγγομυελίνη (SM)** ,η οποία αποτελεί το 23% των μεμβρανικών λιπιδίων. Στην εσωτερική μονοστιβάδα αφθονούν τα εξής φωσφολιπίδια: η **φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE)** σε ένα ικανοποιητικό ποσοστό(30% των συνολικών μεμβρανικών λιπιδίων) και η σημαντική **φωσφατιδυλοσερίνη (PS)**. Σε αρκετά μικρότερη ποσότητα υπάρχουν εσωτερικά και τα **φωσφοϊνσιτίδια (PI)** .Εκτός από τα ασύμμετρα κατανεμημένα στη μεμβράνη φωσφολιπίδια υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που χρησιμεύουν στη μεταφορά αυτών των λιπιδίων και είναι οι **φλιππάσες** ,οι **φλοππάσες** και οι **σκραμπλάσες**. Η ασυμμετρία της μεμβράνης είναι αποτέλεσμα της δράσης της φλιππάσης και της φλοππάσης ενώ η έλλειψη ασυμμετρίας και κατ'επέκταση η διαταραχή της ομοιόστασης της είναι επακόλουθο της ενεργοποίησης της σκραμπλάσης. .(Pretini et al,2019) Πιο ειδικά τα φωσφολιπίδια μεταφέρονται από την εξωτερική στιβάδα στην εσωτερική μέσω της φλιππάσης ,από την εσωτερική στην εξωτερική μέσω της φλοππάσης και μέσω της σκραμπλάσης καλύπτονται και οι δυο κατευθύνσεις. Όλα τα παραπάνω μπορούν να επιτευχθούν για κάποιες πρωτεΐνες με κατανάλωση ενέργειας ενώ για άλλες χωρίς. (Mohandas et Gallagher ,2008)

Όσον αφορά στην προσφορά της **χοληστερόλης** στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι εξίσου σημαντική. Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει ότι σε συνθήκες υψηλής υδροστατικής πίεσης η χοληστερόλη ενεργοποιείται και ενισχύει τη σύνδεση μεταξύ κυτταροσκελετού και λιπιδικής διπλοστιβάδας , αποτρέποντας έτσι την επικείμενη αιμόλυση. Ακόμη η χοληστερόλη συνεργάζεται με τα φωσφολιπίδια και διάφορες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ,εξασφαλίζοντας τη σταθερότητα της μεμβράνης και τη διεξαγωγή βασικών λειτουργιών της. Η βασική της θέση πάνω στη , είναι στην περιοχή που βρίσκεται σε αφθονία το φωσφολιπίδιο της σφιγγομυελίνης ,δηλαδή στο εξωτερικό στρώμα της λιπιδικής διπλοστιβάδας.. Η σύνδεση αυτή μεταξύ

χοληστερόλης και σφινγγομυελίνης δημιουργεί μια υποπεριοχή πάνω στη μεμβράνη ,γνωστή ως **λιπιδικές σχεδίες**. (Yamagushi ,2021)

Οποιαδήποτε μεταβολή στη λιπιδική σύσταση μπορεί να έχει επιπτώσεις στη γενικότερη λειτουργία του ερυθροκυττάρου και να οδηγήσει σε σοβαρές παθήσεις όπως η αιμολυτική αναιμία. Σε άλλη περίπτωση και συγκεκριμένα στην κληρονομική χεροκυττάρωση ,που είναι αποτέλεσμα κάποιας μετάλλαξης στο γονίδιο του καναλιού PIEZO 1 ,παρατηρούνται επίσης αυξημένα ποσοστά φωσφατιδυλοχολίνης στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων του ασθενούς. (Pretini et al,2019)



Εικόνα 13: Η δομική οργάνωση της λιπιδικής διπλοστιβάδας με έμφαση στα βασικά φωσφολιπίδια που τη συγκροτούν.(Ανατύπωση από Pretini et al,2019)

2^ο ΜΕΡΟΣ:ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ(MDS)

1) ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

Τα **Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (Myelodysplastic Syndromes-MDS)** σχετίζονται αμιγώς με τη μη αποτελεσματική αιμοποίηση στο μυελό των οστών ,η οποία μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφόρων γενετικών ανωμαλιών που εμποδίζουν το σκοπό της αιμοποίησης. Σε ασθενείς με MDS τα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα υφίστανται τις ακόλουθες μεταλλάξεις : πρώτον τα χρωμοσώματα 5,7,8 και 20 μπορεί να χαρακτηρίζονται είτε από έλλειψη είτε από πολλαπλή εμφάνιση (Shanz et al., 2012) και δεύτερον τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για γενετικές επιδιορθώσεις του DNA ή των ιστονών καθώς και το γονίδιο που είναι υπεύθυνα για τη μεταγραφή ,το «μάτισμα» και τη δημιουργία ερεθισμάτων υπόκεινται σε μεταλλάξεις.(Bejar et al., 2011, Damn et al., 2013) Γενικά τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα είναι αποτέλεσμα ανωμαλιών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στη δυσπλαστική διαφοροποίηση τους καθώς επίσης και επακόλουθο μιας αυξημένης αποπτωτικής συχνότητας. Το σύνδρομο αυτό παρατηρείται πιο συχνά σε ηλικιωμένους. Η βαθμιαία εξέλιξη της νόσου ξεκινάει από μία ήπια μορφή λευκοπενίας ,αναιμίας και θρομβοπενίας η οποία μπορεί να

οδηγήσει στην έσχατη περίπτωση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. (*Paraemmanuil et al., 2013, Haferlach et al., 2014, Lefèvre et al., 2017*)

1.1) Αιτιολογία

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα χαρακτηρίζονται από ετερογένεια καθώς περιλαμβάνουν μια μεγάλη ομάδα νοσημάτων του αίματος που είναι συνυφασμένα με διάφορες κλωνικές διαταραχές. Τέτοιες είναι η δυσερυθροποίηση με περιφερικές κυτταροπενίες καθώς και οι μορφολογικές διαταραχές των κυττάρων του αίματος. Ως κλωνική διαταραχή ορίζεται η βλάβη που μπορεί να υποστεί ένα αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή και αυτόματα να χάσει τη λειτουργικότητά του, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του καθώς και την ικανότητα εκτεταμένης επιβίωσης του. Τα αλλοιωμένα πλέον κύτταρα μπορούν να επικρατήσουν έναντι των υπολοίπων φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων και συνεπώς να υπερτερήσουν αριθμητικά στο μυελό των οστών, προκαλώντας τις προαναφερθείσες κλωνικές διαταραχές. Τα βασικότερα ελαττώματα των αιμοποιητικών κυττάρων στα μυελοδυσπλαστικά κύτταρα είναι η έλλειψη ικανότητας αυτοανανέωσης και η δυσκολία διαφοροποίησης. Δεν υπάρχει προφανής αιτία για την εμφάνιση των MDS, γεγονός που καθιστά το σύνδρομο από τις πιο απαιτητικές παθήσεις του αίματος. (*Cazzola et Malcovati, 2005, Mufti et al., 2008*)

1.2) Δυσερυθροποίηση στα MDS

Η βασική αιτιολογία για την εμφάνιση, σε ηλικιωμένα κυρίως άτομα, ενός μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου, θεωρείται ότι είναι η δυσερυθροποίηση που λαμβάνει χώρα κατά την εξέλιξή του. Ο αριθμός των βλαστών στο περιφερικό αίμα, το ακριβές ποσοστό της δυσπλασίας του μυελού των οστών και ο βαθμός της κυτταροπενίας είναι δείκτες διάγνωσης των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων, όπως προβλέπεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Ένα σημαντικό ποσοστό των δυσπλαστικών κυττάρων του συνδρόμου είναι αποτέλεσμα της αναιμίας που προκύπτει από τη δυσερυθροποίηση της ερυθράς σειράς (*Vardiman et al., 2009*). Διαφορετικά διαγνωστικά κριτήρια αποτελούν δύο συγκεκριμένοι υπότυποι των MDS που δεν είναι άλλοι από το σύνηθες σύνδρομο της έλλειψης τμήματος του χρωμοσώματος 5 [del (5q)] αλλά και ο τύπος MDS με την ύπαρξη σιδηροβλαστών στο περιφερικό αίμα. (*Glenthøj et al., 2016*) Η δυσπλασία της ερυθροειδούς σειράς είναι αποτέλεσμα των ακόλουθων κυτταροπλασματικών διενεργειών που μπορούν να συμβούν στα πλαίσια της δυσερυθροποίησης: της μεγαλοβλάστωσης, της αυξημένης ποσότητας μιτοχονδριακού σιδήρου καθώς και της δημιουργίας θραυσμάτων. Η ερυθροειδής δυσπλασία μπορεί να οφείλεται ακόμη και σε μεταβολές στον πυρήνα των κυττάρων όπως η μη φυσιολογική κατανομή χρωματίνης, η ύπαρξη πολλαπλών πυρήνων ή η δημιουργία πυρηνικών γεφυρών. (*Lefèvre et al., 2017*)

Σημαντικό ρόλο στην κατανόηση της λειτουργίας της δυσερυθροποίησης στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα διαδραματίζουν οι δείκτες της δυσερυθροποίησης, οι οποίοι ανακαλύπτονται με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής. Ο συνδυασμός του συντελεστή διακύμανσης (CV) των ερυθροκυτταρικών αντιγονικών δεικτών CD71 και CD36 και τα ποσοστά αιμοσφαιρίνης που προκύπτουν από μια ανάλυση δείγματος σε κυτταρομετρία ροής, μπορεί να αποτελέσουν δείκτη πρόγνωσης για τα MDS (*Mathis et al., 2013*). Λιγότερο συχνά η εμφάνιση των MDS είναι συνυφασμένη με ανωμαλίες στην έκφραση της γλυκοφορίνης A της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και του δείκτη CD105. (*Eidenshink et al., 2015, Lefèvre et al., 2017*)

Άλλο ένα βασικό χαρακτηριστικό ελαττωματικής δυσερυθροποίησης των MDS είναι η απενεργοποίηση του μορίου GATA 1. Πρόκειται για ένα μεταγραφικό παράγοντα που εκφράζεται στα ερυθροκύτταρα και στα μεγακαρυοκύτταρα και έχει μια χαρακτηριστική μορφή δακτυλίου ψευδαργύρου. Ο ρόλος του GATA1 είναι να δεσμεύει τα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα για τις δυο προαναφερθείσες αιμοποιητικές σειρές ,δηλαδή την ερυθρά και την μεγακαρυωτική, ρυθμίζοντας έτσι την επιτυχημένη ερυθροποίηση (*Ferreira et al., 2005*). Οι λειτουργίες λοιπόν αυτού του μορίου θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν μεταγραφικές ,μεταφραστικές και μετα-μεταφραστικές .Οποιαδήποτε μεταβολή σε αυτές τις λειτουργίες μπορεί να οδηγήσει σε δυσερυθροποίηση. Συγκεκριμένα στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα παρατηρείται μια απορρύθμιση του GATA1 ,όσον αφορά στις μεταγραφικές του ιδιότητες. Αυτό συμβαίνει διότι η έκφραση του μορίου είναι αισθητά μειωμένη ύστερα από την επίδραση των κασπασών. Όλα αυτά καταλήγουν σε μία μη αποτελεσματική ερυθροποίηση που μπορεί τελικώς να μεταφραστεί ως λανθασμένη ωρίμανση της ερυθροκυτταρικής σειράς ,εκτεταμένη απόπτωση και αναποτελεσματικότητα παραγόντων ωρίμανσης. Όλα αυτά αποτελούν χαρακτηριστικά των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. (*Claessens et al., 2002, Gryan et al., 2008, Lefèvre et al_2017*)

1.3) Γενετικές ανωμαλίες

Όπως ήδη αναφέρθηκε τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα μπορεί να είναι αποτέλεσμα ορισμένων γενετικών ανωμαλιών που μπορούν να συμβούν σε επίπεδο κυττάρου και όχι μόνο. Σύμφωνα με το IPSS (International Prognostic Scoring System) οι ανωμαλίες αυτές αποτελούν βασικό προγνωστικό δείκτη για τα MDS (*Yoshida et al., 2011, Greenberg et al., 2012*). Σε ένα ικανοποιητικό ποσοστό (40-50%) περιπτώσεων μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων παρατηρούνται οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες τρισωμία 8 και μονοσωμία 7 , η έλλειψη τμήματος των χρωμοσωμάτων 5 και 7 και άλλες καρυοτυπικές διαταραχές. Ο απολογισμός των επιπτώσεων τους διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εύρεση θεραπευτικών λύσεων για την αντιμετώπιση των συγκεκριμένων νοσημάτων του αίματος .Οι πιο χαρακτηριστικές λοιπόν γενετικές διαταραχές που καθορίζουν τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα είναι οι ακόλουθες : η **έλλειψη του μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (del5q)** ,αποτελεί την πιο συχνή ανωμαλία σε γενετικό υπόβαθρο και εμφανίζεται στο 10-15% των ασθενών με MDS (*Boulwood et al., 2002*) και περίπου στο 40% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία (*Patnaik et al., 2010*). Η πρόγνωση των ασθενών αυτών είναι σχετικά καλή και κλινικά εμφανίζουν μακροκυτταρική αναιμία και θρομβοκυττάρωση. Αρκετά συχνή είναι και η **έλλειψη του χρωμοσώματος 7** η οποία εμφανίζεται σε ποσοστό 10% στα πρωτοπαθή μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και σε ποσοστό 50% σε εκείνα που επιδέχονται θεραπεία (*Haase et al., 2007*). Τα κλινικά χαρακτηριστικά αυτής της ανωμαλίας ποικίλουν ανάλογα με το ακριβές είδος της γονιδιακής μετάλλαξης και η πρόγνωση για αυτό το είδος του συνδρόμου είναι δυσσίοινη (*Shanz et al., 2012*). Συχνά παρατηρούνται επίσης **μετατοπίσεις τμημάτων γονιδίων που συμβάλουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μεταλλάξεις γονιδίων που κωδικοποιούν μεμβρανικούς υποδοχείς ,μεταγραφικούς παράγοντες** (όπως αναφέρθηκε παραπάνω ο σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας GATA1)και **παράγοντες μεταγωγής ερεθισμάτων**. Τα MDS χαρακτηρίζονται ακόμη γενετικά από **ανοσολογικές διαταραχές** με πιο σημαντική την αυξημένη παρουσία T-λεμφοκυττάρων που έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν νέους αντιγονικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των μυελοδυσπλαστικών κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υπέρμετρη απελευθέρωση κυτταροκινών όπως ο TNF-a παράγοντας ,αλλά και την ύπαρξη πολλών αυτοαντισωμάτων. Στις διαταραχές των MDS συγκαταλέγεται και το **οξειδωτικό στρες** στα μιτοχόνδρια που μπορεί να οδηγήσει σε απελευθέρωση ενζύμων πρωτεόλυσης και σε ταχύτερη απόπτωση.(*Sallman et List, 2019*) Μερικές ακόμη συχνές ελαττωματικές καταστάσεις είναι η **τρिसωμία 8** η οποία έχει ποσοστό

εμφάνισης 5-7%, η **τρισωμία 21**, η **μεθυλίωση του DNA**, οι μεταλλάξεις των ιστονών καθώς και οι μεταλλάξεις γονιδίων που είναι υπεύθυνα για το «μάτισμα» του RNA. Τέλος η δυσλειτουργία λόγω μεταλλάξεων του **ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP53** ,εμφανίζεται σε ποσοστό 8-13% σε περιπτώσεις πρωτοπαθούς μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου και 30% σε δευτεροπαθή MDS. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 συγκαταλέγονται συχνά στο σύνδρομο έλλειψης χρωμοσώματος 5. (Hosono et al., 2017, Hosono ,2019)

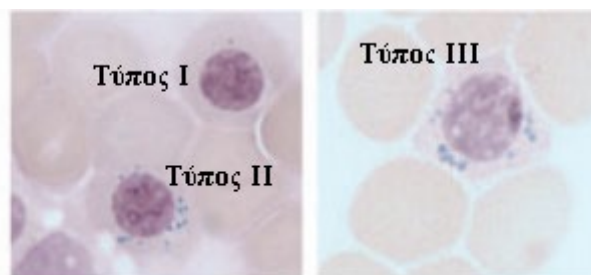
1.4) Βασικά εργαστηριακά ευρήματα

Η διάγνωση των MDS μπορεί να διαρκέσει από μήνες έως και 10 χρόνια και καθορίζεται από παράγοντες όπως το φύλο και ηλικία συνδυαζόμενα με την αντίστοιχη πληθυσμιακή κατάσταση (List et al., 2004). Για την αποτελεσματική διάγνωση των MDS τα βασικά εργαστηριακά ευρήματα είναι οι πρώιμες μορφές των κυττάρων ,δηλαδή οι βλάστες .Συγκεκριμένα δίνεται βάση στον εντοπισμό ,την καταμέτρηση και στις μορφολογικές τους αλλοιώσεις .Τα ευρήματα αυτά συμβάλλουν ακόμη και στην αξιολόγηση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (Mufti, 2004, Komrokji et al., 2007). Τα διαγνωστικά κριτήρια για την κατάταξη αλλά και την προγνωστική αξία των διάφορων τύπων των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων ,προκύπτουν λοιπόν από την παρατήρηση των **μυελοβλαστών** ,**προμυελοκυττάρων** και **σιδηροβλαστών** .Οι μυελοβλάστες χαρακτηρίζονται φυσιολογικά από μεγαλύτερη αναλογία πυρήνα σε σχέση με το κυτταρόπλασμα ,ο οποίος μάλιστα είναι εύκολα ορατός και το σχήμα του ποικίλλει. Έχουν επίσης λεπτή πυρηνική χρωματίνη. Το κυτταρόπλασμά τους είναι βασεόφιλο με ή χωρίς κοκκία. Όσον αφορά στις μυελοβλάστες που παρατηρούνται στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αυτές διακρίνονται σε αυτές που έχουν κοκκία και σε αυτές που δεν έχουν.(**Εικόνα 14**) Σύμφωνα με την ταξινόμηση των βλαστών των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων κατά FAB ,οι βλάστες χωρίς κοκκία χαρακτηρίζονται ως τύπου I ,ενώ η κοκκίωση είναι χαρακτηριστικό των βλαστών τύπου II και III.Ο τελευταίος τύπος δυσπλαστικών βλαστών έχει τα βασικά χαρακτηριστικά μιας βλάστης με την κοκκίωση να αποτελεί διακριτό στοιχείο. Οι βλάστες με κοκκίωση συγγέονται με τα προμυελοκύτταρα σε διαγνωστικό επίπεδο ,για αυτό το λόγο πρέπει να εντοπίζονται και να παρατηρούνται με προσοχή. Τα προμυελοκύτταρα ενός υγιούς ατόμου έχουν έναν σχετικά ορατό πυρήνα ,ο οποίος αποτελεί κυρίαρχο κυτταρικό στοιχείο και φυσιολογική συσσώρευση χρωματίνης .Επιπλέον είναι αρκετά διακριτό σε αυτά το σύμπλεγμα Golgi.(**Εικόνα 14**) Τα ομοιόμορφα κατανομημένα αζουρόφιλα κοκκία και ο βασεόφιλος χαρακτήρας αποτελούν στοιχεία του κυτταροπλάσματος των φυσιολογικών αυτών προμυελοκυττάρων. Στα MDS τα προμυελοκύτταρα έχουν ένα πυρήνα που μπορεί να χαρακτηριστεί στρογγυλός ,οβάλ ή με εσοχές και με λεπτή ή χονδροειδής κατανομή χρωματίνης .Στη δυσπλαστική αυτή μορφή των συγκεκριμένων κυττάρων, το σύμπλεγμα Golgi παρατηρείται αμυδρά. Τα διαφοροποιητικά τους στοιχεία από τα φυσιολογικά προμυελοκύτταρα είναι κυρίως η μειωμένη βασηοφιλία του κυτταροπλάσματος και η ανώμαλη κοκκίωση , η οποία ερμηνεύεται είτε με την υπέρμετρη παρουσία κοκκίων ,είτε με την έλλειψη ,είτε με τον ελαττωματικό διασκορπισμό τους.. Χαρακτηριστικό των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων αποτελεί και η δυσπλασία της ερυθράς σειράς , η οποία οδηγεί σε δίμορφους ερυθροκυτταρικούς πληθυσμούς .Η κατάσταση αυτή έχει ως αποτέλεσμα ορισμένοι τύποι MDS να έχουν ως διαγνωστικό κριτήριο τις σιδηροβλάστες ,τα χαρακτηριστικά των οποίων πρέπει να εξετάζονται εκτενώς.. Πρόκειται λοιπόν για δυσπλαστικές ερυθροβλάστες που το βασικό τους στοιχείο είναι η περιμετρική συσσώρευση τουλάχιστον 5 κοκκίων σιδήρου γύρω από τον πυρήνα (**Εικόνα 15**).Μερικές φορές η κατανομή των κοκκίων μπορεί να μην είναι γύρω από τον πυρήνα και τα ίδια να καλύπτουν ένα μέρος αυτού. Έρευνες έχουν υποδείξει 3 τύπους σιδηροβλαστών :ο **τύπος I** περιλαμβάνει κύτταρα με λιγότερα από 5 κοκκία σιδήρου στο κυτταρόπλασμα ,ο **τύπος II** χαρακτηρίζεται από σιδηροβλάστες με περισσότερα από 5 κοκκία τα οποία δεν κατανέμονται

περιμετρικά του πυρήνα και ο **τύπος III** αποδίδεται στις **δακτυλιωτές σιδηροβλάστες** που εμφανίζονται συχνά στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και έχουν 5 ή περισσότερα κοκκία σιδήρου να περιβάλλουν τον πυρήνα ή να καλύπτουν το 1/3 της περιφέρειά του. (Mufti et al,2008)



Εικόνα 14: Τύποι των βλαστών που παρατηρούνται στα MDS και σύγκριση μεταξύ φυσιολογικών και δυσπλαστικών προμυελοκυττάρων του συνδρόμου (Ανατύπωση από Mufti et al,2008)

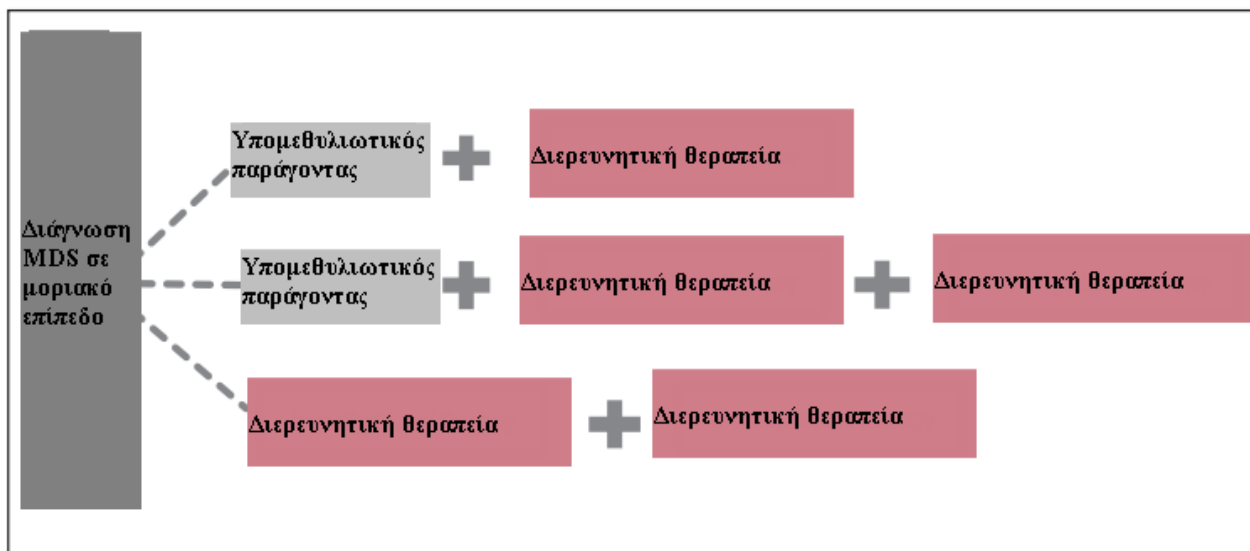


Εικόνα 15: Οι τρεις τύποι των σιδηροβλαστών που συναντώνται σε συγκεκριμένους τύπους MDS ,έπειτα από χρώση των κυττάρων με αιματοξυλίνη(Ανατύπωση από Mufti et al,2008)

1.5) Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αποτελούν για τους ερευνητές ένα δύσκολο πεδίο διερεύνησης καθώς δεν έχει βρεθεί ακόμη μια αποτελεσματική θεραπευτική αντιμετώπιση. Και αυτό γιατί δεν υπάρχει ένας σαφής στόχος ,δηλαδή μια ξεκάθαρη αιτιολογία για την εμφάνιση του συνδρόμου. Οι επιστήμονες προσπαθούν διαρκώς να εντοπίσουν τις πιο αποδοτικές θεραπευτικές λύσεις και πολλές φορές χρησιμοποιούν το συνδυασμό αυτών (**Εικόνα 16**). Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την αντιμετώπιση χαμηλού κινδύνου MDS είναι η χρήση **παραγόντων διέγερσης της ερυθροποίησης** και έχει ως άμεσο στόχο την ελάττωση του βαθμού της αναιμίας . Η μέθοδος αυτή μπορεί να επιτευχθεί με τη μετάγγιση συμπυκνωμένων ερυθρών στους ασθενείς . Η συχνή εφαρμογή της όμως μπορεί να τους προκαλέσει σημαντικά προβλήματα. Η μεγαλύτερη ανησυχία εντοπίζεται στη χρόνια εξάρτηση που εμφανίζουν οι ασθενείς αυτοί στις μεταγγίσεις των ερυθρών που χρειάζονται ,η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μια υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο και πιθανώς σε μια τελική φάση αιμοσιδήρωσης. (*Santini,2021*)

Στις περιπτώσεις μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων που χαρακτηρίζονται από κυτταροπενία σε περισσότερες από μία αιμοποιητικές σειρές ,εφαρμόζεται η χορήγηση **παραγόντων υπομεθυλίωσης (HMAs)** .Πιο διαδεδομένη είναι η λήψη αυτών των παραγόντων δια του στόματος. Ο συνδυασμός δεσιταβίνης και κεδαζουριδίνης αποτελεί μια εγκεκριμένη ,από το 2020 ,θεραπευτική μέθοδο για ενήλικους ασθενείς με MDS αλλά και για ασθενείς με χρόνια μυελομονοκυτταρική αναιμία. Όσον αφορά στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα έχει παρατηρηθεί αποτελεσματικότητα τόσο στην πρωτοπαθή όσο και στη δευτεροπαθή έκφραση των νοσημάτων (*Garcia-Manero et al., 2020*). Στις Οξείες Μυελογενείς Λευχαιμίες ενδείκνυται η δια του στόματος χορήγηση του παράγοντα CC-486 ή αλλιώς αζακυτιδίνη. Πρόκειται για έναν παράγοντα υπομεθυλίωσης με φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες που επιδρά διαφορετικά και πιο αποτελεσματικά όταν λαμβάνεται από το στόμα από ότι όταν χορηγείται ενέσιμα στους ασθενείς. Χορηγείται στην πρώτη ύφεση της νόσου ,έπειτα από μια ανεπιτυχή χημειοθεραπεία. Η αποδοτικότητα στη λήψη των HMAs από το στόμα μπορεί να οδηγήσει στην αποκλειστική και καθολική χρήση αυτής της μεθόδου για τη θεραπεία των MDS. Αξίζει να αναφερθεί πως οι υπομεθυλιωτικοί παράγοντες αποδεικνύονται σταδιακά καταλύτες για την αντιμετώπιση των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων, με βασικό χαρακτηριστικό τους την αναστολή μεθυλίωσης του DNA. Για το λόγο αυτό αποτελούν κυρίαρχο στοιχείο στις σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά των MDS .Ακόμη χρησιμεύουν σα βασικός σκελετός για το συνδυασμό παλιών και νέων θεραπευτικών παραγόντων. (*Santini,2021*)



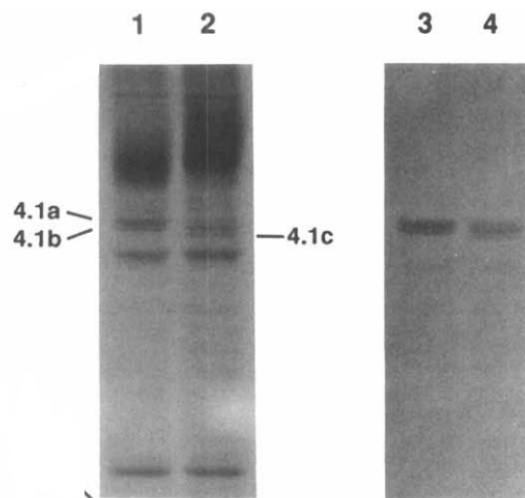
Εικόνα 16: Σχεδιάγραμμα μελλοντικών θεραπευτικών προσεγγίσεων με σκοπό την αποτελεσματική αντιμετώπιση των MDS ,ανάλογα με τον τύπο της μοριακής τους διάγνωσης .Οι υπομεθυλιωτικοί παράγοντες παίζουν καθοριστικό ρόλο στις περισσότερες στρατηγικές αντιμετώπισης. (Ανατύπωση από Santini,2021)

2. MDS ΚΑΙ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αποτελούν ένα «δύσβατο» ερευνητικά μονοπάτι για τους επιστήμονες που συνεχώς διερευνούν τα αίτια που μπορούν να οδηγήσουν στην εκδήλωσή τους. Όπως ήδη αναφέρθηκε η βασικότερη αιτιολογία που οδηγεί στην εμφάνιση των MDS είναι η δυσερυθροποίηση , δηλαδή η ελαττωματική ερυθροποίηση της ερυθράς αιμοποιητικής σειράς. Για το λόγο αυτό η αναιμία που χαρακτηρίζει τα MDS , είναι άμεσο αποτέλεσμα της δυσερυθροποίησης .(Uman et al.,2022) Λίγες έρευνες όμως έχουν γίνει για τη μελέτη των ερυθροκυττάρων που παρατηρούνται σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά και συγκεκριμένα για τις αλλοιώσεις της πρωτεϊνικής σύστασης της ερυθροκυτταρικής τους μεμβράνης. Από τις μελέτες που εξελίσσονται τα τελευταία χρόνια και συνεχίζουν να διενεργούνται ακόμη και σήμερα ,έχουν προκύψει τα παρακάτω πορίσματα για της πρωτεΐνες της μεμβράνης των ασθενών με MDS.

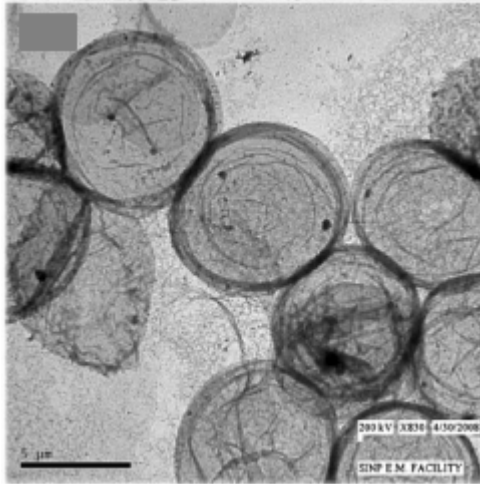
Παλιότερες μελέτες που έχουν γίνει σε ασθενείς με MDS που συνοδεύεται από ελλειπτοκυττάρωση ,έχουν υποδείξει αλλοιώσεις σε δύο από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης . Πρόκειται για την σκελετική **πρωτεΐνη 4,1R** και τη διαμεμβρανική **πρωτεΐνη ζώνη 3**. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS ,υποδήλωσαν μια μειωμένη ποσότητα της πρωτεΐνης 4,1R αλλά και μια αυξημένη κινητικότητά της πάνω στο πήκτωμα σε σχέση με τη φυσιολογική σύσταση της πρωτεΐνης. Ακόμη η διεξοδικότερη ανάλυση των κλασμάτων a ,b ,c της πρωτεΐνης έδειξε σημαντικά μειωμένη ποσότητα στο κλάσμα b και την ύπαρξη μιας συμπληρωματικής ζώνης κάτω από αυτό .(Εικόνα 17) Επιπλέον η τριπλέτα των κλασμάτων της πρωτεΐνης είχε έναν ανοσοαντιδραστικό χαρακτήρα σε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της φυσιολογικής πρωτεΐνης 4,1R. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη 4,1R του ασθενούς είχε μοριακές αλλοιώσεις .Η ελλειπής ποσότητα της πρωτεΐνης σε συνδυασμό με τις ανωμαλίες σε μοριακό επίπεδο επηρέασε και την ποσότητα του συμπλέγματος

σπεκτρίνης -ακτίνης. Όσον αφορά στη ζώνη 3 παρατηρήθηκε μια αργή μετακίνησή της πάνω στο πήκτωμα ,γεγονός που παρέπεμψε στο γνωστό πολυμορφισμό Memphis που εμφανίζεται στην πρωτεΐνη ζώνη 3. (Hiroshi et al.,1993)



Εικόνα 17 : Στην πρώτη εικόνα παρουσιάζονται τα κλάσματα της πρωτεΐνης 4,1R όπως προκύπτει από την ανάλυσή τους σε πήκτωμα SDS. Στη δεύτερη εικόνα είναι το ανοσοαποτύπωμα των πρωτεϊνών ύστερα από τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της ζώνης της φυσιολογικής πρωτεΐνης 4,1R. Οι στήλες 1 και 3 είναι ενός υγιούς ασθενούς ενώ οι 2 και 4 είναι ασθενούς με MDS. (Ανατύπωση από Hiroshi et al. ,1993)

Πιο πρόσφατες έρευνες σε ασθενείς με MDS υπέδειξαν αλλοιώσεις και στη λιπιδική σύσταση της μεμβράνης. Συγκεκριμένα τα νέα και πιο ελαφριά ερυθροκύτταρα των ασθενών με MDS εμφανίζονται να έχουν μεγαλύτερη έκθεση σε **φωσφατιδυλοσερίνη (PS)** από ότι τα πιο βαριά και γηρασμένα κύτταρα του ίδιου πάσχοντος ασθενούς. Η μεγάλη αυτή έκθεση των νεότερων RBCs σε PS συνοδεύεται και από αυξημένα ποσοστά γλυκοφορινών . Η σχέση αυτή μεταξύ νεότερων και παλιότερων κυττάρων σε ασθενείς με MDS μπορεί να αντιστρέφεται σε ορισμένους υπότυπους του συνδρόμου. Η κατάσταση αυτή οδηγεί σε μια γενικότερη ασυμμετρία στη λιπιδική διπλοστιβάδα της μεμβράνης η οποία οφείλεται κυρίως στην άνιση κατανομή της φωσφατιδυλοσερίνης. Αξίζει να αναφερθεί ότι η μεγαλύτερη ασυμμετρία της PS που να αφορά στα ελαφρύτερα ερυθροκύτταρα παρατηρείται στους ακόλουθους τύπους MDS: στην **ανθεκτική αναιμία (RA)** και στις **ανθεκτικές αναιμίες με περίσσεια βλαστών (RAEBs)**. Παρά την ασυμμετρία αυτή που παρατηρείται στις περιπτώσεις ασθενών με RA ,η εικόνα των μεμβρανών των ερυθροκυττάρων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δεν παρουσιάζει κάποια ανωμαλία και έχει ένα φυσιολογικό προφίλ σκελετικό πρωτεϊνών. (Εικόνα 18) (Basu et al.,2010)



Εικόνα 18: Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των μεμβρανών ghosts των ερυθροκυττάρων ασθενούς με τύπο RA μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου. (Ανατύπωση από *Basu et al., 2010*)

Τέλος αξίζει να διευκρινισθεί πως έχουν καταγραφεί αποτελέσματα ερευνών πάνω σε ασθενείς με χαμηλού κινδύνου MDS που συμπεραίνουν ότι η δυσπλασία της ερυθροκυτταρικής σειράς δεν επηρεάζει τη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων. Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν όμως σημαντική απόκλιση από το φυσιολογικό σε ερυθροκυτταρικούς δείκτες όπως ο RDW ,MCH ,MCHC ,MCV κ.α. .(*Uman et al, 2022*)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Για την επίτευξη της συγκεκριμένης έρευνας συγκεντρώθηκαν 18 δείγματα διαγνωσμένων με MDS ασθενών και 11 δείγματα υγιών ασθενών ,στις ίδιες ηλικιακές διακυμάνσεις με τους πάσχοντες. Αξίζει να αναφερθεί ότι λόγω της φύσης τους νοσήματος οι ηλικίες των ασθενών κυμαίνονται από 64 έως 96 και αυτό γιατί τα μυελοδυσπλαστικά νοσήματα εμφανίζονται σε μεγαλύτερες ηλικιακές τάξεις.

Η συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη στοχεύει αποκλειστικά στην ημι-ποσοτική ανάλυση των βασικών πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης ασθενών διαγνωσμένων με MDS και σε μια γενικότερη εικόνα πιθανής αλλοίωσης της σύστασής της . Οι βασικές αυτές πρωτεΐνες είναι οι σκελετικές πρωτεΐνες **σπεκτρίνη ,ακτίνη ,πρωτεΐνη 4.1R** και η θεμελιώδης μεμβρανική πρωτεΐνη **ζώνη 3**.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1) Απομόνωση ερυθροκυτταρικών μεμβρανών

Αρχή μεθόδου

Η απομόνωση των μεμβρανών των ερυθροκυττάρων που είναι ελεύθερες αιμοσφαιρίνης στηρίζεται στη μέθοδο της υποτονικής αιμόλυσης (*Dodge et al.,1963*). Η μέθοδος αυτή με τη σειρά της βασίζεται στο ωσμωτικό φαινόμενο με μια μικρή παραλλαγή .Χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο PMSF για την αναστολή της πρωτεόλυσης των πρωτεϊνών (*Advani et al.,1992*)Για την αποτελεσματικότερη εφαρμογή της τεχνικής με την ταυτόχρονη αποφυγή αλλοίωσης των συστατικών της μεμβράνης και βέλτιστη απομάκρυνση της αιμοσφαιρίνης ,τρέχουμε το πείραμα με συγκεκριμένες τιμές pH(7,4) και ιοντικής ισχύος (20mOsm).

Υλικά -Αντιδραστήρια

- ✓ Sodium Phosphate Buffer 50mM (50P₈), pH8,0 ,4°C (Na₂HPO₄*2H₂O 50 mM, NaH₂PO₄H₂O 50 mM)
- ✓ Lyssis Buffer (20mosm) (Na₂HPO₄*2H₂O 5mM/ NaH₂PO₄*H₂O 5mM / 0,3 mM PMSF)
- ✓ PMSF (Phenyl mathylsufonyl fluoride)200mM
- ✓ PBS Washing Solution (310 mosm)
- ✓ Πιπέτες Pasteur
- ✓ Eppendorfs 1,5ml
- ✓ Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος

Πειραματική διαδικασία

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται στους 4° C για να αποφευχθεί η πρωτεόλυση των πρωτεϊνών ,μέσω της αναστολής της δράσης των πρωτεασών.

1. Μεταφορά 1ml ολικού δείγματος σε ένα eppendorf
2. Φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 10 λεπτά στους 4° C. Αφαίρεση buffy coat
3. Πλύσεις των ερυθροκυττάρων του δείγματος με ισότονο διάλυμα (PBS Washing Solution)
4. Φυγοκέντρηση ξανά στις 3.000 στροφές στους 4° C.
5. Προσθήκη διαλύματος λύσης και επώαση του σωληναρίου για 45 λεπτά στους 4° C
6. Φυγοκέντρηση λύσης στις 13000 στροφές για 20 λεπτά και πάλι στους 4° C.
7. Πλύσεις με υπότονο διάλυμα 5P8 και συνεχείς φυγοκεντρήσεις στις 13.000 στροφές στους 4° C ανά 20 λεπτά ,μέχρι να αποχρωματιστεί το ίζημα.

2.2) Υπολογισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δείγματος

Αρχή μεθόδου

Ο υπολογισμός της ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης βασίζεται στο πρότυπο του Bradford. Η μέθοδος αυτή αφορά στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να προσδένεται στις πρωτεΐνες και να πραγματοποιείται έτσι μετατόπιση του μέγιστου της απορρόφησης από τα 465 στα 595 nm. (Bradford, 1976) Το αντιδραστήριο Bradford μπορεί και συνδέεται με τις πρωτεΐνες και δημιουργεί ένα σταθερό σύμπλοκο κυανού χρώματος, το οποίο παραμένει για διάστημα μίας ώρας.

Υλικά – Αντιδραστήρια

- ✓ Bradford dye reagent concentrate, της εταιρίας BIORAD
- ✓ Eppendorfs 1,5ml
- ✓ Κυβέττες κατάλληλες για το φασματοφωτόμετρο
- ✓ Υπότονο διάλυμα 5P8
- ✓ Φασματοφωτόμετρο

Πειραματική διαδικασία

Για το πείραμα ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Αραίωση δείγματος 1:3 με υπότονο διάλυμα 5P8
2. Προστίθενται 790 μl διαλύματος 5P8 και 200 μl χρωστικής Bradford σε 10μl αραιωμένου δείγματος. Επίσης για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιείται ένα τυφλό διάλυμα το οποίο προκύπτει από 200 μl χρωστικής σε 800 μl υπότονου διαλύματος. Τα σωληνάρια αναδεύονται σε vortex και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 25 λεπτά. Έτσι σταθεροποιείται ο χρωματισμός του δείγματος.
3. Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 595 nm
4. Τέλος υπολογίζεται η συγκέντρωση του κάθε δείγματος σε mg/ml από την πρότυπη καμπύλη που έχει ήδη κατασκευαστεί

2.3) Προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Αρχή μεθόδου

Για να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση των απομονωμένων μεμβρανών ,απαιτείται η επεξεργασία τους με ένα διάλυμα χρώσης .Το διάλυμα αυτό αποτελείται από 20%SDS -10mM EDTA, γλυκερόλη ,β-μερκαπτοαιθανόλη και 1% μπλε της βρωμοφαινόλης.

Υλικά -Αντιδραστήρια

- ✓ Γλυκερόλη
- ✓ EDTA, MW =372,24
- ✓ β-μερκαπτοαιθανόλη
- ✓ Μπλε της βρωμοφαινόλης
- ✓ SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)

Πειραματική διαδικασία

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της κάθε ουσίας καθορίζεται από το συνολικό όγκο διαλύματος χρώσης που έχει χρησιμοποιηθεί .Η αναλογία των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στη συγκεκριμένη μέθοδο είναι 10:10:5:1 με τη σειρά να είναι SDS 10mM EDTA ,γλυκερόλη ,β-μερκαπτοαιθανόλη και μπλε της βρωμοφαινόλης. Για 100 μl βαμμένου δείγματος ,γίνεται προσθήκη 26 μl διαλύματος χρώσης σε 74 μl απομονωμένων μεμβρανών. Το δείγμα που έχει βαφτεί ενσωματώνεται στη συνέχεια σε βρασμένο νερό για τρία λεπτά και τελικώς αποθηκεύεται στους -80° C.

2.4) Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κατά Laemmli

Αρχή μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών στηρίζεται στον εμφανή διαχωρισμό φορτισμένων μακρομορίων πάνω σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης .Αυτό επιτυγχάνεται γιατί η κάθε πρωτεΐνη ,όπως και το κάθε μακρομόριο, έχουν το δικό τους μοριακό βάρος και το δικό τους ισοηλεκτρικό σημείο ή φορτίο υπό την επίδραση του ηλεκτρικού φορτίου. Στην ηλεκτροφόρηση κατά Laemmli , που είναι μια επίπεδη SDS-PAGE αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση με ομοιογενή σύσταση ,το διάλυμα SDS προσδίδει σε όλες τις πρωτεΐνες αρνητικό φορτίο προκειμένου ο διαχωρισμός τους να επιτυγχάνεται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. (Laemmli ,1970)

Υλικά -Αντιδραστήρια

- ✓ Acrylamide
- ✓ APS (Ammonium Persulfate)
- ✓ Bis-acrylamide
- ✓ Γλυκίνη
- ✓ HCl (Hydrochloric acid)
- ✓ SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)
- ✓ Ηλεκτρονικό πεχάμετρο
- ✓ Μίγμα μαρτύρων

- ✓ Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- ✓ TEMED (N, N, N, N'-Tetramethyl ethylenediamine)
- ✓ Tris, MW = 121,14
- ✓ dH₂O water

Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα .

1. Χρήση των ακόλουθων διαλυμάτων με συγκεκριμένες αναλογίες με σκοπό την παρασκευή των πηκτωμάτων :διάλυμα ακρυλαμίδης -δισ ακρυλαμίδη 30:0,8 % w/v,0,4% SDS σε 1,5M , Tris/HCl με pH=8,8 ,0,4% SDS σε 0.5 M Tris/HCl με pH=6,8 ,10% APS και TEMED.
2. Αρχικά στο σύστημα της ηλεκτροφόρησης τοποθετείται το **πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel)** με συγκεντρώσεις 10-15% διάλυμα ακρυλαμίδης -δισ ακρυλαμίδης 30:0,8 w/v ,0,127 M Tris/HCl με pH = 6,8,0,1% SDS ,0,05% APS ,0,17% TEMED.Αφήνεται να πήξει
3. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το **πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel)** .Το πήκτωμα αυτό έχει τη δική του σταθερή σύσταση η οποία είναι :3,05% διάλυμα ακρυλαμίδης -δισ ακρυλαμίδης 30:0,8 w/v ,0,127M Tris/HCl με pH= 6,8 ,0,1% SDS, 0,05% APS ,0,17% TEMED.
4. Καλή και ήπια ανάδευση των παραπάνω συστατικών και στη συνέχεια προσθήκη του gel πακεταρίσματος πάνω από το gel διαχωρισμού.
5. Μετά τον πολυμερισμό και των δύο πηκτωμάτων ακολουθεί η εισαγωγή των δειγμάτων σε ειδικές θέσεις υποδοχής. Στην πρώτη υποδοχή τοποθετούνται δείγματα γνωστού μοριακού βάρους που λειτουργούν σα μάρτυρες
6. Προσθήκη του **διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running buffer)** στο σύστημα ηλεκτροφόρησης. Το διάλυμα αυτό επιδρά στις πρωτεΐνες με την επιβολή ρεύματος ,μέσω των ηλεκτροδίων που απαρτίζουν το σύστημα. Αποτελείται από 17,7 mM Tris (M.W.:121,4) ,192 mM (M.W.: 75,07) και 0,1% SDS (M.W.:288,38). (pH= 8,3)
7. Σφράγισμα της συσκευής ηλεκτροφόρησης και σύνδεση των δύο ηλεκτροδίων με ειδικό εξάρτημα εφαρμογής τάσης.
8. Τερματισμός της ηλεκτροφόρησης μόλις το μπλε της βρωμοφαινόλης φτάσει σε απόσταση μισό εκατοστό από τη βάση διαχωρισμού και είναι ορατές όλες οι ζώνες των μαρτύρων.

2.5) Ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνών και των πηκτωμάτων

Τελευταίο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας είναι η σάρωση των πηκτωμάτων καθώς και η πυκνομέτρησή τους ,με τη χρήση ενός προγράμματος που ονομάζεται Gel Analyzer ver 1.0. Πρόκειται για ένα πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων το οποίο συμβάλλει στην οπτικοποίηση και ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος. Ο ορισμός του υπόβαθρου και του περιγράμματος για την κάθε ζώνη συμβάλλει στην ποσοτική εκτίμηση της κάθε μίας από αυτές. Το υπόβαθρο και στη συνέχεια το περίγραμμα καθορίζεται από το χρήστη. Όταν αφαιρεθεί τα υπόβαθρο ακολουθεί ο υπολογισμός της φωτεινότητας όλων των εικονοστοιχείων που υπάρχουν στην κάθε ζώνη .Οι τιμές που προκύπτουν από αυτόν υπόκειται σε επεξεργασία με το πρόγραμμα του Excel. Για κάθε δείγμα γίνεται ο υπολογισμός για την τιμή της κάθε πρωτεϊνικής ζώνης , αθροίζονται οι τιμές όλων των πρωτεϊνών και τέλος υπολογίζεται η τιμή του λόγου της κάθε πρωτεΐνης προς το άθροισμα των τιμών όλων των πρωτεϊνών .

3.ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η συχνότητα εμφάνισης των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων είναι αρκετά σπάνια ,ειδικά για τα ελληνικά δεδομένα .Οι ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη ,είναι ασθενείς του νοσοκομείου «Αττικόν» ,το οποίο ασχολείται διεξοδικά με περιπτώσεις MDS. Οι ηλικίες τους κυμαίνονται από 64 έως 96 ετών ,με τα controls των υγιών ασθενών να ανήκουν στο ίδιο ηλικιακό εύρος .

Συλλογή

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε σωληνάρια γενικής αίματος EDTA .Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα σωληνάριο για το κάθε δείγμα.

Προετοιμασία

Με την άφιξή τους στο εργαστήριο τα σωληνάρια τοποθετούνται σε πάγο ,για να επιτευχθεί η επιθυμητή θερμοκρασία των 4° C. Στη συνέχεια μεταφέρεται ποσότητα 1 ml για το κάθε δείγμα σε erpendorfs ,τα οποία σημαίνονται με τον αριθμό αναγνώρισης του ασθενούς (π.χ.MDS1 ,C1)και τοποθετούνται στον πάγο. Ακολουθεί η εκτέλεση των προαναφερθέντων πειραματικών πρωτοκόλλων.

Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Το αιματολογικό προφίλ των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα έδειξε μειωμένο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων σε σχέση με τους υγιείς συμμετέχοντες στη μελέτη. ($5,48 \pm 3,34 \times 10^3/\mu\text{L}$ και $8,49 \pm 5,13 \times 10^3/\mu\text{L}$ αντίστοιχα). Ακόμη σημαντική μείωση παρατηρήθηκε και στα ερυθρά αιμοσφαίρια των ασθενών, τα οποία έχουν παθολογική τιμή κάτω από το κατώτατο φυσιολογικό όριο ($3,38 \pm 0,81 \times 10^6/\mu\text{L}$) αλλά και ως προς τα υγιή άτομα ($4,54 \pm 0,80 \times 10^6/\mu\text{L}$). Η τιμή της αιμοσφαιρίνης (Hb) και ο αιματοκρίτης (Hct) των ασθενών παρουσιάζουν επίσης παθολογικά μειωμένες τιμές ($10,58 \pm 1,63$, $34,33 \pm 5,14$ %). Ο Hct συνδέεται με τον αριθμό των ερυθροκυττάρων και την αύξηση ή μείωσή τους, καθώς καθορίζει τη μάζα τους και προκύπτει από την εκατοστιαία αναλογία τους σε σχέση με το πλάσμα. Διαφοροποιήσεις μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων παρατηρούνται επίσης και σε άλλους ερυθροκυτταρικούς δείκτες. Συγκεκριμένα ο δείκτης που εκφράζει τον όγκο των ερυθρών αιμοσφαιρίων (MCV) παρουσιάζεται ελαφρά αυξημένος στους ασθενείς με MDS σε σχέση με τα υγιή άτομα ($90,93 \pm 11,96$ fl και $86,38 \pm 11,42$ fl αντίστοιχα). **(Πίνακας 3)**

Ένας ακόμη δείκτης που εμφανίζεται αυξημένος στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς είναι ο δείκτης που αποτελεί μέτρο του βάρους της αιμοσφαιρίνης στο RBC -MCH. ($28,1 \pm 4,20$ pg και $26,1 \pm 4,25$ pg αντίστοιχα). Η σημαντικότερη όμως αύξηση εντοπίζεται στο δείκτη RDW-δείκτης εύρους κατανομής μεγέθους ερυθροκυττάρων. Μάλιστα η τιμή του συγκεκριμένου δείκτη στους ασθενείς με MDS, ξεπερνάει το ανώτατο φυσιολογικό όριο. Έτσι στους υγιείς συμμετέχοντες της έρευνας η τιμή του δείκτη είναι $14,6 \pm 1,69$ CV% ενώ στους ασθενείς είναι $17,3 \pm 5,59$ CV%, με το φυσιολογικό εύρος τιμών να κυμαίνεται μεταξύ 11 και 14,5 CV%. Τέλος τα αιμοπετάλια των ασθενών είναι μειωμένα σε σχέση με αυτά των υγιών ατόμων ($196,9 \pm 117,9 \times 10^3/\mu\text{L}$ και $276 \pm 218 \times 10^3/\text{Ml}$, αντίστοιχα)

<u>Πίνακας 3</u>	MDS Ασθενείς	Υγιείς	Φυσιολογικές τιμές
WBCs (x 10 ³ /μL)	5,48 ± 3,34*	8,49 ± 5,13	5-10
RBCs (x 10 ⁶ /μL)	3,38 ± 0,81*	4,54 ± 0,80	A : 4,2-6,4 Γ : 3,6-5
Hb (gr/dl)	10,58 ± 1,63	11,65 ± 1,83	A : 14-17 Γ : 12-16
HCT (%)	34,33 ± 5,14*	38,65 ± 5,23	A : 42-52 Γ : 37- 47
MCV (fl)	90,93 ± 11,96	86,38 ± 11,42	82-98
MCH (pg)	28,1 ± 4,20	26,1 ± 4,25	26-34
MCHC (g/dl)	30,8 ± 0,98	30,1 ± 1,23	31-37
RDW (CV%)	17,3 ± 5,59*	14,6 ± 1,69	11,5-14,5
PLTs (x 10 ³ /μL)	196,9 ± 117,9*	276 ± 218	150-400

Πίνακας 3 : Αιματολογικοί δείκτες των ασθενών με MDS και των υγιών ατόμων ,δηλαδή των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ως controls. Οι τιμές προέκυψαν από το μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση. **Με έντονη γραφή** επισημαίνονται οι παθολογικές τιμές. (*) p<0.05, σύγκριση υγιών και ασθενών ατόμων.

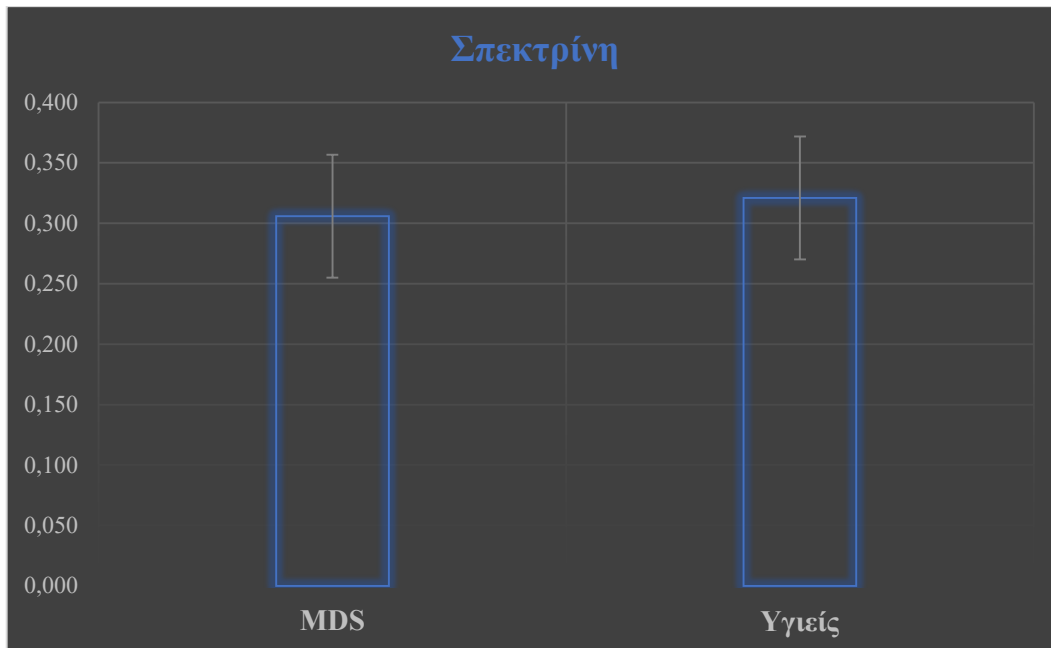
2. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΥΓΙΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

Η ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών και η χρήση του Gel Analyzer 0,1 (**Εικόνα 19**), οδήγησε σε μια σειρά αποτελεσμάτων για την ημι-ποσοτική ανάλυση της βασικής πρωτεϊνικής σύστασης της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης τόσο των ασθενών με MDS όσο και των υγιών ατόμων. Τα αποτελέσματα αυτά επεξεργάστηκαν κατάλληλα με τη βοήθεια του excel και έδωσαν καθαρούς αριθμούς ,οι οποίοι καταγράφονται στον **Πίνακα 4** με τη μορφή του M.O.± την τυπική απόκλιση. Έτσι από τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν ,παρατηρείται ότι οι πρωτεΐνες σπεκτρίνη ,ακτίνη και πρωτεΐνη 4,1R δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές

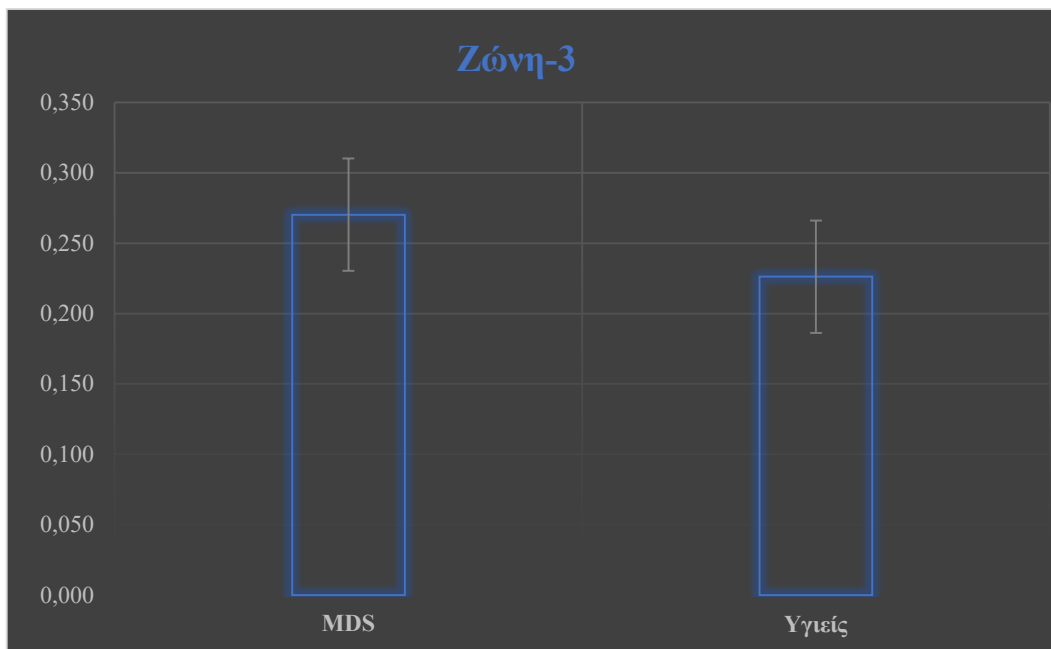
στις τιμές τους μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων .Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες 4,1R και ακτίνη βρίσκονται σχεδόν στην ίδια ποσότητα σε ασθενείς και υγιείς ($0,144 \pm 0,013$ και $0,146 \pm 0,013$, $0,063 \pm 0,010$ και $0,058 \pm 0,008$ αντίστοιχα). Από την άλλη στην πρωτεΐνη σπεκτρίνη παρατηρείται μία ελάχιστη μείωση στους ασθενείς με MDS και στις τιμές των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.($0,306 \pm 0,051$ και $0,321 \pm 0,051$ αντίστοιχα). Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ ασθενών και υγιών συμμετεχόντων στην παρούσα μελέτη ,εντοπίζεται στη βασική διαμεμβρανική πρωτεΐνη **ζώνη 3**. Οι τιμές των ασθενών λοιπόν είναι ιδιαίτερα αυξημένες συγκριτικά με τα υγιή άτομα.($0,270 \pm 0,040$ και $0,226 \pm 0,040$ αντίστοιχα). Οι διακυμάνσεις στην ημι-ποσοτική ανάλυση της έκφρασης των βασικών αυτών πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων ,απεικονίζονται και στα παρακάτω διαγράμματα .(Διάγραμμα 1,2,3,4,5)

<u>Πίνακας 4</u>	MDS Ασθενείς	Υγιείς
Σπεκτρίνη	$0,306 \pm 0,051$	$0,321 \pm 0,051$
Ζώνη 3	$0,270 \pm 0,040^*$	$0,226 \pm 0,040$
Πρωτεΐνη 4,1R	$0,144 \pm 0,013$	$0,146 \pm 0,013$
Ακτίνη	$0,063 \pm 0,010$	$0,058 \pm 0,008$

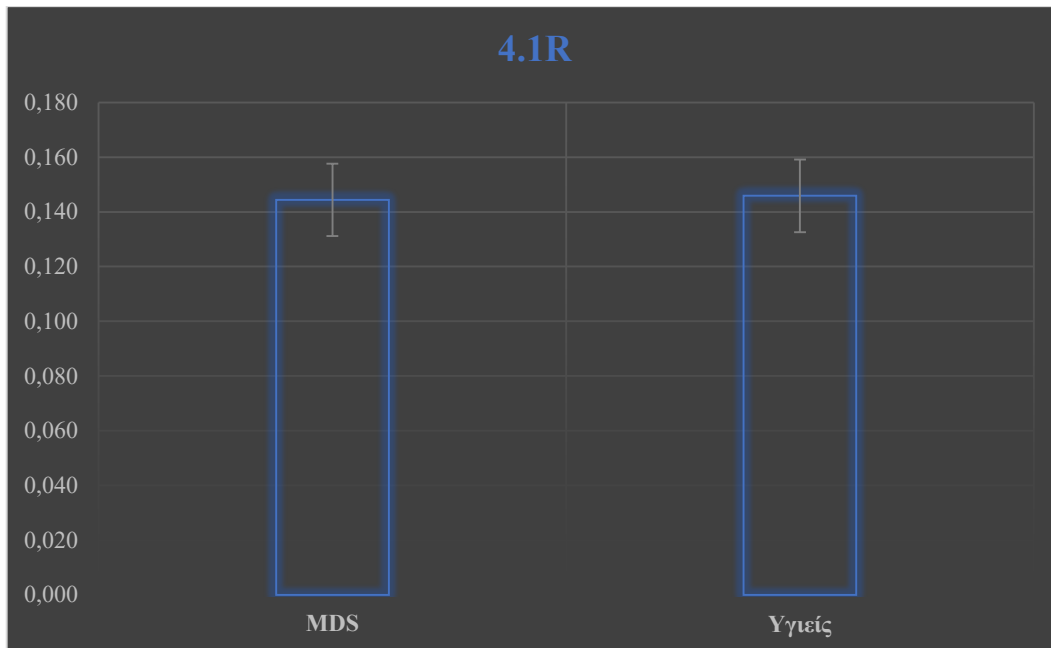
Πίνακας 4 : Ημιποσοτική ανάλυση της έκφρασης των βασικών πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης τόσο των ασθενών με MDS όσο και των υγιών ατόμων .
* $p < 0,05$, σύγκριση υγιών και ασθενών ατόμων.



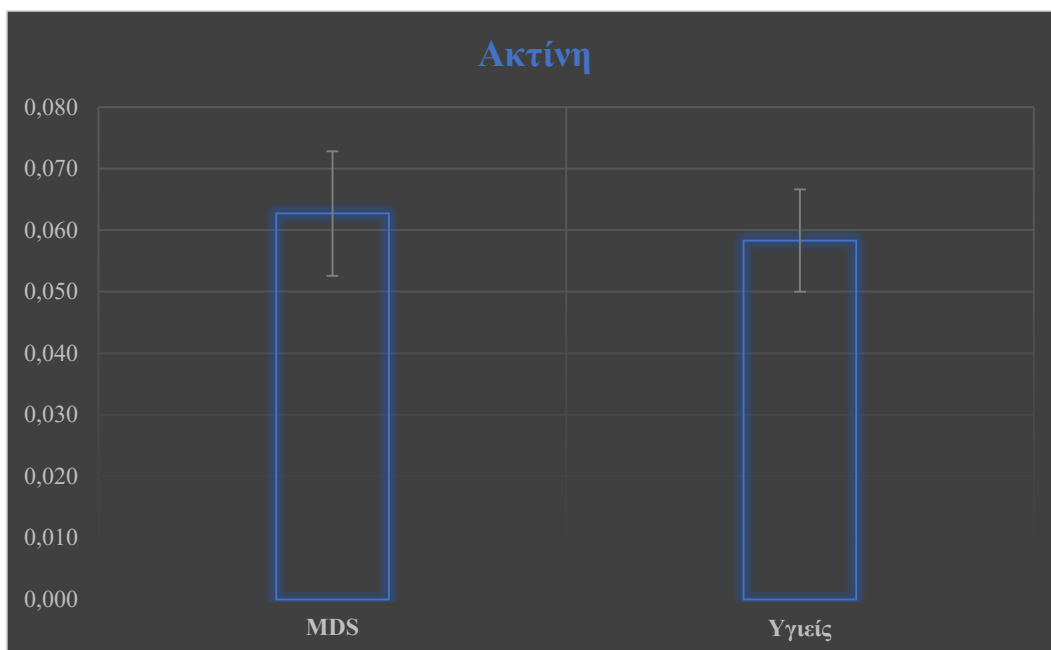
Διάγραμμα 1 : Διαγραμματική απεικόνιση της ημι-ποσοτικής έκφρασης της σκελετικής πρωτεΐνης **σπεκτρίνης**, στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη των ασθενών με MDS συγκριτικά με τα υγιή άτομα. Παρατηρείται ότι η έκφραση της πρωτεΐνης των ασθενών είναι ελαφρώς μειωμένη.



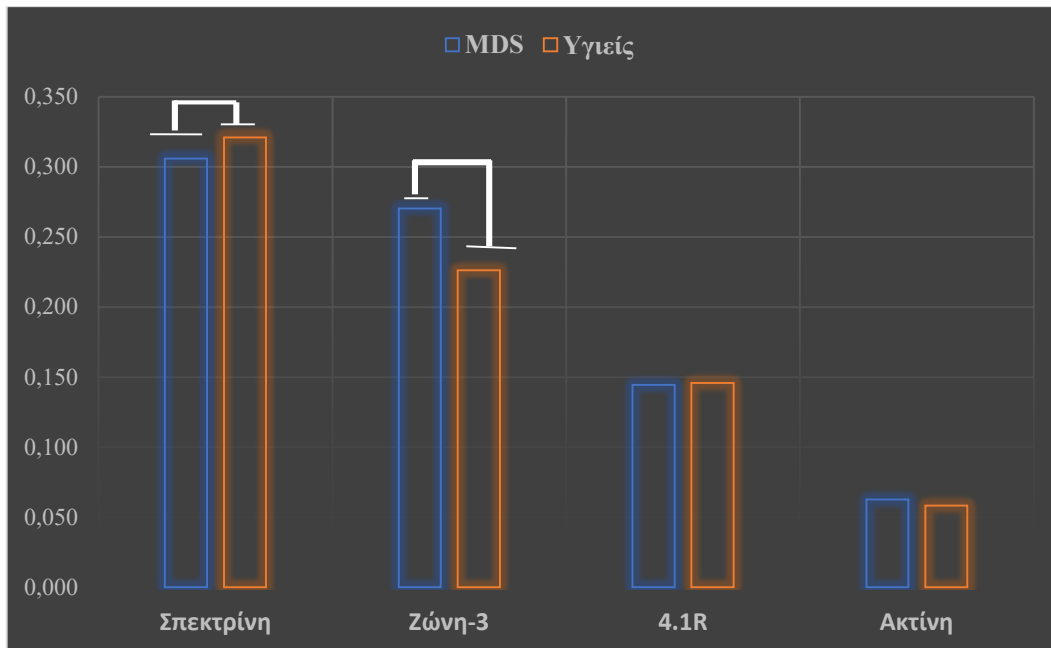
Διάγραμμα 2 : Διαγραμματική απεικόνιση της ημι-ποσοτικής έκφρασης της πρωτεΐνης **ζώνη 3** της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης ,μεταξύ ασθενών με MDS και υγιών ατόμων. Παρουσιάζεται η στατιστικά σημαντική αύξηση της πρωτεΐνης στους ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.



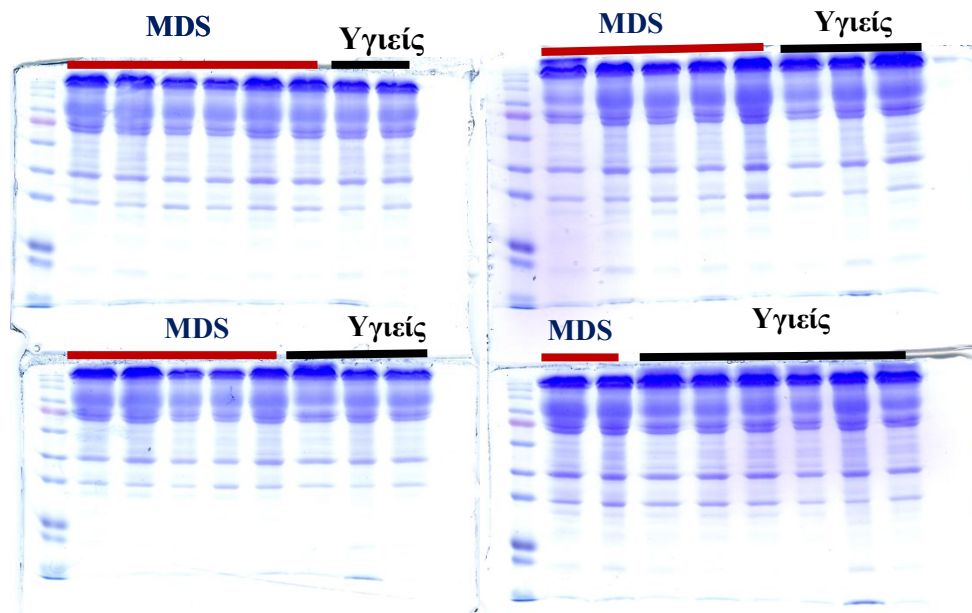
Διάγραμμα 3 : Διαγραμματική απεικόνιση της ημι-ποσοτικής έκφρασης της πρωτεΐνης **4,1R** της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης ,σε ασθενείς με MDS και στα υγιή άτομα. Η σύγκριση επιδεικνύει ίση κατανομή πρωτεΐνης μεταξύ των δύο κατηγοριών.



Διάγραμμα 4 : Διαγραμματική απεικόνιση της ημι-ποσοτικής έκφρασης της πρωτεΐνης **ακτίνης** της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης ,σε ασθενείς με MDS και στα υγιή άτομα. Παρατηρείται ελαφρά αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς.



Διάγραμμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομής και των 4 βασικών πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης τόσο των ασθενών με MDS, όσο και των υγιών ατόμων. Παρατηρείται εμφανώς η αυξημένη έκφραση της ζώνης 3 στους ασθενείς με MDS σε σχέση με τους υγιείς, η ελάχιστη μείωση της σπεκτρίνης και η σχεδόν ίση έκφραση της πρωτεΐνης 4,1 R και της ακτίνης.



Εικόνα 19 : Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών όλων των δειγμάτων των ασθενών με MDS και όλων των υγιών ατόμων. Τα αποτελέσματα (σε καθαρό αριθμό) προήλθαν από τη χρήση του προγράμματος Gel Analyzer 0,1.

Δ) ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συγκεκριμένη εργασία εστιάζει σε δύο αντικείμενα παρατήρησης ,με απώτερο σκοπό τον εντοπισμό αλλοιώσεων στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα . Έτσι σε πρώτη φάση μελετήθηκαν οι διαφοροποιήσεις στους αιματολογικούς δείκτες των ασθενών και στη συνέχεια η βασική πρωτεϊνική σύσταση της μεμβράνης τους με έμφαση στις πρωτεΐνες σπεκτρίνη ,ακτίνη ,πρωτεΐνη 4,1 R και ζώνη 3. Η μελέτη αυτών των παραμέτρων οδήγησε στα προαναφερθέντα αποτελέσματα ,η ερμηνεία των οποίων παραπέμπει στα ακόλουθα συμπεράσματα.

Όσον αφορά στους **αιματολογικούς δείκτες** , το προφίλ των ασθενών υποδεικνύει την ύπαρξη αναιμίας που χαρακτηρίζει γενικά τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα , η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να εξελιχθεί σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. (*Lefèvre et al ,2017*) Η ήπια αυτή μορφή αναιμίας, οφείλεται κυρίως στο μειωμένο αριθμό ερυθροκυττάρων των ασθενών ,ο οποίος είναι υπεύθυνος και για το χαμηλό Hct που επιδεικνύουν σε σχέση με τα υγιή άτομα. Μειωμένο εμφανίζεται επίσης και το ποσοστό των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων των πασχόντων ,δείκτες που παρουσιάζουν μια ήπια μορφή λευκοπενίας και θρομβοπενίας αντίστοιχα. Τόσο η λευκοπενία όσο και η θρομβοπενία αποτελούν διαγνωστικά κριτήρια του συνδρόμου ,όπως προαναφέρθηκε. (*Lefèvre et al ,2017*) Συμπεράσματα προκύπτουν και από την ερμηνεία της αύξησης ορισμένων ερυθροκυτταρικών δεικτών των ασθενών με MDS όπως ο MCV ,ο MCH και ο RDW. Ο δείκτης MCV παρουσιάζεται αυξημένος στους ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σε σχέση με τα υγιή άτομα ,δεδομένο που μπορεί να υποδεικνύει την ύπαρξη δικτυοερυθροκυττάρων στο περιφερικό αίμα των ασθενών. Αυτό το είδος κυττάρων είναι πιθανό να εμφανίζεται αυξημένο στους ασθενείς με MDS , λόγω της ελαττωματικής δυσερυθροποίησης που χαρακτηρίζει την εκδήλωση του συνδρόμου. Η αυξημένη τιμή MCV στους ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα σε σχέση με τους υγιείς , παρουσιάζεται και στην πρόσφατη έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τον *Uman et al* και τους συνεργάτες του, πάνω σε ασθενείς με MDS χαμηλού κινδύνου (*Uman et al,2022*). Ακόμη οι αυξημένες τιμές του δείκτη MCH των ασθενών δε θεωρούνται ανησυχητικές, υποδεικνύοντας έτσι μια ήπια μορφή αναιμίας. Οι σημαντικά παθολογικές τιμές του δείκτη MCH, αποτελούν διαγνωστικό κριτήριο για την ύπαρξη βαριάς αναιμίας . Στη συγκεκριμένη μελέτη λοιπόν, οι ασθενείς δεν επιδεικνύουν παθολογικές τιμές στο δείκτη MCH, για αυτό το λόγο το προφίλ των ασθενών επιβεβαιώνει την ύπαρξη ενός ήπιου χαρακτήρα αναιμίας.

Ιδιαίτερα σημαντικά είναι τα πορίσματα που προκύπτουν από τη μεγάλη αύξηση του ερυθροκυτταρικού δείκτη RDW .Η παθολογικά αυξημένη τιμή του δείκτη RDW, μπορεί να είναι αποτέλεσμα της δυσερυθροποίησης , όταν εκείνη συνδυάζεται με ρυθμιστικές ανωμαλίες στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων καθώς και με ελαττωματικό μεταβολισμό του σιδήρου. Τα συμπεράσματα αυτά υποστηρίζονται και από την ερευνητική προσέγγιση του *Baba* και των συνεργατών του πάνω σε ασθενείς με MDS, σύμφωνα με την οποία η αυξημένη τιμή του RDW παρατηρείται κυρίως στον τύπο της ανθεκτικής αναιμίας (RA κατά FAB) των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (*Baba et al,2017*).

Οι υπόλοιποι αιματολογικοί δείκτες των ασθενών δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική διαταραχή η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε κάποιο σαφές συμπέρασμα για τον ευρύτερο χαρακτήρα των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. Βέβαια η μελέτη του *Uman et al* και των συνεργατών του, που έχει πραγματοποιηθεί σε ασθενείς χαμηλού κινδύνου MDS, έχει

εντοπίσει μείωση και στο δείκτη MCHC μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων (*Uman et al, 2022*). Η διαπίστωση αυτή έρχεται σε αντιπαράθεση με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης που δεν παρουσιάζει καμία διαφοροποίηση στην τιμή του δείκτη MCHC μεταξύ ασθενών με MDS και υγιών ατόμων.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της **βασικής πρωτεϊνικής σύστασης της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης** των ασθενών με MDS, οδηγούν στα παρακάτω συμπεράσματα. Οι βασικές σκελετικές πρωτεΐνες 4,1R, σπεκτρίνη και ακτίνη δεν εμφανίζουν κάποια σημαντική διαφοροποίηση, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα δεν επιδρούν στον κυτταροσκελετό της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης των ασθενών. Η ελάχιστη μειωμένη ποσότητα της σπεκτρίνης δεν αποτελεί σημαντικό εύρημα, ώστε να υποστηριχθεί μια γενικότερη αλλοίωση του υπομεμβρανικού σκελετού της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης των ασθενών. Ωστόσο παλαιότερες έρευνες έχουν υποστηρίξει ότι η ποσότητα της σκελετικής πρωτεΐνης 4,1 R εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη σε ασθενείς με MDS, γεγονός που αυξάνει και την ταχύτητα της ηλεκτροφόρησής της (*Hiroshi et al, 1993*). Στην παρούσα μελέτη η κατανομή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης παρουσιάζεται σχεδόν πανομοιότυπη μεταξύ ασθενών με MDS και υγιών ατόμων. Η σημαντική αλλοίωση άλλωστε, σύμφωνα με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, παρατηρείται στη διαμεμβρανική πρωτεΐνη ζώνη 3 των ερυθροκυττάρων των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Συγκεκριμένα η ποσότητα της ζώνης 3 εμφανίζεται εμφανώς αυξημένη στους ασθενείς σε σχέση με τα υγιή άτομα. Η διατήρηση της πρωτεΐνης αυτής σε υψηλά επίπεδα ή η αυξημένη έκφρασή της στα προγονικά κύτταρα, μπορεί να είναι αποτέλεσμα κάποιου αντισταθμιστικού μηχανισμού των κυττάρων καθώς η πρωτεΐνη αυτή επηρεάζει τη σταθερότητα της μεμβράνης και τη γενικότερη ομοιοστάση του ερυθροκυττάρου (*Reithmeir et al, 2016, Pretini et al, 2019*). Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Επιπλέον, είναι σημαντικός και ο έλεγχος έκφρασης κι άλλων πρωτεϊνών της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων που πιθανά να σχετίζονται με την αύξηση της ζώνης-3, καθώς και ο βαθμός κυστιδιοποίησης των ερυθροκυττάρων στα MDS.

2. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, το προφίλ των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα χαρακτηρίζεται από μια ήπια μορφή αναιμίας, λευκοπενίας και θρομβοπενίας και από την αύξηση των ερυθροκυτταρικών δεικτών MCV, MCH με κυριότερη τη σημαντική αύξηση του RDW. Στις διαταραχές της βασικής πρωτεϊνικής σύστασης της ερυθροκυτταρικής τους μεμβράνης κυριαρχεί η αυξημένη ποσότητα της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης ζώνη 3, αποτελώντας πιθανά έναν μηχανισμό αντισταθμισμού για τη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας ολόκληρου του ερυθροκυττάρου.

E) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Advani R., Rubin E., Mohandas N., Schrier S.L. (1992)** Oxidative Red Blood cell membrane Injury in the Pathophysiology of Severe Mouse b-Thalassemia. *Blood*, 79(4):1064-1067.
2. **Alenghat, F. J., and Golan, D. E., (2013).** Membrane protein dynamics and functional implications in mammalian cells. *Curr. Top. Membr.* 72, 89–120.
3. **Anirban S.G., (2019).** Hemoglobin-based Oxygen Carriers: Current State-of-the-art and Novel Molecules. *Shock (Augusta, Ga.)*, 52(1S Suppl 1), 70–83.
4. **An, X., Salomao, M., Guo, X., Gratzner, W., & Mohandas, N. (2007).** Tropomyosin modulates erythrocyte membrane stability. *Blood*, 109(3), 1284–1288.
5. **Aoki T. (2017).** A Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins. *Membranes*, 7(4), 56.
6. **Azouzi S, Romana M, Arashiki N, Takakuwa Y, El Nemer W, Peyrard T, Colin Y, Amireault P, Le Van Kim C. (2018)** Band 3 phosphorylation induces irreversible alterations of stored red blood cells. *Am J Hematol* ,93(5): E110-E112.
7. **Baba, Y., Saito, B., Shimada, S., Sasaki, Y., Murai, S., Abe, M., Fujiwara, S., Arai, N., Kawaguchi, Y., Kabasawa, N., Tsukamoto, H., Uto, Y., Ariizumi, H., Yanagisawa, K., Hattori, N., Harada, H., & Nakamaki, T. (2018).** Association of red cell distribution width with clinical outcomes in myelodysplastic syndrome. *Leukemia research*, 67, 56–59.
8. **Baines A. J. (2009).** Evolution of spectrin function in cytoskeletal and membrane networks. *Biochemical Society transactions*, 37(Pt 4), 796–803.
9. **Basu, S., Banerjee, D., Ghosh, M., & Chakrabarti, A. (2010).** Erythrocyte membrane defects and asymmetry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndrome. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 15(4), 236–239.
10. **Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R. L., Neuberg, D., & Ebert, B. L. (2011).** Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *The New England journal of medicine*, 364(26), 2496–2506.

11. **Blanc, L., Salomao, M., Guo, X., An, X., Gratzer, W., & Mohandas, N. (2010).** Control of erythrocyte membrane-skeletal cohesion by the spectrin-membrane linkage. *Biochemistry*, *49*(21), 4516–4523.
12. **Boultonwood, J., Fidler, C., Strickson, A. J., Watkins, F., Gama, S., Kearney, L., Tosi, S., Kasprzyk, A., Cheng, J. F., Jaju, R. J., & Wainscoat, J. S. (2002).** Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood*, *99*(12), 4638–4641.
13. **Brandford M.N. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, *72*:48.
14. **Bruce, L. J., Ghosh, S., King, M. J., Layton, D. M., Mawby, W. J., Stewart, G. W., Oldenburg, P. A., Delaunay, J., & Tanner, M. J. (2002).** Absence of CD47 in protein 4.2-deficient hereditary spherocytosis in man: an interaction between the Rh complex and the band 3 complex. *Blood*, *100*(5), 1878–1885.
15. **Bryk, A. H., & Wiśniewski, J. R. (2017).** Quantitative Analysis of Human Red Blood Cell Proteome. *Journal of proteome research*, *16*(8), 2752–2761.
16. **Cazzola, M., & Malcovati, L. (2005).** Myelodysplastic syndromes--coping with ineffective hematopoiesis. *The New England journal of medicine*, *352*(6), 536–538.
17. **Cahalan, S. M., Lukacs, V., Ranade, S. S., Chien, S., Bandell, M., & Patapoutian, A. (2015).** Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume. *eLife*, *4*, e07370.
18. **Chen, L., Brown, J. W., Mok, Y. F., Hatters, D. M., & McKnight, C. J. (2013).** The allosteric mechanism induced by protein kinase A (PKA) phosphorylation of dematin (band 4.9). *The Journal of biological chemistry*, *288*(12), 8313–8320.
19. **Claessens, Y. E., Bouscary, D., Dupont, J. M., Picard, F., Melle, J., Gisselbrecht, S., Lacombe, C., Dreyfus, F., Mayeux, P., & Fontenay-Roupie, M. (2002).** In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. *Blood*, *99*(5), 1594–1601.
20. **Damm, F., Chesnais, V., Nagata, Y., Yoshida, K., Scourzic, L., Okuno, Y., Itzykson, R., Sanada, M., Shiraishi, Y., Gelsi-Boyer, V., Renneville, A., Miyano, S., Mori, H., Shih, L. Y., Park, S., Dreyfus, F., Guerci-Bresler, A.,**

- Solary, E., Rose, C., Cheze, S., ... Kosmider, O. (2013). BCOR and BCORL1 mutations in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Blood*, 122(18), 3169–3177.
21. de Oliveira, S., & Saldanha, C. (2010). An overview about erythrocyte membrane. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 44(1), 63–74.
22. Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J. (1963) The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 100:119
23. Du, V. X., de Groot, P. G., van Wijk, R., Ruggeri, Z. M., and de Laat, B. (eds). (2014). Identification of intercellular adhesion molecule 4 on erythrocytes as mediator of erythrocyte-platelet interaction in thrombus formation, in *Expanding Horizons in Thrombosis and Hemostasis*, (Utrecht: Utrecht University), 50–72.
24. Dzierzak, E., & Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4), a011601.
25. Eidenschink Brodersen, L., Menssen, A. J., Wangen, J. R., Stephenson, C. F., de Baca, M. E., Zehentner, B. K., Wells, D. A., & Loken, M. R. (2015). Assessment of erythroid dysplasia by "difference from normal" in routine clinical flow cytometry workup. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 88(2), 125–135.
26. Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M., & Philipsen, S. (2005). GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Molecular and cellular biology*, 25(4), 1215–1227.
27. Garcia-Manero, G., Griffiths, E. A., Steensma, D. P., Roboz, G. J., Wells, R., McCloskey, J., Odenike, O., DeZern, A. E., Yee, K., Busque, L., O'Connell, C., Michaelis, L. C., Brandwein, J., Kantarjian, H., Oganessian, A., Azab, M., & Savona, M. R. (2020). Oral cedazuridine/decitabine for MDS and CMML: a phase 2 pharmacokinetic/pharmacodynamic randomized crossover study. *Blood*, 136(6), 674–683.
28. Gimm, J. A., An, X., Nunomura, W., & Mohandas, N. (2002). Functional characterization of spectrin-actin-binding domains in 4.1 family of proteins. *Biochemistry*, 41(23), 7275–7282.
29. Giorgi, M., Cianci, C. D., Gallagher, P. G., & Morrow, J. S. (2001). Spectrin oligomerization is cooperatively coupled to membrane assembly: a linkage

targeted by many hereditary hemolytic anemias. *Experimental and molecular pathology*, 70(3), 215–230.

30. Glenthøj, A., Ørskov, A. D., Hansen, J. W., Hadrup, S. R., O'Connell, C., & Grønbæk, K. (2016). Immune Mechanisms in Myelodysplastic Syndrome. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 944.
31. Glogowska, E., Schneider, E. R., Maksimova, Y., Schulz, V. P., Lezon-Geyda, K., Wu, J., Radhakrishnan, K., Keel, S. B., Mahoney, D., Freidmann, A. M., Altura, R. A., Gracheva, E. O., Bagriantsev, S. N., Kalfa, T. A., & Gallagher, P. G. (2017). Novel mechanisms of PIEZO1 dysfunction in hereditary xerocytosis. *Blood*, 130(16), 1845–1856.
32. Greenberg, P. L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., Bennett, J. M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Malcovati, L., Cazzola, M., Cermak, J., Fonatsch, C., Le Beau, M. M., Slovak, M. L., Krieger, O., ... Haase, D. (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 120(12), 2454–2465.
33. Grey, J. L., Kodippili, G. C., Simon, K., & Low, P. S. (2012). Identification of contact sites between ankyrin and band 3 in the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 51(34), 6838–6846.
34. Gurkan U. A. (2021). Biophysical and rheological biomarkers of red blood cell physiology and pathophysiology. *Current opinion in hematology*, 28(3), 138–149.
35. Gyan, E., Frisan, E., Beyne-Rauzy, O., Deschemin, J. C., Pierre-Eugene, C., Randriamampita, C., Dubart-Kupperschmitt, A., Garrido, C., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C., Solary, E., & Fontenay, M. (2008). Spontaneous and Fas-induced apoptosis of low-grade MDS erythroid precursors involves the endoplasmic reticulum. *Leukemia*, 22(10), 1864–1873.
36. Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Hildebrandt, B., Kundgen, A., Lübbert, M., Kunzmann, R., Giagounidis, A. A., Aul, C., Trümper, L., Krieger, O., Stauder, R., Müller, T. H., Wimazal, F., Valent, P., Fonatsch, C., & Steidl, C. (2007). New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*, 110(13), 4385–4395.
37. Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae,

- G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., Yoshida, K., Roller, A., Nadarajah, N., Shiraishi, Y., Shiozawa, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Koefler, H. P., Klein, H. U., Dugas, M., ... Ogawa, S. (2014). Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 28(2), 241–247.
38. Han, B. G., Nunomura, W., Takakuwa, Y., Mohandas, N., & Jap, B. K. (2000). Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization. *Nature structural biology*, 7(10), 871–875.
39. Hermand, P., Gane, P., Callebaut, I., Kieffer, N., Cartron, J. P., & Bailly, P. (2004). Integrin receptor specificity for human red cell ICAM-4 ligand. Critical residues for alphaIIbeta3 binding. *European journal of biochemistry*, 271(18), 3729–3740.
40. Ideguchi, H., Yamada, Y., Kondo, S., Tamura, K., Makino, S., & Hamasaki, N. (1993). Abnormal erythrocyte band 4.1 protein in myelodysplastic syndrome with elliptocytosis. *British journal of haematology*, 85(2), 387–392.
41. Hosono N. (2019). Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS. *International journal of clinical oncology*, 24(8), 885–892.
42. Hosono, N., Makishima, H., Mahfouz, R., Przychodzen, B., Yoshida, K., Jerez, A., LaFramboise, T., Polprasert, C., Clemente, M. J., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., Sanada, M., Cui, E., Verma, A. K., McDevitt, M. A., List, A. F., Sauntharajah, Y., Sekeres, M. A., ... Maciejewski, J. P. (2017). Recurrent genetic defects on chromosome 5q in myeloid neoplasms. *Oncotarget*, 8(4), 6483–6495.
43. Johnson, C. P., Tang, H. Y., Carag, C., Speicher, D. W., & Discher, D. E. (2007). Forced unfolding of proteins within cells. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5838), 663–666.
44. Joshi, R., Gilligan, D. M., Otto, E., McLaughlin, T., & Bennett, V. (1991). Primary structure and domain organization of human alpha and beta adducin. *The Journal of cell biology*, 115(3), 665–675.
45. Khan, A. A., Hanada, T., Mohseni, M., Jeong, J. J., Zeng, L., Gaetani, M., Li, D., Reed, B. C., Speicher, D. W., & Chishti, A. H. (2008). Dematin and adducin provide a novel link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1. *The Journal of biological chemistry*, 283(21), 14600–14609.

- 46. Kodippili, G. C., Spector, J., Hale, J., Giger, K., Hughes, M. R., McNagny, K. M., Birkenmeier, C., Peters, L., Ritchie, K., & Low, P. S. (2012).** Analysis of the mobilities of band 3 populations associated with ankyrin protein and junctional complexes in intact murine erythrocytes. *The Journal of biological chemistry*, 287(6), 4129–4138.
- 47. Komrokji, R. S., & Bennett, J. M. (2007).** Evolving classifications of the myelodysplastic syndromes. *Current opinion in hematology*, 14(2), 98–105.
- 48. Koshino, I., Mohandas, N., & Takakuwa, Y. (2012).** Identification of a novel role for dematin in regulating red cell membrane function by modulating spectrin-actin interaction. *The Journal of biological chemistry*, 287(42), 35244–35250.
- 49. Kuhlman, P. A., Hughes, C. A., Bennett, V., & Fowler, V. M. (1996).** A new function for adducin. Calcium/calmodulin-regulated capping of the barbed ends of actin filaments. *The Journal of biological chemistry*, 271(14), 7986–7991.
- 50. Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- 51. Lefèvre, C., Bondu, S., Le Goff, S., Kosmider, O., & Fontenay, M. (2017).** Dyserythropoiesis of myelodysplastic syndromes. *Current opinion in hematology*, 24(3), 191–197.
- 52. List AF, Vardiman J, Issa JP, DeWitte TM. (2004).** Myelodysplastic syndromes. *Hematology, Am. Soc. Hematol Educ. Program*:297-317
- 53. Lux S. E., 4th (2016).** Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood*, 127(2), 187–199.
- 54. Ma, S., Cahalan, S., LaMonte, G., Grubaugh, N. D., Zeng, W., Murthy, S. E., Paytas, E., Gamini, R., Lukacs, V., Whitwam, T., Loud, M., Lohia, R., Berry, L., Khan, S. M., Janse, C. J., Bandell, M., Schmedt, C., Wengelnik, K., Su, A. I., Honore, E., ... Patapoutian, A. (2018).** Common PIEZO1 Allele in African Populations Causes RBC Dehydration and Attenuates Plasmodium Infection. *Cell*, 173(2), 443–455.e12.
- 55. Mathis, S., Chapuis, N., Debord, C., Rouquette, A., Radford-Weiss, I., Park, S., Dreyfus, F., Lacombe, C., Béné, M. C., Kosmider, O., Fontenay, M., & Bardet, V. (2013).** Flow cytometric detection of dyserythropoiesis: a sensitive and powerful diagnostic tool for myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 27(10),

1981–1987.

56. Matsuoka, Y., Hughes, C. A., & Bennett, V. (1996). Adducin regulation. Definition of the calmodulin-binding domain and sites of phosphorylation by protein kinases A and C. *The Journal of biological chemistry*, 271(41), 25157–25166.
57. Minetti, G., Achilli, C., Perotti, C., & Ciana, A. (2018). Continuous Change in Membrane and Membrane-Skeleton Organization During Development from Proerythroblast to Senescent Red Blood Cell. *Frontiers in physiology*, 9, 286.
58. Mohandas N., Gallagher P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112:3939-3948.
59. Morera, D., & MacKenzie, S. A. (2011). Is there a direct role for erythrocytes in the immune response. *Veterinary research*, 42(1), 89.
60. Moyer, J. D., Nowak, R. B., Kim, N. E., Larkin, S. K., Peters, L. L., Hartwig, J., Kuypers, F. A., & Fowler, V. M. (2010). Tropomodulin 1-null mice have a mild spherocytic elliptocytosis with appearance of tropomodulin 3 in red blood cells and disruption of the membrane skeleton. *Blood*, 116(14), 2590–2599.
61. Mufti, G. J., Bennett, J. M., Goasguen, J., Bain, B. J., Baumann, I., Brunning, R., Cazzola, M., Fenaux, P., Germing, U., Hellström-Lindberg, E., Jinnai, I., Manabe, A., Matsuda, A., Niemeyer, C. M., Sanz, G., Tomonaga, M., Vallespi, T., Yoshimi, A., & International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndrome (2008). Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica*, 93(11), 1712–1717.
62. Mufti GJ. (2004). Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Best Pract. Res.Clin. Haematol*; 17:543-57.
63. Murthy, S. E., Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2017). Piezos thrive under pressure: mechanically activated ion channels in health and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(12), 771–783.
64. Nandakumar, S. K., Ulirsch, J. C., & Sankaran, V. G. (2016). Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. *British journal of haematology*, 173(2), 206–218
65. Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G.,

- Van Loo, P., Yoon, C. J., Ellis, P., Wedge, D. C., Pellagatti, A., Shlien, A., Groves, M. J., Forbes, S. A., Raine, K., Hinton, J., Mudie, L. J., McLaren, S., Hardy, C., Latimer, C., Della Porta, M. G., ... Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium (2013). Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 122(22), 3616–3699.
66. Patnaik, M. M., Lasho, T. L., Finke, C. M., Gangat, N., Caramazza, D., Holtan, S. G., Pardanani, A., Knudson, R. A., Ketterling, R. P., Chen, D., Hoyer, J. D., Hanson, C. A., & Tefferi, A. (2010). WHO-defined 'myelodysplastic syndrome with isolated del(5q)' in 88 consecutive patients: survival data, leukemic transformation rates and prevalence of JAK2, MPL and IDH mutations. *Leukemia*, 24(7), 1283–1289.
67. Poole J. (2000). Red cell antigens on band 3 and glycophorin A. *Blood reviews*, 14(1), 31–43.
68. Pretini, V., Koenen, M. H., Kaestner, L., Fens, M., Schiffelers, R. M., Bartels, M., & Van Wijk, R. (2019). Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Frontiers in physiology*, 10, 945
69. Reithmeier, R. A., Casey, J. R., Kalli, A. C., Sansom, M. S., Alguel, Y., & Iwata, S. (2016). Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochimica et biophysica acta*, 1858(7 Pt A), 1507–1532.
70. Rungaldier, S., Oberwagner, W., Salzer, U., Csaszar, E., & Prohaska, R. (2013). Stomatin interacts with GLUT1/SLC2A1, band 3/SLC4A1, and aquaporin-1 in human erythrocyte membrane domains. *Biochimica et biophysica acta*, 1828(3), 956–966.
71. Sallman, D. A., & List, A. (2019). The central role of inflammatory signaling in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Blood*, 133(10), 1039–1048.
72. Santini V. (2021). Advances in myelodysplastic syndrome. *Current opinion in oncology*, 33(6), 681–686.
73. Schanz, J., Tüchler, H., Solé, F., Mallo, M., Luño, E., Cervera, J., Granada, I., Hildebrandt, B., Slovak, M. L., Ohyashiki, K., Steidl, C., Fonatsch, C., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Valent, P., Giagounidis, A., Aul, C., Lübbert, M., Stauder, R., Krieger, O., ... Haase, D. (2012). New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic

syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(8), 820–829.

74. Sui, Z., Nowak, R. B., Bacconi, A., Kim, N. E., Liu, H., Li, J., Wickrema, A., An, X. L., & Fowler, V. M. (2014). Tropomodulin3-null mice are embryonic lethal with anemia due to impaired erythroid terminal differentiation in the fetal liver. *Blood*, 123(5), 758–767.
75. Svetina, S., Švelc Kebe, T., & Božič, B. (2019). A Model of Piezo1-Based Regulation of Red Blood Cell Volume. *Biophysical journal*, 116(1), 151–164.
76. Uman, N., Kobbuaklee, S., Kansuwan, P., Watanaboonyongcharoen, P., & Polprasert, C. (2022). Detection of Red Blood Cell Membrane Proteins in Myelodysplastic Syndromes Using Eosin-5-Maleimide (EMA) Staining by Flow Cytometry. *Hematology reports*, 14(1), 13–18.
77. Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., Harris, N. L., Le Beau, M. M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., & Bloomfield, C. D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), 937–951.
78. Yamashiro, S., Gokhin, D. S., Kimura, S., Nowak, R. B., & Fowler, V. M. (2012). Tropomodulins: pointed-end capping proteins that regulate actin filament architecture in diverse cell types. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 69(6), 337–370.
79. Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nowak, D., Nagata, Y., Yamamoto, R., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., Kon, A., Nagasaki, M., Chalkidis, G., Suzuki, Y., Shiosaka, M., Kawahata, R., Yamaguchi, T., Otsu, M., Obara, N., Sakata-Yanagimoto, M., Ishiyama, K., Mori, H., ... Ogawa, S. (2011). Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 478(7367), 64–69.
80. Zhang, J., Abiraman, K., Jones, S. M., Lykotrafitis, G., & Andemariam, B. (2017). Regulation of Active ICAM-4 on Normal and Sickle Cell Disease RBCs via AKAPs Is Revealed by AFM. *Biophysical journal*, 112(1), 143–152.

- 81. Zuccala, E. S., Satchwell, T. J., Angrisano, F., Tan, Y. H., Wilson, M. C., Heesom, K. J., & Baum, J. (2016).** Quantitative phospho-proteomics reveals the Plasmodium merozoite triggers pre-invasion host kinase modification of the red cell cytoskeleton. *Scientific reports*, 6, 19766.