



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

**Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία
(HemQcR)**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Παθοφυσιολογικές μεταβολές ερυθροκυττάρων σε ασθενείς με διπλή ετεροζυγωτία β
Θαλασσαιμίας/Δρεπανοκυτταρικής Νόσου**

Αιμιλία Ε. Γιαννάκη

Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων

Π.Μ.Σ. Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση

ΑΘΗΝΑ 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF HEALTH AND CARE SCIENCES



DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

MEDICAL LABORATORY SECTION

Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology

(HemQcR)

DOCTORAL (PhD) THESIS

Pathophysiological Red Blood Cell changes in double heterozygous b-Thalassaimia/Sickle Cell Disease patients

EMILIA E. GIANNAKI

Medical laboratory Scientist

Master in Science, Biomedical Methods and Technology in Diagnosis

ATHENS 2024

Επιβλέπων

Αναστάσιος Κριεμπάρδης Καθηγητής Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Συμβουλευτική Τριμελής Επιτροπή

Αναστάσιος Κριεμπάρδης Καθηγητής Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Ευσταθία Παπαγεωργίου Καθηγήτρια Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Χριστίνα Φούντζουλα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αναστάσιος Κριεμπάρδης Καθηγητής Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Ευσταθία Παπαγεωργίου Καθηγήτρια Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Δημήτριος Χανιώτης Καθηγητής Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Απόστολος Μπελούκας Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Χριστίνα Φούντζουλα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Γεώργιος Δρύλλης Επίκουρος Καθηγητής Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Βασίλειος Τζούνακας Επίκουρος Καθηγητής Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Πατρών

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα»,

N. 5343/1932, άρθρο 202, παράγραφος

Αφιερωμένο στους γονείς μου

Δήλωση συγγραφέα διδακτορικής διατριβής

Η κάτωθι υπογεγραμμένη, Γιαννάκη Αιμιλία του Ευαγγέλου, υποψήφια διδάκτορας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

Είμαι συγγραφέας και δικαιούχος των πνευματικών δικαιωμάτων επί της διατριβής και δεν προσβάλλω τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων. Για τη συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής δεν χρησιμοποίησα ολόκληρο ή μέρος έργου άλλου δημιουργού ή τις ιδέες και αντιλήψεις άλλου δημιουργού χωρίς να γίνεται αναφορά στην πηγή προέλευσης (βιβλίο, άρθρο από εφημερίδα ή περιοδικό, ιστοσελίδα κ.λπ.).

Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του διδακτορικού διπλώματός μου.

Η Δηλούσα

**AIMILIA
GIANNAKI** Digitally signed by
AIMILIA GIANNAKI
Date: 2024.04.05
13:56:30 +03'00'

Αιμιλία Ε. Γιαννάκη

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κριεμπάρδης Αναστάσιος

Καθηγητής Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών ΠαΔΑ,
Επιβλέπων

Παπαγεωργίου Ευσταθία

Καθηγήτρια Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών ΠαΔΑ
Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Χανιώτης Δημήτριος

Καθηγητής
Πρόεδρος Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών ΠαΔΑ

Μπελούκας Απόστολος

Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών ΠαΔΑ

Φούντζουλα Χριστίνα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών ΠαΔΑ
Μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Δρύλλης Γεώργιος

Επίκουρος Καθηγητής
Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών ΠαΔΑ

Τζούνακας Βασίλειος

Επίκουρος Καθηγητής
Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών

Πρόλογος

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία, του Τομέα Ιατρικών Εργαστηρίων, του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Αναστάσιου Κριεμπάρδη κατά το χρονικό διάστημα 2018-2023.

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω τον Πρόεδρο του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω αυτή τη διδακτορική διατριβή καθώς και για τη φιλοξενία που μου παρείχε στο Τμήμα.

Ευχαριστίες οφείλω στον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη γιατί αρχικά ως μέλος της Συντονιστικής Επιτροπής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «*Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση*» με επέλεξε σε αυτό το μεταπτυχιακό, ενώ στη συνέχεια μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την παρούσα διδακτορική διατριβή. Τον ευχαριστώ για τις πολύτιμες συμβουλές του σε όλα τα επίπεδα, την αμέριστη και εποικοδομητική κριτική στη διόρθωση του κειμένου της διατριβής, την ηθική συμπαράστασή του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης και την άμεση ανταπόκριση στις δυσκολίες που προέκυψαν.

Πολλές ευχαριστίες στα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, την Καθηγήτρια κα Ευσταθία Παπαγεωργίου και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Χριστίνα Φούντζουλα για τις εύστοχες παρατηρήσεις, την πρόθυμη ανταπόκριση να βοηθήσουν στον σχεδιασμό των πειραμάτων και την επίβλεψη τους μέχρι τις τελικές διορθώσεις του κειμένου της διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην Διευθύντρια του Κέντρου Εμπειρογνωμοσύνης Αιμοσφαιρινοπαθειών και επιπλοκών τους - Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας και Δρεπανοκυτταρικής Νόσου - του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών Ιπποκράτειο κα Ντελίκου Σοφία. Η συμβολή της κα Ντελίκου στον πειραματικό σχεδιασμό, στην εύρεση, τη συμμετοχή των ασθενών και στη συλλογή των δειγμάτων ήταν καθοριστική για την περάτωση αυτής της διατριβής. Επίσης, την ευχαριστώ για τα πολύτιμα σχόλιά της στα κείμενα της διατριβής και στα αποτελέσματα της εργασίας. Ευχαριστίες και στην παθολόγο ιατρό της μονάδας, Επιμελήτρια Α' ΕΣΥ, κα Ξυδάκη Αικατερίνη.

Η συμμετοχή των Ακαδημαϊκών Υποτρόφων κας Χαράς Γεωργατζάκου και του κ. Σωτήριου Φόρτη ήταν πολύ σημαντική τόσο στην πορεία όσο και στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Οι συμβουλές τους σε εργαστηριακό και θεωρητικό επίπεδο με βοήθησαν τόσο να σχηματίσω κρίση για το οτιδήποτε αναλάμβανα, όσο και να αποκτήσω υψηλού επιπέδου εργαστηριακή εμπειρία. Ευχαριστίες οφείλω και στη μεταδιδάκτορα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών κα Αλκμήνη Αναστασιάδη για τα θετικά σχόλιά της στην παρούσα εργασία.

Αισθάνομαι επίσης την ανάγκη να ευχαριστήσω για τη συμπαράστασή της, καθ' όλη τη διάρκεια της επαγγελματικής μου πορείας, για τα μέσα που μου προσφέρει στη δια βίου μάθηση, αλλά και για τις διορθώσεις και συμβουλές της κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διατριβής, τη διευθύντρια του Τμήματος Αιμοδοσίας και Αιμόστασης - Αιμορροφιλικών ασθενών ΓΝΑ Ιπποκράτειο, κα Νομικού Ευφροσύνη.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω την Προϊσταμένη Παραϊατρικού Τομέα του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών Ιπποκράτειο κα Παύλου Ευθυμία, την πνευματική μου δασκάλα, πολύτιμη φίλη και συνάδελφο για την αμέριστη βοήθειά της σε όλα τα επίπεδα και για την επιμονή της να συνεχίσω τις σπουδές μου και να εξελιχθώ στο επάγγελμά μου. Επίσης, τις συναδέλφους Τεχνολόγους Ιατρικών Εργαστηρίων του τμήματος Αιμόστασης του Ιπποκρατείου Αθηνών, κυρίες Σιουμάλα Μαρία, Γιαννιώτη Αρετή και Δασκαλάκη Σταυρούλα, για την πολύτιμη βοήθειά τους στη συλλογή των δειγμάτων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στα τέσσερα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, τον Πρόεδρο του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών κ. Δημήτριο Χανιώτη, τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Απόστολο Μπελούκα, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γεώργιο Δρύλλη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βασίλειο Τζούνακα, για την πρόθυμη συμμετοχή τους σε αυτή και το χρόνο που αφιέρωσαν, καθώς και σε όλα τα μέλη του Τομέα Ιατρικών Εργαστηρίων για την φιλοξενία που μου πρόσφεραν.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την ηθική συμπαράσταση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν. Δεν μπορώ παρά να τους αφιερώσω όλη αυτή την προσπάθεια.

*Αιμιλία Γιαννάκη
Μάρτιος 2024*

Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων.....	11
Περιεχόμενα πινάκων	16
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	19
1. Το Αίμα.....	19
1.1 Το πλάσμα	19
1.2 Τα κύτταρα του αίματος	20
1.2.1 Λευκά Αιμοσφαίρια	20
1.2.2 Αιμοπετάλια	21
1.2.3 Ερυθρά Αιμοσφαίρια	21
2. Ερυθροκυτταρική μεμβράνη.....	22
2.1 Μembrανικά λιπίδια	23
2.2 Μembrανικές πρωτεΐνες	24
2.2.1 Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες.....	24
2.2.1.1 Ζώνη-3 ή ανιονανταλλάκτης	24
2.2.1.2 Γλυκοφορίνες.....	26
2.2.1.3 Υδατοπορίνη-1.....	27
2.2.1.4 Μεταφορέας γλυκόζης-1	29
2.2.1.5 Αντλία ιόντων Ca ⁺⁺ - ΑΤΡάση.....	29
2.2.1.6 Πρωτεΐνη CD47	30
2.2.1.7 Σύμπλοκο Rh και Rh σχετιζόμενη γλυκοπρωτεΐνη	30
2.2.1.8 Πρωτεΐνη CD59	31
2.2.1.9 Στοματίνη	31
2.2.2 Σκελετικές πρωτεΐνες	32
2.2.2.1 Σπεκτρίνη.....	32
2.2.2.2 Αγκυρίνη.....	33
2.2.2.3 Ακτίνη - Τροπομυοσίνη - Τροπομοντουλίνη	34
2.2.2.4 Πρωτεΐνη 4.1 R.....	35
2.2.2.5 Πρωτεΐνη p55	36
2.2.2.6 Δεματίνη.....	36
2.2.2.7 Παλλιδίνη	37
2.2.3 Διάταξη πρωτεϊνών στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη - Σύμπλοκα πρωτεϊνών	37
2.2.4 Κυτοσολικές πρωτεΐνες.....	39
2.2.4.1 Αιμοσφαιρίνη	39
Παραλλαγές αιμοσφαιρίνης	41

Ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος.....	42
2.2.4.2 Υπεροξειρεδοξίνη-2 (PRX-2)	42
2.2.4.3 Hsp70	43
2.2.4.4 Καλπαΐνη - Καλπαστατίνη	43
3. Μεταβολισμός ερυθροκυττάρων	44
3.1 Αναερόβια γλυκόλυση - Το μονοπάτι Embden – Meyerhof	45
3.2 Ο κύκλος Rapoport – Luebering	45
3.3 Το μονοπάτι Φωσφορικών Πεντοζών (Μονοφωσφορικής Εξόζης)	46
Ζώνη-3 και μεταβολισμός ερυθροκυττάρου	48
4. Γήρανση ερυθροκυττάρων.....	49
4.1 Μικροκυστιδιοποίηση	50
4.1.1 Κλαστερίνη (sCLU, secretory clusterin).....	53
4.2 Μονοπάτι γήρανσης μετατροπών ζώνης-3.....	54
4.3 Ομοιόσταση ιόντων Ca ⁺²	55
4.4 Ενεργοποίηση κασπασών	56
4.5 Γήρανση και οξειδωτικό στρες	56
4.6 Γήρανση και CD47.....	58
5. Ερυθρόπτωση	59
6. Οξειδωτικό στρες.....	62
6.1 Οξείδωση της αιμοσφαιρίνης	62
6.2 Οξείδωση μεμβρανικών πρωτεϊνών.....	63
6.2.2 Καρβονυλίωση πρωτεϊνών.....	64
6.3 Υπεροξείδωση λιπιδίων	65
6.4 Αντιοξειδωτικά συστήματα ερυθροκυττάρων	65
6.4.1 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστατικά	65
6.4.2 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστατικά	67
6.4.3 Άλλα αντιοξειδωτικά ορού/πλάσματος	68
7. Η Δρεπανοκυτταρική νόσος.....	69
7.1 Ορισμός.....	69
7.2 Ιστορική αναδρομή.....	70
7.3 Γεωγραφική κατανομή της δρεπανοκυτταρικής νόσου	71
7.4 Αιμοσφαιρινοπάθειες.....	72
7.5 Κλινικές μορφές δρεπανοκυτταρικών συνδρόμων	74
7.5.1 Ετερόζυγος δρεπανοκυτταρική αναιμία (HbAS)	74
7.5.2 Ομόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία (HbSS).....	74
7.5.3 Διπλή ετεροζυγωτία Hb S/β thal.....	75

7.5.4 Διπλή ετεροζυγωτία HbS/αιμοσφαιρινοπάθειας C (HbSC)	76
7.5.5 Σπανιότερες μορφές διπλής ετεροζυγωτίας	76
7.6 Η αιμοσφαιρίνη S	77
7.6.1 Δομή, κινητική και μηχανισμός πολυμερισμού	77
7.6.2 Μοντέλο ενδοκυτταρικού πολυμερισμού και ρεολογία	80
7.6.3 Αλλαγές στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και υποπληθυσμοί δρεπανοκυττάρων	81
7.7 Κυτταρικές αλληλοεπιδράσεις στη δρεπανοκυτταρική νόσο	84
7.7.1 Προσκόλληση στο ενδοθήλιο	84
7.7.2 Λευκά αιμοσφαίρια	85
7.7.3 Δικτυοερυθροκύτταρα - ΔΕΚ (Reticulocytes)	86
7.7.4 Καταστροφή και ενεργοποίηση του ενδοθηλίου	88
7.7.5 Μόρια προσκόλλησης	90
7.7.6 Ο ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου (NO)	91
7.8 Διαταραχές πήξης - αιμόστασης	92
7.8.1 Ο ρόλος του ιστικού παράγοντα (TF – Tissue Factor)	93
7.8.2 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων	93
7.9 Εργαστηριακή διάγνωση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας	93
7.10 Κλινική εικόνα δρεπανοκυτταρικής νόσου	95
7.10.1 Αιμόλυση	95
7.10.2 Αγγειακή απόφραξη / επώδυνες κρίσεις	96
7.10.3 Χρόνια βλάβη οργάνων	97
7.11 Θεραπεία δρεπανοκυτταρικής νόσου	99
7.11.1 Μεταγγισιοθεραπεία	99
7.11.2 Χορήγηση υδροξυουρίας	100
7.11.3 Χορήγηση L-γλουταμίνης	103
7.11.4 Μεταμόσχευση μυελού των οστών	105
7.11.5 Αυτόλογη γονιδιακή θεραπεία	106
7.11.6 Νεότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις	106
B. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	109
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	110
Γ1. Ασθενείς	110
Γ2. Απομόνωση πλάσματος και ορού από το περιφερικό αίμα	110
Γ3. Μέθοδοι	111
Γ3.1 Αιματολογικός και Βιοχημικός έλεγχος	111
Γ3.2 Ωσμωτική Ευθραυστότητα ερυθροκυττάρων	111
Γ3.3 Ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος	112

Γ3.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)	112
Γ3.5 Μέτρηση ενδοκυττάρων επιπέδων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS).....	113
Γ3.6 Απομόνωση και επεξεργασία ερυθροκυτταρικών μεμβρανών	114
Γ3.6.1 Λευκαφαίρεση και αιμοπεταλιαφαίρεση σε κολώνες κυτταρίνης	114
Γ3.6.2 Απομόνωση ερυθροκυτταρικών μεμβρανών	114
Γ3.6.3 Προσδιορισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δείγματος	115
Γ3.6.4 Προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος για ηλεκτροφόρηση	116
Γ3.6.5 Τεχνική ανοσοαποτυπώματος κατά Western	116
Γ3.6.6 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών των πηκτωμάτων και των φιλμ	118
Γ3.6.7 Καρβονυλίωση των πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (μέθοδος Oxyblot)....	118
Γ3.7 Έλεγχοι πηκτικού μηχανισμού.....	119
Γ3.7.1 Κλασσικός έλεγχος της αιμόστασης.....	119
Γ3.7.2 Δείκτες υπερπηκτικότητας	120
Γ3.8 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	121
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	123
Δ1. Ασθενείς - Δημογραφικά στοιχεία	123
Δ2. Βασικός Αιματολογικός και Βιοχημικός έλεγχος	124
Δ2.1 Γενική Αίματος.....	124
Δ2.2 Βιοχημικός Έλεγχος	124
Δ2.3 Αιμόσταση.....	125
Δ3. Κατηγοριοποίηση δρεπανοκυτταρικών ασθενών με βάση τη γλουταμίνη	127
Δ4. Κατηγοριοποίηση δρεπανοκυτταρικών ασθενών με βάση το εύρος κατανομής ερυθροκυττάρων (RDW).....	132
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	136
Ε.1 Υψηλή δόση L-γλουταμίνης μπορεί να είναι προστατευτική ως προς την οξείδωση, την υπερπηκτικότητα και την φλεγμονή	137
Ε2. Ο αυξημένος RDW συνδέεται με δείκτες σοβαρότητας της νόσου	139
ΣΤ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	141
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	142
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	165
ABSTRACT.....	166
ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	167
ΣΤ1. ΣΥΝΕΔΡΙΑ	167
ΣΤ2. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	167

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Μοντέλο ρευστού μωσαϊκού πλασματικής μεμβράνης.....	22
Εικόνα 2: Ο ρόλος του ανιονανταλλάκτη Cl/HCO_3^- /ζώνη-3 στα ερυθρά αιμοσφαίρια.....	25
Εικόνα 3: Αναπαράσταση της δομής της υδατοπορίνης.....	28
Εικόνα 4: Η οργάνωση των κύριων πρωτεϊνικών συμπλόκων στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη του ανθρώπου.....	31
Εικόνα 5: Ο σκελετός της σπεκτρίνης των ερυθροκυττάρων.....	33
Εικόνα 6: Σχηματικό μοντέλο της δομής του συμπλέγματος σπεκτρίνης - ακτίνης του σκελετού της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης.....	35
Εικόνα 7: Τρισδιάστατο μοντέλο για το σύμπλοκο ζεύξης του σκελετού της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης.....	39
Εικόνα 8: Η δομή της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης.....	41
Εικόνα 9: Τα γλυκολυτικά μονοπάτια Embden-Meyerhof και Rapoport-Luebering.....	46
Εικόνα 10: Το μονοπάτι φωσφορικών πεντοζών στα ερυθροκύτταρα.....	48
Εικόνα 11: Προτεινόμενοι μηχανισμοί για την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού, που οδηγεί στο σχηματισμό μικροκυστιδίων.....	51
Εικόνα 12: Προτεινόμενο μοντέλο της εμπλοκής της κλαστερίνης στη μεμβρανική ακεραιότητα, τη γήρανση και την κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων.....	53
Εικόνα 13: Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, που σχετίζονται με την αυξημένη αυτοοξείδωση της οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης πάνω στη μεμβράνη.....	55
Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση που παρουσιάζει τις δύο οδούς που παράγουν οξειδωτικό στρες στα ερυθροκύτταρα.....	58
Εικόνα 15: Συμμετοχή της πρωτεΐνης CD47 στην ερυθροφαγοκυττάρωση λόγω γήρανσης και οξείδωσης.....	59
Εικόνα 16: Η σηματοδότηση της ερυθρόπτωσης.....	61
Εικόνα 17: Σωματία Heinz (Heinz bodies) (έγκλειστα αιμοσφαιρίνης).....	63
Εικόνα 18: Ο κύκλος της γλουταθειόνης.....	67
Εικόνα 19: Παγκόσμια κατανομή που παρουσιάζει την παρουσία ή απουσία του HbS αλληλίου (Piet et al., 2005) σε σχέση με τη μέση θερμοκρασία σε °C (World Climate).....	72
Εικόνα 20: Σχηματικό μοντέλο διάταξης των μορίων αιμοσφαιρίνης στη γέλη, όπως φαίνεται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	78
Εικόνα 21: Ο μηχανισμός διπλής πυρηνοποίησης του πολυμερισμού της HbS.....	79
Εικόνα 22: Διάγραμμα του φάσματος ενδοκυτταρικού πολυμερισμού των δρεπανοκυττάρων σε διαφορετικές καταστάσεις κορεσμού οξυγόνου: (a) 100%, (b) 75%, (c) 50%, (d) 25% και (e) 0%.....	80
Εικόνα 23: Οι αλλαγές της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης στο δρεπανοκύτταρο.....	82
Εικόνα 24: Επίχρισμα περιφερικού αίματος ανήλικου ασθενή με δρεπανοκυτταρική νόσο.....	84
Εικόνα 25: Σχηματικά μοντέλα αγγειακής απόφραξης στη δρεπανοκυτταρική αναιμία.....	86
Εικόνα 26: Δικτυοερυθροκύτταρο και ώριμο ερυθροκύτταρο στη ΔΝ.....	88
Εικόνα 27: Προτεινόμενος μηχανισμός για τη συμμετοχή των ερυθροκυττάρων στη διαδικασία της αγγειακής απόφραξης.....	89
Εικόνα 28: Προσκόλληση των δρεπανοκυττάρων στο ενδοθήλιο και κυτταρική ενεργοποίηση.....	91
Εικόνα 29: Ακτινογραφίες θώρακος 18χρονης ασθενούς με ομόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία.....	99
Εικόνα 30: Οι πολλαπλοί μηχανισμοί δράσης της υδροξυουρίας στη δρεπανοκυτταρική αναιμία.....	102
Εικόνα 31: Η σύνθεση της γλουταθειόνης στο ερυθροκύτταρο.....	104
Εικόνα 32: Διαφορές δεικτών φλεγμονής δρεπανοκυτταρικών ασθενών που διαχωρίζονται με βάση τη χορήγηση γλουταμίνης.....	128
Εικόνα 33: Διαφορές στις ερυθροκυτταρικές παραμέτρους δρεπανοκυτταρικών ασθενών που διαχωρίζονται με βάση τη γλουταμίνη.....	129
Εικόνα 34: Η ανάλυση συστάδων αποκάλυψε δύο υποομάδες ασθενών, τις οποίες διαχωρίζουν οι τιμές του RDW.....	132
Εικόνα 35: Διαφορές σε (Α) δείκτες αιμόλυσης και (Β) οξειδοαναγωγικές παραμέτρους μεταξύ των δρεπανοκυτταρικών δειγμάτων, που διαχωρίζονται με βάση τις τιμές του RDW.....	133

<i>Εικόνα 36: Διαφορές στις παραμέτρους αιμόστασης και πήξης μεταξύ των δρεπανοκυτταρικών δειγμάτων, που διαχωρίζονται με βάση το RDW</i>	<i>134</i>
<i>Εικόνα 37: Διαφορές στους δείκτες φλεγμονής μεταξύ των δρεπανοκυτταρικών δειγμάτων, που διαχωρίζονται με βάση το RDW</i>	<i>135</i>

Περιεχόμενα πινάκων

<i>Πίνακας 1: Ποσοστό λιπιδίων στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη</i>	<i>23</i>
<i>Πίνακας 2: Οι εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις επιπλοκών της δρεπανοκυτταρικής ετεροζυγωτίας (στίγμα)</i>	<i>74</i>
<i>Πίνακας 3: Πιθανές και αναγνωρισμένες παρενέργειες της θεραπείας της δρεπανοκυτταρικής νόσου με υδροξυουρία</i>	<i>103</i>
<i>Πίνακας 4: Κύρια δημογραφικά στοιχεία των ασθενών και των μαρτύρων</i>	<i>123</i>
<i>Πίνακας 5: Διαφοροποίηση δρεπανοκυτταρικών ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες.....</i>	<i>125</i>
<i>Πίνακας 6: Διαφοροποίηση δρεπανοκυτταρικών ασθενών που λαμβάνουν ως θεραπευτική αγωγή την υδροξυουρία και διατροφικό συμπλήρωμα γλουταμίνης λιγότερο ή περισσότερο από 15g/ημέρα.....</i>	<i>130</i>

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine Triphosphate)

Ca⁺⁺: κατιόν ασβεστίου

cAMP: Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cyclic Adenosine Monophosphate)

Cl⁻: ανιόν χλωρίου

CO₂: διοξείδιο του άνθρακα

EDTA: Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediaminetetraacetic acid)

Hb: αιμοσφαιρίνη (Hemoglobin)

Hct: αιματοκρίτης (Hematocrit)

HDL: υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (High Density Lipoproteins)

H₂O: μόριο νερού

H₂O₂: υπεροξείδιο του υδρογόνου

INR: Διεθνές κανονικοποιημένο πηλίκο (International Normalized Ratio)

ISCs: μη αναστρέψιμα δρεπανοκύτταρα (Irreversible Sickle Cells)

MCF: μέση ωσμωτική ευθραυστότητα κυττάρων (Mean Corpuscular Fragility)

MCH: μέση ενδοκυττάρια ποσότητα αιμοσφαιρίνης (Mean Corpuscular Hemoglobin)

MCHC: μέση ενδοκυττάρια συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)

MCV: μέσος όγκος ερυθροκυττάρου (Mean Cell Volume)

MDA: Μαλονδιαλδεΐδη (Malondialdehyde)

MFI: δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας (Mechanical Fragility Index)

MVs: Μικροκυστίδια (Microvesicles)

NAD: Δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)

NADH: Ανηγμένο δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide)

NADPH: Φωσφορικό Δινουκλεοτίδιο Νικοτιναμίδης Αδενίνης (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NO: Μονοξείδιο του αζώτου (Nitric Oxide)

O₂: μόριο οξυγόνου

PLTs: Αιμοπετάλια (Platelets)

PRP: Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (Platelet-Rich Plasma)

PS: Φωσφατιδυλοσερίνη (Phosphatidylserine)

PT: Χρόνος προθρομβίνης (Prothrombin Time)

RBCs: Ερυθρά Αιμοσφαίρια (Red Blood Cells)

RDW: Εύρος Μεγέθους Ερυθροκυττάρων (Red Blood Cell Distribution Width)

RhAG: Rh σχετιζόμενη γλυκοπρωτεΐνη (Rh Associated Glycoprotein)

ROS: Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species)

RSCs: Αναστρέψιμα Δρεπανοκύτταρα (Reversible Sickle Cells)

SIRPα: Ρυθμιστική Πρωτεΐνη α (Signal Regulatory Protein α)

SOD: Δισμουτάση Υπεροξειδίου (Superoxide dismutase)

Sp: Σπεκτρίνη

SPSS: Στατιστικό πακέτο για κοινωνικές επιστήμες (Statistical Package for Social Sciences)

TF: Ιστικός παράγοντας (Tissue Factor)

UA: Ουρικό Οξύ (Uric Acid)

vWF: Παράγοντας von Willebrand (von Willebrand Factor)

WBCs: Λευκά Αιμοσφαίρια (White Blood Cells)

ΔΕΚ: Δικτυοερυθροκύτταρα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Το Αίμα

Το αίμα είναι ένας υγρός, πολύπλοκος ιστός, απαραίτητος για τη ζωή των ανθρώπων και των ζώων. Αποτελεί ένα παχύρρευστο υγρό μεταφοράς οξυγόνου από τους πνεύμονες προς τους ιστούς, απομακρύνοντας στη συνέχεια από αυτούς διοξείδιο του άνθρακα πίσω στους πνεύμονες. Η κυκλοφορία του αίματος στο σώμα, μέσω των αιμοφόρων αγγείων, ρυθμίζεται από την καρδιά η οποία εξασφαλίζει την ισορροπία αυτής της κυκλικής διαδικασίας.

Το αίμα αντιστοιχεί στο 7% του βάρους του ανθρώπινου σώματος, δηλαδή σε περίπου 5L κατά μέσο όρο για έναν ενήλικα, από τα οποία τα 2,7-3,0L είναι το πλάσμα, το υγρό στοιχείο του αίματος (άμορφο συστατικό) και το υπόλοιπο συνιστούν τα έμμορφα συστατικά του αίματος, που αιωρούνται μέσα σε αυτό.

Η ρευστή υφή του αίματος οφείλεται στην παρουσία εξειδικευμένων κυττάρων που εξυπηρετούν συγκεκριμένες λειτουργίες. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν τα έμμορφα συστατικά του αίματος και είναι τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs), τα λευκά αιμοσφαίρια (WBCs) και τα αιμοπετάλια (PLTs).

Το αίμα είναι ο κύριος ρυθμιστής της σταθερότητας του εσωτερικού περιβάλλοντος, η οποία εξασφαλίζεται μέσω των πολλών και σημαντικών λειτουργιών του. Συγκεκριμένα:

- Η μεταφορά οξυγόνου και ουσιών και η απομάκρυνση διοξειδίου του άνθρακα και άλλων αποβλήτων.
- Η θρέψη όλων των κυττάρων του οργανισμού με άλατα, μεταλλικά στοιχεία, λίπη, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, καθώς και η διατήρηση των κατάλληλων συγκεντρώσεών τους, ώστε να συντηρείται η ομοιόσταση.
- Η έκκριση αποβλήτων προς τους νεφρούς.
- Η άμυνα μέσω της μεταφοράς κυττάρων και αντισωμάτων που λειτουργούν έναντι ξένων εισβολέων.
- Η προστασία, μέσω της πολύπλοκης λειτουργίας της αιμόστασης, ώστε να εμποδίζεται η απώλεια υγρών κατά τη διάρκεια μικροτραυματισμών.
- Η ρύθμιση της θερμοκρασίας του οργανισμού.

1.1 Το πλάσμα

Το υγρό στοιχείο του αίματος, το πλάσμα, αποτελείται κατά 90% από νερό και μέσω αυτού, εξασφαλίζεται η ενυδάτωση όλων των ιστών.

Την κύρια διαλυτή ουσία του πλάσματος συνιστά ένα ετερογενές μίγμα πρωτεϊνών, οι οποίες ασκώντας το φαινόμενο της ώσμωσης, αντλούν νερό από άλλα εξωκυττάρια υγρά προς το πλάσμα. Αυτή τη λειτουργία επιτελεί κυρίως η αλβουμίνη, η πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος. Η αλβουμίνη εξαιτίας της δομής και της λειτουργίας της, διαχωρίζεται από άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται σφαιρίνες, που είναι άλλη μια ετερογενής ομάδα πρωτεϊνών. Κυριότερες σφαιρίνες είναι οι ανοσοσφαιρίνες ή αντισώματα, οι οποίες παράγονται σε απάντηση προς μία συγκεκριμένη ξένη ουσία-αντιγόνο. Άλλες πρωτεΐνες του

πλάσματος συνιστούν εκείνες που σχετίζονται με την αιμόσταση του αίματος, όπως οι πρωτεΐνες S και C. Επιπλέον, πολλές πρωτεΐνες του πλάσματος βοηθούν στη μεταφορά ουσιών, όπως για παράδειγμα οι λιποπρωτεΐνες που μεταφέρουν λιπίδια, η τρανσφαιρίνη που μεταφέρει τον σίδηρο, η σελουροπλασμίνη τον χαλκό, η πρωτεΐνη που μεταφέρει τη βιταμίνη B12 κ.α. Η αιμοσφαιρίνη, παρόλο που φυσιολογικά δεν υπάρχει στο πλάσμα, όταν βρεθεί εξαιτίας της λύσης των ερυθροκυττάρων, δεσμεύεται με την απτοσφαιρίνη και το δημιουργούμενο σύμπλεγμα απτοσφαιρίνης-αιμοσφαιρίνης απομακρύνεται άμεσα από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα, κυρίως στο σπλήνα.

Στο πλάσμα ανευρίσκονται και διάφοροι τύποι λιπιδίων, όπως τα φωσφολιπίδια, τα τριγλυκερίδια και η χοληστερόλη, η συγκέντρωση των οποίων ποικίλει ανάλογα με τη διατροφή.

Επίσης, το πλάσμα απαρτίζουν η γλυκόζη, κύριας σημασίας συστατικό ενέργειας, τα αμινοξέα, απαραίτητα για την πρωτεϊνσύνθεση, το νάτριο που ρυθμίζει την ωσμωτική πίεση και άλλα στοιχεία όπως το ασβέστιο, το μαγνήσιο, το χλώριο και ο φώσφορος.

Τέλος, οι ορμόνες όλων των ενδοκρινών αδένων εκκρίνονται στο πλάσμα και μεταφέρονται μέσω αυτού στα κατάλληλα όργανα.

1.2 Τα κύτταρα του αίματος

1.2.1 Λευκά Αιμοσφαίρια

Τα λευκά αιμοσφαίρια ή λευκοκύτταρα είναι μια πολυλειτουργική ομάδα κυττάρων του αίματος, της οποίας κύριος σκοπός είναι η άμυνα εναντίον ιών, βακτηρίων και άλλων ξένων ουσιών. Είναι εμπύρνα κύτταρα, σε αντίθεση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια, ενώ παράγονται και διαχωρίζονται στο μυελό των οστών από κοινό αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο. Από αυτό προκύπτουν η μυελοειδής σειρά (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα και μονοκύτταρα) και η λεμφοειδής σειρά (T-, B-λεμφοκύτταρα και κύτταρα φυσικοί φονείς). Τα ουδετερόφιλα και τα λεμφοκύτταρα αποτελούν τα πολυπληθέστερα είδη λευκοκυττάρων. Κυκλοφορούν στο αίμα και τον λεμφικό ιστό και καταλήγουν στους ιστούς, από όπου πολεμούν τις λοιμώξεις. [1]

Τα λευκά αιμοσφαίρια αντιστοιχούν στο 1% του συνολικού όγκου του αίματος. Ο φυσιολογικός αριθμός τους για τους ενήλικες είναι 4.000-11.000 ανά μl αίματος [2], αριθμός που μπορεί να αλλάξει ανάλογα με την κατάσταση του οργανισμού τη δεδομένη στιγμή. Η αύξηση του αριθμού τους άνω του φυσιολογικού καλείται λευκοκυττάρωση και μπορεί να είναι μια φυσιολογική κατάσταση εάν συμβαίνει μία ανοσολογική απάντηση, αλλά ενέχει σοβαρούς κινδύνους για την υγεία του ατόμου, εάν είναι νεοπλασματικής ή αυτοάνοσης προέλευσης. Η μείωση του αριθμού τους κάτω του φυσιολογικού καλείται λευκοπενία και είναι ένδειξη αδύναμου ανοσολογικού συστήματος. [3]

1.2.2 Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια ή θρομβοκύτταρα είναι μικρά απύρρηνα κύτταρα του αίματος και αποτελούν κυτταρικά θραύσματα των μεγακαρυοκυττάρων, που σχηματίζονται στον μυελό των οστών. Η απόσπαση των αιμοπεταλίων από τα μεγακαρυοκύτταρα γίνεται όταν αυτό φτάσει ένα σημείο ωριμότητας. Υπολογίζεται ότι από ένα μεγακαρυοκύτταρο δημιουργούνται περίπου 1.000 αιμοπετάλια.

Τα αιμοπετάλια έχουν την τάση να κολλούν το ένα με το άλλο, όχι όμως μαζί με τα ερυθρά ή τα λευκά αιμοσφαίρια. Τα κοκκία τους περιέχουν ουσίες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην κύρια λειτουργία τους, τη δημιουργία θρόμβου ινικής, εμποδίζοντας έτσι την αιμορραγία και την είσοδο μικροοργανισμών. Παίζουν καθοριστικό ρόλο στην πρωτογενή αιμόσταση, ανταποκρινόμενα άμεσα στο σημείο τραυματισμού του αγγείου, όπου αθροίζονται, συσσωρεύονται και κολλούν μεταξύ τους σχηματίζοντας μια μαλακή μάζα, τον αιμοπεταλιακό θρόμβο. [4]

Η φυσιολογική τιμή τους είναι 150.000-400.000 ανά μl αίματος και ζουν 8-12 ημέρες στην κυκλοφορία. Ο χαμηλός αριθμός σε αιμοπετάλια (θρομβοπενία) μπορεί να προκαλέσει σοβαρές αιμορραγίες, ενώ ο αυξημένος αριθμός τους (θρομβοκυττάρωση) προκαλεί θρόμβους στα αγγεία, με αποτέλεσμα την απόφραξή τους σε διάφορα μέρη του σώματος, εγκεφαλικό, έμφραγμα, πνευμονική εμβολή κ.α. [5]

1.2.3 Ερυθρά Αιμοσφαίρια

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια ή ερυθροκύτταρα είναι κυτταρικά συστατικά του αίματος, τα οποία κυκλοφορούν κατά εκατομμύρια στην κυκλοφορία, προσδίδοντας αυτό το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα στο αίμα. Τα ώριμα ερυθροκύτταρα είναι μικρά, στρογγυλά κύτταρα σε σχήμα αμφίκυκλου δίσκου, ιδιαίτερα εύκαμπτα, ώστε να διαπερνούν ακόμα και τα λεπτά τριχοειδή αγγεία. Η εξωτερική τους μεμβράνη αποτελείται από πρωτεΐνες και λιπίδια, η δομή της οποίας προσδίδει στο κύτταρο την απαραίτητη σταθερότητα, ευκαμψία και παραμορφωσιμότητα. Τα ερυθροκύτταρα στερούνται πυρήνα, ενώ περιέχουν αιμοσφαιρίνη, ένα βιομόριο πλούσιο σε σίδηρο, στην οποία προσδέεται το οξυγόνο. Εξαιτίας της έλλειψης του πυρήνα, η ανάγκη του κυττάρου για τον μεταβολισμό του είναι ελάχιστη, έτσι λειτουργεί ως κύριος μεταφορέας οξυγόνου προς όλους τους ιστούς από τους πνεύμονες, ενώ επιστρέφει από αυτούς μεταφέροντας το προϊόν μεταβολισμού, το διοξείδιο του άνθρακα προς τους πνεύμονες για αποβολή.

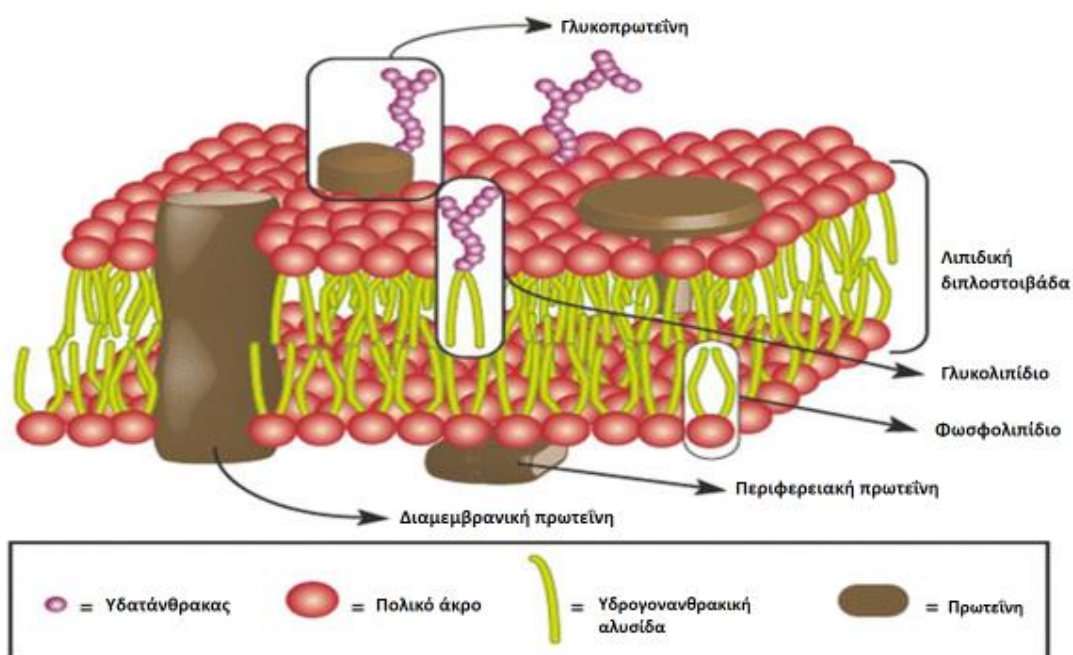
Τα ερυθροκύτταρα γεννιούνται στο μυελό των οστών σε διάφορα στάδια (ερυθροποίηση), μέχρι να εισέλθουν στην κυκλοφορία ως ώριμα ερυθροκύτταρα. Η διάρκεια ζωής τους είναι 100-120 ημέρες, για να φαγοκυτταρωθούν στο τέλος από τα μακροφάγα και να ανακυκλωθούν στο σπλήνα. Ο ρυθμός του κυτταρικού θανάτου (ερυθρόπτωση) είναι ίσος με εκείνον της ερυθροποίησης, ώστε να μη μειώνεται ο αριθμός τους. Φυσιολογικά κάθε mm³ αίματος περιέχει $5,2 \times 10^6$ ερυθροκύτταρα. [6]

Το σχήμα τους, ο αριθμός τους και η ποσότητα της αιμοσφαιρίνης που περιέχουν, δύναται να αλλάξει σε παθολογικές καταστάσεις.

2. Ερυθροκυτταρική μεμβράνη

Ο μοναδικός σχηματισμός του ερυθροκυττάρου, όπως και της μεμβράνης του, η οποία εμπεριέχει την αιμοσφαιρίνη, εξασφαλίζει την ικανότητά του να επιτελεί την κύρια λειτουργία της μεταφοράς των αναπνευστικών αερίων σε όλη την έκταση του σώματος. Για τον λόγο αυτό, η ερυθροκυτταρική μεμβράνη αποτελεί μία εύκαμπτη, παραμορφώσιμη, ημίρρευστη δομή, η οποία επιτρέπει στο κύτταρο τη διέλευση διαμέσου πολύ λεπτών αγγείων της μικροκυκλοφορίας και την αλληλεπίδραση με το περιβάλλον του. Καθώς δεν υπάρχουν κυτταρικά οργανίδια, ώστε να διορθώνουν τις βλάβες στο ώριμο ερυθροκύτταρο, η μεμβράνη επιβάλλεται να είναι ανθεκτική. Αυτές οι μοναδικές μηχανικές ιδιότητες αποδίδονται σε ένα δισδιάστατο δίκτυο υπομεμβρανικών σκελετικών πρωτεϊνών, οι οποίες αλληλοεπιδρούν με μία διπλοστοιβάδα λιπιδίων, διαμέσου των ενσωματωμένων σε αυτή διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. [7] Το 52% της μεμβρανικής μάζας αποτελείται από πρωτεΐνες, το 40% από λιπίδια και το 8% από υδατάνθρακες (πολυσακχαρίτες), οι οποίοι συνδέονται είτε στα λιπίδια (γλυκολιπίδια) είτε στις πρωτεΐνες (γλυκοπρωτεΐνες). [8] Το μοντέλο που απεικονίζει τη δομή και τη λειτουργικότητα της πλασματικής μεμβράνης είναι αποδεκτό διεθνώς ως μοντέλο ρευστού μωσαϊκού (εικ.1). [9]

Επιπρόσθετα, βλάβες των πρωτεϊνών της μεμβράνης συσχετίζονται αιτιολογικά ή όχι με διάφορες αιμολυτικές αναιμίες στον άνθρωπο [10] αλλά και με την αποτελεσματικότητα των μεταγγίσεων [11], [12] κι έτσι η ερυθροκυτταρική μεμβράνη μελετάται εκτεταμένα στα πλαίσια της ευρύτερης βιοϊατρικής έρευνας.



Εικόνα 1: Μοντέλο ρευστού μωσαϊκού πλασματικής μεμβράνης. Η υπόθεση απεικόνισης της πλασματικής μεμβράνης ως ρευστό μωσαϊκό, υιοθετήθηκε από τους Singer και Nicolson στις αρχές του 1970. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, οι μεμβράνες αποτελούνται από λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Τα κύρια λιπιδικά τμήματα της μεμβράνης είναι φωσφολιπίδια. Αυτά τα μόρια είναι αμφίφιλα, δηλαδή έχουν ένα πολικό άκρο, το οποίο δεσμεύει το νερό (υδρόφιλο) και ένα μη πολικό τμήμα που απωθεί το νερό (υδρόφοβο). Ανατύπωση από: Lombard Jonathan. *Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research.* *Biology Direct* (2014) 9:32 DOI 10.1186/s13062-014-0032-7.[9]

2.1 Μεμβρανικά λιπίδια

Η διπλοστοιβάδα των λιπιδίων απαρτίζεται από ίσες αναλογίες βάρους χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων (Πίνακας 1). [13] Ενώ η χοληστερόλη κατανέμεται ισομερώς μεταξύ των δύο στρωμάτων, τα τέσσερα είδη φωσφολιπιδίων παρατάσσονται ασυμμετρικά. Η φωσφατιδυλοχολίνη και η σφιγγομυελίνη είναι τοποθετημένες στην εξωτερική μονοστοιβάδα, ενώ η μεγαλύτερη ποσότητα φωσφατιδυλαιθανολαμίνης και όλη η φωσφατιδυλοσερίνη (PS), μαζί με μικρές ποσότητες φωσφοϊνοσιτιδίων, εγκλείονται στην εσωτερική μονοστοιβάδα. Για αυτή τη φωσφολιπιδική ασυμμετρία ευθύνονται διαφορετικού τύπου, τόσο ενεργο-εξαρτημένων όσο και ενεργο-ανεξάρτητων πρωτεϊνών μεταφοράς. Συγκεκριμένα, οι «φλιππάσες» μεταφέρουν τα φωσφολιπίδια από την εξωτερική προς την εσωτερική μονοστοιβάδα, ενώ οι «φλοππάσες» κάνουν το αντίθετο με επιπλέον κατανάλωση ενέργειας. Σε αντίθεση, οι «σκραμπλάσες» τα μεταφέρουν προς τις δύο κατευθύνσεις, δίχως να καταναλώνουν ενέργεια. [14]

Η αποδιοργάνωση της συγκεκριμένης αναδιάταξης των φωσφολιπιδίων έχει αποτέλεσμα στην ανοσογονικότητα των ερυθροκυττάρων, όπως για παράδειγμα την αναγνώρισή τους από τα μακροφάγα για την απομάκρυνση και την καταστροφή τους. [8]

Ιδιαίτερα η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης προς την εξωτερική μονοστοιβάδα, λειτουργεί ως σήμα για την ερυθρόπτωση, τον μηχανισμό δηλαδή που οδηγεί στον ερυθροκυτταρικό θάνατο και είναι σημαντικός για την κυτταρική εκκαθάριση από την κυκλοφορία. Εκτός αυτού, αποτελεί σήμα για την προσκόλληση των ερυθροκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και για την πιο ενεργή, όπως φαίνεται, συμμετοχή των RBCs στη δημιουργία θρόμβου. [15]

Έχει περιγραφεί ότι τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα περιέχουν μεγάλες ποσότητες κατιόντων ασβεστίου (Ca^{++}) [16], το οποίο ενεργοποιεί την σκραμπλάση, που με τη σειρά της, προκαλεί την έκθεση της PS στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης. [15] Η αύξηση του κυτοσολικού ασβεστίου επηρεάζει τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την οργάνωση της ασυμμετρίας των λιπιδίων της μεμβράνης, ενώ υπάρχουν και αναφορές για τη συμβολή σε αυτό και του οξειδωτικού στρες που υπόκεινται τα ερυθροκύτταρα στις αιμοσφαιρινοπάθειες. Η μετάλλαξη της διπλοστοιβάδας των λιπιδίων της μεμβράνης στα παθολογικά αυτά ερυθροκύτταρα, οδηγεί στη γρήγορη αποβολή τους (αναιμία) και στη διατάραξη της ισορροπίας της ομοιόστασης, παίζοντας για παράδειγμα, ρόλο στην απόφραξη των αγγείων στη δρεπανοκυτταρική αναιμία. [17]

Πίνακας 1: Ποσοστό λιπιδίων στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Ανατύπωση από Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science [13]

Χοληστερόλη	23%
Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη	18%
Σφιγγομυελίνη	18%
Φωσφατιδυλοχολίνη	17%
Φωσφατιδυλοσερίνη	7%
Γλυκολιπίδια	3%
Άλλα	13%

2.2 Μεμβρανικές πρωτεΐνες

Το ερυθροκύτταρο έχει μια απλή κυτταρική δομή, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο κατανόησης των κυττάρων γενικότερα, γι' αυτό και οι πρωτεΐνες της μεμβράνης του είναι ένα αρκετά καλά μελετημένες. Έχει ταυτοποιηθεί η λειτουργία άνω των 300 πρωτεϊνών, ενώ χαρακτηριστική είναι η μεγάλη ετερογένειά τους. Διακρίνονται σε διαμεμβρανικές, που διαπερνούν τη λιπιδική διπλοστοιβάδα διεισδύοντας στον υδρόφοβο πυρήνα της και σε σκελετικές, δομικές δηλαδή πρωτεΐνες του σκελετού της μεμβράνης. [18]

2.2.1 Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες

Περισσότερες από 50 διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μαζί με τα αντίγραφα τους έχουν χαρακτηριστεί έως σήμερα, ένα μεγάλο μέρος των οποίων αποτελούν τα αντιγόνα των ομάδων αίματος. Γενικά, παρουσιάζουν μεγάλη λειτουργική ετερογένεια, είτε ως πρωτεΐνες μεταφοράς, είτε ως πρωτεΐνες προσκόλλησης που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ερυθροκυττάρων ή με επιθηλιακά κύτταρα, είτε ως υποδοχείς σημάτων, είτε με αταυτοποίηση έως τώρα λειτουργία.

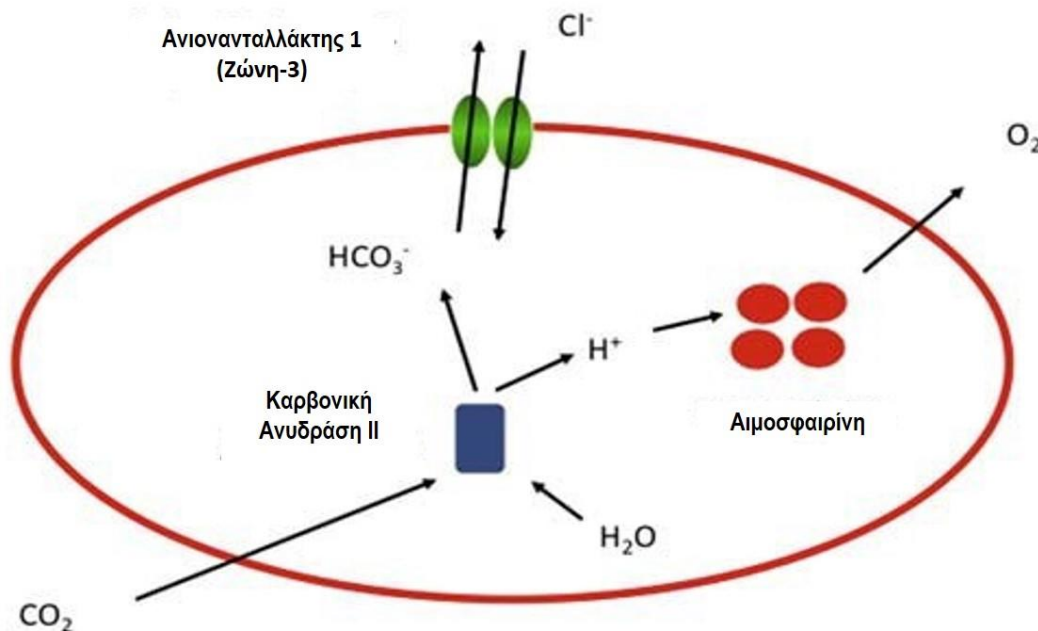
Οι πρωτεΐνες μεταφοράς περιλαμβάνουν τη ζώνη-3 (ανιονανταλλάκτης), την υδατοπορίνη-1 (μεταφορέας νερού), τον μεταφορέα γλυκόζης-1 (Glut-1), τον μεταφορέα ουρίας (αντιγόνο Kidd), τον μεταφορέα αερίων, πιθανών και διοξειδίου του άνθρακα (RhAG), το σύμπλοκο Rh, πολυάριθμους υποδοχείς και αντιγόνα, την αντλία ιόντων Ca^{+2} -ATPάση, την αντλία ιόντων K^+-Na^+ -ATPάση, τον συμμεταφορέα ιόντων $K^+-Na^+-2Cl^-$, τον συμμεταφορέα Na^+-Cl^- , τον συμμεταφορέα Na^+-K^+ , τον συμμεταφορέα K^+-Cl^- και τα κανάλια Gardos.

Στις πρωτεΐνες προσκόλλησης ανήκουν τα αντιγόνα της ομάδας αίματος Landsteiner-Wiener (ICAM-4 - Intercellular Adhesion Molecule 4) και της ομάδας Lu (Lutheran), που αλληλοεπιδρούν με τις ιντεγκρίνες και τη λαμινίνη αντίστοιχα. [14]

2.2.1.1 Ζώνη-3 ή ανιονανταλλάκτης

Η πιο άφθονη πρωτεΐνη της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης είναι γνωστή ως ζώνη-3 ή AE1 (Anion Exchanger 1, ανιονανταλλάκτης 1) ή καρνοφορίνη ή SLC4A1. [19] Συνιστά το 25-30% των πρωτεϊνών της μεμβράνης, ενώ ανευρίσκονται περίπου $1,2 \times 10^6$ αντίγραφα ανά ερυθροκύτταρο. Κωδικοποιείται από το γονίδιο SLC4A1, αποτελείται από 911 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 95 kDa, ενώ σχηματίζει κρυσταλλικής δομής διμερή και τετραμερή, τα οποία εκτείνονται σε δύο περιοχές με διαφορετικές λειτουργίες: μία αμινοτελική κυτταροπλασματική περιοχή (cdAE1, αμινοξέα 1-360), στην οποία προσδένονται κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες μέσω της αγκυρίνης, η αιμοσφαιρίνη, γλυκολυτικά ένζυμα κ.α. και μία καρβοξυτελική μεμβρανική περιοχή (mdAE1, αμινοξέα 361-911), υπεύθυνη για τη μεταφορική της λειτουργία, η οποία διαπερνά τη μεμβράνη πολλές φορές. [20] Οι κύριες περιοχές που εκφράζεται το γονίδιο SLC4A1 είναι το ερυθροκύτταρο και οι νεφροί, αλλά εκφράζεται επίσης στην καρδιά και πρόσφατες ενδείξεις την ανιχνεύουν και στο σπέρμα. [19]

Η πολυλειτουργική αυτή πρωτεΐνη καταλύει τη διαμεμβρανική ανταλλαγή $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, που αποτελεί μία φάση της έκκρισης CO_2 , κατέχει δομικό ρόλο για τη σταθεροποίηση του σκελετού της μεμβράνης, ρυθμίζει το μεταβολισμό, συμμετέχει στη διαδικασία της γήρανσης του ερυθροκυττάρου, ενώ αποτελεί τον υποδοχέα για τη σύνδεση του πλασμοδίου της ελονοσίας. [19] Η ζώνη-3 παίζει πρωταρχικό ρόλο στο σύστημα διακίνησης του CO_2 (Εικόνα 2) [20], το οποίο εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητάς του στο αίμα, μετατρέπεται στο πλάσμα σε διττανθρακικό ανιόν (HCO_3^-) από την καρβονική ανυδράση. Το HCO_3^- στη συνέχεια μεταφέρεται εκτός του κυττάρου από τη ζώνη-3 σε ανταλλαγή με Cl^- . Όταν το αίμα φτάσει στους πνεύμονες, η παραπάνω ανταλλακτική διαδικασία αντιστρέφεται, ως αποτέλεσμα της βαθμίδας πίεσης του CO_2 μεταξύ του αίματος και των κυψελίδων του πνεύμονα. Κάθε μόριο πρωτεΐνης ζώνης-3 μεταφέρει περί τα 10^5 ζεύγη μονοσθενών ανιόντων το δευτερόλεπτο, γεγονός που συνιστά την ανταλλαγή $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ τη μεγαλύτερη εξειδικευμένη, γνωστή έως τώρα, ιοντική ροή σε όλα τα κύτταρα. [21]



Εικόνα 2: Ο ρόλος του ανιονανταλλάκτη $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ /ζώνη-3 στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Στους ιστούς, το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) διαχέεται στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων (κόκκινο οβάλ σχήμα) ή εισέρχεται μέσω των καναλιών υδατοπορίνης, μετατρέπεται αμέσως με H_2O σε δικαρβονικό ανιόν και ένα πρωτόνιο, με τη δράση της καρβονικής ανυδράσης II. Το HCO_3^- μεταφέρεται έξω από το κύτταρο σε ανταλλαγή με Cl^- , ενώ το πρωτόνιο λαμβάνει η αιμοσφαιρίνη, η οποία ελευθερώνει το οξυγόνο προς τους ιστούς. Στους πνεύμονες η λειτουργία αντιστρέφεται (δεν απεικονίζεται). Το HCO_3^- εισέρχεται εντός του κυττάρου σε ανταλλαγή με Cl^- , μέσω της ζώνης-3, μετατρέπεται με ένα πρωτόνιο σε CO_2 και H_2O μέσω της καρβονικής ανυδράσης II, απελευθερώνοντας έτσι το CO_2 από το ερυθροκύτταρο στους πνεύμονες. Ανατύπωση από R.A.F. Reith Meier et al. / *Biochimica et Biophysica Acta* 1858 (2016) 1507–1532. [20]

Εκτός από τη μεταφορική της λειτουργία, η ζώνη-3 κατέχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της συνοχής και της ακεραιότητας της μεμβράνης. Αποτελεί σημαντικό συστατικό για τουλάχιστον δύο πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα, όπως της αγκυρίνης και του συμπλόκου

ζεύξης, τα οποία εξυπηρετούν θέσεις των κάθετων συνδέσμων μεταξύ της μεμβράνης του πλάσματος και του υποκείμενου κυτταροσκελετού της σπεκτρίνης. Στην κυτταροπλασματική αμινοτελική περιοχή της υπάρχουν σημεία πρόσδεσης διάφορων δομικών πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, όπως της ακκυρίνης, της πρωτεΐνης 4.2, της 4.1, της αιμοσφαιρίνης και διάφορων γλυκολυτικών ενζύμων. [22]

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της ζώνης-3 συνδέονται με διάφορες ασθένειες, όπως κληρονομική σφαιροκυττάρωση, νοτιοανατολική ασιατική οβαλοκυττάρωση, κληρονομική στοματοκυττάρωση κ.α. Άλλες μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί ως υπεύθυνες για τα αντιγόνα ελάσσονων συστημάτων ομάδων αίματος Diego, Warrior κ.α. [20]

Μία επιπλέον λειτουργία της ζώνης-3 είναι η ρύθμιση του μεταβολισμού του ερυθροκυττάρου, μέσω της φωσφορυλίωσης τυροσινών του αμινοτελικού άκρου της κυτταροπλασματικής ουράς της πρωτεΐνης (Tyr8 και Tyr21) από την τυροσίνη κινάση, γεγονός που αποσυνδέει την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (G3PD) προκαλώντας έτσι την ενεργοποίησή του ενζύμου και την ενίσχυση της γλυκόλυσης. [23]

Επιπρόσθετα, η ζώνη-3 έχει ρόλο και στην εκκαθάριση των ερυθροκυττάρων, μέσω της φαγοκυττάρωσης από τα μακροφάγα. Καθώς τα πολύ ώριμα ερυθροκύτταρα χάνουν την ικανότητα για σύνθεση νέων πρωτεϊνών, η σηματοδότηση για την ενεργοποίηση της κυτταρικής γήρανσης ενεργοποιείται από τις ήδη υπάρχουσες πρωτεΐνες της μεμβράνης. Τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα αλλάζουν, ώστε να διακρίνονται από τα νεαρά ερυθροκύτταρα. Ο οψωνισμός τους από την ανοσοσφαιρίνη G, είναι απαραίτητος για την αναγνώριση από τα μακροφάγα, τα οποία παράγουν φυσιολογικά αυτόαντισώματα IgG, που προσδέονται στα ερυθροκύτταρα πάνω σε μεμβρανικά αθροίσματα που σχηματίζουν η ζώνη-3, συστατικά του συμπληρώματος και τα αιμοχρώματα (δομές που αποτελούνται από όλα τα ενδιάμεσα προϊόντα της οξειδωτικής μετουσίωσης της αιμοσφαιρίνης), με αποτέλεσμα την αναγνώριση και την απομάκρυνσή τους από την κυκλοφορία. Σε συνθήκες οξειδωτικής πίεσης, όπως συμβαίνει σε διάφορες αιμοσφαιρινοπάθειες, η παραπάνω διαδικασία επιταχύνεται ραγδαία, με αποτέλεσμα τη γρήγορη απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία και την αναιμία. [24]

2.2.1.2 Γλυκοφορίνες

Οι γλυκοφορίνες των ερυθροκυττάρων είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, πλούσιες σε σιαλικό οξύ, οι οποίες εκτός του ότι φέρουν αντιγόνα ομάδων αίματος, αποτελούν και προσδέτες ιών, βακτηρίων και παρασίτων. Χωρίζονται στις κύριες γλυκοφορίνες A (GPA) και B (GPB), οι οποίες φέρουν τα αντιγόνα των ομάδων αίματος MN και Ss αντίστοιχα και τη γλυκοφορίνη E (GPE), η οποία εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα. Οι κύριες γλυκοφορίνες είναι ερυθροειδικές και μεταξύ τους δομικά ομόλογες. Οι δευτερεύουσες γλυκοφορίνες της μεμβράνης περιλαμβάνουν τις μικρότερες μη-ερυθροειδικές πρωτεΐνες C (GPC) και D (GPD), οι οποίες φέρουν τα αντιγόνα της ομάδας αίματος Gierbich. [25]

Η κύρια γλυκοφορίνη A, μοριακού βάρους 31 kDa, αποτελείται από 131 αμινοξέα, ως μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα, η οποία ομοδιμερίζεται. Περιέχει 5×10^5 - 10×10^5 αντίγραφα ανά ερυθροκύτταρο που αντιστοιχεί στο 1,6% των ολικών πρωτεϊνών του και το μεγαλύτερο

ποσοστό σιαλικού οξέος, περίπου 75% του συνολικού σιαλικού οξέος της μεμβράνης. Αποτελείται από ένα αμινοτελικό τμήμα και ένα καρβοξυτελικό, το οποίο χωρίζεται σε μία διαμεμβρανική υδροφοβική περιοχή και μία κυτταροπλασματική υδροφιλική περιοχή.

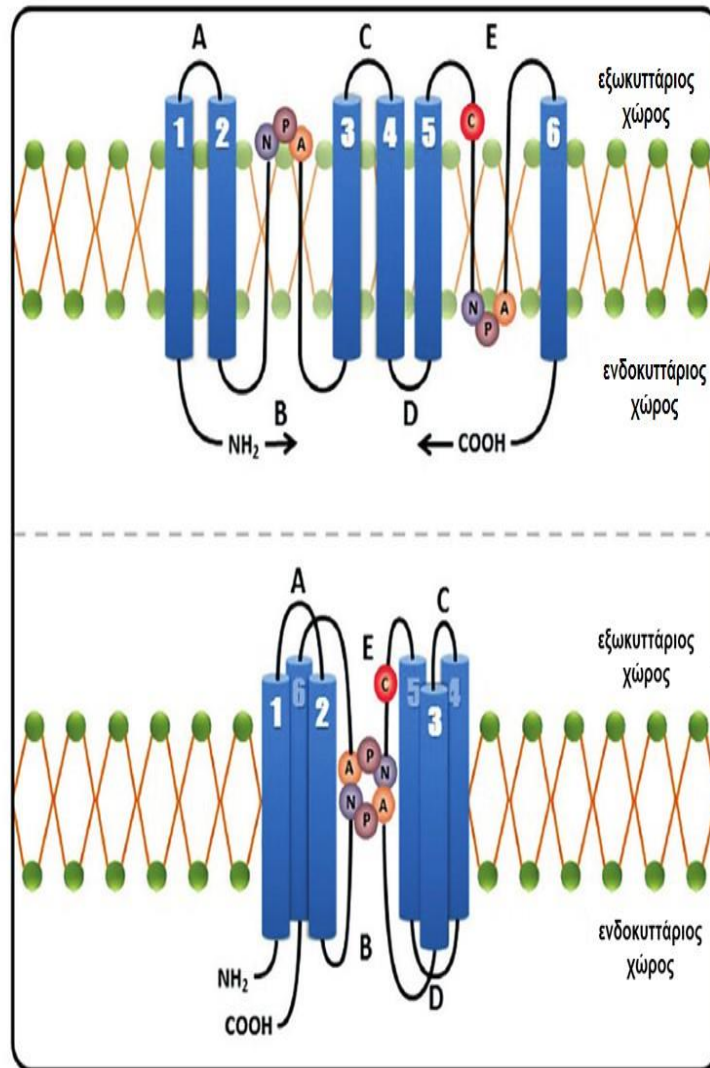
Η γλυκοφορίνη Β περιέχει $0,2 \times 10^5$ - $1,0 \times 10^5$ αντίγραφα ανά ερυθροκύτταρο, έχει μοριακό βάρος 23 kDa, με το αμινοτελικό τμήμα της να είναι πανομοιότυπο με αυτό της γλυκοφορίνης Α, καθώς και οι δύο γλυκοφορίνες εκφράζονται από παρόμοια γονίδια. Σχηματίζει παρόμοια διμερή με τη γλυκοφορίνη Α. Το 1990 ανακαλύφθηκε και η γλυκοφορίνη Ε, η οποία γενετικά προσομοιάζει αρκετά με τη Β. Η λειτουργία της παραμένει προς το παρόν ασαφής. [26]

Οι γλυκοφορίνες C και D, εκφράζονται λιγότερο στη μεμβράνη του ερυθροκυττάρου, έχουν μοριακό βάρος 29 και 23 kDa αντίστοιχα, έχουν παρόμοια δομή και λειτουργία, αφού προέρχονται από την ίδια συστάδα γονιδίων. Λειτουργικά, συνδέονται με τον σκελετό της μεμβράνης, συμβάλλοντας στη διατήρηση του σχήματος του ερυθροκυττάρου, σε αντίθεση με τις κύριες γλυκοφορίνες, που δεν αποτελούν μέρος του μεμβρανικού σκελετού και έτσι μπορούν εύκολα να απελευθερώνονται από το ερυθροκύτταρο. Η σύνδεση των δευτερευόντων γλυκοφορινών με τον υπομεμβρανικό σκελετό, συμβάλλει στην απόδοση αρνητικού φορτίου στην επιφάνεια του ερυθροκυττάρου, το οποίο αυξάνει την κινητικότητα του. [26]

2.2.1.3 Υδατοπορίνη-1

Η υδατοπορίνη-1 (Aqr-1) (Εικόνα. 3) είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου, μοριακού βάρους 28 kDa και αποτελεί τον κύριο πρωτεϊνικό δίαυλο νερού. Η Aqr-1 είναι διαπερατή στα μόρια του νερού, όχι όμως σε άλλους διαλύτες ή άλλα μόρια/στοιχεία, συμπεριλαμβανομένων των πρωτονίων [27], ώστε να διατηρείται το ηλεκτροχημικό δυναμικό στα δύο άκρα της μεμβράνης. Φέρει τα αντιγόνα της ομάδας αίματος Colton. [28]

Στη μεμβράνη παρουσιάζει ομοτετραμερή δομή, με κάθε υπομονάδα να συνδέει ένα μόριο νερού. Κάθε ερυθροκύτταρο περιέχει 40.000-50.000 τετραμερή. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από 6 α -έλικες, οι οποίες περιβάλλουν μία κεντρική δομή (πόρος) που καλείται «κλεψύδρα», η οποία σχηματίζεται μέσα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, από την αντιπαράθεση της θηλιάς β (κυτταροπλασματικό φύλλο) και της θηλιάς ϵ (εξωπλασματικό φύλλο) [27], [29] Το μικρό μέγεθος του πόρου (20 \AA όταν είναι ανοικτός, που μετατρέπεται σε $2,8 \text{ \AA}$ στο στενότερο σημείο του όταν είναι κλειστός) και ο ηλεκτροστατικός φραγμός στην περιοχή της τριπλέτας των αμινοξέων NPA (ασπαραγίνη-προλίνη-αλανίνη) συμβάλλουν στο γεγονός ότι αποτρέπεται η διόδος άλλων μορίων εκτός του νερού. [30] Το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό τμήμα της Aqr-1 εκτείνονται στο κυτταρόπλασμα. [27]



Εικόνα 3: Αναπαράσταση της δομής της υδατοπορίνης. (α) Ένα μονομερές υδατοπορίνης αποτελείται από 6 διαμεμβρανικές α-έλικες (1-6), οι οποίες συνδέονται με 5 θηλιές (A-E). Οι θηλιές B και E, που περιέχουν τις περιοχές των τριπλετών των αμινοξέων ασπαραγίνη-προλίνη-αλανίνη (NPA), λυγίζουν μέσα το μόριο και αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους στην κεντρική περιοχή του καναλιού, σχηματίζοντας έναν πολύ μικρό πόρο, σαν κλεψύδρα, ο οποίος αποτρέπει τη διέοδο άλλων μορίων, εκτός του νερού. **(β)** Στην περιοχή της στένωσης του καναλιού, οι τριπλέτες των αμινοξέων N-P-A των δύο θηλιών συνδέονται. Η κόκκινη περιοχή C, εκπροσωπεί την περιοχή της κυστεΐνης, όπου δεσμεύεται ο υδράργυρος, προσδίδοντας ευαισθησία, στις περισσότερες υδατοπορίνες. Ανατύπωση από Geadkaew, Amornrat. (2016). *Human Parasitic Aquaporins: New Anti-Parasitic Drug Targets*. 10.13140/RG.2.1.2123.6085. [29]

Χαρακτηριστικά, η μεταφορά των μορίων νερού μέσω της υδατοπορίνης-1 επιτελείται, είτε μέσω της ωσμωτικής διαπερατότητας, είτε μέσω διάχυσης. Η μεταφορά των μορίων νερού μέσω της ωσμωτικής πίεσης δεν απαιτεί ATP ή άλλη μορφή ενέργειας. [31] Τέλος, υπάρχει μεγάλη διαφορά ανάμεσα στη διαπερατότητα του νερού μέσω της διάχυσης από τη διπλοστοιβάδα των λιπιδίων της μεμβράνης (χαμηλή χωρητικότητα και αργή διαδικασία) με τη διαπερατότητα μέσω των υδατοπορινών (μεγαλύτερη χωρητικότητα, γρήγορη διαδικασία που επιτελείται με δύο ρυθμιστικούς μηχανισμούς, όπως αναφέρθηκε). [32]

2.2.1.4 Μεταφορέας γλυκόζης-1

Η μεταφορά της γλυκόζης (Glut-1) συνδέεται άμεσα με τη φυσιολογία του ερυθροκυττάρου. Η γλυκόζη αποτελεί τη μοναδική πηγή ενέργειας, γι' αυτό και η ανεπάρκεια στο μεταβολισμό ή τη μεταφορά της, συνδέεται άμεσα με την ανώμαλη μορφολογία και παραμόρφωση του κυττάρου, που οδηγεί σε μειωμένη διάρκεια της ζωής του. Στα ώριμα ερυθροκύτταρα, ο μεταφορέας γλυκόζης ρυθμίζεται από τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη μεταφορέας γλυκόζης-1 (Glut-1), η οποία εκτός της γλυκόζης, είναι υπεύθυνη και για τη μεταφορά του αφυδροασκορβικού οξέος (DHA), του οξειδωμένου ενδιάμεσου του ασκορβικού οξέος. [33] Είναι μια μη ερυθροειδική πρωτεΐνη, εκφράζεται μεταξύ άλλων, στα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, στα αστροκύτταρα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος και στον καρδιακό μυ. [34]

Η glut-1 έχει μοριακό βάρος 54,1 kDa και αποτελείται από 492 αμινοξέα, που σχηματίζουν 12 υδρόφοβες α-έλικες, οι οποίες διαπερνούν τη μεμβράνη, με το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο της να εκτείνονται στο κυτταρόπλασμα. Παρόλο που αποτελεί ένα υδρόφοβο μόριο, η glut-1 είναι δεκτική στο νερό [τα 8 από τα 12 διαμεμβρανικά της τμήματα (TMs) είναι αμφιπαθητικά, παρουσιάζουν δηλαδή τόσο υδρόφοβες όσο και υδρόφιλες ιδιότητες], αποτελώντας έτσι ένα υδατικό κανάλι για την κυκλοφορία των μορίων της γλυκόζης. Στη μεμβράνη, *in vivo*, σχηματίζει διμερή και τετραμερή. [34] Η μεταφορά της γλυκόζης μέσω της glut-1, τέλος, γίνεται μέσω της παθητικής διάχυσης. [35]

2.2.1.5 Αντλία ιόντων Ca^{++} - ATPάση

Η αντλία ιόντων Ca^{++} -ATPάση (PMCA – Plasma Membrane Calcium Atpase) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου, της οποίας ο κύριος ρόλος είναι η απομάκρυνση ιόντων ασβεστίου (Ca^{++}) από το κύτταρο. [36] Είναι εξαιρετικής σημασίας η διατήρηση χαμηλών συγκεντρώσεων ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο, τόσες όσες είναι απαραίτητες για την κυτταρική σηματοδότηση. Η αύξηση των συγκεντρώσεων ιόντων Ca^{++} μπορούν να επιφέρουν αλλαγές στις λειτουργικές ικανότητες των Ca^{++} -εξαρτώμενων πρωτεϊνών, που εμπλέκονται σε δομικές, μεταφορικές, μεταβολικές και σηματοδοτικές λειτουργίες του ερυθροκυττάρου, με αποτέλεσμα τη σοβαρή απορρύθμιση πολλαπλών κυτταρικών λειτουργιών.

Για τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα έχει βρεθεί η isoμορφή PMCA1, η οποία αποτελείται από 1220 αμινοξέα, που δημιουργούν 10 διαμεμβρανικές περιοχές και δύο ενδοκυττάριας θηλιές, που αποτελούν σημεία πρόσδεσης των μορίων ATP και των περιοχών φωσφορυλίωσης, με το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο να «κοιτούν» την εσωτερική πλευρά. [37]

Η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{++} γίνεται αντιληπτή από την αντλία PMCA, μέσω του συμπλέγματος Ca^{++} /καλμοντουλίνης, το οποίο προσδέεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Σε φορτωμένα με ιόντα Ca^{++} ερυθροκύτταρα, ο περιοριστικός παράγοντας της χωρητικότητας της PMCA είναι η διαθεσιμότητα ATP, καθώς για τη μεταφορά κάθε ιόντος Ca^{++} απαιτείται η υδρόλυση ενός μορίου ATP και η ανταλλαγή

ενός πρωτονίου. Σε καταστάσεις μόνιμης διαρροής ιόντων Ca^{++} , η ενεργοποίηση της PMCA μπορεί να προκαλέσει πολύ γρήγορη εξάντληση των αποθεμάτων ATP. [37]

Η εισροή Ca^{++} στα υγιή ερυθροκύτταρα είναι μία αργή διαδικασία, αλλά η ταχύτητα μπορεί να πενταπλασιαστεί στα κύτταρα ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία και σε άλλα είδη κληρονομικών αιμολυτικών αναιμιών. [38]

2.2.1.6 Πρωτεΐνη CD47

Η πρωτεΐνη CD47 (Integrin-Associated Protein/IAP, πρωτεΐνη που σχετίζεται με την ιντεγκρίνη) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 50 kDa, με μία υδροφοβική διαμεμβρανική περιοχή που διαπερνά τη μεμβράνη 5 φορές και μία μικρότερη κυτταροπλασματική ουρά. Αρχικά είχε ταυτοποιηθεί ως ρυθμιστής παραγωγής ιντεγκρίνης, αλλά αργότερα βρέθηκε ότι ανευρίσκεται και σε κύτταρα που δεν παράγουν ιντεγκρίνη, γεγονός που αναδεικνύει την πολυλειτουργικότητά αυτής της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα στα ερυθροκύτταρα, βρέθηκε ότι συνδέεται με το σύμπλοκο Rh (Ρέζους) και το σύμπλοκο της πρωτεΐνης ζώνης-3, συμβάλλοντας στη διατήρηση της μεμβρανικής ακεραιότητας.

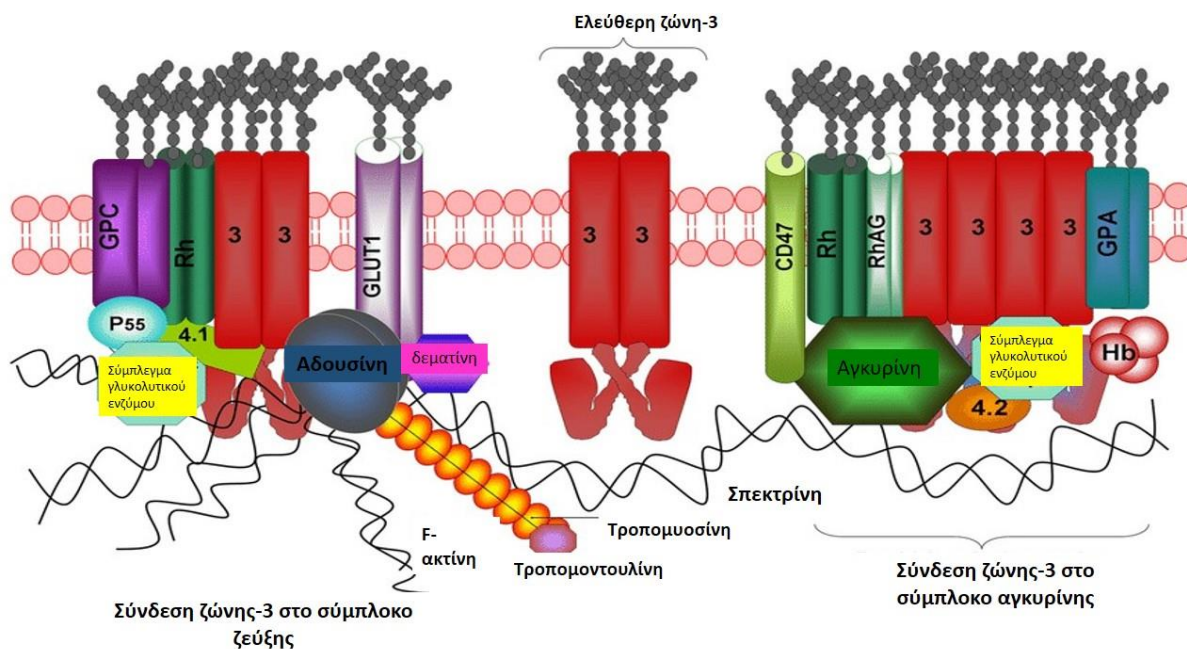
Η πρωτεΐνη CD47 λειτουργεί επίσης ως «δείκτης εαυτού» στα ερυθροκύτταρα, πιθανών και σε άλλα κύτταρα, καθώς συνδέεται με τον ανασταλτικό υποδοχέα SIRPα. Επομένως, τα κύτταρα που εκφράζουν τον SIRPα, όπως για παράδειγμα τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, είναι πιο πιθανό να φαγοκυτταρώσουν τα κύτταρα που έχουν ανεπάρκεια της CD47, σε σχέση με τα κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη στην επιφάνειά τους. Η αλληλοεπίδραση μεταξύ της CD47 και του υποδοχέα SIRPα φαίνεται ότι περιορίζει την καταστροφή των κυττάρων-ξενιστών στα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως στην αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, όπου τα μακροφάγα καταστρέφουν τα αντισώματα των προς οψωνισμό ερυθροκυττάρων. [39]

2.2.1.7 Σύμπλοκο Rh και Rh σχετιζόμενη γλυκοπρωτεΐνη

Το σύστημα Rhesus, αποτελεί ένα τόσο κλινικά σημαντικό, όσο και πολύπλοκο σύστημα, που αποτελείται από πολλαπλά αντιγόνα (D, C, c E, e κ.α.). Χρειάστηκαν πολλά χρόνια για να κατανοηθεί μοριακά, έως την ταυτοποίηση του «πολυπεπτιδίου Rh», του κεντρικού δομικού τμήματος των αντιγόνων Rh. Αυτή η ομάδα των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών του ερυθροκυττάρου, μοριακού βάρους 30-35 kDa, διαπερνά τη διπλοστοιβάδα λιπιδίων της μεμβράνης και συνδέεται με τον υπομεμβρανικό σκελετό [40], μέσω της πρωτεΐνης 4.2 και της αγκυρίνης. [41] Αλληλοεπιδρά επίσης με τη Rh σχετιζόμενη γλυκοπρωτεΐνη (RhAG). Η RhAG (μοριακό βάρος 50 kDa) είναι παρόμοιας δομής, δεν είναι πολυμορφική και ενώ δε σχετίζεται με κάποιο αντιγόνο ομάδας αίματος, είναι σημαντική για τη στόχευση των RhCE και RhD στη μεμβράνη, γιατί οι μεταλλάξεις της είναι υπεύθυνες για την απώλεια έκφρασης του αντιγόνου Rh (Rhnull). Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι πρωτεΐνες του συμπλόκου Rh και η Rh σχετιζόμενη γλυκοπρωτεΐνη συμμετέχουν στη μεταφορά της αμμωνίας (NH_4), ένα πεδίο που είναι ακόμα υπό διερεύνηση. [41]

2.2.1.8 Πρωτεΐνη CD59

Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη CD59, μοριακού βάρους 18-20 kDa, είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που προστατεύει το ερυθροκύτταρο από λύση, μέσω της αναστολής ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Η CD59 συνδέεται με τη μεμβράνη του πλάσματος με μία άγκυρα γλυκοζυλοφωσφατιδυλινοσιτόλης (GPI, Glycosyphosphatidylinositol anchor). Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι ανεπαρκής στις ερυθροκυτταρικές μεμβράνες ασθενών με παροξυσμική νυχτερινή αιμοσφαιρινουρία. Η ικανότητα αναστολής του συμπληρώματος της πρωτεΐνης, φαίνεται από το ότι μπορεί να προσδέεται στα μεμβρανικά σύμπλοκα C5b-8 ή C5b-9, μειώνοντας έτσι τη σύνδεσή τους με το ομοπολυμερές μόριο C9 και μειώνοντας επομένως τον δεσμό των μεμβρανικών πόρων που σχηματίζονται από αυτά τα σύμπλοκα (σχηματισμός MAC – Membrane Attack Complex), που επάγει τη λύση του κυττάρου. [42]



Εικόνα 4. Η οργάνωση των κύριων πρωτεϊνικών συμπλόκων στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη του ανθρώπου. Ο μεταφορέας γλυκόζης GLUT1, ο ανιονανταλλάκτης ζώνη-3 ή AE1, η γλυκοφορίνη A GPA, η γλυκοφορίνη C GPC, οι πρωτεΐνες 4.1, 4.2, σπεκτρίνη και η Rh σχετιζόμενη γλυκοπρωτεΐνη. Καθώς η λιπιδική διπλοστοιβάδα θεωρείται ασταθής και εύθραυστη, η έρευνα επικεντρώθηκε στην ταυτοποίηση των συνδέσεων μεταξύ αυτής και του πιο σταθερού μεμβρανικού σκελετού, ο οποίος ίσως, τη σταθεροποιεί. Πιο συγκεκριμένα, θεωρείται ότι η υπάρχουν τρεις πληθυσμοί ζώνης-3 στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη του ανθρώπου: (i) ένας πληθυσμός που συνδέεται με την αγκυρίνη, που βρίσκεται κοντά στο κέντρο του τετραμερούς της σπεκτρίνης, (ii) ο πληθυσμός που συνδέεται με την αδουσίνη στο σημείο ζεύξης του συμπλέγματος σπεκτρίνης- ακτίνης και (iii) ένας πληθυσμός που παραμένει ελεύθερος, χωρίς συνδέσεις, για να διαχυθεί από άλλες διαμεμβρανικές ή κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Ανατύπωση από *.J.Biol.Chem. 2012, 287:4129-4138. [43]*

2.2.1.9 Στοματίνη

Η στοματίνη (Ζώνη-7, πρωτεΐνη 7.2) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 31 kDa, η οποία πήρε το όνομά της από μία σπάνια αιμολυτική νόσο, την

κληρονομική στοματοκυττάρωση. Σε αρκετά περιστατικά αυτής της αναιμίας, βρέθηκε ότι τα ερυθροκύτταρα διαρρέουν ιόντα Na^+ και K^+ , ενώ απουσιάζει η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, που σημαίνει ότι προφανώς παίζει ρόλο στη ρύθμιση της ιοντικής μεταφοράς. [44]

Η ρύθμιση της μεταφοράς των μονοσθενών κατιόντων εκατέρωθεν της μεμβράνης εξυπηρετεί την ενδοκυτταρική ωσμωτικότητα. Η μεταφορά τους γίνεται είτε μέσω της, οδηγούμενης από ATP, αντλίας Na^+-K^+ , είτε μέσω μιας παθητικής διαρροής που είναι μη επιλεκτική, αμφίδρομη, ακόρεστη και μοιάζει με τη διάχυση. Η στοματίνη δεν είναι αντλία ιόντων, αλλά ρυθμιστής της λειτουργίας της. [45]

Η στοματίνη δε μοιάζει με καμία άλλη πρωτεΐνη της μεμβράνης και είναι ολιγομερής (9-12 μονομερή), αποτελούμενη από μία μονή υδρόφοβη περιοχή που συνδέεται με τη μεμβράνη και είναι φωσφορυλιωμένη, ενώ το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο της εκτείνονται στο κυτταρόπλασμα. [44], [46] Συνδέεται με περιοχές πλούσιες σε χοληστερόλη, τις λιπιδικές σχεδίες. [47]

Όπως αναφέρθηκε, η στοματίνη μαζί με τη GLUT-1, ρυθμίζουν τη λήψη του L-αφυδροασκορβικού οξέος, μιας οξειδωμένης μορφής της βιταμίνης C. [48] Επιπρόσθετα, έχει πιθανά και δομικό βοηθητικό ρόλο, διότι συνδέεται με την ακτίνη του κυτταροσκελετού.

2.2.2 Σκελετικές πρωτεΐνες

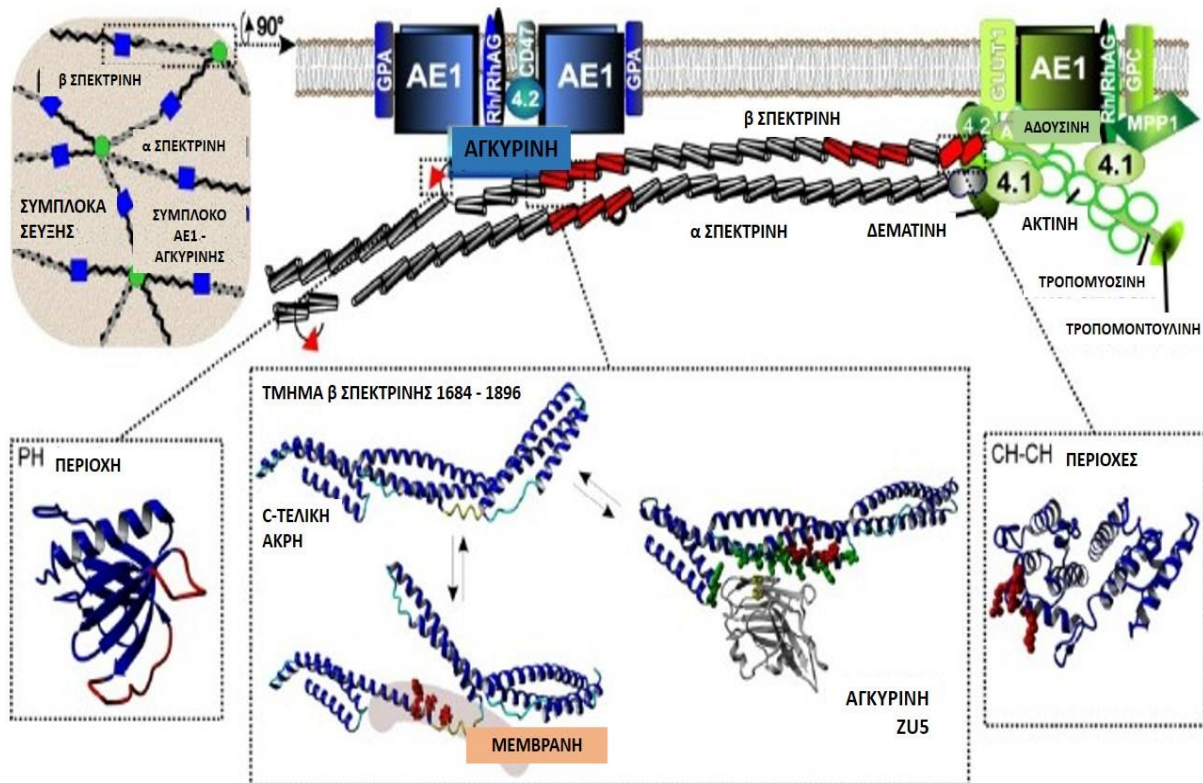
Ο ερυθροκυτταρικός μεμβρανικός σκελετός αποτελεί ένα ψευδοεξαγωγικό δίκτυο που σχηματίζεται από τη σπεκτρίνη, την πρωτεΐνη 4.1R, την αγκυρίνη, την ακτίνη και τις πρωτεΐνες που συνδέονται με αυτή, που διαπερνά φυλλωτά την εσωτερική μεμβρανική επιφάνεια και συνδέεται στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, μέσω των πολυπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων της ζώνης-3 και του συμπλέγματος Σπεκτρίνη-Αγκυρίνη-Ακτίνη. Ο μεμβρανικός σκελετός που αποτελείται από περίπου 20 κύριες πρωτεΐνες και 850 δευτερεύουσες, στερεώνει τη λιπιδική διπλοστοιβάδα και είναι απαραίτητος για τη διατήρηση του σχήματος του ερυθροκυττάρου, την αντιστρεπτή παραμορφωσιμότητά του, την ακεραιότητα της δομής των μεμβρανικών πρωτεϊνών, καθώς και τον έλεγχο της κινητικότητας των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. [49], [50]

2.2.2.1 Σπεκτρίνη

Η σπεκτρίνη των ερυθροκυττάρων (εικ.5) είναι ένα μακρύ, εύκαμπτο, σκωληκοειδές μόριο, που αποτελείται από δύο παράλληλες αλυσίδες, αντίθετα προσανατολισμένες, την α -και τη β -σπεκτρίνη. Κάθε αλυσίδα αποτελείται από περίπου 106 αμινοξέα και περιέχει πολλαπλές σπεκτρίνης-τύπου επαναλήψεις (repeats), με εξειδικευμένες λειτουργικά περιοχές στο άνω τελικό άκρο (κεφαλή) για τη διμερή-τετραμερή σύνδεση της σπεκτρίνης και τη σύνδεση με την αγκυρίνη και στο κάτω άκρο (ουρά) για τη σύνδεση των πρωτεϊνών 4.1R, 4.2, της ακτίνης κ.α. Κάθε επαναληπτική περιοχή σχηματίζεται από 3 α -έλικες (τις A, B και C) με κοντές διπλωμένες θηλιές. Η α -σπεκτρίνη περιέχει 21 επαναληπτικές περιοχές ($\alpha 1 - \alpha 21$) και μία μερική επαναληπτική περιοχή, την $\alpha 0$ στο αμινοτελικό άκρο της, που περιέχει μία μονή C-έλικα. Η β -σπεκτρίνη περιέχει 16 ($\beta 1 - \beta 16$) επαναληπτικές περιοχές και μία μερική

(β17) στο αμινοτελικό άκρο της, που περιέχει μία Α- και μία Β-έλικα. Για τον σχηματισμό του αβ διμερούς σε α2β2 τετραμερές, σπάει ο εσωτερικός δεσμός μεταξύ των μερικών επαναληπτικών περιοχών α0 και β17 και στη συνέχεια ξεδιπλώνεται (ανοικτό διμερές). [50]

Τέλος, η μεγάλη σημασία του σκελετού της σπεκτρίνης, γίνεται αντιληπτή και από το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις της, μπορούν να αποφέρουν κληρονομικές ανεπάρκειες στα ερυθροκύτταρα, όπως συμβαίνει στην κληρονομική ελλειπτοκυττάρωση και πιο σπάνια την κληρονομική σφαιροκυττάρωση. [51]



Εικόνα 5: Ο σκελετός της σπεκτρίνης των ερυθροκυττάρων. Επάνω αριστερά: τα διμερή της σπεκτρίνης (α-σπεκτρίνη με γκρι χρώμα και β-σπεκτρίνη με μαύρο χρώμα) συνδέονται για το σχηματισμό τετραμερών (επίσης εξαμερών και οκταμερών). Τα σύμπλοκα-γέφυρες με πράσινο χρώμα που μαζί με (επάνω δεξιά) το σύμπλοκο ΑΕ1-αγκυρίνης (μπλε χρώμα) συνδέουν το δίκτυο της σπεκτρίνης με τη μεμβράνη του πλάσματος. Με κόκκινο χρώμα τα σημεία πρόσδεσης της σπεκτρίνης. Κάτω: δομικά μοτίβα της σπεκτρίνης στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Σημεία πρόσδεσης με κόκκινο χρώμα. Ανατύπωση από: D. Boguslawska et al., CELL. MOL. BIOL. LETT., Vol. 19, No. 1. 2014. [52]

2.2.2.2 Αγκυρίνη

Η αγκυρίνη των ερυθροκυττάρων αποτελεί παράγωγο του γονιδίου ANK-1 (χρωμόσωμα 8p11). Είναι ένα μεγάλο πολυπεπτιδίο μοριακού βάρους 206 kDa, που συνδέει τη σπεκτρίνη σε ένα σύμπλεγμα με τη ζώνη-3 και άλλες πρωτεΐνες στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Χωρίζεται σε τέσσερις λειτουργικές περιοχές: μία αμινοτελική περιοχή που περιέχει 24 επαναλήψεις τύπου αγκυρίνης, σε διάταξη η μία πίσω από την άλλη, η οποία είναι μία ανοικτή, σπειροειδής δομή, που συνδέει τα τετραμερή της ζώνης-3. Έχει, επίσης,

μία κεντρική περιοχή που συνδέεται με τη σπεκτρίνη, μία νεκρική περιοχή που συνδέεται με πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην απόπτωση και μία καρβοξυτελική ρυθμιστική περιοχή, η οποία είναι πολύ ευμετάβλητη, μεταξύ των διαφορετικών ειδών της αγκυρίνης. [52], [50]

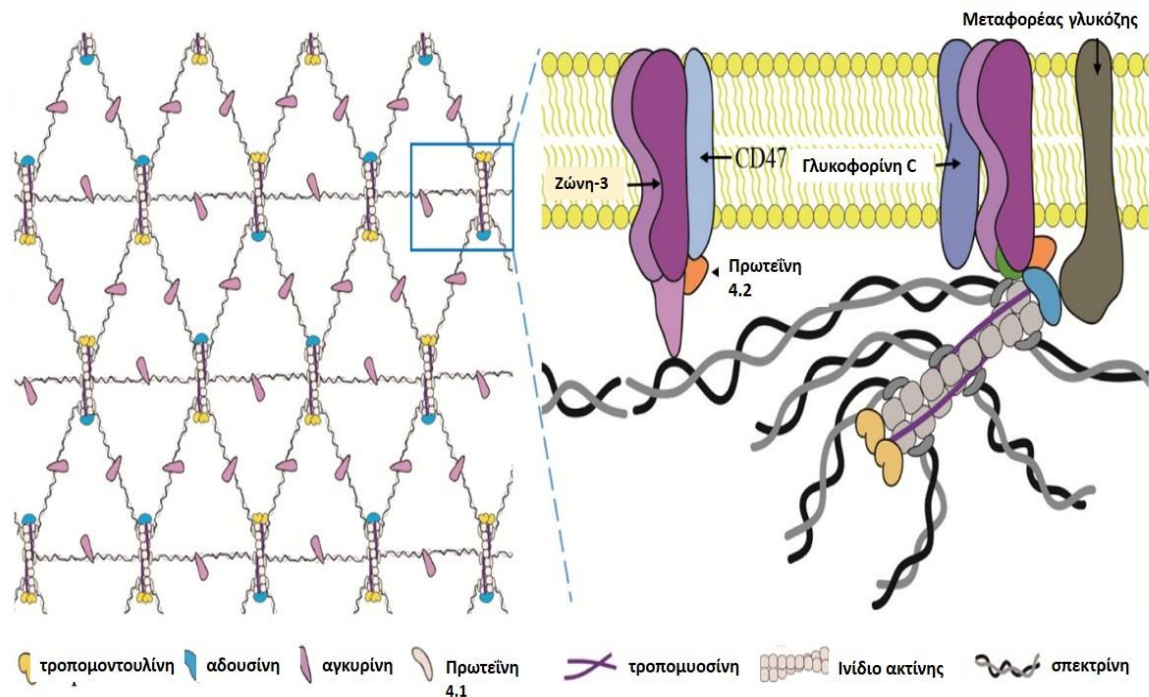
Επιπρόσθετα, η κληρονομική σφαιροκυττάρωση οφείλεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό σε ανεπάρκεια αγκυρίνης, η οποία οφείλεται είτε σε διαγραφή του χρωμοσώματος 8, που έχει ως αποτέλεσμα το μειωμένο ποσοστό του γονιδίου ANK-1, υπεύθυνου για την κωδικοποίηση της αγκυρίνης, είτε σε μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη σύνδεσή της με τον ανιονανταλλάκτη AE1. [53]

2.2.2.3 Ακτίνη - Τροπομυοσίνη - Τροπομοντουλίνη

Στα ερυθροκύτταρα απαντάται η ισομορφή της ακτίνης, β-ακτίνη, η οποία σχηματίζει κοντά νημάτια (πρωτονημάτια). Το ομοιόμορφο μήκος αυτών των νηματίων (F-AKT), εξαρτάται από τη ρύθμιση του πολυμερισμού της ακτίνης και από τον διπολυμερισμό των πρωτεϊνών που συνδέονται με την ακτίνη.

Εκτός από τη σύνδεσή τους με την $(\alpha_1\beta_1)_2$ -σπεκτρίνη, τα νημάτια ακτίνης σταθεροποιούνται στο μήκος τους από δύο ισομορφές τροπομυοσίνης, που αποτελούν πρωτεΐνες του υπομεμβρανικού σκελετού, τις TM5b (MB 27 kDa) και TM5NM1 (MB 29 kDa) και κυκλώνονται στα άκρα τους από δύο μόρια τροπομουντουλίνης (MB 40.6 kDa) και από ένα ετεροδιμερές αβ-αδουσίνης αντίστοιχα. Τα μόρια τροπομυοσίνης και τροπομουντουλίνης αναστέλλουν την επιμήκυνση και τον αποπολυμερισμό των νηματίων της ακτίνης.

Επιπλέον, τα πρωτονημάτια της ακτίνης συνδέονται και με την πρωτεΐνη 4.1, η οποία προκαλεί δομικές αλλαγές που ευνοούν τη σύνδεση με άλλα μόρια και με τη λιπιδική διπλοστοιβάδα, όπου φαίνεται ότι αποτελούν κέντρα μεταξύ της διπλοστοιβάδας και του κυτταροσκελετού (εικ.6). [54], [55], [56]



Εικόνα 6: Σχηματικό μοντέλο της δομής του συμπλέγματος σπεκτρίνης - ακτίνης του σκελετού της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Ένα τριγωνικό δίκτυο δύο διαστάσεων, που αποτελείται από τετραμερή σπεκτρίνης, τα οποία συνδέονται με συμπλέγματα ζεύξης, που περιέχουν μικροϊνίδια ακτίνης και άλλες συνδεδεμένες πρωτεΐνες (πρωτεΐνη 4.1, αδουσίνη, τροπομοντουλίνη, τροπομουοσίνη). Ανατύπωση από: Fulin Xing, Fen Hu, Jianyu Yang, Leitong Pan, Jingjun Xu. Structural and functional studies of erythrocyte membrane-skeleton by single-cell and single-molecule techniques. *Journal of Innovative Optical Health Sciences* Vol. 12, No. 01, 1830004 (2019). [54]

2.2.2.4 Πρωτεΐνη 4.1 R

Η πρωτεΐνη 4.1 είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη, η οποία σταθεροποιεί τη σύνδεση σπεκτρίνης-ακτίνης. Παίζει καθοριστικό ρόλο για το φυσιολογικό σχήμα και την ακεραιότητα του ερυθροκυττάρου, συνδέει τον κυτταρικό σκελετό με τη μεμβράνη, ενώ παίζει σημαντικό ρόλο σε κυτταρικές λειτουργίες και άλλων ιστών/οργάνων, όπως του μυελού των οστών, των πνευμόνων, της παρεγκεφαλίδας και του θύμου αδένου.

Αποτελείται από 840 αμινοξέα, είναι μοριακού βάρους 97 kDa και είναι προϊόν του γονιδίου erb41. Η πρωτεΐνη 4.1 αποτελείται από τέσσερις δομικές και λειτουργικές περιοχές:

- Την πολύ σημαντική αμινοτελική περιοχή ή περιοχή FERM (κοινή περιοχή για μία μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, τις ERM πρωτεΐνες), μοριακού βάρους 30 kDa, η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της πρωτεΐνης 4.1 R με τη γλυκοφορίνη C, την πρωτεΐνη p55 και την καλμοντουλίνη. Αποτελείται από τρεις υποπεριοχές, τους λοβούς A, B και C, οι οποίοι σχηματίζουν μία δομή σαν τριφύλλι. Κάθε λοβός αποτελεί μία διπλωμένη δομή, με συγκεκριμένες περιοχές που συνδέονται με διαφορετικές πρωτεΐνες της μεμβράνης.

- Την περιοχή 16 kDa, που συνδέει τη FERM με την επόμενη περιοχή SABD, η οποία δεν έχει δεσμούς, έχει δυσδιάκριτο ρόλο ακόμα, αλλά φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες A και C, γεγονός που μάλλον επηρεάζει τη σύνδεση της 4.1 με άλλες πρωτεΐνες.
- Την περιοχή SABD, μοριακού βάρους 10 kDa, που συνδέεται με τη σπεκτρίνη, την ακτίνη και την ιμπορτίνη-α, την πρωτεΐνη που μεταφέρει την 4.1 στον πυρήνα (στα μη ερυθροειδικά κύτταρα). Φωσφορυλιώνεται και αυτή από διάφορες κινάσες.
- Την καρβοξυτελική περιοχή, αποτελούμενη από δύο υποπεριοχές, μοριακού βάρους 22 και 24 kDa, οι οποίες δεν είναι σταθερές και τελικά μικραίνουν σε μία περιοχή 15 kDa. Αυτή η μικρότερη περιοχή είναι εξαιρετικά σταθερή και εκβάλλει στη μεμβράνη του πλάσματος.

Επομένως, η ικανότητα της πρωτεΐνης 4.1 να προσδένεται με διάφορες πρωτεΐνες, είναι πρωταρχικής σημασίας για την οργάνωση του κυτταρικού σκελετού. Αυτό το δίκτυο δημιουργείται από πολλαπλές οριζόντιες αλληλεπιδράσεις του δικτύου σπεκτρίνη-ακτίνη με την πρωτεΐνη 4.1, την αδουσίνη, την τροπομουσίνη, την τροπομοντουλίνη, τη δεματίνη και την πρωτεΐνη p55. Η πρωτεΐνη 4.1 είναι, επίσης, απαραίτητη για τις κάθετες συνδέσεις στον υπομεμβρανικό σκελετό, με τις παρούσες πρωτεΐνες, όπως τη ζώνη-3. Όλες αυτές οι συνδέσεις είναι απαραίτητες για το σχήμα αμφίκιουλου δίσκου του ερυθροκυττάρου και τις μηχανικές του ιδιότητες. Η έλξη της 4.1 με τις πρωτεΐνες της μεμβράνης ρυθμίζεται από την καλμοντουλίνη, η οποία μπορεί να συνδεθεί τόσο σε Ca^{+2} -εξαρτώμενες, όσο και Ca^{+2} -ανεξάρτητες περιοχές. Παρουσία Ca^{+2} , η καλμοντουλίνη μειώνει την έλξη της πρωτεΐνης 4.1 για το σύμπλεγμα σπεκτρίνης-ακτίνης, μειώνοντας έτσι τη μηχανική σταθερότητα της μεμβράνης. Τέλος, η πρωτεΐνη 4.1 συνδέεται απ' ευθείας και με φωσφολιπίδια της μεμβράνης, κυρίως με τη φωσφατιδυλοσερίνη, μέσω της αμινοτελικής περιοχής της. [57]

2.2.2.5 Πρωτεΐνη p55

Η p55 είναι μια περιφερική παλμιτυλιωμένη πρωτεΐνη της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Η κύρια δομή της περιλαμβάνει επτά διακριτές περιοχές, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η περιοχή PDZ (που συνδέεται με την καρβοξυτελική περιοχή της γλυκοφορίνης C), η SH3, η περιοχή σύνδεσης με την πρωτεΐνη 4.1, η περιοχή φωσφορυλίωσης τυροσινών και η καρβοξυτελική περιοχή τύπου γουανυλικής κινάσης.

Η σύνδεση της πρωτεΐνης p55 με την 4.1 και τη γλυκοφορίνη C, σχηματίζει ένα τριαδικό σύμπλοκο στην κυτταροπλασματική περιοχή της μεμβράνης του πλάσματος. Το τριαδικό σύμπλοκο συνδέει το σύμπλοκο σπεκτρίνης-ακτίνης με τη λιπιδική διπλοστοιβάδα, παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του ερυθροκυτταρικού σχήματος και στις ιδιότητες της μεμβράνης. [58]

2.2.2.6 Δεματίνη

Η δεματίνη ή ζώνη 4.9 είναι μία περιφερική πρωτεΐνη της κυτταροπλασματικής επιφάνειας της μεμβράνης του πλάσματος. Είναι τριμερούς σφαιρικής δομής και ο ρόλος της

είναι το πακετάρισμα της ακτίνης σε δέσμες, που ρυθμίζεται από τη φωσφορυλίωση της εξαρτώμενης από c-AMP πρωτεϊνικής κινάσης. Παρά ταύτα, παρουσιάζει μία αντίφαση, καθώς η φωσφορυλίωση από τις κινάσες A και C, έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τη λειτουργικότητά της. [59]

Αποτελείται από δύο υπομονάδες, μοριακού βάρους 48 και 52 kDa, ενώ κάθε ερυθροκύτταρο περιέχει περίπου 43.000 αντίγραφα δεματίνης, που αντιστοιχούν σε ισάριθμα ολιγομερή ακτίνης. Περιέχει έναν αμινοτελικό πυρήνα και μία καρβοξυτελική κεφαλή, η οποία συνδέεται με την F-ακτίνη. [60], [61]

Η δεματίνη έχει δομικό ρόλο στα ερυθροκύτταρο. Ανευρίσκεται στην ουρά του διμερούς της σπεκτρίνης, όπου υπάρχει ένα νημάτιο ακτίνης, σταθεροποιώντας το σύμπλοκο. Η περιοχή αυτή καλείται σύμπλοκο ζεύξης, όπου εκτός της δεματίνης, προσδέονται η πρωτεΐνη 4.1, η τροπομυοσίνη, η τροπομουντουλίνη, η πρωτεΐνη p55 και η καλμοντουλίνη. [62] Επιπλέον, ο μεταφορέας γλυκόζης GLUT-1 και η ζώνη-3 συνδέονται απ' ευθείας στη δεματίνη, προσφέροντας εναλλακτικές συνδέσεις στη μεμβράνη του πλάσματος. [63]

2.2.2.7 Παλλιδίνη

Η περιφερική μεμβρανική πρωτεΐνη παλλιδίνη ή ζώνη 4.2, είναι από τα πιο άφθονα πρωτεϊνικά συστατικά της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, εκπροσωπώντας περίπου το 5% της πρωτεϊνικής μάζας της. Έχει μοριακό βάρος 72 kDa και βρίσκεται σε περίπου 200.000 αντίγραφα ανά ερυθροκύτταρο. Η παλλιδίνη, όπως και άλλες πρωτεΐνες της μεμβράνης (ζώνη-3, αγκυρίνη, πρωτεΐνη 4.1 και ένας υποπληθυσμός της σπεκτρίνης) είναι ένα αμινομυριστυλιωμένο και παλμιτυλιωμένο μόριο. Η ακυλίωση του λιπαρού οξέος των πρωτεϊνών, παρέχει ένα επιπλέον υδροφοβικό τμήμα, το οποίο προάγει υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης-μεμβράνης και μεταξύ πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. [60] Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι η παλλιδίνη φωσφορυλιώνεται πλήρως στο ώριμο ερυθροκύτταρο. [64]

Η πρωτεΐνη 4.2 παίζει σημαντικό ρόλο στη δομή της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου, ενώ η απουσία της εξαιτίας των φυσιολογικών μεταλλάξεων στον άνθρωπο, έχει καταστροφικά αποτελέσματα για τη σταθερότητα της μεμβράνης και οδηγεί στη νόσο κληρονομική σφαιροκυττάρωση. Είναι γνωστό ότι αποτελεί σημείο σύνδεσης μεταξύ του συμπλέγματος της ζώνης-3 και του συμπλέγματος της πρωτεΐνης Rh, διαμέσου των συνδέσεων της με τη ζώνη-3 και την πρωτεΐνη CD47, καθώς και με τη σκελετική πρωτεΐνη αγκυρίνη. [65] Η σύνδεσή της με την πρωτεΐνη CD47, η οποία είναι «δείκτης εαυτού» για το ερυθροκύτταρο, δείχνει ότι συμβάλλει στην επιβίωσή του στην κυκλοφορία. [66]

2.2.3 Διάταξη πρωτεϊνών στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη - Σύμπλοκα πρωτεϊνών

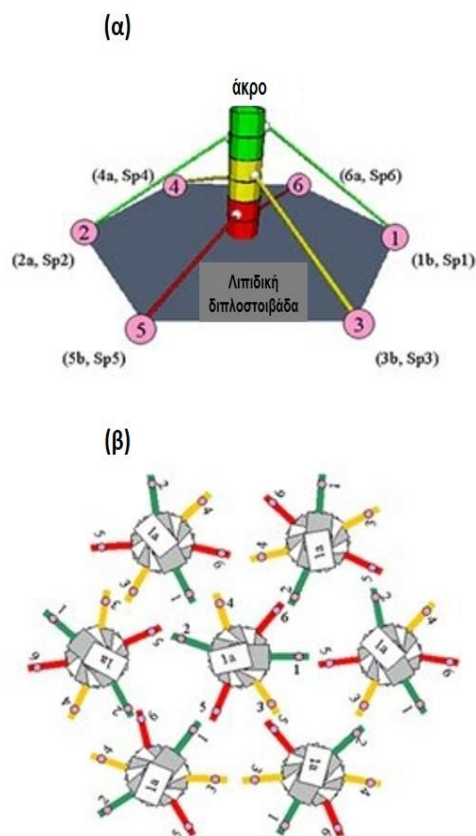
Οι πρωτεΐνες του σκελετού της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης συνδέονται σε αυτή, μέσω κάθετων αλληλεπιδράσεων με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες με τη σειρά τους, δημιουργούν πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα, μέσω οριζόντιων αλληλεπιδράσεων στη μεμβράνη (εικ.4). Για τον σχηματισμό και τη διατήρηση αυτών των συνδέσεων, είναι

απαραίτητη μία αρκετά μεγάλη ποικιλία προσαρμοσμένων πρωτεϊνών, η αποδιοργάνωση των οποίων, έχει ως αποτέλεσμα την παραμόρφωση του σχήματος των ερυθροκυττάρων (σφαιροκύτταρα, ελλειπτοκύτταρα, οβαλοκύτταρα), γεγονός που αποδεικνύει πόσο σημαντική είναι η παρουσία τους για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων.

Οι κύριες συνδέσεις μεταξύ του σκελετού και της μεμβράνης, εντοπίζονται σε δύο σημεία-κλειδιά: το σύμπλοκο της αγκυρίνης και το σύμπλοκο ζεύξης. Το σύμπλοκο της αγκυρίνης συνδέει τόσο το τετραμερές σύμπλοκο της ζώνης-3 (ζώνη-3, γλυκοφορίνη A, πρωτεΐνη 4.2 και καρβονική ανυδράση II) όσο και το σύμπλοκο Rh [Rh-εξαρτώμενη γλυκοπρωτεΐνη, το πολυπεπτίδιο RhCE, το αντιγόνο RhD, την πρωτεΐνη CD47, το μόριο προσκόλλησης-4 (Intercellular Adhesion Molecule 4 – ICAM-4) και τη γλυκοφορίνη-4], χρησιμοποιώντας απ' ευθείας αλληλεπιδράσεις της ζώνης-3, της πρωτεΐνης 4.2 και της Rh-εξαρτώμενης γλυκοπρωτεΐνης με την αγκυρίνη. Η πρωτεΐνη 4.2, η οποία συνδέεται και με τη ζώνη-3 και με την αγκυρίνη, θεωρείται η γέφυρα μεταξύ των δύο υπο-συμπλεγμάτων, καθώς συνδέεται με τη ζώνη-3 και την πρωτεΐνη CD47. Όλο αυτό το μακρο-σύμπλοκο αγκιστρώνεται στον κυτταροσκελετό, από τη σύνδεση της αγκυρίνης με τη β-σπεκτρίνη.

Το σύμπλοκο ζεύξης (εικ.7) [67], εστιάζεται γύρω από ένα κεντρικό σημείο (ζεύξη), το οποίο ανασηκώνεται από πλευρικές συνδέσεις, μεταξύ της πρωτεΐνης 4.1, της ακτίνης και της β-σπεκτρίνης, με τις πρώτες από αυτές να σταθεροποιούν το σύνδεσμο ακτίνης-σπεκτρίνης με απευθείας συνδέσεις και με τις δύο αυτές πρωτεΐνες. Έτσι, σχηματίζεται η κύρια ζεύξη, πάνω στην οποία δένουν και άλλες σκελετικές συμπληρωματικές πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων είναι η δεματίνη και οι α- και β-αδουσίνη (συνδέονται με την ακτίνη). Επιπλέον, η ακτίνη επισυνάπτεται από ένα διμερές τροπομοουσίνης και καλύπτεται από την τροπομουντουλίνη. Αυτά τα σύμπλοκα ζεύξης, εφοδιάζουν κυτταροσκελετικές συνδέσεις με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες γλυκοφορίνη C και γλυκοφορίνη D και με τις πρωτεΐνες p55 και 4.1. Τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν ενδείξεις ότι και οι πρωτεΐνες ζώνη-3 και ο μεταφορέας γλυκόζης-1, αποτελούν επιπλέον διαμεμβρανικές συνδέσεις στο σύμπλοκο ζεύξης.

Ο ερυθροκυτταρικός σκελετός σχηματίζεται από ένα εξαγωνικό πλέγμα τετραμερών σπεκτρίνης, με κοντά ινίδια ακτίνης στις ζεύξεις. Υπάρχει η υπόθεση ότι κάθε εξαγωνιο σχηματίζεται από έξι τριγωνικά επαναλαμβανόμενα στοιχεία. Κάθε τριγωνική επανάληψη περιέχει ένα σύμπλοκο ζεύξης σε κάθε κορυφή του (συνολικά τρεις), ένα σύμπλοκο αγκυρίνης σε κάθε πλευρά του (συνολικά τρία) και περιέχει τέσσερα ελεύθερα διμερή ζώνης-3 (δεν συνδέονται με τον κυτταρικό σκελετό). [68]



Εικόνα 7: Τρισδιάστατο μοντέλο για το σύμπλοκο ζεύξης του σκελετού της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. (α) Πρωτοϊνίδιο ακτίνης, που ενδέχεται να λειτουργεί ως μηχανικός άξονας για τρία ζεύγη σπεκτρίνης. Κάθε μόριο σπεκτρίνης, ίσως συνδέεται με ένα σύμπλοκο ανάρτησης στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, σχηματίζοντας ένα μικρό εξαγωνο. (β) Έξι περιφερικά σύμπλοκα ζεύξης και ένα κεντρικό, ίσως περιστρέφονται σε διάφορους προσανατολισμούς για να συνδεθούν και να σχηματίσουν ένα μεγάλο εξαγωνο. Οι έξι άκρες και τα πλέγματα που συνδέουν τις έξι γωνίες στο κέντρο του εξαγώνου, είναι φτιαγμένα από τετραμερή της σπεκτρίνης. Ανατύπωση από L.A Sung and C. Vera, 2003. [67]

2.2.4 Κυτοσολικές πρωτεΐνες

2.2.4.1 Αιμοσφαιρίνη

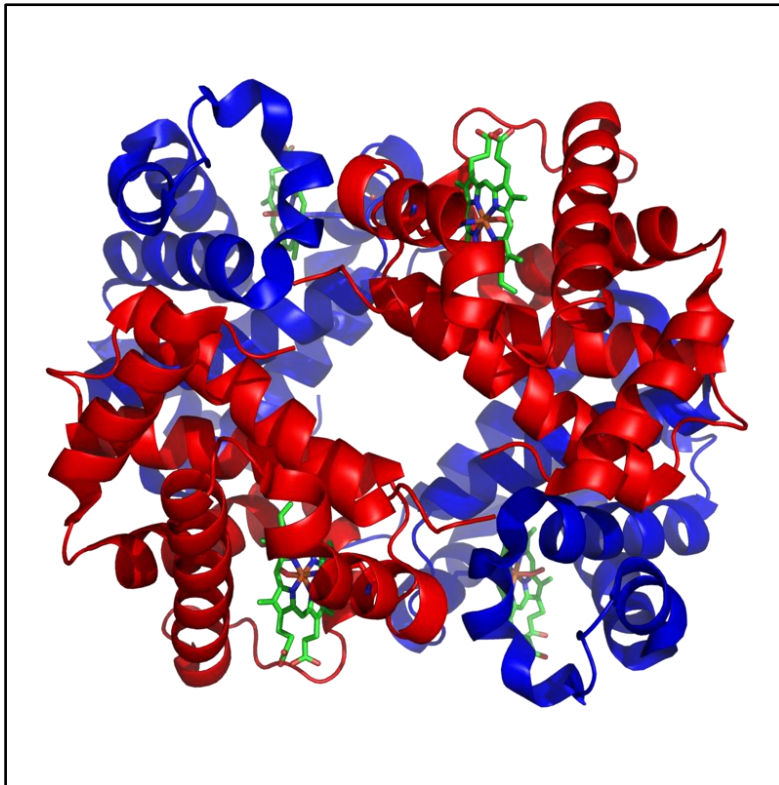
Η κύρια λειτουργία της αιμοσφαιρίνης, της πιο άφθονης κυτοσολικής πρωτεΐνης του ερυθροκυττάρου, είναι η μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες προς τους ιστούς και η επιστροφή διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς προς τους πνεύμονες. Κάθε ερυθροκύτταρο περιέχει περίπου 280×10^6 μόρια αιμοσφαιρίνης.

Υπάρχουν δύο είδη αιμοσφαιρίνης, σε σχέση με τον κορεσμό του οξυγόνου. Η οξυαιμοσφαιρίνη, η οποία είναι πλήρως κορεσμένη με μόρια οξυγόνου και η δεοξυαιμοσφαιρίνη, που είναι ακόρεστη. Η οξυαιμοσφαιρίνη έχει μεγάλη έλξη για το οξυγόνο, ενώ η δεοξυαιμοσφαιρίνη έχει μεγαλύτερη έλξη για το διοξείδιο του άνθρακα. Έτσι, η οξυαιμοσφαιρίνη μεταφέρει το οξυγόνο στους πνεύμονες και μέσω της κυκλοφορίας φτάνει στους ιστούς. Εκεί το οξυγόνο απελευθερώνεται και στη συνέχεια δεσμεύεται στη μιοσφαιρίνη, η οποία το μεταφέρει στα μιτοχόνδρια, όπου χρησιμοποιείται για την αερόβια αναπνοή. Σε αντάλλαγμα, η δεοξυαιμοσφαιρίνη λαμβάνει δύο πρωτόνια και δύο μόρια

διοξειδίου του άνθρακα και επιστέφει στους πνεύμονες, όπου απελευθερώνεται με την εκπνοή. [69]

Πιο συγκεκριμένα, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να συνδέεται με το οξυγόνο με χαλαρό δεσμό και με αναστρέψιμο τρόπο. Οι υπομονάδες της σφαιρίνης σε ένα μόριο αιμοσφαιρίνης που δεν δεσμεύει οξυγόνο (δεοξυαιμοσφαιρίνη), συνδέονται μεταξύ τους σε έναν σχηματισμό που έχει, σχετικά, μικρή έλξη για το οξυγόνο. Όταν ένα μόριο οξυγόνου συνδεθεί με την αίμη, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ των ανεξάρτητων αλυσίδων χαλαρώνουν, με αποτέλεσμα την έκθεση περισσότερων θέσεων δέσμευσης οξυγόνου, άρα και μεγαλύτερη έλξη για αυτό. Αυτή η σχέση επιτρέπει στην αιμοσφαιρίνη να εξυπηρετεί τη λειτουργία της, το να δεσμεύει οξυγόνο σε περιβάλλον υψηλής πίεσης οξυγόνου (πνεύμονες) και να το απελευθερώνει σε περιβάλλον χαμηλής πίεσης οξυγόνου, στους περιφερικούς ιστούς. Η έλξη της αιμοσφαιρίνης για το οξυγόνο εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Το υδρογόνο και το διοξείδιο του άνθρακα ελαττώνουν αυτή την έλξη, αφήνοντας περισσότερο οξυγόνο να απελευθερωθεί στους ιστούς. Επίσης το 2,3 διφωσφογλυκερικό οξύ (2,3-DPG) στα ερυθροκύτταρα, σταθεροποιεί τη σύνθεση της δεοξυαιμοσφαιρίνης και μειώνει την έλξη της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο. [70]

Η σύνθεση της αιμοσφαιρίνης γίνεται στην πρόωρη μορφή του ερυθροκυττάρου, την προερυθροβλάστη, στο μυελό των οστών και συνεχίζεται στο αρχικό στάδιο της ανάπτυξης του δικτυοερυθροκυττάρου, λίγο πριν απελευθερωθεί στην κυκλοφορία. Αρχικά σχηματίζεται το μόριο της αίμης, από την πρωτοπορφυρίνη IX και τον σίδηρο (Fe^{++}). Στη συνέχεια, κάθε μόριο αίμης συνδέεται με μία μακριά πολυπεπτιδική αλυσίδα, τη σφαιρίνη, σχηματίζοντας μία αλυσίδα αιμοσφαιρίνης. Τέσσερις τέτοιες αλυσίδες συνδέονται με χαλαρούς δεσμούς, για να σχηματίσουν ολόκληρο το μόριο της αιμοσφαιρίνης (εικ.8). [71] Υπάρχουν μικρές διαφορές μεταξύ των διάφορων πολυπεπτιδικών αλυσίδων (α , β , γ και δ), που αφορούν τη σειρά των αμινοξέων. Η πιο συνηθισμένη μορφή που απαντάται στους υγιείς ενήλικες είναι η αιμοσφαιρίνη A (Hemoglobin A, HbA), η οποία αποτελείται από δύο άλφα (141 αμινοξέα) και δύο βήτα (146 αμινοξέα) πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Επομένως, κάθε μόριο αιμοσφαιρίνης έχει τέσσερις ομάδες αίμης, οι οποίες μπορούν να μεταφέρουν ένα μόριο O_2 η κάθε μία. Το μοριακό βάρος του τετραμερούς της αιμοσφαιρίνης είναι 64,458 kDa. [70] Οι α αλυσίδες στον άνθρωπο (ενήλικες και έμβρυα) παραμένουν ίδιες, ενώ οι μη-άλφα αλυσίδες περιλαμβάνουν τις β αλυσίδες στον ενήλικα ($\alpha_2\beta_2$), τις γάμα αλυσίδες στα έμβρυα και σε μικρό ποσοστό στους ενήλικες ($\alpha_2\gamma_2$) και τις δέλτα αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης A2, η οποία ανευρίσκεται σε μικρά ποσοστά μετά τη γέννηση ($\alpha_2\delta_2$). [72]



Εικόνα 8: Η δομή της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης.

Οι δύο ολόιδια α και οι επίσης ίδιες β αλυσίδες (κόκκινο και μπλε χρώμα αντίστοιχα), είναι διαταγμένες τετραεδρικά. Οι υπομονάδες συγκρατούνται με υδροφοβικούς δεσμούς, δεσμούς υδρογόνου και ιοντικούς δεσμούς (γέφυρες αλάτων), μεταξύ αντίθετα φορτισμένων πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων. Κάθε υπομονάδα συνδέεται με ένα μόριο αίμης (πράσινο χρώμα), η οποία συνδέει το οξυγόνο. Καθώς το τετραμερές μόριο της αιμοσφαιρίνης είναι αλλοστερικό, όταν ένα μόριο αίμης συνδέεται με οξυγόνο, τα υπόλοιπα μόρια αίμης του τετραμερούς συνδέονται και αυτά ταχύτατα με ένα μόριο οξυγόνου. Ανατύπωση από: (<https://doi.org/10.1016/C2016-0-04004-4>) [71]

Παραλλαγές αιμοσφαιρίνης

Η αιμοσφαιρίνη F, η οποία ανευρίσκεται σε υψηλά ποσοστά στο έμβρυο, φυσιολογικά μετά τη γέννηση, μειώνεται σταδιακά, έτσι στους ενήλικες ανευρίσκεται περίπου στο 1%. Σε ορισμένες κληρονομικές παθολογικές καταστάσεις όμως, τα ποσοστά της μπορούν να βρεθούν αρκετά υψηλά, εάν η σύνθεση των φυσιολογικών α και β αλυσίδων είναι μειωμένη έως ανύπαρκτη. Οι πιο κοινές παραλλαγές που μπορούν να προκαλέσουν νόσο, είναι οι αιμοσφαιρίνη S, η οποία ανευρίσκεται υψηλή στη δρεπανοκυτταρική αναιμία και θα αναλυθεί εκτενώς σε επόμενο κεφάλαιο, η αιμοσφαιρίνη E και οι αιμοσφαιρίνες C και D. Όλες αυτές οι παραλλαγές προέρχονται από μία αντικατάσταση ενός αμινοξέος στη β αλυσίδα. Στις Ηνωμένες Πολιτείες η δεύτερη πιο συχνή παραλλαγή είναι η C και ακολουθεί η E. Εκτός της HbS, οι παραπάνω παραλλαγές μπορεί να είναι ήπιας ή μέτριας αιμόλυσης και αναιμίας, ενώ η ομόζυγη μορφή της E είναι ασυμπτωματική. Τα ετερόζυγα άτομα αυτών των παραλλαγών είναι επίσης ασυμπτωματικά και έχουν φυσιολογική επιβίωση των ερυθροκυττάρων. [73]

Ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος

Ο μεταβολισμός της αιμοσφαιρίνης, οδηγεί στην απελευθέρωση της αίμης προς τα εξωκυττάρια υγρά, με πιθανές σοβαρές συνέπειες για την υγεία. Η επιπλέον αιμοσφαιρίνη, που δε χρησιμοποιείται από τα ερυθροκύτταρα, υπόκειται φιλτράρισμα από τους νεφρούς, εάν δε δεσμεύεται στην απτοσφαιρίνη (HPT - πρωτεΐνη με υψηλή συγγένεια που βρίσκεται στο πλάσμα και δεσμεύει την αιμοσφαιρίνη, αναστέλλοντας την οξειδωτική της δραστηριότητα). Η παραγωγή της αιμοσφαιρίνης στα πρόωρα ερυθροκύτταρα συντονίζεται, ώστε να ελαχιστοποιούνται τα καταστροφικά αποτελέσματα των α- και β-σφαιρινών, που είναι ασταθείς και κυτταροτοξικές, όπως είναι επίσης τα μόρια της ελεύθερης αίμης και των ιόντων σιδήρου, καθώς όλα καταλύουν τον σχηματισμό των ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS – Radical Oxidative Stress). Τα επίπεδα της έξω-ερυθροκυτταρικής αιμοσφαιρίνης και της ελεύθερης αίμης είναι συνήθως χαμηλά, αλλά μπορούν να γίνουν επικίνδυνα υψηλά σε παθολογικές καταστάσεις που προκαλούν αιμόλυση, όπως για παράδειγμα στη δρεπανοκυτταρική αναιμία. [74]

2.2.4.2 Υπεροξειρεδοξίνη-2 (PRX-2)

Συγκριτικά με άλλα σωματικά κύτταρα, το ερυθρό αιμοσφαίριο εκτίθεται στο οξειδωτικό στρες από πολλές και διαφορετικές πηγές προέλευσης, μέσα και έξω από το κύτταρο. Περιέχει υψηλά επίπεδα οξυγόνου και αιμοσφαιρίνης, η οποία αυτό-οξειδώνεται συνεχώς και παράγει το ανιόν σουπεροξειδίου (O_2^-) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Επιπλέον, το ερυθροκύτταρο περιέχει μεμβράνη πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και τα μόρια της αίμης του τετραμερούς της αιμοσφαιρίνης, που μπορούν να πυροδοτήσουν μία σειρά οξειδωτικών αντιδράσεων. Επιπρόσθετα, ως απύρρηνο κύτταρο, το ερυθρό αιμοσφαίριο δε μπορεί να συνθέσει νέες πρωτεΐνες προς αντικατάσταση εκείνων που καταστρέφονται στη διάρκεια των 120 ημερών της ζωής του. Έτσι, είναι επαρκώς εφοδιασμένο με πολλές αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες. [75]

Η υπεροξειρεδοξίνη-2 (PRX-2), είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο, που χρησιμοποιεί υπολείμματα κυστεΐνης, για να αποδομήσει υπεροξείδια. Αποτελεί την τρίτη πιο άφθονη πρωτεΐνη στα ερυθροκύτταρα και ανταγωνίζεται με την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) για να αποδομήσει το H_2O_2 , συμπεριλαμβανόμενου αυτού που αντλείται από την αυτό-οξείδωση της αιμοσφαιρίνης. Η χαμηλή δραστηριότητα της θειορεδοξινικής ρεδοκτάσης στα ερυθροκύτταρα διατηρεί την PRX-2 σε χαμηλά επίπεδα, αλλά η έκθεση σε εξωγενές H_2O_2 προκαλεί συσσώρευσή του. Η υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση σημαίνει ότι, παρόλο που η δράση της είναι αργή, η υπεροξειρεδοξίνη-2 μπορεί να δράσει ως δεξαμενή H_2O_2 , έως ότου επέλθει το αποτέλεσμα της δράσης της.

Η υπεροξειρεδοξίνη-2 είναι επίσης γνωστή ως καλπρομοτίνη και ρυθμίζει επίσης τη μεταφορά ιόντων, καθώς συνδέεται με τη μεμβράνη και ενεργοποιεί τα κανάλια Gardos. [76]

2.2.4.3 Hsp70

Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 (Heat shock proteins), μοριακού βάρους 70 kDa, είναι μία οικογένεια πρωτεϊνών, οι οποίες υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται, κυρίως, στο κυτοσόλιο των ερυθροκυττάρων. Όμως σε κατάσταση θερμικού στρες, έχουν την τάση να συνδέονται με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη, παίζοντας πιθανό ρόλο στην προστασία του κυττάρου, αφού ουσιαστικά σταθεροποιούν με την παρουσία τους τον μεμβρανικό σκελετό. [77]

Ειδικότερα, κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης, το κύτταρο καθίσταται ιδιαίτερα ευάλωτο στο στρες. Σε αυτή τη φάση, οι πρωτεΐνες Hsp70, ανευρίσκονται σε υψηλά επίπεδα, καθώς προστατεύουν και συντηρούν τα άωρα κύτταρα της ερυθράς σειράς. Επιπλέον κατά τη διαφοροποίηση, βοηθούν στη βιοσύνθεση της αιμοσφαιρίνης, εξουδετερώνουν τις πρωτεοτοξικές επιδράσεις, εμποδίζουν την πρόωρη απόπτωση των διαφοροποιημένων ερυθροβλαστών και σταθεροποιούν τη βιωσιμότητα των τελικά διαφοροποιημένων ερυθροκυττάρων, μέσω της επιδιόρθωσης των πρωτεϊνών. Γι' αυτό και η δυσλειτουργία αυτού του συστήματος πρωτεϊνών, οδηγεί σε αναποτελεσματική ερυθροποίηση, με αποτέλεσμα τις χρόνιες αναιμίες και διάφορες αιματολογικές νόσους, μεταξύ των οποίων και η δρεπανοκυτταρική αναιμία. Έχει παρατηρηθεί ότι τα στρεσαρισμένα δρεπανοκύτταρα εκφράζουν Hsp70 στη μεμβράνη. Σε αυτή τη νόσο, φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες Hsp70, ίσως παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απάντησης. [78]

2.2.4.4 Καλπαΐνη - Καλπαστατίνη

Οι καλπαΐνες αποτελούν ευρύτατα εκφραζόμενες πρωτεάσες κυστεΐνης, που ενεργοποιούνται από το ασβέστιο σε ουδέτερο pH. Στα ερυθροκύτταρα απαντάται αποκλειστικά η καλπαΐνη-1 ή μ-καλπαΐνη, η οποία ρυθμίζεται από την καλπαστατίνη, που αποτελεί και τον ενδογενή αναστολέα της. Είναι ετεροδιμερές μόριο με δύο υπομονάδες, μία μοριακού βάρους 80 kDa, που περιέχει το καταλυτικό τμήμα και μία μικρότερη 30 kDa, που είναι ρυθμιστική. [79]

Καθώς τα ώριμα ερυθροκύτταρα στερούνται οργανιδίων, που θα χρησίμευαν και ως αποθήκες ασβεστίου, η δράση της καλπαΐνης στοχεύει σε λειτουργίες της μεμβράνης του πλάσματος. Εκτός από τη ρύθμιση διάφορων αντιδράσεων στη μεμβράνη, οι οποίες προκαλούνται από την εισροή ασβεστίου, η καλπαΐνη διασπάει διαμεμβρανικές και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, όπως την αντλία ιόντων Ca^{++} -ATPάση, η οποία ρυθμίζει τη μεταφορά ιόντων Ca^{++} στα ερυθροκύτταρα. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η δράση της καλπαΐνης παίζει ρόλο στη ρύθμιση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών της μεμβράνης, όπως της 4.1. Καθώς η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης 4.1 ρυθμίζει τη σύνδεσή της με τη σπεκτρίνη και την ακτίνη, έχει προταθεί ότι η, προκαλούμενη από την καλπαΐνη, πρωτεόλυση της πρωτεϊνικής κινάσης C (protein kinase C – PKC), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την 4.1, είναι απαραίτητη για την επιβίωση των ερυθροκυττάρων από το στρες που υφίστανται *in vivo* στην κυκλοφορία. [80]

Η καλπαστατίνη είναι μια ευρέως διαδεδομένη ενδοκυτταρική πρωτεΐνη, που σε ανενεργή μορφή βρίσκεται στο κυτοσόλιο. Ενεργοποιείται από μερική αυτόλυση παρουσία

ιόντων Ca^{++} , μια διαδικασία που ενισχύεται από τη μετακίνηση της καλπαΐνης στη μεμβράνη. Επιπρόσθετα, η καλπαστατίνη εμποδίζει τη σύνδεση της καλπαΐνης στη μεμβράνη, ενώ η ποσότητα, η τοποθεσία και η αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης και του αναστολέα της, φαίνεται ότι επηρεάζει την πρωτεόλυση των πρωτεϊνών της μεμβράνης. [81]

Σε καταστάσεις αυξημένης εισροής ασβεστίου, όπως συμβαίνει στη δρεπανοκυτταρική αναιμία, η δράση της καλπαΐνης-1 προκαλεί αυξημένη καταστροφή των πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, άρα και παραμόρφωση του σχήματος των κυττάρων. Υπάρχουν ενδείξεις, ότι η πιθανή στοχευμένη φαρμακευτική χορήγηση αναστολέων της καλπαΐνης, μπορεί να προσφέρει νέες θεραπευτικές επιλογές σε νόσους με διαταραχές της ομοιόστασης του ασβεστίου. [80]

3. Μεταβολισμός ερυθροκυττάρων

Κατά τη διάρκεια της ζωής τους, τα ερυθροκύτταρα χρειάζονται ενέργεια για να συντηρήσουν τις, ζωτικής σημασίας, κυτταρικές λειτουργίες, οι οποίες περιλαμβάνουν:

- Τη συντήρηση της γλυκόλυσης.
- Τη διατήρηση της ισορροπίας του ηλεκτρολυτικού δυναμικού μεταξύ του πλάσματος και του κυτταροπλάσματος του ερυθροκυττάρου, μέσω της ενεργοποίησης των μεμβρανικών αντλιών, που κινούνται από ATP (Τριφωσφορική Αδενοσίνη).
- Τη σύνθεση της γλουταθειόνης (Glutathione - GSH) και άλλων μεταβολιτών.
- Τον μεταβολισμό των πουρινών και των πυριμιδινών.
- Τη διατήρηση του σιδήρου της αιμοσφαιρίνης στη λειτουργική δισθενή του μορφή.
- Την προστασία των μεταβολικών ενζύμων, της αιμοσφαιρίνης και των μεμβρανικών πρωτεϊνών από την οξειδωτική μετουσίωση.
- Τη συντήρηση της ασυμμετρίας των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων.

Εξαιτίας της έλλειψης πυρήνα και μιτοχονδρίων, τα ώριμα ερυθροκύτταρα αδυνατούν να παράγουν ενέργεια μέσω του (οξειδωτικού) κύκλου του Krebs. Αντίθετα, τα ερυθροκύτταρα εξαρτώνται από την αναερόβια μετατροπή της γλυκόζης, μέσω του μονοπατιού Embden-Meyerhof, για την παραγωγή και την αποθήκευση υψηλά ενεργειακών φωσφορικών ριζών. Επιπλέον χρησιμοποιείται το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (ή μονοφωσφορικής εξόζης), που παράγει NADPH, απαραίτητο για τη διατήρηση σε υψηλά επίπεδα της αντιοξειδωτικής γλουταθειόνης. Τα ερυθροκύτταρα διαθέτουν δύο επιπλέον μοναδικά μονοπάτια, τον κύκλο Rapoport – Luebering και το σύστημα του νουκλεοτιδίου πυριμιδίνης-5'. Το πρώτο χρησιμοποιείται για την παραγωγή του 2,3-διφωσφογλυκερικού οξέος (2,3-biphosphoglycerate – 2,3-DPG), που προσπερνά το στάδιο της φωσφογλυκερικής κινάσης (phosphoglycerate kinase – PGK). Το 2,3-DPG μειώνει την έλξη την αιμοσφαιρίνης για το οξυγόνο και αποτελεί ενεργειακή αποθήκη. Το δεύτερο ερυθροειδικό μεταβολικό μονοπάτι, είναι το σύστημα του νουκλεοτιδίου πυριμιδίνης-5', που φωσφορυλιώνει περιττά νουκλεοτίδια πυριμιδίνης, τα οποία προέρχονται από εκφυλισμένο RNA. [82], [83]

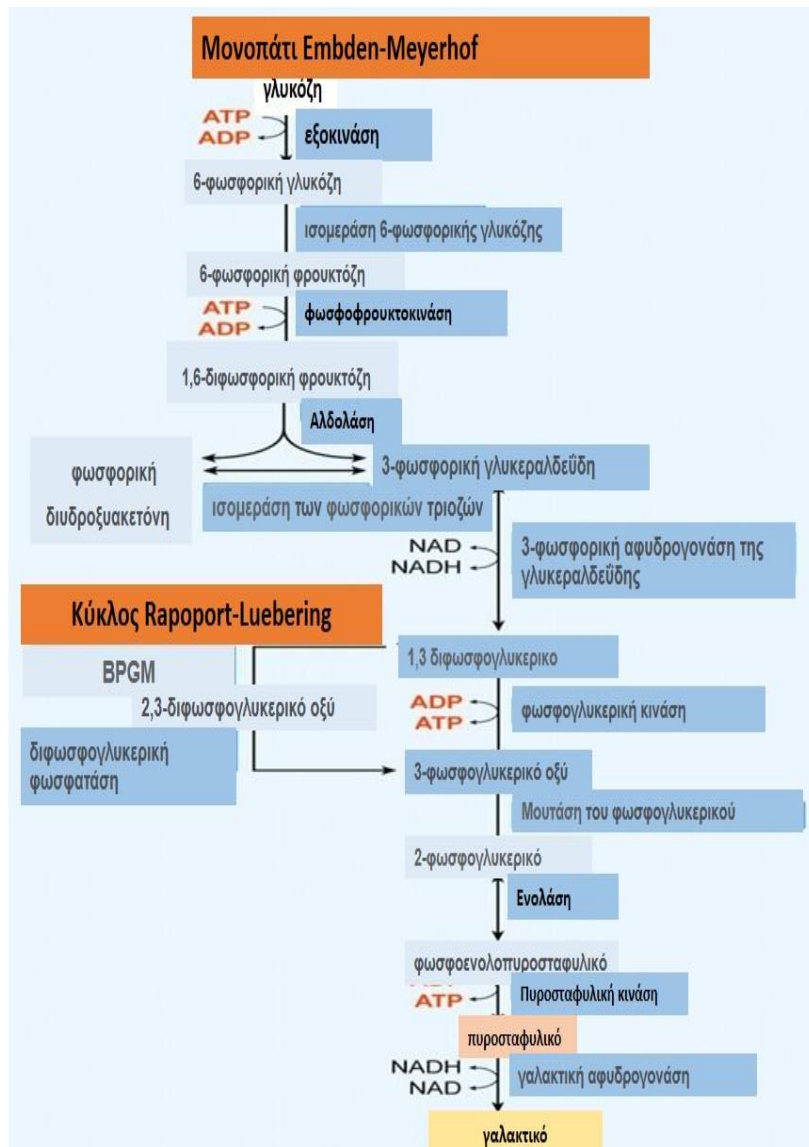
3.1 Αναερόβια γλυκόλυση - Το μονοπάτι Embden – Meyerhof

Η γλυκόζη αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για το ερυθροκύτταρο. Σε φυσιολογικές συνθήκες και απουσία οξειδωτικού στρες, το 90% της γλυκόζης καταβολίζεται αναερόβια σε πυροσταφυλικό ή γαλακτικό, από το μονοπάτι Embden-Meyerhof (γλυκόλυση) (εικ.9). Παρόλο που χρησιμοποιείται ένα μόριο ATP από την εξοκινάση (hexokinase – HK) και άλλο ένα από την φωσφοφρουκτοκινάση (phosphofructokinase – PFK), το όφελος είναι 2 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης, διότι το σύνολο των τεσσάρων μορίων ATP παράγονται από τη φωσφογλυκερινική κινάση και την πυροσταφυλική κινάση. Επιπλέον, η δυνατότητα αναγωγής, παράγεται στη μορφή του νικοτιναμιδίου αδένινο δινουκλεοτιδίου (NADH) στο στάδιο που καταβολίζεται από την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης. Το NADH μπορεί να χρησιμοποιηθεί, για να μειωθεί η μεθαιμοσφαιρίνη σε αιμοσφαιρίνη από τη NADH-κυτόχρωμα b5 ρεδοουκτάση. Εάν γίνει αυτή η αντίδραση, το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης είναι το πυροσταφυλικό. Παρόλα αυτά, εάν το NADH δεν επαναοξειδωθεί σε αυτό το στάδιο, χρησιμοποιείται για να την αναγωγή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό από τη γαλακτική αφυδρογονάση (Lactate Dehydrogenase – LDH) στο τελικό στάδιο της γλυκόλυσης.

Το μονοπάτι Embden-Meyerhof υπόκειται σε ένα πολύπλοκο μηχανισμό ανασταλτικών και ενεργοποιητικών παραγόντων. Η συνολική ταχύτητα της γλυκόλυσης στα ερυθροκύτταρα ρυθμίζεται από τα τρία ένζυμα HK, PFK, PK και από τη διαθεσιμότητα σε NADH και ATP. Κάποια γλυκολυτικά ένζυμα ενεργοποιούνται αλλοστερικά ή αναστέλλονται από ενδιάμεσα παράγωγα του μονοπατιού. [82]

3.2 Ο κύκλος Rapoport – Luebering

Ο κύκλος Rapoport-Luebering (εικ.9) [82] αποτελεί μία παράκαμψη του γλυκολυτικού κύκλου, που παράγει και αποφωσφορυλιώνει το 2,3-διφωσφογλυκερινικό οξύ (2,3-diphospho-D-glycerate – 2,3-BPG). Κατά τη διάρκεια της κανονικής γλυκόλυσης, το 1,3-BPG καταβολίζεται από την φωσφογλυκερινική κινάση σε 3-φωσφογλυκερινικό οξύ (3-phospho-D-glycerate – 3-PG) και παράγει ένα μόριο ATP. Έτσι, παράγεται μέσω του κύκλου το 2,3-BPG (το 3-PG επιστρέφει στον κύριο γλυκολυτικό κύκλο), που είναι κύριος ρυθμιστής στα ερυθροκύτταρα, καθώς ρυθμίζει σημαντικά ενζυμικά παράγωγα ινοσιτόλης, αλλά κυρίως διότι προκαλεί την απελευθέρωση οξυγόνου από τα ερυθροκύτταρα. Αφού συνδεθεί κατ' επιλογή στη δεοξυαιμοσφαιρίνη, διευκολύνει την απελευθέρωση του οξυγόνου προς τους ιστούς. Επομένως, η ρύθμιση των επιπέδων του 2,3-BPG είναι καθοριστικής σημασίας για τις απαιτήσεις του οργανισμού σε οξυγόνο. [84]



Εικόνα 9: Τα γλυκολυτικά μονοπάτια Embden-Meyerhof και Rapoport-Luebering. Εξαιτίας της έλλειψης πυρήνα και μιτοχονδρίων, τα ώριμα ερυθροκύτταρα αδυνατούν να παράξουν ενέργεια, μέσω του οξειδωτικού Κύκλου του Krebs. Αντί αυτού, τα ερυθροκύτταρα εξαρτώνται από την αναερόβια μετατροπή της γλυκόζης από το μονοπάτι Embden-Meyerhof, για την παραγωγή και αποθήκευση υψηλής ενέργειας φωσφορικών παραγώγων. Επιπλέον, τα ερυθροκύτταρα κατέχουν ένα μοναδικό γλυκολυτικό μονοπάτι, που καλείται Rapoport-Luebering για την παραγωγή του 2,3-DPG. Ανατύπωση από: van Wijik R. et al. *The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis.* *Blood* (2005) 106 (13): 4034–4042. [82]

3.3 Το μονοπάτι Φωσφορικών Πεντοζών (Μονοφωσφορικής Εξόζης)

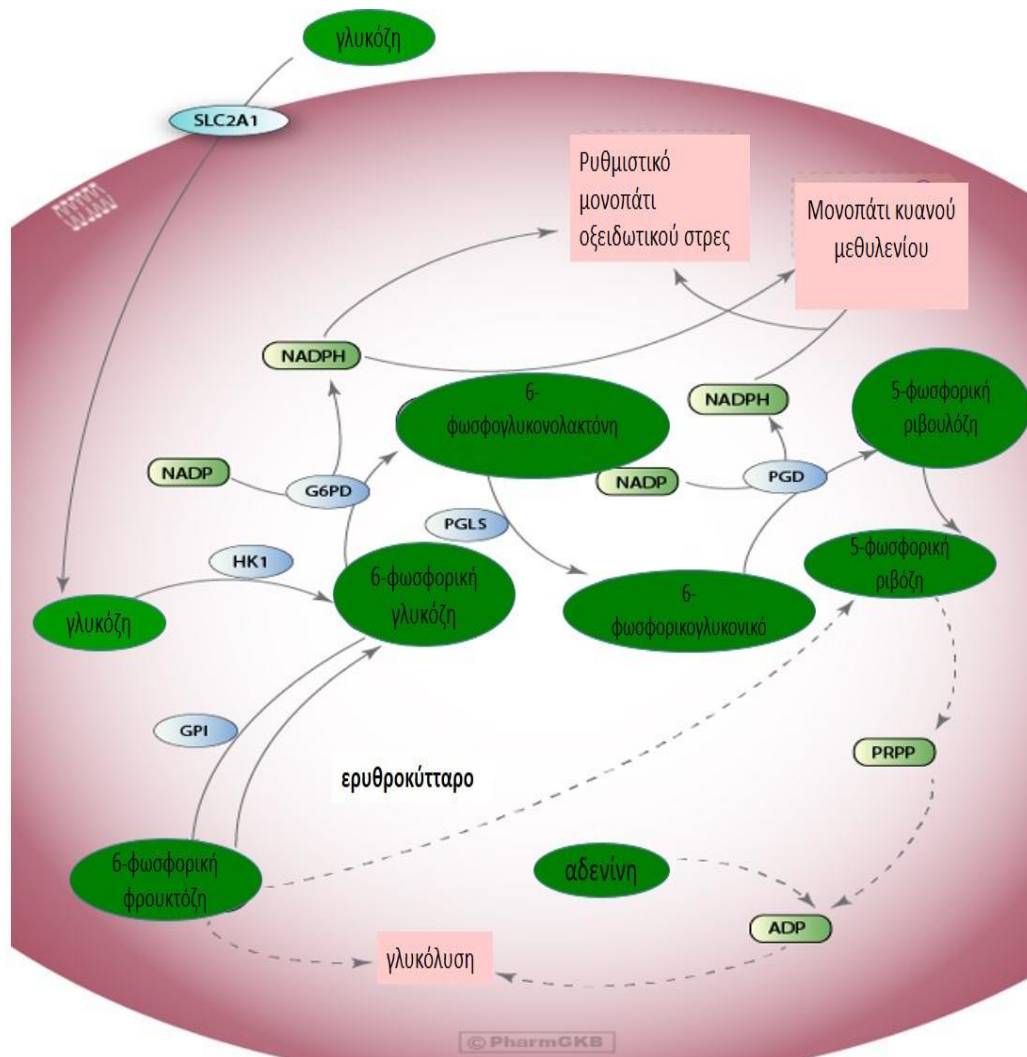
Η κύρια λειτουργία της αιμοσφαιρίνης, η μεταφορά οξυγόνου προς τους ιστούς, επιτελείται όταν το μόριο της αίμης συνδέεται με τον σίδηρο στη λειτουργική δισθενή του μορφή (Fe^{+2}). Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, όπως συμβαίνει στη θαλασσαιμία, τη δρεπανοκυτταρική αναιμία και τις ασταθείς αιμοσφαιρίνες, ο δισθενής σίδηρος οξειδώνεται σε τρισθενή (Fe^{+3}) και το μόριο, γνωστό ως μεθαιμοσφαιρίνη, δε μπορεί να συνδεθεί με το οξυγόνο. Έτσι η αιμοσφαιρίνη καθίσταται μη λειτουργική και ο οργανισμός είναι αδύνατο να

επιβιώσει. Επομένως, για τη διατήρηση της ζωής, πρέπει να υπάρχει ο μηχανισμός που ανάγει γρήγορα και συντηρεί τον σίδηρο σε δισθενές κατιόν. [85], [86]

Φυσιολογικά, το ένζυμο αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (Glucose - 6 Phosphate Dehydrogenase - G6PDH) των ερυθροκυττάρων, μετατρέπει τη γλυκόζη σε NADPH (ανηγμένη μορφή ATP), το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες. Το NADPH παράγεται κυρίως από το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (ή μονοφωσφορικής εξόζης) (εικ.10) [87], που χρησιμοποιεί το ίδιο καύσιμο με τη γλυκόλυση: τη γλυκόζη. Αξιοσημείωτα, το NADPH δε συμμετέχει απ' ευθείας στη μείωση του Fe^{+3} σε Fe^{+2} της αιμοσφαιρίνης, αλλά είναι ο κύριος υπεύθυνος παραγωγής ενέργειας που είναι απαραίτητη για αυτή την αναγωγή, εμποδίζοντας έτσι την οξείδωση και τη μετουσίωση της πρωτεΐνης. Στη διαδικασία συμμετέχει και το ένζυμο κυτόχρωμα b5 ρεδουκτάση, ένα NADPH εξαρτώμενο ένζυμο, που καταλύει τη μετατροπή της μεθαιμοσφαιρίνης σε αιμοσφαιρίνη, η ανεπάρκεια του οποίου οδηγεί σε μεθαιμοσφαιριναιμία. Επιπλέον, η έλλειψη του ενζύμου G6PD, αποτελεί τη συχνότερη ενζυμοπάθεια και προκαλεί αιμολυτική αναιμία. [85], [88]

Ο εσωτερικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός των ερυθροκυττάρων, βασίζεται στην παραγωγή του μορίου της γλουταθειόνης. Το σουλφιδρύλιο συνιστά την πιο σημαντική ομάδα αυτού του τριπεπτιδίου, που μπορεί να βρίσκεται είτε στην ανηγμένη μορφή του (SH), είτε στη μορφή του οξειδωμένου δισουλφιδίου (S-S). Οι οξειδοαναγωγικοί κύκλοι της γλουταθειόνης, είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση του δισθενούς σιδήρου στο μόριο της αιμοσφαιρίνης. Η αποκατάσταση της μειωμένης γλουταθειόνης, προμηθεύεται μέσω του NADPH.

Επομένως, η γλυκόζη που παράγεται στα ερυθροκύτταρα είτε από το μονοπάτι της γλυκόλυσης, είτε από το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών, που δρουν παράλληλα, αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τους αντιοξειδωτικούς τους μηχανισμούς. [85]



Εικόνα 10: Το μονοπάτι φωσφορικών πεντοζών στα ερυθροκύτταρα. Γραφική αναπαράσταση των μορίων που συμμετέχουν στην παραγωγή NADPH στα ερυθροκύτταρα. Το NADPH που παράγεται, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μηχανισμούς που ρυθμίζουν το οξειδωτικό στρες και από το μονοπάτι του κυανού μεθυλενίου μπορεί να μειωθεί η παραγωγή μεθαίμοσφαιρίνης. (G6P=αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, GPI=ισομεράση 6-φωσφορικής γλυκόζης, HK1=εξοκινάση 1, NADP=φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου αδενίνης, NADPH= ανηγμένη μορφή του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου, PGD= 6-φωσφογλυκονική αφυδρογονάση, PGLS= 6-φωσφογλυκονολακτονάση, PRPP=πυροφωσφορικό φωσφοριβοσούλιο). Ανατύπωση από: McDonagh EM, Bautista JM, Youngster I, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: methylene blue pathway. Pharmacogenet Genomics. 2013 Sep;23(9):498-508. doi: 10.1097/FPC.0b013e32836498f4. [87]

Ζώνη-3 και μεταβολισμός ερυθροκυττάρου

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η διαμεμβρανική πρωτεΐνη ζώνη-3 παίζει σημαντικό ρόλο και στον μεταβολισμό του ερυθροκυττάρου. Η αμινοτελική κυτοσολική περιοχή της πρωτεΐνης αποτελεί σημείο πρόσδεσης της μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης (δεοξυαιμοσφαιρίνη), με πολύ μεγαλύτερη έλξη από την οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη. Για τον λόγο αυτό, έχει προταθεί ότι η αιμοσφαιρίνη ίσως παίζει επιπρόσθετα και ρόλο «αισθητήρα οξυγόνου», που κατευθύνει τη ζώνη-3 στην κατάλληλη ρύθμιση του μεταβολισμού. Πράγματι, υπάρχουν ενδείξεις ότι το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, όταν

δε συνδέεται με τη δεοξυαιμοσφαιρίνη, μπορεί να συνδεθεί με το γλυκολυτικό ένζυμο αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκαλδεΐδης (GAPDH), αναστέλλοντας τη δράση του. Είναι αξιοσημείωτο, ότι το ερυθροκύτταρο διαθέτει περίπου 10^6 αντίγραφα ζώνης-3, όσα και GAPDH. Όπως φαίνεται πειραματικά, πιθανόν να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους, ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου και η ζώνη-3 να εκτρέπει τη γλυκόζη, ανάλογα με τις κυτταρικές ανάγκες, σε διαφορετικά μονοπάτια (γλυκόλυση ή μονοπάτι φωσφορικών πεντοζών). Έτσι μπορεί να εξηγηθεί, γιατί σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες η GAPDH προσδένεται στη ζώνη-3 και αναστέλλεται η δράση της, ενώ το ερυθροκύτταρο χρησιμοποιεί το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών για την οξείδωση της γλυκόζης, ώστε να παραχθεί ο ανηγμένος συμπαραγόμενος NADPH, που θα χρησιμοποιηθεί σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Αντίθετα, το ερυθροκύτταρο χρησιμοποιεί την οδό της γλυκόλυσης όταν το οξειδωτικό στρες είναι μειωμένο (για παράδειγμα σε μεγάλο υψόμετρο), όπου η αιμοσφαιρίνη από-οξυγονώνεται και προσδένεται στην αμινοτελική περιοχή της ζώνης-3, η οποία επιτρέπει την απελευθέρωση των γλυκολυτικών ενζύμων από τη μεμβράνη, ώστε να συμμετέχουν στο μηχανισμό, που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP και NADH.

Η ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ της γλυκόλυσης και του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών είναι απαραίτητη, ώστε το ερυθροκύτταρο να είναι ικανό να ανταποκριθεί σε συγκεκριμένες μεταβολικές του ανάγκες (λειτουργία μεμβρανικών αντλιών, κυτταροσκελετός και ομοιόσταση των λιπιδίων), όπου το ερυθροκύτταρο εκτίθεται σε μειωμένες ή αυξημένες εντάσεις οξυγόνου στους πνεύμονες ή στα περιφερειακά τριχοειδή. [89]

4. Γήρανση ερυθροκυττάρων

Η διαδικασία γήρανσης των ερυθροκυττάρων, θεωρείται ένα πεδίο ειδικού επιστημονικού και κλινικού ενδιαφέροντος. Αποτελεί ένα σύνολο κατευθυνόμενων, χρονό-εξαρτώμενων, αλλά όχι απαραίτητα γραμμικών μοριακών διαδικασιών, που τελικά οδηγούν στην κυτταρική κάθαρση. Φυσιολογικά, τα ερυθρά αιμοσφαίρια ζουν περίπου 120 ημέρες στην κυκλοφορία, κατά τη διάρκεια των οποίων, οι ειδικοί ρυθμιστικοί μοριακοί μηχανισμοί προγραμματίζουν τη διάρκεια της ζωής καθώς και την αποβολή των γηρασμένων ερυθροκυττάρων. Αν και το ερυθροκύτταρο είναι ένα απλοποιημένο και αρκετά καλά μελετημένο κύτταρο, τα σηματοδοτικά μονοπάτια που περιλαμβάνονται στη διαδικασία γήρανσης δεν είναι επαρκώς διασαφηνισμένα.

Τα ερυθροκύτταρα υφίστανται μία ποικιλία συνεχών μεταβολικών και φυσιολογικών καταστροφών όσο γερνούν, όπως η κυστιδιοποίηση της μεμβράνης, οι τροποποιήσεις της αιμοσφαιρίνης, η έκθεση επιφανειακών δεικτών αποβολής που προκαλούν ερυθροφαγοκυττάρωση, καθώς και υποβάθμιση της ομοιόστασης και της αντιοξειδωτικής τους άμυνας. Χαρακτηριστικά σήματα αποβολής αποτελούν η έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης, καθώς και η σύνδεση αυτόλογων ανοσοσφαιρινών G (IgGs) πάνω σε ειδικά αντιγόνα γήρανσης, που προέρχονται από δομικές αλλαγές στην πρωτεΐνη ζώνη-3. Επιπλέον, η αύξηση της πυκνότητας των ερυθροκυττάρων, η μη ενζυματική γλυκοζυλίωση της αιμοσφαιρίνης και η απαμιδίωση της πρωτεΐνης 4.1b σε 4.1a, χρησιμοποιούνται ευρέως ως

ευαίσθητοι ερυθροκυτταρικοί δείκτες γήρανσης. Τέλος, πολυάριθμες μετα-μεταφραστικές πρωτεϊνικές τροποποιήσεις εμπλέκονται στη ρύθμιση της ομοιόστασης και στη διάρκεια της ζωής του ερυθροκυττάρου, όπως η φωσφορυλίωση, η οξειδωση και η συσσωμάτωση. [90], [91]

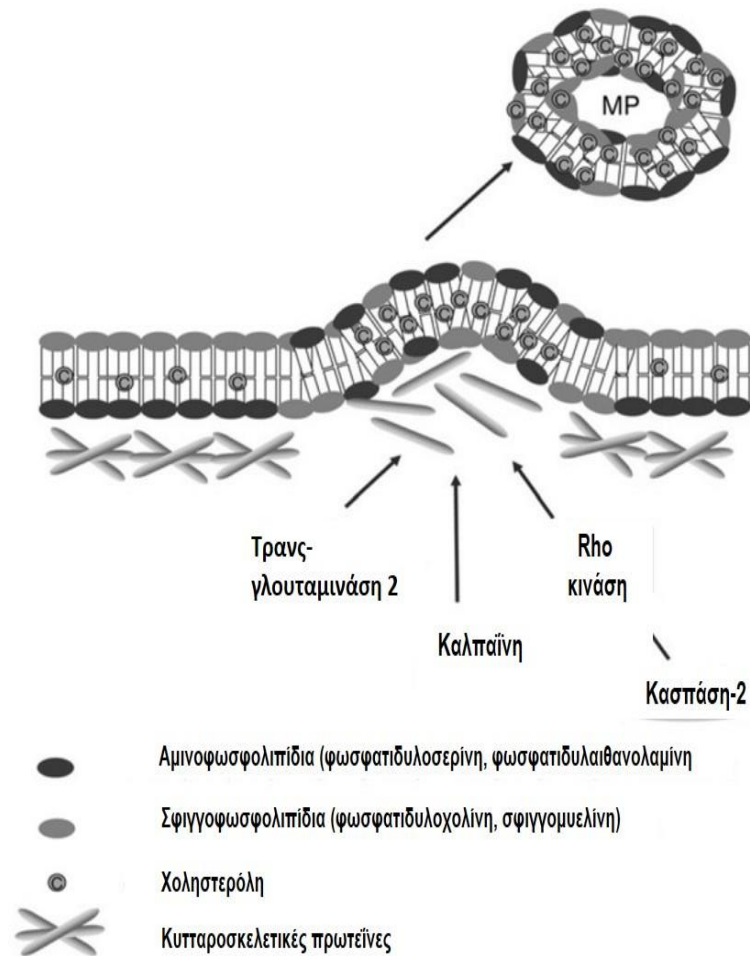
4.1 Μικροκυστιδιοποίηση

Τα μικροκυστίδια (Microvesicles – MVs ή Microparticles - MPs) αποτελούν μικρά τμήματα της μεμβράνης, τα οποία εκκρίνονται στην εξωκυττάρια περιοχή, σε καταστάσεις στρες ή τραυματισμού. Διακρίνονται από άλλα κυστίδια (π.χ. εξωσώματα), βάσει μεγέθους, περιεχομένου, μηχανισμού και τόπου δημιουργίας. Τα MVs ανευρίσκονται στο πλάσμα και σε άλλα βιολογικά υγρά υγιών ατόμων και τα ποσοστά τους αυξάνονται κατά την ερυθροποίηση, κατά τη διαδικασία της γήρανσης, σε απάντηση περιβαλλοντικών καταστάσεων στρες και σε διάφορες νόσους, όπως στη δρεπανοκυτταρική αναιμία. Ο σχηματισμός των μικροκυστιδίων από τα ερυθροκύτταρα, γίνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, ενώ επιταχύνεται κατά την αποθήκευση στις τράπεζες αίματος. [92], [93], [94], [95], [96] Τα MPs των ερυθροκυττάρων είναι μικρότερα από εκείνα άλλης κυτταρικής προέλευσης, έχουν παρόμοιο μέγεθος, διαμέτρου περίπου 0.15 μm, ενώ συχνά συνοδεύονται από μικρότερα κυστίδια, τα νανοκυστίδια. [97], [98], [99]

Τα μικροκυστίδια δημιουργούνται από τη φυσαλιδοποίηση και αποκοπή τμημάτων της εξωτερικής μεμβράνης. Αποτελεί μία διαδικασία που δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, η οποία φαίνεται ότι περιλαμβάνει δύο φάσεις. Καταρχάς την αρχική κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση (εικ.11) [97], όπου καθοριστικό ρόλο παίζει ο διακανονισμός των ινιδίων της ακτίνης, ο οποίος επιτελείται με τη βοήθεια ενδοκυτταρικών ενζύμων, όπως της καλπαΐνης, της πρωτεϊνικής κινάσης που σχετίζεται με το Rho και της διαγλουταμινάσης. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, η αποβολή των MVs είναι ένας μηχανισμός αποβολής άχρηστων πρωτεϊνών και αλλαγής του κυτταρικού όγκου στην περιοχή της επιφάνειας, ώστε να αναδιαμορφωθεί η μεμβράνη. Τα MVs περιέχουν ακετυλοχολινεράση, μεμβρανικές πρωτεΐνες, μεταφορείς γλυκόζης (π.χ. glut-1) και μεταφορείς αμινοξέων, τα οποία ίσως συμβάλλουν στην αναδιαμόρφωση της μεμβράνης κατά την ωρίμανση. Η κυστιδιοποίηση λόγω γήρανσης των ερυθροκυττάρων, έχει ως συνέπεια την απώλεια της αιμοσφαιρίνης (περίπου κατά 20%) και της μεμβράνης, με συνακόλουθη ελάττωση του κυτταρικού όγκου και αύξηση της πυκνότητας. Η αιμοσφαιρίνη που περιέχουν τα MVs, εμπλουτίζεται με μη αναστρέψιμα μεταλλαγμένα είδη (HbA1c and HbA1e2), τα οποία τυπικά βρίσκονται στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα.

Η δεύτερη φάση αφορά την εξωτερική αποβολή της φωσφατιδυλοσερίνης (PS), η οποία ελέγχεται από ένα ATP/ασβέστιο-εξαρτώμενο σύστημα, που περιλαμβάνει τρία διακριτά ένζυμα, τις φλιππάσες, τις φλοππάσες και τις σκραμπλάσες. Σε κατάσταση ηρεμίας, όταν η κυτταροπλασματική συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} παραμένει σε χαμηλά επίπεδα, οι φλιππάσες εσωτερικεύουν αρνητικά φορτισμένα PS, ενώ οι φλοππάσες και οι σκραμπλάσες παραμένουν ανενεργές. Η ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των φωσφολιπιδικών ενζύμων μεταφοράς που προκαλούνται, είτε από οξειδωση είτε από εισροή Ca^{2+} , μπορεί να προκαλέσει κυστιδιοποίηση. Η εισροή Ca^{2+} από μη εξειδικευμένα κανάλια, ενεργοποιεί την

καλπαΐνη και τις σκραμπλάσες, ενώ αναστέλλει τις φλιππάσες, με αποτέλεσμα την εξωτερίκευση της PS, την κυτταροσκελετική ρήξη και τη συνάθροιση της ζώνης-3, που συνολικά οδηγούν στην παραγωγή κυστιδίων. [98], [100]



Εικόνα 11: Προτεινόμενοι μηχανισμοί για την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού, που οδηγεί στο σχηματισμό μικροκυστιδίων. Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα αμινοφωσφολιπίδια (αμινοφωσφατιδυλοχολίνη και αμινοφωσφατιδυλοσερίνη) ανευρίσκονται στο εσωτερικό φύλλωμα της μεμβράνης του πλάσματος. Κατά το σχηματισμό των MVs, χάνεται η μεμβρανική λιπιδική ασυμμετρία, καθώς τα αμινοφωσφολιπίδια αναδιανέμονται στο εξωτερικό φύλλωμα της μεμβράνης. Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, έχει ως αποτέλεσμα τη φυσαλιδοποίηση της μεμβράνης του πλάσματος και ίσως εξαρτάται από τον πολυμερισμό της ακτίνης, την κασπάση-2, την Rho κινάση, την καλπαΐνη και/ή τη διαγλουταμινάση-2. Ανατύπωση από: Burger et al., *Microparticles: biomarkers and beyond. Clin Sci.* 2013;124:423-41. [97]

Παλαιότερα υπήρχε η αντίληψη ότι η κυστιδιοποίηση εξυπηρετούσε μόνο στον καθαρισμό των ερυθροκύτταρων (τα ερυθροκύτταρα στερούνται λυσοσωμάτων) από κατεστραμμένα ή βλαβερά συστατικά που συσσωρεύονται με τον χρόνο, όπως η μετουσιωμένη αιμοσφαιρίνη, τα συμπλέγματα του συμπληρώματος C5b-9 και τα νεοαντιγόνα της ζώνης-3. Επίσης έχει προταθεί ότι, φυσιολογικά, η παραγωγή MVs προάγει την αναγνώριση και την κάθαρση των γηρασμένων ή κατεστραμμένων ερυθροκυττάρων, μέσω της αποβολής διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που λειτουργούν σαν «δείκτες εαυτού» (για παράδειγμα η πρωτεΐνη CD47). Πλέον τα MVs αποτελούν και βιοδείκτες για τραυματισμούς αγγείων, διάφορες προθρομβωτικές και προφλεγμονώδεις καταστάσεις. [100]

Σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, στα μικροκυστίδια που με πρωτεΐνες, λιπίδια και miRNA, ίσως είναι ζωτικής σημασίας για την επικοινωνία με το ενδοθήλιο, για τη ρύθμιση της ομοιόστασης του NO και του O₂, της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και της ανοσοτροποποίησης. Τα MVs φαίνεται ότι έχουν σημαντικό ρόλο στην απορρύθμιση της ομοιόστασης και προάγουν προθρομβωτικές συνέπειες σε διάφορες ασθένειες. Οι βιολογικοί ρόλοι των MVs στις παθολογικές καταστάσεις, συνοψίζονται στους παρακάτω:

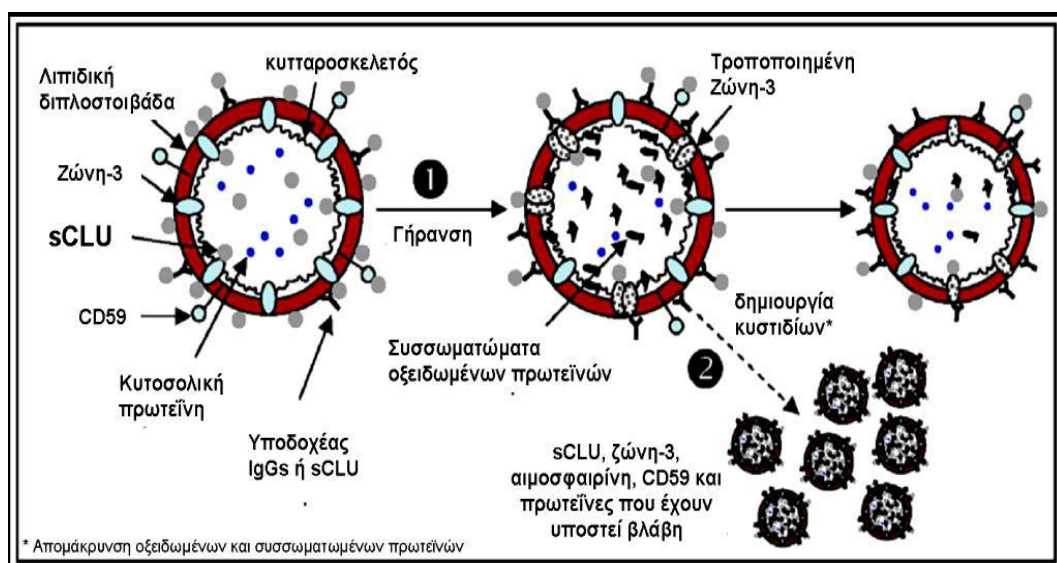
- **Ομοιόσταση του μονοξειδίου του αζώτου:** το NO δρα ως αγγειορυθμιστής, ελέγχοντας το αγγειακό μικροπεριβάλλον. Η οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη οξειδώνεται από το NO, παράγοντας μεθαιμοσφαιρίνη και νιτρικό ανιόν (NO₃⁻). Στη συνέχεια η δεοξυαιμοσφαιρίνη συνδέεται με το NO με ισχυρή έλξη στον σίδηρο της αίμης (Fe⁺²), μειώνοντας τη διαθεσιμότητα του NO και συνεπώς, επηρεάζοντας την ομοιόσταση του O₂. Η βιοδιαθεσιμότητα του NO εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, μεταξύ των οποίων και η αφθονία των μικροκυστιδίων στην κυκλοφορία που προσεγγίζουν το ενδοθήλιο, που πυροδοτείται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες.
- **Οξειδοαναγωγική ισορροπία:** τα ερυθροκύτταρα διατηρούν ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών καταστάσεων. Περιέχουν αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως θειορεδοξίνη, το σύστημα ρεδοκτάσης/περοξειρεδοξίνης, δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD), καταλάση, γλουταθειόνη υπεροξειδάση και ρεδοκτάση της γλουταθειόνης και αντίστοιχα αναγωγικά, όπως και μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά, όπως η γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ και η θειορεδοξίνη. Σε οξειδωτικές καταστάσεις, η αυξημένη παραγωγή MVs φαίνεται ότι εμπλέκεται σε ραγδαία παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), με συνέπεια την ανατροπή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας
- **Προθρομβωτικές συνέπειες:** τα μικροκυστίδια που παράγονται σε διάφορα αιματολογικά νοσήματα, όπως σε διάφορες φάσεις της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, σε συνδυασμό με αλλαγές σε διάφορα κυτταρικά συστατικά, προθρομβωτικούς και ινολυτικούς παράγοντες, καθώς και τη δράση των αιμοπεταλιακών κυστιδίων, αποτελεί πεδίο διερεύνησης εδώ και δεκαετίες και φαίνεται ότι συντελούν στην υπερπηκτικότητα και τη θρόμβωση. Η έκθεση της PS στην εξωτερική μεμβράνη προάγει την προθρομβωτική δράση των MVs. Η αρνητικά φορτισμένη PS αλληλοεπιδρά με περιοχές προθρομβωτικών παραγόντων, πλούσιες σε γ-καρβοξυγλουταμινικό οξύ (Gla) παρουσία ασβεστίου, δρώντας ως τοποθεσίες δημιουργίας συμπλεγμάτων προθρομβινάσης.
- **Ανοσοτροποποίηση:** In vitro μελέτες δείχνουν ότι τα ερυθροκυτταρικά MVs που αναμινύονται με μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα), προκαλούν έκκριση προφλεγμονωδών χυμοκινών και κυτοκινών, οι οποίες αυξάνουν την επιβίωσή τους. [98]

4.1.1 Κλαστερίνη (sCLU, secretory clusterin)

Η εκκριτική απολιποπρωτεΐνη κλαστερίνη (sCLU), είναι μια ετεροδιμερής γλυκοπρωτεΐνη, μοριακού βάρους 75-80 kDa, που βρίσκεται στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων (τόσο ενδοκυττάρια όσο και εξωκυττάρια) και το κυτοσόλιο. Η δράση της εντοπίζεται σε ποικίλες φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η κυτταρική ωρίμανση, η μεταφορά λιπιδίων, η διαφοροποίηση, η γήρανση των φυσιολογικών και των στρεσαρισμένων ερυθροκυττάρων.

Η κλαστερίνη απομακρύνεται από τα ώριμα ερυθροκύτταρα, μέσω της κυστιδιοποίησης της μεμβράνης, μία διαδικασία που προστατεύει τα ερυθροκύτταρα, καθώς απομακρύνει καταστροφικά οξειδωτικά προϊόντα της αιμοσφαιρίνης, που παράγονται από αυξημένο οξειδωτικό στρες, πρωτεΐνες και άλλα μόρια που έχουν υποστεί βλάβη. Αποτελεί, επομένως, έναν αμυντικό μηχανισμό επιβίωσης του γηρασμένου ή/και στρεσαρισμένου ερυθροκυττάρου, που καθυστερεί την πρόωρη απομάκρυνσή του, αλλά και έναν βιοδείκτη γήρανσης και οξειδωτικού στρες.

Η κλαστερίνη που προέρχεται, είτε από το πλάσμα είτε από το κυτοσόλιο, μπορεί να αλληλοεπιδράσει με τη ζώνη-3, την πρωτεΐνη CD59, την αιμοσφαιρίνη, διάφορα οξειδωμένα μόρια και καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες, ώστε να απομακρύνει τα συστατικά που έχουν υποστεί βλάβη (εικ.12). [91], [101]



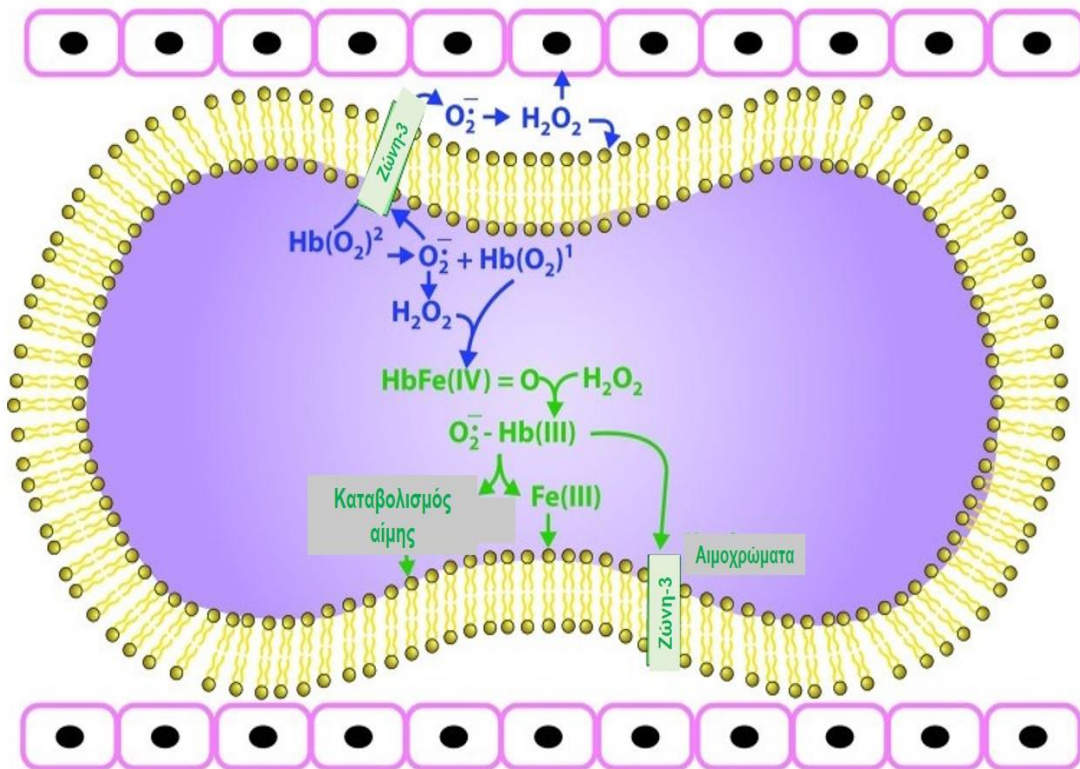
Εικόνα 12: Προτεινόμενο μοντέλο της εμπλοκής της κλαστερίνης στη μεμβρανική ακεραιότητα, τη γήρανση και την κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων. Η κλαστερίνη βρίσκεται και στις δύο πλευρές της μεμβράνης του πλάσματος, σε μη κυτταροσκελετικές περιοχές και το κυτοσόλιο. Ενδοκυττάρια, η κλαστερίνη ίσως προσδέεται στη ζώνη-3, την αιμοσφαιρίνη ή/και άλλες μεμβρανικές, μη κυτταροσκελετικές περιοχές. Εξωκυττάρια, η κλαστερίνη αλληλοεπιδρά με τη ζώνη-3, την πρωτεΐνη CD59 και ανοσοσφαιρίνες IgGs της μεμβράνης του πλάσματος, ώστε να απομακρύνει τα συστατικά που έχουν υποστεί βλάβη. Επομένως, συνδέεται με τις δομικές αλλαγές της μεμβράνης, που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση και το οξειδωτικό στρες. Ανατύπωση από: Antonelou, Marianna H et al. "Apolipoprotein J/clusterin in human erythrocytes is involved in the molecular process of defected material disposal during vesiculation." *PLoS one* vol. 6,10 (2011): e26033. [101]

4.2 Μονοπάτι γήρανσης μετατροπών ζώνης-3

Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη ζώνη-3, εκτός του δομικού και μεταφορικού λειτουργικού της ρόλου, συμμετέχει και στη διαδικασία απομάκρυνσης των ερυθροκυττάρων, μέσω της φαγοκυττάρωσης από τα μακροφάγα. Καθώς τα ερυθροκύτταρα αδυνατούν να συνθέσουν νέες πρωτεΐνες, τα σήματα που μαρκάρουν τα προς κάθαρση γηρασμένα ερυθροκύτταρα, πρέπει να δημιουργηθούν από τις ήδη υπάρχουσες πρωτεΐνες της μεμβράνης. Τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα πρέπει να υποστούν διάφορες τροποποιήσεις, οι οποίες τα καθιστούν διακριτά, σε σχέση με τα νεότερα κύτταρα. Ο οψωνισμός (κυτταρική επικάλυψη από ανοσολογικούς παράγοντες) από την ανοσοσφαιρίνη του ορού G (IgG) είναι απαραίτητη για την αναγνώριση των γηρασμένων ερυθροκυττάρων από τα μακροφάγα. Αυτά τα φυσιολογικά παραγόμενα IgG «αυτοαντισώματα» προσδένονται επιλεκτικά πάνω στη ζώνη-3 των γηρασμένων ερυθροκυττάρων.

Στα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα, η οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη αυτοοξειδώνεται για να σχηματίσει τη μεθαιμοσφαιρίνη και συνεχώς μετατρέπεται στη φυσιολογική μορφή της. Οποιαδήποτε αλλαγή σε αυτή την ισορροπία, αυξάνει την παραγωγή της μεθαιμοσφαιρίνης, που οδηγεί στον σχηματισμό αιμοχρωμάτων, σιδηρούχων παραγώγων αιμοσφαιρίνης, τα οποία δεν προσδένονται με οξυγόνο (εικ.13). [102] Τα αιμοχρώματα και η μεθαιμοσφαιρίνη συσσωρεύονται, προσδένονται στην αμινοτελική περιοχή της ζώνης-3, με συνέπεια τη συσσωμάτωση και της ζώνης-3. Επιπρόσθετα, τα IgGs σε ερυθροκύτταρα αυξημένης πυκνότητας, συνυπάρχουν με μεμβρανικά συσσωματώματα, που αποτελούνται από την πρωτεΐνη ζώνη-3, από αιμοχρώματα και τον πρωτεϊνικό παράγοντα του συστήματος συμπληρώματος C3. Για να επιτευχθεί η ερυθροφαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα, είναι απαραίτητοι και οι δύο ανοσολογικοί παράγοντες, τα anti-band3 αυτοαντισώματα και το συμπλήρωμα C3.

Πέρα από τη δράση των αυτοαντισωμάτων, τα ίδια τα ερυθροκύτταρα, μέσω της ζώνης-3, υφίστανται αλλαγές που προκαλούν τον οψωνισμό τους. Οι αλλαγές της ζώνης-3 περιλαμβάνουν την αποδόμηση ή πρωτεόλυση, την επιθετικού τρόπου τοπολογική αναδιαμόρφωση, την οξείδωση της πρωτεΐνης, τη διασταυρούμενη σύνδεση της κυτοσολικής αιμοσφαιρίνης και την πλευρική πρωτεϊνική αναδιανομή. [24]



Εικόνα 13: Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, που σχετίζονται με την αυξημένη αυτοοξειδωση της οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης πάνω στη μεμβράνη. Ο σχηματισμός σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου, οδηγούν στο σχηματισμό αιμοχρωμάτων και στη διάσπαση της αίμης που απελευθερώνει ελεύθερο σίδηρο και άλλα παράγωγα, τα οποία αλληλοεπιδρούν με τη ζώνη-3 και άλλες περιοχές της μεμβράνης. Η ανάστροφη οξυγόνωση απαιτεί τον σίδηρο της αίμης στην ανάγωγη, δισθενή του μορφή Fe(II), ο οποίος οξειδώνεται σχετικά γρήγορα σε τρισθενή Fe(III). Παρόλο που η οξείδωση δεν είναι τόσο γρήγορη, όταν ο σίδηρος συνδέεται με την πρωτεΐνη, υπόκειται συνεχείς οξειδώσεις, συμπεριλαμβανομένου και του οξυγόνου της αιμοσφαιρίνης, προς παραγωγή σουπεροξειδίου. Ανατύπωση από: Rifkind JM, Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013 Jun;18(17):2274-2283. [102]

4.3 Ομοιόσταση ιόντων Ca^{+2}

Οι αλλαγές στην ομοιόσταση του ασβεστίου (Ca^{+2}) είναι πιθανόν άλλο ένα μονοπάτι που σχετίζεται με τη γήρανση του ερυθροκυττάρου, είτε ως παράγοντας που προκαλεί την ωρίμανση, είτε ως συνέπεια αυτού. Η εισροή ασβεστίου σχετίζεται σαφώς με την οξειδωτική καταστροφή, την κυστιδιοποίηση, καθώς και τις αφυδατικές και παραμορφωτικές συνέπειες των γηρασμένων ερυθροκυττάρων. Επιπλέον, υπάρχει λειτουργική σχέση της εισροής ασβεστίου και των αποπτωτικών γεγονότων των ώριμων ερυθροκυττάρων. Το σύνολο των μονοπατιών που σχετίζονται με το ασβέστιο ως απόκριση σε στρες (οξειδωτικό ή ωσμωτικό) ονομάζεται ερυθρόπτωση. Έχουν αναφερθεί δύο τέτοια μονοπάτια: Ο σχηματισμός της προσταλαγδίνης E2, που οδηγεί στην ενεργοποίηση των καναλιών κατιόντων που επιτρέπουν την εισροή Ca^{+2} και η απελευθέρωση της φωσφολιπάσης A2 από τον αιμοπεταλιακό παράγοντα, που ενεργοποιεί τη σφιγγομυελινάση και τον σχηματισμό κεραμιδίου. Τα αυξημένα επίπεδα ενδοκυτταρικού Ca^{+2} και κεραμιδίου, οδηγούν στην εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης. Επιπρόσθετα, το ασβέστιο ενεργοποιεί τους

ιοντικούς διαύλους Ca^{2+} - K^{+} , με συνέπεια την απώλεια KCl και την κυτταρική συρρίκνωση. Επίσης, τα ιόντα Ca^{2+} διεγείρουν τη μ-καλπαϊνική τρανσγλουταμινάση-2 και ενίοτε τις κασπάσες, με αποτέλεσμα την απώλεια της μεμβρανικής ακεραιότητας, την παραμόρφωση και την κυστιδιοποίησή της. Τέλος, τα ιόντα Ca^{2+} διασπούν τη σημαντική αλληλοεπίδραση της φωσφοτυροσίνης φωσφατάσης με τη ζώνη-3. [90]

4.4 Ενεργοποίηση κασπασών

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα ακολουθούν παρόμοιο μονοπάτι προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, που στις περισσότερες περιπτώσεις, εξαρτάται από την ενεργοποίηση υψηλά συντηρημένων πρωτεασών, που καλούνται κασπάσες. Ενώ αποτελούν κύριοι μεσολαβητές για τις αποπτωτικές διαδικασίες στα εμπύρηννα κύτταρα, στα ερυθροκύτταρα η επονομαζόμενη ερυθρόπτωση, η οποία παρουσιάζει ομοιότητες με την απόπτωση, χρησιμοποιεί διαφορετικούς δρόμους, με δεδομένη την παρουσία των προκασπασών και την απουσία πυρήνα και μιτοχονδρίων.

Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, οι κασπάσες δρουν, είτε ως ενεργοποιητές που απαντούν σε προαποπτωτικά σήματα (κασπάση-8, κασπάση-9), είτε ως τελεστές (κασπάση-3) που καταστρέφουν ζωτικές πρωτεΐνες, προκαλώντας αποπτωτικό φαινότυπο στο κύτταρο. Τα ώριμα ερυθροκύτταρα περιέχουν τις κασπάσες -3 και -8.

Η ενεργοποίηση των κασπασών προκαλείται από δύο σηματοδοτικά μονοπάτια στα κύτταρα. Καταρχάς το μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου, όπως του υποδοχέα $CD95$, αρχίζει με τον ολιγομερισμό από τον προσδέτη του, ο οποίος συνδέει την πρωτεΐνη $FAAD$ στο σύμπλοκο. Η $FAAD$ συνδέεται με τις προκασπάσες του ερυθροκυττάρου, που ενεργοποιούν την αυτοπρωτεόλυση. Το δεύτερο αποπτωτικό μονοπάτι, ενεργοποιείται από το κυτόχρωμα c , το οποίο απελευθερώνουν τα μιτοχόνδρια και αφορά τα εμπύρηννα κύτταρα. [103]

Η κασπάση-3 είναι πιθανό να ασκεί φυσιολογικό ρόλο στα ερυθροκύτταρα, με την παρουσία της να είναι ιδιαίτερα έντονη στα πολύ ώριμα πυκνά ερυθροκύτταρα, σε σχέση με τα νεότερα. Η κασπάση-3, καταλύει την πρωτεόλυση του αμινοτελικού άκρου της ζώνης-3, με πιθανό αποτέλεσμα την απώλεια της ακεραιότητας του ερυθροκυττάρου. Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμες συνέπειες, όπως η διάρρηξη της λιπιδικής διπλοστοιβάδας από τον κυτταροσκελετό και τροποποιήσεις στο μεταβολισμό της γλυκόζης. [104]

4.5 Γήρανση και οξειδωτικό στρες

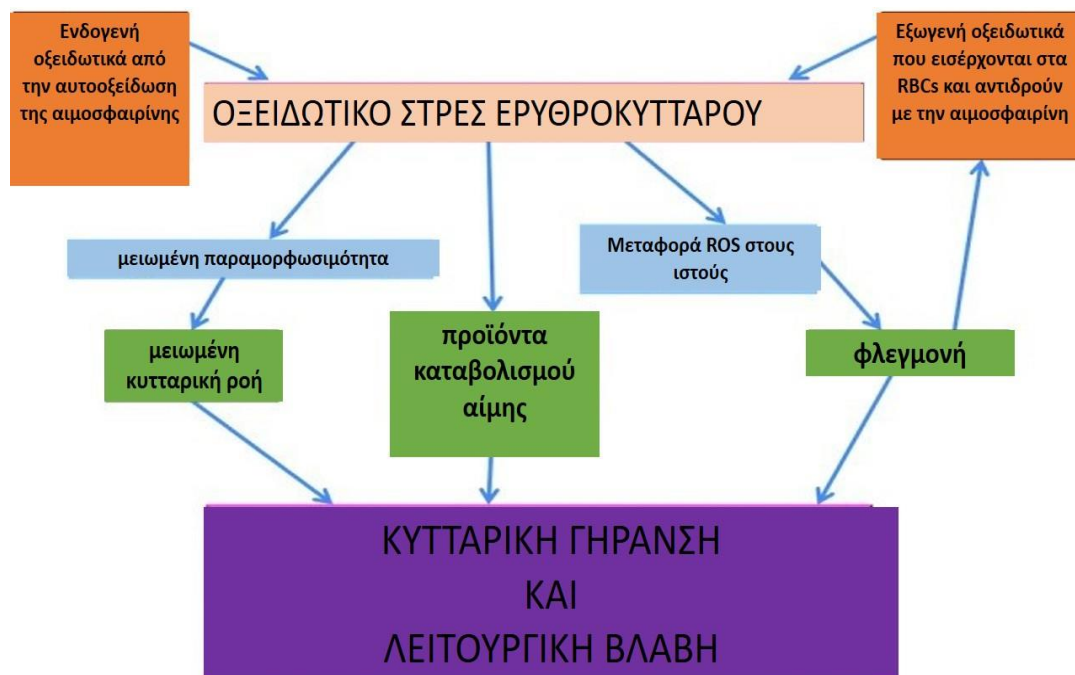
Όπως ήδη αναφέρθηκε, πολλές από τις διαδικασίες που οδηγούν στη γήρανση του ερυθροκυττάρου, σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (ομοιόσταση ασβεστίου, ενεργοποίηση της κασπάσης-3, εξωτερίκευση νεοαντιγόνου πάνω στη ζώνη-3 και συσσωμάτωση της ζώνης-3). Ο ρόλος του, συνεπώς, είναι ύψιστης σημασίας στη διαδικασία της γήρανσης και σχετίζεται άμεσα με την αιμοσφαιρίνη. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, που παράγονται από τις αντιδράσεις της αιμοσφαιρίνης και από τις αλληλοεπιδράσεις της με τις διαμεμβρανικές

και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, προκαλούν οξειδωτικό στρες και σχετίζονται άμεσα με τη γήρανση του ερυθροκυττάρου.

Πιο συγκεκριμένα, η μεταφορά του οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη, προϋποθέτει την ανάστροφη πρόσδεσή του στο μόριο της αιμοσφαιρίνης, με τον σίδηρο της αίμης να βρίσκεται στη δισθενή ανάγωγη μορφή του. Παρόλα αυτά, ο δισθενής σίδηρος της αιμοσφαιρίνης μπορεί να οξειδωθεί εύκολα σε τρισθενή, σε σχετικά αργούς ρυθμούς, παράγοντας υπεροξείδιο, το οποίο καταλύεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Η αντίδραση αυτή, μπορεί να επιταχυνθεί ραγδαία σε καταστάσεις υποξίας και έτσι, μέσω της πρόσδεσής του στην αιμοσφαιρίνη, να βρεθεί σε μεγάλες ποσότητες στη μικροκυκλοφορία, από όπου αλληλοεπιδρούν και με άλλα κυτταρικά συστατικά. Η μεθαιμοσφαιρίνη που προσδέεται με τον τρισθενή σίδηρο, δεν μεταφέρει οξυγόνο. Για να γίνει λειτουργική και πάλι η αιμοσφαιρίνη, ο τρισθενής σίδηρος ανάγεται σε δισθενή. Η ποσότητα μεθαιμοσφαιρίνης που παραμένει, αποδεσμεύει την αίμη σε ελεύθερη αιμίνη, η οποία αλληλοεπιδρά με τις σκελετικές πρωτεΐνες και τα λιπίδια της μεμβράνης, παράγοντας λιποφιλικές δραστικές ρίζες. Μάλιστα, παρουσία H_2O_2 , προκαλεί υπεροξείδωση των λιπιδίων. Η αντιοξειδωτική γλουταθειόνη των ερυθροκυττάρων, ενεργεί προς καταστροφή της αιμίνης.

Εκτός της αυτοοξειδωσης της αιμοσφαιρίνης (εικ.13), τα ερυθροκύτταρα εκτίθενται συνεχώς σε διάφορα οξειδωτικά παράγωγα και εκτός του κυττάρου, τα οποία προσλαμβάνει και στη συνέχεια αυτά αντιδρούν με την αιμοσφαιρίνη (εικ.14). [102]

Επιπρόσθετα, τα ερυθροκύτταρα εκτίθενται σε μονοξείδιο του αζώτου (NO) και άλλα νιτρώδη, τα οποία δημιουργούν νέο κύκλο οξειδωτικών αντιδράσεων και παραγωγή ενεργών ριζών αζώτου (RNS – Reactive Nitrogen Species). Το NO αντιδρά ταχύτατα με την οξυαιμοσφαιρίνη προς παραγωγή νιτρωδών και μεθαιμοσφαιρίνης. Μάλιστα, παρουσία H_2O_2 που έχει προέλθει από την αυτοοξειδωση της αιμοσφαιρίνης, ενεργοποιείται ακόμα πιο γρήγορα αυτή η παραγωγή, με αποτέλεσμα την καταστροφή των δομικών τμημάτων του ερυθροκυττάρου και τον πρόωρο θάνατό του. [102]

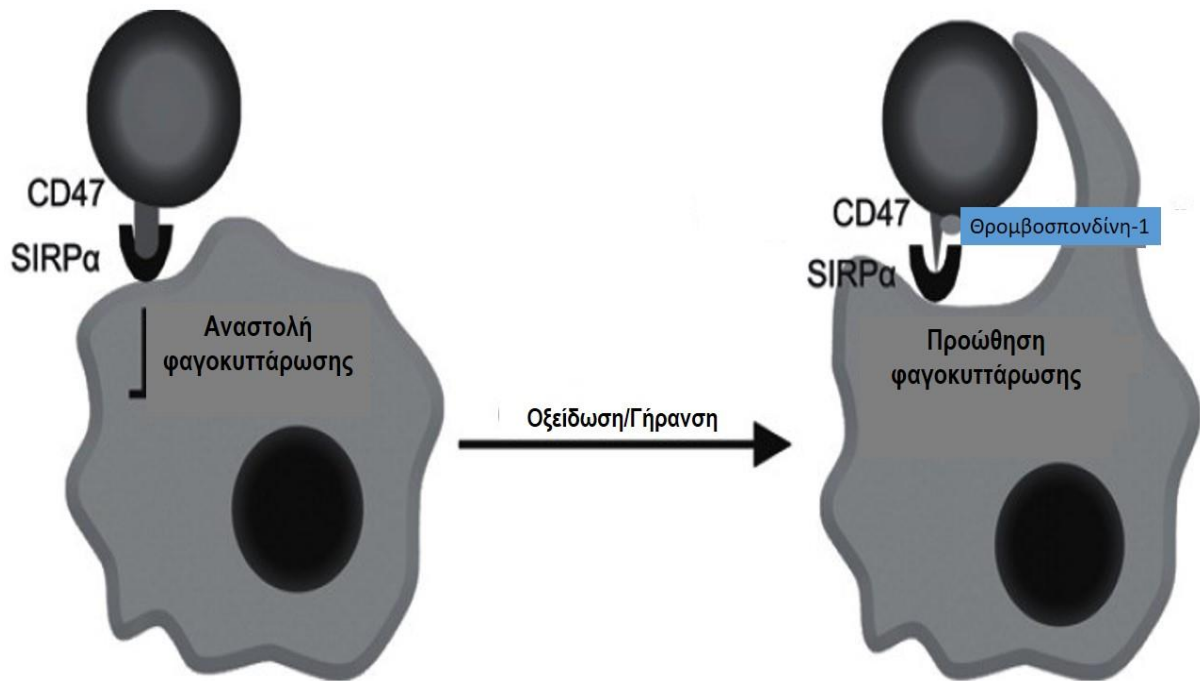


Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση που παρουσιάζει τις δύο οδούς που παράγουν οξειδωτικό στρες στα ερυθροκύτταρα: την ενδογενή αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης και την παρουσία των εξωγενών οξειδωτικών, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα, την κυτταρική γήρανση και τη λειτουργική βλάβη στο ερυθροκύτταρο. Το εκτενές αντιοξειδωτικό σύστημα, είναι σχεδιασμένο, ώστε να ουδετεροποιεί τις επικίνδυνες ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), που παράγονται ως αποτέλεσμα στις συνεχείς οξειδωτικές εκθέσεις. Ανατύπωση από: Rifkind JM, Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(17):2274-2283. doi:10.1089/ars.2012.4867. [102]

4.6 Γήρανση και CD47

Η πρωτεΐνη CD47 είναι άλλο ένα μόριο που εμπλέκεται στη διαδικασία της γήρανσης του ερυθροκυττάρου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πρωτεΐνη CD47 θεωρείται «δείκτης εαυτού» για τα ερυθροκύτταρα (“don’t eat me signal”), αλλά τα τελευταία χρόνια πολλές έρευνες δείχνουν τη συμμετοχή της στην πρόκληση σήματος για φαγοκυττάρωση (“eat me signal”). Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η CD47 μπορεί να υποστεί αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσής της, τόσο στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα όσο και σε συνθήκες στρες. Η τροποποιημένη αυτή μορφή, συνδέεται με τον υποδοχέα SIRPα και το σύμπλοκο που σχηματίζεται συνδέεται με τη θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1) του πλάσματος, αποτελώντας πλέον, σήμα εκκαθάρισης από τα φαγοκύτταρα (εικ.15). [105]

Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί που οδηγούν σε στερεοδιαμορφωτικές αλλαγές της πρωτεΐνης. Πρώτον, οι ποικίλες αλλαγές που προκαλούνται στη ζώνη-3 εξαιτίας της γήρανσης, θα μπορούσαν να επηρεάσουν και τη CD47, καθώς η πρωτεΐνη αποτελεί συστατικό του μακροσυμπλόκου της ζώνης-3. Δεύτερον, η CD47 υφίσταται απευθείας αλλαγές λόγω γήρανσης και οξείδωσης. [105]



Εικόνα 15: Συμμετοχή της πρωτεΐνης CD47 στην ερυθροφαγοκυττάρωση λόγω γήρανσης και οξείδωσης. Η οξείδωση και η γήρανση προκαλούν διαμορφωτική αλλαγή στην πρωτεΐνη CD47, πάνω στην οποία προσδέεται η TSP-1. Σε φυσιολογικές καταστάσεις, η CD47 αλληλοσπειδρά με τον υποδοχέα SIRPα και εμποδίζει τη φαγοκυττάρωση, ενώ μετά τη διαμορφωτική αλλαγή, η TSP-1 μπορεί να συνδεθεί με το σύμπλοκο CD47-SIRPα και να προκαλέσει φαγοκυττάρωση. Ανατύπωση από: Burger et al., *CD47 in Erythrocyte Ageing and Clearance – the Dutch Point of View. Transfus Med Hemother.* 2012 Oct; 39(5): 348–352. [105]

5. Ερυθρόπτωση

Τα ερυθροκύτταρα, όταν φτάσουν κοντά στο τέλος της ζωής τους, υπόκεινται σε μία μορφή κυτταρικού θανάτου, που ονομάζεται ερυθρόπτωση. Αυτός ο τύπος κυτταρικού θανάτου μπορεί να προκληθεί, είτε από τραυματισμό, είτε από μία ποικιλία παραγόντων, που περιλαμβάνουν την υπεροσμωτικότητα, το οξειδωτικό στρες, τη μείωση ενέργειας, την έκθεση μετάλλων, ξενοβιοτικά και αντιβιοτικά που χορηγούνται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Τα ώριμα ερυθροκύτταρα, εξαιτίας της έλλειψης πυρήνα και μιτοχονδρίων δεν ακολουθούν τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), αλλά μία ταχεία διαδικασία αυτοκαταστροφής, η οποία παρουσιάζει κάποια κοινά χαρακτηριστικά με την απόπτωση, όπως η κυτταρική συρρίκνωση, η κυστιδιοποίηση της μεμβράνης και η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης πάνω στη μεμβράνη του ερυθροκυττάρου.

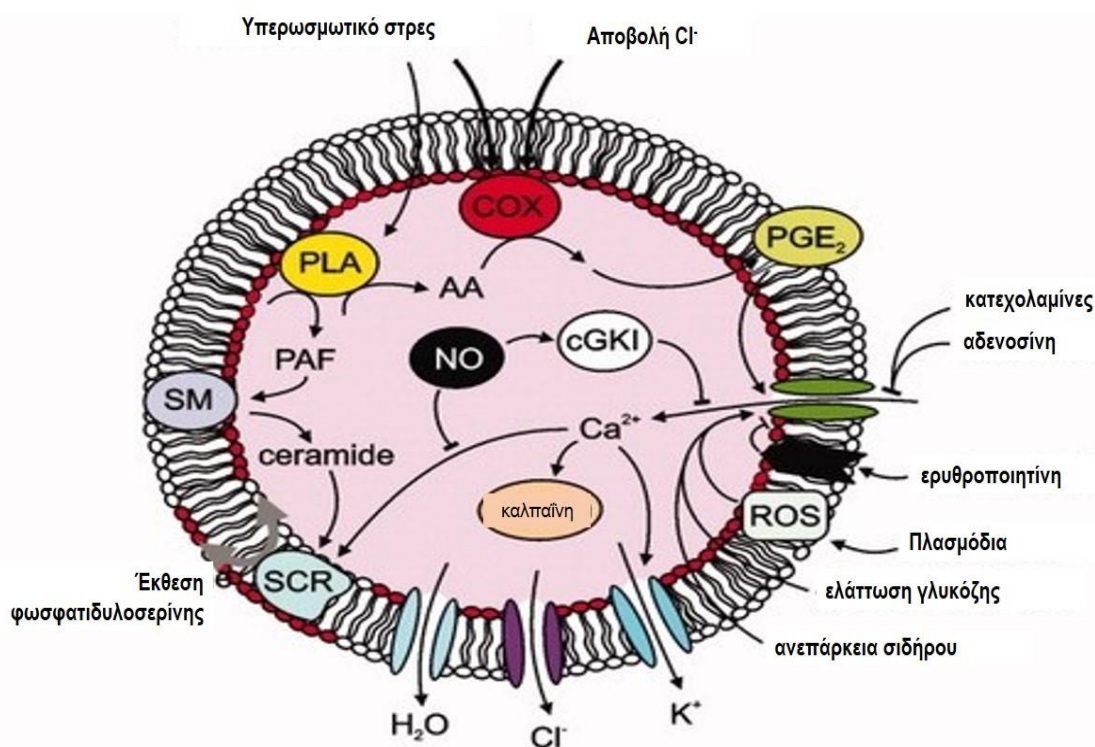
Η ρύθμιση της ερυθρόπτωσης είναι ιδιαίτερα σύνθετη και εμπλέκει μια ποικιλία κυτταρικών μηχανισμών, ενεργοποιητών, αναστολέων και νόσων στον μηχανισμό της. Προκαλείται αρχικά από αύξηση των επιπέδων των ιόντων του κυτταρικού ασβεστίου (Ca^{+2}) κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες και του ωσμωτικού σοκ, μετά τον σχηματισμό της προσταλαγδίνης E2 (PGE2). Ενεργό ρόλο στη διαδικασία θανάτου μπορεί να προκαλέσει και ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Platelet-activating Factor - PAF), ο

ο οποίος ενεργοποιεί τη σφιγγομυελινάση, που οδηγεί με τη σειρά της στο σχηματισμό κεραμιδίου. Η αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου και η παρουσία του κεραμιδίου, οδηγούν σε αναδιάταξη της μεμβράνης και εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης. Οι μηχανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν ερυθρόπτωση, συνοψίζονται στους εξής (εικ.16) [106]:

- **Οξειδωτικό στρες και υπεροσμωτικότητα:** Το οξειδωτικό στρες και η υπεροσμωτικότητα ενεργοποιούν τα κανάλια που επιτρέπουν τη διαπερατότητα των κατιόντων Ca^{+2} και των ανιόντων Cl^- . Η απώλεια ανιόντων Cl^- ενεργοποιεί την απελευθέρωση της προσταλαγδίνης E2 (PGE2), η οποία με τη σειρά της είναι υπεύθυνη για την αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, που προκαλεί την ερυθρόπτωση. Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί τις κασπάσες, που προκαλούν την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης, με συνέπεια την αναγνώριση των ερυθροκυττάρων από τα μακροφάγα. Η υπεροσμωτικότητα δεν επηρεάζει την ενεργοποίηση των κασπασών.
- **Μείωση της ενέργειας:** Η αναπλήρωση της γλουταθειόνης είναι προβληματική όταν ελαττώνεται η ενέργεια, με συνέπεια την ταυτόχρονη μείωση και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ερυθροκυττάρου. Η ενεργειακή απώλεια οδηγεί επίσης στην ενεργοποίηση των καναλιών που επιτρέπουν τα ιόντα Ca^{+2} στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, τον σχηματισμό της PGE2 και την ερυθρόπτωση. Επιπλέον μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών της μεμβράνης, που οδηγούν σε εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και συρρίκνωση του κυττάρου. Η PKC προκαλεί και απευθείας αύξηση των ενδοκυτταρικών ιόντων ασβεστίου, άρα και ερυθρόπτωση.
- **α-λιποϊκό οξύ:** Το α-λιποϊκό οξύ μπορεί να προκαλέσει ερυθρόπτωση, καθώς ενεργοποιεί την κασπάση-3. Σε αντίθεση με αυτό, έχει και αντιοξειδωτική δράση στα ερυθροκύτταρα, καθώς η παρουσία του απενεργοποιεί την έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης στα ερυθροκύτταρα, που σημαίνει ότι μόνο οι αυξημένες ποσότητες α-λιποϊκού οξέος μπορούν να προκαλέσουν ερυθρόπτωση.
- **Κάδμιο:** Η δηλητηρίαση από κάδμιο συμβάλλει στην ερυθρόπτωση αυξάνοντας τα ενδοκυττάρια επίπεδα ιόντων ασβεστίου και μειώνοντας τα επίπεδα K^+ , με αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του ερυθροκυττάρου. Γι' αυτό το λόγο, οι ασθενείς που δηλητηριάζονται με κάδμιο παρουσιάζουν αναιμία.
- **Anti-A IgG αντισώματα:** Η εισροή ιόντων Ca^{+2} μπορεί να προκληθεί και από τα anti-A IgG αντισώματα, με αποτέλεσμα την κάθαρση των τραυματισμένων ερυθροκυττάρων. Αυτό εξηγεί και την απάντηση του ανοσολογικού συστήματος στο αντιγόνο A σε αυτοάνοσα νοσήματα και σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης μυελού των οστών.

Επομένως γίνεται αντιληπτό, ότι τα ερυθροκύτταρα είναι πολύ πιο ευάλωτα από ότι θεωρούνταν παλαιότερα, παρόλο που εισέρχονται σε υπερωσμωτικό περιβάλλον στους νεφρούς και υπόκεινται συνεχώς σε οξειδωτικό στρες στους πνεύμονες. Η παρουσία κάθε ξένης ουσίας στο αίμα, έχει τη δυνατότητα να τραυματίσει τα ερυθροκύτταρα και να προκαλέσει ερυθρόπτωση.

Αναστολείς της ερυθρόπτωσης θεωρούνται ουσίες που ρυθμίζουν αρνητικά τα κανάλια ασβεστίου, όπως η ερυθροποιητίνη, οι κατεχολαμίνες και η θυμόλη. Η αναστολή της ερυθρόπτωσης είναι σημαντική για συγκεκριμένες νόσους όπου οι ερυπρωτικοί μηχανισμοί είναι προφανείς, όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία και η μαλάρια.



Εικόνα 16: Η σηματοδότηση της ερυθρόπτωσης. Οι μηχανισμοί που περιλαμβάνονται στην ενεργοποίηση και την αναστολή της εισόδου των ιόντων Ca^{+2} και ο σχηματισμός κεραμιδίου, που οδηγεί σε αλλαγή του κυτταρικού όγκου, εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και ενεργοποίηση των καλπαϊνών, οι οποίες αποδομούν τον κυτταροσκελετό, προκαλώντας κυστιδιοποίηση. cGKI, cGMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση τύπου I; COX, κυκλοοξυγενάση; NO, οξείδιο του αζώτου; PAF, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων; PGE₂, προσταλαγδίνη E₂; PLA, φωσφολιπάση A₂; ROS, ενεργές ρίζες οξυγόνου; SCR, σκραμπλάση. Ανατύπωση από: Föller, M., Huber, S.M. and Lang, F. (2008), Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life*, 60: 661-668. [106]

Η ερυθρόπτωση μπορεί να λειτουργήσει επιπλέον ως προστατευτικός μηχανισμός σε κάποιες περιπτώσεις, διότι μέσω αυτής της οδού, το κύτταρο αποφεύγει την αιμόλυση. Η αιμόλυση τραυματισμένων ή κατεστραμμένων ερυθροκυττάρων απελευθερώνει το περιεχόμενό τους, την αιμοσφαιρίνη στην κυκλοφορία, που μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική ανεπάρκεια. Επιπλέον, αποτελεί τον μηχανισμό που απομακρύνει από την κυκλοφορία

τραυματισμένα ή παθολογικά ερυθροκύτταρα συγκεκριμένων νοσημάτων, όπως τα δρεπανοκύτταρα, που εξαιτίας του σχήματός τους, μπορούν να φράξουν τα αγγεία. Όπως γίνεται αντιληπτό, η ομοιότητα μεταξύ ερυθροπρωτικών και αντιερυθροπρωτικών μηχανισμών είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του αριθμού των ερυθροκυττάρων σε φυσιολογικά επίπεδα, ώστε να παρεμποδιστούν οι συνέπειες που μπορεί να οδηγήσουν σε αναιμία. [107], [106], [108]

6. Οξειδωτικό στρες

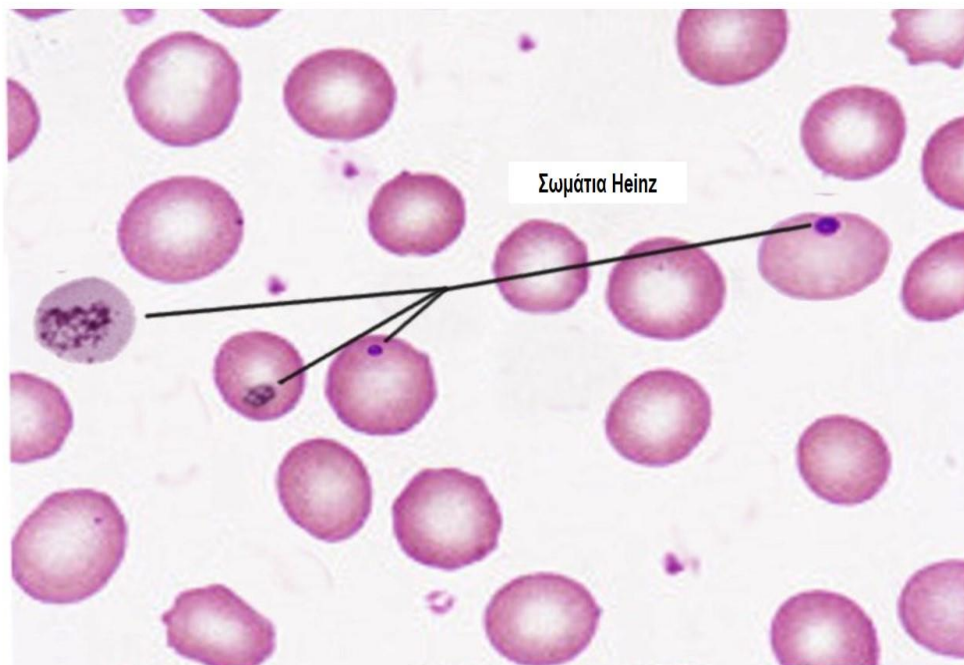
Όλα τα κύτταρα που ζουν σε αερόβιες συνθήκες εκτίθενται συνεχώς σε ένα μεγάλο αριθμό οξειδωτικών, που προέρχονται είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς πηγές, τα οποία καλούνται δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS - Reactive Oxygen Species). Ο όρος «οξειδωτικό στρες» αναφέρεται ως η επαυξημένη παραγωγή και/ή η χαμηλή ελάττωση των ROS, οι οποίες επηρεάζουν κύρια κυτταρικά συστατικά, όπως νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και πρωτεΐνες. Η ισορροπία μεταξύ αποβολής και παραγωγής των ενδοκυττάρων ROS αναφέρεται ως «οξειδοαναγωγική κατάσταση» (redox state). Σε φυσιολογικές καταστάσεις παράγονται οξειδωτικά, που παίζουν καθοριστικό ρόλο σε μία ποικιλία σηματοδοτικών μονοπατιών, που ρυθμίζουν τη μετανάστευση, την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Μάλιστα, οι ελεύθερες ρίζες σε χαμηλά επίπεδα θεωρούνται ωφέλιμες, καθώς καταπολεμούν τους καρκινικούς όγκους, ιούς και διάφορα παθογόνα. Γενικά, οι ελεύθερες ρίζες ομαδοποιούνται σε ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS), αζώτου (RNS) και καρβονυλίων (RCS). Τα ROS παράγονται σε διάφορα σημεία, όπως το κυτταρόπλασμα, εξωκυττάρια υγρά (π.χ. στο πλάσμα), στα μιτοχόνδρια (κυρίως), τα ενδοσώματα και εξωσώματα κ.α. Τα νεοπαραγόμενα ROS μεταφέρονται μέσω καναλιών και κυστιδίων. [109] Το οξειδωτικό στρες θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη αρκετών νόσων, όπως ο διαβήτης, ο καρκίνος, καρδιαγγειακές και νευρολογικές νόσοι, αιματολογικές κ.α. [110]

Το ερυθροκύτταρο είναι πολύ ευάλωτο στην οξειδωτική καταστροφή, εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων οξυγόνου και αιμοσφαιρίνης, ισχυρού προαγωγού του οξειδωτικού στρες. Συνιστούν ένα είδος το κυττάρων που προσβάλλονται άμεσα σε δυσμενείς καταστάσεις. Μεγάλος αριθμός in vitro και in vivo μελετών έχουν δείξει ότι πολλές ερυθροκυτταρικές παράμετροι επηρεάζονται αρνητικά από το αυξημένο οξειδωτικό στρες, όπως η απενεργοποίηση των μεμβρανικών υποδοχέων και ενζύμων, ιοντικές παράμετροι, αυξημένη οξείδωση της γλουταθειώνης (GSH), πρωτεϊνών και λιπιδίων. Εξαιτίας της σημαντικότητάς τους, κάθε ανωμαλία στα ερυθροκύτταρα ενέχει δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό. [110]

6.1 Οξείδωση της αιμοσφαιρίνης

Η αιμοσφαιρίνη, η κύρια πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου, βρίσκεται πυκνά πακεταρισμένη στο κυτοσόλιο και συνιστά περίπου το 90% του βάρους του. Παρόλο το αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό σύστημα που κατέχει το ερυθροκύτταρο, ο δυσμενής σίδηρος της αιμοσφαιρίνης εκτίθεται σε συνεχείς υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου και

υφίσταται αργή οξείδωση προς παραγωγή μεθαιμοσφαιρίνης. Η μεθαιμοσφαιρίνη δεν μπορεί να προσδέσει οξυγόνο, ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες συνιστά λιγότερο από το 1% του συνόλου της αιμοσφαιρίνης. Σε καταστάσεις υψηλού στρες το ποσοστό της αυξάνεται ραγδαία. Η οξείδωση της αιμοσφαιρίνης επίσης προκαλεί τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των σφαιρινών, τροποποιώντας τη δομή του μορίου, οδηγώντας στον σχηματισμό ορατών μετουσιασμένων ιζημάτων αιμοσφαιρίνης, γνωστά ως σωματίδια Heinz (εικ.17). [111] Σε χαμηλού βαθμού οξειδώσεις, αυτά τα σωματίδια μπορούν να φαγοκυτταρωθούν από τα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, αλλά σε υψηλό στρες μπορούν να προκαλέσουν αιμόλυση. Σε κατάσταση υπεργλυκαιμίας, γίνεται οξειδωτική αλληλοεπίδραση μεταξύ της αιμοσφαιρίνης και της γλυκόζης προς παραγωγή της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c), η οποία αποτελεί έναν δείκτη που συσχετίζει την οξείδωση με τη γλυκοζυλίωση στους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. [110]



Εικόνα 17: Σωματίδια Heinz (Heinz bodies) (έγκλειστα αιμοσφαιρίνης).

Μικρά, ορατά, ακανόνιστα σωματίδια μετουσιωμένης αιμοσφαιρίνης, εντός των ώριμων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η παρουσία τους σε ένα δείγμα είναι αποτέλεσμα της παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου και δείχνει ανώμαλη δομή της αιμοσφαιρίνης. Στο μικροσκόπιο φαίνονται σαν μικρές, σκούρες, στρογγυλές, βασεόφιλες μάζες. Συνήθως βρίσκονται κοντά στο εσωτερικό της μεμβράνης. Ανατύπωση από: Herman TF, Javaid MU. Heinz Body.mStatPearls Publishing; 2022. [111]

6.2 Οξείδωση μεμβρανικών πρωτεϊνών

Εκτός από την αιμοσφαιρίνη, τα ROS μπορούν να επηρεάσουν και άλλες πρωτεΐνες (διαμεμβρανικές και κυτταροσκελετικές), καθώς αποτελούν εύκολοι στόχοι. Τα ROS μπορούν να οδηγήσουν σε οξείδωση των αμινοξέων των πλευρικών αλυσίδων, στον

σχηματισμό συνδέσεων μεταξύ πρωτεϊνών και στην οξειδωση του πρωτεϊνικού σκελετού, με αποτέλεσμα τη διάσπασή τους και την παραγωγή πολλών οξειδωμένων πρωτεϊνικών προϊόντων. Επιπλέον, η πρωτεΐνη 4.1 παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα να συνδεθεί με τη σπεκτρίνη, καθώς και να συνδέσει τη σπεκτρίνη με την ακτίνη. Ειδικά η σπεκτρίνη, αποτελεί κύριο στόχο των ROS, με αποτέλεσμα την αδυναμία της σύνδεσής της με άλλες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, που οδηγεί σε ασταθείς συνδέσεις του κυτταροσκελετού με τη μεμβράνη και επομένως σε αυξημένη ευθραυστότητα. Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα αθροίσματα της α-σφαιρίνης μπορούν να οξειδωθούν εύκολα και να εντοπιστούν πάνω στις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες.

Τα αιμοχρώματα παρουσιάζουν δυνατή έλξη για την κυτταροπλασματική περιοχή της ζώνης-3. Οι κινάσες τυροσίνης ενεργοποιούνται από το οξειδωτικό στρες και φωσφορυλιώνουν την κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα την κυστιδιοποίησή της και την αποκοπή της από τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα του κυτταροσκελετού.

Παρόλο που τα ROS καταστρέφουν πολλά κυτταρικά συστατικά, η καταστροφή των πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα επιβλαβής για το ερυθροκύτταρο, καθώς αποτελούν συστατικά που δεν μπορούν να αντικατασταθούν. Η οξειδωση αμινοξέων σε ενεργά σημεία ενός ενζύμου, για παράδειγμα, οδηγεί στην απενεργοποίησή του. Γι' αυτό η οξειδοαναγωγική κατάσταση των πρωτεϊνών, είναι ύψιστης σημασίας για τις λειτουργίες του κυττάρου, ενώ οι δομικές αλλαγές στις πρωτεΐνες θεωρούνται από εκείνους τους μοριακούς μηχανισμούς που μπορούν να οδηγήσουν σε παθολογικές καταστάσεις. Ιδιαίτερα τα καρβονυλιωμένα πρωτεϊνικά παράγωγα, θεωρούνται γενετικοί δείκτες πρωτεϊνικής βλάβης από τα ROS σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, εξαιτίας της σταθερότητας και της πρώιμης παραγωγής τους. [110], [112]

6.2.2 Καρβονυλίωση πρωτεϊνών

Η καρβονυλίωση είναι μία μη αναστρέψιμη, μη ενζυματική τροποποίηση των πρωτεϊνών. Οι καρβονυλικές ομάδες εισάγονται στις πρωτεΐνες από διάφορα οξειδωτικά μονοπάτια. Τα ROS μπορούν να δράσουν είτε άμεσα απ' ευθείας στις πρωτεΐνες ή μπορούν να δράσουν με άλλα μόρια, όπως σάκχαρα και λιπίδια, τα παράγωγα των οποίων (δραστικές καρβονυλιακές ρίζες - RCS) αντιδρούν τελικά με τις πρωτεΐνες. Η άμεση οξειδωση των πρωτεϊνών από τα ROS παράγει ιδιαίτερα δραστικά προϊόντα, είτε μέσω της οξειδωσης των πλευρικών αλυσίδων, είτε από διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών, είτε από το μονοπάτι της α-αμιδίωσης ή από οξειδωση των γλουταμυλο-πλευρικών αλυσίδων, όπου το πεπτίδιο αδρανοποιείται στα αμινοξέα της αμινοτελικής περιοχής από ένα παράγωγο α-κετοακυλίου. Ο έμμεσος μηχανισμός καρβονυλίωσης πρωτεϊνών, περιλαμβάνει καρβονυλίωση κυρίως της λυσίνης με δραστικά καρβονυλιακά παράγωγα αναγωγής σακχάρων ή των προϊόντων οξειδωσής τους. Αυτή η διαδικασία καρβονυλίων ονομάζεται γλυκοξείδωση (παραγωγή AEGs – Advanced Glycation End products). Τέλος, ο έμμεσος μηχανισμός περιλαμβάνει τα παράγωγα οξειδωμένων λιπιδίων, τα οποία προέρχονται από την οξειδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως η μαλονδυαλδεϋδη (MDA) (λιποξείδωση και παραγωγή ALEs – Advanced Lipoxidation End products). [113], [114]

6.3 Υπεροξειδωση λιπιδίων

Η πλασματική μεμβράνη των ερυθροκυττάρων είναι πλούσια σε αλυσίδες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA – Polyunsaturated Fatty Acid), τα οποία είναι πολύ ευαίσθητα στην οξειδωση. Η επίθεση των ROS προκαλεί υπεροξειδωση λιπιδίων, που οδηγεί στον σχηματισμό βλαβερών προϊόντων. Η μαλονδυαλδεΰδη (MDA) αποτελεί το κύριο προϊόν λιπιδικής υπεροξειδωσης. Το MDA αντιδρά με ελεύθερες αμινομάδες από νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια και αμινοξέα. Η δραστηριότητά του μπορεί να οδηγήσει σε διαμοριακές γεφυρώσεις και αλληλοεπιδράσεις στη μεμβράνη, που μπορεί να οδηγήσουν σε ακαμψία του ερυθροκυττάρου, ακόμα και παγίδευσή του στο σπλήνα. [115], [110]

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων ακολουθεί τρεις μηχανισμούς: την οξειδωση από τις ελεύθερες ρίζες, τη μη ενζυματική οξειδωση και την ενζυματική. Τα PUFA και η χοληστερόλη οξειδώνονται από τα ενζυματικά και τα μη ενζυματικά μονοπάτια.

Τέλος, έχει αναφερθεί ότι η υπεροξειδωση συγκεκριμένων λιπιδίων τροποποιεί διάφορες λειτουργίες in vivo, όπως τη ρύθμιση έκφρασης γονιδίων, τη σηματοδότηση, την ενεργοποίηση υποδοχέων κ.α., που μπορούν να οδηγήσουν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, καρδιολογικές και νευρολογικές ασθένειες, η γήρανση κτλ. [116]

6.4 Αντιοξειδωτικά συστήματα ερυθροκυττάρων

Στα ερυθροκύτταρα ανευρίσκονται υψηλά επίπεδα κυτταροπλασματικών αντιοξειδωτικών, ενζυμικά και μη ενζυμικά. Και τα δύο είδη αντιοξειδωτικών δρουν ενάντια στα ROS για την προστασία του ερυθροκυττάρου από τη δηλητηριώδη επίδραση του οξειδωτικού στρες.

6.4.1 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστατικά

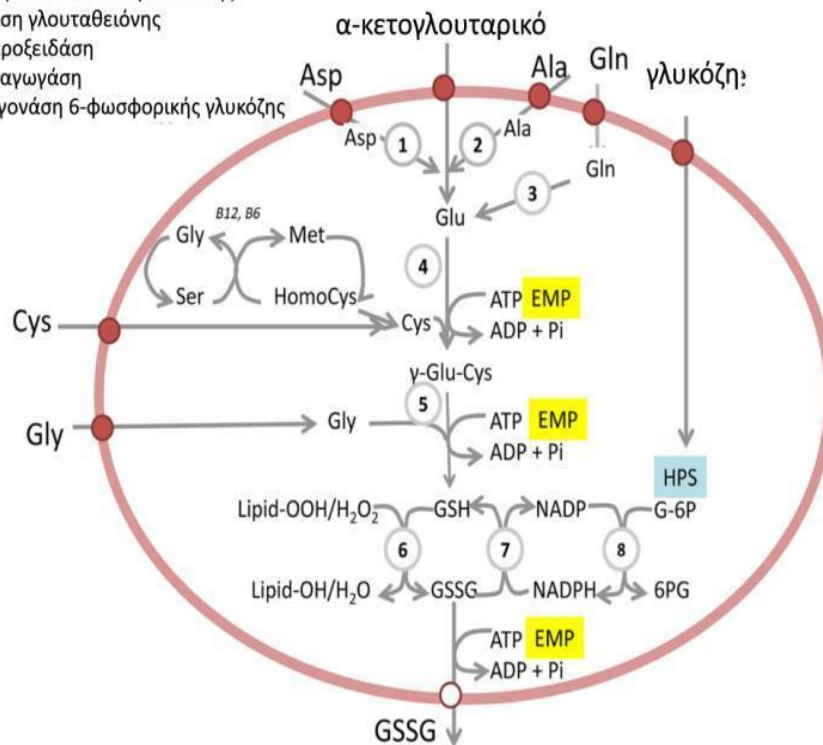
Τα κύρια ενδογενή μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), το ασκορβικό οξύ (ASC), η α-τοκοφερόλη και άλλες θειολικές ομάδες.

- **α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E):** είναι μία λιποφιλική βιταμίνη που δρα ενάντια στα ROS, σπάζοντας τις ρίζες υπεροξυλίου και προστατεύοντας τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων από την υπεροξειδωση, διατηρώντας την ακεραιότητά της. Στην χρόνια αιμολυτική αναιμία, όπου υπάρχει υπέρμετρη οξειδωτική καταστροφή στα ερυθροκύτταρα, έχουν παρατηρηθεί σημαντικά μειωμένα επίπεδα βιταμίνης E. Πολλές έρευνες δείχνουν ότι η θεραπευτική χορήγησή της σε αιματολογικές νόσους όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία, μειώνει σημαντικά την παραμόρφωση των ερυθροκυττάρων, μειώνει την ωσμωτική ευθραυστότητα και την αιμόλυση, αυξάνοντας συγχρόνως τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης. [117]
- **Ασκορβικό οξύ (ASC) (βιταμίνη C):** αποτελεί βασικό κυτταρικό αντιοξειδωτικό, καθώς προστατεύει τη μεμβράνη και άλλα υδρόφοβα

συστατικά του κυττάρου από την οξειδωτική καταστροφή, επαναφέροντας την α-τοκοφερόλη από την οξειδωμένη, στην ανηγμένη λειτουργική μορφή της. Σε διαβητικούς ασθενείς καθώς και σε ασθενείς με υδρωπικία, έχουν αναφερθεί μειωμένα επίπεδα ασκορβικού οξέος και α-τοκοφερόλης. [110] Τέλος το ασκορβικό προστατεύει την αιμοσφαιρίνη από την αυτοοξείδωση, καθώς ανάγει τον τρισθενή σίδηρο της αίμης. Η θεραπευτική χορήγησή της βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού. [118]

- **Γλουταθειόνη (GSH):** ένα πολυλειτουργικό μόριο, που αποτελεί το κύριο μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό των ερυθροκυττάρων. Τα επίπεδα της γλουταθειόνης στα κύτταρα, αντικατοπτρίζουν τη δυναμική ισορροπία μεταξύ σύνθεσης και χρησιμοποίησης. Ο πρωταρχικός της ρόλος στα ερυθροκύτταρα είναι η διατήρηση της αιμοσφαιρίνης στη λειτουργική μορφή της σε υψηλές συγκεντρώσεις. Επίσης σε χαμηλά επίπεδα συντηρεί τις θειολικές ομάδες των πρωτεϊνών της μεμβράνης. [119] Εκτός από την άμεση προστασία από το οξειδωτικό στρες, δρα και ως συμπαράγοντας για αρκετά προστατευτικά ένζυμα, όπως για την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και τη γλουταθειόνη-S-τρανφεράση (GST). Τα ROS σε συνθήκες οξειδωτικού στρες προκαλούν ελάττωση των επιπέδων της γλουταθειόνης, με αποτέλεσμα την αλλαγή του συνολικού αντιοξειδωτικού συστήματος του ερυθροκυττάρου. Σε οξειδωτικές καταστάσεις, η GSH οξειδώνεται σε δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG), το οποίο διαπερνά τη μεμβράνη με κατανάλωση μορίων ATP. Ο μηχανισμός αυτός ίσως είναι υπεύθυνος για τα μειωμένα επίπεδα GSH σε συνθήκες στρες. [120] Η παραγωγή της γλουταθειόνης, καθώς και τα ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση της ανηγμένης και της οξειδωμένης μορφής της, παρουσιάζονται στην εικόνα 18 [121]. Τα δύο υποστρώματα που χρησιμοποιούνται, η κυστεΐνη και η γλυκίνη μεταφέρονται στα ερυθροκύτταρα, ενώ το γλουταμινικό παράγεται από το ασπαρτικό και την αλανίνη. Η de novo σύνθεση της γλουταθειόνης απαιτεί μόρια ATP, ενώ η αναγωγή από GSSG σε GSH απαιτεί NADP. [121] Η ικανότητα της GSH να ουδετεροποιεί τα οξειδωτικά, οφείλεται στην πυρρηνοφιλικότητα των θειολικών ομάδων των πρωτεϊνών και στον υψηλό ρυθμό αντίδρασης με τα οξειδωτικά. Μειωμένα επίπεδα GSH έχουν αναφερθεί σε πολλές παθολογικές νόσους, όπως στη δρεπανοκυτταρική αναιμία, το AIDS, σε καρδιακή προσβολή, εγκεφαλικό, διαβήτη, τη νόσο Πάρκινσον κ.α. [122] Βρίσκεται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις και στο πλάσμα, κυρίως στην οξειδωμένη μορφή της. [123]

- 1: αμινοτρανσφεράση ασπαρτικού
- 2: αμινοτρανσφεράση αλανίνης
- 3: αμινοϋδρολάση γλουταμίνης
- 4: γ-γλουταμυλ-συνθετάση κυστεΐνης
- 5: συνθετάση γλουταθειόνης
- 6: GSH υπεροξειδάση
- 7: GSSG αναγωγή
- 8: αφυδρογονάση 6-φωσφορικής γλυκόζης



Εικόνα 18: Ο κύκλος της γλουταθειόνης. Παρουσιάζονται σχηματικά η σύνθεση της γλουταθειόνης και η διακίνησή της στο ερυθροκύτταρο. Όπου EMP είναι το μονοπάτι Embden-Meyerhof (αναερόβια γλυκόλυση), HPS το μονοπάτι φωσφορικών πεντοζών, G-6P και 6PG 6-φωσφορική γλυκόζη και φωσφογλυκονολακτόνη αντίστοιχα. Ανατύπωση από: Lutz HU, Bogdanova A. Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. *Front Physiol.* 2013;4:387. Published 2013 Dec 25. [121]

6.4.2 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστατικά

Τα ερυθροκύτταρα κατέχουν έναν ικανό ενζυμικό μηχανισμό για την αντιμετώπιση και την αποτοξίνωση από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου, ο οποίος περιλαμβάνει την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), την καταλάση, την υπεροξειδάση, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) κ.α. Τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτό το μηχανισμό αντιστρέφουν τις οξειδωτικές τροποποιήσεις στις θειολικές ομάδες των πρωτεϊνών, ενώ επίσης διατηρούν τις ενζυματικές δραστηριότητες από την οξειδωτική απενεργοποίηση. Η ενεργότητα κάποιων αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως της SOD και της καταλάσης, εξασθενεί κατά τη γήρανση του ερυθροκυττάρου. [121]

Η SOD είναι το πιο γνωστό αντιοξειδωτικό ένζυμο, βρίσκεται στο κυτοσόλιο και μετατρέπει τις ρίζες υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο εξουδετερώνεται από την καταλάση σε νερό και οξυγόνο. Το υπεροξείδιο δεν αποτελεί τοξικό προϊόν, αλλά αμέσως μετά τον σχηματισμό του μετατρέπεται σε $\cdot OH$ με την αντίδραση Fenton. Με συμπαράγοντα τη γλουταθειόνη, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μετατρέπει τα υπεροξείδια σε λιγότερο τοξικά προϊόντα, αποτελώντας άλλο ένα σημαντικό τμήμα του ερυθροκυτταρικού αντιοξειδωτικού αμυντικού μηχανισμού. Παρόλα αυτά, η GPx ανάγει το H_2O_2 σε νερό,

οξειδώνοντας δύο μόρια της γλουταθειόνης σε GSSG. Η καταλάση υπερισχύει της GPx, εξαιτίας της ικανότητάς της να διασπά το υπεροξειδίο χωρίς την κατανάλωση NADP. Αξίζει να αναφερθεί ότι αυτά καθ' αυτά τα ένζυμα μπορούν να απενεργοποιηθούν από τα ROS. [124], [110]

6.4.3 Άλλα αντιοξειδωτικά ορού/πλάσματος

Κάποια από τα αντιοξειδωτικά που αναφέρθηκαν βρίσκονται και στο πλάσμα (GSH, ασκορβικό οξύ, βιταμίνη E), ενώ εξίσου σημαντικά αντιοξειδωτικά μέσα σε αυτό αποτελούν η αλβουμίνη, η χολερυθρίνη και το ουρικό οξύ.

- **Αλβουμίνη (HSA – Human Serum Albumin):** πολυλειτουργική πρωτεΐνη του πλάσματος, μοριακού βάρους 66 kDa, που περιέχει 585 αμινοξέα. Οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις της αλβουμίνης είναι μεταξύ 35-50 g/dl. Αποτελεί το κυριότερο αντιοξειδωτικό του πλάσματος, παρουσιάζοντας πάνω από 70% αντιοξειδωτική ικανότητα. Πολλές από τις αντιοξειδωτικές δράσεις της αλβουμίνης εξαρτώνται από την εύκαμπτη δομή της και την ικανότητα να συνδέεται με διάφορα μόρια σε αρκετά σημεία σύνδεσης, όπως μεταλλικά ιόντα, λιπαρά οξέα, φάρμακα και ορμόνες. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η σύνδεσή της με ιόντα χαλκού (Cu^{+2}) και σιδήρου (Fe^{+2}), τα οποία μπορούν εύκολα να παράγουν ROS συμμετέχοντας στην αντίδραση Fenton. Αυτά τα μέταλλα όταν συνδέονται με πρωτεΐνες γίνονται λιγότερο επιδεκτικά στη συμμετοχή τους σε αυτή την αντίδραση. Μία έμμεση αντιοξειδωτική δράση της αλβουμίνης, είναι η σύνδεσή της με τη χολερυθρίνη, η οποία αναστέλλει τη δράση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Τέλος, η δομή και η δράση της αλβουμίνης μπορεί να τροποποιηθεί σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στον σακχαρώδη διαβήτη, την ηπατική και τη νεφρική ανεπάρκεια. [125]
- **Χολερυθρίνη (BR - Bilirubin):** υψηλά υδροφοβικό τετραπυρρολικό παράγωγο, που αντιπροσωπεύει το τελικό προϊόν του καταβολισμού της αίμης. Στο πλάσμα, η BR που δεν χρησιμοποιείται, συνδέεται με την αλβουμίνη και μεταφέρεται στα ηπατοκύτταρα. Στο ήπαρ η χολερυθρίνη μεταβολίζεται από το ένζυμο ουροκινική διφωσφορική γλυκουρονοσυλτρανσφεράση (UGT) και μεταβάλλεται σε υδατοδιαλυτή μορφή. Αυτή είναι γνωστή ως συζευγμένη χολερυθρίνη. Η BR αποτελεί μία ενδογενή ουσία που δρα ως αντιοξειδωτικός και αντιφλεγμονώδης παράγοντας στον ορό. Έχει την ικανότητα να περισυλλέγει το οξυγόνο, να αντιδρά με υπεροξειδικά ανιόντα και ρίζες υπεροξειδίου, ενώ επίσης προκαλεί αναγωγή στις υπεροξειδάσες, παρουσία H_2O_2 . Υπάρχουν ενδείξεις ότι η BR σε μέτριες έως ελαφρώς αυξημένες συγκεντρώσεις επιδρά προστατευτικά σε ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως σε καρδιαγγειακές παθήσεις, τη νόσο Alzheimer, σε διαβήτη, καρκίνο, μεταβολικό σύνδρομο, παχυσαρκία κ.τ.λ. [126]
- **Ουρικό οξύ (UA – Uric Acid):** αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο. Πειραματικές και κλινικές μελέτες υποστηρίζουν το

διπλό ρόλο του ουρικού οξέος σε οξειδωτικές και αντιοξειδωτικές επιδράσεις. Έχει αποδειχθεί ότι σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, το UA αποτελεί ένα πιθανό αντιοξειδωτικό που μπορεί να προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από τα εξωκυττάρια ROS. Σε υδροφιλικό περιβάλλον, περισυλλέγει τις ρίζες υπεροξειδίου, ενώ είναι υπεύθυνο για το 50% της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού, αντιμετωπίζοντας περίπου το 70% των δραστικών ελευθέρων ριζών στο πλάσμα. Πιο συγκεκριμένα, το UA προστατεύει την ερυθροκυτταρική μεμβράνη από την υπεροξείδωση των λιπιδίων και τη λύση που προκαλείται από υπεροξείδια και επιπλέον αντιδρά με το ONOO⁻ για να σχηματίσει αζωτούχα παράγωγα που απελευθερώνουν NO, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά του. Η αντιοξειδωτική του δράση αποκλειστικά σε υδροφιλικό περιβάλλον, αποτελεί ίσως τον κυριότερο περιορισμό στη δράση του. Ανάλογα λοιπόν με το χημικό μικροπεριβάλλον, το UA όχι μόνο δεν μπορεί να αντιμετωπίσει τις δραστικές ρίζες, αλλά σε υδροφοβικές καταστάσεις δύναται να μετατραπεί σε ισχυρό οξειδωτικό. Το UA μπορεί να σχηματίσει ρίζες όταν αντιδρά με άλλα οξειδωτικά, οι οποίες στοχεύουν κυρίως σε λιπίδια, τη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας ή LDL χοληστερίνη, καθώς και σε μεμβράνες. Παρουσία οξειδωμένης LDL έχει οξειδωτικές δράσεις, ενώ όταν η LDL βρίσκεται στην αρχική μορφή της, το ουρικό οξύ παρουσιάζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Συνεπώς, ο ακριβής ρόλος του ουρικού οξέος στη δημιουργία του οξειδωτικού στρες είναι πολύπλοκος και εξαρτάται από τις φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Γενικά, η υπερουριχαιμία (η αύξηση του UA στον ορό) συμβάλλει στην πρόοδο πολλών παθήσεων, μέσω των οξειδωτικών ιδιοτήτων του ουρικού οξέος (καρδιαγγειακά νοσήματα, αρθρίτιδα, μεταβολικό σύνδρομο). Στον αντίποδα, η αντιοξειδωτική του δράση μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης νευροεκφυλιστικών νόσων. [127]

7. Η Δρεπανοκυτταρική νόσος

7.1 Ορισμός

Ο όρος «δρεπανοκυτταρική νόσος» (ΔΝ) αναφέρεται σε μία ομάδα γενετικών καταστάσεων, κατά τις οποίες η παθολογία προκύπτει από την κληρονόμηση του δρεπανοκυτταρικού γονιδίου, είτε ομόζυγα ή ως διπλή ετεροζυγωτία με άλλο γονίδιο. Το φάσμα των καταστάσεων που προκύπτουν επηρεάζεται από τη γεωγραφία των μεμονωμένων γονιδίων της αιμοσφαιρίνης, αλλά στους περισσότερους πληθυσμούς, η ομόζυγη δρεπανοκυτταρική (SS) νόσος συνιστά τον πιο κοινό γονότυπο κατά τη γέννηση. Καθώς αυτός ο γονότυπος γενικώς δηλώνει υψηλότερη θνησιμότητα, η σχετική αναλογία των δρεπανοκυτταρικών γονοτύπων επηρεάζεται από την ηλικία, αλλά και τη γεωγραφική κατανομή των μεμονωμένων γονιδίων. [128] Η δημιουργία της παθολογικής αιμοσφαιρίνης S σε συνθήκες υποξίας οδηγεί στον μετασχηματισμό των ερυθροκυττάρων σε δύσκαμπτα δρεπανοκύτταρα, που φράζουν τα αγγεία.

Χαρακτηρίζεται από χρόνια αιμολυτική αναιμία, δακτυλίτιδα (διόγκωση χεριών και ποδιών), καθώς και από οξεία κλινικά γεγονότα, που καλούνται «κρίσεις». Οι αγγειοφρακτικές κρίσεις (πόνου) είναι οι πιο κοινές και, εξαιτίας της αντίστασης στο NO, προκαλείται ισχαιμία στους ιστούς. Άλλες κρίσεις συνιστούν την υπεραιμολυτική κρίση, το οξύ θωρακικό σύνδρομο, την κρίση εγκλωβισμού (τα ερυθρά αιμοσφαίρια παγιδεύονται στον σπλήνα ή το ήπαρ) και την απλαστική κρίση (ο μυελός σταματά να παράγει ερυθρά αιμοσφαίρια). Τα συμπτώματα ξεκινούν συνήθως μεταξύ της ηλικίας των πέντε και έξι μηνών. [129]

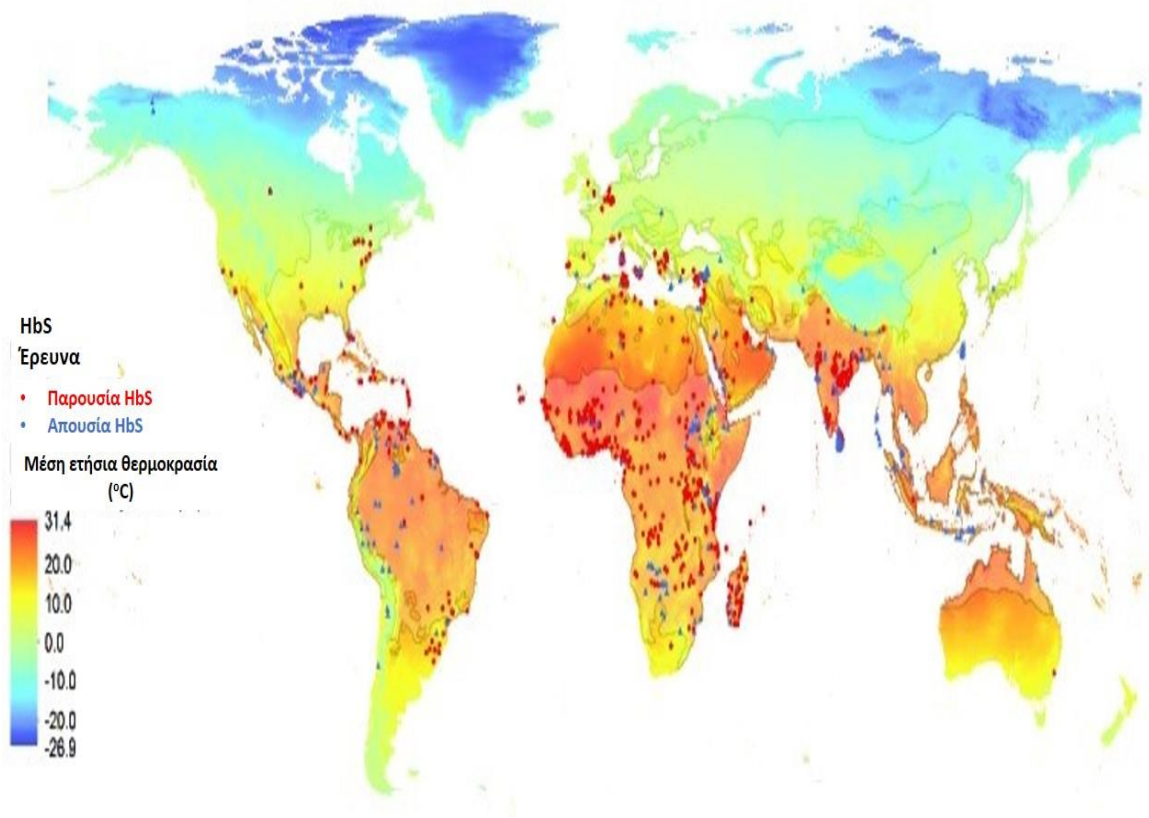
7.2 Ιστορική αναδρομή

- **1910:** Ο καρδιολόγος Dr. James Herrick από το Σικάγο, καταγράφει επίσημα για πρώτη φορά την ασθένεια στην ομόζυγη μορφή της, μετά την παρατήρηση του επιχρίσματος περιφερικού αίματος σε ένα νεαρό ασθενή, φοιτητή οδοντιατρικής, με συμπτωματολογία γνωστή στις μέρες μας ως οξύ θωρακικό σύνδρομο. [130]
- **1915:** Η πρώτη αναφορά της νόσου ως κληρονομική ασθένεια. Οι Cook και Meyer παρατηρούν ότι το φυσιολογικό επίχρισμα του πατέρα μιας νεαρής ασθενούς μετά από μερικές μέρες παρουσιάζει παρόμοια αλλοιωμένα ερυθροκύτταρα. [131]
- **1922:** Ο Mason μελετά τα τέσσερα καταγεγραμμένα, έως τότε, περιστατικά της νόσου και εφευρίσκει τον όρο «δρεπανοκυτταρική νόσος». Υποθέτει λανθασμένα, πως πρόκειται για ασθένεια που αφορά μόνο τη μαύρη φυλή. [132]
- **1933:** Η πρώτη διάκριση της νόσου από τον Dr. Demuel Diggs σε «ενεργή» (ομόζυγη) και «λανθάνουσα μορφή» (ετερόζυγη). [133] Επισήμως, ο διαχωρισμός σε ομόζυγη και ετερόζυγη μορφή δημοσιεύεται το 1949 σε δύο ξεχωριστές δημοσιεύσεις από τους Neel και Beet. [134], [135]
- **1949:** Με την εξέλιξη της μοριακής γενετικής, η δρεπανοκυτταρική αναιμία αναγνωρίζεται ως μοριακή νόσος από τον Pauling. [136]
- **1956:** Μετά τις εφευρέσεις της ηλεκτροφόρησης και της χρωματογραφίας, ο Igram παρατηρεί ότι η HbS μετακινείται σε διαφορετικό ίχνος από την HbA, υπονοώντας και τη διαφορετική μοριακή της δομή. [137]
- **1958:** Η μετάλλαξη, από την οποία προκύπτει η HbS, οφείλεται στην αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από βαλίνη στη θέση 6 της β αλυσίδας. [138]
- **1998:** Ο Αμερικανικός Οργανισμός Φαρμάκων (FDA) εγκρίνει την υδροξυκαρβαμίδη (υδροξουρία) για την αντιμετώπιση των συχνών επώδυνων κρίσεων. [139]
- **2017:** Δημοσιεύεται η πρώτη περίπτωση ασθενούς που θεραπεύεται με γονιδιακή θεραπεία. [140]

7.3 Γεωγραφική κατανομή της δρεπανοκυτταρικής νόσου

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία (ΔΑ) είναι ενδημική νόσος σε περιοχές όπου η μαλάρια (*Plasmodium falciparum*) είναι ή ήταν κυρίαρχη, εξαιτίας της προστατευτικής φύσης του δρεπανοκυτταρικού γονιδίου. Κατά συνέπεια, εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα στην υποσαχάρια Αφρική, τη Νοτιοανατολική Ασία, τη Μέση Ανατολή και τη Νότια Αμερική. Η μετακίνηση των πληθυσμών ήταν ένας καθοριστικός παράγοντας για τη διασπορά, την κυριαρχία και τη γενετική ετερογένεια των αιμοσφαιρινοπαθειών σε όλο τον κόσμο. Έτσι εμφανίζεται συχνά στις χώρες της Μεσογείου, αλλά και σε άλλες μη ενδημικές χώρες της βόρειας Ευρώπης και της βόρειας Αμερικής. Η πρόοδος στην προληπτική διάγνωση του προγεννητικού ελέγχου και η σαφώς βελτιωμένη κλινική φροντίδα τις τελευταίες δεκαετίες στον εύπορο δυτικό κόσμο, έχει μειώσει τα περιστατικά και κυρίως τη θνησιμότητα της νόσου. Δυστυχώς οι αναπτυσσόμενες χώρες εξαιρούνται αυτής της προόδου, όπου η θνησιμότητα της ΔΑ παραμένει ακόμα υψηλή. [141], [142]

Ο ρόλος των γενετικών παραγόντων που συμβάλλουν στη φαινοτυπική ποικιλομορφία της νόσου έχει μελετηθεί εκτενώς, με τα επίπεδα της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης F (HbF – Fetal Hemoglobin) και τη συνύπαρξη με την α-θαλασσαιμία να αποτελούν τους δύο καλύτερα χαρακτηρισμένους γενετικούς τροποποιητικούς παράγοντες. Οι υπάρχουσες γενετικές μελέτες έχουν προσπαθήσει ανεπιτυχώς να εξηγήσουν την εξέλιξη των κλινικών ποικιλομορφιών, που αφορούν διαφορές στη συχνότητα του οξύ πόνου, των χρόνιων επιπλοκών και της θνησιμότητας. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται ότι εξηγούν ως ένα βαθμό αυτή την ποικιλομορφία, καθώς οι γενετικοί υπόκεινται σπανιότερα σε τροποποιήσεις. Άλλωστε ο βαθμός πολυμερισμού της HbS εξαρτάται από την υποξία, το pH, τη θερμοκρασία και την ενυδάτωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, παράγοντες που εξαρτώνται από το περιβάλλον. Για παράδειγμα οι κλιματικοί παράγοντες είναι σημαντικοί για τον οξύ πόνο, με το έντονο κρύο ή τη ζέστη (εικ.19) [141] και την υγρασία να συντελούν αρνητικά. Άλλοι πιθανοί σχετικοί κλιματικοί και κοινωνικοί παράγοντες περιλαμβάνουν την ποιότητα του αέρα, τη στέγαση, την κοινωνικοοικονομική κατάσταση, τη φυσική άσκηση και τις μολύνσεις. Οι κάτοικοι της Αφρικής έχουν περισσότερες τροποποιήσεις της νόσου, σε σχέση με τους κατοίκους του βόρειου ημισφαιρίου, γεγονός που σχετίζεται με περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως οι μολύνσεις, το κλίμα και η πρόσβαση στο σύστημα υγείας. [141]



Εικόνα 19: Παγκόσμια κατανομή που παρουσιάζει την παρουσία ή απουσία του HbS αλληλίου (Piet et al., 2005) σε σχέση με τη μέση θερμοκρασία σε °C (World Climate). Οι ακραίες συνθήκες ζέστης ή κρύου, έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν στις οξείες παρενέργειες της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Η πλειονότητα των ασθενών με ΔΑ κατοικούν σε τροπικά κλίματα, όπου γίνονται λίγες σχετικές μελέτες. Αυξημένα κρούσματα της νόσου παρατηρούνται και σε πιο εύκρατα κλίματα της δυτικής Ευρώπης, ιδιαίτερα στη Γαλλία, το Ηνωμένο Βασίλειο και τη βόρεια Αμερική. Με βάση την προσωπική τους εμπειρία, πολλοί ασθενείς αναφέρουν ότι η έκθεση σε έντονο κρύο προκαλεί οξύ πόνο, σε μερικές ώρες μετά την έκθεση. Ανατύπωση από: Tewari S, Brousse V, Piel FB, Menzel S, Rees DC. Environmental determinants of severity in sickle cell disease. *Haematologica*. 2015 Sep;100(9):1108-16. doi: 10.3324/haematol.2014.120030. PMID: 26341524; PMCID: PMC4800688. [141]

Σε πολλές περιοχές του κόσμου, όπου κυριαρχούν διάφορα είδη αιμοσφαιρινών, παρουσιάζονται σύνθετες μορφές ετεροζυγωτίας. Η HbSC βρίσκεται συχνότερα στη Δυτική Αφρική [143], η HbSE στην Αφρική και τη Μέση Ανατολή [144], η HbSD στην Ασία και τη Λατινική Αμερική. Στην Ελλάδα, όπου ενδημεί η β-μεσογειακή αναιμία (β-MA), κυριαρχεί η διπλή ετεροζυγωτία HbS/β^{thal}). [145]

7.4 Αιμοσφαιρινοπάθειες

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες αποτελούν ένα μεγάλο σύνολο κληρονομικών γενετικών συνδρόμων, που επηρεάζουν τη δομή και τη σύνθεση του μορίου της αιμοσφαιρίνης. Κληρονομούνται κατά τον αυτοσωμικό και τον υπολειπόμενο χαρακτήρα.

Η πρώτη ομάδα αιμοσφαιρινοπαθειών αφορά την αντικατάσταση ενός αμινοξέος από ένα άλλο (όπως στην HbS), την απαλοιφή μιας αλληλουχίας αμινοξέων (Hb Gun Hill), τον μη ομαλό υβριδισμό μεταξύ δύο αλυσίδων (Hb Lepore) ή τη μη ομαλή επιμήκυνση μιας σφαιρινικής αλυσίδας (Hb Constant Spring). Οι παρενέργειες αυτών των παθολογικών αιμοσφαιρινών ποικίλλει, με την HbS να αποτελεί την πιο συχνή παραλλαγή, που θα αναλυθεί εκτενέστερα σε επόμενο κεφάλαιο.

Η δεύτερη ομάδα αιμοσφαιρινοπαθειών, οφείλεται σε ένα μεγάλο αριθμό ετερογενών μεταλλάξεων, που προκαλούν μη ομαλή γονιδιακή σφαιρινική έκφραση, με αποτέλεσμα την καθολική απουσία ή την ποσοτική μείωση της σύνθεσης της σφαιρινικής αλυσίδας. Οι μεταλλάξεις στο α- ή β- γονίδιο της σφαιρινικής αλυσίδας οδηγεί στην α- και τη β-μεσογειακή αναιμία αντίστοιχα και σε δβ-μεσογειακή αναιμία, όταν επηρεάζεται η σύνθεση των δ και β αλυσίδων.

Η α-θαλασσαιμία οφείλεται σε διαγραφές στο χρωμόσωμα 16p του γονιδίου της α-σφαιρίνης, που οδηγούν στην απώλεια λειτουργίας του ενός ή των δύο γονιδίων για κάθε συστάδα. Ανάλογα με τον αριθμό των γονιδίων που αδυνατούν να συνθέσουν την α-σφαιρινική αλυσίδα, παρατηρούνται διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις. Εάν τροποποιούνται ένα ή δύο γονίδια (cis ή trans), υπάρχουν καθόλου ή ελάχιστες αιματολογικές συνέπειες και τα άτομα είναι φορείς της νόσου. Στην περίπτωση που τροποποιούνται τα τρία γονίδια, η κατάσταση καλείται αιμοσφαιρινοπάθεια Η (HbH) και χαρακτηρίζεται από ήπια έως σοβαρή αναιμία. Η μετάλλαξη και στα τέσσερα γονίδια της α-αλυσίδας οδηγεί στη μείζονα α-μεσογειακή αναιμία, που είναι πολύ σοβαρή και συχνά ο θάνατος επέρχεται ακόμα και πριν τη γέννηση.

Σε αντίθεση με την α-θαλασσαιμία, οι μοριακές δυσλειτουργίες της β-θαλασσαιμίας αφορούν σημειακές μεταλλάξεις ενός νουκλεοτιδίου ή ενός μικρού αριθμού τους, αλλά έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικές ανεπάρκειες στη γονιδιακή έκφραση της β-σφαιρίνης, σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο, κυρίως στην ομόζυγη μορφή της. Ως αποτέλεσμα, η ερυθροποίηση είναι ανεπαρκής και οδηγεί σε διόγκωση του σπλήνα, σοβαρή αναιμία, σκελετικές ανωμαλίες κ.α. Οι μεταγγίσεις αίματος είναι απαραίτητες για την επιβίωση των ασθενών με μείζονες αναιμίες, αλλά πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι κίνδυνοι και οι παρενέργειες που ελλοχεύουν (υπερφόρτωση σιδήρου, μολύνσεις, αντιδράσεις, αλλοανοσοποίηση κ.τ.λ.)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η δρεπανοκυτταρική αναιμία και η θαλασσαιμία μπορούν να συνυπάρχουν με άλλες αιμοσφαιρινοπάθειες. Η ετερόζυγη ΔΑ μπορεί να συγκληρονομηθεί με την α- ή β-MA, με την HbC ή την HbE. Η ετεροζυγωτία α- και β-θαλασσαιμίας μπορεί να μειώσει τη σοβαρότητα της σφαιρινικής ανισορροπίας, ενώ η συνύπαρξη ετερόζυγης ΔΑ και ήπιας β-θαλασσαιμίας μπορεί να μειώσει τη δρεπάνωση. Η ετεροζυγωτία β-MA και HbE μπορεί να προκαλέσει ένα μεγάλο φάσμα κλινικών διαταραχών από ήπια έως σοβαρή αναιμία, διαφορετικού τύπου από τη μείζονα β-MA. [146], [147]

7.5 Κλινικές μορφές δρεπανοκυτταρικών συνδρόμων

7.5.1 Ετερόζυγος δρεπανοκυτταρική αναιμία (HbAS)

Ο ετερόζυγος φορέας (SCT – Sickle Cell Trait) του γονιδίου της δρεπανοκυτταρικής αιμοσφαιρίνης (HbS), σε απουσία άλλης μετάλλαξης του γονιδίου της β-σφαιρίνης, θεωρείται «στίγμα» της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας (αιμοσφαιρίνη A και S – HbAS). Καθώς στους ετερόζυγους κάθε ερυθροκύτταρο περιέχει μόνο 30-40 % το πολυμερές HbS, αυτό δεν ανευρίσκεται στις περισσότερες καταστάσεις. Μόνο στα αγγεία του νεφρικού μυελού μπορεί να εντοπιστεί η HbS και τα δρεπανοκύτταρα, όπου η πίεση του οξυγόνου είναι χαμηλή και το περιβάλλον είναι υπερτονικό και όξινο. Κάποιες φορές με τη δυνατή άσκηση, μπορεί να βρεθούν δρεπανοκύτταρα στη κυκλοφορία. Οι φορείς, εκτός από εξαιρετικές περιπτώσεις (πίν.2) [148], δεν παρουσιάζουν καμία νοσηρότητα ή επιπλοκές που οφείλονται στο δρεπανοκυτταρικό στίγμα και ο μέσος όρος ζωής τους είναι φυσιολογικός. Συνεπώς, δεν πρέπει να θεωρείται μορφή δρεπανοκυτταρικής νόσου. Το δρεπανοκυτταρικό στίγμα φέρουν περίπου 8% των Αφροαμερικανών στις Ηνωμένες πολιτείες, ενώ σε διάφορες περιοχές της Αφρικής είναι φορείς περί το ένα τέταρτο του πληθυσμού. Πολύ συχνά ανευρίσκεται στη Σαουδική Αραβία, την Ελλάδα, την Ινδία και τη Βραζιλία. Στους Καυκάσιους είναι παρόν στο χρωμόσωμα του Αφρικανικού απλότυπου και είναι αποτέλεσμα γενετικών προσμίξεων των γενεών. [148]

Πίνακας 2: Οι εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις επιπλοκών της δρεπανοκυτταρικής ετεροζυγωτίας (στίγμα). Συνήθως ο μέσος όρος ζωής των ετερόζυγων φορέων είναι φυσιολογικός. Ανατύπωση από: Steinberg MH. Sick cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal*. 2008 Dec 25;8:1295-324. [148]

ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΔΡΕΠΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑΣ
Υποσθενουρία, ισοσθενουρία, αιματουρία, νεφρική θηλοειδής νέκρωση, ουρολοίμωξη κατά την εγκυμοσύνη, νεφρικό μυελοειδές καρκίνωμα
Αυξημένος κίνδυνος αρτηριακού θρομβοεμβολισμού
Αυξημένος κίνδυνος γλαυκώματος μετά από τραυματικό ύφαιμα
Αυξημένος κίνδυνος θανάτου μετά από σοβαρή θερμοπληξία
Χαμηλό βάρος στα νεογνήνητα
Σπληνικό έμφραγμα σε υψόμετρο
Δυσκολία στη λευκαφαίρεση δωρητών μονάδων αίματος

7.5.2 Ομόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία (HbSS)

Η ομόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία (HbSS) αποτελεί τον συνηθέστερο και έναν από τους πλέον κλινικά σοβαρούς φαινότυπους της νόσου. Κληρονομείται από ετερόζυγους γονείς και ενώ το άτομο κατά τη γέννησή του είναι υγιές, εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (HbF), παρουσιάζει τα πρώτα συμπτώματα όταν τα επίπεδα της HbF ελαττώνονται στην βρεφική ηλικία.

Η σημειακή αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από βαλίνη στο έκτο κωδικόνιο του γονιδίου της β-σφαιρίνης, οδηγεί στον σχηματισμό της παθολογικής δρεπανοκυτταρικής

αιμοσφαιρίνης S (HbS). Σε καταστάσεις υποξίας, οξέωσης ή αφυδάτωσης, η HbS πολυμερίζεται και σχηματίζει γραμμικές και επιμήκεις ίνες, οι οποίες παραμορφώνουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, που τελικά αποκτούν το χαρακτηριστικό δρεπανοειδές σχήμα. Ως εκ τούτου, προκύπτει χρόνια αιμολυτική αναιμία με χαρακτηριστικά οξεία επεισόδια πόνου, εξαιτίας της αγγειοφρακτικής παρεμπόδισης της κυκλοφορίας του αίματος και της ισχαιμίας των ιστών. Η επακόλουθη βλάβη μετά από ισχαιμία/επαναιμάτωση οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου και την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, που παρουσιάζουν υψηλή έκφραση μοριακής προσκόλλησης, καθώς και ενεργοποίηση ουδετεροφίλων, μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων, που οδηγούν στη χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση της νόσου. Επιπρόσθετα, η ενδοαρτηριακή αιμόλυση των δρεπανοκυττάρων, οδηγεί στη μείωση του NO από την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη του πλάσματος (free-Hb), συμβάλλοντας στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Επιπλέον, η ερυθροκυτταρική μεμβράνη καταστρέφεται από τον πολυμερισμό της δεοξυαιμοσφαιρίνης, μέσω της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, που προκαλεί εξωτερική της φωσφατιδυλοσερίνης και τελικά δημιουργεί μια υπερπηκτική κατάσταση. Αυτοί οι μηχανισμοί οδηγούν στην ανάπτυξη χρόνιων οργανικών καταστροφών, που περιλαμβάνουν τη δρεπανοκυτταρική νεφροπάθεια, την πνευμονική υπέρταση, την αγγειακή νέκρωση των οστών, χρόνια πνευμονοπάθεια και τελικά μικρότερο προσδόκιμο ζωής. [149], [150]

7.5.3 Διπλή ετεροζυγωτία Hb S/β⁺ thal

Η διπλή ετεροζυγωτία δρεπανοκυτταρικής αναιμίας και β-θαλασσαιμίας (Hb S/β⁺ thal, Hb S/β⁰ thal) αποτελεί φαινότυπο της νόσου, η έκβαση του οποίου εξαρτάται από τη σοβαρότητα της συνυπάρχουσας β-θαλασσαιμίας (ο τύπος Hb S/β⁰ thal είναι κλινικά πολύ σοβαρότερος). Η ετερογένεια των μεταλλάξεων της β-θαλασσαιμίας οδηγεί σε διαφορετική ποσοτική σύνθεση της β-σφαιρίνης και συνεπώς σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της HbA. Πιο συγκεκριμένα, στον φαινότυπο Hb S/β⁺ thal ανιχνεύεται η HbA, ενώ στον Hb S/β⁰ thal απουσιάζει εντελώς, γεγονός που έχει άμεση συνέπεια στην κλινική εικόνα και ποικίλλει από σχεδόν ασυμπτωματική έως σοβαρή κατάσταση, όμοια της ομόζυγης. Η θαλασσαιμία επιδρά στα δρεπανοκύτταρα, προκαλώντας μικροκυττάρωση, υποχρωμία και κάποιες φορές ελαφρώς αυξημένη HbF. Σε αυτή την περίπτωση η αναιμία βελτιώνεται και μειώνεται η αιμόλυση. Παρόλα αυτά, δε μειώνονται τα αγγειοαποφρακτικά επεισόδια, εξαιτίας των αυξημένων επιπέδων HbS. Αυτή η αιμολυτική αναιμία, σχετίζεται με πολλαπλές οξείες και χρόνιες επιπλοκές, όπως εγκεφαλικό, πριαπισμό, ηπατική, σπληνική, νεφρική, καρδιολογική και πνευμονική νόσο. Η χρόνια ενδοηπατική χολόσταση είναι μία σπάνια και σοβαρή επιπλοκή της δρεπανοκυτταρικής νόσου, που χαρακτηρίζεται από υπερχολερυθριναιμία και οξεία ηπατική ανεπάρκεια, που συχνά οδηγεί στον θάνατο.

Παρόλο που οι ασθενείς με Hb S/β⁺ thal έχουν ήπια συμπτώματα της νόσου, τα χαμηλά επίπεδα HbA και HbF, μπορεί να σχετίζονται με δρεπανοκυτταρικές κρίσεις. Ένα διαγνωστικό πρόβλημα αποτελεί η διαφοροποίηση της Hb S/β⁰ thal με τη δρεπανοκυτταρική αναιμία που σχετίζεται με την α-θαλασσαιμία. Τα αιματολογικά τεστ και η ηλεκτροφόρηση αδυνατούν να διακρίνουν τις δύο καταστάσεις, έτσι η οικογενειακή μελέτη και η ανάλυση DNA χρησιμοποιούνται για να επιβεβαιώσουν τη διάγνωση. [151], [152]

7.5.4 Διπλή ετεροζυγωτία HbS/αιμοσφαιρινοπάθειας C (HbSC)

Σε αυτή την διπλή ετεροζυγωτία, το ένα γονίδιο της β-σφαιρίνης HBB περιέχει τη HbS μετάλλαξη (βGlu6Val) και το άλλο τη μετάλλαξη της αντικατάστασης του γλουταμινικού οξέος από λυσίνη στο έκτο κωδικώνιο (βGlu6Lys), που οδηγεί στον σχηματισμό της παθολογικής μη δρεπανοκυτταρικής αιμοσφαιρίνης C. Η HbC δημιουργεί άμορφα συσσωματώματα εντός των ερυθροκυττάρων, που έχουν ως αποτέλεσμα μορφολογικές τροποποιήσεις. Επιπλέον, τροποποιείται και ο μεταφορέας K-CI στη μεμβράνη, προκαλώντας αφυδάτωση στα ερυθροκύτταρα, με συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης της ενδοκυτταρικής αιμοσφαιρίνης και τη μετατροπή των ερυθροκυττάρων σε πιο πυκνά από τα φυσιολογικά.

Θεωρείται ήπιας μορφής δρεπανοκυτταρική νόσος, με συμπτώματα που προαναφέρθηκαν και οφείλονται είτε στην HbS ή την HbC, τα οποία πολλές φορές δεν είναι εύκολο να διασαφηνιστεί η αιτία τους, καθώς υπερπηδούν το ένα το άλλο. Η αμφιβληστροειδοπάθεια ωστόσο, σχετίζεται άμεσα με την HbSC.

7.5.5 Σπανιότερες μορφές διπλής ετεροζυγωτίας

Η διπλή ετεροζυγωτία HbSD-Punjab, είναι μια σπάνια συμπτωματική αιμοσφαιρινοπάθεια, που προκύπτει από τη μετάλλαξη ενός αλληλίου της β-αλυσού που οδηγεί στη δρεπάνωση (βGlu6Val) και στην αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από γλουταμίνη στο έτερο αλληλίο (ρ.Glu121Gln), από την οποία προκύπτει η παθολογική αιμοσφαιρίνη D-Punjab. Οι κλινικές εκδηλώσεις της HbSD-Punjab είναι ηπιότερες σε σχέση με την HbSS (όπως και σε σχέση με την ομόζυγη HbDD, που έχει βαρύτερη κλινική εικόνα). Παρόλα αυτά, η σπληνομεγαλία είναι πιο κοινή σε αυτόν τον φαινότυπο, σε σχέση με την HbSS. [153]

Η διπλή μετάλλαξη στο ίδιο γονίδιο της β-σφαιρίνης βGlu6Val και βAsp73Asn, οδηγεί στον σχηματισμό της μη δρεπανοκυτταρικής αιμοσφαιρίνης C-Harlem. Ιστορικά αποτελεί τη δεύτερη παθολογική αιμοσφαιρίνη, μετά την S, που πρωτο-περιγράφηκε το 1966 στους Αφροαμερικανούς κατοίκους του Χάρλεμ. Σε ετερόζυγη κατάσταση είναι γενικώς ήπια, σε διπλή ετεροζυγωτία με την HbS όμως, παρουσιάζεται ως σοβαρή δρεπανοκυτταρική νόσος όμοια της ομόζυγης, με αιμόλυση, αγγειοφρακτικά επεισόδια και αιματοουρία. Η διαφορική διάγνωση HbSC και HbSC-Harlem είναι δύσκολη στην ηλεκτροφόρηση. Μία κλινική διαφορά τους είναι τα αγγειοφρακτικά επεισόδια στην HbSC-Harlem, τα οποία απολείπουν στην HbSC. [154]

Άλλη μία σπάνια δρεπανοκυτταρική ετεροζυγωτία είναι η HbS/O_{Arab}, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο μεταλλαγμένων αλυσίδων β-σφαιρίνης: τη b6Glu→Val (Hb S) και τη b121Glu→Lys (Hb O_{Arab}). Αυτή η παραλλαγή εμφανίζεται κυρίως σε άτομα αραβικής καταγωγής, με κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά δρεπανοκυτταρικής νόσου, όπως αιμολυτική αναιμία, ίκτερος, επεισόδια πόνου και σπανιότερα πνευμονία και σήψη. Αποτελεί σοβαρή δρεπανοκυτταρική νόσο, όμοια της ομόζυγης. [155]

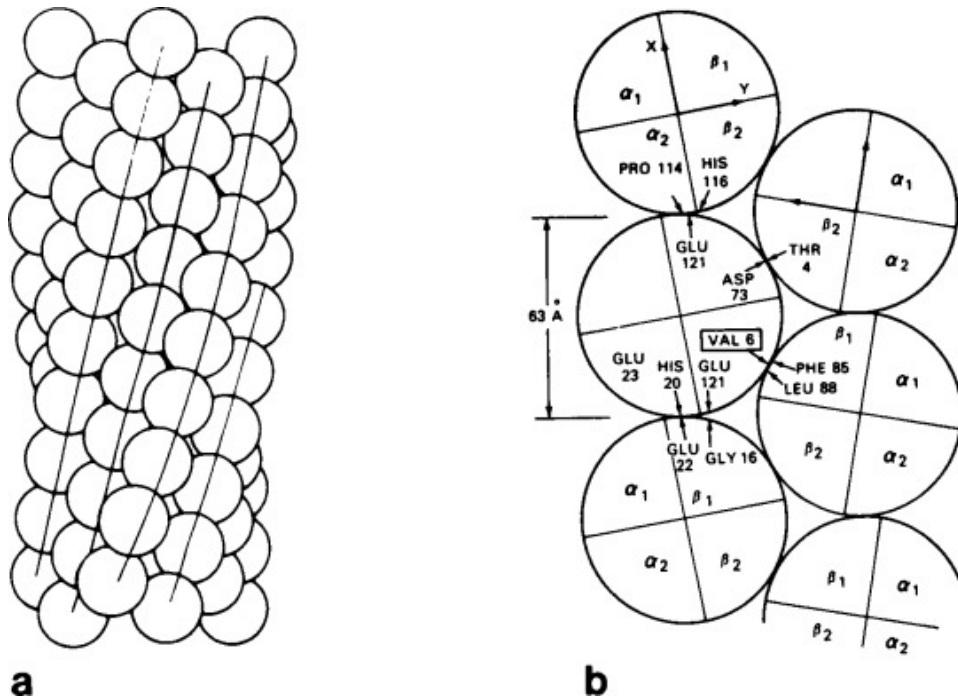
Τέλος, ο συνδυασμός της HbS και της επίσης παθολογικής HbE (HbSE), που προκύπτει από τις μεταλλάξεις b6Glu→Val (Hb S) και b26Lys →Glu (HbE), οδηγεί σε δρεπανοκυτταρικό σύνδρομο, όμοιο της δρεπανοκυτταρικής ετεροζυγωτίας Hb S/β⁺, με τους ασθενείς να παρουσιάζουν ήπια αναιμία και μικροκυττάρωση. Οι ασθενείς της HbE προέρχονται κυρίως από λαούς της νοτιοανατολικής Ασίας, με την ετεροζυγωτία S/E να προκύπτει από τις μετακινήσεις αυτών των πληθυσμών και τις προσμίξεις τους με άλλους πληθυσμούς που εμπεριέχουν ρίσκο. Πολλές από τις κλινικές εκδηλώσεις εμφανίζονται σε μεγάλη ηλικία, όπως κρίσεις πόνου, οξύ θωρακικό σύνδρομο, διόγκωση του σπλήνα κ.α. [156]

7.6 Η αιμοσφαιρίνη S

7.6.1 Δομή, κινητική και μηχανισμός πολυμερισμού

Η μετάλλαξη b6Glu→Val στο γονίδιο της β-σφαιρίνης, που προκαλεί την παραγωγή της δρεπανοκυτταρικής αιμοσφαιρίνης S, δεν αλλάζει τη διαλυτότητα της οξυγονωμένης μορφής της οξυαιμοσφαιρίνης S (R – Relax κατάσταση), αλλά μειώνει δραστικά τη διαλυτότητα της δεοξυαιμοσφαιρίνης S (T - Tense κατάσταση), ώστε αυτή να σχηματίζει ιζήματα εντός των ερυθροκυττάρων, που γίνονται επιμηκυμένα και άκαμπτα. Η παραμόρφωση και η ακαμψία των ερυθροκυττάρων αποτελεί την κύρια αιτία των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων της ασθένειας και το χαρακτηριστικό που διακρίνει τη νόσο από άλλα είδη αναιμιών.

Στα δρεπανοκύτταρα, έχει αναφερθεί μετά από παρατηρήσεις με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ότι η δεοξυαιμοσφαιρίνη S συναθροίζεται με τη μορφή γέλης σωληνοειδών ινών (ή κρυστάλλων), διαμέτρου 140 – 170 Å, τα οποία μπορεί είτε να εκτείνονται σε όλο το ερυθροκύτταρο, είτε να τυλίγονται στην εσωτερική του επιφάνεια. Οι ίνες καταλαμβάνουν μεγάλο μέρος του όγκου του κυττάρου πακεταρισμένες μαζί σε παράλληλες δέσμες, σχηματίζοντας εξαγωνικά ή τετράγωνα πλέγματα. Κάθε ίνα συνιστά μια σωληνοειδή μορφή που σχηματίζεται από έξι λεπτά ινίδια, τα οποία τυλίγουν ελικοειδώς το νοητό άξονα του σωλήνα. Κάθε ινίδιο αποτελεί ένα μόριο αιμοσφαιρίνης (εικ.20). [157] Αυτές οι ημικρυσταλλικές δομές είναι ξεκάθαρα υπεύθυνες για τη χαρακτηριστική παραμόρφωση ή δρεπάνωση των ερυθροκυττάρων. [158]

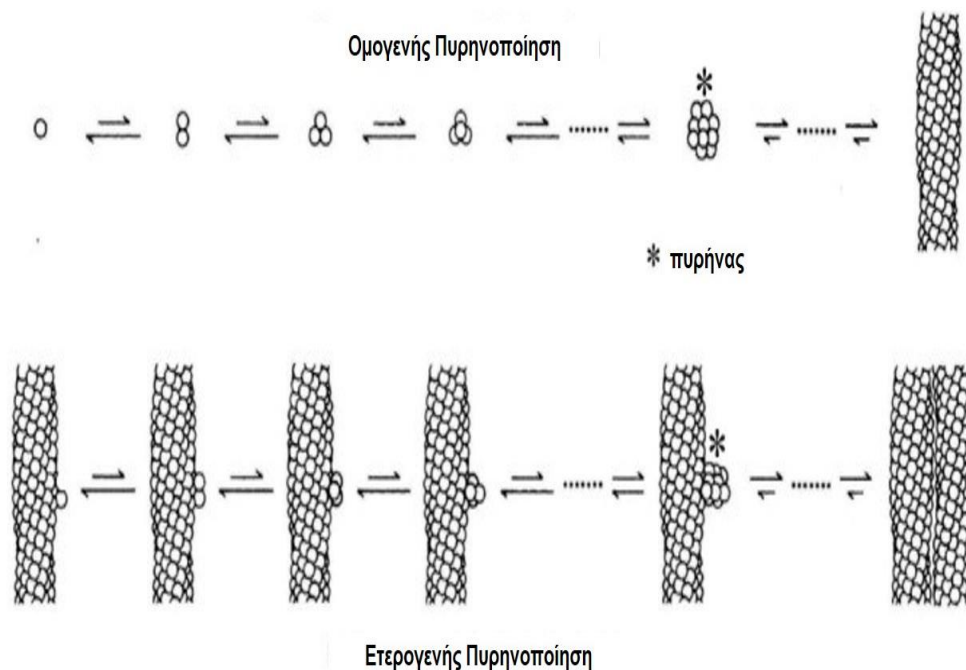


Εικόνα 20: Σχηματικό μοντέλο διάταξης των μορίων αιμοσφαιρίνης στη γέλη, όπως φαίνεται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. (α) και με περίθλαση ακτινών x-ray (β). Η όψη στο διάγραμμα (α) δείχνει τα μόρια της αιμοσφαιρίνης (σφαίρες) διαταγμένα σε ελικοειδή παράταξη. Το διάγραμμα (β) παρουσιάζει, σε μεγαλύτερη ανάλυση, τη διάταξη των μορίων της αιμοσφαιρίνης στον κρύσταλλο. Κάθε αλυσίδα φαίνεται ως τεταρτοκύκλιο. Οι επαφές μεταξύ των μορίων της αιμοσφαιρίνης φαίνονται στο σχήμα με τα βέλη, με το όνομα του αμινοξέος και τον αριθμό της αλληλουχίας τους. Ανατύπωση από: Constance Tom Noguchi, Alan N. Schechter, *The Intracellular Polymerization of Sickle Hemoglobin and Its Relevance to Sickle Cell Disease*, Blood, Volume 58, Issue 6, 1981, Pages 1057-1068, ISSN 0006-4971. [157]

Τα συμπεράσματα από τις δομικές μελέτες του μορίου της HbS έχουν εξαχθεί, μέσω των αναλύσεων του σχηματισμού της γέλης της δεοξυαιμοσφαιρίνης S. Η διαδικασία σχηματισμού της γέλης μπορεί να περιγραφεί ως μια φάση ισορροπίας μεταξύ ενός κορεσμένου διαλύματος τετραμερών δεοξυαιμοσφαιρίνης S και ενός στερεού πολυμερούς αυτών των τετραμερών, φάσεις οι οποίες συνυπάρχουν μέσα στο κύτταρο. Από αυτή την οπτική, η δρεπάνωση οφείλεται στη χαμηλή διαλυτότητα της δεοξυαιμοσφαιρίνης S, σε σχέση με τη δεοξυαιμοσφαιρίνη A και την οξυαιμοσφαιρίνη A ή S. Σε συνθήκες αποοξυγόνωσης, η διαλυτότητα μειώνεται δραματικά και σχηματίζονται τα πολυμερή. Τα πειράματα έχουν δείξει ότι ο σχηματισμός της γέλης, ίσως ξεκινά από τη δεοξυαιμοσφαιρίνη, είτε αυξάνοντας τη συγκέντρωσή της, είτε αυξάνοντας τη θερμοκρασία ενός διαλύματος HbS (η διαλυτότητα της δεοξυαιμοσφαιρίνης S μειώνεται όσο ανεβαίνει η θερμοκρασία τους 37°C). Χαρακτηριστικά, μετά από απότομη αύξηση της θερμοκρασίας ενός διαλύματος δεοξυαιμοσφαιρίνης, δεν παρατηρείται καμία αλλαγή για αρκετό χρόνο, μέχρι που γίνεται ξαφνικά μια γρήγορη αλλαγή στη σύσταση του διαλύματος (σχηματισμός γέλης). Αυτή η ασυνήθιστη κινητική συμπεριφορά του μορίου θεωρείται μια αντίδραση πολυμερισμού πυρηνικού τύπου. [157]

Πιο συγκεκριμένα, έχει προταθεί ο μηχανισμός διπλής πυρηνοποίησης για τον σχηματισμό της δρεπανοκυτταρικής ίνας. Η βασική ιδέα του μηχανισμού, είναι ότι υπάρχουν

δύο διαδικασίες πυρηνικού πολυμερισμού. Η πρώτη ίνα σχηματίζεται με τον μηχανισμό Oosawa, κατά τον οποίο υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ της απώλειας της μεταφραστικής και της περιστροφικής εντροπίας επάνω στη συσσωμάτωση και της σταθερότητας που αποκτάται από τις διαμοριακές συνδέσεις. Έτσι, η αντίδραση εξαρτάται από την ελεύθερη ενέργεια έως ότου σχηματιστεί ένας πυρήνας (αστερίσκος στην εικόνα 21). [157] Επιπλέον μόρια που προσκολλώνται στον αρχικό πυρήνα και ο τελικός σχηματισμός της ίνας εξαρτώνται από την ποσότητα της ελεύθερης ενέργειας. Η πρώτη ίνα θεωρείται ότι σχηματίζεται από ομογενή πυρηνοποίηση, διότι δεν υπάρχει επαφή με άλλες ίνες ή επιφάνειες. Στη συνέχεια ακολουθεί γρήγορα ο επόμενος μηχανισμός, που καλείται ετερογενής πυρηνοποίηση, διότι οι πυρήνες που σχηματίζονται επάνω στην επιφάνεια των ινών που ήδη υπάρχουν, σχηματίζουν περισσότερες ίνες όσο μεγαλώνει η επιφάνεια, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση των πολυμερών. Αυτή η διαδικασία δημιουργεί μια καθυστέρηση, μια λανθάνουσα περίοδο όπως λέγεται (delay time ή lag phase). Η λανθάνουσα περίοδος αποτελεί μια σημαντική παθοφυσιολογική παράμετρο, η οποία είναι ανάλογη της υψηλής συγκέντρωσης της δεοξυαιμοσφαιρίνης S, ενώ η ευαισθησία της εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως το pH και η θερμοκρασία. Σε πολλές πειραματικές μελέτες έχει φανεί ότι η λανθάνουσα περίοδος σχετίζεται με τη διαλυτότητα της δεοξυαιμοσφαιρίνης S. [159], [157]

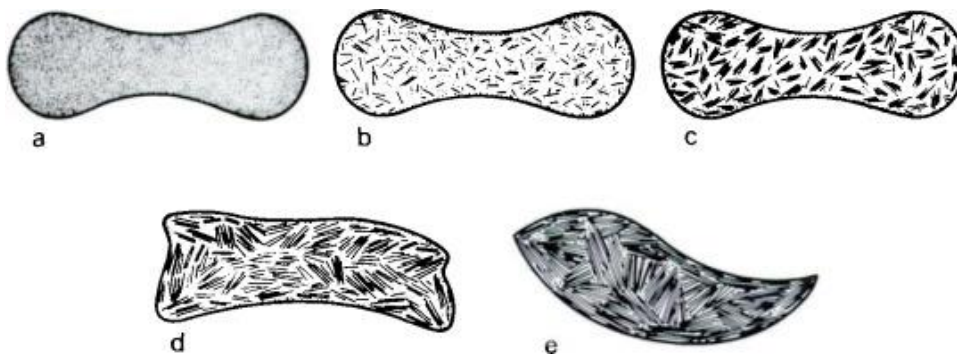


Εικόνα 21: Ο μηχανισμός διπλής πυρηνοποίησης του πολυμερισμού της HbS. Υπάρχουν δύο μηχανισμοί πυρηνικού πολυμερισμού του σχηματισμού των ινών της HbS, η ομογενής και η ετερογενής πυρηνοποίηση. Η πρώτη ίνα σχηματίζεται σύμφωνα με το μοντέλο πυρηνοποίησης Oosawa. Τα αρχικά στάδια της συσσωμάτωσης είναι θερμοδυναμικά ασταθή και η όλη αντίδραση εξαρτάται από την ποσότητα της ελεύθερης ενέργειας. Σε αυτό το μηχανισμό δεν υπάρχει επαφή με άλλες ίνες ή επιφάνειες. Στη συνέχεια ακολουθεί άμεσα ο δεύτερος μηχανισμός της ετερογενούς πυρηνοποίησης, όπου οι πυρήνες που σχηματίζονται στην επιφάνεια των ινών που ήδη υπάρχουν, σχηματίζουν επιπλέον ίνες, αυξάνοντας την επιφάνεια για περαιτέρω ετερογενή πυρηνοποίηση. Ανατύπωση από: Constance Tom Noguchi, Alan N. Schechter, *The Intracellular Polymerization of Sickle Hemoglobin and Its Relevance to Sickle Cell Disease, Blood, Volume 58, Issue 6, 1981, Pages 1057-1068, ISSN 0006-4971.* [157]

Η σχέση της λανθάνουσας περιόδου με την κλινική σοβαρότητα της νόσου εκφράστηκε στην παρακάτω πρόταση των Eaton, Hofrichter και Ross: «η πιθανότητα της δρεπάνωσης στα αγγεία, καθορίζεται από τη λανθάνουσα περίοδο του σχηματισμού της γέλης, ενώ μια κρίση συμβαίνει όταν οι λανθάνουσες φάσεις μειώνονται αρκετά ή όταν επιμηκύνονται οι χρόνοι διέλευσης των δρεπανοκυττάρων στα αγγεία». [160]

7.6.2 Μοντέλο ενδοκυτταρικού πολυμερισμού και ρεολογία

Υποθετικά, το πλήρως οξυγονωμένο ερυθροκύτταρο δεν περιέχει πολυμερισμένη αιμοσφαιρίνη S και με σταδιακή αποοξυγόνωση, σχηματίζονται μικρές ποσότητες του πολυμερούς μέσα στο δρεπανοκύτταρο. Όσο εξελίσσεται η αποοξυγόνωση αυξάνεται και η ποσότητα των πολυμερών, που καταλαμβάνουν μεγαλύτερες περιοχές, που όσο μεγαλώνουν, το κύτταρο παραμορφώνεται προοδευτικά, λαμβάνοντας ίσως τη χαρακτηριστική δρεπανοειδή του μορφή ή άλλο ανώμαλο σχηματισμό (εικ.22) [157]. Θα πρέπει να τονιστεί ότι ακόμα και σε συνθήκες πλήρους αποοξυγόνωσης, υπάρχει σημαντική ποσότητα μορίων ελεύθερης HbS σε ισορροπία με το πολυμερές εντός του δρεπανοκυττάρου.



Εικόνα 22: Διάγραμμα του φάσματος ενδοκυτταρικού πολυμερισμού των δρεπανοκυττάρων σε διαφορετικές καταστάσεις κορεσμού οξυγόνου: (a) 100%, (b) 75%, (c) 50%, (d) 25% και (e) 0%. Το κύτταρο στο (a) σχήμα περιέχει ολόκληρο μόρια ελεύθερης αιμοσφαιρίνης. Όσο η αποοξυγόνωση εξελίσσεται, εμφανίζονται δεμάτια πολυμερούς, τα οποία μεγαλώνουν, αυξάνονται και ευθυγραμμίζονται, οδηγώντας τελικά στην παραμόρφωση του κυττάρου. Ο βαθμός της ευθυγράμμισης του πολυμερούς και οι ιδιότητές του, ίσως αναμένεται να είναι εξαρτώμενες του βαθμού αποοξυγόνωσης και πιθανών με τις παρελθοντικές ιδιότητες του κυττάρου (υστέρηση). Ανατύπωση από: Constance Tom Noguchi, Alan N. Schechter, *The Intracellular Polymerization of Sickle Hemoglobin and Its Relevance to Sickle Cell Disease, Blood, Volume 58, Issue 6, 1981, Pages 1057-1068, ISSN 0006-4971.* [157]

Η φυσική κατάσταση του πολυμερούς (ποσότητα και ιδιότητες) αποτελεί καθοριστικό παράγοντα των μη ομαλών ιδιοτήτων, που διέπουν το δρεπανοκύτταρο. Επομένως, είναι πιθανό ότι τα κύτταρα, όπως αυτά που φαίνονται στην εικόνα 20b και 20c, τα οποία φέρουν ισοτροπικά διανεμημένο το πολυμερές, ίσως έχουν μη ομαλές ρεολογικές ιδιότητες, αλλά μορφολογικά φαίνονται φυσιολογικά. Εδώ και εξήντα χρόνια είναι γνωστό ότι η αργή αποοξυγόνωση των δρεπανοκυττάρων, οδηγεί σε μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων με τη χαρακτηριστική δρεπάνωση, κάτι που δεν φαίνεται να γίνεται όταν η αποοξυγόνωση

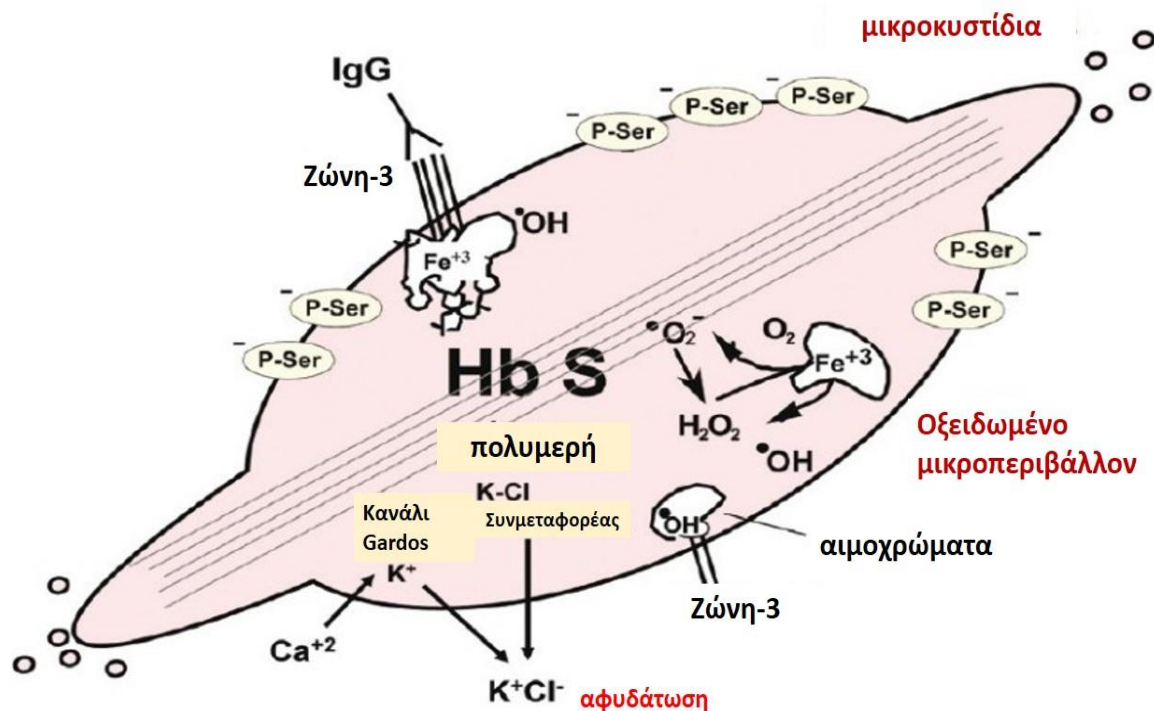
είναι γρήγορη. Όσο η κρυσταλλοποίηση εξελίσσεται, η αργή αποοξυγόνωση ίσως οδηγεί στον σχηματισμό πολύ ευθυγραμμισμένων πολυμερών εξαιτίας της μεγεθυντικής αύξησης μικρού αριθμού περιοχών. Επιπρόσθετα, τα κύτταρα που περιέχουν πολύ ευθυγραμμισμένα πολυμερή, ίσως έχουν άλλες ρεολογικές ιδιότητες, σε σχέση με εκείνα που περιέχουν περισσότερα αταξινόμητα πολυμερή. [157]

7.6.3 Αλλαγές στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και υποπληθυσμοί δρεπανοκυττάρων

Ο σχηματισμός των επιμηκυμένων ινών του πολυμερούς και ίσως οι υψηλές συγκεντρώσεις μη πολυμερισμένης οξειδωμένης HbS, προκαλούν έναν καταρράκτη αρκετών κυτταρικών ανωμαλιών, που συμμετέχουν στον συνολικό παθοφυσιολογικό μηχανισμό της δρεπανοκυτταρικής νόσου.

Η απορρύθμιση της ομοιόστασης των κατιόντων, που οδηγεί στην ενεργοποίηση κάποιων ιοντικών καναλιών, όπως του συµμεταφορέα K^+-Cl^- και ιδιαίτερα των ασβεστιοεξαρτώμενων καναλιών K^+ (κανάλια Gardos), έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια καλίου και άρα την κυτταρική αφυδάτωση, η οποία με τη σειρά της, με την αύξηση της συγκέντρωσης της ενδοκυτταρικής αιμοσφαιρίνης, ευνοεί τον πολυμερισμό της δεοξυαιμοσφαιρίνης S. Επίσης, το συνολικό ενδοκυτταρικό ασβέστιο των δρεπανοκυττάρων αυξάνεται δραματικά σε σχέση με τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα, καθώς παρατηρούνται μειωμένες εκροές και αυξημένες εισροές ασβεστίου, καθώς και ένας μηχανισμός διάχυσης με ανταλλαγή ενδοκυτταρικού μαγνησίου (Mg) με ασβέστιο. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις ασβεστίου, προκαλούν μειωμένη ευκαμπτότητα, ενώ η ωσμωτική ευθραυστότητα των δρεπανοκυττάρων παρατηρείται αυξημένη. [161] Σύμφωνα με νεότερες έρευνες, η ανώμαλη διακίνηση των ιόντων, οφείλεται σε διαταραχές των αντίστοιχων αντλιών και όχι σε διαταραχές της διαπερατότητας της μεμβράνης. Ανεξάρτητα από τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται, τα αφυδατωμένα ερυθροκύτταρα ευθύνονται άμεσα για τη μειωμένη κυτταρική παραμορφωσιμότητα και τη μη ομαλή μεμβρανική μικρορεολογία, που περιγράφεται παρακάτω.

Είναι επίσης χαρακτηριστικό, ότι στα δρεπανοκύτταρα η αιμοσφαιρίνη γίνεται ακόρεστη. Τα αιμοχρώματα συγκεντρώνονται στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης, μαζί με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και συγκεκριμένα τη ζώνη-3. Συγχρόνως με αυτή τη διαδικασία, απελευθερώνεται ποσότητα αίμης και Fe^{3+} , τα οποία προάγουν ένα οξειδωτικό μικροπεριβάλλον και ανεπάρκεια στις αντιοξειδωτικές βιταμίνες C και E. Με τη συγκέντρωση των υπεροξειδίων και την παραγωγή μαλονδυαλδεΐδης (MDA), διαταράσσεται η φυσιολογική ασυμμετρία των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων, με ακόλουθη έκθεση της ανιονικής φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην κυτταρική επιφάνεια. Στη συνέχεια, οι ανοσοσφαιρίνες G Anti-band-3 συγκεντρώνονται στα συσσωματώματα της πρωτεΐνης ζώνη-3, προκαλώντας ερυθροφαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα. Τέλος όλες αυτές οι αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη οδηγούν στη μικροκυστιδιοποίηση (εικ.23) [162]. Οι μεταβολές αυτές σχετίζονται με την εκλεκτική σύνδεση της HbS με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη (σε αντίθεση με την HbA). [163], [164]



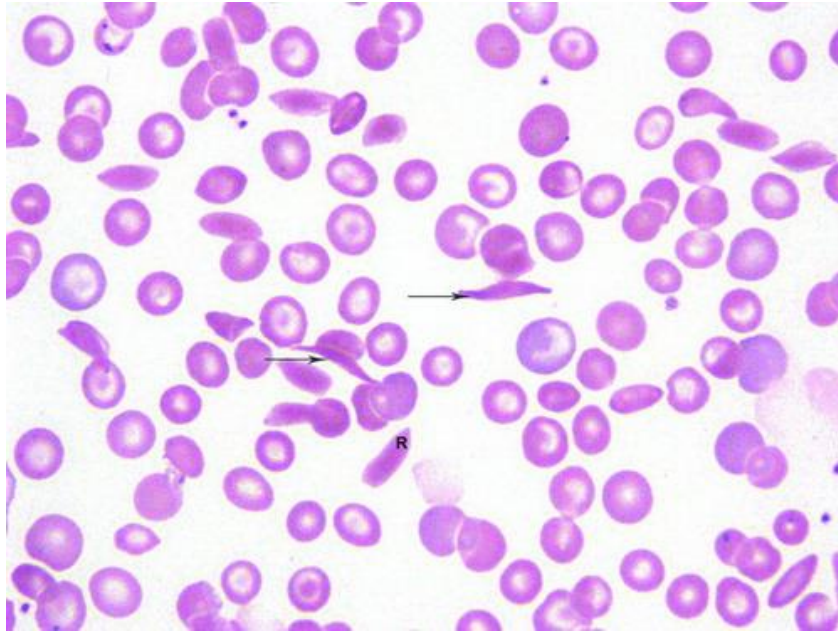
Εικόνα 23: Οι αλλαγές της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης στο δρεπανοκύτταρο. Ο σχηματισμός των ινιδίων του πολυμερούς δεοξυαιμοσφαιρίνης S προκαλεί μια σειρά από αλλαγές στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Επηρεάζονται ιοντικά κανάλια, η δυσλειτουργία των οποίων είναι υπεύθυνη για την κυτταρική αφυδάτωση, που με τη σειρά της συμμετέχει σε ένα κύκλο γεγονότων που οδηγούν στον πολυμερισμό της δεοξυαιμοσφαιρίνης S. Στη συνέχεια απελευθερώνονται αιμοχρώματα, τα οποία οδηγούν στο σχηματισμό συσσωματωμάτων της ζώνης-3, όπου δρουν οι ανοσοσφαιρίνες G anti-band-3. Η απελευθέρωση της αίμης και τα κατιόντα Fe^{3+} ευνοούν τη δημιουργία οξειδωτικού περιβάλλοντος. Συγχρόνως η έκθεση της ανιονικής φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, δημιουργεί μια συγκολλητική επιφάνεια. Τέλος, απελευθερώνονται τα μικροκυστίδια. Ανατύπωση από: Labie D, Elion J. *Molecular and cellular pathophysiology of sickle cell anemia*. *Pathol Biol (Paris)* 1999;47:7-12. [162]

Στις παθοφυσιολογικές μεταβολές της μεμβράνης των δρεπανοκυττάρων, συμπεριλαμβάνονται και κριτήρια που μπορεί να προκαλέσουν σύγχυση, όπως της ετερογένειας και των πολλαπλών διαφορών των υποπληθυσμών των δρεπανοκυττάρων, των διαφορών μεταξύ των ασθενών, ακόμα και της προσωρινής ετερογένειας της συμπεριφοράς μεμονωμένων κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, στους κυριότερους υποπληθυσμούς δρεπανοκυττάρων, συμπεριλαμβάνονται οι εξής:

- **Μη ομαλά πυκνά κύτταρα:** σε αντίθεση με τα ομοιογενή φυσιολογικά δείγματα ερυθροκυττάρων, τα δρεπανοκυτταρικά δείγματα περιέχουν, εκτός από υψηλό αριθμό δικτυοερυθροκυττάρων, έναν υποπληθυσμό μη φυσιολογικών πυκνών κυττάρων, ένα κλάσμα που ποικίλλει σε συγκέντρωση μεταξύ των ασθενών, από 5-50% του συνολικού αριθμού των ερυθροκυττάρων. Αυτά τα κύτταρα είναι αφυδατωμένα, με χαμηλή συγκέντρωση νερού, αυξημένη μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (MCHC) και τροποποιημένο περιεχόμενο μονοσθενών κατιόντων (χαμηλή συγκέντρωση Na-K, λόγω μικρής αύξησης Na^+ και μεγάλης μείωσης K^+). Αυτά τα κύτταρα αποτελούν την πιο χαρακτηριστική συνέπεια της μη ομαλής ομοιόστασης κατιόντων. Τα μη αναστρέψιμα δρεπανοκύτταρα συνιστούν

κύρια συστατικά αυτής της υποομάδας και θα περιγραφούν ξεχωριστά, καθώς τα πυκνά κύτταρα δεν είναι πάντα μη αναστρέψιμα δρεπανοκύτταρα. [164]

- **Μη αναστρέψιμα δρεπανοκύτταρα (ISC - Irreversibly Sickled Cells):** σε αυτή την ομάδα κυττάρων έχει συγκεντρωθεί ιδιαίτερη προσοχή, καθώς αποτελούν κύτταρα που διατηρούν μορφολογικά το επιμηκυμένο δρεπανοειδές σχήμα τους (εικ.24), ακόμα και όταν είναι πλήρως οξυγονωμένα και η αιμοσφαιρίνη S είναι μη πολυμερισμένη. Η μόνιμη δρεπάνωση επέρχεται μετά από επανειλημμένους κύκλους πολυμερισμού και αποπολυμερισμού. Αυτά τα κύτταρα, η συχνότητα των οποίων ποικίλλει από ασθενή σε ασθενή, έχει βρεθεί ότι έχουν μία μεμβρανική ανεπάρκεια, που εμποδίζει την αναστροφή στο αρχικό φυσιολογικό σχήμα αμφίκιουλου δίσκου. Η μεμβρανική πρωτεΐνη σπεκτρίνη και το δίκτυο που σχηματίζει με την ακτίνη, παίζουν καθοριστικό ρόλο για το σχήμα του κυτταροσκελετού των ερυθροκυττάρων και φαίνεται ότι στα ISCs συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην παραμόρφωσή τους. Τα ISCs είναι ιδιαίτερα διαπερατά σε κατίοντα, ιδιαίτερα σε ασβέστιο και κάλιο, με αποτέλεσμα να προσλαμβάνουν μεγάλες ποσότητες ασβεστίου, ενώ αποβάλλουν αυξημένες συγκεντρώσεις ενδοκυτταρικού καλίου και νερού. Επιπλέον, τα ISCs έχουν πολύ μεγαλύτερη ποσότητα αιμοσφαιρίνης, σε σχέση με τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα ή τα αναστρέψιμα δρεπανοκύτταρα. Άλλη μια πιθανότητα της διατήρησης του ανώμαλου σχήματος, ίσως οφείλεται στην αιμοσφαιρίνη S, που συνδέεται με τα μικροϊνίδια στη μεμβράνη, τη στιγμή που το κύτταρο αποοξυγονώνεται και έτσι δεν μπορεί να αποπολυμεριστεί. Σε αυτό ίσως συμβάλλουν επίσης και δευτερογενείς αλλαγές σε άλλες πρωτεΐνες. Ένα ποσοστό των ISCs απομακρύνεται από την κυκλοφορία με μηχανική ενδοαγγειακή αιμόλυση (τα ISCs σχετίζονται με το βαθμό αιμόλυσης) και τα περισσότερα καταστρέφονται στα κύτταρα του ΔΕΣ. [165]
- **Αναστρέψιμα δρεπανοκύτταρα (RSC - Reversible Sickle Cells):** Πριν από τους πολλαπλούς κύκλους πολυμερισμού/αποπολυμερισμού που οδηγούν σε μόνιμη δρεπάνωση, το φαινόμενο είναι ως ένα βαθμό αναστρέψιμο, όταν τα κύτταρα επαναοξυγονώνονται. Σε επίχρισμα περιφερικού αίματος, τα αναστρέψιμα δρεπανοκύτταρα ταξινομούνται ως αναστρέψιμα, όταν είναι ορθόχρωμα, με μη ομαλό σχηματισμό που μοιάζει με σχήμα δρεπανιού ή άλλο ελλειψοειδές σχήμα (εικ.24). [166] Η μορφολογία των δρεπανοκυττάρων δεν είναι βέβαιο ότι σχετίζεται άμεσα με τις κρίσεις, καθώς τα είδη και ο αριθμός τους παραμένουν σταθερά στα επιχρίσματα. Επίσης, οι συνήθεις υπάρχουσες θεραπείες (υδροξυουρία, μεταγγίσεις) δε φαίνεται ότι επηρεάζουν θεαματικά τον αριθμό τους. Παλαιότερη έρευνα του 1984 από τους Chilcote και Gallagher, υποστήριξε τον συσχετισμό των αναστρέψιμων δρεπανοκυττάρων με τις κρίσεις, κάτι που δε φαίνεται να ισχύει σύμφωνα με τις νεότερες έρευνες. Περισσότερα πειραματικά δεδομένα είναι απαραίτητα για τη διασαφήνιση αυτού του ζητήματος. [166], [167]



Εικόνα 24: Επίχρισμα περιφερικού αίματος ανήλικου ασθενή με δρεπανοκυτταρική νόσο. Στο επίχρισμα φαίνεται ένα μη αναστρέψιμο δρεπανοκύτταρο (R) και δύο μη αναστρέψιμα κύτταρα (βέλη). Επιπλέον φαίνεται ανισοκυττάρωση (χαρακτηριστικό της δρεπανοκυτταρικής νόσου), στοχοκύτταρα και αιμοπετάλια. Χρησιμοποιήθηκε μεγεθυντικός φακός 100X. Ανατύπωση από: Alvarez O, Montague NS, Marin M, O'Brien R, Rodriguez MM. Quantification of sickle cells in the peripheral smear as a marker of disease severity. *Fetal Pediatr Pathol.* 2015 Jun;34(3):149-54. [166]

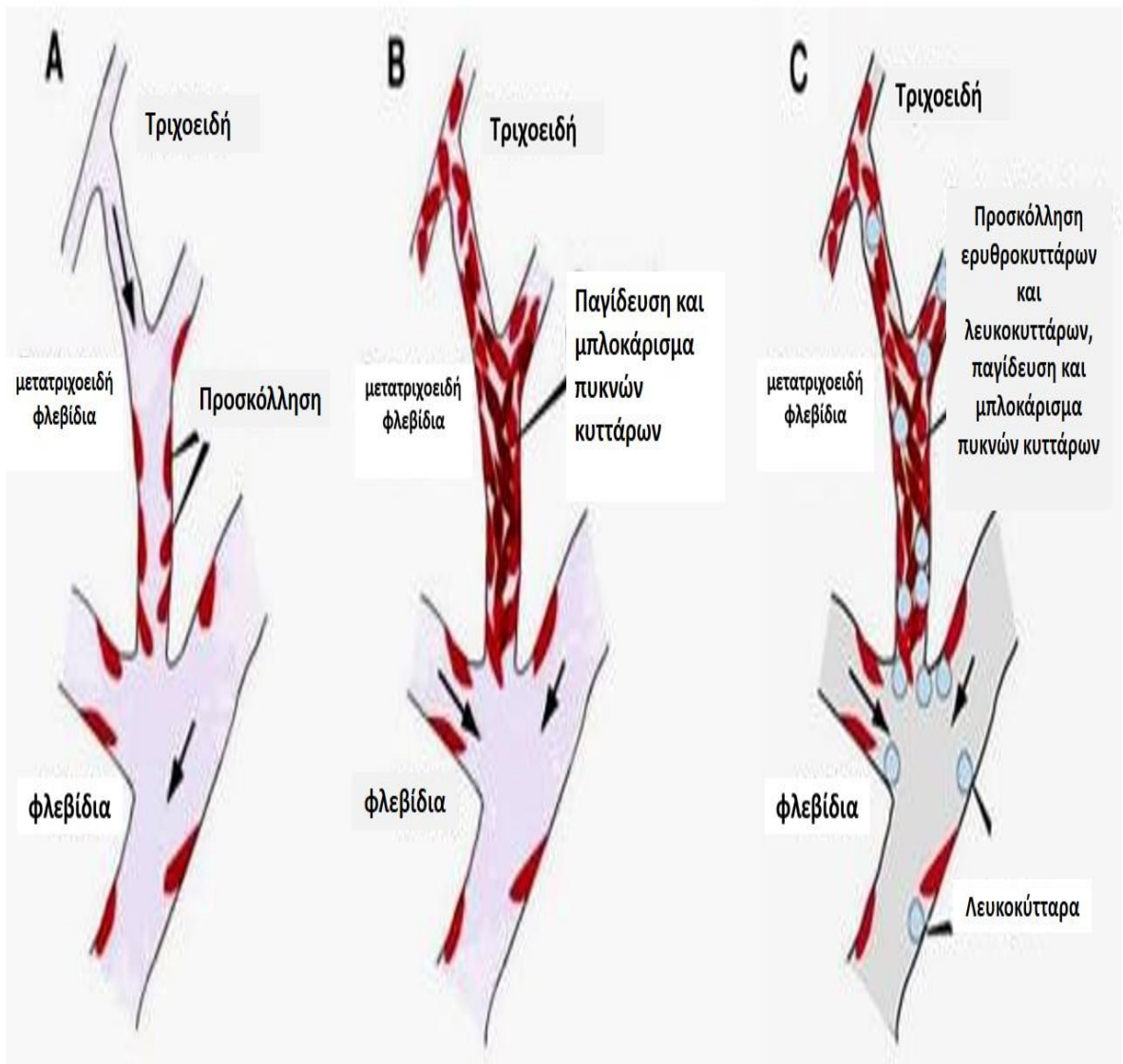
7.7 Κυτταρικές αλληλοεπιδράσεις στη δρεπανοκυτταρική νόσο

7.7.1 Προσκόλληση στο ενδοθήλιο

Κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της δρεπανοκυτταρικής νόσου κατέχουν ο πολυμερισμός της αιμοσφαιρίνης S και η δρεπάνωση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Παρόλα αυτά, οι συγκεκριμένες παθολογίες δεν αρκούν για να ξεκινήσουν τα αποφρακτικά επεισόδια. Η μη ομαλή προσκόλληση των δρεπανοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο, έχει συγκεντρώσει έντονη προσοχή ως πιθανός παράγοντας που πυροδοτεί την απόφραξη στη δρεπανοκυτταρική νόσο. Ανάλογα με την παραμόρφωσή τους, οι δρεπανοκυτταρικοί υποπληθυσμοί παίζουν ρόλο στην προσκόλληση στο ενδοθήλιο και την κλινική σοβαρότητα της αγγειακής απόφραξης στη νόσο. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι τα πυκνά δρεπανοκύτταρα προσκολλώνται πολύ περισσότερο στο ενδοθήλιο, σε σχέση με τους λιγότερο πυκνούς και όχι τόσο παραμορφωμένους υποπληθυσμούς. Επομένως η κυτταρική πυκνότητα, το σχήμα και τα μεμβρανικά χαρακτηριστικά των δρεπανοκυττάρων παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλλησή τους στο ενδοθήλιο. Πιο συγκεκριμένα, το μοντέλο των δύο βημάτων που παρουσιάστηκε από τους Kaul et al., υποστηρίζει ότι η εκλεκτική προσκόλληση των παραμορφωμένων δρεπανοκυττάρων (δικτυοερυθροκύτταρα και δισκοκύτταρα) στα μετατριχοειδή φλεβίδια, ακολουθείται από εκλεκτική παγίδευση πυκνών δρεπανοκυττάρων (πυκνά δισκοκύτταρα και ISCs), γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε απόφραξη. (εικ.25, A και B). [168], [169]

7.7.2 Λευκά αιμοσφαίρια

Οι ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο έχουν αυξημένες τιμές λευκών αιμοσφαιρίων στην περιφερική κυκλοφορία. Η προφλεγμονώδης κατάσταση στη νόσο αποδίδεται σε επεισόδια τραυματικής επαναιμάτωσης, που προκαλούνται από αποφρακτικά επεισόδια. Η τραυματική επαναιμάτωση στη δρεπανοκυτταρική νόσο, αποδεικνύεται από την ενδοθηλιακή καταστροφή/ενεργοποίηση, την αποκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων, την παραγωγή οξειδωτικών, αυξημένες συγκεντρώσεις κυτοκινών και ιστικού παράγοντα (Tissue Factor – TF). Σε αυτές τις συνθήκες, η αυξημένη στρατολόγηση των λευκών αιμοσφαιρίων και η πιθανή αλληλοεπίδρασή τους με τα δρεπανοκύτταρα στη μικροκυκλοφορία, μπορεί να οδηγήσει σε αργή ροή, αυξημένους χρόνους μετάβασης, υποξία και δρεπάνωση, όπως φαίνεται και σε πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια. Σύμφωνα με το μοντέλο των δύο βημάτων, που περιγράφηκε παραπάνω, (εικ.25, C), δεν αρκεί μόνο η προσκόλληση των δρεπανοκυττάρων για να επηρεαστεί *in vivo* η ροή της μικροκυκλοφορίας, αλλά και η στρατολόγηση των λευκών αιμοσφαιρίων, τα οποία δρουν με παρόμοιο τρόπο με τα δρεπανοκύτταρα στην προσκόλληση στο μετατριχοειδικό ενδοθήλιο, παγιδεύοντας μηχανικά τα επιμήκη δρεπανοκύτταρα. Η στρατολόγηση των λευκών αιμοσφαιρίων και η επακόλουθη παγίδευση των δρεπανοκυττάρων, μειώθηκε πειραματικά, με τη χορήγηση αντισωμάτων στην Ρ-σελεκτίνη (μόριο προσκόλλησης, δρα ως υποδοχέας που υποστηρίζει τη σύνδεση των λευκοκυττάρων στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και το ενδοθήλιο) [170] και με τη θεραπευτική χορήγηση με ενδοφλέβια ανθρώπινη γάμα σφαιρίνη (intravenous Human Gamma Globulin - IVIG) σε ποντίκια. [171] Πιθανά, η ανοσοσφαιρίνη εκφράζει πολλαπλούς επιτόπους και ίσως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και θεραπευτικά για τη δρεπανοκυτταρική νόσο. [169]



Εικόνα 25: Σχηματικά μοντέλα αγγειακής απόφραξης στη δρεπανοκυτταρική αναιμία. (Α) Αρχική προσκόλληση παραμορφωμένων δρεπανοκυττάρων σε μικρού διαμέτρου μετατριχοειδή φλεβίδια. (Β) Η προσκόλληση των παραμορφωμένων δρεπανοκυττάρων ακολουθείται από εκλεκτική παγίδευση πυκνών δρεπανοκυττάρων πάνω στα ήδη προσκολλημένα κύτταρα. (C) Εναλλακτικά, η στρατολόγηση των λευκών αιμοσφαιρίων στα φλεγμονώδη αγγεία ίσως πυροδοτεί εκλεκτική παγίδευση πυκνών δρεπανοκυττάρων. Ανατύπωση από: Kaul DK, Fabry ME, Nagel RL. Erythrocytic and vascular factors influencing the microcirculatory behavior of blood in sickle cell anemia. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1989;565:316–326. [168]

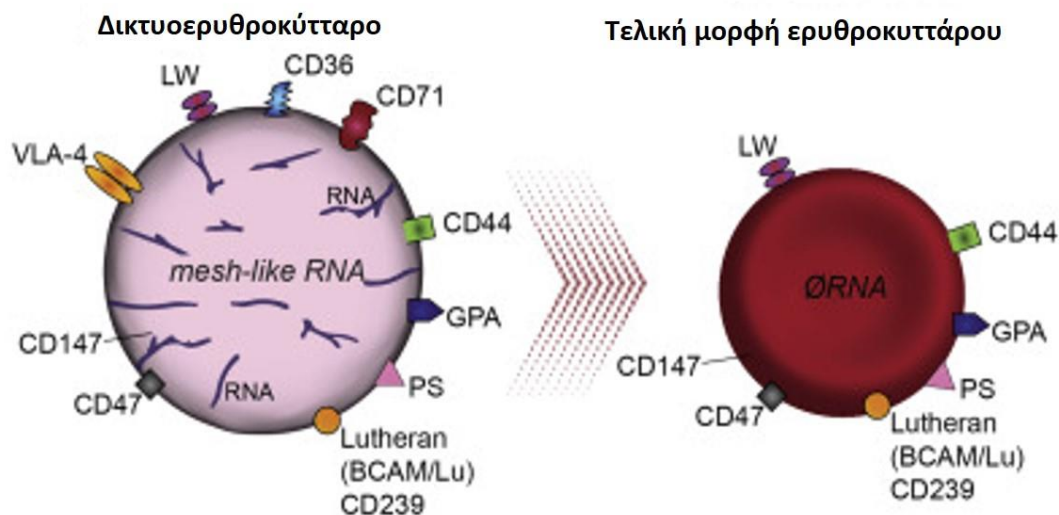
7.7.3 Δικτυοερυθροκύτταρα - ΔΕΚ (Reticulocytes)

Τα δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ) είναι απύρηννα πρόδρομα ερυθροκύτταρα του τελικού σταδίου της διαφοροποίησης, τα οποία διακρίνονται από τα τελικά διαφοροποιημένα ερυθροκύτταρα βάσει ορισμένων μοναδικών ιδιοτήτων τους, όπως ο πολύπλοκος κυτταροσκελετός, το υπολειμματικό δίκτυο ριβοσωματικού rRNA που περιέχουν (διακριτό στο μικροσκόπιο με κυανό του μεθυλενίου) και των ιντεγκρίνων που εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια, οι οποίες απουσιάζουν από τα ώριμα ερυθροκύτταρα.

Φυσιολογικά, ο μυελός των οστών παράγει περίπου δύο εκατομμύρια δικτυοερυθροκύτταρα ανά δευτερόλεπτο, αλλά στις αιμολυτικές αναιμίες, όπως στη δρεπανοκυτταρική, η παραγωγή αυτή μπορεί να αυξηθεί περίπου είκοσι φορές παραπάνω, αλλάζοντας δραματικά τη ρεολογία των ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία. Έτσι, ο αριθμός τους αποτελεί δείκτη της χρόνιας αιμολυτικής νόσου στη δρεπανοκυτταρική αναιμία. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα δρεπανοκύτταρα είναι ετερογενή και ταξινομούνται βάσει της πυκνότητάς τους. Τα ΔΕΚ αποτελούν το λιγότερο πυκνό τμήμα σε φυγοκεντρημένο δείγμα (άνω τμήμα ιζήματος), ενώ τα μη αναστρέψιμα δρεπανοκύτταρα (ISCs), που είναι ιδιαίτερα πυκνά, κατακάθονται στον πυθμένα του σωληναρίου. Η παραμόρφωση των διαφόρων ειδών των δρεπανοκυττάρων εξαρτάται τόσο από εσωτερικούς παράγοντες (π.χ. μεμβρανικά αντιγόνα, συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης), όσο και από εξωτερικούς (π.χ. περιβαλλοντικούς παράγοντες και παράγοντες του πλάσματος). Τα λιγότερο πυκνά ΔΕΚ είναι πιο παραμορφώσιμα και λιγότερο άκαμπτα από τα ISCs στη δρεπανοκυτταρική νόσο. Αντίθετα με τα ISCs, στα οποία η αποοξυγόνωση και η αφυδάτωση οδηγούν σε πολυμερισμό της αιμοσφαιρίνης S, κυτταρική ακαμψία και μειωμένη παραμορφωσιμότητα, με υψηλό ρίσκο απόφραξης των αγγείων, τα ΔΕΚ θεωρούνται ότι συμβάλλουν πρώτα σε αποφρακτικό ρίσκο, εξαιτίας του μεγέθους τους και των μεμβρανικών ιδιοτήτων τους, που περιλαμβάνουν την αυξημένη προσκόλληση και τη μειωμένη παραμορφωσιμότητα. Επιπλέον, τα δρεπανοκυτταρικά ΔΕΚ περιέχουν συχνά μιτοχόνδρια, τα οποία προάγουν την αιμόλυση, λόγω των αυξημένων επιπέδων ROS που περιέχουν. Ιδιαίτερα στα λεπτότερα τριχοειδή αγγεία, η μεμβράνη των δρεπανοκυτταρικών ΔΕΚ κυριαρχεί στη διαδικασία της απόφραξης, καθώς τα κύτταρα πολλές φορές πρέπει να διαπεράσουν αγγεία πολύ μικρότερα από το δικό τους μέγεθος, αυξάνοντας την επαφή τους με τις ενδοθηλιακές μεμβράνες. Πρόσφατες *in vitro* μελέτες δείχνουν ότι τα ΔΕΚ έχουν μοναδικές ικανότητες προσκόλλησης, σε σχέση με τα ISCs και τα ερυθροκύτταρα χωρίς δρεπάνωση.

Αυτού του είδους η προσκολλητική παθολογία προέρχεται εν μέρει και από τη στρεσογόνα παραγωγή τους στον μυελό των οστών. Η φυσιολογική έξοδος των ερυθροκυττάρων από τον μυελό, περιλαμβάνει τη διάσπαση των «φωλιών» του μυελού, πολύπλοκες διασυνδέσεις με τα μακροφάγα και αποπυρηνοποίηση των ορθοχρωματικών ερυθροβλαστών. Η διαφοροποίηση από τον ορθοχρωματικό ερυθροβλάστη σε ώριμο ερυθροκύτταρο, ελέγχεται από παράγοντες όπως η ενυδάτωση και ο έλεγχος του όγκου, η αναδιάταξη της μεμβράνης και η κυστιδιοποίηση. Συνεπώς, οι κυτταροπλασματικές, οι κυτταροσκελετικές και οι μεμβρανικές ιδιότητες των ΔΕΚ στη δρεπανοκυτταρική αναιμία διαφέρουν τόσο από τα ερυθροποιητικά προγονικά κύτταρα, όσο και από τους ώριμους ερυθροβλάστες. Μια στρεσογόνα, ανώριμη απελευθέρωση από τη μυελική φωλιά οδηγεί στην παραγωγή ΔΕΚ που εκφράζουν ιντεγκρίνες και άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες, που δεν είναι συνήθως παρούσες ή είναι παρούσες σε μικρές συγκεντρώσεις στα ερυθροκύτταρα της κυκλοφορίας. Αυτές περιλαμβάνουν τις CD71, CD36, VLA-4 και την PS (εικ.26). [172] Πιθανόν, οι μη φυσιολογικές προσκολλητικές ιδιότητες των ανώριμων ΔΕΚ στην κυκλοφορία των ασθενών με δρεπανοκυτταρική νόσο, συμβάλλουν στο μηχανισμό της απόφραξης των αγγείων και στις διαταραχές της αιμόστασης. Επιπλέον, το σπληνικό έμφρακτο και η δυσλειτουργία, συμβάλλουν στην καθυστερημένη ωρίμανση των ερυθροκυττάρων και στη μη φυσιολογική κυστιδιοποίηση των παραπροϊόντων, που αποτελούν συνέπειες της

στρεσογόνας ερυθροποίησης και της επαγόμενης δικτυοερυθροκυττάρωσης. Η μη ομαλή έκφραση των προσκολλητικών μεμβρανικών συστατικών, ίσως συμβάλλει στις διαδραστικές επαφές μεταξύ των κυττάρων και στη δημιουργία κυτταρικών αθροισμάτων, μεταξύ των δρεπανοκυτταρικών ΔΕΚ και άλλων κυττάρων του αίματος, όπως μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα και αιμοπετάλια. Ο ρόλος αυτών των αθροισμάτων στην απόφραξη των αγγείων στη δρεπανοκυτταρική αναιμία δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. [172]

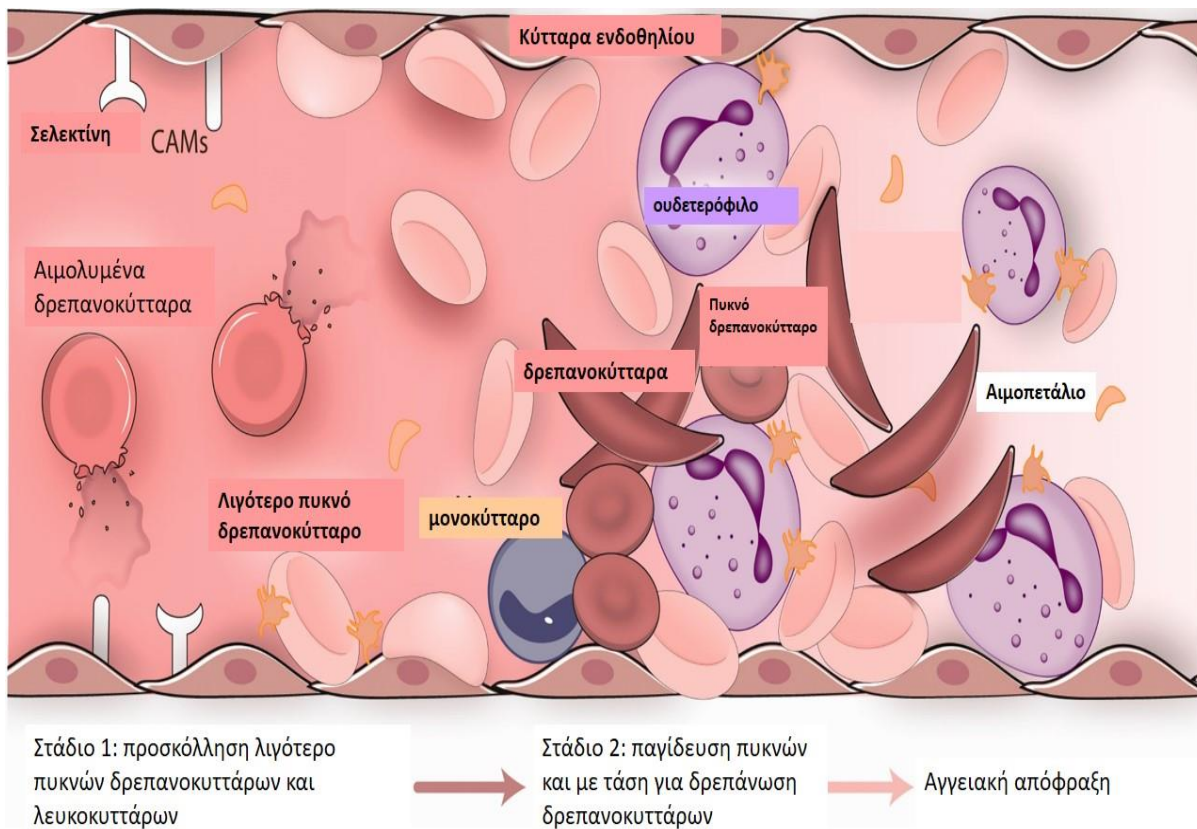


Εικόνα 26: Δικτυοερυθροκύτταρο και ώριμο ερυθροκύτταρο στη ΔΝ. Τα δικτυοερυθροκύτταρα στην κυκλοφορία στη ΔΝ, μπορούν να ταυτοποιηθούν από την παρουσία του κυτταροπλασματικού RNA και από μόρια προσκόλλησης στην επιφάνειά τους, τα οποία δεν ανευρίσκονται στα ώριμα ερυθροκύτταρα. (LW=ομάδα αίματος Landsteiner-Weiner (ICAM-4), PS=Φωσφατιδυλοσερίνη GPA=Γλυκοφορίνη-A). Ανατύπωση από: Carden MA, Fasano RM, Meier ER. Not all red cells sickle the same: Contributions of the reticulocyte to disease pathology in sickle cell anemia. *Blood Rev.* 2020 Mar;40:100637. doi: 10.1016/j.blre.2019.100637. Epub 2019 Nov 5. [172]

7.7.4 Καταστροφή και ενεργοποίηση του ενδοθηλίου

Είναι κοινή η αντίληψη, ότι τα μετατριχοειδή φλεβίδια αποτελούν τις αρχικές θέσεις των αλληλοεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων του αίματος με το ενδοθήλιο και της δημιουργίας της φλεγμονής. Οι ερυθροκυτταρικές ρεολογικές ανωμαλίες, όπως ήδη αναφέρθηκε, αποτελούν πιθανή πηγή του ενδοθηλιακού τραυματισμού. Ο ενδοθηλιακός τραυματισμός στη δρεπανοκυτταρική αναιμία αναφέρεται ότι, ίσως οδηγεί σε αποκόλληση των τραυματισμένων ενδοθηλιακών κυττάρων, στη μεταφορά τους στην περιφερική κυκλοφορία και στην απόπτωση του τραυματισμένου ενδοθηλίου. [173] Επιπρόσθετα, η παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου από τα δρεπανοκύτταρα, λόγω της παρουσίας της ασταθούς αιμοσφαιρίνης S και της αυτοοξειδωσης του σιδήρου της αίμης, συμβάλλουν στην ενδοθηλιακή ενεργοποίηση. [174] Η αυξημένη προσκόλληση των δρεπανοκυττάρων προκαλεί οξειδωτικό στρες σε καλλιέργειες ενδοθηλίου, όπως αποδεικνύεται από την αυξημένη υπεροξειδωση, την ενεργοποίηση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ (factor-κΒ) και την αυξημένη έκφραση του ενδοκυτταρικού μορίου προσκόλλησης 1

(Intercellular Adhesion Molecule 1 - ICAM-1), του μορίου προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων 1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1 - VCAM-1) και της E-σελεκτίνης (εικ.27). [175] In vivo, η ανάστροφη δρεπάνωση, η απώλεια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και ο ενδοθηλιακός τραυματισμός εξαιτίας της προσκόλλησης, είναι πιθανό να απελευθερώσει ουσίες [αιμοσφαιρίνη και διφωσφορική αδενοσίνη (ADP)] στην κυκλοφορία του αίματος, που μπορούν να προκαλέσουν ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και συσσωμάτωση. Η απενεργοποίηση του NO από την ελεύθερη αίμη του πλάσματος (ως συνέπεια της αιμόλυσης), ακολουθείται από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. [176] Επίσης, το τραυματισμένο ενδοθήλιο είναι γνωστό ότι απελευθερώνει ADP, το οποίο αποτελεί πιθανό ενεργοποιητή των αιμοπεταλίων και οδηγεί στη συσσωμάτωσή τους. [177] Επομένως, είναι πιθανό ότι η προσκόλληση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο ενδοθήλιο, το ενεργοποιεί, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση και την εμπλοκή των αιμοπεταλίων και των λευκών αιμοσφαιρίων στην αποφρακτική διαδικασία (εικ.27). [178]



Εικόνα 27: Προτεινόμενος μηχανισμός για τη συμμετοχή των ερυθροκυττάρων στη διαδικασία της αγγειακής απόφραξης. Φλεγμονώδεις μηχανισμοί, που δημιουργούνται από ενδοαγγειακή αιμόλυση και ισχαιμικές διαδικασίες, εκτός άλλων παραγόντων, οδηγούν σε ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων, λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων. Το ενεργοποιημένο ενδοθήλιο παρουσιάζει πολλαπλά μόρια προσκόλλησης στην επιφάνειά του, που περιλαμβάνουν την P-σελεκτίνη, την E-σελεκτίνη και το μόριο ICAM-1, που μεσολαβούν για την προσκόλληση στο αγγειακό τοίχωμα. Τα λιγότερο πυκνά, παραμορφώσιμα, με μικρότερη τάση για δρεπάνωση ερυθροκύτταρα, στρατολογούνται για την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου, όπως επίσης και τα λευκοκύτταρα, ιδιαίτερα τα ουδετερόφιλα. Στη μικροκυκλοφορία, ιδιαίτερα στα τριχοειδή αγγεία, η μηχανική απόφραξη που προκαλείται, αυξάνει τον χρόνο διέλευσης και άλλων δρεπανοκυττάρων στο αγγείο, οδηγώντας σε παγίδευση πυκνότερων, με τάση προς δρεπάνωση κυττάρων, καθώς και ποικίλων κυτταρικών συναθροίσεων, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή της ρεολογίας και τοπική δρεπάνωση, παρεμπόδιση της κυκλοφορίας και

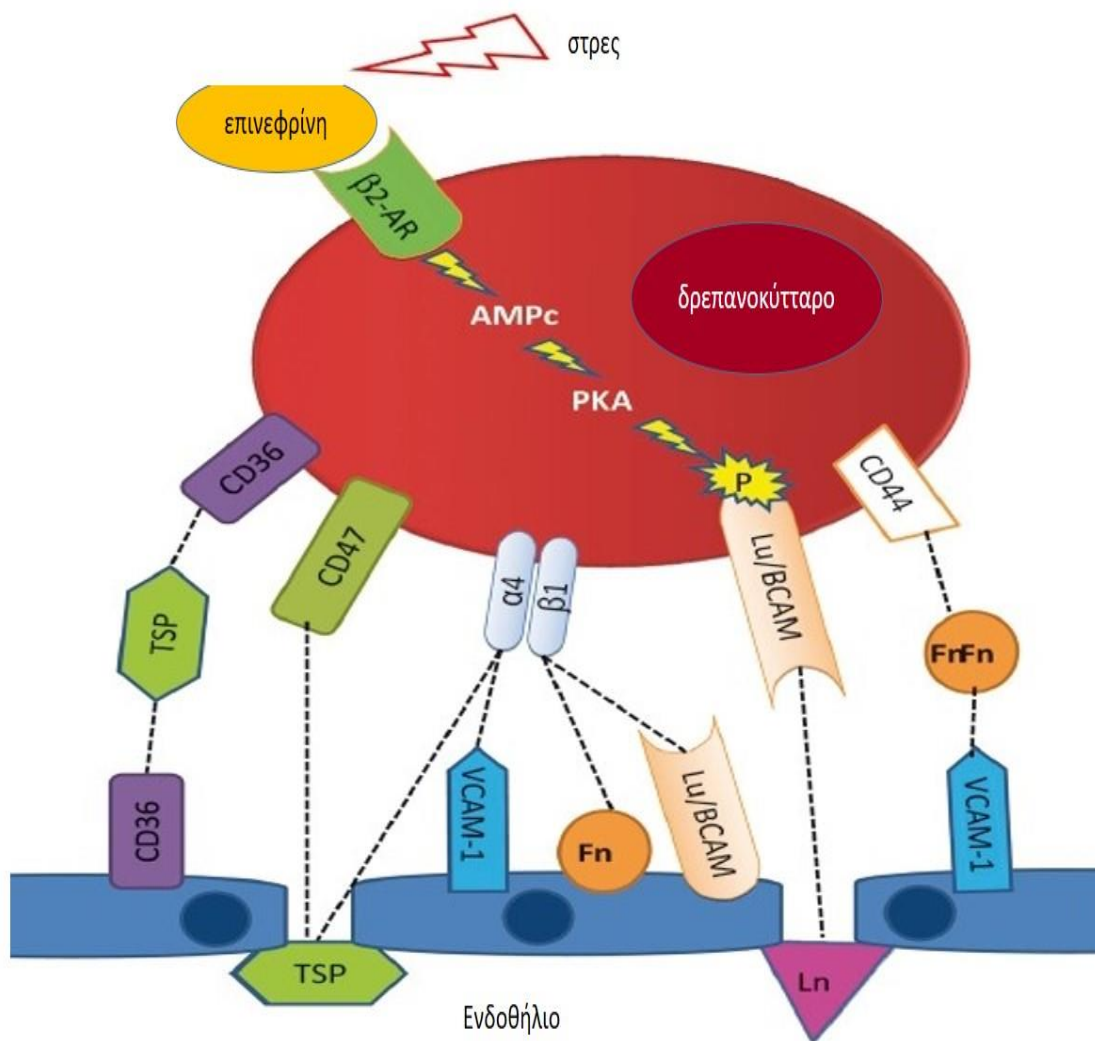
τελικά απόφραξη του αγγείου. Ανατύπωση από: Conran N, Embury SH. Sick cell vaso-occlusion: The dialectic between red cells and white cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2021 Jun;246(12):1458-1472. doi: 10.1177/15353702211005392 [178]

7.7.5 Μόρια προσκόλλησης

Προηγούμενες μελέτες έχουν εμπλέξει πολλαπλά μόρια προσκόλλησης στον μηχανισμό της προσκόλλησης των δρεπανοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για την ενεργοποίηση της δρεπανοκυτταρικής προσκόλλησης από συγκεκριμένα μόρια *in vivo*. Αντίθετα με την αλληλοεπίδραση των λευκών αιμοσφαιρίων με το ενδοθήλιο, όπου η προσκόλληση είναι κυλιόμενη και σταθερή, ενώ η μετανάστευση των λευκών αιμοσφαιρίων συμβαίνει μέσω μιας καλά ρυθμιζόμενης ακολουθίας αλληλοεπίδρασης μεταξύ υποδοχέα-προσδέτη, η δρεπανοκυτταρική προσκόλληση μάλλον δεν ακολουθεί τον ίδιο δρόμο. [179]

Τα μόρια προσκόλλησης, που εμπλέκονται στην προσκόλληση των δρεπανοκυττάρων στο ενδοθήλιο ταξινομούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τους ερυθροκυτταρικούς υποδοχείς, τις προσκολλητικές πρωτεΐνες-γέφυρες και τους ενδοθηλιακούς υποδοχείς. Τα δρεπανοκυτταρικά μόρια/υποδοχείς προσκόλλησης περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη CD36 και την ιντεγκρίνη $\alpha_4\beta_1$, τα οποία εκφράζονται στα στρεσαρισμένα δρεπανοειδή δικτυοερυθροκύτταρα, όπως επίσης και τα θειϊκά γλυκολιπίδια, που εκτίθενται στη μεμβράνη τους. [180] Τα μόρια CD36 και $\alpha_4\beta_1$, μπορούν να μειώσουν την προσκόλληση των ΔΕΚ, όταν αλληλοεπιδρούν με τη θρομβοσπονδίνη (TSP) και το VCAM-1 αντίστοιχα. [181], [182] Επιπλέον, μια νέα κατηγορία μορίων προσκόλλησης στα δρεπανοκύτταρα, έχει περιγραφεί ότι απαιτεί ενεργοποίηση με μεταγωγή σήματος. Αυτά περιλαμβάνουν το βασικό μόριο προσκόλλησης 1/Lutheran (B-CAM-1/Lu - Basal Cell Adhesion Molecule 1), τη σχετιζόμενη με ιντεγκρίνη πρωτεΐνη (IAP - Integrin-Associated Protein) και το ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης 4 (ICAM-4) [169] (εικ.28) [163] Άλλοι μηχανισμοί που αναφέρονται είναι η έκθεση της PS στην επιφάνεια των δρεπανοκυττάρων, αλλά η τάση της για προσκόλληση δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. [183]

Οι προσκολλητικές πρωτεΐνες-γέφυρες, περιλαμβάνουν την TSP (Thrombospondin) και τον παράγοντα von Willebrand (vWf), τα οποία συντίθενται στο ενδοθήλιο και τα αιμοπετάλια, ενώ ανευρίσκονται στο πλάσμα και την επιφάνεια του επιθηλίου. Η ενδοθηλιακή P-σελεκτίνη θεωρείται ότι εμπλέκεται στην προσκόλληση των δρεπανοκυττάρων, ενώ η ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_3$ αποτελεί τον κυριότερο ενδοθηλιακό υποδοχέα. [169]



Εικόνα 28: Προσκόλληση των δρεπανοκυττάρων στο ενδοθήλιο και κυτταρική ενεργοποίηση. Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων αλληλεπιδράσεων, που συμμετέχουν στη μη ομαλή προσκόλληση των δρεπανοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Τοπικά, η ενδοθηλιακή καταστροφή, εμφανίζει υπο-επιθηλιακές δομές, οι οποίες επίσης συμμετέχουν στην προσκολλητική διαδικασία. Κάποιες προσκολλητικές πρωτεΐνες ενεργοποιούνται από εξωκυτταρικό ερέθισμα. Αυτό αφορά την περίπτωση των μορίων προσκόλλησης της ομάδας αίματος Lutheran (Lu/BCAM), το οποίο εκφράζει τις προσκολλητικές του ιδιότητες, μόνο όταν φωσφορυλιώνεται, μέσω του εξαρτώμενου από την κινάση A μονοπατιού, όταν το ερυθροκύτταρο ενεργοποιείται από την επινεφρίνη. (2-AR=αδρενεργικός υποδοχέας τύπου 2, Fn=φιμπρονεκτίνη, TSP=θρομβοσπονδίνη, Ln=λαμινίνη, α4β1, αβ1 ιντεγκρίνη (ή VLA-4). Ανατύπωση από: Odièvre MH, Verger E, Silva-Pinto AC, Elion J. Pathophysiological insights in sickle cell disease. *Indian J Med Res.* 2011 Oct;134(4):532-7. [163]

7.7.6 Ο ρόλος του μονοξειδίου του αζώτου (NO)

Τα τελευταία χρόνια, πολλές κλινικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην υπόθεση ότι η μειωμένη διαθεσιμότητα του NO και η σηματοδότηση, ίσως παίζουν κεντρικό ρόλο στην παθολογία των επιπλοκών της δρεπανοκυτταρικής νόσου, που περιλαμβάνουν την αγγειακή απόφραξη και τον πόνο. Διάφορα μοριακά γεγονότα μπορούν ασφαλώς να αυξήσουν τις ανάγκες σε NO, μειώνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητά του. Η δρεπάνωση και η αιμόλυση των ερυθροκυττάρων, που οφείλεται στον πολυμερισμό της αιμοσφαιρίνης S, έχει ως

αποτέλεσμα την απελευθέρωση της κυτταρικής ελεύθερης αιμοσφαιρίνης (free-Hb), η οποία διαχέεται στο πλάσμα και περισυλλέγει το NO, αυξάνοντας την κατανάλωσή του. Επιπλέον, η αιμόλυση έχει ως συνέπεια την απελευθέρωση της L-αργινίνης, μειώνοντας αποτελεσματικά την παραγωγή του NO από τις συνθετάσες του NO (NOS). Πράγματι, τα επίπεδα αργινίνης στους δρεπανοκυτταρικούς ασθενείς παρουσιάζονται χαμηλά σε σχέση με υγιή άτομα (controls). Επιπρόσθετα, η ανεπάρκεια της αργινίνης, ως αποτέλεσμα της ενεργότητας της αργινάσης, έχει συνδεθεί με την απενεργοποίηση των NOS ενζύμων και με την παραγωγή σουπεροξειδίων, που στη συνέχεια αντιδρούν με το NO προς σχηματισμό υπεροξυνιτροδών, τα οποία μειώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα του NO. Η αγγειακή φλεγμονή και η παραγωγή υπεροξειδίων στη δρεπανοκυτταρική αναιμία, έχουν ως πιθανό αποτέλεσμα την ανεπάρκεια του απαραίτητου NOS συμπαράγοντα τετραϋδροβιοπτερίνη, η οποία ενεργοποιεί τα NOS ένζυμα προς παραγωγή του NO. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι οι δρεπανοκυτταρικοί ασθενείς έχουν αυξημένα επίπεδα του ενδογενούς αναστολέα του NO ασυμμετρική διμεθυλαργινίνη (ADMA). Επομένως, η ανεπάρκεια του NO στη δρεπανοκυτταρική νόσο, περιλαμβάνει διάφορα γεγονότα, που προκαλούνται από την αιμόλυση. Ως αποτέλεσμα, η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO, οδηγεί σε αγγειοσυστολή, ενδοθηλιακό τραυματισμό, παραγωγή ROS, ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, προσκόλληση των λευκών αιμοσφαιρίων, απόφραξη των αγγείων και ισχαιμία, τα οποία πιθανών συμβάλλουν στην ανάπτυξη των οξέων κρίσεων πόνου. [184]

7.8 Διαταραχές πήξης - αιμόστασης

Οι ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο εμφανίζουν υψηλά επίπεδα του θραύσματος προθρομβίνης 1.2 και του συμπλέγματος θρομβίνης-αντιθρομβίνης (TAT - Thrombin – antithrombin complex), που αποτελούν δείκτες της παραγωγής θρομβίνης. Επιπλέον παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα δ-διμερών (D-dimers, D-D), ινοπεπτιδίων και συμπλόκων πλασμίνης-αντιπλασμίνης, τα οποία αντανάκλουν την εξαρτώμενη από θρομβίνη κάθαρση του ινωδογόνου, το σχηματισμό θρόμβου και την ινωδόλυση. Σχετικά πρόσφατη μελέτη του Whelihan και των συνεργατών του, δείχνει αυξημένη παραγωγή θρομβίνης στο ολικό αίμα και όχι στο πλάσμα δρεπανοκυτταρικών ασθενών, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι αυτή η αύξηση δεν συνδέεται με την έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης, που σημαίνει ότι πιθανόν τα κυτταρικά συστατικά του αίματος είναι αυτά που συμβάλλουν στην αύξηση της θρομβίνης στη νόσο. [185] Παρόμοια στοιχεία έδειξαν και μελέτες σε ποντίκια με ΔN σε σταθερή κατάσταση, όπου τα επίπεδα του συμπλέγματος TAT ανευρίσκονται σταθερά ανεβασμένα, ενώ σε κατάσταση υποξίας αυξάνονται περισσότερο. [186] Επομένως η χρόνια κατάσταση ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, οξειδωτικού στρες και φλεγμονής, προάγουν μια υπερπηκτική κατάσταση στη δρεπανοκυτταρική νόσο. Ανάλογα με τα επίπεδα αυτών των βιοδεικτών, είναι και τα αυξημένα θρομβοεμβολικά επεισόδια σε ασθενείς με ΔN. Ο φλεβικός θρομβοεμβολισμός, που αποτελείται από πνευμονικό εμβολισμό και αυξημένη θρόμβωση, συνδέεται με αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας για τους ασθενείς, ενώ η χρόνια υπερπηκτική κατάσταση συνδέεται και με καρδιοαναπνευστικές παθήσεις, όπως η πνευμονική υπέρταση. [187]

7.8.1 Ο ρόλος του ιστικού παράγοντα (TF – Tissue Factor)

Η υπερπηκτική κατάσταση συνδέεται συχνά με την αυξημένη έκφραση του ιστικού παράγοντα (TF) στα αγγειακά κύτταρα. Ο TF είναι ο αρχικός ενεργοποιητής του εξωγενούς μονοπατιού της αιμόστασης. Παράγεται στα μονοκύτταρα και τα περιαγγειακά κύτταρα και απομονώνεται φυσιολογικά από το αίμα για να εξυπηρετήσει ως αιμοστατικός παράγοντας, για τη μείωση της απώλειας του αίματος σε περίπτωση αγγειακού τραυματισμού. Παρόλα αυτά, σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, στις οποίες συμπεριλαμβάνεται και η δρεπανοκυτταρική νόσος, παρατηρείται υπερέκφραση του TF. Κλινικά, υπάρχει ισχυρή σύνδεση μεταξύ των δεικτών της αιμόλυσης και των δεικτών της ενεργοποίησης της πήξης στους ασθενείς με ΔΝ. Έχει αναφερθεί πειραματικά, ότι η αίμη προκαλεί ενεργοποίηση της πήξης *in vivo* σε ποντίκια, μέσω του εξαρτώμενου από τον TF μονοπατιού. Παρόλα αυτά, όταν ουδετεροποιήθηκαν τα τοξικά επίπεδα της ελεύθερης αίμης με αιμοπηξίνη, υπήρξε μερική αναστολή της παραγωγής της θρομβίνης, γεγονός που δείχνει ότι η αίμη δεν αποτελεί τον μοναδικό ενεργοποιητή του πήκτικού καταρράκτη. [188] Επιπλέον, η αναστολή του TF φαίνεται ότι, όχι μόνο εμποδίζει την ενεργοποίηση της πήξης, αλλά μειώνει τα επίπεδα της αμυλοειδούς πρωτεΐνης και της ιντερλευκίνης-6 στο πλάσμα, την ουδετερόφιλο-εξαρτώμενη φλεγμονή και την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα πειραματόζωα. Επομένως, η εξαρτώμενη από τον TF ενεργοποίηση της πήξης, πιθανόν συμβάλλει και στην αγγειακή φλεγμονή. [187], [189]

7.8.2 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων

Ο αριθμός των αιμοπεταλίων ανευρίσκεται αυξημένος σε μεγάλα παιδιά και ενήλικες με ΔΝ σε σταθερή κατάσταση, πιθανόν λόγω της σπληνεκτομής, η οποία είναι καθολική για τους ομόζυγους ασθενείς αυτής της ηλικίας. Η χρόνια αιμόλυση ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια, τα οποία έχουν την τάση να συσσωματώνονται και να προσκολλώνται στο ενδοθήλιο. Η ελεύθερη αίμη ακυρώνει την ανασταλτική δράση του NO στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, ενώ το δεσμευμένο στην αιμοσφαιρίνη ADP, μπορεί να ενεργοποιήσει τα αιμοπετάλια. Επιπλέον, η HbS συνδέεται με τον αιμοπεταλιακό υποδοχέα GPIIb (Platelet glycoprotein IIb alpha) για την ενεργοποίησή τους. Επιπρόσθετα, τα αιμοπετάλια των ασθενών με ΔΝ εκφράζουν αυξημένα επίπεδα P-σελεκτίνης και του συνδέτη CD40, σε σχέση με τα υγιή άτομα (controls). Η αυξημένη P-σελεκτίνη συμβάλλει στην αύξηση των αιμοπεταλιακών και μονοκυτταρικών συσσωματωμάτων στη ΔΝ. Μάλιστα, έχει αναφερθεί ότι η P-σελεκτίνη και ο CD40, προκαλούν την παραγωγή του TF στα μονοκύτταρα. Επίσης, τα αιμοπετάλια συμβάλλουν στη παραγωγή της θρομβίνης, η οποία ενεργοποιεί το εσωτερικό μονοπάτι της πήξης, απελευθερώνοντας πολυφωσφορικά. Αξιοσημείωτα, ο ήδη αυξημένος αριθμός αιμοπεταλίων σε σταθερή κατάσταση, αυξάνεται πολύ περισσότερο κατά τη διάρκεια των αγγειοαποφρακτικών κρίσεων. [187]

7.9 Εργαστηριακή διάγνωση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας

Τις τελευταίες δεκαετίες, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες, το προσδόκιμο ζωής των ασθενών με ΔΑ έχει βελτιωθεί σημαντικά, εξαιτίας της έγκαιρης διάγνωσης, της

αποτελεσματικής θεραπείας και της γενικότερης ιατρικής φροντίδας. Έτσι, η έγκαιρη διάγνωση υποστηρίζει την αποτελεσματική διαχείριση της νόσου. Η ανίχνευση της αιμοσφαιρίνης S και η διάγνωση της ΔΑ, εξαρτάται κυρίως από το κλινικό εργαστήριο, όπου χρησιμοποιείται συνδυασμός βιοχημικών και μοριακών εξετάσεων για την ανίχνευση και την επιβεβαίωση της διάγνωσης. Οι πιο γνωστές μέθοδοι είναι η μέτρηση των κυττάρων του αίματος, η ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (high-performance liquid chromatography - HPLC), οι οποίες αποτελούν τον χρυσό κανόνα της διάγνωσης της ΔΑ. [190]

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της νόσου, ταξινομούνται σε δύο κύριες κατηγορίες. Τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται ήδη και τις καινοτόμες τεχνικές που βρίσκονται ακόμα σε ερευνητικό στάδιο. Παρακάτω περιγράφονται συνοπτικά οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται, με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους.

- **Επίχρισμα περιφερικού αίματος:** ανιχνεύει δρεπανοκύτταρα. Ευαισθησία: 35%, ειδικότητα: 96,7%, ακρίβεια: 90,5%. **Πλεονεκτήματα:** απλή προπαρασκευή, φθηνή μέθοδος, χρόνος διεκπεραίωσης (turnaround time – TAT) 45 min. **Μειονεκτήματα:** εξαρτάται από τα προσόντα του αιματολόγου, δε διαφοροποιεί τους τύπους των δρεπανοκυττάρων. [191]
- **Έλεγχος διαλυτότητας:** ανιχνεύει τη δρεπάνωση. Ευαισθησία: 65% δρεπάνωση και 45% διαλυτότητα. Ειδικότητα: 95,6% δρεπάνωση, 90% διαλυτότητα. Ακρίβεια: 92,5% δρεπάνωση, 85,5% διαλυτότητα. **Πλεονεκτήματα:** εύκολη, φθηνή, γρήγορη, TAT: 38 min για δρεπάνωση, 70 min για διαλυτότητα. **Μειονεκτήματα:** στα νεογέννητα δείχνει ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα, δε διαφοροποιεί τους τύπους των δρεπανοκυττάρων. [192]
- **Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση:** ταυτοποιεί και ποσοτικοποιεί HbF, Hb A, Hb A2, Hb S, Hb C, Hb Barts και άλλες ποικιλίες αιμοσφαιρίνης. Δεν αναφέρονται ποσοστά ευαισθησίας, ειδικότητας και ακρίβειας. **Πλεονεκτήματα:** αξιόπιστη, ικανή να διαχωρίσει τα περισσότερα είδη ΔΑ, συμπεριλαμβανομένης της ετερόζυγης μορφής. **Μειονεκτήματα:** ακριβή, απαιτεί ικανά προσόντα τεχνολόγου. [193]
- **Ισοηλεκτρική εστίαση - Isoelectric focusing (IEF):** ταυτοποιεί και ποσοτικοποιεί Hb A, Hb F, Hb C, Hb S, Hb E και Hb O Arab. Δεν αναφέρονται ποσοστά ευαισθησίας, ειδικότητας και ακρίβειας. **Πλεονεκτήματα:** ανιχνεύει εύκολα HbS και HbA, με υψηλή συγκέντρωση HbF, διαχωρίζει εύκολα την D-Punjab από την HbS, απαιτεί ελάχιστο όγκο δείγματος, μπορεί να επιτευχθεί και με ξηρή σταγόνα αίματος, TAT: 45min. **Μειονεκτήματα:** ακριβή, απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό. [194]
- **Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC):** ανιχνεύει Hb F, Hb A2, Hb S, Hb C, Hb Barts και άλλες ποικιλίες Hb. **Πλεονεκτήματα:** αξιόπιστη, αυτοματοποιημένη, ικανή να διαχωρίσει τα περισσότερα είδη ΔΑ, συμπεριλαμβανομένης της ετερόζυγης μορφής. **Μειονεκτήματα:** ανιχνεύει λανθασμένα νεότερες ποικιλίες που μιμούνται την HbS, ακριβή, απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό, δε μπορεί να εφαρμοστεί σε πτωχές οικονομίες. [195], [196]

- **Μοριακή μέθοδος Amplification-refractory mutation system (ARMS) polymerase chain reaction (PCR) για προγεννητικό έλεγχο:** διαφοροποιεί βSβS, βαβS και βαβα. Ευαισθησία: 75%. Δεν αναφέρονται ποσοστά ειδικότητας και ακρίβειας. *Πλεονεκτήματα:* απλή, μπορεί να εφαρμοστεί για προγεννητικό έλεγχο. *Μειονεκτήματα:* χαμηλή ευαισθησία, κίνδυνος επιμόλυνσης DNA μητρικού κυττάρου. [197]
- **Μοριακή μέθοδος Allele-Specific Recombinase Polymerase Amplification:** ανιχνεύει βA, βS. Ευαισθησία: 100%, ειδικότητα: βA: 94.7%, βS: 97.1%, ακρίβεια: <95%. *Πλεονεκτήματα:* οικονομικά προσιτή, γρήγορη (λιγότερο από 30 min), ακριβής. *Μειονεκτήματα:* δύσκολος ο σχεδιασμός του τεστ, λείπουν κάποιοι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single-Nucleotide Polymorphisms - SNPs), επίπονη μέθοδος. [198], [199]

Οι εργαστηριακοί παράμετροι αποτελούν χρήσιμοι βιοδείκτες για την παρακολούθηση της αναιμίας, της αιμόλυσης, της λευκοκυττάρωσης και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, που μπορούν να προβλέψουν και τις κλινικές εκδηλώσεις. Στη ΔN, ο αριθμός των ερυθροκυττάρων (RBC) και τα επίπεδα της Hb είναι χαμηλά, ενώ ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) και τα επίπεδα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (Lactate Dehydrogenase - LDH) είναι αυξημένα. Στη HbSC τα RBCs και τα επίπεδα της Hb είναι σχετικά αυξημένα, ενώ ο μέσος όγκος ερυθρών (Mean Corpuscular Volume – MCV), η μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (Mean Corpuscular Hemoglobin - MCH) και το εύρος κατανομής των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Red Cell Distribution Width – RDW) είναι μειωμένα. [200]

7.10 Κλινική εικόνα δρεπανοκυτταρικής νόσου

Οι κλινικές εκδηλώσεις της δρεπανοκυτταρικής νόσου μπορούν να αποδοθούν σε δύο φαινόμενα: την αιμόλυση και την αγγειακή απόφραξη.

7.10.1 Αιμόλυση

Η αιμολυτική αναιμία παρατηρείται σε όλους τους σημαντικούς τύπους της δρεπανοκυτταρικής νόσου, ενώ είναι λιγότερο σοβαρή σε ασθενείς με συνυπάρχουσα θαλασσαιμία, HbSC ή/και υψηλή HbF%. Η επιβίωση των δρεπανοκυττάρων στην ομόζυγη μορφή υπολογίζεται σε δεκαεπτά ημέρες, κατά μεγάλη αντίθεση σε σχέση με τις 120 ημέρες ζωής των φυσιολογικών ερυθροκυττάρων. Η ενδοαγγειακή αιμόλυση στους ασθενείς με ΔN είναι συνέπεια της αναγνώρισης από το συμπλήρωμα των μεμβρανικών αλλαγών εξαιτίας της δρεπάνωσης, της κυτταρικής αφυδάτωσης και της απευθείας μεμβρανικής καταστροφής από τον πολυμερισμό. Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, μέσω της φαγοκυττάρωσης, συμβάλλουν στην καταστροφή των ερυθροκυττάρων στη μικροκυκλοφορία. Μάλιστα, ενώ υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των ασθενών, η οποία ακολουθεί μετά τη μείωση της HbF μετά τη γέννηση, τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης (και συγχρόνως της αναλογίας της αιμόλυσης και του αριθμού των ISC), παραμένουν σταθερά μέχρι την ηλικία των 40 ετών.

Μετά την τέταρτη δεκαετία, τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης πέφτουν, πιθανόν ως αποτέλεσμα της ανεπάρκειας των νεφρών και του μυελού, εξαιτίας της ίνωσης.

Οι συνέπειες της αιμόλυσης στη ΔΝ είναι ποικίλες. Οι δρεπανοκυτταρικοί ασθενείς, προκειμένου να αντισταθμίσουν τη μειωμένη συγκέντρωση του οξυγόνου, έχουν υπερδυναμική κυκλοφορία, αυξημένο όγκο πλάσματος, ενώ αναπτύσσουν καρδιομυοπάθεια σε νεαρή ηλικία. Όσο μειώνεται η έλξη της HbS για το οξυγόνο, σε σχέση με την HbA, η οξυγόνωση των ιστών ίσως να συντηρείται σχετικά (απουσία αγγειακής απόφραξης), γεγονός που ίσως εξηγεί την αρκετά καλή ανεκτικότητα της αναιμίας σε αυτή την ομάδα ασθενών. Εξαιτίας της αυξημένης ερυθροποίησης, περιοχές του μυελού των οστών, που συνήθως απενεργοποιούνται μετά τη γέννηση, όπως του κρανίου και του μηριαίου οστού, παραμένουν ενεργά. Ως αποτέλεσμα της χρόνιας αιμόλυσης, ανευρίσκονται υψηλά επίπεδα χολερυθρίνης, που οδηγούν σε ίκτερο και χολολιθίαση. Επιπλέον, η λοίμωξη με *parvovirus B19*, μπορεί να οδηγήσει σε επικίνδυνη για τη ζωή των ασθενών, απλαστική αναιμία. [201]

7.10.2 Αγγειακή απόφραξη / επώδυνες κρίσεις

Η αγγειακή απόφραξη ή οι επώδυνες κρίσεις, συνιστούν την κύρια αιτία θανάτου στη δρεπανοκυτταρική νόσο. Η ΔΝ θεωρείται ότι αποτελεί μια τετράδα χαρακτηριστικών κλινικών συμπτωμάτων: των επώδυνων κρίσεων, της αναιμίας και των επακόλουθων συμπτωμάτων της, των οργανικών βλαβών (συμπεριλαμβανομένων των λοιμώξεων), καθώς και των συννοσηροτήτων, με τον πόνο να κυριαρχεί στην κλινική εικόνα, ο οποίος είτε προκαλείται αυθόρμητα, είτε αποτελεί συνέπεια των υπόλοιπων τριών χαρακτηριστικών.

Οι επώδυνες κρίσεις στη ΔΝ είναι, είτε οξείες, επώδυνες και επαναλαμβανόμενες, είτε σύνδρομο χρόνιου πόνου ή/και νευροπαθητικός πόνος. Ο χρόνιος πόνος παρατηρείται κυρίως σε ενήλικες ασθενείς και στους γηραιότερους ανευρίσκονται ανεβασμένοι δείκτες ενεργοποίησης μαστοκυττάρων (τρυπτάση ορού και ουσία P). Μετά την αποκοκκίωση των μαστοκυττάρων, η τρυπτάση απελευθερώνεται στο πλάσμα και μπορεί να οδηγήσει σε φλεγμονή, αναφυλαξία, κνίδωση και κυρίως νευροπαθητικό πόνο. Η τρυπτάση προσδένεται στον υποδοχέα ενεργοποίησης πρωτεάσης 2, απελευθερώνοντας φλεγμονώδεις μεσολαβητές και την ουσία P, η οποία προκαλεί νευρογενή φλεγμονή.

Στις οξείες επαναλαμβανόμενες επώδυνες κρίσεις, υπάρχει μια πρόοδος τεσσάρων φάσεων: της πρόδρομης, της αρχικής, της εγκατεστημένης και της φάσης της λύσης της κρίσης. Κάθε επώδυνη κρίση χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και μπορεί να οδηγήσει σε πιθανές θανατηφόρες συνέπειες, όπως η πολυργανική ανεπάρκεια και ο ξαφνικός θάνατος. Κατά τη διάρκεια της κρίσης, τα διαδοχικά παθοφυσιολογικά γεγονότα που λειτουργούν συνεργατικά, είναι η αγγειακή απόφραξη, η φλεγμονή και η αλγαισθησία.

Τα σύνδρομο χρόνιου πόνου σχετίζονται με την αγγειακή νέκρωση της μηριαίας κεφαλής, τον νευροπαθητικό πόνο ή τον πόνο που σχετίζεται με χαμηλού βαθμού φλεγμονή, που περιλαμβάνει το στήθος, την πλάτη, τα άνω και κάτω άκρα και σπανίως έλκη στα πόδια.

Ο νευροπαθητικός δρεπανοκυτταρικός πόνος, όπως φαίνεται από μελέτες σε ανθρώπους και ζώα, ίσως σχετίζεται με νευροπαθητικά μονοπάτια. Μελέτες που έχουν γίνει σε μοριακούς και νευροβιολογικούς μηχανισμούς, έχουν ανοίξει νέες προοπτικές στην εξέλιξη του νευροπαθητικού πόνου. Για παράδειγμα, μόρια με ρόλο κλειδί, όπως η πρωτεΐνη κινάση C και η ασβεστιο-εξαρτώμενη κινάση II και η αλληλοεπίδρασή τους με τους υποδοχείς NMDA (N-methyl-D-aspartate receptor και TrpV1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1)). [202]

7.10.3 Χρόνια βλάβη οργάνων

Η επαναλαμβανόμενη αγγειακή απόφραξη και η συνεχής απελευθέρωση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης λόγω αιμόλυσης, μειώνει τη διαθεσιμότητα του NO και προκαλεί έναν καταρράκτη προφλεγμονωδών καταστάσεων, ενεργοποιώντας διάφορους παθοφυσιολογικούς παράγοντες, που περιλαμβάνουν τα αιμοπετάλια και το αγγειακό ενδοθήλιο, με συνέπεια την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, που αποτελεί τη βασική αιτία της χρόνιας βλάβης των οργάνων. Οι χρόνιες εκδηλώσεις αφορούν όλα τα όργανα, αλλά κυρίως εντοπίζονται στον σπλήνα, την καρδιά, τους πνεύμονες, τους νεφρούς, τον εγκέφαλο κ.α. [203]

Αυτοσπληνεκτομή: η ΔΑ συνιστά μοναδική νόσο για την ειδική, γρήγορη και προοδευτική καταστροφή του σπλήνα. Η αυτοσπληνεκτομή εμφανίζεται νωρίς κατά τη βρεφική ηλικία με σπληνομεγαλία στο 73% των ομόζυγων ασθενών. Το σύνδρομο σπληνικής παγίδευσης, που συμβαίνει όταν ο σπλήνας διογκώνεται, ακολουθείται από βαθμιαία μείωση του μεγέθους, μέχρι να απομείνει ένα μικρό ινώδες κατάλοιπο σε μεγάλο ποσοστό ασθενών. Παρόλο που ο σπλήνας σε νεαρά παιδιά παγιδεύει ISCs, καθίσταται μη λειτουργικός στην ικανότητά του να αποβάλλει τα σωματίδια e Howell-Jolly από τα ερυθροκύτταρα και να αποβάλλει τα κατεστραμμένα ερυθροκύτταρα. Οι λειτουργικές ανωμαλίες ίσως μπορούν να ανιχνευθούν νωρίς και να αντιμετωπιστούν με μεταγγίσεις αίματος. Παρόλα αυτά, σε ορισμένα μεγαλύτερα παιδιά υπό θεραπεία μεταγγίσεων, η δυσλειτουργία μπορεί και να μην είναι αναστρέψιμη. Η ανατομία του σπλήνα, απαιτεί υπερβολική ερυθροκυτταρική ευκαμψία, ώστε να επιστρέψει το ερυθροκύτταρο στη συστηματική κυκλοφορία. Όταν το αίμα εισέρχεται στις χορδές του Billroth, οι οποίες αποτελούνται από μακροφάγα και στη συνέχεια από επιθηλιακά κύτταρα, τα ερυθροκύτταρα είναι εκτεθειμένα σε αιμοσυμπύκνωση, υπογλυκαιμία και μείωση του pH. Αυτές οι ιδιαίτερες τοπικές καταστάσεις συνηγορούν στη μείωση του χρόνου καθυστέρησης για τον πολυμερισμό της HbS, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του δρεπανοκυτταρικού φαινομένου, ιδιαίτερα στα αφυδατωμένα δρεπανοκύτταρα με υψηλή HbS/ χαμηλή HbF. [204]

Οξύ θωρακικό σύνδρομο (Acute chest syndrome - ACS): το οξύ θωρακικό σύνδρομο αποτελεί τη μεγαλύτερη αιτία θνησιμότητας και θνητότητας στη ΔΑ. Χαρακτηρίζεται από πυρετό, αναπνευστικά συμπτώματα και πνευμονική διήθηση στην ακτινογραφία θώρακος. Η βαρύτητα της κατάστασης οδηγεί συχνά σε νοσηλεία, ακόμα και σε μονάδα εντατικής θεραπείας (εικ.29). [201], [205]

Εγκέφαλος: το εγκεφαλικό αποτελεί την κυριότερη νευρολογική βλάβη. Το αιμορραγικό εγκεφαλικό στους δρεπανοκυτταρικούς ασθενείς μπορεί να είναι κατά τριάντα φορές πιο πιθανό, σε σχέση με άλλους ασθενείς. Στους ενήλικες ασθενείς υπάρχουν πολλοί κλινικοί, περιβαλλοντικοί, γενετικοί και εργαστηριακοί παράγοντες κινδύνου για νευρογνωστική διαταραχή και βλάβη του εγκεφάλου, οι οποίοι αυξάνονται με την ηλικία. Σχετικά συχνά είναι και τα εγκεφαλικά ανευρύσματα στους ασθενείς.

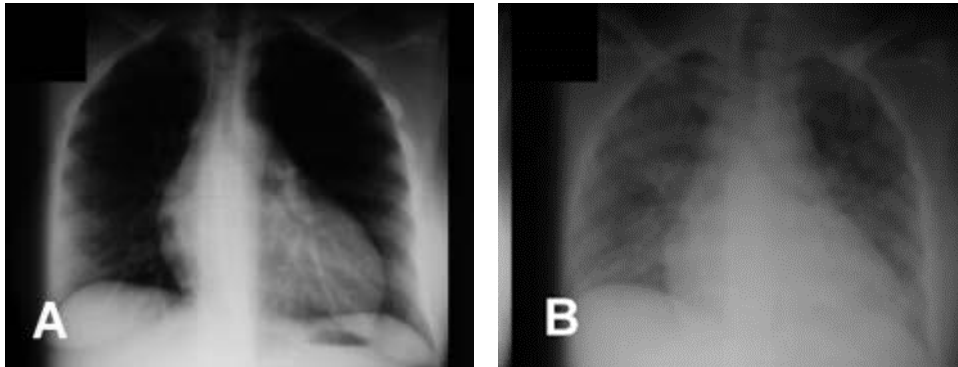
Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια: η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια αποτελεί κύρια αιτία θανάτου στους μεγαλύτερους σε ηλικία δρεπανοκυτταρικούς ασθενείς. Αυτή η ομάδα ασθενών συχνά βιώνουν επαναλαμβανόμενους πολυπαραγοντικούς νεφρικούς τραυματισμούς, συχνά χωρίς διάγνωση, οι οποίοι οδηγούν σε νεφρική ανεπάρκεια. Οι τραυματισμοί αυτοί μπορεί να μην αντανακλώνται στα επίπεδα της κρεατινίνης. Η αιμόλυση, η ανεπάρκεια του NO και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, οδηγούν σε χρόνια νεφρική ισχαιμία, η οποία αποτελεί την κύρια αιτία της νεφρικής παθοφυσιολογίας στη ΔΑ. Η ισχαιμία, έχει ως συνέπεια τη φλεγμονή, την αύξηση των επιπέδων της κινάσης τυροσίνης 1 και άλλων προαγόντων της αγγειογένεσης, της ενεργοποίησης του επαγόμενου από υποξία παράγοντα 1α και το οξειδωτικό στρες. Συνεπώς, οι ασθενείς με νεφρική νόσο, παρουσιάζουν συνήθως και άλλα χαρακτηριστικά του αιμορραγικού φαινοτύπου, όπως υπέρταση, βλάβες του ΚΝΣ και σοβαρή αναιμία. Τέλος, η αλβουμινουρία σχετίζεται με την αιμόλυση, τη χαμηλή συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, την αυξημένη πίεση και την υπέρταση. [206]

Ήπαρ: η εμπλοκή του ήπατος στη ΔΑ είναι συνηθισμένη και μπορεί να αναπτυχθεί ως αποτέλεσμα πολλαπλών ηπατικών βλαβών. Η ισχαιμική βλάβη μπορεί να είναι προσωρινή, όπως στην οξεία δρεπανοκυτταρική κρίση ή μπορεί να είναι πιο σοβαρή, με τη μορφή της οξείας ενδοηπατικής χολόστασης. Άλλοι πιθανοί συμπαράγοντες για ηπατική βλάβη στη ΔΝ αποτελούν η ιογενής ηπατίτιδα και η υπερφόρτωση σιδήρου από τις μεταγγίσεις αίματος. Η ηπατική νόσος μπορεί να εξελιχθεί σε κίρρωση σε ορισμένους ασθενείς. [207]

Καρδιά: στους ασθενείς με ΔΝ αναπτύσσεται υψηλή πνευμονική πίεση, με πολυπαραγοντική αιτιολογία. Η υψηλή καρδιακή παροχή, η υπερφόρτωση του όγκου και η σχετικά υψηλή συστηματική πίεση, ίσως αυξάνουν την πνευμονική πίεση, απουσία της αυξημένης πνευμονικής αγγειακής αντίστασης. Η ενδοαγγειακή αιμόλυση συνεισφέρει στην αγγειοπάθεια, μέσω του πνευμονικού αγγειακού δένδρου και της εσωτερικής πάχυνσης των πνευμονικών αρτηριών και φλεβών και της θρόμβωσης. Άλλες παθολογίες, όπως η χρόνια υποξία, ο πνευμονικός θρομβοεμβολισμός και το οξύ θωρακικό σύνδρομο, ίσως συνεισφέρουν στην καρδιακή ανεπάρκεια. [203]

Πριαπισμός: είναι η πάθηση που εκδηλώνεται ως παρατεταμένη και επώδυνη στύση, η οποία δε σχετίζεται απαραίτητα με σεξουαλική διέγερση. Αποτελεί συχνή επιπλοκή σε άνδρες ασθενείς με ΔΝ, καθώς και σε άλλες αιμολυτικές νόσους και ενέχει σημαντικό ρίσκο για την σεξουαλική λειτουργία. Θεωρείται, ότι η ανισορροπία του NO, έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση των αναστολέων της 5-Φωσφοδιεστεράσης (PDE5), οι οποίοι επηρεάζουν τη φυσιολογική δράση της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP) και της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP). Οι θεραπείες που στοχεύουν στην αποδιοργάνωση αυτών των μη ομαλών μηχανισμών, ίσως μπορούν να μειώσουν τη συχνότητα των κρίσεων. [208]

Οφθαλμοί: στη ΔΝ, η αμφιβληστροειδοπάθεια που προκαλείται από την απόφραξη των λεπτών αγγείων του οφθαλμού, ταξινομείται ως πολλαπλασιαστική και μη πολλαπλασιαστική δρεπανοκυτταρική αμφιβληστροειδοπάθεια. Η πολλαπλασιαστική αμφιβληστροειδοπάθεια αποτελεί την κύρια αιτία απώλειας της όρασης, οδηγώντας σε οπτική βλάβη κατά 10–20%. Η δρεπανοκυτταρική αμφιβληστροειδοπάθεια συμβαίνει συχνότερα σε ασθενείς με τον SC γενότυπο. [209]



Εικόνα 29: Ακτινογραφίες θώρακος 18χρονης ασθενούς με ομόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία: Α) σε κλινικά ασυμπτωματική κατάσταση. Β) της ίδιας ασθενούς μερικές εβδομάδες αργότερα σε κατάσταση οξείας κρίσης, όπου ανέπτυξε πολύ γρήγορα αναπνευστική ανεπάρκεια, με χαμηλό πυρετό, αιμόλυση και έντονο πόνο στο στήθος. Η ασθενής αρνήθηκε τη μετάγγιση αίματος, λόγω θρησκευτικών πεποιθήσεων και απεβίωσε λίγες ημέρες αργότερα, από οξεία κρίση θωρακικού συνδρόμου. Δεν ταυτοποιήθηκαν παθογόνα. Ανατύπωση από: Schnog JB, Duits AJ, Muskiet FA, ten Cate H, Rojer RA, Brandjes DP. Sick cell disease; a general overview. *Neth J Med.* 2004 Nov;62(10):364-74. [201]

7.11 Θεραπεία δρεπανοκυτταρικής νόσου

7.11.1 Μεταγγισιοθεραπεία

Οι μεταγγίσεις συνιστούν, εδώ και δεκαετίες, την κύρια θεραπευτική παρέμβαση για τη δρεπανοκυτταρική νόσο. Ενώ αποτελεί συνήθως μια ωφέλιμη πρακτική για ενήλικες και παιδιά, η συχνή χρήση τους σχετίζεται με πολλαπλές επιπλοκές. Επομένως είναι απαραίτητο να εφαρμόζονται, λαμβάνοντας υπόψη συγκεκριμένες οδηγίες, διεθνή πρωτόκολλα, επικαιροποιημένες μελέτες και εξειδικευμένες ανάγκες για τον κάθε ασθενή. Για κάποιες κλινικές ενδείξεις, όπως το ισχαιμικό εγκεφαλικό, ο ρόλος των μεταγγίσεων έχει μελετηθεί επαρκώς, ώστε να αποτελεί πλέον παγκόσμια πρακτική. Για αρκετές ωστόσο κλινικές περιπτώσεις, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για την ασφάλεια του ασθενή και κάθε τέτοια περίπτωση είναι αναγκαίο να εξετάζεται ατομικά. [210]

Οι μεταγγίσεις αίματος βελτιώνουν τη χωρητικότητα σε μεταφορικό οξυγόνο και τα συμπτώματα της αναιμίας. Στη δρεπανοκυτταρική αναιμία, αυξάνουν τον αιματοκρίτη (h/t) του ασθενή και μειώνουν την παραγωγή των ερυθροκυττάρων που περιέχουν αιμοσφαιρίνη S. Οι μεταγγίσεις χρησιμοποιούνται σποραδικά για την προεγχειρητική προετοιμασία ή τη θεραπεία οξείων παρενεργειών της νόσου. Η χρόνια θεραπεία με μεταγγίσεις εφαρμόζεται

όταν είναι αναγκαίο να διατηρηθεί χαμηλή η συγκέντρωση της HbS, όπως σε περίπτωση αποφυγής εγκεφαλικών επεισοδίων, οξέος θωρακικού συνδρόμου και πολυοργανικής ανεπάρκειας. Η οδηγία που εφαρμόζεται συνήθως είναι η διατήρηση των επιπέδων της HbS σε $\leq 30\%$ και των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης στο 10-12 g/dL. Η αύξηση της αιμοσφαιρίνης πάνω από 12 g/dL πρέπει να αποφεύγεται, καθώς υπάρχει ρίσκο υπεργλοιότητας του αίματος (πηκτό αίμα). [211]

Η αλλοανοσοποίηση αποτελεί μία από τις κυριότερες παρενέργειες των μεταγγίσεων, καθώς αυξάνει τον κίνδυνο αιμολυτικής αντίδρασης και καθυστέρησης στην ανεύρεση μονάδων αίματος. Η παθοφυσιολογία της αλλοανοσοποίησης στη ΔΝ είναι πολύπλοκη και σχετίζεται με την ποσότητα του αλλοαντισώματος που λαμβάνεται, την ποικιλία του συστήματος Rh και άλλους ανοσολογικούς παράγοντες (π.χ. χρόνια φλεγμονή). [212] Τα αντιγόνα των συστημάτων Rh (C, E or C/c, E/e) και Kell είναι τα πλέον ανοσογονικά, επομένως είναι απαραίτητος ο έλεγχος των προς μετάγγιση μονάδων αίματος, αλλά και για τα αντιγόνα Fya/Fyb, Jka/Jkb, M/N, S/s, Lea/Leb και P, ώστε να ελαττώνεται ακόμα περισσότερο το ρίσκο αλλοανοσοποίησης για τους ασθενείς με ΔΝ. [213]

Η μετάγγιση 3-5 μονάδων αίματος προσδίδουν 1g σιδήρου στον ασθενή, ποσότητα που θεωρείται μεγάλη, λαμβάνοντας υπόψη ότι ο συνολικός σίδηρος του μέσου ενήλικα δεν ξεπερνά τα 5g. Ο ανθρώπινος οργανισμός δε διαθέτει μηχανισμό αποβολής του σιδήρου. Ενώ μικρές ποσότητες απορροφώνται από τη γαστρεντερική οδό και το δέρμα, η ομοιοστάση του σιδήρου ρυθμίζεται από την εψιδίνη, μία πρωτεΐνη που συντίθεται στο ήπαρ, σε απάντηση στην υπερφόρτωση σιδήρου και τη φλεγμονή. Η εψιδίνη εμποδίζει την απορρόφηση σιδήρου και την ανακύκλωσή του από το δικτυοενδοθηλιακού σύστημα. Η ποσότητα του σιδήρου που λαμβάνεται από τις μεταγγίσεις, δεν ακολουθεί τους κανονικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς του, με αποτέλεσμα ο οργανισμός να μην έχει τη δυνατότητα να αποβάλλει αυτή την ποσότητα. [214] Για τους δρεπανοκυτταρικούς ασθενείς, η συσσώρευση σιδήρου εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ, ενώ η τοξικότητά του ευθύνεται για το 7-10 % των θανάτων. Επομένως η αποσιδήρωση κρίνεται απαραίτητη για τους ασθενείς που μεταγγίζονται χρόνια, με τα φάρμακα που κυκλοφορούν να είναι αρκετά αποτελεσματικά. [215]

Τέλος, οι μονάδες αίματος είναι απαραίτητο να ελέγχονται με ανοσολογικό και μοριακό έλεγχο για τους γνωστούς ιούς που μεταδίδονται μέσω της μετάγγισης, όπως οι ιοί HIV, HBV, HCV, HTLV, αλλά και για περαιτέρω ιούς που εντοπίζονται σε συγκεκριμένους πληθυσμούς (μαλάρια, ιός του Δυτικού Νείλου). [216]

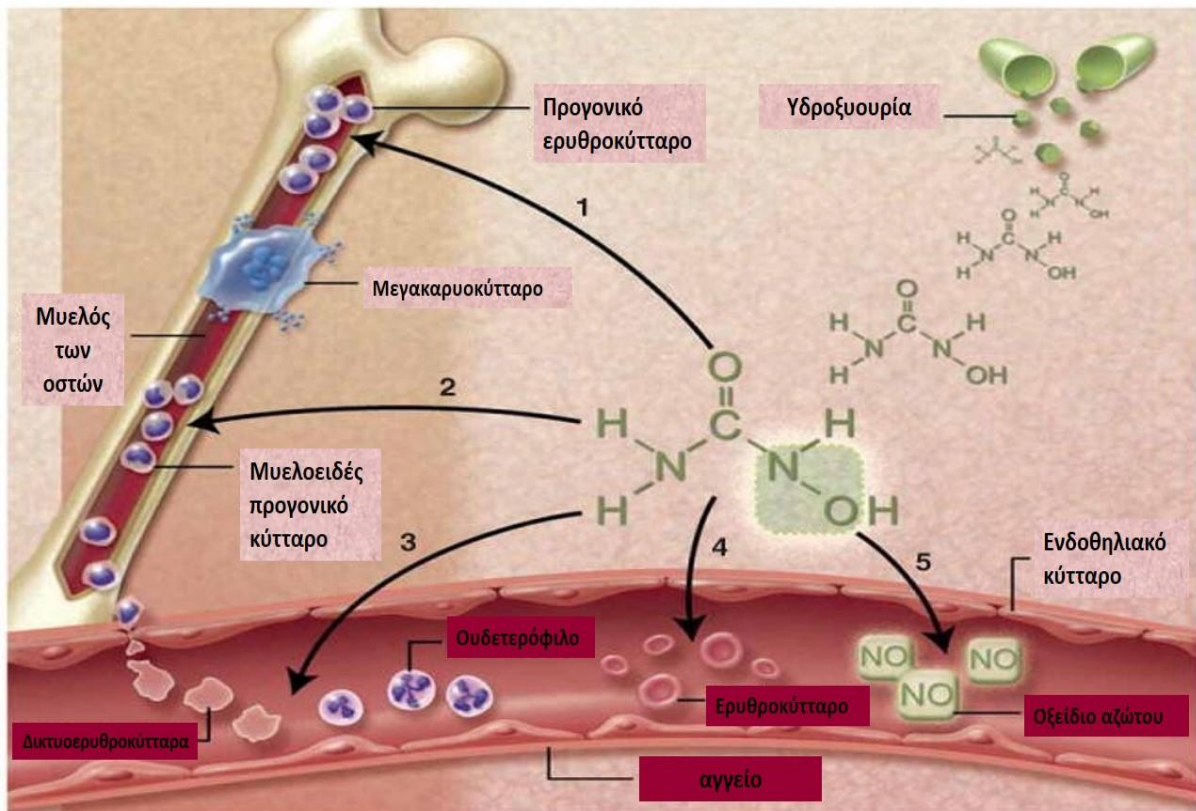
7.11.2 Χορήγηση υδροξουρίας

Η υδροξουρία ή υδροξυκαρβαμίδη αποτελεί μία απλή οργανική χημική ένωση (μοριακός τύπος: $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$), που συντέθηκε αρχικά το 1869 από τους Desler και Stein, κατά τη διάρκεια πειραμάτων, σε μια προσπάθεια για εξαγωγή παραγώγων ουρίας. Έναν αιώνα αργότερα, η υδροξουρία συστήθηκε ως φάρμακο, αρχικά ως χημειοθεραπεία για τη θεραπεία συμπαγών καρκινικών όγκων και διάφορων τύπων λευχαιμίας. Εγκρίθηκε το 1967 από τον Αμερικάνικο Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων FDA (US Food and Drug

Administration). Τις επόμενες δεκαετίες, η φαρμακευτική χρήση της υδροξουρίας επεκτάθηκε για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, της ψωρίασης, του μελανώματος, του καρκίνου των ωοθηκών, της αληθούς πολυκυτταραιμίας, ακόμα και του HIV. Σε πειράματα που έγιναν στα μέσα της δεκαετίας του 1980, αποδείχθηκε ότι η υδροξουρία προκαλεί την παραγωγή HbF στη δρεπανοκυτταρική αναιμία. Μετά από τις κλινικές δοκιμές (φάσεις I/II και III έως τα μέσα της δεκαετίας 1990), η υδροξουρία τελικά εγκρίνεται από τον FDA το 1998, για τη θεραπεία της σοβαρής δρεπανοκυτταρικής νόσου.

Τα κατεξοχήν οφέλη της υδροξουρίας για τη ΔΝ, σχετίζονται με την ικανότητά της να αυξάνει τα επίπεδα της HbF, τα οποία εμποδίζουν τον ενδοκυττάριο πολυμερισμό της HbS και τη διαδικασία της δρεπάνωσης εντός των ερυθροκυττάρων. Παρ' όλες τις πολυετείς μελέτες για τα οφέλη της υδροξουρίας, ο ακριβής μηχανισμός παραγωγής HbF δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Παρ' όλα αυτά, τα οφέλη της υδροξουρίας για τη ΔΝ είναι πολυλειτουργικά και επεκτείνονται πέρα από την αύξηση της HbF. [217] Η υδροξουρία βελτιώνει το μεταβολισμό του NO, μειώνει την αλληλεπίδραση των ερυθροκυττάρων με το ενδοθήλιο, καθώς και την πυκνότητα των ερυθροκυττάρων. Αυτές οι τροποποιήσεις μειώνουν τις κρίσεις πόνου, το οξύ θωρακικό σύνδρομο, τις νοσηλείες και τις ανάγκες για μεταγγίσεις στους ασθενείς με ΔΝ. [218]

Ο πρωταρχικός και περισσότερο κατανοημένος μηχανισμός δράσης της υδροξουρίας *in vivo*, είναι η αναστρέψιμη αναστολή της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγάσης (Ribonucleotide Reductase - RR), ένα σημαντικό ένζυμο που μετατρέπει τα ριβονουκλεοτίδια σε δεοξυριβουκλεοτίδια, τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνθεση και την επιδιόρθωση του DNA. [219] Η αναστολή του RR οδηγεί σε μειωμένες ενδοκυτταρικές δεξαμενές τριφωσφωρικών δεοξυνουκλεοτιδίων και εμποδίζει τον κυτταρικό διαχωρισμό, μέσω της φάσης S. Επίσης, η διακοπτόμενη τοξικότητά της στο μυελό των οστών οδηγεί σε στρεσογόνα ερυθροποίηση, μέσω της στρατολόγησης των προγονικών ερυθροποιητικών κυττάρων, που διατηρούν τη χωρητικότητα για παραγωγή HbF. Τα ερυθροκύτταρα με αυξημένη HbF είναι μεγαλύτερα (αυξημένος MCV) και πιο παραμορφώσιμα (καλύτερη ρεολογία). Επιπλέον, επηρεάζεται και η μυελοποίηση, οδηγώντας σε δοσοεξαρτώμενη και αναστροφή ουδετεροπενία. Άλλα οφέλη περιλαμβάνουν, τη βελτίωση της ροής του αίματος και την ελάττωση της αγγειακής απόφραξης, μέσω άλλων μηχανισμών, όπως τη μείωση των μορίων προσκόλλησης και τη διέγερση της παραγωγής NO. Τέλος, φαίνεται ότι, ως ένα βαθμό, μειώνει τη χρόνια φλεγμονή, όπως φαίνεται από τον μειωμένο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων (εικ.30). [220], [221], [217]



Εικόνα 30: Οι πολλαπλοί μηχανισμοί δράσης της υδροξουρίας στη δρεπανοκυτταρική αναιμία. (1) Η παραγωγή εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (HbF), μέσω της ενεργοποίησης της γουανυλικής κυκλάσης και της τροποποιημένης κινητικής των ερυθροκυττάρων. (2) μειωμένος αριθμός ουδετεροφίλων και δικτυοερυθροκυττάρων από την αναστολή της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγής και της κυτταροτοξικότητας του μυελού των οστών. (3) μειωμένη προσκόλληση και βελτίωση της ρεολογίας των ουδετεροφίλων και των δικτυοερυθροκυττάρων της κυκλοφορίας. (4) μειωμένη αιμόλυση, μέσω της βελτιωμένης ενυδάτωσης των ερυθροκυττάρων, της μακροκυττάρωσης και της μείωσης της ενδοκυτταρικής δρεπάνωσης (5) απελευθέρωση του NO με πιθανή τοπική αγγειodιαστολή και βελτιωμένη αγγειακή ανταπόκριση. Ανατύπωση από: Ware RE. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2010 Jul 1;115(26):5300-11. [220]

Η υδροξουρία είναι δοσοεξαρτώμενη και έχει εξαιρετική βιοδιαθεσιμότητα στην από του στόματος μορφή, ενώ η κάθαρση από τον οργανισμό είναι γρήγορη, με χρόνο ημιζωής 2-3 ώρες στους περισσότερους ενήλικες και τα παιδιά. [222] Καθώς η υδροξουρία ήταν ιστορικά ένα καρκινικό φάρμακο και είχε δοκιμαστεί σε ασθενείς με σοβαρή δρεπανοκυτταρική αναιμία, η κλινική ένδειξη αφορούσε αποκλειστικά ενήλικες. Οι κλινικές δοκιμές και οι παρατηρήσεις, ωστόσο, έδειξαν ότι τα κλινικά οφέλη της χορήγησης του φαρμάκου ήταν πολλαπλά, χωρίς σημαντικές παρενέργειες, με αποτέλεσμα να συμπεριληφθούν το 2017 και οι ανήλικοι ασθενείς στη θεραπεία από 2 ετών και άνω. [217]

Οι κυριότερες παρενέργειες που έχουν αναφερθεί από τη χορήγηση της υδροξουρίας, περιλαμβάνουν την ήπια γαστρεντερική διαταραχή, τη χρώση του δέρματος ή της κοίτης των ονύχων και σπανιότερα τη λέπτυνση των τριχών. Στον πίνακα 3 [217] αναφέρονται το εύρος των παρενεργειών της χορήγησης υδροξουρίας για τη δρεπανοκυτταρική νόσο, από τις σπάνιες έως τις πιο κοινές.

Πίνακας 3: Πιθανές και αναγνωρισμένες παρενέργειες της θεραπείας της δρεπανοκυτταρικής νόσου με υδροξυουρία. Ανατύπωση από: McGann PT, Ware RE. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. *Expert Opin Drug Saf.* 2015;14(11):1749-58. [217]

ΠΟΛΥ ΣΠΑΝΙΑ (<< 1%)	ΣΠΑΝΙΑ (< 1%)	ΠΕΡΙΣΤΑΣΙΑΚΑ (1–10%)	ΚΟΙΝΑ (> 10%)
Αλλεργική αντίδραση	Διάρροια	Ήπια αναιμία	Ήπια λευκοπενία
Αυξημένη ALT	Γαστρίτιδα	Ανορεξία	Χρώση δέρματος/ονύχων
Αυξημένη Κρεατινίνη	Υπερσπληνισμός	Λέπτυνση τριχών	Ήπια ουδετεροπενία
Κακοήθεια	Πανκυτταροπενία	Ναυτία	Ήπια μείωση ΔΕΚ
Δερματικά έλκη	Εξανθήματα	Μείωση PLT	
	Εμετοί		

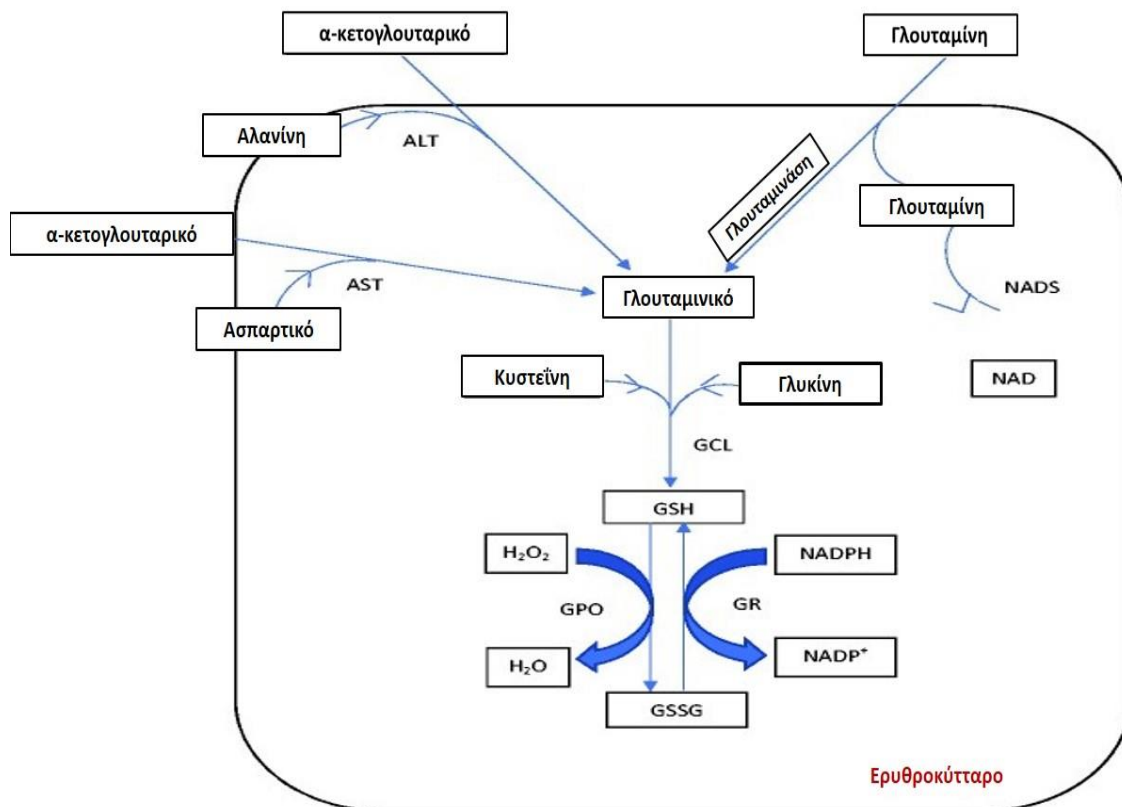
7.11.3 Χορήγηση L-γλουταμίνης

Η γλουταμίνη αποτελεί ένα από τα πιο άφθονα αμινοξέα στον ανθρώπινο οργανισμό και ένα, ζωτικής σημασίας, οξειδωτικό καύσιμο για τους ιστούς. Η γλουταμίνη σχετίζεται με τη μεταφορά του αζώτου, τη ρύθμιση της ομοιόστασης των οξέων και την καταβολική σηματοδότηση. Αποτελεί γλυκονογενικό συστατικό για συγκεκριμένους ιστούς και είναι απαραίτητη για τη σύνθεση άλλων αμινοξέων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, νουκλεοτιδίων και εξοζαμίνων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τους αιματολόγους, συνιστά η ιδιότητα της γλουταμίνης ως πρόδρομο προϊόν της σύνθεσης της γλουταθειόνης (GSH), του νικοτινάμιδο-αδένινο δινουκλεοτιδίου (NAD) και της αργινίνης, τα οποία προστατεύουν το ερυθροκύτταρο από την οξειδωτική καταστροφή, ενώ εμμέσως συντηρούν τον αγγειακό τόνο. [223] Παρ' όλα αυτά, η επίδραση της L-γλουταμίνης στο οξειδοαναγωγικό περιβάλλον των ερυθροκυττάρων της δρεπανοκυτταρικής νόσου, δεν είναι πλήρως κατανοητή, καθώς υπάρχουν ελάχιστες κλινικές δοκιμές. Κατόπιν εγκρίσεως του φαρμάκου από τον FDA (2017), είναι απαραίτητο να συμπεριληφθούν όλοι οι ρόλοι της γλουταμίνης στον ανθρώπινο οργανισμό και όχι μόνο στα ερυθροκύτταρα και ασφαλώς χρειάζεται περισσότερη έρευνα για την πλήρη κατανόηση των κλινικών επιδράσεων και τον ρόλο της στη θεραπεία.

Ο κύριος θεραπευτικός μηχανισμός της γλουταμίνης στη Δρεπανοκυτταρική νόσο θεωρείται η αντιοξειδωτική της δράση. Η συμβολή της γλουταμίνης, σε σχέση με άλλα αμινοξέα και αντιοξειδωτικά, στο οξειδοαναγωγικό περιβάλλον στη Δρεπανοκυτταρική νόσο παραμένει άγνωστη.

Η γλουταθειόνη υφίσταται σε ανηγμένη (GSH) και οξειδωμένη μορφή (GSSH). Η GSH περισυλλέγει ROS, όπως υπεροξειδίου του υδρογόνου και λιπιδικά υπεροξειδία. Μπορεί, επίσης, να συνδεθεί με την αιμοσφαιρίνη (G-Hb), μειώνοντας έτσι την τάση για δρεπάνωση. Υπάρχουν δύο οδοί σύνθεσης της ανηγμένης γλουταθειόνης, η de novo σύνθεση, η οποία απαιτεί τα αμινοξέα γλυκίνη, γλουταμινικό οξύ και κυστεΐνη, καθώς και η ανασύνθεση από την οξειδωμένη μορφή (GSSH), η οποία απαιτεί NADPH (εικ. 31). [224] Σε φυσιολογικές οξειδωτικές καταστάσεις, με αρκετή ποσότητα NADPH, χρησιμοποιείται η ανασύνθεση από

GSSH, από την αναγωγή της γλουταθειώνης, ενώ σε υπερβολικό οξειδωτικό στρες, όπως στη ΔΝ, χρησιμοποιείται η de novo σύνθεση, λόγω έλλειψης του NADPH και της γρήγορης εκροής GSSH. Πράγματι, τα δρεπανοκύτταρα εμφανίζουν μειωμένη συγκέντρωση ενδοκυτταρικής GSH, παρόλα τα υψηλά ποσοστά σύνθεσης, τα οποία είναι τελικά μειωμένα, σε σχέση με την εκροή GSSH. Θα ήταν ενδιαφέρον να γίνει γνωστό, κατά πόσο το συμπλήρωμα γλουταμίνης μπορεί να αυξήσει τη de novo σύνθεση GSH, ώστε να φτάσει σε φυσιολογικά επίπεδα. [224] Έρευνες έχουν δείξει, ότι το συμπλήρωμα με L-κυστεΐνη μπορεί, επίσης, να αυξήσει τη de novo σύνθεση GSH. Η κυστεΐνη μπορεί να εισέλθει στα ερυθροκύτταρα, μέσω εξειδικευμένων μεταφορικών συστημάτων των αμινοξέων, επομένως ίσως η γλουταμίνη να μην είναι ο μόνος ρυθμιστής της σύνθεσης GSH. [225] Η μετατροπή της γλουταμίνης σε γλουταμινικό, έχει ως αποτέλεσμα και την παραγωγή του NAD⁺, με τη δράση της NAD συνθετάσης. Το NAD⁺ μετατρέπεται σε NADP⁺ από τη NAD κινάση και ανάγεται σε NADPH με τη βοήθεια του G6PD (αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης) (εικ.31). Όπως ειπώθηκε, το NADPH είναι συμπαραγόντας της ανασύνθεσης της GSH από το GSSH. Επιπλέον, χρησιμοποιείται από τη NADPH οξειδάση για την παραγωγή δραστικών ριζών υπεροξειδίου, μια ενέργεια που απορρυθμίζεται στη ΔΝ. Παρ' όλα αυτά, τα δρεπανοκύτταρα παρουσιάζουν φυσιολογική αναλογία NADPH έναντι του συνολικού NADP, παρά την αύξηση του συνολικού NADP περιεχομένου. Συνεπώς, το συμπλήρωμα γλουταμίνης, ίσως να μην επηρεάζει την οξειδοαναγωγική δυνατότητα του NADPH στα δρεπανοκύτταρα. [224]



Εικόνα 31: Η σύνθεση της γλουταθειώνης στο ερυθροκύτταρο. Η de novo σύνθεση της ανηγμένης γλουταθειώνης (GSH), παρουσιάζεται στο επάνω μέρος του σχήματος και η ανασύνθεση της GSH από την

οξειδωμένη μορφή (GSSH) στο κάτω μέρος. Η γλουταμίνη, το α-κετογλουταρικό και η αλανίνη, με τη μικρή συμβολή του ασπαρτικού, αποτελούν τα κύρια πρόδρομα προϊόντα για την ενδοκυτταρική σύνθεση του γλουταμινικού. Η γλουταμίνη επίσης, χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του NAD⁺. Η κυστεΐνη, η γλυκίνη και το γλουταμινικό, είναι απαραίτητα για τη de novo σύνθεση της GSH και αυτή η αντίδραση καταλύεται από μία λιγκάση (glutamate cysteine ligase - GCL), που αποτελεί παράγοντα περιορισμού για αυτό το μονοπάτι. Η GSH ανάγει το υπεροξειδίο του υδρογόνου, από τη δράση των υπεροξειδασών γλουταθειόνης και τελικά οξειδώνεται προς GSSH. Η αναγωγή της γλουταθειόνης καταλύει την αντίστροφη αντίδραση, με τη βοήθεια του NADPH. Το ανηγμένο NADPH αναπαράγεται από το NAD⁺ από το ένζυμο G6PD. Ανατύπωση από: Sadaf A, Quinn CT. L-glutamine for sickle cell disease: Knight or pawn? *Exp Biol Med* (Maywood). 2020 Jan;245(2):146-154. [224]

Το πρώτο συμπλήρωμα γλουταμίνης που κυκλοφόρησε, το Endari, αλλά και οι υπόλοιπες ονομασίες του φαρμάκου που κυκλοφορούν παγκοσμίως, είναι σε μορφή σκόνης που λαμβάνεται από το στόμα μετά από διάλυση σε νερό ή τροφή, σε ποσότητα ανάλογη με το βάρος του σώματος. Το όφελος που υπόσχεται το φάρμακο είναι η μειωμένη επιδεκτικότητα των δρεπανοκυττάρων στο οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα από τις, έως σήμερα δημοσιευμένες κλινικές δοκιμές, που να δείχνουν αύξηση της αιμοσφαιρίνης και των ΔΕΚ, συνεπώς δεν φαίνεται ότι η χορήγηση L-γλουταμίνης μειώνει δραστικά την αιμόλυση. [223]

Οι κυριότερες παρενέργειες που έχουν αναφερθεί στις κλινικές δοκιμές από τη χορήγηση της L-γλουταμίνης είναι δυσκοιλιότητα, ναυτία, πονοκέφαλος, κοιλιακός πόνος, βήχας, πόνος στα άκρα, την πλάτη και το στήθος. [226], [227] Σε κάποιες περιπτώσεις σημειώθηκαν δυσμενείς παρενέργειες στους ασθενείς, όπως υπερσπληνισμός, κοιλιακό άλγος, δυσπεψία, αίσθηση καύσου και εξάψεις, που οδήγησαν σε διακοπή της χορήγησης του φαρμάκου. Ασθενείς με πολυοργανική ανεπάρκεια που έλαβαν γλουταμίνη, εμφάνισαν αυξημένο δείκτη θνησιμότητας, σε σχέση με ασθενείς της ίδιας κατηγορίας που δεν έλαβαν τη θεραπεία. [228]

Επί του παρόντος, είναι συνετό να θεωρείται η θεραπεία με γλουταμίνη ως συμπλήρωμα στη θεραπεία με υδροξυουρία, χωρίς να μειωθεί η χορήγηση της δεύτερης, καθώς ορισμένη μερίδα ασθενών μπορεί να υποκύψουν στην πλάνη μιας πιο φυσικής θεραπείας με γλουταμίνη και να διακόψουν την υδροξυουρία. Εντούτοις, για μια μικρή μερίδα ασθενών που παρουσιάζουν μικρή ανοχή στην υδροξυουρία, η θεραπεία με γλουταμίνη ίσως μπορεί να θεωρηθεί κύρια, καθώς γενικώς παρουσιάζει καλή ανοχή. Ο βοηθητικός ρόλος της γλουταμίνης στη θεραπεία με μεταγγίσεις δεν είναι ακόμα γνωστός. Είναι απαραίτητο να διεξαχθούν περισσότερες κλινικές δοκιμές και βιοχημικά δεδομένα για τη χορήγηση της L-γλουταμίνης, ώστε να αποκτήσει περισσότερη αποδοχή στην ακαδημαϊκή αιματολογική κοινότητα. [223]

7.11.4 Μεταμόσχευση μυελού των οστών

Η μεταμόσχευση μυελού είναι η μόνη διαθέσιμη σύγχρονη θεραπεία για τη δρεπανοκυτταρική νόσο, με αποτελέσματα που δείχνουν ποσοστό 91% χωρίς κλινικές εκδηλώσεις και ρυθμό θνησιμότητας λιγότερο από 5%. Η μεταμόσχευση ενέχει σημαντικά ρίσκα, όπως την παραγωγή λευκοκυττάρων από το μυελό, τα οποία επιτίθενται στους ιστούς

του δέκτη, γνωστή ως νόσος μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (Graft Versus Host Disease - GVHD). Οι ιστοί που επηρεάζονται περιλαμβάνουν το δέρμα, το ήπαρ, τη γαστρεντερική οδό και τους οφθαλμούς, ενώ τα συμπτώματα που εμφανίζονται περιλαμβάνουν τη ναυτία, την απίσχναση και τον ίκτερο. Το ρίσκο ανάπτυξης της νόσου είναι χαμηλό όταν δότης και ξενιστής σχετίζονται και ο τύπος HLA είναι συμβατός. Οι στρατηγικές για προσεκτική ανοσοκαταστολή μετά τη μεταμόσχευση, μειώνουν το ρίσκο εμφάνισης της νόσου GVHD. Άλλα ρίσκα που ελλοχεύει η μεταμόσχευση μυελού συνιστούν τα εγκεφαλικά επεισόδια, οι θανατηφόρες λοιμώξεις, η οργανική ανεπάρκεια, καθώς και η συμβατότητα. Επομένως, είναι απαραίτητο οι μεταμοσχεύσεις μυελού να εφαρμόζονται σε κατάλληλα εξειδικευμένα κέντρα, με εξειδικευμένο προσωπικό και σύγχρονους τεχνολογικούς πόρους. Εξαιτίας του υψηλού ρίσκου, η μεταμόσχευση μυελού εφαρμόζεται συνήθως όταν τα συμπτώματα και οι παρενέργειες της ΔN είναι τόσο σοβαρά, ώστε να ξεπερνούν τα ρίσκα που ενέχει η μεταμόσχευση. [229]

7.11.5 Αυτόλογη γονιδιακή θεραπεία

Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί μεγάλη ελπίδα για την οριστική θεραπεία της δρεπανοκυτταρικής νόσου, αλλά σήμερα βρίσκεται ακόμη σε ερευνητικό στάδιο. Η στρατηγική βασίζεται στα βλαστοκύτταρα και τη γονιδιακή θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα, αντί να χρησιμοποιηθούν εμβρυικά βλαστοκύτταρα, τα βλαστοκύτταρα του δέκτη προέρχονται από τον χειρισμό και τον αναπρογραμματισμό των κυττάρων του αίματος του ίδιου του δέκτη, χρησιμοποιώντας γενετική μηχανική, ώστε να διορθωθεί το γενετικό σφάλμα. Καθώς τα βλαστοκύτταρα προέρχονται από τον ίδιο τον ασθενή, δεν υπάρχει η ανάγκη εύρεσης δότη, έτσι δεν υπάρχει ρίσκο για τη νόσο μοσχεύματος έναντι του ξενιστή. Κύριο στόχο της μεθόδου, αποτελεί η μετατροπή των κυττάρων του αίματος του ασθενή σε πολυδυναμικά βλαστοκύτταρα στο εργαστήριο (ex vivo) και η μετέπειτα έγχυσή τους στον ασθενή, ώστε να γίνει αντικατάσταση του ελαττωματικού τμήματος του γονιδίου. Αυτά τα κύτταρα στη συνέχεια θα μετατραπούν σε αιμοποιητικά κύτταρα, που θα αναγεννήσουν εξειδικευμένα, μια νέα ποικιλία κυττάρων. Έως σήμερα, ελάχιστοι ασθενείς έχουν θεραπευθεί με γονιδιακή θεραπεία, στα πλαίσια των τριών κλινικών μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί τροποποιημένοι ρετροϊοί. [140], [229]

Την τελευταία δεκαετία, η εξέλιξη της τεχνολογίας έχει οδηγήσει σε νέες προσεγγίσεις στις γονιδιακές θεραπείες. Η τεχνολογία CRISPR/Cas9 αποτελεί ένα σύστημα βακτηρίων, το οποίο ανιχνεύει συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και καθοδηγεί ένζυμα ώστε να διορθώσει ή να διαγράψει τις αλληλουχίες-στόχους (στο γονίδιο HBB). Σήμερα, διεξάγονται αρκετές μελέτες που εφαρμόζουν CRISPR τεχνικές, οι οποίες βρίσκονται σε προκλινικό στάδιο και αναμένονται τα αποτελέσματα. [230]

7.11.6 Νεότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις

Οι ερευνητές συνεχίζουν και μελετούν νέες και παλαιότερες στρατηγικές για τη δρεπανοκυτταρική νόσο, προσπαθώντας να καλύψουν όλο το παθοφυσιολογικό φάσμα της

νόσου. Στόχοι των κλινικών μελετών, αποτελούν αναστολείς της προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, αναστολείς του πολυμερισμού της HbS, αντιοξειδωτικά, ρυθμιστές της φλεγμονής και ενεργοποιητές του NO. Αναπτύσσοντας μία ποικιλία διάφορων μηχανιστικών στόχων, ίσως επιτρέψει μια συνδυαστική εφαρμογή θεραπειών, οι οποίες να μπορούν συγχρόνως να μειώσουν και να θεραπεύσουν τις επιπλοκές της νόσου.

- **Θεραπίες που μειώνουν τον πολυμερισμό της HbS:** το GBT440 (Voxelotor) είναι ένα μικρό μόριο, σχεδιασμένο να αυξάνει την έλξη του οξυγόνου της HbS. Αυτό επιτυγχάνεται, καθώς το μόριο συνδέεται ανάστροφα με την αμινοτελική βαλίνη της α-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης, αλλάζοντας τη δομή του μορίου και σταθεροποιώντας την οξυγονωμένη του μορφή. Ως αποτέλεσμα, μειώνεται η συγκέντρωση της αποοξυγονωμένης HbS. Η αρχική I/II φάση της μελέτης, δείχνει ότι το φάρμακο είναι καλά ανεκτό, με προβλεπόμενη φαρμακοδυναμική και φαρμακοκινητική. [231]
- **Συμπληρώματα διατροφής:** τα Ω3 λιπαρά οξέα, που προέρχονται από έλαια ψαριών, έχουν ελεγχθεί για τα αντιοξειδωτικά, αντιθρομβωτικά και αντιφλεγμονώδη οφέλη τους. Κλινικές δοκιμές, που χρησιμοποίησαν διαφορετική αναλογία διαφόρων τύπων Ω3 και διαφορετικές δόσεις, έδειξαν ελάττωση του πόνου και της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με ΔN. [232] Επίσης, το φυλλικό οξύ συνταγογραφείται ευρέως για τη ΔN, με το σκεπτικό ότι η αυξημένη ερυθροποίηση προκαλεί αυξημένο ρίσκο ανεπάρκειας του φυλλικού οξέος. Παλαιότερη έρευνα του 1980, έδειξε βελτίωση της νόσου στα παιδιά. [233]
- **Παράγοντες που μειώνουν την κυτταρική προσκόλληση στο ενδοθήλιο: στοχευμένοι αναστολείς σελεκτίνης: (Crizanlizumab, Rivipansel, Ηπαρίνες και τροποποιημένα ηπαρινοειδη μόρια):** οι σελεκτίνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, σημαντικές για την κυτταρική κινητικότητα στο σημείο της φλεγμονής (λεμφοκύτταρα, αιμοπετάλια). Διαφορετικές οικογένειες σελεκτινών εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Τα λευκοκύτταρα που κινούνται από τις P- και E-σελεκτίνες, οι οποίες εκφράζονται στην επιφάνεια του ενεργοποιημένου ενδοθηλίου της μικροκυκλοφορίας, ίσως συνεισφέρουν στη μείωση της ταχύτητας της ροής του αίματος, την αυξημένη δρεπάνωση και την αγγειακή απόφραξη. Επομένως, συγκεκριμένοι αναστολείς P-σελεκτίνης (Crizanlizumab) και rap-σελεκτίνης (Rivipansel), έχουν περάσει στην φάση II των κλινικών δοκιμών, όπου διαφαίνονται αισιόδοξα αποτελέσματα, ιδιαίτερα στην αντιμετώπιση των οξέων κρίσεων. [234] Τέλος, οι ηπαρίνες έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν σελεκτίνες, έτσι έχουν προταθεί ως παράγοντες μείωσης της προσκόλλησης των δρεπανοκυττάρων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο. Οι κλινικές δοκιμές δείχνουν μείωση των οξέων κρίσεων πόνου (Tinzaparin και το ηπαρινοειδές Senuparin). [235]
- **Παράγοντες που αποκαθιστούν την έλλειψη NO στη μικροκυκλοφορία: στατίνες, L-αργινίνη, PDE9:** το μονοξείδιο του αζώτου που απελευθερώνεται από το ενδοθήλιο, προάγει τη χαλάρωση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αγγειοδιαστολή και τη βελτίωση της ροής του αίματος. Επίσης, εμποδίζει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, μειώνει την έκφραση των μορίων

προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, καθώς και προπηκτικών παραγόντων. Η ενδοαγγειακή αιμόλυση, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα, η οποία δεσμεύει το NO. [236] Επιπλέον, η αργινάση, η οποία απελευθερώνεται από τη λύση των ερυθροκυττάρων, διασπά την αργινίνη, η οποία με τη σειρά της, είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του NO. Αυτά τα δύο γεγονότα προκαλούν ανεπάρκεια του NO. Δύο ομάδες φαρμάκων που έχουν ερευνηθεί για τη βελτίωση των επιπέδων του NO στη ΔΝ, είναι οι στατίνες και η L-αργινίνη. Οι στατίνες αναστέλλουν τη Rho κινάση, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της σύνθεσης του NO. [237], [238]

- **Αντ αιμοπεταλιακοί και αντιπηκτικοί παράγοντες: Prasugrel και Αrixaban:** το Prasugrel αναστέλλει την ελεγχόμενη από το ADP (διφωσφορική αδενοσίνη) συσσώρευση αιμοπεταλίων. Σύμφωνα με παλαιότερη έρευνα, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προσκολλώνται στο ενδοθήλιο, κατά τη διάρκεια των αγγειοαποφρακτικών κρίσεων, ενώ στρατολογούν και λευκοκύτταρα. Στη φάση III της κλινικής μελέτης, το φάρμακο δε φαίνεται να μειώνει τις αγγειοαποφρακτικές κρίσεις στα παιδιά με ΔΝ, σε σχέση με εκείνα που έπαιρναν placebo. [239] Το Arixaban λαμβάνεται από το στόμα και αποτελεί αναστολέα του παράγοντα Χα, με αποτέλεσμα να μην ενεργοποιείται η προθρομβίνη σε θρομβίνη. Η φάση III της κλινικής μελέτης είναι σε εξέλιξη και μελετά την αποτελεσματικότητα προφυλακτικής δόσης του φαρμάκου, για τη μείωση των καθημερινών κρίσεων πόνου σε ενήλικες ασθενείς με ΔΝ. [240]

B. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η διπλή ετεροζυγωτία Δρεπανοκυτταρικής Νόσου/ β -Θαλασσαιμίας αποτελεί συχνή αιμοσφαιρινοπάθεια στον Ελλαδικό χώρο, που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη της παθολογικής αιμοσφαιρίνης S (HbS). Η HbS σε καταστάσεις υποξίας πολυμερίζεται και μετασχηματίζει το σχήμα του ερυθροκυττάρου σε δρεπανοειδές. Στη Δρεπανοκυτταρική Νόσο παρατηρούνται μικροαγγειοαποφράξεις, οξειδωτικό στρες και μειωμένη επιβίωση ερυθροκυττάρων. Τα τελευταία χρόνια, η γλουταμίνη αποτελεί μια πρόταση ως διατροφικό συμπλήρωμα για τους ασθενείς με Δρεπανοκυτταρική Νόσο, στοχεύοντας στη μείωση του οξειδωτικού στρες.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η κυτταροβιολογική μελέτη των ερυθροκυττάρων από ασθενείς με διπλή ετεροζυγωτία Δρεπανοκυτταρικής Νόσου/ β -Θαλασσαιμίας, που έλαβαν διατροφικό συμπλήρωμα L-γλουταμίνης, ως μονοθεραπεία ή ως συμπληρωματική αγωγή με υδροξυουρία.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ1. Ασθενείς

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν τριάντα δύο (32) ασθενείς με διπλή ετεροζυγωτία β-Θαλασσαιμίας/Δρεπανοκυτταρικής Νόσου (HbS-β⁺) και 20 (είκοσι) υγιείς μάρτυρες (controls) παρόμοιου φύλλου και βάρους. Οι ασθενείς είχαν μέση ηλικία τα 49,8±11,9 έτη και οι μάρτυρες τα 44,7±7,6 έτη. Όλοι οι ασθενείς λάμβαναν φυλλικό οξύ και οι περισσότεροι ήταν σε αγωγή με υδροξυουρία με ή χωρίς διατροφικό συμπλήρωμα γλουταμίνης, ενώ ένα ποσοστό ασθενών ήταν υπό θεραπεία μεταγγίσεων (1,5±0,5 μονάδες/μήνα για 72±36 μήνες). Η L-γλουταμίνη (σκεύασμα Glutamine EXTRA DB, Zenyth Pharmaceuticals, Romania) χορηγήθηκε ως συμπλήρωμα διατροφής (δόση 16±6 g/ημέρα) για 7,6±4,8 μήνες, ενώ χορηγήθηκε συνδυαστικά με υδροξυουρία (0,99±0,057 gr/ημέρα, σκεύασμα υδροξυκαρβαμίδης, Siklos, Add Medica, France). Ασθενείς με αγγειοαποφρακτική κρίση 30 ημέρες πριν τη χορήγηση γλουταμίνης καθώς και με άλλες λοιμώξεις, κακοήθειες, αυτοάνοσα νοσήματα ή ανεπάρκειες, εξαιρέθηκαν από την παρούσα μελέτη.

Τα δείγματα ολικού αίματος από ασθενείς και μάρτυρες, λήφθηκαν σε σωληνάρια με αντιπηκτικό αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), σε σωληνάρια 4,5 ml με αντιπηκτικό 3.2% κιτρικό νάτριο και σε σωληνάρια ορού με Gel SST II (BD Vacutainer Blood Collection Tubes, BD Biosciences, San Jose, CA).

Η παρούσα μελέτη έχει υποβληθεί και εγκριθεί από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας της Έρευνας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, 23η/05-07-2021. Οι έρευνες διεξήχθησαν σύμφωνα με τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Ελήφθη γραπτή ενημερωμένη συγκατάθεση από όλους τους συμμετέχοντες.

Γ2. Απομόνωση πλάσματος και ορού από το περιφερικό αίμα

- **Πλάσμα σε EDTA:** Τα σωληνάρια με EDTA φυγοκεντρήθηκαν στα 3.000xg για 10min σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 3.000xg για 10min σε θερμοκρασία 4°C σε ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρο Erppendorf, MIKRO 22R, HETTICH (Germany).
- **Πλάσμα σε 3,2% κιτρικό νάτριο φτωχό σε αιμοπετάλια:** Τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν στις 3.500xg για 45min σε θερμοκρασία 4°C σε ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρο Erppendorf, Hettich. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο.
- **Πλάσμα σε 3,2% κιτρικό νάτριο:** Για την απομόνωση πλάσματος για τη μέτρηση των παραγόντων της αιμόστασης, η φυγοκέντρηση των σωληναρίων με 3,2% κιτρικό νάτριο έγινε στα 2.000xg για 15min σε θερμοκρασία δωματίου (Room Temperature, RT) σε επιτραπέζια φυγόκεντρο.
- **Ορός αίματος:** Για την απομόνωση του ορού, τα σωληνάρια με πηκτικό παράγοντα (serum-seperating tube) φυγοκεντρήθηκαν στις 2.000xg για 15min σε RT σε επιτραπέζια φυγόκεντρο.

Τα υπερκείμενα κάθε σωληναρίου συλλέχθηκαν και διαμοιράστηκαν σε σωληνάρια κατάλληλου όγκου. Στη συνέχεια φυλάχθηκαν σε υπερκαταψύκτη (-80°C), Platinum 340SV, Angelantonì για περαιτέρω αναλύσεις.

Γ3. Μέθοδοι

Γ3.1 Αιματολογικός και Βιοχημικός έλεγχος

Για τον κλασικό αιματολογικό έλεγχο (γενική αίματος), χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος αιματολογικός αναλυτής Siemens Advia 2120i. Τα επίπεδα HbS και HbF προσδιορίστηκαν στον αυτόματο αναλυτή VARIANT II Hemoglobin Testing System (BioRad, Hercules, CA, United States).

Η βιοχημική ανάλυση των συστατικών του ορού (ουρία, κρεατινίνη, ουρικό οξύ, γλυκόζη, χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, ασβέστιο, φώσφορος, κάλιο, νάτριο, χλώριο, μαγνήσιο, σίδηρος, φερριτίνη, βιταμίνη B12, φυλλικό οξύ, ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα, ολικές πρωτεΐνες, λευκωματίνη, β2 μικροσφαιρίνη, οξαλοξική τρανσαμινάση ορού, πυροσταφυλική τρανσαμινάση ορού, γ-γλουταμυλοτρανσφεράση, αλκαλική φωσφατάση, ολική χολερυθρίνη, έμμεση χολερυθρίνη, άμεση χολερυθρίνη, φωσφοκινάση κρεατίνης, αμυλάση, γαλακτική αφυδρογονάση και βιταμίνη D), πραγματοποιήθηκε με τον αυτόματο βιοχημικό αναλυτή ARCHITECT C16000 (Abbott, Illinois, U.S.A.). Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) μετρήθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο κιτ AFINION™ CRP στον αναλυτή Architect C8000.

Γ3.2 Οσμωτική Ευθραυστότητα ερυθροκυττάρων

Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι, όταν τα ερυθροκύτταρα βρίσκονται σε υπότονο διάλυμα (χρησιμοποιούνται διαδοχικά διαλύματα NaCl συγκέντρωσης από 0% έως 0,9%), μόρια νερού διαπερνούν την ημιδιαπερατή μεμβράνη του ερυθροκυττάρου προς το εσωτερικό του, με αποτέλεσμα τη σταδιακή διόγκωσή του και τελικά τη λύση του (αιμόλυση). Το διάλυμα NaCl 0,9% είναι ισότονο, όπου υπάρχει ισορροπία των μορίων νερού εκατέρωθεν της μεμβράνης, ενώ στο καθαρό νερό NaCl 0,0% , παρατηρείται η πλήρης αιμόλυση. Όταν τα ερυθροκύτταρα ασθενών με αιματολογική νόσο αποκτούν ανώμαλο σχήμα (π.χ. σφαιροκύτταρα), αυτά γίνονται ωσμωτικά πιο εύθραυστα και αιμολύονται ευκολότερα. Στην περίπτωση των δρεπανοκυττάρων, η ωσμωτική αντίσταση είναι αυξημένη, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ευθραυστότητά τους. [241]

Υλικά/Αντιδραστήρια:

- NaCl (MW=58.44), Sigma-Aldrich (Munich, Germany)
- Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος Eppendorf, MIKRO 22R, HETTICH
- Σωληνάρια Eppendorf
- Vortex Genie 2, Scientific Industries
- Φωτόμετρο Eppendorf, BioPhotometer Plus
- Κυβέτες, αυτόματες πιπέτες, ακροφύσια (tips)

Πειραματική διαδικασία:

10μλ ολικού αίματος προστέθηκαν σε διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων NaCl (0,0-0,9%). Ακολούθησε ήπια ανάδευση με vortex και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 1500xg για 5 λεπτά και φωτομετρήθηκε το υπερκείμενο στα 540nm. Με βάση την πρότυπη καμπύλη απορρόφησης και συγκέντρωσης NaCl, υπολογίστηκε ο δείκτης οσμωτικής ευθραυστότητας (MCF - Mean corpuscular fragility) δηλαδή η συγκέντρωση του NaCl που προκαλεί λύση στο 50% των κυττάρων. Στο διάλυμα 0,9% NaCl, η αιμόλυση θεωρείται 0%.

Γ3.3 Ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος

Η μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Harboe, η οποία βασίζεται αρχικά στο γεγονός ότι η οξυαιμοσφαιρίνη έχει μέγιστη απορρόφηση στα 415nm. Όμως, συστατικά του πλάσματος όπως η χολερυθρίνη, η αλβουμίνη και τα λιπίδια έχουν εξίσου σημαντική απορρόφηση σε αυτή την περιοχή. Για το λόγο αυτό, οι μετρήσεις στα 380nm και 450nm χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία μια μαθηματικής σχέσης (correction) ώστε να υπολογίζεται απευθείας η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, χωρίς την επίδραση άλλων συστατικών του πλάσματος. [242]

Υλικά/Αντιδραστήρια:

- Vortex Genie 2
- Γυάλινα σωληνάκια RIA
- Φυγόκεντρος σωληναρίων Econospin της Sorval Instruments
- Φωτόμετρο Novaspec 2
- Κυβέτες, αυτόματες πιπέτες, ακροφύσια (tips)
- Απεσταγμένο H₂O

Πειραματική διαδικασία:

Μετά από φυγόκεντρωση για απομόνωση του πλάσματος από το ολικό αίμα, έγινε αραιώση του πλάσματος 1/10. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 30 min σε RT και μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (Optical Density - OD) σε 380, 415 και 450 nm. Ο υπολογισμός της OD έγινε με τον τύπο:

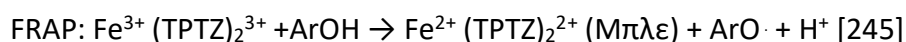
$OD^* = 2 \times OD_{415} - OD_{380} - OD_{450}$, [243] όπου OD_{415} , OD_{380} και OD_{450} , η οπτική πυκνότητα στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.

Τέλος, με τη διόρθωση κατά Harboe, βρέθηκε η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα:

$$Hb \text{ (mg/100ml)} = [(OD^*/1.655)] \times (\text{αραιώση} \times 1000)/79.46$$

Γ3.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται αποκλειστικά στην ικανότητα του προς εξέταση δείγματος να μεταφέρει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο για την αναγωγή του συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου με 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ)-τριαζίνη (Fe³⁺-TPTZ) σε δισθενή σίδηρο (Fe²⁺-TPTZ) με έντονο μπλε χρώμα το οποίο εμφανίζει απορρόφηση στα 593 nm. Η αντίδραση διεξάγεται σε pH= 3,6 για τη διατήρηση της διαλυτότητας του σιδήρου στο διαλύτη. [244] Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται παρακάτω:



Για τη μέτρηση του ποσοστού συμμετοχής του ουρικού οξέος και των υπολοίπων αντιοξειδωτικών συστατικών, στην αναγωγική ικανότητα του πλάσματος, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο ουρικάση, το οποίο υδρολύει το ουρικό οξύ. [246]

Υλικά/Αντιδραστήρια:

- Οξικό οξύ, SIGMA
- TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) (MW=312.34), SIGMA
- HCl, SIGMA
- FeCl₃·6H₂O (MW=270.30), SIGMA

- Uricase, SIGMA
- Φωτόμετρο, BIO-RAD
- Κυβέτες, erpendorf, ακροφύσια, αυτόματες πιπέτες

Πειραματική διαδικασία:

Το πλάσμα αραιώθηκε (30x) με αντιδραστήριο FRAP. Ακολούθησε επώαση για 4 λεπτά στους 37°C και φωτομέτρηση στα 593nm.

Μέτρηση της ειδικής συμμετοχής του ουρικού οξέος στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος:

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με δείγμα πλάσματος το οποίο έχει προ-επωαστεί με διάλυμα ουρικής (0.125 U/mL) σε θερμοκρασία δωματίου. Η απορρόφηση αντιστοιχεί με τη χρήση πρότυπης καμπύλης σε συγκέντρωση (μM) ιόντων Fe²⁺.

Γ3.5 Μέτρηση ενδοκυττάρων επιπέδων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS)

Η μέτρηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ROS (Reactive Oxygen Species), βασίστηκε στη χρήση του αντιδραστηρίου CMH₂DCFDA, το οποίο αποτελεί ένα λιπόφιλο, μη φθορίζον συστατικό, που διαπερνά παθητικά την κυτταροπλασματική μεμβράνη, εισέρχεται στο κύτταρο, όπου οι οξικές του ομάδες διασπώνται από ενδοκυτταρικές εστεράσες, ενώ στη συνέχεια οξειδώνεται από τα ενδοκυττάρια ROS και φθορίζει. Επομένως, τα επίπεδα φθορισμού αντικατοπτρίζουν άμεσα τα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS.

Υλικά/Αντιδραστήρια:

- CMH₂DCFDA, Invitrogen
- Ισότονο διάλυμα φωσφορικών (PBS 310mOsm)
- D-γλυκόζη, SIGMA
- Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος Eppendorf, MIKRO 22R, HETTICH
- FACSCanto II Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA)
- Θερμικός επωαστικός αναδευτήρας Hybaid Shake 'n' Stack, Hybaid Limited
- erpendorf, ακροφύσια, αυτόματες πιπέτες
- Δισταπεσταγμένο νερό (ddH₂O)

Πειραματική διαδικασία:

Τα ερυθροκύτταρα απομονώθηκαν από το ολικό αίμα και αραιώθηκαν σε ισότονο διάλυμα φωσφορικών με προσθήκη γλυκόζης (5mM). Στη συνέχεια προστέθηκε αντιδραστήριο CMH₂DCFDA (5μM) σε κάθε δείγμα και επώαση, υπό ανάδευση, σε σκοτάδι για 30 λεπτά. Ακολούθησε πλύση των κυττάρων με διάλυμα PBS και επώαση στο σκοτάδι για 12 λεπτά. Η διαδικασία συνεχίστηκε με ξεπλύματα με διάλυμα φωσφορικών/γλυκόζης. Τέλος, λύση με ddH₂O και μέτρηση στο κυτταρόμετρο.

Η μέση ένταση φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity, MFI) και το ποσοστό των θετικών σε ROS κυττάρων προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής σε κυτταρόμετρο FACSCanto II (Εκθεση (Ex)/ Εκπομπή (Em): ~492–495/517–527 nm). Η ανάλυση δεδομένων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD FACSDiva™. Λήφθηκαν κατ' ελάχιστον 30.000 γεγονότα για τα ερυθροκύτταρα, σε κάθε δείγμα.

Γ3.6 Απομόνωση και επεξεργασία ερυθροκυτταρικών μεμβρανών

Γ3.6.1 Λευκαφαίρεση και αιμοπεταλιαφαίρεση σε κολώνες κυτταρίνης

Για την απομόνωση των ερυθροκυττάρων από το ολικό αίμα πραγματοποιήθηκε λευκαφαίρεση και αιμοπεταλιαφαίρεση σε στήλες κυτταρίνης. Οι στήλες αυτές, αποτελούνται από μείγμα δύο κυτταρινών (μικροκρυσταλλικής και α-κυτταρίνης), από τις οποίες διαπερνάει το δείγμα, με αποτέλεσμα την κατακράτηση άνω του 99,75% του συνόλου των λευκοκυττάρων, τα οποία λόγω μεγέθους αδυνατούν να διαπεράσουν τους πόρους και της πλειονότητας των αιμοπεταλίων, που παγιδεύονται στους πολύ μικρούς πόρους. [247]

Υλικά/Αντιδραστήρια:

- Ισότονο διάλυμα φωσφορικών 310mosm (PBS), (5mM PO₄/150mM NaCl, pH 8.0)
- Κυτταρίνη α-cellulose, SIGMA
- Κυτταρίνη Sigmacell cellulose type 50, SIGMA
- Σύριγγες, 10ml
- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος MIKRO 22R, HETTICH
- PBS Washing solution (310mosm), (5mM PO₄/150mM NaCl, pH 8.0, 4°C)
- erpendorf, ακροφύσια, αυτόματες πιπέτες, parafilm
- dH₂O
- πάγος

Πειραματική διαδικασία:

Το ολικό αίμα φυγοκεντρήθηκε σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Eppendorf (Hettich) στις 3.500xg για 10 λεπτά στους 4°C και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο πλάσμα. Στη συνέχεια, τα πακεταρισμένα RBCs αραιώθηκαν 1:4 με ισότονο διάλυμα PBS. Ακολούθησε ανάμειξη των κυτταρινών, το μείγμα μεταφέρθηκε στις κολώνες και εμποτίστηκε με διάλυμα PBS. Προστέθηκαν τα δείγματα στη στήλη και έγινε σταδιακή συλλογή τους και τρία διαδοχικά πλυσίματα με διάλυμα PBS σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C) στις 3000xg, για την απομάκρυνση των κυτταρινών.

Γ3.6.2 Απομόνωση ερυθροκυτταρικών μεμβρανών

Η απομόνωση των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών χωρίς αιμοσφαιρίνη (στη διεθνή βιβλιογραφία καλούνται ghosts), πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της υποτονικής αιμόλυσης κατά Dodge [248], η οποία βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης, και είναι ελαφρά τροποποιημένη, καθώς αργότερα προστέθηκαν αναστολείς πρωτεασών (PMSF) στο διάλυμα της κυτταρικής λύσης, με στόχο να περιοριστεί η πρωτεόλυση. Ωστόσο, μετά από πειράματα έχει διαπιστωθεί ότι, για τη συντήρηση των συστατικών της μεμβράνης και για τη λήψη όσο το δυνατόν καθαρότερων μεμβρανών, ελεύθερων αιμοσφαιρίνης, η τιμή ιοντικής ισχύος που πρέπει να επιλέγεται διεθνώς είναι τα 20mOsm και του pH στο 8.0. [249]

Υλικά/Αντιδραστήρια:

- Διάλυμα λύσης (20mosm) (Na₂HPO₄·2H₂O 5mM /NaH₂PO₄·H₂O 5mM /0,3mM PMSF, pH 8.0, 4°C)
- PMSF (Phenyl methyl sulfonyl fluoride) 200mM, SERVA
- Διάλυμα φωσφορικού νατρίου 50mM (50P8) (Na₂HPO₄·2H₂O 50mM, NaH₂PO₄H₂O 50mM, pH 8.0)

- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος MIKRO 22R, HETTICH
- Υπερκαταψύκτης (-80°C), Platinum 340SV, Angelantoni
- erpendorf, ακροφύσια, αυτόματες πιπέτες
- dH₂O
- πάγος

Πειραματική διαδικασία: (...συνέχεια από την προηγούμενη πειραματική διαδικασία, παράγραφος Γ3.6.1)

Μετά από το τελευταίο πλύσιμο για την απομάκρυνση των κυτταρινών, ακολούθησε η προσθήκη του διαλύματος λύσης και παραμονή των δειγμάτων σε πάγο για 45 λεπτά. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν ήπια ανακίνηση των δειγμάτων για να υποβοηθηθεί η λύση και όχι μηχανική ανάδευση (vortex), το οποίο μπορεί να προκαλέσει καταστροφή των πρωτεϊνών της μεμβράνης και την προσκόλλησή τους στα τοιχώματα του σωληναρίου erpendorf. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000rpm για 20 λεπτά, στους 4°C. Έγινε αναρρόφηση του υπερκειμένου, που περιέχει το κυτοσόλιο των κυττάρων και το οποίο συλλέχθηκε και φυλλάχθηκε στους -80°C για περαιτέρω ανάλυση. Συγχρόνως έγινε αναρρόφηση και απόρριψη του δεύτερου ιζήματος, το οποίο περιέχει άσπαστα ερυθροκύτταρα και πηκτώματα πρωτεασών. Η διαδικασία επαναλήφθηκε όσες φορές χρειαζόταν (συνήθως στις τέσσερις φορές οι μεμβράνες ήταν πολύ καθαρές) μέχρι να αποχρωματιστεί τόσο το ίζημα των μεμβρανών όσο και το υπερκείμενο (white ghosts). Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -80°C για περαιτέρω ανάλυση.

Γ3.6.3 Προσδιορισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δείγματος

Ο προσδιορισμός της ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης πραγματοποιείται με τη μέθοδο Bradford, η οποία στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G 250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595nm. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στις πρωτεΐνες, που προκαλεί μετατόπιση του μέγιστου της απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 στα 595nm. Το σύμπλοκο είναι κυανού χρώματος και παραμένει σταθερό για μία ώρα περίπου. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης άγνωστων δειγμάτων απαιτείται η δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Σύμφωνα με την καμπύλη, χρειάζεται εκ νέου μέτρηση για τιμές απορρόφησης >1 και <0,2. Για κάθε δείγμα λαμβάνονται τρεις μετρήσεις και από αυτές υπολογίζεται ο μέσος όρος. [250]

Υλικά/Αντιδραστήρια:

- Κυβέτες φασματοφωτομέτρου, SIGMA
- Υπότονο διάλυμα φωσφορικών 5P8 (Na₂HPO₄·2H₂O 5mM, NaH₂PO₄·H₂O 5mM, pH 8.0)
- Χρωστική Bradford, BIO-RAD
- Φωτόμετρο Eppendorf, BioPhotometer Plus
- erpendorf, ακροφύσια, αυτόματες πιπέτες

Πειραματική διαδικασία:

Μετά από τη διαδικασία της απομόνωσης των μεμβρανών, ακολουθεί αραιώση ποσότητας των δειγμάτων ghosts και κυτοσολίων με υπότονο διάλυμα 5P8 για τη μέτρηση

της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Για τις μεμβράνες η αραιώση έγινε 1/3 και για το κυτοσόλιο 1/30. Σε ποσότητα αραιωμένου δείγματος 10μl προστέθηκαν 790μl υπότονο διάλυμα 5P8 και 200μl διάλυμα Bradford. Στο τυφλό προστέθηκαν 200μl διαλύματος Bradford σε 800μl υπότονου διαλύματος. Ακολούθησε καλή ανάμειξη με vortex και τα δείγματα επώαστηκαν σε RT για 25 λεπτά, για να ολοκληρωθεί και να σταθεροποιηθεί ο χρωματισμός του δείγματος. Τέλος, τα δείγματα φωτομετρήθηκαν σε μήκος κύματος 595nm και τέλος, υπολογίστηκε η συγκέντρωση κάθε δείγματος σε mg/ml από την πρότυπη καμπύλη.

Γ3.6.4 Προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος για ηλεκτροφόρηση

Για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν οι απομονωμένες μεμβράνες και τα κυτοσόλια για ηλεκτροφόρηση, είναι απαραίτητη η επεξεργασία τους με ένα διάλυμα χρώσης. Στο διάλυμα χρώσης περιέχονται τα εξής: διάλυμα απορρυπαντικού 20% SDS μαζί με 10mM EDTA, το οποίο αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο, γλυκερόλη, που αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος για την αποφυγή της διάχυσής του στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, β-μερκαπτοαιθανόλη για την αποδιάταξη των ενδο- και δια-μοριακών δισουλφιδικών δεσμών και μπλε της βρωμοφαινόλης, ώστε να είναι ορατό το δείγμα κατά το φόρτωμα στα πηγαδάκια. Η αναλογία των διαλυμάτων είναι αντίστοιχα 10:10:5:1.

Υλικά/Αντιδραστήρια:

- β-μερκαπτοαιθανόλη, SIGMA
- Γλυκερόλη, FERAK
- EDTA (Ethylene-diamino-tetraacetic acid disodium salt), MW=372.24, RESEARCH ORGANICS
- Θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate - SDS), MW =288.38, SIGMA
- Μπλε της βρωμοφαινόλης, SIGMA
- Ηλεκτρικός θερμαντήρας
- Υπερκαταψύκτης (-80°C), Platinum 340SV, Angelantoni

Πειραματική διαδικασία:

Για τον τελικό όγκο βαμμένου δείγματος 100λ, προστέθηκαν 26λ του διαλύματος χρώσης σε 74λ απομονωμένων μεμβρανών και κυτοσολίου αντίστοιχα. Το βαμμένο δείγμα, στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε νερό που έβραζε για 3 λεπτά, έγινε επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια αποθήκευση στους -80°C.

Γ3.6.5 Τεχνική ανοσοαποτυπώματος κατά Western

Το ανοσοαπώτρωμα κατά Western χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Μετά τον διαχωρισμό τους με ηλεκτροφόρηση, μεταφέρονται από το πήκτωμα σε νιτροκυτταρίνη (μεμβρανώδες υλικό) με διάχυση, όπου ανιχνεύονται με ανάπτυξη χρώματος, από συγκεκριμένα αντισώματα, τα οποία είναι εμποτισμένα στη μεμβράνη.

Υλικά/Αντιδραστήρια:

Αντισώματα:

- anti-DNP (rabbit), Millipore
- anti-Hb (goat), Europa Bioproducts
- anti-IgGs-HRP (human), SIGMA-ALDRICH
- anti-4.1R (rabbit)
- anti-spectrin (rabbit), SIGMA-ALDRICH

Άλλα υλικά και αναλώσιμα:

- Ακτινογραφικό φιλμ,
- Β-μερκαπτοαιθανόλη, SIGMA-ALDRICH
- Γλυκίνη (MW=75.07), APPLICHEM
- Διηθητικό χαρτί Whatmann 3MM, SCHLEICHER & SCHUELL
- ECL Western Blotting Detection Reagents, GE HEALTHCARE
- Εμφανιστής D-19, SIGMA
- HRP-conjugated anti-mouse IgG, DakoCytomation
- HRP-conjugated anti-rabbit IgG, R&D Systems
- HRP-conjugated anti-goat IgG, SIGMA-ALDRICH
- Θεικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS) (MW =288.38), SIGMA
- Κασέτα εμφάνισης
- KCl (MW=74.55), SIGMA
- KH₂PO₄ (MW=136.1), MERCK
- Λαβίδες
- Μεθανόλη, SIGMA
- NaCl (MW=58.44), OmniPur
- Na₂HPO₄·2H₂O (MW=177.9), MERCK
- Νιτροκυτταρίνη 0.45 μm, 33cm x 3mm, BIO-RAD
- Στερεωτής (fixer) ακτινογραφικού φιλμ, ALPHA CHEMICALS
- Συσκευή εφαρμογής τάσης
- Transblot – SDI Semidry Transfer Gel, BIO-RAD
- Tris (MW=121.14), MERCK.
- Σύσταση Transfer buffer: 50mM, Glycine 40mM, SDS 0.04%, Methanol 20%, pH 8.3)
- Σύσταση PBS: NaCl 1.37M, KCl 27mM, Na₂HPO₄·2H₂O 80.6mM, KH₂PO₄ 19.4mM
- Σύσταση Stripping buffer: Tris-HCl 62.5mM, 2% SDS, pH 7.6

Πειραματική διαδικασία:

Μετά το πέρας του διαχωρισμού των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση, έγινε μεταφορά τους σε ειδική συσκευή Transblot-SDI Semidry Transfer Gel ως εξής: τοποθετήθηκαν 6 φύλλα χαρτιών Whatmann, με διαστάσεις 6x9.3 mm, το ένα πάνω στο άλλο, αφού είχαν εμποτιστεί προηγουμένως σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer). Στο σημείο αυτό, απομακρύνθηκαν οι φυσαλίδες, ώστε αυτές να μην εμποδίσουν τη μεταφορά των πρωτεϊνών. Ακολούθως, τοποθετήθηκε η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, με διαστάσεις 5.5x8.8 mm, η οποία προηγουμένως είχε εμποτιστεί σε απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια, το πήκτωμα τοποθετήθηκε επάνω στην νιτροκυτταρίνη και άλλα 6 φύλλα χαρτιών Whatmann (αφού είχαν εμποτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, όπως τα προηγούμενα). Στη συνέχεια, η συσκευή έκλεισε και συνδέθηκε με συσκευή εφαρμογής τάσης μέσω

ηλεκτροδίων (σταθερή τάση 20V) και ακολούθησε η μεταφορά των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη για 50 λεπτά.

Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη, ακολούθησε η εκλεκτική ανίχνευση των υπό αναζήτηση πρωτεϊνών, με ειδικά για την κάθε πρωτεΐνη, αντισώματα, ως εξής: έγινε, αρχικά, κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του κάθε αντισώματος με επώαση (σε RT) της νιτροκυτταρίνης σε άπαχο γάλα 5% σε διάλυμα PBS-Tween (blocking) και ακολούθησε επώαση των μεμβρανών με το πρωτογενές αντίσωμα, κατά την οποία δεσμεύεται με το αντιγόνο της υπό ανίχνευσης πρωτεΐνης. Μετά το πέρας της επώασης, ακολούθησε πολύ καλό ξέπλυμα με διάλυμα PBS-T (Tween 0.1% σε PBS). Στη συνέχεια, έγινε επώαση με το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση.

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με την ανάπτυξη χρώματος (σύστημα ECL - Enhanced chemiluminescence, ενισχυμένη χημειοφωταύγεια), γι' αυτό και οι διαδικασίες που ακολούθησαν έγιναν σε σκοτεινό θάλαμο, εξαιτίας της ευαισθησίας των φιλμ. Πιο συγκεκριμένα, στη νιτροκυτταρίνη προστέθηκε υπόστρωμα υπεροξειδάσης (λουμινόλη) η οποία οξειδώνεται, διεγείρεται και όταν επιστρέφει σε κατάσταση ηρεμίας, παράγει φως το οποίο προσβάλλει τα ειδικά φωτοευαίσθητα φιλμ. Η μεμβράνη επώαστηκε με τη λουμινόλη, τοποθετήθηκε σε ειδική κασέτα μαζί με το κομμάτι του φιλμ και στη συνέχεια έγινε εμφάνιση των ζωνών με το διάλυμα D19. Το φιλμ ξεπλύθηκε σε νερό και έγινε στερέωση με το διάλυμα Fixer.

Για την πραγματοποίηση ενός νέου κύκλου ανοσοεντόπισης, πραγματοποιήθηκε κάθε φορά αποκόλληση (stripping) των προηγούμενων ιχνηθετών που τοποθετήθηκαν στη μεμβράνη ως εξής: επώαση της μεμβράνης στους 50°C για 30 λεπτά σε διάλυμα απορρυπαντικού (Stripping buffer) που περιέχει β-μερκαπτοαιθανόλη 0.7%. Τέλος, ακολουθούσαν ξεπλύματα της μεμβράνης και στέγνωμα, ώστε να είναι έτοιμη για τον επόμενο κύκλο ανοσοεντόπισης.

Γ3.6.6 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών των πηκτωμάτων και των φιλμ

Για να ποσοτικοποιηθεί το σήμα που εκλύεται από τη ζώνη της πρωτεΐνης-στόχου στα πηκτώματα και τα φιλμ, πραγματοποιείται σάρωση και πυκνομέτρησή τους από ειδικό πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων (Gel Analyser ver 1.0).

Η πυκνότητα του σήματος της ζώνης, είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, ορίζεται το υπόβαθρο και το περίγραμμα της κάθε ζώνης. Μετά από την αφαίρεση του υποβάθρου, υπολογίζεται το άθροισμα της φωτεινότητας όλων των εικονοστοιχείων (pixels) που περιέχονται στη ζώνη και οι τιμές που προκύπτουν επεξεργάζονται με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Office Excel.

Έτσι, για κάθε δείγμα, υπολογίζονται:

- ο η τιμή της κάθε πρωτεϊνικής ζώνης
- ο το άθροισμα των τιμών όλων των πρωτεϊνών
- ο η τιμή του λόγου της κάθε πρωτεΐνης προς το άθροισμα αυτό ή προς μια πρωτεΐνη αναφοράς η οποία εμφανίζει σταθερές τιμές ανάμεσα στα δείγματα

Γ3.6.7 Καρβονυλίωση των πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (μέθοδος Oxyblot)

Η Oxyblot αποτελεί μία απλή και ευαίσθητη μέθοδο ανοσοανίχνευσης των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, επομένως και του

υπολογισμού του οξειδωτικού στρες των ερυθροκυττάρων. Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση του DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) με τις καρβονυλικές ομάδες των οξειδωμένων πρωτεϊνών, που οδηγεί στο σχηματισμό του σταθερού παραγώγου DNP (2,4-dinitrophenyl).

Υλικά/Αντιδραστήρια:

- Β-μερκαπτοαιθανόλη, SIGMA
- Oxyblot detection kit, MILLIPORE
- Θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (SDS) (MW=288.38), SIGMA

Πειραματική διαδικασία:

12-15μg απομονωμένων μεμβρανών διαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα 12% SDS. Στο διάλυμα μεμβρανών προστέθηκε ποσότητα αντιδραστήριου DNPH και ακολούθησε επώαση σε RT για 15 λεπτά. Στη συνέχεια τερματίστηκε η αντίδραση με προσθήκη του διαλύματος ουδετεροποίησης και έγινε αναγωγή του μίγματος με β-μερκαπτοαιθανόλη 5%.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση και η τεχνική ανοσοαποτυπώματος για κάθε δείγμα, με τη χρήση του ειδικού αντισώματος (anti-DNP), ώστε να ανιχνευθούν οι οξειδωμένες πρωτεΐνες. Ο δείκτης καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών (Proteome Carbonylation Index-PCI) αντιστοιχεί στο πηλίκο του σήματος των οξειδωμένων πρωτεϊνών προς το σήμα μιας πρωτεΐνης ή του αθροίσματος πρωτεϊνών που εμφανίζουν σχετικά σταθερές τιμές ανάμεσα στα δείγματα.

Γ3.7 Έλεγχοι πήκτικού μηχανισμού

Γ3.7.1 Κλασσικός έλεγχος της αιμόστασης

- **Χρόνος προθρομβίνης (PT/INR):** εφαρμόζεται για την ανίχνευση των διαταραχών της εξωγενούς οδού της πήξης (Παράγοντες II, V, VII και X), κατά την οποία χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Thromborel S (Thromborel S Reagent, Siemens Healthcare Diagnostics). Η διαδικασία της πήξης ξεκίνησε με επώαση του πλάσματος με ποσότητα θρομβοπλαστίνης και ασβεστίου. Στη συνέχεια, μετρήθηκε ο χρόνος σχηματισμού θρόμβου ινώδους.
- **Χρόνος Ενεργοποιημένης Μερικής Θρομβοπλαστίνης (APTT):** εφαρμόζεται για την ανίχνευση των διαταραχών της ενδογενούς οδού της πήξης (Παράγοντες I, II, V, VIII, IX, X, XI, και XII), κατά την οποία χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Pathromtin SL (Pathromtin SL, Siemens Healthcare Diagnostics). Το ενδογενές μονοπάτι ενεργοποιήθηκε με την επώαση του πλάσματος με ποσότητα φωσφολιπιδίων και έναν επιφανειακό ενεργοποιητή. Με την προσθήκη ιόντων ασβεστίου ξεκίνησε η διαδικασία πήξης και στη συνέχεια, μετρήθηκε ο χρόνος σχηματισμού θρόμβου ινώδους.

Οι κάτωθι παράμετροι μετρήθηκαν στο σύστημα αναλυτή πήξης αίματος BCS XP.

- **Ινωδογόνο (Fibrogen):** προσδιορίστηκε με το kit Multifibren U, σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Το αντιδραστήριο Multifibren™ U περιέχει βόεια θρομβίνη και χρησιμοποιήθηκε στον τροποποιημένο κατά Clauss προσδιορισμό του ινωδογόνου, [251] κατά τον οποίο, το πλάσμα έπηξε από περίσσεια θρομβίνης (ο χρόνος πήξης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την περιεκτικότητα του δείγματος σε ινωδογόνο).

- **Δ-Διμερή - D-Dimers (προϊόντα αποικοδόμησης του ινώδους):** πραγματοποιήθηκε με το κιτ Innovance D-Dimer, σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Innovance D-Dimer με μία ενισχυμένη με σωματίδια ανοσοθολοσιμετρική δοκιμασία ποσοτικού προσδιορισμού των Δ-Διμερών. [252]

Γ3.7.2 Δείκτες υπερπηκτικότητας

- **Παράγοντας von Willebrand (vWF):** η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε με το κιτ Innovance VWF Ac, κατά παρόμοιο τρόπο, με τον οποίο ο vWF δεσμεύεται στον κύριο υποδοχέα του vWF στα PLTs, την πρωτεΐνη b2-GPI. [253] Το αντιγόνο του vWF μετρήθηκε με ανοσοθολομετρία, με το κιτ STA-Liatest VWF:Ag, σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή, στον αναλυτή αιμόστασης STAR DIAGNOSTICA STAGO.
- **Παράγοντας XIII:** χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Berichrome Factor XIII. Ο παράγοντας XIII ενεργοποιείται από τη θρομβίνη που υπάρχει στο αντιδραστήριο και αντιδρά με το συνθετικό υπόστρωμα προς σχηματισμό αμμωνίας. Η συγκριμένη μέθοδος μετρά την αμμωνία που απελευθερώνεται από ένα συνθετικό υπόστρωμα, εξαιτίας της δράσης του παράγοντα XIII. Η αμμωνία αντιδρά με το δινουκλεοτίδιο της αδενίνης νικοτιναμιδίου (Nicotinamide Adenine Dinucleotide - NAD) προς παραγωγή του NADH (reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide). Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του παράγοντα XIII, χρησιμοποιείται η διαφορά στην απορρόφηση στα 340 nm. [254]
- **Αντισώματα έναντι φωσφατιδυλοσερίνης/προθρομβίνης (aPS/PT):** η ανίχνευση των IgG και IgM αντισωμάτων έναντι του συμπλέγματος φωσφατιδυλοσερίνης/προθρομβίνης στο πλάσμα, χρησιμοποιείται συμπληρωματικά για τη διάγνωση διάφορων αυτοάνοσων θρομβωτικών ασθενειών, κυρίως για το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο (APS, σύνδρομο Hughes). Για την ανίχνευση των αντισωμάτων, έγινε ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) χρησιμοποιώντας το κιτ QUANTA Lite® aPS/PT IgG, IgM (Inova Diagnostics Inc, San Diego, USA), σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, τα πλαστικά πηγαδάκια (wells) της πλάκας μικροτιτλοδότησης είναι επικαλυμμένα με σταθεροποιημένο σύμπλεγμα PS/PT (αντιγόνο). Με την επώαση του πλάσματος που προστίθεται, τα PS/PT αντισώματα, αν υπάρχουν, προσδένονται στο σύμπλεγμα. Η μη δεσμευμένη πρωτεΐνη απομακρύνεται με πλυσίματα, ενώ στη συνέχεια προστίθεται σύζευγμα ενζύμου (conjugate), ακολουθεί επώαση και απομάκρυνση του μη δεσμευμένου conjugate με πλυσίματα. Τελευταίο προστίθεται το υπόστρωμα (substrate), που προκαλεί αλλαγή χρώματος. Στη συνέχεια σταματά η ενζυματική αντίδραση του χρωματισμένου προϊόντος με διάλυμα τερματισμού (stop solution) και η παρουσία ή απουσία του συμπλέγματος μετράται φωτομετρικά στα 450nm (χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο Jupiter, Asus), ενώ η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται από πρότυπη καμπύλη.
- **Ποσοτικός προσδιορισμός συμπλέγματος θρομβίνης-αντιθρομβίνης III (TAT):** αυξημένα επίπεδα του συμπλέγματος TAT, αποτελούν εργαστηριακό δείκτη αυξημένης πηκτικής δραστηριότητας. Το σύμπλεγμα TAT επίσης διεγείρει την παραγωγή αιμοπεταλίων. Για την ποσοτικοποίηση του TAT, χρησιμοποιήθηκε

ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) με το κιτ Enzygnost® TAT micro immunoassay (Siemens Healthcare Diagnostics Products, Marburg, Germany). Βάσει προηγούμενης εμπειρίας, έγινε διάλυση των δειγμάτων δέκα φορές, χρησιμοποιώντας το buffer του κιτ. Η περαιτέρω διαδικασία έγινε σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 492nm. Οι συγκεντρώσεις TAT των δειγμάτων υπολογίστηκαν από πρότυπη καμπύλη. [255]

- **Χρόνος Θρομβίνης (Thrombine Time - TT):** κατά τη διαδικασία της αιμόστασης, η ενδογενής και η εξωγενής οδός της πήξης οδηγούν στην ενεργοποίηση του παράγοντα X, που οδηγεί στη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη. Η θρομβίνη στη συνέχεια διεγείρει τον σχηματισμό του ινώδους από το ινωδογόνο. Ο χρόνος θρομβίνης (TT) μετρά τον χρόνο που χρειάζεται, σε ένα δείγμα αίματος να σχηματίσει θρόμβο, όταν προστίθεται θρομβίνη στο δείγμα. Για τον προσδιορισμό του χρόνου θρομβίνης TT, χρησιμοποιήθηκε το κιτ STA-Thrombin (Diagnostica Stago, Parsippany, NJ), σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται, περιέχει ανθρώπινη θρομβίνη σε διάλυμα ασβεστίου. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι στην παρουσία συγκεκριμένης ποσότητας θρομβίνης, ένα φυσιολογικό πλάσμα σχηματίζει ινώδες σε συγκεκριμένο χρόνο. Χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής αιμόστασης STAR DIAGNOSTICA STAGO. [256], [257]

- **Προπηκτική ενεργότητα μικροκυστιδίων (Microparticles' procoagulant activity):** τα μικροκυστίδια (MPs) ανευρίσκονται στο πλάσμα σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Προέρχονται από ενεργοποίηση των κυττάρων του αίματος (αιμοπετάλια, ενδοθήλιο, λευκοκύτταρα κτλ.). Ανάλογα με την προέλευσή τους, μπορούν να προκαλέσουν προπηκτική έκθεση φωσφολιπιδίων και θρομβογεννητικών πρωτεϊνών, όπως του ιστικού παράγοντα (Tissue Factor – TF), στην επιφάνειά τους. Για τη μέτρηση της προπηκτικής ενεργότητας των μικροκυστιδίων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ELISA με το κιτ ZYMUPHEN™ MP-ACTIVITY (Hyphen Biomed, France), σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή. Τα μικροπηγαδάκια (microwells) είναι επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη και ανεξίνη-V, στα οποία προστίθεται αραιωμένη ποσότητα πλάσματος. Μετά από επώαση και πλύσιμο, προστίθενται ασβέστιο, μίγμα παραγόντων Xa-V και θρομβίνη (FIIa). Τα MPs, αν υπάρχουν στο πλάσμα, προσδένονται στην ανεξίνη-V και εξωτερικεύουν τα φωσφολιπίδια στην επιφάνεια. Με την παρουσία των παραγόντων Xa-Va και του ασβεστίου, η προθρομβίνη ενεργοποιείται προς θρομβίνη. Η συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων είναι ανάλογη της ποσότητας θρομβίνης που παράγεται. Η αντίδραση τερματίζεται με 2% κιτρικό οξύ και η απορρόφηση μετράται στα 405 nm (χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο Jupiter, Asus). Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων επιτυγχάνεται από πρότυπη καμπύλη. [258]

Γ3.8 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS Software), έκδοση 26.0 για Windows (IBM Corp.). Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων των ασθενών αξιολογήθηκαν με τη δοκιμασία t-test, ενώ οι διαφορές των ομάδων των ασθενών με τα υγιή άτομα ελέγχθηκαν με ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA), με τη διόρθωση Bonferroni ή με

τον έλεγχο Mann Whitney U test. Η συσχέτιση (R) μεταξύ των μετρήσεων ελέγχθηκε με τους συντελεστές Pearson και Spearman για τις κανονικά και μη κανονικά κατανομημένες μεταβλητές αντίστοιχα. Ως στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα με $p < 0,05$.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ1. Ασθενείς - Δημογραφικά στοιχεία

Το πρωτόκολλο της παρούσας μελέτης εγκρίθηκε ύστερα από την υπ' αριθμό 23η/05-07-2021 απόφαση της Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας της Έρευνας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Οι έρευνες διεξήχθησαν σύμφωνα με τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Στην παρούσα μελέτη, μετά από έγγραφη συγκατάθεση, συμμετείχαν τριάντα δύο (32) ασθενείς με διπλή ετεροζυγωτία β-Θαλασσαιμίας/Δρεπανοκυτταρικής Νόσου (HbS-β⁺) και είκοσι (20) υγιείς μάρτυρες (controls) παρόμοιου φύλλου και βάρους. Οι ασθενείς είχαν μέση ηλικία τα 49,8±11,9 έτη και οι μάρτυρες τα 44,7±7,6 έτη.

Οι ασθενείς ήταν κλινικά σταθεροί την περίοδο της αιμοληψίας. Όλοι οι ασθενείς λάμβαναν φυλλικό οξύ, ένα συμπλήρωμα που συντελεί στην αιμοπαραγωγική διαδικασία και οι περισσότεροι ήταν υπό θεραπεία υδροξυουρίας (δόση 0,99±0,057 gr, σκεύασμα υδροξυκαρβαμίδης, Siklos, Add Medica, France) με ή χωρίς L-γλουταμίνη (σκεύασμα Glutamine EXTRA DB, Zenyth Pharmaceuticals, Romania), ενώ ένα ποσοστό ασθενών ήταν υπό θεραπεία μεταγγίσεων (1,5±0,5 μονάδες/μήνα για 72±36 μήνες). Η L-γλουταμίνη χορηγήθηκε στους ασθενείς ως συμπλήρωμα διατροφής σε δόση 16±6g/ημέρα για 7,6±4,8. (πίνακας 4).

Στους ασθενείς δε χορηγούνταν φάρμακα ή/και άλλα συμπληρώματα διατροφής κατά τη διάρκεια της μελέτης. Ασθενείς με αγγειοαποφρακτική κρίση τριάντα (30) ημέρες πριν τη χορήγηση γλουταμίνης καθώς και με άλλες λοιμώξεις, κακοήθειες, αυτοάνοσα νοσήματα, ανεπάρκειες, γνωστά πεπτικά έλκη και δυσανεξία στα συστατικά των χορηγούντων συμπληρωμάτων εξαιρέθηκαν από τη μελέτη.

Στους ασθενείς πραγματοποιήθηκε αιμοληψία πριν και μετά τη χορήγηση γλουταμίνης. Το σωληνάριο που περιείχε το αντιπηκτικό EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) χρησιμοποιήθηκε για τον κλασσικό αιματολογικό έλεγχο, την κυτταροβιολογική μελέτη των RBCs, την ωσμωτική ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων, την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, τον προσδιορισμό της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης και των ROS. Το σωληνάριο που περιείχε το αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο (2% sodium citrate, BD Vacutainer Blood Collection Tubes, BD Biosciences, San Jose, CA) χρησιμοποιήθηκε για τον πλήρη εργαστηριακό έλεγχο της αιμόστασης και των παραγόντων που συμμετέχουν στην πήξη του αίματος. Τέλος, το σωληνάριο που δεν περιείχε αντιπηκτικό χρησιμοποιήθηκε για τον πλήρη εργαστηριακό έλεγχο των βιοχημικών εξετάσεων.

Πίνακας 4: Κύρια δημογραφικά στοιχεία των ασθενών και των μαρτύρων. Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν τριάντα πέντε (32) ασθενείς με διπλή ετεροζυγωτία β Θαλασσαιμίας/Δρεπανοκυτταρικής Νόσου (HbS-β⁺) και είκοσι (20) υγιείς μάρτυρες. Συντομογραφίες: gr, γραμμάρια, mth: μήνας, Units: μονάδες αίματος.

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Χαρακτηριστικά	Ασθενείς (n=32)	Μάρτυρες (n=20)
Ηλικία (έτη)	49,8±11,9	44,7±7,6
Δόση γλουταμίνης (gr)	16± 6,35	-
Χορήγηση γλουταμίνης (mth)	7,6±4,8	-
Δόση υδροξουρίας/γλουταμίνης (gr)	0,99±0,057	
Μεταγγίσεις (Units/mth)	1,5±0,5	-

Δ2. Βασικός Αιματολογικός και Βιοχημικός έλεγχος

Δ2.1 Γενική Αίματος

Το πρώτο βήμα που θα έπρεπε να επιβεβαιωθεί κατά τη διεξαγωγή της μελέτης, ήταν η διαφοροποίηση των τιμών των ασθενών σε σχέση με τις τιμές των υγιών μαρτύρων. Όπως αναμενόταν, οι δρεπανοκυτταρικοί ασθενείς χαρακτηρίστηκαν αναιμικοί, εξαιτίας του μειωμένου αριθμού ερυθροκυττάρων (ερυθροπενία) ($3.8 \pm 0.9/\mu\text{L}$, $p < 0.05$ σε σχέση με τους μάρτυρες), της τιμής της ενδοκυττάριας αιμοσφαιρίνης ($10.0 \pm 1.5 \text{ gr/dL}$, $p < 0.05$ σε σχέση με τους μάρτυρες), της τιμής του αιματοκρίτη ($31.8 \pm 4.4\%$, $p < 0.05$ σε σχέση με τους μάρτυρες), αλλά και του αυξημένου εύρους κατανομής ερυθροκυττάρων (RDW) ($19.3 \pm 2.3\%$, $p < 0.05$ σε σχέση με τους μάρτυρες), γεγονός που παρατηρείται στη ΔN, λόγω της ανισοκυττάρωσης και του μειωμένου όγκου των δρεπανοκυττάρων, σε σχέση με τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα (πίνακας 5). Επιπλέον, εκτός από τα αυξημένα επίπεδα HbF ($14.3 \pm 9.6\%$, $p < 0.05$ σε σχέση με τους μάρτυρες) και HbS ($65.9 \pm 14.3\%$, $p < 0.05$ σε σχέση με τους μάρτυρες), βρέθηκαν χαρακτηριστικά περισσότερα δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ) στα δείγματα των δρεπανοκυτταρικών ασθενών ($8.0 \pm 4.8\%$, $p < 0.05$ σε σχέση με τους μάρτυρες). Μάλιστα, ενώ ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων τόσο στους ασθενείς όσο και στους μάρτυρες, οι αναλογίες των βασεόφιλων ($1.0 \pm 0.5\%$, $p < 0.05$ σε σχέση με τους μάρτυρες) και των μονοκυττάρων ($7.5 \pm 3.1\%$, $p < 0.05$ σε σχέση με τους μάρτυρες) βρέθηκαν αυξημένες.

Δ2.2 Βιοχημικός Έλεγχος

Η βιοχημική ανάλυση έδειξε ότι δείκτες της αιμόλυσης, όπως η χολερυθρίνη (ολική, έμμεση και άμεση) ($2.2 \pm 1.1 \text{ mg/dL}$, $1.4 \pm 0.9 \text{ mg/dL}$ και $0.7 \pm 0.3 \text{ mg/dL}$ αντίστοιχα, $p < 0.05$ σε σχέση με τους μάρτυρες) και η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH - Lactate Dehydrogenase) ($337.9 \pm 102.1 \text{ IU/L}$, $p < 0.05$ σε σχέση με τους μάρτυρες) παρουσίασαν υψηλές τιμές σε σχέση με τους μάρτυρες, όπως ήταν αναμενόμενο, εξαιτίας της αιμολυτικής φύσης της δρεπανοκυτταρικής νόσου, με την πρόωρη καταστροφή των ερυθροκυττάρων. Επίσης, οι

ασθενείς εμφάνισαν αύξηση σε δείκτες φλεγμονής όπως η φερριτίνη (359.9 ± 215.5 ng/mL, $p < 0,05$ σε σχέση με τους μάρτυρες) και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP – C Reactive Protein) (6.0 ± 5.9 mg/L, $p < 0,05$ σε σχέση με τους μάρτυρες) παρουσιάζοντας το τυπικό φλεγμονώδες πρότυπο χρόνιας φλεγμονής, που χαρακτηρίζει και δρεπανοκυτταρική νόσο. Τέλος, δείκτες λειτουργίας του ήπατος, όπως η αλκαλική φωσφατάση (ALP - Alkaline Phosphatase) (78.5 ± 23.1 U/L, $p < 0,05$ σε σχέση με τους μάρτυρες) και η γ-γλουταμιλοτρανσφεράση (γ-GT - gamma-glutamyl transferase) (34.4 ± 24.1 U/L, $p < 0,05$ σε σχέση με τους μάρτυρες) παρουσίασαν υψηλές τιμές στον ορό των δρεπανοκυτταρικών ασθενών, σε σχέση με αυτές των μαρτύρων (πίνακας 5).

Δ2.3 Αιμόσταση

Οι δοκιμασίες προσυμπτωματικού ελέγχου (Screening test) της αιμόστασης, σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες, είναι ο χρόνος προθρομβίνης (PT), ο χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT), τα Δ-Διμερή ινώδους και το ινωδογόνο (Fibrinogen). [259] Ο λόγος PT προς το διεθνές κανονικοποιημένο πηλίκο (INR) είναι αποδεκτός ως δείκτης καλής λειτουργίας της εξωγενούς οδού της αιμόστασης [260], που ελέγχει την ανεπάρκεια στους παράγοντες (F=Factors) FI, FII, FV, FVII, FX της πήξης. Το aPTT ελέγχει την ανεπάρκεια των FI, FII, FV, FVIII, FIX, FX, FXI, και FXII, καθώς και το ενδογενές μονοπάτι του καταρράκτη της πήξης. [261] Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, συγκεκριμένοι δείκτες της αιμόστασης, όπως τα επίπεδα των Δ-διμερών (D-Dimers) (2552.6 ± 2186.0 μg/L, $p < 0.05$), του παράγοντα von Willebrand (vWf) ($166.3 \pm 82.4\%$, $p < 0.05$), του παράγοντα VIII (FVIII) ($90.6 \pm 31.0\%$, $p < 0.05$), του συμπλέγματος Θρομβίνης/Αντιθρομβίνης (TAT) (7.0 ± 3.7 μg/L, $p < 0.05$) και της προπηκτικής ενεργότητας των μικροκυστιδίων (EVs) (28.0 ± 12.2 Nm PS, $p < 0.05$), βρέθηκαν ανεβασμένοι στο πλάσμα των δρεπανοκυτταρικών ασθενών, σε σχέση με τους μάρτυρες (πίνακας 5).

Τέλος, η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη (fHb) (Αιμόλυση $0.20 \pm 0.09\%$, $p < 0.05$), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (TAC= 782.6 ± 184.9 μM Fe²⁺, $p < 0.05$), η Αντιοξειδωτική ικανότητα εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ (Plasma UAdAC) (438.2 ± 106.9 μM Fe²⁺, $p < 0.05$), η Αντιοξειδωτική ικανότητα μη εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ (Plasma UAiAC) (344.4 ± 166.2 μM Fe²⁺, $p < 0.05$) καθώς και το φορτίο των ROS στα ερυθροκύτταρα (744.1 ± 258.5 MFI, $p < 0.05$), ήταν αυξημένα στους δρεπανοκυτταρικούς ασθενείς, ενώ η ωσμωτική αντίσταση ($0.33 \pm 0.04\%$, $p < 0.05$) παρέμεινε σε χαμηλότερα επίπεδα (πίνακας 5).

Πίνακας 5: Διαφοροποίηση δρεπανοκυτταρικών ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση (SD). Με έντονη γραφή διακρίνονται οι παθολογικές τιμές, (*): $p < 0.05$ Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. A.U.: Αυθαίρετες Μονάδες; EV: εξωκυττάρια κυστίδια; MFI: mean fluorescence intensity; PS: φωσφατιδυλοσερίνη; ROS: ενδοκυττάρια ρίζες οξυγόνου; TAC: Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος; TAT complex: Σύμπλεγμα θρομβίνης/αντιθρομβίνης; UAdAC: Αντιοξειδωτική ικανότητα εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ; UAiAC: Αντιοξειδωτική ικανότητα μη εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ.

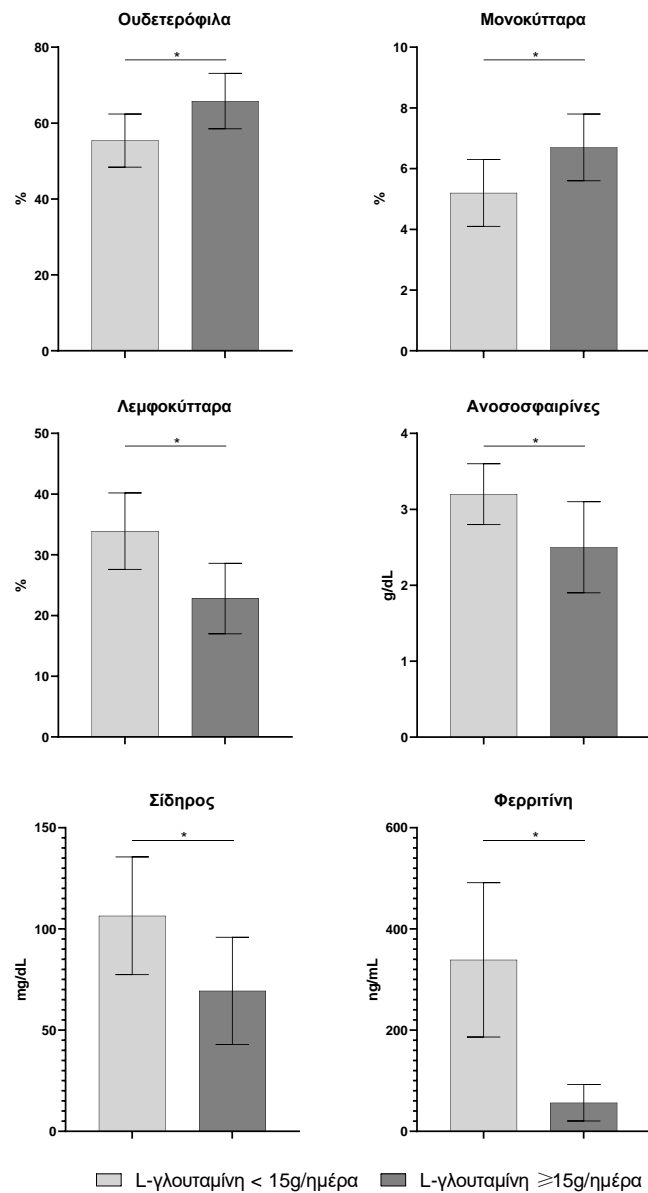
	Ασθενείς	Μάρτυρες	Φ.Τ.
Ηλικία (έτη)	49.8 ± 11.9	44.7 ± 7.6	
Γενική εξέταση αίματος			
Λευκά αιμοσφαίρια (x10 ³ /μL)	7.6 ± 1.7	6.4 ± 1.3	5.2-12.4
Ουδετερόφιλα (%)	57.4 ± 9.0	56.8 ± 7.1	40.0-74.0
Λεμφοκύτταρα (%)	29.3 ± 7.3	31.3 ± 6.5	19.0-48.0
Μονοκύτταρα (%)	7.5 ± 3.1*	5.8 ± 1.3	3.4-9.0
Ηωσινόφιλα (%)	2.5 ± 1.3*	3.6 ± 1.8	0.0-7.0
Βασεόφιλα (%)	1.0 ± 0.5*	0.7 ± 0.3	0.0-1.5
Λόγος Ουδετεροφίλων/Λεμφοκυττάρων	2.2 ± 1.0	1.9 ± 0.5	-
Ερυθρά αιμοσφαίρια (x10 ⁶ /μL)	3.8 ± 0.9*	5.0 ± 0.4	4.2-6.1
Αιμοσφαιρίνη (g/dL)	10.0 ± 1.5*	14.2 ± 1.1	12.0-18.0
Αιματοκρίτης (%)	31.8 ± 4.4*	44.0 ± 3.6	37.0-52.0
Μέσος Όγκος Ερυθρών (MCV; fL)	86.4 ± 12.0	88.9 ± 4.0	80.0-99.0
Μέση Περιεκτικότητα Αιμοσφαιρίνης (MCH; pg)	27.1 ± 4.2	28.6 ± 1.3	27.0-31.0
Μέση Πυκνότητα αιμοσφαιρίνης (MCHC; gr/dL)	31.3 ± 1.3*	32.2 ± 0.7	33.0-37.0
Εύρος Κατανομής Ερυθρών (RDW; %)	19.3 ± 2.3*	13.1 ± 0.9	11.5-14.5
Αιμοπετάλια (x10 ³ /μL)	310.7 ± 189.2	273.4 ± 40.0	130.0-400.0
Μέσος όγκος αιμοπεταλίων (MPV; fL)	10.0 ± 1.2	9.5 ± 1.4	7.2-11.1
Δικτυοερυθροκύτταρα (%)	8.0 ± 4.8*	1.5 ± 0.3	0.5-2.0
Αιμοσφαιρίνη S (HbS) (%)	65.9 ± 14.3*	0.0 ± 0.0	0
Αιμοσφαιρίνη F (HbF) (%)	14.3 ± 9.6*	0.3 ± 0.1	0.8-2
Βιοχημική ανάλυση ορού			
Γλυκόζη (mg/dL)	89.3 ± 10.1*	81.5 ± 10.8	70-105
Ουρία (mg/dL)	28.8 ± 13.7	27.2 ± 5.1	18.0-55.0
Κρεατινίνη (mg/dL)	0.78 ± 0.18	0.83 ± 0.09	0.72-1.25
Ουρικό οξύ (mg/dL)	5.1 ± 1.0	4.7 ± 0.8	3.5-7.2
Χοληστερόλη (mg/dL)	149.4 ± 25.4*	183.1 ± 22.6	0.0-200.0
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	124.7 ± 53.1	99.7 ± 37.0	0.0-150.0
Ασβέστιο (mg/dL)	9.2 ± 0.6	9.3 ± 0.4	8.4-10.2
Φώσφορος (mg/dL)	3.4 ± 0.5	3.4 ± 0.5	2.4-4.7
Κάλιο (mmol/L)	4.3 ± 0.3	4.2 ± 0.2	3.5-5.1
Νάτριο (mmol/L)	138.6 ± 1.8	139.4 ± 1.8	136.0-145.0
Χλώριο (mmol/L)	105.7 ± 1.9	105.8 ± 1.8	98.0-107.0
Μαγνήσιο (mg/dL)	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.1	1.60-2.60
Σίδηρος (mg/dL)	130.0 ± 96.1	109.4 ± 51.0	50-150 (F); 60-160 (M)
Φερριτίνη (ng/mL)	359.9 ± 215.5*	61.0 ± 42.3	14.0-233.0 (F); 16.4-293.3 (M)
Βιταμίνη B12 (pg/mL)	336.3 ± 146.2	371.4 ± 185.0	179.0-1162.0
Φυλλικό οξύ (ng/mL)	24.1 ± 15.0*	6.4 ± 2.5	2.5-17.0
Ολικές πρωτεΐνες (mg/dL)	7.4 ± 0.6	7.3 ± 0.4	6.40-8.30
Αλβουμίνη (gr/dL)	4.4 ± 0.3	4.4 ± 0.3	3.50-5.00
Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (SGOT; U/L)	32.4 ± 11.5*	19.0 ± 6.3	5.0-34.0
Πυροσταφυλική τρανσαμινάση (SGPT; U/L)	28.8 ± 25.0	22.3 ± 12.6	0.0-55.0
Γάμμα γλουταμινοτρανσφεράση (U/L)	34.4 ± 24.1*	19.2 ± 9.6	12.0-64.0
Αλκαλική Φωσφατάση (ALP; U/L)	78.5 ± 23.1*	63.1 ± 11.9	40.0-150.0
Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL; mg/dL)	39.9 ± 8.7*	55.4 ± 14.1	>50

Λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL; mg/dL)	84.7 ± 20.9*	107.8 ± 18.9	<110
Ανοσοσφαιρίνες (g/dL)	3.0 ± 0.7	2.9 ± 0.7	
Ολική χολερυθρίνη (mg/dL)	2.2 ± 1.1*	0.6 ± 0.2	0.2-1.2
Έμμεση χολερυθρίνη (mg/dL)	1.4 ± 0.9*	0.3 ± 0.1	0.01-0.9
Άμεση χολερυθρίνη (mg/dL)	0.7 ± 0.3*	0.2 ± 0.1	0.00-0.30
Γαλακτική αφυδρογονάση (LDH, IU/L)	337.9 ± 102.1*	184.5 ± 31.7	125.0-220.0
Ολική Κινάση Κρεατίνης (CPK total; IU/L)	41.8 ± 29.7*	107.7 ± 80.9	30.0-200.0
Βιταμίνη-D (ng/mL)	24.3 ± 11.1	21.4 ± 8.2	30.0-100.0
C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP; mg/L)	6.0 ± 5.9*	1.7 ± 1.6	0.0-5.0
Παράμετροι Αιμόστασης - Πήξης			
Χρόνος προθρομβίνης INR	1.1 ± 0.4*	1.0 ± 0.1	0.8-1.1
Χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (APTT; sec)	29.7 ± 5.0	29.2 ± 2.9	<36
Ινωδογόνο (mg/dL)	306.2 ± 115.5	327.9 ± 74.1	180-350
Δ-διμερή (μg/L)	2552.6 ± 2186.0*	261.9 ± 98.4	<500
Παράγοντας VIII (%)	90.6 ± 31.0*	123.3 ± 17.6	60-140
Παράγοντας von Willebrand (%)	166.3 ± 82.4*	110 ± 20.8	60-140
Σύμπλεγμα Θρομβίνης/Αντιθρομβίνης (TAT; μg/L)	7.0 ± 3.7*	3.2 ± 0.6	2.0-4.2
Προπηκτική ενεργότητα EVs (nM PS)	28.0 ± 12.2*	20.3 ± 8.5	
Δείκτες αιμόλυσης και οξειδοαναγωγικής κατάστασης			
Αιμόλυση (%)	0.20 ± 0.09*	0.09 ± 0.08	
Ωσμωτική ευθραυστότητα (% [NaCl])	0.33 ± 0.04*	0.46 ± 0.02	
Ενδοκυττάρια ROS (MFI)	744.1 ± 258.5*	480.6 ± 211.2	
Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (TAC; μM Fe ²⁺)	782.6 ± 184.9*	506.3 ± 109.4	
Αντιοξειδωτική ικανότητα εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ (Plasma UAdAC; μM Fe ²⁺)	438.2 ± 106.9*	306.2 ± 125.1	
Αντιοξειδωτική ικανότητα μη εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ (Plasma UAiAC; μM Fe ²⁺)	344.4 ± 166.2*	200.0 ± 59.8	

Δ3. Κατηγοριοποίηση δρεπανοκυτταρικών ασθενών με βάση τη γλουταμίνη

Χαρακτηριστικό της ομάδας των ασθενών αποτέλεσε το γεγονός ότι οι θεραπείες που ακολουθήθηκαν ήταν ποικίλες, επομένως το επόμενο στάδιο της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης της δόσης της L-γλουταμίνης που χορηγήθηκε ως διατροφικό συμπλήρωμα στους δρεπανοκυτταρικούς ασθενείς, που χρησιμοποιούσαν ως θεραπευτικό μέσο την υδροξουρία. Οι μεταγγιζόμενοι ασθενείς αποκλείστηκαν από αυτή την κατηγοριοποίηση, καθώς ήταν αναγκαίο να ληφθεί υπόψη μόνο η επίδραση της δόσης της L-γλουταμίνης. Πιο συγκεκριμένα, φάνηκε ότι η υποομάδα των ασθενών που έλαβε λιγότερο από 15g L-γλουταμίνης ανά ημέρα, παρουσίασε μειωμένο αριθμό ουδετεροφίλων ($55.4 \pm 7.0\%$, $p < 0.05$ σε σχέση με την υποομάδα που έλαβε ίση ή περισσότερη ποσότητα από 15g γλουταμίνης ανά ημέρα) και μονοκυττάρων ($5.2 \pm 1.1\%$, $p < 0.05$), ενώ ο αριθμός των λεμφοκυττάρων παρέμεινε σε υψηλότερα επίπεδα ($33.9 \pm 6.3\%$, $p < 0.05$) στην ίδια ομάδα (πίνακας 6, εικόνα 32). Οι ποσοτικές μεταβολές των διάφορων τύπων λευκοκυττάρων υποδηλώνουν χειρότερη πρόγνωση για τη συγκεκριμένη ομάδα σε σχέση με τη χρόνια

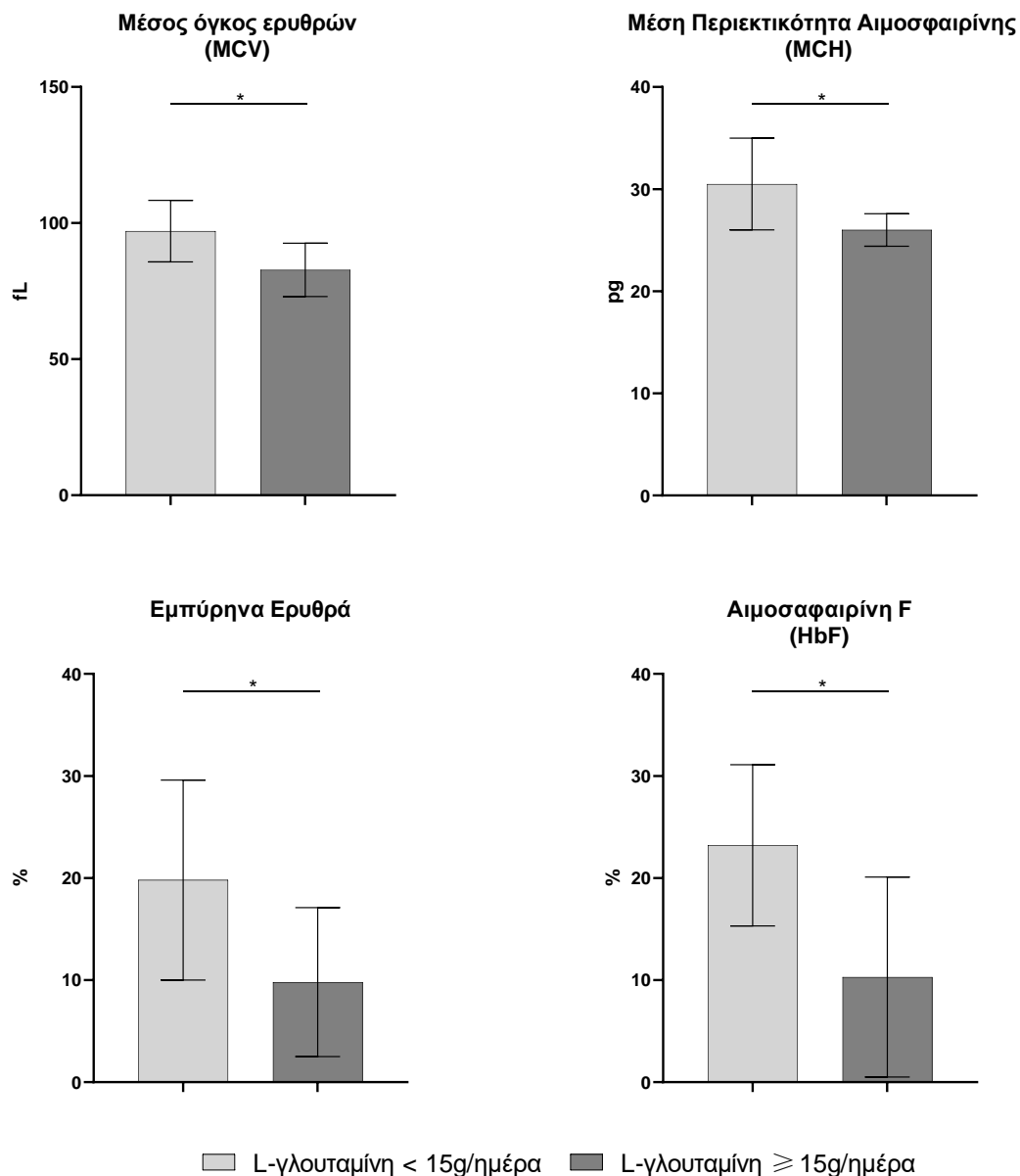
φλεγμονή, γεγονός που αποδείχτηκε συμπληρωματικά και σε τιμές άλλων δεικτών φλεγμονής, όπως ο σίδηρος (106.5 ± 29.1 mg/dL, $p < 0.05$), η φερριτίνη (338.8 ± 152.5 ng/mL, $p < 0.05$) και οι ανοσοσφαιρίνες (3.2 ± 0.4 g/dL, $p < 0.05$), οι οποίες επίσης κινήθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στα αποτελέσματά μας (πίνακας 6, εικόνα 32).



Εικόνα 32: Διαφορές δεικτών φλεγμονής δρεπανοκυτταρικών ασθενών που διαχωρίζονται με βάση τη χορήγηση γλουταμίνης. Παρατηρείται ότι η ομάδα των ασθενών που έλαβε λιγότερη γλουταμίνη από 15g (ανοικτό γκρι χρώμα), παρουσιάζει υψηλότερες τιμές σε αρκετούς δείκτες φλεγμονής (ανοσοσφαιρίνες, σίδηρος και φερριτίνη) και παθολογικές τιμές στον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων (μειωμένο αριθμό ουδετεροφίλων και μονοκυττάρων, ενώ τα λεμφοκύτταρα ήταν αυξημένα) σε σχέση με την ομάδα ασθενών που έλαβε γλουταμίνη ίση ή περισσότερη από 15g (έντονο γκρι χρώμα), η οποία παρουσίασε φυσιολογικούς δείκτες φλεγμονής. (*): $p < 0.05$ Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ασθενών που διαχωρίζονται με βάση τη χορήγηση γλουταμίνης <15g/ ημέρα και ≥15 g/ημέρα.

Όσον αφορά τις τιμές που σχετίζονται με τα ερυθροκύτταρα, τόσο δείκτες όπως η μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (MCH) (30.5 ± 4.5 pg, $p < 0.05$) και ο μέσος όγκος

ερυθρών (MCV) (97.0 ± 11.3 fL, $p < 0.05$), όσο και η παρουσία εμπύρηνων ερυθρών ($19.8 \pm 9.8\%$, $p < 0.05$), βρέθηκαν μειωμένα στην ομάδα που έλαβε την υψηλότερη δόση γλουταμίνης, χωρίς ωστόσο οι τιμές της αιμόλυσης να ακολουθούν την ίδια πτώση [ποσοστό αιμόλυσης = $0.21 \pm 0.08\%$, οσμωτική ευθραυστότητα = $0.33 \pm 0.06\%$ NaCl και γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) = 284.5 ± 57.9 IU/L, ($0.05 < p < 0.10$)] (πίνακας 6, εικόνα 33). Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι στην ομάδα των ασθενών που έλαβε δόση γλουταμίνης άνω των 15g, τα επίπεδα της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης HbF βρέθηκαν μειωμένα στα αποτελέσματά μας ($10.3 \pm 9.8\%$), σε σχέση με την άλλη υποομάδα που έλαβε γλουταμίνη λιγότερη από 15g ($23.2 \pm 7.9\%$, $0.05 < p < 0.05$) (πίνακας 6, εικόνα 33).



Εικόνα 33: Διαφορές στις ερυθροκυτταρικές παραμέτρους δρεπανοκυτταρικών ασθενών που διαχωρίζονται με βάση τη γλουταμίνη. Παρατηρείται ότι η ομάδα των ασθενών που έλαβε ποσότητα γλουταμίνης ίση ή περισσότερη από 15g (έντονο γκρι χρώμα), παρουσίασε φυσιολογικούς ερυθροκυτταρικούς δείκτες (MCV, MCH), ενώ η παρουσία εμπύρηνων ερυθρών δεν ήταν πολύ αυξημένη. Συγχρόνως, η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη F βρέθηκε μειωμένη, σε σχέση με την ομάδα των ασθενών που έλαβε λιγότερη γλουταμίνη από 15g (ανοικτό γκρι

χρώμα), (*): $p < 0.05$ Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ασθενών που διαχωρίζονται με βάση τη χορήγηση γλουταμίνης $< 15\text{g/ημέρα}$ και $\geq 15\text{g/ημέρα}$.

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι η ομάδα που έλαβε υψηλότερη δόση γλουταμίνης, παρουσίασε χαμηλότερες τιμές σε διάφορες παραμέτρους της αιμόστασης/πήξης, συγκεκριμένα στο σύμπλεγμα θρομβίνης-αντιθρομβίνης (TAT) ($5.8 \pm 1.4\ \mu\text{g/L}$, $p < 0.05$), το ινωδογόνο ($364.0 \pm 79.5\ \text{mg/dL}$, $p < 0.05$) και τα δ-διμερή ($1187.6 \pm 360.9\ \mu\text{g/L}$, $p < 0.05$). Το ίδιο συνέβη και στις τιμές που αφορούν το οξειδωτικό στρες, όπως τα ενδοκυτάρια ROS ($880.5 \pm 194.9\ \text{MFI}$, $p < 0.05$) και τα δεσμευμένα διμερή αιμοσφαιρίνης στη μεμβράνη ($1.51 \pm 0.89\ \text{A.U.}$, $p < 0.05$) (πίνακας 6).

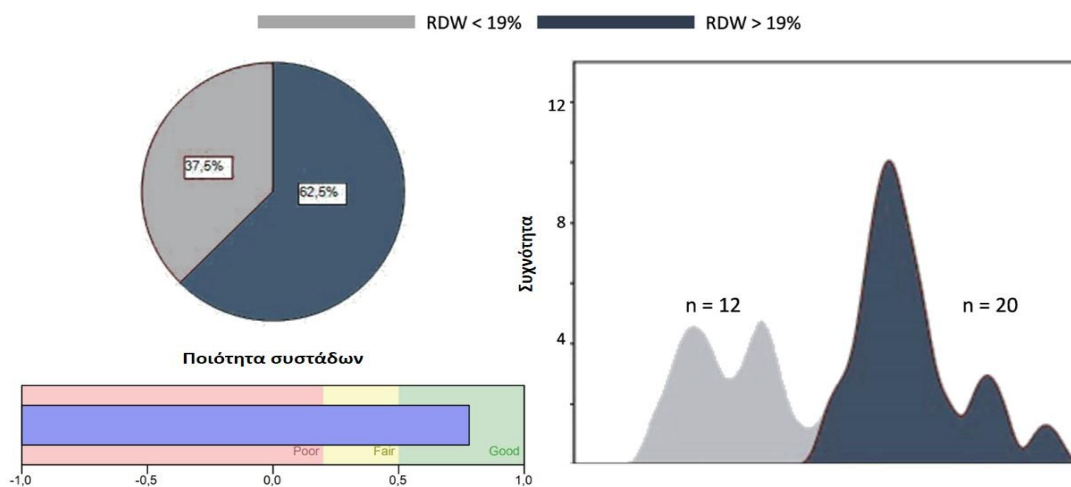
Πίνακας 6: Διαφοροποίηση δρεπανοκυτταρικών ασθενών που λαμβάνουν ως θεραπευτική αγωγή την υδροξουρία και διατροφικό συμπλήρωμα γλουταμίνης λιγότερο ή περισσότερο από 15g/ημέρα . Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση (SD). Με έντονη γραφή διακρίνονται οι παθολογικές τιμές, (*): $p < 0.05$ Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ασθενών που διαχωρίζονται με βάση τη χορήγηση γλουταμίνης $< 15\text{g/ημέρα}$ και $\geq 15\text{g/ημέρα}$. A.U.: Αυθαίρετες Μονάδες; EV: εξωκυτάρια κυστίδια; MFI: mean fluorescence intensity; PS: φωσφατιδυλοσερίνη; ROS: ενδοκυτταρικές ρίζες οξυγόνου; TAC: Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος; TAT complex: Σύμπλεγμα θρομβίνης/αντιθρομβίνης; UAdAC: Αντιοξειδωτική ικανότητα εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ; UAiAC: Αντιοξειδωτική ικανότητα μη εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ.

Δόση γλουταμίνης	$< 15\text{g/ημέρα}$ (n=10)	$\geq 15\text{g/ημέρα}$ (n=9)
Ηλικία (έτη)	50.5 \pm 14.7	40.3 \pm 14.7
Γενική εξέταση αίματος		
Λευκά αιμοσφαίρια ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5.7 \pm 1.7	6.1 \pm 2.0
Ουδετερόφιλα (%)	55.4 \pm 7.0*	65.8 \pm 7.3
Λεμφοκύτταρα (%)	33.9 \pm 6.3*	22.8 \pm 5.8
Μονοκύτταρα (%)	5.2 \pm 1.1*	6.7 \pm 1.1
Ηωσινόφιλα (%)	2.5 \pm 1.0	2.4 \pm 1.4
Βασεόφιλα (%)	0.7 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3
Λόγος Ουδετεροφίλων/Λεμφοκυττάρων	1.7 \pm 0.7*	3.1 \pm 1.2
Ερυθρά αιμοσφαίρια ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	3.4 \pm 0.3	4.0 \pm 1.2
Αιμοσφαιρίνη (g/dL)	10.2 \pm 1.1	10.2 \pm 2.2
Αιματοκρίτης (%)	32.5 \pm 2.4	32.4 \pm 6.6
Μέσος Όγκος Ερυθρών (MCV; fL)	97.0 \pm 11.3*	82.8 \pm 9.8
Μέση Περιεκτικότητα Αιμοσφαιρίνης (MCH; pg)	30.5 \pm 4.5*	26.0 \pm 2.8
Μέση Πυκνότητα αιμοσφαιρίνης (MCHC; gr/dL)	31.4 \pm 1.2	31.5 \pm 1.6
Εύρος Κατανομής Ερυθρών (RDW; %)	19.4 \pm 2.4	18.6 \pm 2.7
Αιμοπετάλια ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	351.7 \pm 263.3	306.9 \pm 201.9
Μέσος όγκος αιμοπεταλίων (MPV; fL)	10.0 \pm 1.2	9.6 \pm 1.2
Δικτυοερυθροκύτταρα (%)	7.1 \pm 1.6	8.4 \pm 6.7
Εμπύρνηνα ερυθρά (%)	19.8 \pm 9.8*	9.8 \pm 7.3
Αιμοσφαιρίνη S (HbS; %)	68.9 \pm 6.4	73.5 \pm 9.3
Αιμοσφαιρίνη F (HbF; %)	23.2 \pm 7.9*	10.3 \pm 9.8
Βιοχημική ανάλυση ορού		
Γλυκόζη (mg/dL)	88.7 \pm 9.6	84.4 \pm 6.8
Ουρία (mg/dL)	27.5 \pm 17.2	21.6 \pm 7.7
Κρεατινίνη (mg/dL)	0.78 \pm 0.12	0.73 \pm 0.13
Ουρικό οξύ (mg/dL)	5.2 \pm 0.7	5.3 \pm 1.2

Χοληστερόλη (mg/dL)	156.9 ± 24.4	153.3 ± 27.9
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	136.0 ± 30.2*	91.2 ± 47.1
Ασβέστιο (mg/dL)	9.6 ± 0.8*	8.9 ± 0.5
Φώσφορος (mg/dL)	3.5 ± 0.3	3.4 ± 0.4
Κάλιο (mmol/L)	4.4 ± 0.3	4.2 ± 0.3
Νάτριο (mmol/L)	139.1 ± 1.4	140.0 ± 1.2
Χλώριο (mmol/L)	105.8 ± 1.5	106.3 ± 1.4
Μαγνήσιο (mg/dL)	2.0 ± 0.6	2.0 ± 0.1
Σίδηρος (mg/dL)	106.5 ± 29.1*	69.4 ± 26.5
Φερριτίνη (ng/mL)	338.8 ± 152.5*	56.5 ± 36.0
Βιταμίνη B12 (pg/mL)	269.1 ± 85.0	311.2 ± 98.7
Φυλλικό οξύ (ng/mL)	20.5 ± 16.6	25.1 ± 14.5
Ολικές πρωτεΐνες (mg/dL)	7.8 ± 0.3*	7.0 ± 0.4
Αλβουμίνη (g/dL)	4.7 ± 0.2	4.5 ± 0.4
Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (SGOT; U/L)	27.8 ± 6.8	26.4 ± 14.2
Πυροσταφυλική τρανσαμινάση (SGPT; U/L)	19.8 ± 7.3	22.4 ± 15.2
Γάμμα γλουταμινοτρανσφεράση (U/L)	20.1 ± 14.1	34.5 ± 15.6
Αλκαλική φωσφατάση (ALP; U/L)	76.1 ± 14.6	86.7 ± 24.8
Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL; mg/dL)	41.5 ± 7.8	39.7 ± 9.0
Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL; mg/dL)	88.5 ± 20.1	95.6 ± 22.3
Ανοσοσφαιρίνες (g/dL)	3.2 ± 0.4*	2.5 ± 0.6
Ολική χολερυθρίνη (mg/dL)	1.9 ± 0.9	1.7 ± 0.8
Έμμεση χολερυθρίνη (mg/dL)	1.3 ± 0.8	1.1 ± 0.7
Άμεση χολερυθρίνη (mg/dL)	0.65 ± 0.13	0.58 ± 0.16
Γαλακτική αφυδρογονάση (IU/L)	284.5 ± 57.9	251.8 ± 27.8
Ολική Κινάση Κρεατίνης (IU/L)	33.4 ± 19.8	47.0 ± 35.6
Βιταμίνη-D (ng/mL)	21.7 ± 6.8	22.9 ± 7.8
C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (mg/L)	4.3 ± 2.4	6.7 ± 6.4
Παράμετροι Αιμόστασης - Πήξης		
Χρόνος προθρομβίνης (INR)	1.02 ± 0.06	1.08 ± 0.12
Χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (APTT; sec)	28.2 ± 2.0	29.1 ± 2.9
Ινωδογόνο (mg/dL)	364.0 ± 79.5*	257.1 ± 104.6
Δ-διμερή (μg/L)	1187.6 ± 360.9*	693.1 ± 307.1
Παράγοντας VIII (%)	78.2 ± 23.4	75.3 ± 33.4
Παράγοντας von Willebrand (%)	126.8 ± 21.2	141.1 ± 84.2
Σύμπλεγμα Θρομβίνης - Αντιθρομβίνης (μg/L)	5.8 ± 1.4*	4.3 ± 1.3
Προπηκτική ενεργότητα EVs (nM PS)	22.5 ± 7.6	27.2 ± 6.3
Αιμόλυση και οξειδοαναγωγική κατάσταση		
Αιμόλυση (%)	0.21 ± 0.08	0.15 ± 0.05
Οσμωτική ευθραυστότητα (% [NaCl])	0.33 ± 0.06	0.34 ± 0.02
Ενδοκυττάρια ROS (MFI)	880.5 ± 194.9*	585.4 ± 231.4
Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (TAC; μM Fe ²⁺)	778.7 ± 177.5	745.2 ± 211.2
Αντιοξειδωτική ικανότητα εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ (Plasma UAdAC; μM Fe ²⁺)	417.1 ± 99.7	435.0 ± 95.0
Αντιοξειδωτική ικανότητα μη εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ (Plasma UAiAC; μM Fe ²⁺)	361.5 ± 158.2	310.2 ± 225.9
Διμερή αιμοσφαιρίνης δεσμευμένα στη μεμβράνη (A.U.)	1.51 ± 0.89*	0.64 ± 0.46

Δ4. Κατηγοριοποίηση δρεπανοκυτταρικών ασθενών με βάση το εύρος κατανομής ερυθροκυττάρων (RDW)

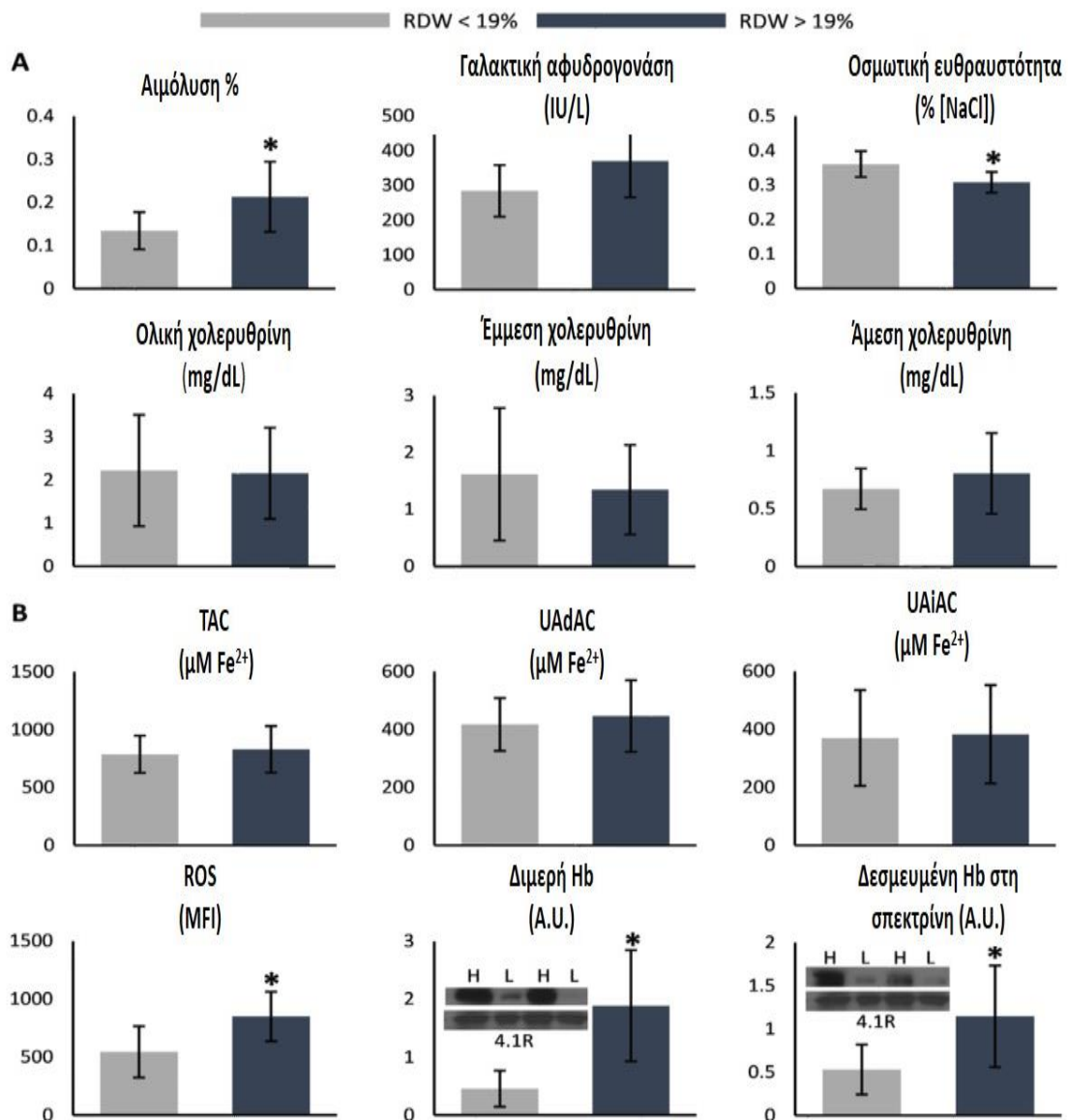
Στη συνέχεια της μελέτης, έγινε προσπάθεια κατηγοριοποίησης όλων των δρεπανοκυτταρικών ασθενών, ανεξάρτητα από τη θεραπευτική αγωγή που λάμβαναν, με βάση μία από τις παραμέτρους που μετρήθηκαν, χρησιμοποιώντας την ανάλυση συστάδων. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης έδειξε ότι το εύρος κατανομής ερυθροκυττάρων (RDW) συνιστούσε ένα δείκτη με καλή προοπτική, ως προς τη διχοτόμηση της ετερογενούς ομάδας των δρεπανοκυτταρικών ασθενών μας (εικόνα 34). Το όριο (cut-off value) του RDW στο 19%, διαχωρίζει την ομάδα των ασθενών σε δύο διακριτές υποομάδες με μικρή επικάλυψη και στατιστικά σημαντικές διαφορές (εικόνα 34).



Εικόνα 34: Η ανάλυση συστάδων αποκάλυψε δύο υποομάδες ασθενών, τις οποίες διαχωρίζουν οι τιμές του RDW. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης έδειξε ότι το εύρος κατανομής ερυθροκυττάρων (RDW) συνιστούσε ένα δείκτη με καλή προοπτική, ως προς τη διχοτόμηση της ετερογενούς ομάδας των δρεπανοκυτταρικών ασθενών μας. Το όριο (cut-off value) του RDW στο 19%, διαχωρίζει την ομάδα των ασθενών σε δύο διακριτές υποομάδες με μικρή επικάλυψη και στατιστικά σημαντικές διαφορές.

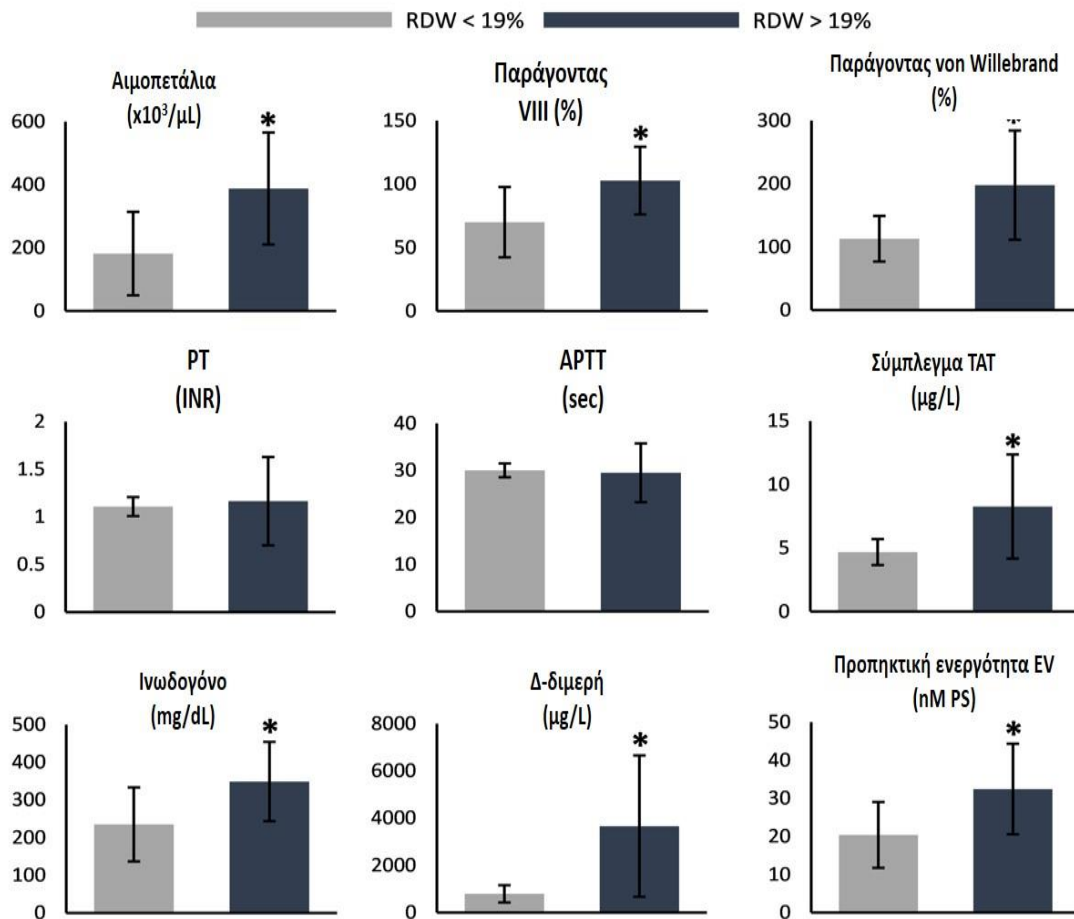
Αναφορικά με τις ερυθροκυτταρικές παραμέτρους, τα επίπεδα της ενδοκυτταρικής αιμοσφαιρίνης βρέθηκαν χαμηλότερα στην ομάδα με RDW>19% (10.8 ± 1.8 vs 9.5 ± 1.1 g/dL, ομάδα χαμηλότερου RDW vs ομάδα υψηλότερου RDW, $p=0.017$), σε αντίθεση με το ποσοστό των δικτυοερυθροκυττάρων και των εμπύρηνων ερυθροκυττάρων, τα οποία παρουσιάζουν το αντίθετο αποτέλεσμα (Δικτυοερυθροκύτταρα: $4.3 \pm 1.1\%$ vs $9.4 \pm 4.2\%$, Εμπύρηνια ερυθροκύτταρα RBCs: $5.4 \pm 5.1\%$ vs $24.7 \pm 15.2\%$, ομάδα χαμηλότερου RDW vs ομάδα υψηλότερου RDW, $p=0.01$ και 0.05 , αντίστοιχα). Ενώ, μάλιστα, η χολερυθρίνη δε διέφερε σημαντικά στις δύο ομάδες, τα επίπεδα της αιμόλυσης και της γαλακτικής αφυδρογονάσης ορού ήταν ανεβασμένα στην ομάδα με το υψηλότερο RDW (εικόνα 35A). Η ίδια ομάδα παρουσίασε χαμηλότερες τιμές οσμωτικής αιμόλυσης (εικόνα 35A), ενώ η συγκέντρωση εξωκυττάρων κατιόντων K^+ βρέθηκε αυξημένη (4.1 ± 0.2 mmol/L vs 4.4 ± 0.3 mmol/L, ομάδα χαμηλότερου RDW vs ομάδα υψηλότερου RDW, $p=0.006$). Επιπλέον, οι δείκτες οξειδωτικού στρες, όπως η συσσώρευση ενδοκυττάρων ROS και η δέσμευση μορίων αιμοσφαιρίνης στην

κυτταρική μεμβράνη και τον κυτταροσκελετό, ήταν περισσότερο ανεβασμένοι στην ομάδα με το υψηλό RDW (εικόνα 35B). Παρά ταύτα, η αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος κινήθηκε σε παρόμοια επίπεδα στις δύο ομάδες (εικόνα 35B).



Εικόνα 35: Διαφορές σε (A) δείκτες αιμόλυσης και (B) οξειδοαναγωγικές παραμέτρους μεταξύ των δρεπανοκυτταρικών δειγμάτων, που διαχωρίζονται με βάση τις τιμές του RDW. Προσθήκη ανοσοαποτυπωμάτων επιλεγμένων δειγμάτων από τις δύο υποομάδες των ασθενών με υψηλό (high) και χαμηλό (low) RDW (έντονο γκρι χρώμα και ανοικτό γκρι χρώμα αντίστοιχα). Η πρωτεΐνη 4.1R χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο (control). TAC: ολική αντιοξειδωτική ικανότητα; UAdAC: Αντιοξειδωτική ικανότητα εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ; UAiAC: Αντιοξειδωτική ικανότητα μη εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ; ROS: ενεργές ρίζες οξυγόνου; MFI: mean fluorescence intensity; Hb: αιμοσφαιρίνη. (*): $p < 0.05$

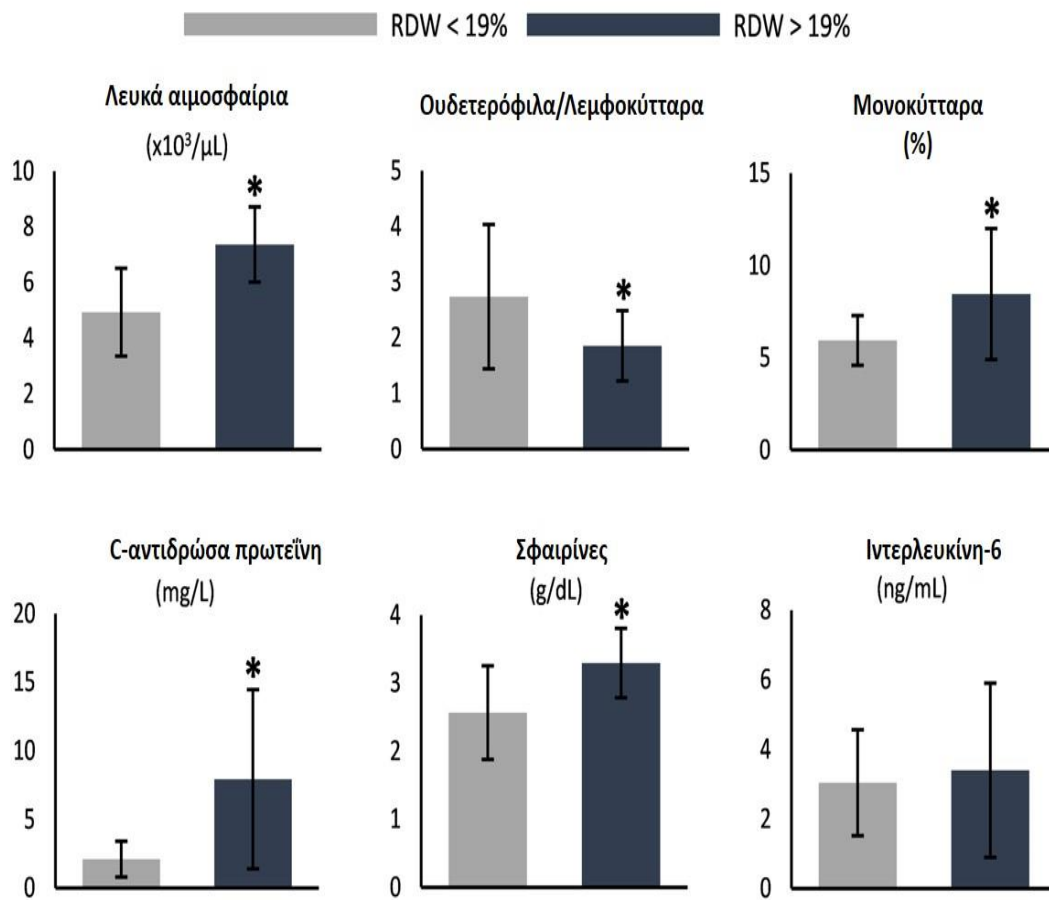
Ακολούθως, οι παράμετροι αιμόστασης και πήξης ήταν εντυπωσιακά ανόμοιες μεταξύ των δύο ομάδων, με τις περισσότερες από αυτές (αιμοπετάλια, παράγοντας von Willebrand, ινωδογόνο και Δ-διμερή) να είναι αυξημένες στην ομάδα με το υψηλό RDW (εικόνα 36). Χαρακτηριστικά μάλιστα, ο χρόνος προθρομβίνης (PT) και ο χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (APTT) δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτες μεταβολές (εικόνα 36).



Εικόνα 36: Διαφορές στις παραμέτρους αιμόστασης και πήξης μεταξύ των δρεπανοκυτταρικών δειγμάτων, που διαχωρίζονται με βάση το RDW. Παρατηρούνται ανόμοια αποτελέσματα στις παραμέτρους της αιμόστασης και πήξης μεταξύ των δύο ομάδων, με κάποιες από τις παραμέτρους να βρίσκονται αυξημένες (αιμοπετάλια, παράγοντας von Willebrand, ινωδογόνο και Δ-διμερή) στην ομάδα με το υψηλό RDW (έντονο γκρι χρώμα), σε σχέση με την ομάδα χαμηλού RDW (ανοικτό γκρι χρώμα). PT: χρόνος προθρομβίνης; INR: διεθνές κανονικοποιημένο πηλίκο; APTT: χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης; TAT: σύμπλεγμα θρομβίνης - αντιθρομβίνης; EV: εξωκυττάρια κυστίδια; PS: φωσφατιδυλοσερίνη. (*) $p < 0.05$

Τέλος, όπως ήταν αναμενόμενο, εξαιτίας της χρόνιας φλεγμονής που παρατηρείται στη δρεπανοκυτταρική νόσο, η ομάδα με το υψηλό RDW είχε υψηλότερο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων, με τα μονοκύτταρα να ακολουθούν παρομοίως με υψηλές τιμές, ενώ τον λόγο ουδετεροφίλων/λεμφοκυττάρων να εμφανίζει υψηλότερη τιμή στην ομάδα με το χαμηλό RDW (εικόνα 37). Επιπρόσθετα, άλλοι δείκτες φλεγμονής, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και οι ανοσοσφαιρίνες ήταν ανεβασμένοι στην ομάδα με RDW>19%, παρόλο που οι τιμές της ιντερλευκίνης-6 φαίνεται ότι δεν επηρεάστηκαν (εικόνα 37). Παράλληλα, οι

συγκεντρώσεις της αλβουμίνης ορού παρέμειναν χαμηλές στην ίδια ομάδα με το υψηλό RDW (εικόνα 37).



Εικόνα 37: Διαφορές στους δείκτες φλεγμονής μεταξύ των δρεπανοκυτταρικών δειγμάτων, που διαχωρίζονται με βάση το RDW. Αρκετοί δείκτες φλεγμονής βρέθηκαν αυξημένοι στην ομάδα με το υψηλό RDW (έντονο γκρι χρώμα), σε σχέση με την ομάδα χαμηλότερου RDW (ανοικτό γκρι χρώμα) εξαιτίας της χρόνιας φλεγμονής που παρατηρείται στη δρεπανοκυτταρική νόσο. Τα λευκά αιμοσφαίρια βρέθηκαν αυξημένα, ομοίως και ο αριθμός των μονοκυττάρων, ενώ ο λόγος ουδετεροφίλων/λεμφοκυττάρων ήταν μικρότερος στη συγκεκριμένη ομάδα. Επιπλέον, η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και οι σφαιρίνες φαίνεται ότι αυξήθηκαν αρκετά στην ομάδα του υψηλού RDW, ενώ η ιντερλευκίνη-6 δεν φάνηκε να επηρεάζεται μεταξύ των δύο ομάδων, (*): $p < 0.05$

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η δρεπανοκυτταρική νόσος (ΔΝ) συνιστά μία ασθένεια, που απαντάται σε όλη την υφήλιο και προκαλεί πολυοργανική ανεπάρκεια στους ασθενείς. Εξαιτίας της ιδιότητας της νόσου να προσβάλλει πολλαπλά οργανικά συστήματα κατά την εξέλιξή της, οι ασθενείς αντιμετωπίζουν πολυάριθμες οξείες κρίσεις, που οδηγούν προοδευτικά σε οργανική ανεπάρκεια. Η ΔΝ προκαλείται από μία αυτοσωμική υπολειπόμενη μεταλλαγή στο έκτο κωδικόνιο του ενδέκατου χρωμοσώματος στο γονίδιο της β σφαιρινικής αλυσίδας, που έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός αμινοξέος, δηλαδή της γλουταμίνης από βαλίνη. [262] Αυτή η μεταλλαγή οδηγεί στη δημιουργία της δρεπανοκυτταρικής αιμοσφαιρίνης S (HbS), η οποία πολυμερίζει επαναλαμβανόμενα τα ερυθροκύτταρα (RBCs), με αποτέλεσμα να τα μετασχηματίζει σε δρεπανοκύτταρα, σε φάσεις οξειδωτικού στρες. [263]

Σπανιότερα, σε ποσοστό 10-15%, η ΔΝ συνυπάρχει με επιπλέον κληρονομικές μεταλλάξεις που δημιουργούν φαινότυποι της Θαλασσαιμίας. [264] Η Θαλασσαιμία αναφέρεται ως μία ομάδα κληρονομικών αιματολογικών διαταραχών, που οδηγούν σε ελαττωματική σύνθεση των σφαιρινικών αλυσίδων, με πιθανή συνέπεια την αναποτελεσματική ερυθροποίηση και την αυξημένη αιμόλυση, που καταλήγουν σε υπερπλασία του μυελού των οστών και σκελετικές παραμορφώσεις. [265] Υπάρχουν πολλαπλές παραλλαγές διπλής ετεροζυγωτίας Δρεπανοκυτταρικής Θαλασσαιμίας, ανάλογα με το ποσοστό της β-σφαιρίνης που παράγεται. [266] Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε ο σπάνιος γονότυπος, συχνός βέβαια στις χώρες της Μεσογείου και ιδιαίτερα στην Ελλάδα, HbS/β⁺thal, κατά τον οποίο παράγεται ένα ποσοστό β-σφαιρίνης. Η έως σήμερα βιβλιογραφία συστήνει ότι η κλινικά ετερογενής φύση αυτής της παραλλαγής είναι ποσοτικά εξαρτώμενη από τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης A (HbA), τα οποία όταν είναι αυξημένα, οδηγούν σε ηπιότερη νόσο. [267] Η φαινοτυπική ταξινόμηση αυτών των επιπέδων είναι η εξής:

1. *Τυποποίηση I: 1%-7% HbA*
2. *Τυποποίηση II: 7%-14% HbA*
3. *Τυποποίηση III: 14%-25% HbA*

Η τυποποίηση I έχει την πιο δυσμενή πρόγνωση, καθώς τα ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα της HbA αδυνατούν να εμποδίσουν τη δρεπάνωση, ενώ προκαλείται περαιτέρω αιμόλυση και αγγειοαποφρακτικές κρίσεις. Απαντάται συχνά στις χώρες της Μεσογείου. [268] Στην τυποποίηση III HbS/β⁺thal με τα υψηλότερα ποσοστά HbA, εξαιτίας της φύσης του υποκινητή που γίνεται η μετάλλαξη, υπάρχει ήπια μειορύθμιση (downregulation) της β-σφαιρίνης. Επομένως, δημιουργείται ένας ήπιος φαινότυπος, με ικανοποιητικά ποσοστά HbA, ικανά να εμποδίσουν τη δρεπάνωση, αλλά και να προκαλέσουν αύξηση της παραγωγής εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (HbF) σε μερικές περιπτώσεις. [269], [268] Αυτός ο φαινότυπος βρίσκεται συχνότερα στην Αφρικανική Ήπειρο. [266], [268] Τέλος, η τυποποίηση II απαντάται κυρίως στον Ελλαδικό χώρο και εξαιτίας της μετάλλαξης IVS-I-110, έχει μία μέση σοβαρότητα. [269]

Η υπότυπος II δεν εκδηλώνεται κλινικά γρήγορα, έτσι οι ασθενείς αργούν να διαγνωστούν για αρκετά χρόνια, μέχρι που εκδηλώνονται οι παρενέργειες της νόσου. Τυπικά, οι επιπλοκές της HbS/β⁺thal μπορεί να περιλαμβάνουν ανθεκτική μικροκυτταρική αναιμία, εγκεφαλικό, αγγειακή νέκρωση των οστών, αγγεοφρακτικές κρίσεις,

ηπατοσπληνική διόγκωση, νεφρική ανεπάρκεια και πνευμονική υπέρταση. [267], [265] Σε ασθενείς που εμφανίζουν μειωμένα ποσοστά HbA, όπως στους υπότυπους I και II, οι επιπλοκές αυτές μπορεί να εμφανιστούν στην παιδική ηλικία ή αργότερα μετά την ενηλικίωση. [267] Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε μελέτη των Benites et.al, οι ενήλικες με HbS/β⁺thal ήταν πιο πιθανό να εμφανίσουν οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, σε σχέση με ασθενείς που φέρουν άλλες μεταλλάξεις δρεπανοκυτταρικής θαλασσαιμίας. [267] Μάλιστα, το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο μπορεί να εμφανιστεί σε ποσοστό 50% των ασθενών με ΔN, ενώ χαρακτηρίζεται από πόνο στο στήθος, βήχα, ταχύπνοια, δύσπνοια, κτλ. Σε ηπιότερες μορφές HbS/β⁺thal, οι εργαστηριακοί δείκτες μπορεί να είναι περισσότερο βοηθητικοί για τη διάγνωση, αντί της αναμονής της εμφάνισης των κλινικών εκδηλώσεων. Δεδομένης της ετερογένειας των κλινικών εκδηλώσεων της HbS/β⁺thal, η θεραπευτική προσέγγιση γίνεται με βάση τις ατομικές ανάγκες του ασθενή.

Σε αυτό το πλαίσιο, στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρουσιάζουμε αιματολογικές παραμέτρους αυτής της λιγότερο μελετημένης υποομάδας δρεπανοκυτταρικών ασθενών, εκθέτοντας διττά δεδομένα: α. ως προς την επίδραση της δόσης της γλουταμίνης σε δείκτες αιμόλυσης, οξειδωσης, φλεγμονής και αιμόστασης και β. τη δυνατότητα κατηγοριοποίησης διαφορετικών υποομάδων ασθενών με ΔN, με βάση το δείκτη ανισοκυττάρωσης (RDW), σε σχέση με γνωστά χαρακτηριστικά της νόσου, όπως την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη (fHB), δείκτες οξειδωτικού στρες, δείκτες αιμόστασης και προφλεγμονώδη μόρια. Οι τιμές των υγιών μαρτύρων, όπως αναμενόταν, διαφοροποιήθηκαν και διαχωρίστηκαν από εκείνες των υποομάδων των ασθενών και στα δύο τμήματα της μελέτης.

E.1 Υψηλή δόση L-γλουταμίνης μπορεί να είναι προστατευτική ως προς την οξείδωση, την υπερπηκτικότητα και την φλεγμονή

Παρ' όλη την πρόοδο που υπάρχει τα τελευταία χρόνια στην εξέλιξη των θεραπευτικών επιλογών για τη ΔΑ, το πρώτο φάρμακο που εγκρίθηκε για τη νόσο, η υδροξουρία, παραμένει η πιο καλά μελετημένη, η πιο διαθέσιμη και κλινικά πιο αποτελεσματική θεραπεία. Η υδροξουρία επάγει την αύξηση των επιπέδων της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης F (HbF), μειώνοντας ταυτόχρονα τον πολυμερισμό της HbS. [270] Το 2017 εγκρίνεται για τους δρεπανοκυτταρικούς ασθενείς, το αμινοξύ L-γλουταμίνη, ως διατροφικό συμπλήρωμα, η οποία φαίνεται ότι βελτιώνει τα συμπτώματα της νόσου, όταν χορηγείται ως μονοθεραπεία ή ως συμπληρωματική θεραπεία με την υδροξουρία. [271] Η γλουταμίνη ενισχύει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ερυθροκυττάρου, συμβάλλοντας στη σύνθεση της επίσης αντιοξειδωτικής γλουταθειώνης, όπως επίσης και στη σύνθεση του Νικοτινάμινο Αδένινο Νουκλεοτιδίου (NAD⁺), καθώς και της ανάγωγης μορφής του, του NADH. [272] Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ελάττωση στους δείκτες οξειδωσης που παρουσίασε η ομάδα των ασθενών με πιο αυξημένη ανάγκη χορήγησης γλουταμίνης, είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες. [271], [279]

Ενώ η θεραπευτική χρήση της L-γλουταμίνης στους ασθενείς με ΔN βασίζεται στις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλες πολύπλευρες ιδιότητες του αμινοξέος. Πιο συγκεκριμένα, η λήψη γλουταμίνης από το στόμα ενισχύει την

παραγωγή της L-αργινίνης, η βιοδιαθεσιμότητα της οποίας μειώνεται στους ασθενείς με ΔN, αποτελεί δε απαραίτητο παράγοντα για τον σχηματισμό του μονοξειδίου του αζώτου (NO). [272] Ως γνωστό, η νόσος αποτελεί μια χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση που μειώνει τα επίπεδα του NO, το οποίο φυσιολογικά παράγεται στο ενδοθήλιο και μεταξύ άλλων, ρυθμίζει τον αγγειακό τόνο, αναστέλλει την παραγωγή των ROS, την αιμοστατική και την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, όπως και την παραγωγή και ενεργοποίηση μορίων προσκόλλησης. [273] Στην παρούσα μελέτη, ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι κάποιες παράμετροι προπηκτικότητας και ινοδόλυσης, όπως το σύμπλεγμα θρομβίνης-αντιθρομβίνης και τα D-dimers μειώθηκαν σε ασθενείς που έλαβαν αυξημένη δόση γλουταμίνης. Είναι επίσης γνωστό ότι σε ασθενείς με ΔN που λαμβάνουν L-γλουταμίνη από το στόμα, μειώνεται η προσκόλληση των δρεπανοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. [226] Ωστόσο, διάφορα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για να καταπολεμήσουν διάφορες επιπλοκές της ασθένειας, όπως για παράδειγμα την υπέρταση, μπορεί να αυξήσουν την παραγωγή του NO και τη μείωση των D-dimers. [274] Συνεπώς, δεν είναι ξεκάθαρο εάν η πρόσληψη γλουταμίνης είναι αυτή που οδηγεί στην παραγωγή NO και τη μείωση των D-dimers ή αν συμβάλλουν και τα δύο φάρμακα και σε ποιο βαθμό. Θα είχε σίγουρα ενδιαφέρον να διερευνηθεί το ερώτημα αυτό στο μέλλον.

Άλλο ένα χαρακτηριστικό της γλουταμίνης, είναι ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τον μεταβολισμό των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και σημαντικό ρυθμιστή για τη λειτουργία των λευκοκυττάρων. Σε σχέση με τους υπόλοιπους υποπληθυσμούς λευκοκυττάρων, τα ουδετερόφιλα, που βρέθηκαν αυξημένα στη μελέτη αυτή, καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες γλουταμίνης για τη στήριξη του ενεργειακού και αντιοξειδωτικού μεταβολισμού τους. [275] Εξάλλου, η γλουταμίνη είναι γνωστή και για την αντιφλεγμονώδη δράση της, αφού αναστέλλει τα NFκB και STAT προφλεγμονώδη μονοπάτια. [276] Συνεπώς, σε μια ασθένεια που τη χαρακτηρίζει μια μόνιμη φλεγμονώδη κατάσταση, όπως η ΔN, η χορήγηση γλουταμίνης ενδέχεται να ωφελήσει μειώνοντας και τη φλεγμονή. Πράγματι, ενώ οι ασθενείς που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη ήταν αντιπροσωπευτικοί της δρεπανοκυτταρικής θαλασσαιμίας, με κοινά χαρακτηριστικά την αναιμία και τη χρόνια φλεγμονή, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ένα διαφορετικό φλεγμονώδες προφίλ, όταν χορηγείται αυξημένη ποσότητα γλουταμίνης, όπως αποδεικνύεται τόσο από τα χαμηλότερα επίπεδα λεμφοκυττάρων και ανοσοσφαιρινών, παράμετροι οι οποίες τείνουν να αυξάνονται σε διάφορα στάδια της νόσου, όσο και από μειωμένα επίπεδα άλλων δεικτών φλεγμονής, όπως η φερριτίνη. [277], [278]

Αναφορικά με την αιμόλυση, οι παράμετροι δε διέφεραν σημαντικά στις δύο υποομάδες των ασθενών. Παρόλα αυτά υπήρξε μια τάση για βελτίωση με μειωμένη αιμόλυση στους ασθενείς που έλαβαν υψηλότερες δόσεις του αμινοξέος, εύρημα το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με πρόσφατη μελέτη των Elenga et al. (2022), η οποία εξέτασε κλινικά, αιματολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά παιδιατρικών και ενήλικων ασθενών με ΔN, οι οποίοι έλαβαν επιμηκυμένη θεραπεία με γλουταμίνη. [279] Άλλος ένας δείκτης σοβαρότητας της νόσου, η ύπαρξη εμπύρηνων ερυθροκυττάρων, τα οποία αντανακλούν την αυξημένη, γρήγορη και μη ομαλή ερυθροποίηση ή και τη νέκρωση του μυελού, φάνηκε ότι ελαττώθηκαν σημαντικά στα αποτελέσματά μας. [280] Ωστόσο, τα μειωμένα επίπεδα HbF που παρατηρήθηκαν στην ομάδα ασθενών που έλαβε υψηλότερη δόση, αποτελεί εύρημα

που χρειάζεται περαιτέρω μελέτη, αφού δεν υπάρχει γνωστή αναφορά σε εμάς που να συνδέει τη χορήγηση γλουταμίνης με την παραγωγή της HbF. Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο, ότι αναμένονται τα δευτερογενή αποτελέσματα πρόσφατης κλινικής δοκιμής που ξεκίνησε το 2018, σχετικά με τη χορήγηση γλουταμίνης και την παραγωγή HbF, από τους Nihara et al. [227]

E2. Ο αυξημένος RDW συνδέεται με δείκτες σοβαρότητας της νόσου

Το εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων (RDW - Red Cell Distribution Width) αποτελεί μία αιματολογική παράμετρο της γενικής εξέτασης αίματος, που αντιπροσωπεύει την ετερογένεια του μεγέθους και του όγκου των ερυθρών αιμοσφαιρίων. [281] Χαρακτηρίζει διάφορες συστηματικές παθολογίες και έχει προταθεί ως πιθανός βιοδείκτης σε καρδιαγγειακές νόσους [282], αυτοάνοσα [283] και σε διάφορους τύπους καρκίνου. [284] Ωστόσο, συνιστά και ένα πολύτιμο εργαλείο στη διαγνωστική αιματολογία, που χρησιμοποιείται για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ των διάφορων τύπων αναιμιών, κυρίως μεταξύ μακροκυτταρικής και νορμοκυτταρικής αναιμίας, [285] ενώ βοηθά στην κατηγοριοποίηση άλλων, όπως τη ΔN, στην οποία βρίσκεται αυξημένος. [286] Είναι μάλιστα χαρακτηριστικό, ότι ομόζυγοι ασθενείς ($\beta_s\beta_s$) με μειωμένη ανισοκυττάρωση (χαμηλό RDW) παρουσιάζουν ηπιότερα συμπτώματα της νόσου και βελτιωμένους αιματολογικούς δείκτες και αυξημένη ολική αιμοσφαιρίνη. [287] Έχει επίσης προταθεί τα τελευταία χρόνια, ότι το οξειδωτικό στρες επηρεάζει το RDW, επομένως η οξειδωτική ανισορροπία μπορεί να συνδέει το RDW και με κλινικές εκδηλώσεις. [288]

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, σε αυτή τη μελέτη το οξειδωτικό στρες, όπως αποδείχτηκε από τη συσσώρευση των ROS και τη δέσμευση της αιμοσφαιρίνης στη μεμβράνη, ήταν αυξημένο στην ομάδα με το υψηλό RDW. Είναι γνωστό, ότι τα ενεδοκυττάρια ROS έχουν καταστροφικές συνέπειες στην παθοφυσιολογία των ερυθροκυττάρων, καθώς δρουν κυρίως στη μεμβράνη και τον κυτταρικό σκελετό, μέσω της καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών, της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και της συσσώρευσης αιμοχρωμάτων. [289] Αυτές οι συνέπειες αποβαίνουν μοιραίες για την επιβίωση των ερυθροκυττάρων, τα οποία υπόκεινται σε καταστροφή της μεμβράνης τους με επαγόμενη λύση, όπως φαίνεται από τα ευρήματα σε δείκτες αιμόλυσης στα αποτελέσματά μας. Αναφέρουμε ιδιαίτερα την αιμόλυση που προκλήθηκε οσμωτικά, καθώς ήταν αντίστροφα σχετιζόμενη με τα επίπεδα του RDW. Είναι γνωστό ότι στις αιμοσφαιρινοπάθειες, όπως στα θαλασαιμικά σύνδρομα και τη ΔN, σε ομόζυγες αλλά και στις ετερόζυγες μορφές τους, τα ερυθροκύτταρα είναι λιγότερο εύθραυστα στο οσμωτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα, στην ετερόζυγη β -μεσογειακή αναιμία, όσο πιο σοβαρή είναι η μετάλλαξη, τόσο πιο οσμωτικά ανθεκτικά είναι τα ερυθροκύτταρα [290], ενώ τα μη αναστρέψιμα δρεπανοκύτταρα παρουσιάζουν τη χαμηλότερη οσμωτική ευθραυστότητα, εξαιτίας της καταστροφής τους. [291]

Επιπρόσθετα, από πρόσφατες μελέτες έχει προταθεί ότι οι παραλλαγές των ερυθροκυττάρων που μετράει ο δείκτης RDW, μπορεί να οδηγούν σε αυξημένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αγγειακού τοιχώματος και των κυκλοφορούντων κυτταρικών στοιχείων, συμβάλλοντας στην αγγειακή παθολογία. [292] Οι παθολογικοί μηχανισμοί που

ενέχουν υψηλό θρομβωτικό κι αιμορραγικό ρίσκο περιλαμβάνουν την προσκόλληση των ερυθροκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα, η οποία εξαρτάται από τη λειτουργική κατάστασή τους, όπως και αυτή του ενδοθηλίου, την τροποποίηση της αντιδραστικότητας και της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων, τα επίπεδα του παράγοντα von Willebrand και του παράγοντα VIII στο αίμα κ.α. [293] Πιο συγκεκριμένα, τα αιμοπετάλια αλληλοεπιδρούν με πρωτεΐνες προσκόλλησης, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα von Willebrand, συσσωματώνονται και ενεργοποιούνται. Η έναρξη του καταρράκτη της πήξης, που ενισχύεται από τα υψηλά επίπεδα του παράγοντα VIII, της θρομβίνης και του ινωδογόνου, μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό θρόμβου, ο οποίος στη συνέχεια λύεται μέσω της ινωδολύσης, όπως φαίνεται από τα αυξημένα επίπεδα των D-dimers. Θα πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη ότι η αυξημένη αιμόλυση στην ομάδα με την αυξημένη ανισοκυττάρωση μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ελεύθερης αιμοσφαιρίνης [294] και όπως έχει προταθεί πρόσφατα, η αίμη μπορεί να προκαλέσει προθρομβωτικές καταστάσεις, είτε όταν συνδέεται με πρωτεΐνες του πλάσματος, είτε μέσω της αλληλοεπίδρασης με τα κύτταρα που συμμετέχουν σε αυτές. [295]

Παράλληλα, έχει γίνει σαφές πλέον, ότι η χρόνια αιμόλυση και η εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, παίζουν ρόλο-κλειδί στον καταρράκτη της πήξης και σε άλλες επιπλοκές της νόσου. [296] Τα αγγειοφρακτικά επεισόδια στη ΔΝ είναι απρόβλεπτα και έως σήμερα, δεν υπάρχει εργαστηριακός βιοδείκτης που να συσχετίζει ακριβώς το κλινικό σύμπτωμα με την κατάσταση της νόσου. Κάποιες μελέτες προτείνουν μια πιθανή σχέση μεταξύ μικροκυστιδίων (Microvesicles - MVs) και υπερπηκτικότητας στη ΔΝ. [297], [298] Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, τα μικροκυστίδια συνιστούν υπομικρά (0.1–2.0 μm) αποκομμένα τμήματα της μεμβράνης διαφόρων κυττάρων (ερυθροκυττάρων, αιμοπεταλίων, λευκοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων), που παράγονται κατά την ενεργοποίηση ή την απόπτωσή τους. [299] Όπως και στις κυτταρικές μεμβράνες, τα φωσφολιπίδια αποτελούν τα κύρια στοιχεία της μεμβράνης τους. Με την κυτταρική ενεργοποίηση, το κυτοσολικό ασβέστιο αυξάνεται, με αποτέλεσμα η μεμβράνη να χάνει την ισορροπημένη κατανομή της, να προκαλείται εξωτερίκευση PS και ο σχηματισμός των MVs. [300] Η έκφραση αυτών των μορίων παίζει καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση των συμπλεγμάτων τενάσης και προθρομβινάσης και στην επακόλουθη αύξηση της παραγωγής θρομβίνης. [301] Αυξημένα επίπεδα MVs έχουν αναφερθεί βέβαια και σε άλλες παθολογίες με αγγειακή και υπερπηκτική εμπλοκή, όπως στη ΔΝ, γεγονός που υποδηλώνει την ενδεχόμενη συμμετοχή των MVs σε βλαβερά θρομβωτικά γεγονότα. [302] Έχει προταθεί ότι τα επίπεδα των MVs θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναν προγνωστικό και διαγνωστικό βιοδείκτη για τη ΔΝ [303] και άλλες νόσους, αλλά παρόλη την πρόοδο που έχει γίνει, λείπει ακόμα η ομοφωνία μεταξύ αποτελεσμάτων των υπαρχόντων μελετών. Έτσι, είναι απαραίτητες περαιτέρω έρευνες σε διάφορες νόσους για την αξιοποίηση των MVs στη διάγνωση.

Ακολούθως, σε μελέτες προηγούμενων ετών, ο δείκτης RDW έχει σχετιστεί με δείκτες φλεγμονής, όπως οι ιντερλευκίνες και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη. [304] Αντίστοιχα, στην παρούσα μελέτη, η ομάδα με υψηλό RDW παρουσιάζει μικρή αύξηση σε κάποιους δείκτες φλεγμονής, όπως τον αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων (WBC), τη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και τις ανοσοσφαιρίνες. Επίσης, τα μονοκύτταρα, που ανευρίσκονται χαρακτηριστικά υψηλά στη

ΔΝ και τα οποία βρέθηκαν επίσης ανεβασμένα στην ομάδα με το υψηλό RDW, τροποποιούνται συχνά σε φλεγμονώδη μονοκύτταρα. [305] Το γεγονός αυτό και η διαρκής φλεγμονή είναι δυνατό να αποφέρουν σημαντικές συνέπειες, όπως την παραγωγή περισσότερων μονοκυττάρων, τη μετανάστευση μακροφάγων και την πρώιμη παραγωγή ερυθροβλαστών, με τρόπο που μπορεί να προκληθεί η απόπτωση ή η έξοδός τους στην κυκλοφορία, με συνέπεια την ανάμειξη των ερυθροειδικών πληθυσμών, που αντανακλάται από το RDW. [306] Συμπερασματικά, το τροποποιημένο φλεγμονώδες προφίλ μπορεί να αποδοθεί στα υψηλά επίπεδα εξωκυτταρικής αιμοσφαιρίνης, που δρα ως σχετιζόμενο με βλάβη μοριακό μοτίβο (damp – damage associated molecular pattern) [307], στο συνεχιζόμενο και υψηλού βαθμού οξειδωτικό στρες [308] και την ενεργοποίηση της αιμόστασης [309], γεγονότα που μπορεί να συνέβαλλαν στην ετερογένεια των κυκλοφορούντων ερυθροκυττάρων στην ομάδα με την υψηλή ανισοκυττάρωση, ενώ η παρουσία άωρων, εμπύρηνων ερυθροβλαστών και δικτυοερυθροκυττάρων στην ομάδα αυτή, είναι αποτέλεσμα ερυθροποίησης κάτω από στρεσογόνες συνθήκες, τις οποίες δημιουργεί η χρόνια φλεγμονή. [310]

ΣΤ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη συστήνει ότι ο θεραπευτικός συνδυασμός γλουταμίνης και υδροξουρίας έχει ωφέλιμες επιδράσεις στις αιματολογικές παραμέτρους της διπλής ετεροζυγωτίας HbS/β⁺thal, πιθανόν εξαιτίας της εμπλοκής της γλουταμίνης στην αντιοξειδωτική ενίσχυση. Ωστόσο, η θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών του συγκεκριμένου υπότυπου ΔΝ αποτελεί ένα πεδίο που χρειάζεται περαιτέρω έρευνα. Επιπλέον, παρά την ποικιλομορφία που παρουσιάζουν διάφορες παράμετροι, ο δείκτης RDW φαίνεται ότι κατηγοριοποιεί ικανοποιητικά τους ασθενείς, με τα επίπεδά του να συσχετίζονται με γνωστούς πρωταγωνιστές της νόσου, την αιμόλυση, το οξειδωτικό στρες, τη φλεγμονή και την αιμόσταση. Ενώ είναι αλήθεια ότι «το RDW δεν μπορεί να θεωρηθεί “πανάκεια” του αιώνα», όπως πολύ εύστοχα ειπώθηκε από τους Lippi και Plebani [311], κοντολογίς φαίνεται ότι αποτελεί μια αρκετά πληροφοριακή παράμετρο σε ετερογενείς νόσους, όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Ciesla Betty, *Hematology in Practice*, 1st ed. Philadelphia: F.A. Davis Co, 2007.
- [2] US Department of Health and Human Services, "Vital and Health Statistics Series 11, No. 247 (03/2005)." Accessed: Mar. 28, 2023. [Online]. Available: [cdc.gov/nchs/data/series/sr_11/sr11_247.pdf](https://www.cdc.gov/nchs/data/series/sr_11/sr11_247.pdf)
- [3] Kumar V et al, *Robbins and cotran pathologic basis of disease*, 8th ed. Philadelphia: PA: Saunders/Elsevier, 2010.
- [4] M. Holinstat, "Normal platelet function," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 36, no. 2, pp. 195–198, Jun. 2017, doi: 10.1007/s10555-017-9677-x.
- [5] Maton Anthea, *Human Biology and Health*. Eanglewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1993.
- [6] E. Sackmann, "Physical Basis of Self-Organization and Function of Membranes: Physics of Vesicles," vol. 1, Lipowski R. and Sackmann E., Eds., Elsevier, 1995, pp. 213–304. doi: 10.1016/S1383-8121(06)80022-9.
- [7] K. Yazdanbakhsh, C. Lomas-Francis, and M. E. Reid, "Blood groups and diseases associated with inherited abnormalities of the red blood cell membrane," *Transfus Med Rev*, vol. 14, no. 4, pp. 364–374, Oct. 2000, doi: 10.1053/tmrv.2000.16232.
- [8] Parisha Sant-Ryan, "The Red Cell Membrane, Part:1, The Role of the Red Cell Membrane," *Cinican Advances in Hematology and Oncology*, vol. 12, no. 8, 2014.
- [9] J. Lombard, "Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research," *Biol Direct*, vol. 9, no. 1, p. 32, Dec. 2014, doi: 10.1186/s13062-014-0032-7.
- [10] R. Advani, S. Sorenson, E. Shinar, W. Lande, E. Rachmilewitz, and S. L. Schrier, "Characterization and comparison of the red blood cell membrane damage in severe human alpha- and beta-thalassemia.," *Blood*, vol. 79, no. 4, pp. 1058–63, Feb. 1992.
- [11] A. G. Kriebardis, M. H. Antonelou, K. E. Stamoulis, E. Economou-Petersen, L. H. Margaritis, and I. S. Papassideri, "Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulin G binding, lipid raft rearrangement, and caspase activation," *Transfusion (Paris)*, vol. 47, no. 7, pp. 1212–1220, Jul. 2007, doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01254.x.
- [12] M. H. Antonelou, A. G. Kriebardis, K. E. Stamoulis, E. Economou-Petersen, L. H. Margaritis, and I. S. Papassideri, "Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol.," *Transfusion (Paris)*, vol. 50, no. 2, pp. 376–89, Feb. 2010, doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02449.x.
- [13] Alberts Bruce, Johnson Alexander, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, and Walter Peter, *Molecular biology of the cell*, 4th ed. New York City: Garland Science, 2002.
- [14] N. Mohandas and P. G. Gallagher, "Red cell membrane: past, present, and future.," *Blood*, vol. 112, no. 10, pp. 3939–48, Nov. 2008, doi: 10.1182/blood-2008-07-161166.

- [15] M. C. Wesseling *et al.*, "Phosphatidylserine Exposure in Human Red Blood Cells Depending on Cell Age.," *Cell Physiol Biochem*, vol. 38, no. 4, pp. 1376–90, 2016, doi: 10.1159/000443081.
- [16] P. J. Romero, E. A. Romero, and M. D. Winkler, "Ionic calcium content of light dense human red cells separated by Percoll density gradients.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1323, no. 1, pp. 23–8, Jan. 1997, doi: 10.1016/s0005-2736(96)00141-1.
- [17] F. A. Kuypers, "Membrane lipid alterations in hemoglobinopathies.," *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, pp. 68–73, 2007, doi: 10.1182/asheducation-2007.1.68.
- [18] Goldman Lee, *Hemolytic Anemias: Red Blood Cell Membrane and Metabolic Defects*. Goldman-Cecil Medicine, 2020.
- [19] M. L. Jennings, "Cell physiology and molecular mechanism of anion transport by erythrocyte band 3/AE1.," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 321, no. 6, pp. C1028–C1059, Dec. 2021, doi: 10.1152/ajpccell.00275.2021.
- [20] R. A. F. Reithmeier, J. R. Casey, A. C. Kalli, M. S. P. Sansom, Y. Alguel, and S. Iwata, "Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1858, no. 7 Pt A, pp. 1507–32, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.bbamem.2016.03.030.
- [21] D. N. Wang, "Band 3 protein: structure, flexibility and function.," *FEBS Lett*, vol. 346, no. 1, pp. 26–31, Jun. 1994, doi: 10.1016/0014-5793(94)00468-4.
- [22] T. J. Satchwell, B. R. Hawley, A. J. Bell, M. L. Ribeiro, and A. M. Toye, "The cytoskeletal binding domain of band 3 is required for multiprotein complex formation and retention during erythropoiesis.," *Haematologica*, vol. 100, no. 1, pp. 133–42, Jan. 2015, doi: 10.3324/haematol.2014.114538.
- [23] P. S. Low, R. L. Geahlen, E. Mehler, and M. L. Harrison, "Extracellular control of erythrocyte metabolism mediated by a cytoplasmic tyrosine kinase.," *Biomed Biochim Acta*, vol. 49, no. 2–3, pp. S135-40, 1990.
- [24] K. E. Badior and J. R. Casey, "Molecular mechanism for the red blood cell senescence clock," *IUBMB Life*, vol. 70, no. 1, pp. 32–40, Jan. 2018, doi: 10.1002/IUB.1703.
- [25] J. P. Cartron and C. Rahuel, "Human erythrocyte glycophorins: protein and gene structure analyses.," *Transfus Med Rev*, vol. 6, no. 2, pp. 63–92, Apr. 1992, doi: 10.1016/s0887-7963(92)70158-8.
- [26] T. Aoki, "A Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins.," *Membranes (Basel)*, vol. 7, no. 4, Sep. 2017, doi: 10.3390/membranes7040056.
- [27] M. R. Cho *et al.*, "Membrane dynamics of the water transport protein aquaporin-1 in intact human red cells.," *Biophys J*, vol. 76, no. 2, pp. 1136–44, Feb. 1999, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77278-4.
- [28] S. Azouzi *et al.*, "Energetic and molecular water permeation mechanisms of the human red blood cell urea transporter B.," *PLoS One*, vol. 8, no. 12, p. e82338, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0082338.

- [29] A. Geadkaew, "Human Parasitic Aquaporins: New Anti-Parasitic Drug Targets," 2016.
- [30] Kotsovolis G., Giala M., and Efstratiadis G., "The role of aquaporins in water homeostasis and their relation with human systems," *Archives of Hellenic Medicine*, vol. 26, no. 3, pp. 307–315, 2009.
- [31] L. Blanc, J. Liu, M. Vidal, J. A. Chasis, X. An, and N. Mohandas, "The water channel aquaporin-1 partitions into exosomes during reticulocyte maturation: implication for the regulation of cell volume," *Blood*, vol. 114, no. 18, pp. 3928–3934, Oct. 2009, doi: 10.1182/blood-2009-06-230086.
- [32] K. Alleva, O. Chara, and G. Amodeo, "Aquaporins: another piece in the osmotic puzzle.," *FEBS Lett*, vol. 586, no. 19, pp. 2991–9, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.013.
- [33] H. Guizouarn and B. Allegrini, "Erythroid glucose transport in health and disease.," *Pflugers Arch*, vol. 472, no. 9, pp. 1371–1383, Sep. 2020, doi: 10.1007/s00424-020-02406-0.
- [34] A. Carruthers, J. DeZutter, A. Ganguly, and S. U. Devaskar, "Will the original glucose transporter isoform please stand up!," *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 297, no. 4, pp. E836–48, Oct. 2009, doi: 10.1152/ajpendo.00496.2009.
- [35] E. K. Cloherty, S. Hamill, K. Levine, and A. Carruthers, "Sugar transporter regulation by ATP and quaternary structure.," *Blood Cells Mol Dis*, vol. 27, no. 1, pp. 102–7, 2001, doi: 10.1006/bcmd.2000.0358.
- [36] T. P. Jensen, L. E. Buckby, and R. M. Empson, "Expression of plasma membrane Ca²⁺ ATPase family members and associated synaptic proteins in acute and cultured organotypic hippocampal slices from rat.," *Brain Res Dev Brain Res*, vol. 152, no. 2, pp. 129–36, Sep. 2004, doi: 10.1016/j.devbrainres.2004.06.004.
- [37] A. Bogdanova, A. Makhro, J. Wang, P. Lipp, and L. Kaestner, "Calcium in red blood cells- a perilous balance.," *Int J Mol Sci*, vol. 14, no. 5, pp. 9848–72, May 2013, doi: 10.3390/ijms14059848.
- [38] T. Tiffert, R. M. Bookchin, and V. L. Lew, "Calcium Homeostasis in Normal and Abnormal Human Red Cells," in *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003, pp. 373–405. doi: 10.1007/978-3-662-05181-8_15.
- [39] P.-A. Oldenborg, "Role of CD47 in erythroid cells and in autoimmunity.," *Leuk Lymphoma*, vol. 45, no. 7, pp. 1319–27, Jul. 2004, doi: 10.1080/1042819042000201989.
- [40] P. Agre, B. L. Smith, and S. Hartel-Schenk, "Biochemistry of the erythrocyte Rh polypeptides: a review.," *Yale J Biol Med*, vol. 63, no. 5, pp. 461–7, 1990.
- [41] C. M. Westhoff, "The structure and function of the Rh antigen complex.," *Semin Hematol*, vol. 44, no. 1, pp. 42–50, Jan. 2007, doi: 10.1053/j.seminhematol.2006.09.010.
- [42] H. Ninomiya and P. J. Sims, "The human complement regulatory protein CD59 binds to the alpha-chain of C8 and to the 'b' domain of C9.," *J Biol Chem*, vol. 267, no. 19, pp. 13675–80, Jul. 1992.

- [43] G. C. Kodippili *et al.*, "Analysis of the Mobilities of Band 3 Populations Associated with Ankyrin Protein and Junctional Complexes in Intact Murine Erythrocytes," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 6, pp. 4129–4138, Feb. 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.294439.
- [44] G. W. Stewart, "Stomatin," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 29, no. 2, pp. 271–274, Feb. 1997, doi: 10.1016/S1357-2725(96)00072-6.
- [45] G. W. Stewart and A. C. Argent, "Integral band 7 protein of the human erythrocyte membrane.," *Biochem Soc Trans*, vol. 20, no. 4, pp. 785–90, Nov. 1992, doi: 10.1042/bst0200785.
- [46] L. Snyers, E. Umlauf, and R. Prohaska, "Oligomeric nature of the integral membrane protein stomatin," *J Biol Chem*, vol. 273, no. 27, pp. 17221–17226, Jul. 1998, doi: 10.1074/JBC.273.27.17221.
- [47] S. Rungaldier, W. Oberwagner, U. Salzer, E. Csaszar, and R. Prohaska, "Stomatin interacts with GLUT1/SLC2A1, band 3/SLC4A1, and aquaporin-1 in human erythrocyte membrane domains," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1828, no. 3, pp. 956–966, Mar. 2013, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2012.11.030.
- [48] A. Montel-Hagen, M. Sitbon, and N. Taylor, "Erythroid glucose transporters," *Curr Opin Hematol*, vol. 16, no. 3, pp. 165–172, May 2009, doi: 10.1097/MOH.0B013E328329905C.
- [49] S. R. Goodman and K. Shiffer, "The spectrin membrane skeleton of normal and abnormal human erythrocytes: a review," *Am J Physiol*, vol. 244, no. 3, 1983, doi: 10.1152/AJPCELL.1983.244.3.C121.
- [50] S. E. Lux, "Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions," *Blood*, vol. 127, no. 2, pp. 187–199, Jan. 2016, doi: 10.1182/BLOOD-2014-12-512772.
- [51] J. Delaunay, "Genetic disorders of the red cell membranes," *FEBS Lett*, vol. 369, no. 1, pp. 34–37, Aug. 1995, doi: 10.1016/0014-5793(95)00460-Q.
- [52] V. Bennett and A. J. Baines, "Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues," *Physiol Rev*, vol. 81, no. 3, pp. 1353–1392, 2001, doi: 10.1152/PHYSREV.2001.81.3.1353.
- [53] S. Lambert and V. Bennett, "From anemia to cerebellar dysfunction. A review of the ankyrin gene family.," *Eur J Biochem*, vol. 211, no. 1–2, pp. 1–6, Jan. 1993, doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb19863.x.
- [54] F. Xing, F. Hu, J. Yang, L. Pan, and J. Xu, "Structural and functional studies of erythrocyte membrane-skeleton by single-cell and single-molecule techniques," *J Innov Opt Health Sci*, vol. 12, no. 01, Jan. 2019, doi: 10.1142/S1793545818300045.
- [55] D. S. Gokhin and V. M. Fowler, "Feisty filaments: actin dynamics in the red blood cell membrane skeleton.," *Curr Opin Hematol*, vol. 23, no. 3, pp. 206–14, May 2016, doi: 10.1097/MOH.0000000000000227.
- [56] C. Picart and D. E. Discher, "Actin Protofilament Orientation at the Erythrocyte Membrane," *Biophys J*, vol. 77, no. 2, pp. 865–878, Aug. 1999, doi: 10.1016/S0006-3495(99)76938-9.

- [57] W. Diakowski, M. Grzybek, and A. F. Sikorski, "Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily.," *Folia Histochem Cytobiol*, vol. 44, no. 4, pp. 231–48, 2006.
- [58] S. M. Marfatia, J. H. Morais-Cabral, A. C. Kim, O. Byron, and A. H. Chishti, "The PDZ Domain of Human Erythrocyte p55 Mediates Its Binding to the Cytoplasmic Carboxyl Terminus of Glycophorin C," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 39, pp. 24191–24197, Sep. 1997, doi: 10.1074/JBC.272.39.24191.
- [59] D. Vardar *et al.*, "Villin-type headpiece domains show a wide range of F-actin-binding affinities," *Cell Motil Cytoskeleton*, vol. 52, no. 1, pp. 9–21, 2002, doi: 10.1002/CM.10027.
- [60] A. C. Azim, S. M. Marfatia, C. Korsgren, E. Dotimas, C. M. Cohen, and A. H. Chishti, "Human erythrocyte dematin and protein 4.2 (pallidin) are ATP binding proteins," *Biochemistry*, vol. 35, no. 9, pp. 3001–3006, Mar. 1996, doi: 10.1021/BI951745Y.
- [61] R. Khanna *et al.*, "Headpiece domain of dematin is required for the stability of the erythrocyte membrane," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no. 10, pp. 6637–6642, May 2002, doi: 10.1073/PNAS.052155999.
- [62] A. A. Khan *et al.*, "Dematin and Adducin Provide a Novel Link between the Spectrin Cytoskeleton and Human Erythrocyte Membrane by Directly Interacting with Glucose Transporter-1," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 21, pp. 14600–14609, May 2008, doi: 10.1074/JBC.M707818200.
- [63] M. Lalle *et al.*, "Dematin, a Component of the Erythrocyte Membrane Skeleton, Is Internalized by the Malaria Parasite and Associates with Plasmodium 14-3-3," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 2, pp. 1227–1236, Jan. 2011, doi: 10.1074/JBC.M110.194613.
- [64] E. Dotimas, D. W. Speicher, B. GuptaRoy, and C. M. Cohen, "Structural domain mapping and phosphorylation of human erythrocyte pallidin (band 4.2)," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1148, no. 1, pp. 19–29, May 1993, doi: 10.1016/0005-2736(93)90156-T.
- [65] T. J. Satchwell, D. K. Shoemark, R. B. Sessions, and A. M. Toye, "Protein 4.2 : A complex linker," *Blood Cells Mol Dis*, vol. 42, no. 3, pp. 201–210, May 2009, doi: 10.1016/J.BCMD.2009.01.005.
- [66] Lawrence Courtney and Riehm Mier Emily, *Biochemical and Molecurar Basis of Pediatric Disease*, 5th ed. 2021.
- [67] P. Sche, C. Vera, and L. Amy Sung, "Intertwined $\alpha\beta$ Spectrin Meeting Helical Actin Protofilament in the Erythrocyte Membrane Skeleton: Wrap-Around vs. Point-Attachment," *Ann Biomed Eng*, vol. 39, no. 7, pp. 1984–1993, Jul. 2011, doi: 10.1007/s10439-011-0293-6.
- [68] T. J. Mankelow, T. J. Satchwell, and N. M. Burton, "Refined views of multi-protein complexes in the erythrocyte membrane," *Blood Cells Mol Dis*, vol. 49, no. 1, pp. 1–10, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.bcmd.2012.03.001.

- [69] M. F. Perutz, "Hemoglobin structure and respiratory transport.," *Sci Am*, vol. 239, no. 6, pp. 92–125, Dec. 1978, doi: 10.1038/scientificamerican1278-92.
- [70] K. K. Anbari, J. P. Garino, and C. F. Mackenzie, "Hemoglobin substitutes," *Eur Spine J*, vol. 13 Suppl 1, no. Suppl 1, Oct. 2004, doi: 10.1007/S00586-004-0737-X.
- [71] Ouellette Robert J. and Rawn J. David, *Organic Chemistry*. Elsevier, 2018. doi: 10.1016/C2016-0-04004-4.
- [72] A. J. Marengo-Rowe, "Structure-function relations of human hemoglobins.," *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, vol. 19, no. 3, pp. 239–45, Jul. 2006, doi: 10.1080/08998280.2006.11928171.
- [73] R. R. Little and W. L. Roberts, "A review of variant hemoglobins interfering with hemoglobin A1c measurement," *J Diabetes Sci Technol*, vol. 3, no. 3, pp. 446–451, 2009, doi: 10.1177/193229680900300307.
- [74] P. Ascenzi *et al.*, "Hemoglobin and heme scavenging," *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, vol. 57, no. 11, pp. 749–759, Nov. 2005, doi: 10.1080/15216540500380871.
- [75] F. M. Low, M. B. Hampton, A. V. Peskin, and C. C. Winterbourn, "Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte," *Blood*, vol. 109, no. 6, pp. 2611–2617, Mar. 2007, doi: 10.1182/BLOOD-2006-09-048728.
- [76] F. M. Low, M. B. Hampton, and C. C. Winterbourn, "Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte," *Antioxid Redox Signal*, vol. 10, no. 9, pp. 1621–1629, Sep. 2008, doi: 10.1089/ARS.2008.2081.
- [77] T. Gudi and C. M. Gupta, "hsp 70-like protein in rhesus erythrocyte cytosol and its interactions with membrane skeleton under heat and pathologic stress.," *J Biol Chem*, vol. 268, no. 28, pp. 21344–50, Oct. 1993.
- [78] Y. Mathangasinghe, B. Fauvet, S. M. Jane, P. Goloubinoff, and N. B. Nillegoda, "The Hsp70 chaperone system: distinct roles in erythrocyte formation and maintenance.," *Haematologica*, vol. 106, no. 6, pp. 1519–1534, Jun. 2021, doi: 10.3324/haematol.2019.233056.
- [79] E. Melloni, F. Salamino, and B. Sparatore, "The calpain-calpastatin system in mammalian cells: properties and possible functions," *Biochimie*, vol. 74, no. 3, pp. 217–223, 1992, doi: 10.1016/0300-9084(92)90120-4.
- [80] A. Wieschhaus *et al.*, "Calpain-1 knockout reveals broad effects on erythrocyte deformability and physiology," *Biochem J*, vol. 448, no. 1, pp. 141–152, Nov. 2012, doi: 10.1042/BJ20121008.
- [81] N. Schwarz-Benmeir, T. Glaser, S. Barnoy, and N. S. Kosower, "Calpastatin in erythrocytes of young and old individuals," *Biochem J*, vol. 304 (Pt 2), no. Pt 2, pp. 365–370, 1994, doi: 10.1042/BJ3040365.
- [82] R. van Wijk and W. W. van Solinge, "The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis.," *Blood*, vol. 106, no. 13, pp. 4034–42, Dec. 2005, doi: 10.1182/blood-2005-04-1622.

- [83] A. Hirono and S. Miwa, “[Human red cell metabolism and its pathophysiology].,” *Nihon Rinsho*, vol. 54, no. 9, pp. 2326–30, Sep. 1996.
- [84] J. Cho, J. S. King, X. Qian, A. J. Harwood, and S. B. Shears, “Dephosphorylation of 2,3-bisphosphoglycerate by MIPP expands the regulatory capacity of the Rapoport-Luebering glycolytic shunt,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 16, pp. 5998–6003, Apr. 2008, doi: 10.1073/PNAS.0710980105.
- [85] R. Franco, G. Navarro, and E. Martínez-Pinilla, “Antioxidant Defense Mechanisms in Erythrocytes and in the Central Nervous System,” *Antioxidants (Basel)*, vol. 8, no. 2, Feb. 2019, doi: 10.3390/ANTIOX8020046.
- [86] R. Van Zwieten, A. J. Verhoeven, and D. Roos, “Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells,” *Free Radic Biol Med*, vol. 67, pp. 377–386, 2014, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.11.022.
- [87] E. M. McDonagh, J. M. Bautista, I. Youngster, R. B. Altman, and T. E. Klein, “PharmGKB summary,” *Pharmacogenet Genomics*, vol. 23, no. 9, pp. 498–508, Sep. 2013, doi: 10.1097/FPC.0b013e32836498f4.
- [88] E. Beutler, “Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective,” *Blood*, vol. 111, no. 1, pp. 16–24, Jan. 2008, doi: 10.1182/BLOOD-2007-04-077412.
- [89] A. Issaian *et al.*, “The interactome of the N-terminus of band 3 regulates red blood cell metabolism and storage quality,” *Haematologica*, vol. 106, no. 11, pp. 2971–2985, Nov. 2021, doi: 10.3324/HAEMATOL.2020.278252.
- [90] M. H. Antonelou, A. G. Kriebardis, and I. S. Papassideri, “Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice,” *Blood Transfus*, vol. 8 Suppl 3, no. Suppl 3, 2010, doi: 10.2450/2010.007S.
- [91] M. H. Antonelou, A. G. Kriebardis, K. E. Stamoulis, I. P. Trougakos, and I. S. Papassideri, “Apolipoprotein J/Clusterin is a novel structural component of human erythrocytes and a biomarker of cellular stress and senescence,” *PLoS One*, vol. 6, no. 10, Oct. 2011, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0026032.
- [92] V. L. Tzounakas *et al.*, “Proteome of Stored RBC Membrane and Vesicles from Heterozygous Beta Thalassemia Donors,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 7, p. 3369, Mar. 2021, doi: 10.3390/ijms22073369.
- [93] V. L. Tzounakas *et al.*, “Red cell proteasome modulation by storage, redox metabolism and transfusion.,” *Blood Transfus*, vol. 20, no. 1, pp. 27–39, Jan. 2022, doi: 10.2450/2020.0179-20.
- [94] V. L. Tzounakas *et al.*, “Temperature-dependent haemolytic propensity of CPDA-1 stored red blood cells vs whole blood - Red cell fragility as donor signature on blood units.,” *Blood Transfus*, vol. 15, no. 5, pp. 447–455, Sep. 2017, doi: 10.2450/2017.0332-16.
- [95] V. L. Tzounakas *et al.*, “Sex-related aspects of the red blood cell storage lesion.,” *Blood Transfus*, vol. 19, no. 3, pp. 224–236, May 2021, doi: 10.2450/2020.0141-20.

- [96] V. L. Tzounakas *et al.*, "Donor-specific individuality of red blood cell performance during storage is partly a function of serum uric acid levels," *Transfusion (Paris)*, vol. 58, no. 1, pp. 34–40, Jan. 2018, doi: 10.1111/trf.14379.
- [97] D. Burger, S. Schock, C. S. Thompson, A. C. Montezano, A. M. Hakim, and R. M. Touyz, "Microparticles: biomarkers and beyond," *Clin Sci (Lond)*, vol. 124, no. 7, pp. 423–441, Apr. 2013, doi: 10.1042/CS20120309.
- [98] K. Thangaraju, S. N. Neerukonda, U. Katneni, and P. W. Buehler, "Extracellular Vesicles from Red Blood Cells and Their Evolving Roles in Health, Coagulopathy and Therapy," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 1, pp. 1–25, Jan. 2020, doi: 10.3390/IJMS22010153.
- [99] H. T. Georgatzakou, S. P. Fortis, E. G. Papageorgiou, M. H. Antonelou, and A. G. Kriebardis, "Blood Cell-Derived Microvesicles in Hematological Diseases and beyond," *Biomolecules*, vol. 12, no. 6, p. 803, Jun. 2022, doi: 10.3390/biom12060803.
- [100] A. S. Said and A. Doctor, "Influence of red blood cell-derived microparticles upon vasoregulation," *Blood Transfus*, vol. 15, no. 6, pp. 522–534, 2017, doi: 10.2450/2017.0353-16.
- [101] M. H. Antonelou, A. G. Kriebardis, K. E. Stamoulis, I. P. Trougakos, and I. S. Papassideri, "Apolipoprotein J/clusterin in human erythrocytes is involved in the molecular process of defected material disposal during vesiculation," *PLoS One*, vol. 6, no. 10, Oct. 2011, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0026033.
- [102] J. M. Rifkind and E. Nagababu, "Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging," *Antioxid Redox Signal*, vol. 18, no. 17, pp. 2274–2283, Jun. 2013, doi: 10.1089/ARS.2012.4867.
- [103] C. P. Berg *et al.*, "Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis," *Cell Death Differ*, vol. 8, no. 12, pp. 1197–1206, 2001, doi: 10.1038/SJ.CDD.4400905.
- [104] D. Mandal *et al.*, "Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3)," *J Biol Chem*, vol. 278, no. 52, pp. 52551–52558, Dec. 2003, doi: 10.1074/JBC.M306914200.
- [105] P. Burger, D. De Korte, T. K. Van Den Berg, and R. Van Bruggen, "CD47 in Erythrocyte Ageing and Clearance - the Dutch Point of View," *Transfus Med Hemother*, vol. 39, no. 5, pp. 348–352, Oct. 2012, doi: 10.1159/000342231.
- [106] M. Föllner, S. M. Huber, and F. Lang, "Erythrocyte programmed cell death," *IUBMB Life*, vol. 60, no. 10, pp. 661–668, Oct. 2008, doi: 10.1002/IUB.106.
- [107] L. Repsold and A. M. Joubert, "Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death," *Biomed Res Int*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/9405617.
- [108] K. S. Lang *et al.*, "Mechanisms of suicidal erythrocyte death," *Cell Physiol Biochem*, vol. 15, no. 5, pp. 195–202, 2005, doi: 10.1159/000086406.
- [109] R. Bissinger, A. A. M. Bhuyan, S. M. Qadri, and F. Lang, "Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases," *FEBS J*, vol. 286, no. 5, pp. 826–854, Mar. 2019, doi: 10.1111/FEBS.14606.

- [110] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Biomarkers of oxidative stress in red blood cells," *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, vol. 155, no. 2, pp. 131–136, 2011, doi: 10.5507/BP.2011.027.
- [111] T. F. Herman and M. U. Javaid, *Heinz Body*. 2023.
- [112] S. Voskou, M. Aslan, P. Fanis, M. Phylactides, and M. Kleanthous, "Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease," *Redox Biol*, vol. 6, pp. 226–239, Dec. 2015, doi: 10.1016/J.REDOX.2015.07.018.
- [113] I. Dalle-Donne, G. Aldini, M. Carini, R. Colombo, R. Rossi, and A. Milzani, "Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression," *J Cell Mol Med*, vol. 10, no. 2, pp. 389–406, 2006, doi: 10.1111/J.1582-4934.2006.TB00407.X.
- [114] A. Rodríguez-García, R. García-Vicente, M. L. Morales, A. Ortiz-Ruiz, J. Martínez-López, and M. Linares, "Protein Carbonylation and Lipid Peroxidation in Hematological Malignancies," *Antioxidants (Basel)*, vol. 9, no. 12, pp. 1–30, Dec. 2020, doi: 10.3390/ANTIOX9121212.
- [115] J. R. Hatherill, G. O. Till, and P. A. Ward, "Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes," *Agents Actions*, vol. 32, no. 3–4, pp. 351–358, Mar. 1991, doi: 10.1007/BF01980898.
- [116] Y. Yoshida, A. Umeno, Y. Akazawa, M. Shichiri, K. Murotomi, and M. Horie, "Chemistry of lipid peroxidation products and their use as biomarkers in early detection of diseases," *J Oleo Sci*, vol. 64, no. 4, pp. 347–356, Mar. 2015, doi: 10.5650/JOS.ESS14281.
- [117] T. Jilani and M. P. Iqbal, "Vitamin E deficiency in South Asian population and the therapeutic use of alpha-tocopherol (Vitamin E) for correction of anemia," *Pak J Med Sci*, vol. 34, no. 6, pp. 1571–1575, Nov. 2018, doi: 10.12669/PJMS.346.15880.
- [118] A. I. Alayash, "Oxidative pathways in the sickle cell and beyond," *Blood Cells Mol Dis*, vol. 70, pp. 78–86, May 2018, doi: 10.1016/J.BCMD.2017.05.009.
- [119] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to in vitro oxidative insult," *Phytother Res*, vol. 24 Suppl 1, no. SUPPL. 1, Jan. 2010, doi: 10.1002/PTR.2853.
- [120] Y. Dincer, Z. Alademir, V. Hamuryudan, I. Fresko, and T. Akcay, "Superoxide dismutase activity and glutathione system in erythrocytes of men with Behcet's disease," *Tohoku J Exp Med*, vol. 198, no. 3, pp. 191–195, Nov. 2002, doi: 10.1620/TJEM.198.191.
- [121] H. U. Lutz and A. Bogdanova, "Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans," *Front Physiol*, vol. 4, 2013, doi: 10.3389/FPHYS.2013.00387.
- [122] G. Wu, Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, and N. D. Turner, "Glutathione metabolism and its implications for health," *J Nutr*, vol. 134, no. 3, pp. 489–492, 2004, doi: 10.1093/JN/134.3.489.
- [123] B. J. Mills and C. A. Lang, "Differential distribution of free and bound glutathione and cyst(e)ine in human blood," *Biochem Pharmacol*, vol. 52, no. 3, pp. 401–406, Aug. 1996, doi: 10.1016/0006-2952(96)00241-9.

- [124] B. E. Prie, L. Iosif, I. Tivig, I. Stoian, and C. Giurcaneanu, "Oxidative stress in androgenetic alopecia.," *J Med Life*, vol. 9, no. 1, pp. 79–83, 2016.
- [125] M. Roche, P. Rondeau, N. R. Singh, E. Tarnus, and E. Bourdon, "The antioxidant properties of serum albumin," *FEBS Lett*, vol. 582, no. 13, pp. 1783–1787, Jun. 2008, doi: 10.1016/J.FEBSLET.2008.04.057.
- [126] A. Nocentini, A. Bonardi, S. Pratesi, P. Gratteri, C. Dani, and C. T. Supuran, "Pharmaceutical strategies for preventing toxicity and promoting antioxidant and anti-inflammatory actions of bilirubin," *J Enzyme Inhib Med Chem*, vol. 37, no. 1, pp. 487–501, 2022, doi: 10.1080/14756366.2021.2020773.
- [127] N. Liu *et al.*, "The Role of Oxidative Stress in Hyperuricemia and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/1470380.
- [128] G. R. Serjeant, "The natural history of sickle cell disease," *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 3, no. 10, 2013, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A011783.
- [129] M. M. Meremikwu and U. Okomo, "Sickle cell disease.," *BMJ Clin Evid*, vol. 2016, Jan. 2016.
- [130] J. B. Herrick, "Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910.," *Yale J Biol Med*, vol. 74, no. 3, pp. 179–84, 2001.
- [131] J. E. Cook and J. Meyer, "SEVERE ANEMIA WITH REMARKABLE ELONGATED AND SICKLE-SHAPED RED BLOOD CELLS AND CHRONIC LEG ULCER," *Arch Intern Med*, vol. XVI, no. 4, pp. 644–651, Oct. 1915, doi: 10.1001/ARCHINTE.1915.00080040140009.
- [132] Mason V.R., "Sickle cell anemia," *Journa;of American Medical Association*, vol. 79, pp. 1318–1320, 1922.
- [133] Diggs L.W., Ahmann C.F., and Bibb J., "THE INCIDENCE AND SIGNIFICANCE OF THE SICKLE CELL TRAIT," *Ann Intern Med*, vol. 7, no. 6, p. 769, Dec. 1933, doi: 10.7326/0003-4819-7-6-769.
- [134] J. V. Neel, "The Inheritance of Sickle Cell Anemia," *Science*, vol. 110, no. 2846, pp. 64–66, 1949, doi: 10.1126/SCIENCE.110.2846.64.
- [135] E. A. Beet, "THE GENETICS OF THE SICKLE-CELL TRAIT IN A BANTU TRIBE," *Ann Eugen*, vol. 14, no. 1, pp. 279–284, Jan. 1947, doi: 10.1111/j.1469-1809.1947.tb02402.x.
- [136] L. PAULING and H. A. ITANO, "Sickle cell anemia a molecular disease.," *Science*, vol. 110, no. 2865, pp. 543–8, Nov. 1949, doi: 10.1126/science.110.2865.543.
- [137] V. M. Ingram, "A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin," *Nature*, vol. 178, no. 4537, pp. 792–794, 1956, doi: 10.1038/178792A0.
- [138] J. A. Hunt and V. M. Ingram, "Allelomorphism and the chemical differences of the human haemoglobins A, S and C," *Nature*, vol. 181, no. 4615, pp. 1062–1063, 1958, doi: 10.1038/1811062A0.

- [139] A. Ault, "US FDA approves first drug for sickle-cell anaemia," *The Lancet*, vol. 351, no. 9105, p. 809, Mar. 1998, doi: 10.1016/s0140-6736(05)78941-8.
- [140] J.-A. Ribeil *et al.*, "Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 376, no. 9, pp. 848–855, Mar. 2017, doi: 10.1056/NEJMOA1609677.
- [141] S. Tewari, V. Brousse, F. B. Piel, S. Menzel, and D. C. Rees, "Environmental determinants of severity in sickle cell disease," *Haematologica*, vol. 100, no. 9, pp. 1108–1116, Sep. 2015, doi: 10.3324/HAEMATOL.2014.120030.
- [142] F. B. Piel *et al.*, "Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis," *Nat Commun*, vol. 1, no. 8, 2010, doi: 10.1038/NCOMMS1104.
- [143] G. J. Kato *et al.*, "Sickle cell disease," *Nat Rev Dis Primers*, vol. 4, Mar. 2018, doi: 10.1038/NRDP.2018.10.
- [144] I. Khamees, F. Ata, H. Choudry, A. T. Soliman, V. De Sanctis, and M. A. Yassin, "Manifestations of HbSE sickle cell disease: a systematic review," *J Transl Med*, vol. 19, no. 1, pp. 1–10, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12967-021-02931-1/FIGURES/2.
- [145] Σχίζας Ν *et al.*, "Συχνότητα και κατανομή β-μεσογειακής αναιμίας και παθολογικών αιμοσφαιρινών στον Ελληνικό χώρο. Έρευνα επί 15.550 νεοσύλλεκτων," *Ιατρική Επιθεώρηση Ενόπλων Δυνάμεων*, vol. 11, no. 1, pp. 197–209, 1977.
- [146] G. Rechavi and S. Rivella, "Regulation of Iron Absorption in Hemoglobinopathies," *Curr Mol Med*, vol. 8, no. 7, pp. 646–662, Oct. 2008, doi: 10.2174/156652408786241401.
- [147] D. J. Weatherall and J. B. Clegg, "Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem.," *Bull World Health Organ*, vol. 79, no. 8, pp. 704–12, 2001.
- [148] M. H. Steinberg, "Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches," *ScientificWorldJournal*, vol. 8, pp. 1295–1324, Dec. 2008, doi: 10.1100/TSW.2008.157.
- [149] B. S. Pace, A. Starlard-Davenport, and A. Kutlar, "Sickle cell disease: progress towards combination drug therapy," *Br J Haematol*, vol. 194, no. 2, pp. 240–251, Jul. 2021, doi: 10.1111/BJH.17312.
- [150] M. Bender and K. Carlberg, *Sickle Cell Disease*. 1993.
- [151] E. Vlachaki *et al.*, "Successful Outcome of Chronic Intrahepatic Cholestasis in an Adult Patient with Sickle Cell/ β (+) Thalassemia.," *Case Rep Hematol*, vol. 2014, pp. 1–3, 2014, doi: 10.1155/2014/213631.
- [152] M. S. Figueiredo, "The compound state: Hb S/beta-thalassemia," *Rev Bras Hematol Hemoter*, vol. 37, no. 3, pp. 150–152, May 2015, doi: 10.1016/J.BJHH.2015.02.008.
- [153] K. H. Thalagahage *et al.*, "HbS/D-Punjab Disease: Report of 3 Cases from Sri Lanka," *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, vol. 34, no. 2, pp. 350–352, Apr. 2018, doi: 10.1007/S12288-017-0851-7/TABLES/1.

- [154] S. G. Ahmed and U. A. Ibrahim, "Non-S sickling hemoglobin variants: Historical, genetic, diagnostic, and clinical perspectives," *Oman Med J*, vol. 36, no. 3, 2021, doi: 10.5001/OMJ.2021.102.
- [155] S. Dror, "Clinical and hematological features of homozygous hemoglobin O-Arab [β 121 Glu \rightarrow Lys].," *Pediatr Blood Cancer*, vol. 60, no. 3, pp. 506–7, Mar. 2013, doi: 10.1002/pbc.24414.
- [156] E. Vichinsky, "Hemoglobin E Syndromes," *Hematology*, vol. 2007, no. 1, pp. 79–83, Jan. 2007, doi: 10.1182/asheducation-2007.1.79.
- [157] C. T. Noguchi and A. N. Schechter, "The intracellular polymerization of sickle hemoglobin and its relevance to sickle cell disease.," *Blood*, vol. 58, no. 6, pp. 1057–68, Dec. 1981.
- [158] J. T. Finch, M. F. Perutz, J. F. Bertles, and J. Döbler, "Structure of sickled erythrocytes and of sickle-cell hemoglobin fibers," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 70, no. 3, pp. 718–722, 1973, doi: 10.1073/PNAS.70.3.718.
- [159] W. A. Eaton, "Hemoglobin S polymerization and sickle cell disease: A retrospective on the occasion of the 70th anniversary of Pauling's *Science* paper," *Am J Hematol*, vol. 95, no. 2, pp. 205–211, Feb. 2020, doi: 10.1002/ajh.25687.
- [160] W. A. Eaton, J. Hofrichter, and P. D. Ross, "Editorial: Delay time of gelation: a possible determinant of clinical severity in sickle cell disease.," *Blood*, vol. 47, no. 4, pp. 621–7, Apr. 1976.
- [161] B. F. Cameron and P. Smariga, "Calcium exchange and calcium-related effects in normal and sickle cell anemia erythrocytes.," *Prog Clin Biol Res*, vol. 20, pp. 105–22, 1978.
- [162] D. Labie and J. Elion, "[Molecular and cellular pathophysiology of sickle cell anemia].," *Pathol Biol (Paris)*, vol. 47, no. 1, pp. 7–12, Jan. 1999.
- [163] M.-H. Odièvre, E. Verger, A. C. Silva-Pinto, and J. Elion, "Pathophysiological insights in sickle cell disease.," *Indian J Med Res*, vol. 134, no. 4, pp. 532–7, Oct. 2011.
- [164] R. Hebbel, "Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology," *Blood*, vol. 77, no. 2, pp. 214–237, Jan. 1991, doi: 10.1182/BLOOD.V77.2.214.214.
- [165] S. E. Lux, K. M. John, and M. J. Karnovsky, "Irreversible deformation of the spectrin-actin lattice in irreversibly sickled cells," *J Clin Invest*, vol. 58, no. 4, pp. 955–963, 1976, doi: 10.1172/JCI108549.
- [166] O. Alvarez, N. S. Montague, M. Marin, R. O'Brien, and M. M. Rodriguez, "Quantification of Sickle Cells in the Peripheral Smear as a Marker of Disease Severity," <http://dx.doi.org/10.3109/15513815.2014.987937>, vol. 34, no. 3, pp. 149–154, Jun. 2014, doi: 10.3109/15513815.2014.987937.
- [167] R. R. Chilcote and D. Gallagher, "REVERSIBLY SICKLED CELLS: A CORRELATE OF THE FREQUENCY OF PAINFUL CRISES IN HbSS SICKLE CELL ANEMIA," *Pediatric Research 1984 18:4*, vol. 18, no. 4, pp. 238–238, Apr. 1984, doi: 10.1203/00006450-198404001-00870.

- [168] D. K. Kaul, M. E. Fabry, and R. L. Nagel, "Erythrocytic and vascular factors influencing the microcirculatory behavior of blood in sickle cell anemia.," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 565, pp. 316–26, 1989, doi: 10.1111/j.1749-6632.1989.tb24179.x.
- [169] D. K. Kau, E. Finnegan, and G. A. Barabino, "Sickle red cell-endothelium interactions," *Microcirculation*, vol. 16, no. 1, pp. 97–111, 2009, doi: 10.1080/10739680802279394.
- [170] D. K. Kaul and R. P. Hebbel, "Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice," *J Clin Invest*, vol. 106, no. 3, pp. 411–420, Aug. 2000, doi: 10.1172/JCI9225.
- [171] A. Turhan, P. Jenab, P. Bruhns, J. V. Ravetch, B. S. Coller, and P. S. Frenette, "Intravenous immune globulin prevents venular vaso-occlusion in sickle cell mice by inhibiting leukocyte adhesion and the interactions between sickle erythrocytes and adherent leukocytes," *Blood*, vol. 103, no. 6, pp. 2397–2400, Mar. 2004, doi: 10.1182/BLOOD-2003-07-2209.
- [172] M. A. Carden, R. M. Fasano, and E. R. Meier, "Not all red cells sickle the same: Contributions of the reticulocyte to disease pathology in sickle cell anemia," *Blood Rev*, vol. 40, p. 100637, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.BLRE.2019.100637.
- [173] A. Ortiz, "Circulating endothelial cells in sickle cell anemia.," *N Engl J Med*, vol. 338, no. 16, pp. 1162; author reply 1162-3, Apr. 1998.
- [174] R. P. Hebbel, J. W. Eaton, M. Balasingam, and M. H. Steinberg, "Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes.," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 70, no. 6, p. 1253, 1982, doi: 10.1172/JCI110724.
- [175] C. Sultana, Y. Shen, V. Rattan, C. Johnson, and V. K. Kalra, "Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes.," *Blood*, vol. 92, no. 10, pp. 3924–35, Nov. 1998.
- [176] J. Villagra, S. Shiva, L. A. Hunter, R. F. Machado, M. T. Gladwin, and G. J. Kato, "Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin," *Blood*, vol. 110, no. 6, pp. 2166–2172, Sep. 2007, doi: 10.1182/BLOOD-2006-12-061697.
- [177] G. Hollopeter *et al.*, "Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs," *Nature*, vol. 409, no. 6817, pp. 202–207, Jan. 2001, doi: 10.1038/35051599.
- [178] N. Conran and S. H. Embury, "Sickle cell vaso-occlusion: The dialectic between red cells and white cells," *Exp Biol Med*, vol. 246, no. 12, pp. 1458–1472, Jun. 2021, doi: 10.1177/15353702211005392.
- [179] D. K. Kaul and M. E. Fabry, "In vivo studies of sickle red blood cells.," *Microcirculation*, vol. 11, no. 2, pp. 153–65, Mar. 2004.
- [180] R. P. Hebbel, R. Osarogiagbon, and D. Kaul, "The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy.," *Microcirculation*, vol. 11, no. 2, pp. 129–51, Mar. 2004.

- [181] H. Brittain, J. Eckman, R. Swerlick, R. Howard, and T. Wick, "Thrombospondin From Activated Platelets Promotes Sickle Erythrocyte Adherence to Human Microvascular Endothelium Under Physiologic Flow: A Potential Role for Platelet Activation in Sickle Cell Vaso-Occlusion," *Blood*, vol. 81, no. 8, pp. 2137–2143, Apr. 1993, doi: 10.1182/BLOOD.V81.8.2137.2137.
- [182] R. A. Swerlick, J. R. Eckman, A. Kumar, M. Jeitler, and T. M. Wick, "Alpha 4 beta 1-integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium," *Blood*, vol. 82, no. 6, pp. 1891–1899, Sep. 1993, doi: 10.1182/BLOOD.V82.6.1891.1891.
- [183] B. N. Yamaja Setty, S. Kulkarni, and M. J. Stuart, "Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell–endothelial adhesion," *Blood*, vol. 99, no. 5, pp. 1564–1571, Mar. 2002, doi: 10.1182/BLOOD.V99.5.1564.
- [184] L. Hallmark, L. E. F. Almeida, S. Kamimura, M. Smith, and Z. M. N. Quezado, "Nitric oxide and sickle cell disease—Is there a painful connection?," <https://doi.org/10.1177/1535370220976397>, vol. 246, no. 3, pp. 332–341, Dec. 2020, doi: 10.1177/1535370220976397.
- [185] M. F. Whelihan *et al.*, "Thrombin generation and cell-dependent hypercoagulability in sickle cell disease," *J Thromb Haemost*, vol. 14, no. 10, pp. 1941–1952, Oct. 2016, doi: 10.1111/JTH.13416.
- [186] Y. Guo *et al.*, "The Protein C Pathway in Human and Murine Sickle Cell Disease: Alterations in Protein C, Thrombomodulin (TM), and Endothelial Protein C Receptor (EPCR) at Baseline and during Acute Vaso-Occlusion," *Blood*, vol. 112, no. 11, p. 538, Nov. 2008, doi: 10.1182/BLOOD.V112.11.538.538.
- [187] E. Sparkenbaugh and R. Pawlinski, "Prothrombotic aspects of sickle cell disease," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 15, no. 7, pp. 1307–1316, Jul. 2017, doi: 10.1111/JTH.13717.
- [188] E. M. Sparkenbaugh *et al.*, "Excess of heme induces tissue factor-dependent activation of coagulation in mice," *Haematologica*, vol. 100, no. 3, pp. 308–314, Mar. 2015, doi: 10.3324/HAEMATOL.2014.114728.
- [189] E. G. Pavlou *et al.*, "Coagulation Abnormalities in Renal Pathology of Chronic Kidney Disease: The Interplay between Blood Cells and Soluble Factors," *Biomolecules*, vol. 11, no. 9, p. 1309, Sep. 2021, doi: 10.3390/biom11091309.
- [190] W. A. Arishi, H. A. Al-hadrami, and M. Zourob, "Techniques for the Detection of Sickle Cell Disease: A Review," *Micromachines (Basel)*, vol. 12, no. 5, 2021, doi: 10.3390/MI12050519.
- [191] K. de Haan *et al.*, "Automated screening of sickle cells using a smartphone-based microscope and deep learning," *NPJ Digit Med*, vol. 3, no. 1, p. 76, May 2020, doi: 10.1038/s41746-020-0282-y.
- [192] A. L. Okwi, W. Byarugaba, A. Parkes, and M. Ocaido, "The Reliability of Sickling and Solubility Tests and Peripheral Blood Film Method for Sickle Cell Disease Screening at District Health Centers in Uganda," *Clin Mother Child Health*, vol. 7, pp. 1–5, 2010, doi: 10.4303/CMCH/C101947.

- [193] N. Volpi and F. Maccari, Eds., *Capillary Electrophoresis of Biomolecules*, vol. 984. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. doi: 10.1007/978-1-62703-296-4.
- [194] C. Frömmel, "Newborn Screening for Sickle Cell Disease and Other Hemoglobinopathies: A Short Review on Classical Laboratory Methods—Isoelectric Focusing, HPLC, and Capillary Electrophoresis," *International Journal of Neonatal Screening 2018*, Vol. 4, Page 39, vol. 4, no. 4, p. 39, Dec. 2018, doi: 10.3390/IJNS4040039.
- [195] Y. Alapan *et al.*, "Emerging point-of-care technologies for sickle cell disease screening and monitoring," *Expert Rev Med Devices*, vol. 13, no. 12, pp. 1073–1093, Dec. 2016, doi: 10.1080/17434440.2016.1254038.
- [196] S. B. Nair, "Potential Pitfalls in Using HPLC and its Interpretation in Diagnosing HbS," *J Rare Dis Res Treat*, vol. 3, no. 3, pp. 9–12, Aug. 2018, doi: 10.29245/2572-9411/2018/3.1161.
- [197] C. R. Newton *et al.*, "Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS).," *Nucleic Acids Res*, vol. 17, no. 7, pp. 2503–16, Apr. 1989, doi: 10.1093/nar/17.7.2503.
- [198] M. E. Natoli *et al.*, "Allele-Specific Recombinase Polymerase Amplification to Detect Sickle Cell Disease in Low-Resource Settings," *Anal Chem*, vol. 93, no. 11, pp. 4832–4840, Mar. 2021, doi: 10.1021/ACS.ANALCHEM.0C04191.
- [199] J. Voisey and C. Morris, "SNP Technologies for Drug Discovery: A Current Review," *Curr Drug Discov Technol*, vol. 5, no. 3, pp. 230–235, Sep. 2008, doi: 10.2174/157016308785739811.
- [200] N. A. Mobark *et al.*, "Sickle cell disease: A distinction of two most frequent genotypes (HbSS and HbSC)," *PLoS One*, vol. 15, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0228399.
- [201] J. B. Schnog, A. J. Duits, F. A. J. Muskiet, H. ten Cate, R. A. Rojer, and D. P. M. Brandjes, "Sickle cell disease; a general overview.," *Neth J Med*, vol. 62, no. 10, pp. 364–74, Nov. 2004.
- [202] S. N. Uwaezuoke, A. C. Ayuk, I. K. Ndu, C. I. Eneh, N. R. Mbanefo, and O. U. Ezenwosu, "Vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: current paradigm on pain management," *J Pain Res*, vol. 11, pp. 3141–3150, 2018, doi: 10.2147/JPR.S185582.
- [203] V. Sachdev, D. R. Rosing, and S. L. Thein, "Cardiovascular complications of sickle cell disease," *Trends Cardiovasc Med*, vol. 31, no. 3, pp. 187–193, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.TCM.2020.02.002.
- [204] D. R. Powars, "Sickle cell anemia and major organ failure," *Hemoglobin*, vol. 14, no. 6, pp. 573–598, 1990, doi: 10.3109/03630269009046967.
- [205] P. C. Desai and K. I. Ataga, "The acute chest syndrome of sickle cell disease," *Expert Opin Pharmacother*, vol. 14, no. 8, pp. 991–999, Jun. 2013, doi: 10.1517/14656566.2013.783570.

- [206] E. Vichinsky, "Chronic organ failure in adult sickle cell disease," *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, vol. 2017, no. 1, pp. 435–439, Dec. 2017, doi: 10.1182/ASHEDUCATION-2017.1.435.
- [207] E. Theocharidou and A. R. Suddle, "The Liver in Sickle Cell Disease," *Clin Liver Dis*, vol. 23, no. 2, pp. 177–189, May 2019, doi: 10.1016/J.CLD.2018.12.002.
- [208] F. I. Chinegwundoh, S. Smith, and K. A. Anie, "Treatments for priapism in boys and men with sickle cell disease," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 2017, no. 9, Sep. 2017, doi: 10.1002/14651858.CD004198.PUB3/MEDIA/CDSR/CD004198/REL0003/CD004198/IMAGE_N/NCD004198-CMP-004-06.PNG.
- [209] G. Onimoe and S. Rotz, "Sickle cell disease: A primary care update," *Cleve Clin J Med*, vol. 87, no. 1, pp. 19–27, Jan. 2020, doi: 10.3949/CCJM.87A.18051.
- [210] H. Han, L. Hensch, and V. N. Tubman, "Indications for transfusion in the management of sickle cell disease," *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, vol. 2021, no. 1, pp. 696–703, Dec. 2021, doi: 10.1182/HEMATOLOGY.2021000307.
- [211] G. E. Linder and S. T. Chou, "Red cell transfusion and alloimmunization in sickle cell disease," *Haematologica*, vol. 106, no. 7, pp. 1805–1815, Jul. 2021, doi: 10.3324/HAEMATOL.2020.270546.
- [212] M. S. Karafin *et al.*, "Risk factors for red blood cell alloimmunization in the Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study (REDS-III) database," *Br J Haematol*, vol. 181, no. 5, pp. 672–681, Jun. 2018, doi: 10.1111/BJH.15182.
- [213] D. Ambruso *et al.*, "Experience with donors matched for minor blood group antigens in patients with sickle cell anemia who are receiving chronic transfusion therapy," *Transfusion (Paris)*, vol. 27, no. 1, pp. 94–98, Jan. 1987, doi: 10.1046/j.1537-2995.1987.27187121485.x.
- [214] C. Y. Wang and J. L. Babitt, "Liver iron sensing and body iron homeostasis," *Blood*, vol. 133, no. 1, pp. 18–29, Jan. 2019, doi: 10.1182/BLOOD-2018-06-815894.
- [215] D. S. Darbari, P. Kple-Faget, J. Kwagyan, S. Rana, V. R. Gordeuk, and O. Castro, "Circumstances of death in adult sickle cell disease patients," *Am J Hematol*, vol. 81, no. 11, pp. 858–863, Nov. 2006, doi: 10.1002/AJH.20685.
- [216] World Health Organization, "Global status report on blood safety and availability 2016," Geneva, 2017.
- [217] P. T. McGann and R. E. Ware, "Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia," *Expert Opin Drug Saf*, vol. 14, no. 11, pp. 1749–1758, Nov. 2015, doi: 10.1517/14740338.2015.1088827.
- [218] S. J. Nevitt, A. P. Jones, and J. Howard, "Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease," *Cochrane Database Syst Rev*, vol. 4, no. 4, p. CD002202, Apr. 2017, doi: 10.1002/14651858.CD002202.pub2.
- [219] H. L. Elford, "Effect of hydroxyurea on ribonucleotide reductase," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 33, no. 1, pp. 129–35, Oct. 1968, doi: 10.1016/0006-291x(68)90266-0.

- [220] R. E. Ware, "How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia.," *Blood*, vol. 115, no. 26, pp. 5300–11, Jul. 2010, doi: 10.1182/blood-2009-04-146852.
- [221] N. S. Green and S. Barral, "Emerging science of hydroxyurea therapy for pediatric sickle cell disease," *Pediatr Res*, vol. 75, no. 1–2, pp. 196–204, 2014, doi: 10.1038/PR.2013.227.
- [222] R. E. Ware *et al.*, "Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics of hydroxyurea treatment for children with sickle cell anemia," *Blood*, vol. 118, no. 18, pp. 4985–4991, Nov. 2011, doi: 10.1182/BLOOD-2011-07-364190.
- [223] C. T. Quinn, "l-Glutamine for sickle cell anemia: more questions than answers," *Blood*, vol. 132, no. 7, pp. 689–693, Aug. 2018, doi: 10.1182/BLOOD-2018-03-834440.
- [224] A. Sadaf and C. T. Quinn, "L-glutamine for sickle cell disease: Knight or pawn?," <https://doi.org/10.1177/1535370219900637>, vol. 245, no. 2, pp. 146–154, Jan. 2020, doi: 10.1177/1535370219900637.
- [225] A. Badaloo, M. Reid, T. Forrester, W. C. Heird, and F. Jahoor, "Cysteine supplementation improves the erythrocyte glutathione synthesis rate in children with severe edematous malnutrition," *Am J Clin Nutr*, vol. 76, no. 3, pp. 646–652, 2002, doi: 10.1093/AJCN/76.3.646.
- [226] Y. Niihara, "L-Glutamine Therapy Reduces Hospitalization for Sickle Cell Anemia and Sickle β° -Thalassemia Patients at Six Months – A Phase II Randomized Trial," *Clin Pharmacol Biopharm*, vol. 3, no. 1, 2014, doi: 10.4172/2167-065X.1000116.
- [227] Y. Niihara *et al.*, "A Phase 3 Trial of L-Glutamine in Sickle Cell Disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 379, no. 3, pp. 226–235, Jul. 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1715971.
- [228] D. Heyland *et al.*, "A Randomized Trial of Glutamine and Antioxidants in Critically Ill Patients," *Survey of Anesthesiology*, vol. 58, no. 1, pp. 11–12, Feb. 2014, doi: 10.1097/01.SA.0000441043.83064.4c.
- [229] B. P. D. Inusa *et al.*, "Sickle cell disease—genetics, pathophysiology, clinical presentation and treatment," *Int J Neonatal Screen*, vol. 5, no. 2, May 2019, doi: 10.3390/IJNS5020020.
- [230] S. H. Park and G. Bao, "CRISPR/Cas9 gene editing for curing sickle cell disease," *Transfus Apher Sci*, vol. 60, no. 1, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.TRANSCL.2021.103060.
- [231] B. Metcalf *et al.*, "Discovery of GBT440, an Orally Bioavailable R-State Stabilizer of Sickle Cell Hemoglobin," *ACS Med Chem Lett*, vol. 8, no. 3, pp. 321–326, Mar. 2017, doi: 10.1021/ACSMEDCHEMLETT.6B00491/SUPPL_FILE/ML6B00491_SI_001.PDF.
- [232] A. A. Daak *et al.*, "Effect of omega-3 (n-3) fatty acid supplementation in patients with sickle cell anemia: randomized, double-blind, placebo-controlled trial," *Am J Clin Nutr*, vol. 97, no. 1, pp. 37–44, Jan. 2013, doi: 10.3945/AJCN.112.036319.
- [233] R. Dixit *et al.*, "Folate supplementation in people with sickle cell disease.," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 2018, no. 3, Oct. 2019, doi: 10.1002/14651858.CD011130.PUB3.

- [234] R. V. Gardner, "Sickle Cell Disease: Advances in Treatment," *Ochsner Journal*, vol. 18, no. 4, pp. 377–389, Dec. 2018, doi: 10.31486/TOJ.18.0076.
- [235] E. J. Van Zuuren and Z. Fedorowicz, "Low-molecular-weight heparins for managing vasoocclusive crises in people with sickle cell disease: a summary of a cochrane systematic review," *Hemoglobin*, vol. 38, no. 3, pp. 221–223, 2014, doi: 10.3109/03630269.2014.911748.
- [236] R. E. Ware, "Optimizing hydroxyurea therapy for sickle cell anemia," *Hematology (United States)*, vol. 2015, no. 1, pp. 436–443, Dec. 2015, doi: 10.1182/asheducation-2015.1.436.
- [237] P. S. Frenette and G. F. Atweh, "Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise," *J Clin Invest*, vol. 117, no. 4, pp. 850–858, Apr. 2007, doi: 10.1172/JCI30920.
- [238] D. Zhang, C. Xu, D. Manwani, and P. S. Frenette, "Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology," *Blood*, vol. 127, no. 7, pp. 801–809, Feb. 2016, doi: 10.1182/BLOOD-2015-09-618538.
- [239] M. M. Heeney *et al.*, "A Multinational Trial of Prasugrel for Sickle Cell Vaso-Occlusive Events," *N Engl J Med*, vol. 374, no. 7, pp. 625–635, Feb. 2016, doi: 10.1056/NEJMOA1512021.
- [240] M. J. Telen, "Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease," *Blood*, vol. 127, no. 7, pp. 810–819, Feb. 2016, doi: 10.1182/BLOOD-2015-09-618553.
- [241] P. AK, L. PB, P. ER, G. JR, and C. AM, "THE OSMOTIC RESISTANCE (FRAGILITY) OF HUMAN RED CELLS," *J Clin Invest*, vol. 26, no. 4, pp. 636–640, Jul. 1947, doi: 10.1172/JCI101847.
- [242] M. Harboe, "A Method for Determination of Hemoglobin in Plasma by Near-Ultraviolet Spectrophotometry," *Scand J Clin Lab Invest*, vol. 11, no. 1, pp. 66–70, Jan. 1959, doi: 10.3109/00365515909060410.
- [243] L. Zolla and A. D'Alessandro, "An efficient apparatus for rapid deoxygenation of erythrocyte concentrates for alternative banking strategies.," *J Blood Transfus*, vol. 2013, p. 896537, 2013, doi: 10.1155/2013/896537.
- [244] I. F. F. Benzie and J. J. Strain, "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay," *Anal Biochem*, vol. 239, no. 1, pp. 70–76, Jul. 1996, doi: 10.1006/ABIO.1996.0292.
- [245] D. Gupta, "Methods for determination of antioxidant capacity: A review," *Int J Pharm Sci Res*, vol. 6, no. 2, pp. 546–566, 2015, doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(2).546-66.
- [246] D. Duplancic, L. Kukoc-Modun, D. Modun, and N. Radic, "Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity," *Molecules*, vol. 16, no. 8, pp. 7058–7067, Aug. 2011, doi: 10.3390/MOLECULES16087058.
- [247] E. Beutler, C. West, and K. G. Blume, "The removal of leukocytes and platelets from whole blood.," *J Lab Clin Med*, vol. 88, no. 2, pp. 328–33, Aug. 1976.

- [248] J. T. Dodge, C. Mitchell, and D. J. Hanahan, "The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes," *Arch Biochem Biophys*, vol. 100, no. 1, pp. 119–130, 1963, doi: 10.1016/0003-9861(63)90042-0.
- [249] R. Advani, E. Rubin, N. Mohandas, and S. L. Schrier, "Oxidative red blood cell membrane injury in the pathophysiology of severe mouse beta-thalassemia.," *Blood*, vol. 79, no. 4, pp. 1064–7, Feb. 1992.
- [250] Bradford MM, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal Biochem*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, May 1976, doi: 10.1006/ABIO.1976.9999.
- [251] A. Clauss, "Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen," *Acta Haematol*, vol. 17, no. 4, pp. 237–246, 1957, doi: 10.1159/000205234.
- [252] Arai N and Collins A, "Overview of Innovance D-Dimer," *Sysmex Journal International*. Accessed: Apr. 06, 2023. [Online]. Available: [sysmex.co.jp/en/products_solutions/library/journal/vol18_no1/vol18_1_02.pdf](https://www.sysmex.co.jp/en/products_solutions/library/journal/vol18_no1/vol18_1_02.pdf)
- [253] L. Graf *et al.*, "Evaluation of an automated method for measuring von Willebrand factor activity in clinical samples without ristocetin.," *Int J Lab Hematol*, vol. 36, no. 3, pp. 341–51, Jun. 2014, doi: 10.1111/ijlh.12218.
- [254] Kanno K, Kaneko M, Suzuki A, and Yatomi Y, "Evaluation of Factor XIII Activity Using Berichrom FXIII Chromogenic Assay on the Fully-Automated Coagulation Analyzer CS-2000i — Based on Comparisons with Universal Biochemical Analyzer and Antigen Method | Products & Solutions | Sysmex." Accessed: Apr. 06, 2023. [Online]. Available: https://www.sysmex.co.jp/en/products_solutions/library/journal/vol23_no1/summary03.html
- [255] Anonymous, "Enzygnost TAT Micro; instruction manual," Marburg, Germany, 2008.
- [256] Jacques P. Caen, M. J. Larrieu, and Meyer M. Samama, *L'hémostase: méthodes d'exploration et diagnostic pratique*. Paris: L'Expansion scientifique, 1975.
- [257] Samama M., Conard J, Horellou M.H., and Lecompte T, *Physiologie et exploration de l'hémostase*. Paris: Doin, 1990.
- [258] Anonymous, "Zymuphen MP Activity," HYPHEN BioMed. Accessed: Apr. 06, 2023. [Online]. Available: https://www.aniara.com/mm5/PDFs/IFU/IFU_A521096.pdf
- [259] P. Baker *et al.*, "Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis," *Br J Haematol*, vol. 191, no. 3, pp. 347–362, Nov. 2020, doi: 10.1111/BJH.16776.
- [260] R. Yang and L. Moosavi, *Prothrombin Time*. Treasure Island (FL), 2022.
- [261] V. Pavoni *et al.*, "'In Less than No Time': Feasibility of Rotational Thromboelastometry to Detect Anticoagulant Drugs Activity and to Guide Reversal Therapy," *J Clin Med*, vol. 11, no. 5, p. 1407, Mar. 2022, doi: 10.3390/JCM11051407/S1.
- [262] G. Onimoe and G. Smarzo, "HbS-Sicilian ($\delta\beta$)⁰-Thalassemia: A Rare Variant of Sickle Cell," *Case Rep Hematol*, vol. 2017, pp. 1–3, 2017, doi: 10.1155/2017/9265396.

- [263] A. Runge, D. Brazel, and Z. Pakbaz, "A case of S β + sickle cell disease diagnosed in adulthood following acute stroke: it's 2021, are we there yet?," *J Community Hosp Intern Med Perspect*, vol. 11, no. 5, pp. 713–718, Sep. 2021, doi: 10.1080/20009666.2021.1954285.
- [264] B. Aygun *et al.*, "Clinical phenotypes of three children with sickle cell disease caused by <sc>HbS</sc> /Sicilian ($\delta\beta$)⁰-thalassemia deletion," *Am J Hematol*, vol. 97, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.1002/ajh.26470.
- [265] R. Galanello and R. Origa, "Beta-thalassemia," *Orphanet J Rare Dis*, vol. 5, no. 1, p. 11, Dec. 2010, doi: 10.1186/1750-1172-5-11.
- [266] S. Dahal, S. Dahal, D. K. C. Ghimire, E. Ur Rahman, and E. Sharma, "Sickle Cell Beta-Plus Thalassemia with Subcapsular Hematoma of the Spleen," *Case Rep Hematol*, vol. 2017, pp. 1–4, 2017, doi: 10.1155/2017/3819457.
- [267] B. D. Benites *et al.*, "Sickle cell/ β -thalassemia: Comparison of S β ⁰ and S β ⁺ Brazilian patients followed at a single institution," *Hematology*, vol. 21, no. 10, pp. 623–629, Nov. 2016, doi: 10.1080/10245332.2016.1187843.
- [268] L. D. Notarangelo *et al.*, "HbS/ β + thalassemia: Really a mild disease? A National survey from the AIEOP Sickle Cell Disease Study Group with genotype-phenotype correlation," *Eur J Haematol*, vol. 104, no. 3, pp. 214–222, Mar. 2020, doi: 10.1111/ejh.13362.
- [269] G. R. Serjeant *et al.*, "Hb S- β -Thalassemia: Molecular, Hematological and Clinical Comparisons," *Hemoglobin*, vol. 35, no. 1, pp. 1–12, Feb. 2011, doi: 10.3109/03630269.2010.546306.
- [270] P. T. McGann and R. E. Ware, "Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia," *Expert Opin Drug Saf*, vol. 14, no. 11, pp. 1749–1758, Nov. 2015, doi: 10.1517/14740338.2015.1088827.
- [271] Y. Niihara *et al.*, "A Phase 3 Trial of <sc>l</sc>-Glutamine in Sickle Cell Disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 379, no. 3, pp. 226–235, Jul. 2018, doi: 10.1056/NEJMoa1715971.
- [272] A. Sadaf and C. T. Quinn, "L-glutamine for sickle cell disease: Knight or pawn?," *Exp Biol Med*, vol. 245, no. 2, pp. 146–154, Jan. 2020, doi: 10.1177/1535370219900637.
- [273] R. P. Gonçalves, "Nitric oxide status in sickle cell anemia," *Rev Bras Hematol Hemoter*, vol. 34, no. 4, pp. 255–255, 2012, doi: 10.5581/1516-8484.20120063.
- [274] W. Zhang, M. Sun, and J. Luo, "[Serum nitric oxide and D-dimer before and after administering antihypertensive drugs in essential hypertension].," *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*, vol. 28, no. 4, pp. 382–4, Aug. 2003.
- [275] T. C. Pithon-Curi, M. P. De Melo, and R. Curi, "Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study," *Cell Biochem Funct*, vol. 22, no. 5, pp. 321–326, Sep. 2004, doi: 10.1002/cbf.1109.
- [276] K. C. Liboni, N. Li, P. O. Scumpia, and J. Neu, "Glutamine Modulates LPS-Induced IL-8 Production through I κ B/NF- κ B in Human Fetal and Adult Intestinal Epithelium," *J Nutr*, vol. 135, no. 2, pp. 245–251, Feb. 2005, doi: 10.1093/jn/135.2.245.

- [277] E. Balandya, T. Reynolds, S. Obaro, and J. Makani, "Alteration of lymphocyte phenotype and function in sickle cell anemia: Implications for vaccine responses," *Am J Hematol*, vol. 91, no. 9, pp. 938–946, Sep. 2016, doi: 10.1002/ajh.24438.
- [278] S. Cherif-Alami *et al.*, "Serum Immunoglobulin Levels in Children with Sickle Cell Disease: A Large Prospective Study," *J Clin Med*, vol. 8, no. 10, p. 1688, Oct. 2019, doi: 10.3390/jcm8101688.
- [279] N. Elenga, G. Loko, M. Etienne-Julan, R. Al-Okka, A. M. Adel, and M. A. Yassin, "Real-World data on efficacy of L-glutamine in preventing sickle cell disease-related complications in pediatric and adult patients," *Front Med (Lausanne)*, vol. 9, Aug. 2022, doi: 10.3389/fmed.2022.931925.
- [280] J. D. Ballantine, S. Kwon, and R. I. Liem, "Nucleated Red Blood Cells in Children With Sickle Cell Disease Hospitalized for Pain.," *J Pediatr Hematol Oncol*, vol. 41, no. 8, pp. e487–e492, Nov. 2019, doi: 10.1097/MPH.0000000000001467.
- [281] J. D. Bessman, P. R. Gilmer, and F. H. Gardner, "Improved classification of anemias by MCV and RDW.," *Am J Clin Pathol*, vol. 80, no. 3, pp. 322–6, Sep. 1983, doi: 10.1093/ajcp/80.3.322.
- [282] M. Arkew, K. Gemechu, K. Haile, and H. Asmerom, "Red Blood Cell Distribution Width as Novel Biomarker in Cardiovascular Diseases: A Literature Review," *J Blood Med*, vol. Volume 13, pp. 413–424, Aug. 2022, doi: 10.2147/JBM.S367660.
- [283] A. Vayá *et al.*, "RDW in patients with systemic lupus erythematosus. Influence of anaemia and inflammatory markers," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 54, no. 3, pp. 333–339, 2013, doi: 10.3233/CH-131738.
- [284] D.-P. Huang, R.-M. Ma, and Y.-Q. Xiang, "Utility of Red Cell Distribution Width as a Prognostic Factor in Young Breast Cancer Patients," *Medicine*, vol. 95, no. 17, p. e3430, Apr. 2016, doi: 10.1097/MD.0000000000003430.
- [285] C. Fava, F. Cattazzo, Z.-D. Hu, G. Lippi, and M. Montagnana, "The role of red blood cell distribution width (RDW) in cardiovascular risk assessment: useful or hype?," *Ann Transl Med*, vol. 7, no. 20, p. 581, Oct. 2019, doi: 10.21037/atm.2019.09.58.
- [286] P. Webster and O. Castro, "Red cell distribution width in sickle cell disease.," *Ann Clin Lab Sci*, vol. 16, no. 4, pp. 274–7, 1986.
- [287] M. THAME *et al.*, "The red cell distribution width in sickle cell disease-is it of clinical value?," *Clin Lab Haematol*, vol. 13, no. 3, pp. 229–237, Jun. 2008, doi: 10.1111/j.1365-2257.1991.tb00277.x.
- [288] H.-J. Joosse *et al.*, "In-vitro and in-silico evidence for oxidative stress as drivers for RDW," *Sci Rep*, vol. 13, no. 1, p. 9223, Jun. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-36514-5.
- [289] Q. Wang and R. Zennadi, "The Role of RBC Oxidative Stress in Sickle Cell Disease: From the Molecular Basis to Pathologic Implications," *Antioxidants*, vol. 10, no. 10, p. 1608, Oct. 2021, doi: 10.3390/antiox10101608.
- [290] A. T. Anastasiadi *et al.*, "Innate Variability in Physiological and Omics Aspects of the Beta Thalassemia Trait-Specific Donor Variation Effects," *Front Physiol*, vol. 13, Jun. 2022, doi: 10.3389/fphys.2022.907444.

- [291] M. S. Figueiredo and M. A. Zago, "The role of irreversibly sickled cells in reducing the osmotic fragility of red cells in sickle cell anemia.," *Acta Physiol Pharmacol Latinoam*, vol. 35, no. 1, pp. 49–56, 1985.
- [292] S. Ananthaseshan *et al.*, "Red blood cell distribution width is associated with increased interactions of blood cells with vascular wall," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, p. 13676, Aug. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-17847-z.
- [293] J. W. Weisel and R. I. Litvinov, "Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 17, no. 2, pp. 271–282, Feb. 2019, doi: 10.1111/jth.14360.
- [294] F. Vallelian, P. W. Buehler, and D. J. Schaer, "Hemolysis, free hemoglobin toxicity, and scavenger protein therapeutics," *Blood*, vol. 140, no. 17, pp. 1837–1844, Oct. 2022, doi: 10.1182/blood.2022015596.
- [295] S. Mubeen *et al.*, "Exploring the Complex Network of Heme-Triggered Effects on the Blood Coagulation System," *J Clin Med*, vol. 11, no. 19, p. 5975, Oct. 2022, doi: 10.3390/jcm11195975.
- [296] J. R. Kennedy, "Attenuating a sickle cell crisis with annexin V.," *Med Hypotheses*, vol. 84, no. 5, pp. 434–6, May 2015, doi: 10.1016/j.mehy.2015.01.037.
- [297] Arun S. Shet, Maria A. Lizarralde-Iragorri, and Rakhi P. Naik, "The molecular basis for the prothrombotic state in sickle cell disease," *Haematologica*, vol. 105, no. 10, pp. 2368–2379, Aug. 2020, doi: 10.3324/haematol.2019.239350.
- [298] E. Nader, Y. Garnier, P. Connes, and M. Romana, "Extracellular Vesicles in Sickle Cell Disease: Plasma Concentration, Blood Cell Types Origin Distribution and Biological Properties," *Front Med (Lausanne)*, vol. 8, Aug. 2021, doi: 10.3389/fmed.2021.728693.
- [299] A. Hashemi Tayer, N. Amirizadeh, M. Ahmadinejad, M. Nikougofar, M. R. Deyhim, and S. Zolfaghari, "Procoagulant Activity of Red Blood Cell-Derived Microvesicles during Red Cell Storage," *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, vol. 46, no. 4, pp. 224–230, 2019, doi: 10.1159/000494367.
- [300] N. A. M. M. N. M. D. M. A. A. H. Tayer, "Evaluation of Blood Storage Lesions in Leuko-depleted Red Blood Cell Units," *Iran J Ped Hematol Oncol*, vol. 7, pp. 171–179, 2017.
- [301] M. Westerman and J. B. Porter, "Red blood cell-derived microparticles: An overview," *Blood Cells Mol Dis*, vol. 59, pp. 134–139, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.bcnd.2016.04.003.
- [302] O. S. Olatunya *et al.*, "Red blood cells microparticles are associated with hemolysis markers and may contribute to clinical events among sickle cell disease patients," *Ann Hematol*, vol. 98, no. 11, pp. 2507–2521, Nov. 2019, doi: 10.1007/s00277-019-03792-x.
- [303] G. J. Kato, "Sickle particulars of microparticles," *Blood*, vol. 136, no. 2, pp. 154–155, Jul. 2020, doi: 10.1182/blood.2020006303.
- [304] G. Lippi, G. Targher, M. Montagnana, G. L. Salvagno, G. Zoppini, and G. C. Guidi, "Relation Between Red Blood Cell Distribution Width and Inflammatory Biomarkers in a Large Cohort of Unselected Outpatients," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 133, no. 4, pp. 628–632, Apr. 2009, doi: 10.5858/133.4.628.

- [305] Y. Liu, H. Zhong, F. Vinchi, A. Mendelson, and K. Yazdanbakhsh, "Patrolling monocytes in sickle cell hemolytic conditions," *Transfusion Clinique et Biologique*, vol. 26, no. 2, pp. 128–129, May 2019, doi: 10.1016/j.tracli.2019.02.004.
- [306] R. Sesti-Costa, F. F. Costa, and N. Conran, "Role of Macrophages in Sickle Cell Disease Erythrophagocytosis and Erythropoiesis," *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 7, p. 6333, Mar. 2023, doi: 10.3390/ijms24076333.
- [307] M. T. Bozza and V. Jeney, "Pro-inflammatory Actions of Heme and Other Hemoglobin-Derived DAMPs," *Front Immunol*, vol. 11, Jun. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01323.
- [308] J. Lugin, N. Rosenblatt-Velin, R. Parapanov, and L. Liaudet, "The role of oxidative stress during inflammatory processes," *Biol Chem*, vol. 395, no. 2, pp. 203–230, Feb. 2014, doi: 10.1515/hsz-2013-0241.
- [309] J. H. Foley and E. M. Conway, "Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation," *Circ Res*, vol. 118, no. 9, pp. 1392–1408, Apr. 2016, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306853.
- [310] R. F. Paulson, B. Ruan, S. Hao, and Y. Chen, "Stress Erythropoiesis is a Key Inflammatory Response," *Cells*, vol. 9, no. 3, p. 634, Mar. 2020, doi: 10.3390/cells9030634.
- [311] G. Lippi and M. Plebani, "Red blood cell distribution width (RDW) and human pathology. One size fits all," *Clin Chem Lab Med*, vol. 52, no. 9, Jan. 2014, doi: 10.1515/cclm-2014-0585.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Δρεπανοκυτταρική Νόσος (ΔΝ) συνιστά μία ετερογενή ασθένεια σε ότι αφορά τη σοβαρότητα των κλινικών εκδηλώσεων, πόσο δε μάλλον στην ετερόζυγη μορφή της, κατά τη συνύπαρξή της με τη β-θαλασσαιμία. Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν η διαστρωμάτωση των β⁵β⁺ δειγμάτων αίματος σε σχέση με τη σοβαρότητα των κλινικών εκδηλώσεων που παρουσίαζαν. Για το σκοπό αυτό, λήφθηκαν δείγματα αίματος από τριάντα δύο (32) ασθενείς με ΔΝ, τα οποία εξετάστηκαν για διάφορες παραμέτρους (αιμόσταση, φλεγμονή, οξειδοαναγωγική ισοροπία), σε σχέση με υγιή άτομα (controls). Συμπληρωματικά, οι δρεπανοκυτταρικοί ασθενείς εκ των υστέρων (α) κατηγοριοποιήθηκαν βάσει της δόσης της L-γλουταμίνης που έλαβαν ως συμπλήρωμα διατροφής και (β) διαχωρίστηκαν σε δύο υποομάδες υψηλού και χαμηλού RDW. Η ομάδα των ασθενών παρουσίασε αναιμία, φλεγμονή και υψηλή πηκτικότητα. Χαρακτηριστικά, η χορήγηση μεγαλύτερης δόσης L-γλουταμίνης σχετίστηκε με χαμηλότερους δείκτες φλεγμονής και οξείδωσης (π.χ. ενεργές ρίζες οξυγόνου), καθώς και τροποποιημένο προφίλ της αιμόστασης. Σε αντίθεση, η ομάδα με το υψηλό RDW παρουσίασε αυξημένη αιμόλυση, υψηλότερους δείκτες φλεγμονής, στρεσογόνου ερυθροποίησης, καθώς και οξειδωτικών φαινομένων (π.χ. αιμοσφαιρίνη δεσμευμένη στη μεμβράνη). Επιπλέον, τα επίπεδα των παραμέτρων της αιμόστασης (π.χ. τα Δ-διμερή) βρέθηκαν σαφώς υψηλότερα, σε σχέση με την ομάδα των ασθενών χαμηλού RDW. Η συγχορήγηση υψηλών δόσεων L-γλουταμίνης μαζί με υδροξυουρία, φαίνεται ότι περιορίζει μερικά δρεπανοκυτταρικά χαρακτηριστικά, πιθανόν εξαιτίας της αντιοξειδωτικής ενίσχυσης. Επιπλέον, η ανισοκυττάρωση ενδέχεται να τροποποιεί τις διαδικασίες της αιμόστασης και την τάση για αιμόλυση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναταραχή της οξειδοαναγωγικής και της προ-αντι-φλεγμονώδους ισοροπίας, δημιουργώντας έτσι ένα θετικό κύκλο ανάδρασης, μέσω της πρόκλησης στρεσογόνου ερυθροποίησης και επομένως, της παρουσίας ανάμεικτου ερυθροκυτταρικού πληθυσμού.

Λέξεις-κλειδιά: δρεπανοκυτταρική νόσος, L-γλουταμίνη, RDW, αιμόσταση, φλεγμονή, οξειδωτικό στρες

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is heterogeneous in terms of manifestation severity, even more so when in compound heterozygosity with beta-thalassemia. The aim of the present study was to stratify $\beta^S\beta^+$ patient blood samples in a severity-dependent manner. Blood from thirty-two patients with HbS/ β -thalassemia compound heterozygosity was examined for several parameters (e.g., hemostasis, inflammation, redox equilibrium) against healthy controls. Additionally, SCD patients were a posteriori (a) categorized based on the L-glutamine dose and (b) clustered into high-/low-RDW subgroups. The patient cohort was characterized by anemia, inflammation, and elevated coagulation. Higher-dose administration of L-glutamine was associated with decreased markers of inflammation and oxidation (e.g., intracellular reactive oxygen species) and an altered coagulation profile. The higher-RDW group was characterized by increased hemolysis, elevated markers of inflammation and stress erythropoiesis, and oxidative phenomena (e.g., membrane-bound hemoglobin). Moreover, the levels of hemostasis parameters (e.g., D-Dimers) were greater compared to the lower-RDW subgroup. The administration of higher doses of L-glutamine along with hydroxyurea seems to attenuate several features in SCD patients, probably by enhancing antioxidant power. Moreover, anisocytosis may alter erythrocytes' coagulation processes and hemolytic propensity. This results in the disruption of the redox and pro-/anti-inflammatory equilibria, creating a positive feedback loop by inducing stress erythropoiesis and, thus, the occurrence of a mixed erythrocyte population.

Keywords: sickle cell disease; L-glutamine; RDW; coagulation; inflammation; oxidative stress

ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΣΤ1. ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Ντελίκου Σ., Γιαννάκη Α., Ξυδάκη Α., Γεωργαντζάκου Χ., Παπαγεωργίου Ε., Κριεμπάρδης Α. «Χορήγηση γλουταμίνης ως συμπληρωματική θεραπεία ή ως μονοθεραπεία σε ασθενείς με Δρεπανοκυτταρική Νόσο και η επίδραση στο επίπεδο ζωής». 47^ο Ετήσιο Παναλλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 20–22 Μαΐου 2021, Αθήνα, Ελλάδα.
2. Γιαννάκη Α., Φόρτης Σ., Γεωργατζάκου Χ., Ξυδάκη Α., Λίοση Μ., Φούντζουλα Χ., Παπαγεωργίου Ε., Αντωνέλου Μ., Ντελίκου Σ., Κριεμπάρδης Α. «Ενδοκυττάρια ρίζες Οξυγόνου σε ασθενείς με Δρεπανοκυτταρική Αναιμία υπό θεραπεία γλουταμίνης». 32^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 10–14 Νοεμβρίου 2021, Αθήνα, Ελλάδα.
3. Giannaki A., Fortis S., Georgatzakou H., Xidaki A., Liosi M., Fountzoula C., Parageorgiou E., Antonelou M., Delikou S., Kriebardis A. “*Plasma free hemoglobin and reactive oxygen species in Sickle Cell Anaemia patients under Hydroxyurea and Glutamine therapy*”. 2nd Sickle Cell & Thalassaemia Virtual Conference, January 26-28, 2022. London, England.
4. Γιαννάκη Α., Γεωργατζάκου Χ., Φόρτης Σ., Ντελίκου Σ., Ξυδάκη Α., Λίοση Μ., Φούντζουλα Χ., Παπαγεωργίου Ε., Αντωνέλου Μ., Κριεμπάρδης Α. «Το εύρος κατανομής ερυθροκυττάρων ως πιθανός βιοδείκτης της κλινικής σοβαρότητας της Δρεπανοκυτταρικής Νόσου». 33^ο Πανελλήνιο Αιματογικό Συνέδριο, 9–12 Νοεμβρίου 2022, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.

ΣΤ2. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Giannaki, A.; Georgatzakou, H.T.; Fortis, S.P.; Anastasiadi, A.T.; Pavlou, E.G.; Nomikou, E.G.; Drandaki, M.P.; Kotsiafti, A.; Xydaki, A.; Fountzoula, C.; et al. Stratification of $\beta^S\beta^+$ Compound Heterozygotes Based on L-Glutamine Administration and RDW: Focusing on Disease Severity. *Antioxidants* 2023, 12, 1982. <https://doi.org/10.3390/antiox12111982>



ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΑΘΗΝΩΝ
1900 (ΑΡΧ. ΕΤΟΣ) 1998

47^ο

ΕΤΗΣΙΟ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ



20-22
ΜΑΪΟΥ
2021

ΞΕΝΟΔΟΧΕΙΟ
DIVANI CARAVEL
ΑΘΗΝΑ

Χορηγούνται 24 μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης
(C.M.E. - C.P.D. Credits)

ΤΟΜΟΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΩΝ

ΨΥΧΟΣΩΜΑΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

435. ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΗΣ ΩΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ Ή ΩΣ ΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΔΡΕΠΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΝΟΣΟ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΖΩΗΣ.

Σ. Ντελικού¹, Δ. Παννάκη², Α. Ξυδάκη¹, Χ. Γεωργαντζάκου², Ε. Παπαγεωργίου², Α. Κριεμπάρδη²
1Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας και Δρεπανοκυτταρικής Νόσου, Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο», 2Εργαστήριο Αξιολογίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Τμήμα Βιοιατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η γλουταμίνη, αποτελεί το πιο άφθονο αμινοξύ στον οργανισμό και είναι γνωστό ότι μεγάλες ποσότητες της παράγονται ως απάντηση στο στρες προκειμένου να παρέχει την απαραίτητη πρώτη ύλη για τα ταχείως διαιρούμενα κύτταρα. Τα τελευταία χρόνια, η γλουταμίνη αποτελεί μια θεραπευτική πρόταση για τους ασθενείς με Δρεπανοκυτταρική Νόσο στοχεύοντας στην βελτίωση του οξειδωτικού stress.

ΣΚΟΠΟΣ: Σκοπός της εργασίας ήταν η αξιολόγηση της εξωγενούς χορήγησης σκευάσματος γλουταμίνης σε ασθενείς με Δρεπανοκυτταρική Νόσο ως συμπληρωματική αγωγή ή ως μονοθεραπεία και αξιολογήθηκε η βελτίωση της ποιότητας ζωής σε διάστημα έξι (6) μηνών.

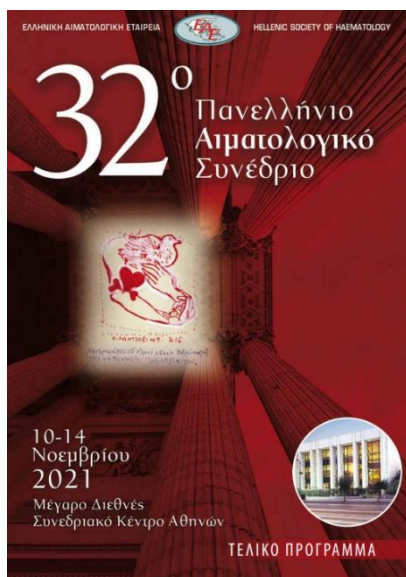
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ: Χορηγήθηκε σκεύασμα γλουταμίνης (Glutamine ExtraDB) σε σκόνη σε ημερήσια δόση 10-30gr (0,3 gr/kg) σε εννέα (9) ασθενείς με Δρεπανοκυτταρική Νόσο 4 άνδρες/5 γυναίκες μέσης ηλικίας 47 ετών. Οι ασθενείς απάντησαν στο ερωτηματολόγιο IQOLA SF-36 Greek, προσαρμοσμένο στην λήψη γλουταμίνης.

ΑΠΟΤΕΛΣΜΑΤΑ: Από το σύνολο των ασθενών 44% λάμβαναν αγωγή με υδροζουρία, 22,2% ήταν σε πρόγραμμα μεταγγίσεων και 33,3% δεν λάμβαναν καμία θεραπεία. Τα βασικότερα προβλήματα απότοκα του βασικού νοσήματος ήταν χρόνιος πόνος 66%, μυοσκελετικά 22,2% και κόπωση 11,8%. Από την ανάλυση των ειδικών και γενικών κλιμάκων υγείας του sf36 στα επιμέρους αντικείμενα αξιολόγησης προέκυψαν ότι με την χρήση γλουταμίνης σε διάστημα 1-6 μηνών: η Φυσική λειτουργία (Physical Functioning-PF) σε καθημερινές δραστηριότητες (τρέξιμο, περπάτημα, σκύψιμο κλπ) παρουσίασε βελτίωση κατά 10%, ο Φυσικός ρόλος (Role Physical-RP) στο διάστημα των τελευταίων 4 εβδομάδων και στο πόσο συχνά εμφανίστηκαν προβλήματα στην εργασία ή καθημερινές δραστηριότητες ως απόρροια του επιπέδου φυσικής υγείας βελτιώθηκε κατά 13%, ο Σωματικός πόνος (Bodily Pain-BP) με ύπαρξη σωματικού πόνου στο διάστημα των τελευταίων 4 εβδομάδων και σε ποιο βαθμό αυτό επηρέασε τις καθημερινές δραστηριότητες παρουσίασε βελτίωση 66,7%, και η Γενική υγεία (General Health - GH) σε επίπεδο προσωπικής εκτίμησης χαρακτηρίστηκε ως πολύ καλή σε επίπεδο 44%.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: η χορήγηση γλουταμίνης μπορεί να λειτουργήσει επιπρόσθετα στην αγωγή των ασθενών με δρεπανοκυτταρική νόσο βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής τους.

Τόμος Περιλήψεων | ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ — e-POSTERS





ΣΑΒΒΑΤΟ 13 Νοεμβρίου 2021

ΑΙΘΟΥΣΑ MC2

Hannover, Hannover, Germany, ⁹Infection, Immunity & Inflammation Department, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, London, UK, ¹⁰Pediatric Hematology, Hôpital de la Timone, Marseille, France, ¹¹Biotherapy Department and Clinical Investigation Center, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Inserm, Paris, France, ¹²Cell & Molecular Therapies, Royal Prince Alfred Hospital, Camperdown, Australia, ¹³bluebird bio, Inc., Cambridge, MA, USA, ¹⁴Hematology Section, Ann & Robert H. Lurie Children's Hospital of Chicago, Chicago, IL, USA

50 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΕΣ ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΡΙΖΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΔΡΕΠΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΥΠΟ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΥΔΡΟΞΥΟΥΡΙΑΣ ΚΑΙ ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΗΣ

A. Γιαννάκη¹, Σ. Φόρτης¹, Χ. Γεωργατζάκου¹, Α. Ξυδάκη², Μ. Λίωση³, Χ. Φούντζουλα⁴, Ε. Παπαγεωργίου¹, Μ. Αντωνέλου⁴, Σ. Ντελίκου², Α. Κριεμπίδης⁵

¹Ερευνητικό Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία - HepQcR, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, ²Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας και Δρεπανοκυτταρικής Νόσου Ιπποκρατείου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών, ³Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, ⁴Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

18:40-18:50 **ΔΙΑΚΟΠΗ**

18:50-19:40 **ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ (51 - 55)**

ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ - ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ - ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Προεδρείο: Άννα Κομποπούλου, Ιωάννης Μπαλταδάκης

51 ΧΥΜΙΚΗ ΚΑΙ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ ΚΑΤΑ ΤΗΣ COVID-19 ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΒΛΗΘΕΙ ΣΕ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ε. Γαβριηλάκη¹, Α. Παπαδοπούλου¹, Τ. Τουλουμενίδου¹, Φ. Σταυρίδου¹, Ε.Ε. Κοράβου¹, Μ. Γιαννάκη¹, Α. Παπαλεξανδρή¹, Γ. Καραβαλάκης¹, Ι. Μπάτσης¹, Α. Κουρέλης², Φ. Χατζοπούλου², Δ. Χατζηδημητρίου², Δ. Σωτηρόπουλος³, Ε. Γιαννάκη¹, Ι. Σακελλάρη¹, Α. Αναγνωστόπουλος⁴

¹Αιματολογική Κλινική - Μονάδα Μεταμόσχευσης - Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, ΠΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, ²Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη

52 «ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΒΑΣΗΣ» ΣΤΗ -200 ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ γ-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΠΡΟΣ ΕΠΑΓΩΓΗ ΕΜΒΡΥΚΙΝΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΔΡΕΠΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ

Π. Αντωνίου¹, G. Hardouin¹, P. Martinucci¹, T. Felix¹, L. Fontana¹, J. Martin¹, G. Frati¹, M. Brusson¹, M. Rosello², G. Maule², F. Del-Bene², A. Cereseto², W. El-Nemer³, J.-P. Concordet³, A. Miccio³

¹Πανεπιστήμιο Παρισιού, Ινστιτούτο IMAGINE, Εργαστήριο χρωματίνης και γονιδιακής ρύθμισης κατά την ανάπτυξη, INSERM UMR 1163, Παρίσι, Γαλλία, ²Πανεπιστήμιο Σορβόνης, INSERM, CNRS, Ινστιτούτο Όρασης, Παρίσι, Γαλλία, ³CIBIO, Πανεπιστήμιο του Τρέντο, Τρέντο, Ιταλία

Plasma free haemoglobin and reactive oxygen species in sickle cell anaemia patients under hydroxyurea and glutamine therapy

A. GIANNAKI¹, S. FORTIS¹, H. GEORGATZAKOU¹, A. XIDAKI², M. LIOS², C. FOUNTZOULA³, E. PAPAGEORGIOU⁴, M. H. ANTONELOU⁴, S. DELICOU², A. G. KRIEBARDIS¹

¹Laboratory of Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology (LQR), Department of Biomedical Sciences, School of Health & Caring Sciences, University of West Attica (UWA), Egaleo, Greece. ²Thalassemia and Sickle Cell Unit at Hippokraton General Hospital Athens, Laboratory of Chemistry, Biochemistry and Cosmetic Sciences (LBCS), Department of Biomedical Sciences, School of Health & Caring Sciences, University of West Attica (UWA), Egaleo, Greece. ³Department of Biology, School of Science, National & Kapodistrian University of Athens (NKUA), Athens, Greece.



INTRODUCTION

Sickle Cell Anaemia (SCA), a quite common haemoglobinopathy in Greece, is a consequence of abnormal haemoglobin S production (HbS). When the oxygen tension is low, HbS polymerization occurs, resulting in red blood cells (RBC) sickling that affects membrane integrity, cell deformability and rheological behavior. Thus, SCA provokes reduced RBCs survival, chronic haemolytic anaemia, oxidative stress and microvascular occlusion. Currently, RBC transfusion and hydroxyurea supplementation are the major disease-modifying therapies available for SCA. In addition, L-glutamine, has been proposed as an antioxidant for SCA in oral therapy schemes.

AIM

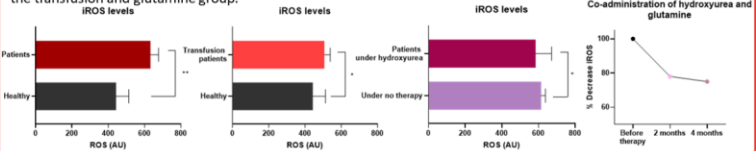
The purpose of this study is to measure the oxidative stress status of RBCs and haemolysis in SCA patients under simultaneous hydroxyurea and L-glutamine therapy.

METHODS

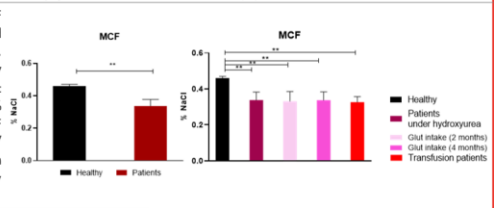
Eighteen SCA patients (52±12 years old, HbS=68.02±9.40%, on average) as well as sixteen similar age-and gender-matched healthy volunteers (controls) participated in the present study. Six patients were under no therapy, eight patients were under hydroxyurea therapy and four patients were under blood transfusion therapy. After signing an informed consent, 12 patients took a daily dose of 10-30g glutamine (Glutamine DB EXTRA supplement), in addition with hydroxyurea (n=8) and RBC-transfusion (n=4), daily for a 4-month period. Blood sampling were taken before glutamine intake and during a period of 2-4 months after it. Intracellular RBC Reactive Oxygen Species (iROS) were measured by Flow Cytometry. Osmotic Fragility (mean corpuscular fragility, MCF), plasma free hemoglobin (p-F-Hb) as well as total bilirubin (T-BIL) were also determined, before and after glutamine treatment. Statistical analysis was performed by the GraphPad Prism 8.0.3 and SPSS v.27 software.

RESULTS

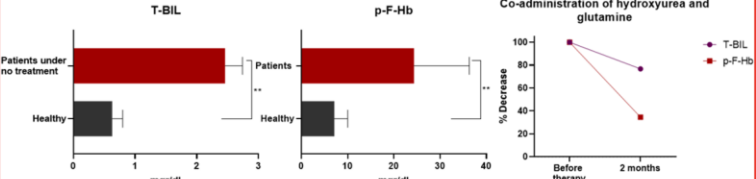
Before glutamine supplementation, all SCA patients, transfused or not, had significantly increased iROS levels (632.30±44.83 AU) compared to controls (443.07±69.40 AU, p<0.01), whereas the group under transfusion therapy had only slightly, even statistically significant, increased values (506.50±31.80 AU, p<0.05). The group of hydroxyurea treatment had lower iROS levels (584.00±87.00 AU) compared to the no therapy group (614.34±23.56 AU, p<0.05). Co-administration of hydroxyurea and glutamine resulted in a 22% decrease in iROS within a two-month period, which was preserved until the end of the four-month period. Finally, not statistically significantly decrease in iROS was observed in the transfusion and glutamine group.



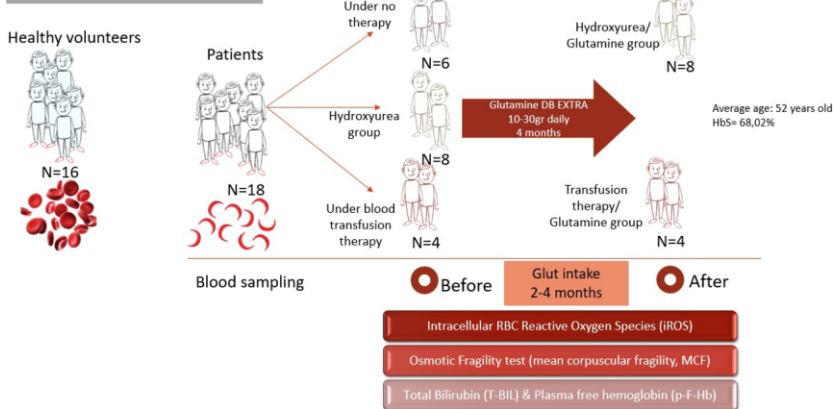
All patients had decreased RBC MCF (MCF = 0.337 ± 0.040% NaCl) compared to controls (MCF = 0.46 ± 0.01% NaCl). This finding was unaffected by hydroxyurea intake (MCF = 0.338 ± 0.044% NaCl), a two (MCF=0.331±0.054% NaCl) and four-month (MCF = 0.337±0.047% NaCl) glutamine / hydroxyurea or glutamine / transfusion intake period and transfusion therapy (MCF = 0.326±0.031%NaCl) (p<0.01).



Total bilirubin (T-BIL) and p-F-Hb levels were increased in all SCA patients, under treatment (2.46mg/dl±0.28 and 24.34mg/dl±11.98, respectively) compared to controls (0.63mg/dl±0.17 and 7.12mg/dl±2.90, respectively) (p<0.01). However, glutamine administration in hydroxyurea or transfusion group of patients seems to cause a decrease in T-BIL and p-F-Hb levels (T-BIL:23.24%, p-F-Hb:65.38%), after a two-month period intake.



STUDY DESIGN



CONCLUSIONS

RBCs of patients under simultaneous hydroxyurea and glutamine supplementation scheme cope better with oxidative and hemolysis stresses. L-glutamine seems to be a candidate antioxidant supplement able to deal with basic symptoms of SCA.



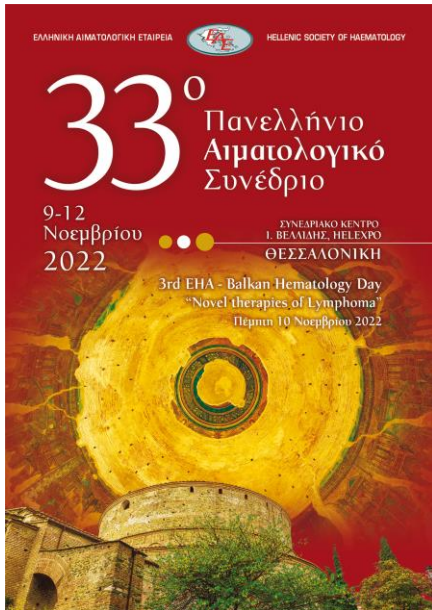
CONTACT INFORMATION

Anastasios G. Kriebardis
Associate Professor
Dpt of Biomedical Sciences
University of West Attica, Athens (UWA), Greece
Personal website: <http://users.uniwa.gr/akrieb/>
Lab: <https://relabaima.uniwa.gr/>

REFERENCES

Kapoor S, Little JA, Pecker LH. *Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease*. Mayo Clin Proc. 2018;93(12):1810-24.
Lu M, Rab MA, Shekopyas SS, Sheehan VA. *Blood rheology biomarkers in sickle cell disease*. Exp Biol Med [Maywood]. 2020;245(2):155-65.
Mangla A, Ehsan M, Agrwal N, Maruvada S. *Sickle Cell Anemia*. StatPearls. Treasure Island (FL) 2022.





ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ (e-POSTERS)

- 88 ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΑΜΗΛΟΥ ΡΙΣΚΟΥ ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ**
 Χ.Μ. Ριπά¹, Ν. Παπαγιάννης², Α. Τάσης³, Μ. Γρηγορίου⁴, Χ. Μισιού⁵, Ε. Λαμπριανίδου⁶, Χ. Κυμπορίδου⁷, Δ. Δημητρίου⁸, Θ. Σπυράκου⁹, Ι. Κοτσιανίδης¹⁰, Ι. Μητρούλης¹¹
¹Αιματολογική Κλινική, ΔΠΘ, ²ΠαΤη Αλεξανδρούπολης, ³Αλεξανδρούπολη, ⁴Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, ⁵Αθήνα
- 89 ΜΑΚΡΟΧΡΟΝΙΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΥΦΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΑΚΟΠΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΘΡΟΜΒΟΠΟΙΗΤΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΗ ΑΝΟΣΗ ΘΡΟΜΒΟΠΕΝΙΑ**
 Ε. Γαβρηλάκη¹, Ε. Παπαγιάννη, Μ. Παπαθανασίου, Β. Δούκα, Α. Μαρβάκη, Μ. Ιακός, Μ. Κολιού, Χ. Αλαγιάννη, Γ. Παπαϊωάννου, Α. Συρίγου, Ι. Σακελλάρη
 Αιματολογική Κλινική, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη

ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

- 90 ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΙΜΟΛΥΣΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ**
 Ι. Τσαμπελιδής¹, Γ.Κ. Πουρουτζίδου², Μ.Ε. Ιωάννου³, Μ. Καραβίτσα⁴, Μ. Σιμογιού⁵, Α. Παγκραλίωτα⁶, Θ. Τσιπλακίδου⁷, Φ. Κλωνικάκης⁸, Ε. Βλαχάκη⁹, Ε. Κοντοσαδάκη¹⁰
¹Τμήμα Οδοντιατρικής Σχολής Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ, ²Τμήμα Φυσικής Σχολής Θετικών Επιστημών, ΑΠΘ, ³Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδος, ⁴ΓΝΘ «Ιπποκράτειο», ⁵Θεσσαλονίκη
- 91 ΣΠΑΝΙΟΤΑΤΟΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΠΑΘΕΙΑΣ Η (ΗΒΗ) ΜΕ ΕΤΕΡΟΣΥΓΗ ΔΡΕΠΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ (ΗΒΑΣ)**
 Ε. Βαβουράκης, Γ. Περισσάκη, Α. Βεργόκη, Ε. Πρεμέτις
 Αιματολογικό Εργαστήριο, ΠΓΝ Παίδων «Η Αγία Σοφία» Αθήνα
- 92 ΤΟ ΕΥΡΟΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗΣ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΟΒΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΔΡΕΠΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ**
 Α. Γιαννάκη¹, Χ. Γεωργατζάκου², Σ. Φώρτης³, Σ. Ντελικού⁴, Α. Ευδόκη⁵, Μ. Λισση⁶, Χ. Φούντζουλα⁷, Ε. Παπαγεωργίου⁸, Μ. Αντωνίου⁹, Α. Κριεμπίδης¹⁰
¹Ερευνητικό Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία-HemQC, ²Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, ³Μονάδα Μεσογειακής Αναμίας και Δρεπανοκυτταρικής Νόσου, ΓΝΘ «Ιπποκράτειο», ⁴Ερευνητικό Εργαστήριο Ηπείας, Βιοχημείας, Κοσμτολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, ⁵Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Αθήνα
⁶ισότιμοι συγγραφείς

- 93 Η ΣΠΛΗΝΕΚΤΟΜΗ ΩΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΗΣ ΥΠΕΡΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΕΤΑΓΓΙΣΙΟΞΕΑΡΤΩΜΕΝΗ Β-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ: Η ΕΜΠΕΙΡΙΑ ΕΝΟΣ ΚΕΝΤΡΟΥ**
 Τ. Β. Καλεμαρά, Ε. Ζαρκάδα, Μ. Μάνου, Φ. Κλωνικάκης, Ε. Βλαχάκη
 Μονάδα Μεσογειακής Αναμίας, Ενήλικων, Β' Παθολογική Κλινική, ΑΠΘ, ΠΓΝΘ «Ιπποκράτειο», Θεσσαλονίκη

ΘΕΙΕΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ

- 94 ΝΕΟΠΛΑΣΜΑ ΒΛΑΣΤΟΕΙΔΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΚΥΤΤΑΡΟΕΙΔΩΝ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (ΒΡDCN): ΜΙΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΥΣΑ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ**
 Β. Ζήνα¹, Μ. Βάρδακα², Γ. Πατεράκης³, Ε. Γρίβα⁴, Γ. Κακόπουλος⁵, Θ. Μαρανιάκη⁶, Ε. Μιχάλη⁷
¹Αιματολογική Κλινική, ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς», ²Ανοσολογικό Εργαστήριο, ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς», ³Αιματολογικό Εργαστήριο, ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς», ⁴Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς», Αθήνα
- 95 ΥΠΟΤΥΠΟ Τ-ΘΕΙΑΣ ΔΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ/ΔΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΟΥ ΔΕΜΦΟΜΑΤΟΣ: ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΕΚΒΑΣΗ ΝΟΣΟΥ**
 Α. Παναγιωτοπούλου, Χ. Αλαγιάννη, Α. Συρίγου, Μ. Παπαθανασίου, Δ. Μιλιούρη, Α. Μαρβάκη, Ε. Γαβρηλάκη, Β. Δούκα, Ζ. Μπορούση, Γ. Καραβαλάκης, Χ. Δημοσθένους, Θ. Χατζηκωνσταντίνου, Θ. Τέστα, Ι. Ευτυχίδης, Σ. Δημιού, Ε. Μουρατίδου, Χ. Βαρέλας, Δ. Γκουσαρής, Ι. Μπίσης, Ε. Γιαννάκη, Α. Αναγνωστόπουλος, Ι. Σακελλάρη
 Αιματολογικό Τμήμα - Μονάδα Μεταμόσχευσης, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη
- 96 ΠΡΟΤΥΠΩΣ ΣΑΡΚΩΜΑ ΜΕ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΣΤΟ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΑΠΟ ΔΡΑΡ ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΗ ΜΕ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ Τ-ΝΟΗΘΟΓΚΙΝ ΛΕΜΦΟΜΑΤΟΣ (ΝΟΣ)**
 Χ. Βαδικλάη¹, Γ. Αρσος², Ε. Γιαννοπούλου³, Α. Τσομπανιάκου⁴, Β. Δούκα⁵, Ι. Ματζαράκης⁶, Β. Παλάσκας⁷, Ε. Χαϊδοπούλη⁸, Π. Φωτιάδης⁹, Α. Μπομπούνης¹⁰, Α. Καραμούτσος¹¹, Γ. Ουδατζίτης¹², Γ. Ανδρούτσος¹³, Α. Μαρinos¹⁴, Α. Αθανασιάδου¹⁵, Κ. Σταματοπούλου¹⁶, Γ. Πατεράκης¹⁷
¹Αιματολογική Κλινική, 424 ΓΣΝΘ, Θεσσαλονίκη, ²Εργαστήριο Πυρηνικής Ιατρικής ΑΠΘ, ΓΝΘ «Γ. Παπαγεωργίου», Θεσσαλονίκη, ³Αιματολογικό Εργαστήριο - Αιματολογική Κλινική, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, ⁴Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, ⁵Χειρουργική Κλινική, 424 ΓΣΝΘ, Θεσσαλονίκη, ⁶Γαστρεντερολογική Κλινική, 424 ΓΣΝΘ, Θεσσαλονίκη, ⁷Ακτινολογικό Εργαστήριο, 424 ΓΣΝΘ, Θεσσαλονίκη, ⁸Ανοσολογικό Τμήμα και Εθνικό Κέντρο Ιατοσυμβατότητας, ΓΝΑ «Γ. Γεννηματάς», Αθήνα, ⁹Αιμοπαθολογοανατομικό Εργαστήριο, ΓΝΑ «Ο Ευαγγελόμοδος», Αθήνα, ¹⁰Εργαστήριο Κυτταρογενετικής - Αιματολογική Κλινική, ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη, ¹¹Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών ΕΚΕΤΑ, Θεσσαλονίκη



Article

Stratification of $\beta^S\beta^+$ Compound Heterozygotes Based on L-Glutamine Administration and RDW: Focusing on Disease Severity

Aimilia Giannaki ^{1,†}, Hara T. Georgatzakou ^{1,†}, Sotirios P. Fortis ¹, Alkmini T. Anastasiadi ^{1,2}, Eftimia G. Pavlou ^{1,3}, Efrosyni G. Nomikou ³, Maria P. Drandaki ⁴, Angeliki Kotsiafti ⁴, Aikaterini Xydaki ⁴, Christina Fountzoula ⁵, Effie G. Papageorgiou ¹, Vassilis L. Tzounakas ² and Anastasios G. Kriebardis ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology (HemQcR), Department of Biomedical Sciences, School of Health & Caring Sciences, University of West Attica (UniWA), 12243 Egaleo, Greece; agiannaki@uniwa.gr (A.G.); cgeorgatz@uniwa.gr (H.T.G.); sfortis@uniwa.gr (S.P.F.); aanastasiadi@uniwa.gr (A.T.A.); epavlou@uniwa.gr (E.G.P.); efipapag@uniwa.gr (E.G.P.)
 - ² Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Patras, 26504 Patras, Greece; vtzounakas@upatras.gr
 - ³ Blood Bank and Hemophilia Unit, Hippokraton Hospital, 11527 Athens, Greece; aimahippocratio.gr
 - ⁴ Thalassemia and Sickle Cell Unit, Expertise Center of Hemoglobinopathies and Their Complications, Hippokraton General Hospital, 11527 Athens, Greece; thalassemia@chaniahospital.gr (M.P.D.); ankotsiafti@uth.gr (A.K.); xydaki@hippocratio.gr (A.X.)
 - ⁵ Laboratory of Chemistry, Biochemistry and Cosmetic Science (ChemBioChemCosm), Department of Biomedical Sciences, School of Health & Caring Sciences, University of West Attica (UniWA), 12243 Egaleo, Greece; chfountz@uniwa.gr
- * Correspondence: akrieb@uniwa.gr; Tel.: +30-210-538-5813
† These authors contributed equally to this work.



Citation: Giannaki, A.; Georgatzakou, H.T.; Fortis, S.P.; Anastasiadi, A.T.; Pavlou, E.G.; Nomikou, E.G.; Drandaki, M.P.; Kotsiafti, A.; Xydaki, A.; Fountzoula, C.; et al. Stratification of $\beta^S\beta^+$ Compound Heterozygotes Based on L-Glutamine Administration and RDW: Focusing on Disease Severity. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1982. <https://doi.org/10.3390/antiox12111982>

Academic Editors: Reto Asmis and Miriam M. Cortese-Krott

Received: 6 October 2023
Revised: 30 October 2023
Accepted: 7 November 2023
Published: 8 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Sickle cell disease (SCD) is heterogeneous in terms of manifestation severity, even more so when in compound heterozygosity with beta-thalassemia. The aim of the present study was to stratify $\beta^S\beta^+$ patient blood samples in a severity-dependent manner. Blood from thirty-two patients with HbS/ β -thalassemia compound heterozygosity was examined for several parameters (e.g., hemostasis, inflammation, redox equilibrium) against healthy controls. Additionally, SCD patients were a posteriori (a) categorized based on the L-glutamine dose and (b) clustered into high-/low-RDW subgroups. The patient cohort was characterized by anemia, inflammation, and elevated coagulation. Higher-dose administration of L-glutamine was associated with decreased markers of inflammation and oxidation (e.g., intracellular reactive oxygen species) and an altered coagulation profile. The higher-RDW group was characterized by increased hemolysis, elevated markers of inflammation and stress erythropoiesis, and oxidative phenomena (e.g., membrane-bound hemoglobin). Moreover, the levels of hemostasis parameters (e.g., D-Dimers) were greater compared to the lower-RDW subgroup. The administration of higher doses of L-glutamine along with hydroxyurea seems to attenuate several features in SCD patients, probably by enhancing antioxidant power. Moreover, anisocytosis may alter erythrocytes' coagulation processes and hemolytic propensity. This results in the disruption of the redox and pro-/anti-inflammatory equilibria, creating a positive feedback loop by inducing stress erythropoiesis and, thus, the occurrence of a mixed erythrocyte population.

Keywords: sickle cell disease; L-glutamine; RDW; coagulation; inflammation; oxidative stress

1. Introduction

Sickle cell disease (SCD) is one of the most common and severe monogenic disorders worldwide and is estimated to affect ~300,000 infants every year. SCD, which Pauling characterized as a “molecular disease” in 1949, occurs due to a point mutation in the β -globin gene that leads to the production of hemoglobin S (HbS). Due to its altered biophysical

properties, the latter can polymerize under hypoxic conditions, and the fibers formed change red blood cell (RBC) deformability features [1]. This is followed by a cascade of events, including vessel occlusion and hemolysis, which are responsible for the symptomatology of the disease, such as pain crises, and even organ damage [2]. Despite its monogenic basis, some clinical phenotypes of SCD present extreme variability, compelling scientists to propose that it concerns a monogenic disease with a polygenic phenotype [3]. The most frequent and most studied form of SCD is the homozygous state for the β^S mutation, while other forms include compound heterozygosity for HbS and thalassemias. Nevertheless, even within the distinct genotypes, there is a wide range of manifestation severity.

The variable symptom severity has been linked to several distinct blood parameters. RBCs with low deformability present increased adhesive properties, with both features being indisputable contributors to the disease sequelae [4–6]. The levels of microRNAs have been also linked to patient symptomatology [7], while free heme has been similarly discussed as a potential biomarker [8]. Of note, a cluster of seventeen circulating molecules, including hematological parameters (e.g., monocytes, MCV) and serum markers (e.g., lactate dehydrogenase, bilirubin), has been found to correlate with morbidity and mortality in SCD [9]. More recently, the presence of mitochondria-retaining RBCs and reticulocytes, as well as free mitochondrial DNA, has been associated with well-known contributors to the disease manifestations, including hemolysis and inflammatory reactions [10–12].

As stated above, the β^S mutation can be combined with other mutations in compound heterozygosity. While HbS/ β^0 thalassemia clinically resembles the homozygous sickle cell disease state, HbS/ β^+ thalassemia's manifestations vary depending on the specific allele [13], and, although it is considered a mild disease, this is not always the case [14]. The present study aimed to find a stratifying parameter to evaluate the variability in disease-manifestation-related parameters in the blood of HbS- β^+ thalassemia compound heterozygotes, which compose a less studied SCD subgroup.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

Thirty-two patients with HbS/ β -thalassemia compound heterozygosity (HbS- β^+) and twenty age- and sex-matched healthy controls were included in the study. All HbS- β^+ patients were receiving folate and most were under treatment with hydroxyurea with/without L-glutamine, while some of them were transfusion-dependent. L-glutamine was consumed by the patients as a food supplement (dose: 16 ± 6 g/day; Glutamine DB EXTRA supplement). The exclusion criteria were as follows: vaso-occlusive crisis 1 month prior to onset of L-glutamine, malignancy, known peptic ulcer, and intolerance to any of the ingredients. Whole blood samples from both patients and controls were collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 3.2% sodium citrate blood collection tubes (BD Vacutainer Blood Collection Tubes, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.2. Material Supplies

All materials and common chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Munich, Germany) unless otherwise stated. Antibodies used for flow cytometry experiments were obtained from BD Biosciences (San Jose, CA, USA). The Zymuphen™ EV activity kit (Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, France) was used for the measurement of extracellular vesicles' procoagulant activity. The ECL Western blot detection kit was from GE Healthcare. Antibodies against Hb (CR8000GAP) were from Europa Bioproducts, (Ipswich, UK) while the antibody against 4.1 R was kindly provided by Prof. J. Delaunay (Laboratoire d'Hématologie, d'Immunologie et de Cytogénétique, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France). HRP-conjugated antibodies to rabbit IgGs were from GE Healthcare (Chicago, IL, USA) and those to goat IgGs were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.3. Hematological and Biochemical Analysis

Classical hematological analysis was performed using a Siemens Advia 2120i Hematology Analyzer. Biochemical analysis of serum components (urea, creatinine, uric acid, glucose, cholesterol, triglycerides, calcium, phosphorus, potassium, sodium, chlorine, magnesium, iron, ferritin, B12, folate, proteins, albumin, serum glutamyl oxalate transaminase, serum glutamyl pyruvate transaminase, gamma-glutamyl transferase, alkaline phosphatase, total, direct and indirect bilirubin, total creatine phosphokinase, amylase, lactate dehydrogenase, and vitamin D) was conducted using the automatic Clinical Chemistry Analyzer ARCHITECT C16000 (Abbott, Chicago, IL, USA). C-reactive protein levels were determined in the Architect C8000 analyzer by a commercial kit (Abbott Laboratories (Hellas), Athens, Greece). HbS and HbF levels were evaluated by the fully automated VARIANT II Hemoglobin Testing System (BioRad, Hercules, CA, USA).

2.4. Hemolysis and Redox Parameters

Spontaneous hemolysis (levels of plasma Hb) was calculated by spectrophotometry using Harboe's method, followed by Allen's correction and normalization to hematocrit and intracellular Hb levels. The propensity of erythrocytes for osmotic lysis was evaluated upon exposure to ascending NaCl concentrations. The antioxidant capacity of plasma (total TAC; uric acid-dependent, UAdAC; and uric acid-independent, UAiAC) was measured via the method of Benzie and Strain [15]. Briefly, plasma with and without uricase treatment, mixed with the ferric reducing/antioxidative power (FRAP) solution, was incubated at 37 °C for 4 min and absorbance was measured at 593 nm. Intracellular mean fluorescence and the percentage of reactive oxygen species (ROS)-positive RBCs were detected in a FACSCanto II Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) by using the fluorescent probe CM-H₂DCFDA (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) [16].

2.5. Hemostasis Parameters

A secondary hemostasis screening test, including the measurement of prothrombin time (PT-INR), activated partial thromboplastin clotting time (APTT), and fibrinogen and D-dimer values, as well as the levels of von Willebrand and factor VIII, was performed as previously described [16]. Quantitative determination of the thrombin/antithrombin III complex (TAT) in human plasma was assessed by enzyme immunoassays (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany). Thrombin time (TT) was measured by STA Thrombin reagent (Diagnostica Stago, Parsippany, NJ, USA).

2.6. Membrane Isolation and Immunoblotting

RBC membranes were isolated by hypotonic (5 mmol/L sodium phosphate buffer) lysis of RBCs. Membrane aliquots were immune-probed for integral and membrane-bound proteins by using horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies and enhanced chemiluminescence development. Semi-quantification of protein bands was performed by scanning densitometry (Gel Analyzer v.1.0, Biosure, Athens, Greece).

2.7. Statistical Analysis

For statistical analysis, the Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS Software; version 26.0 for Windows IBM Corp., Armonk, NY, USA; administrated by UniWA and the University of Patras) was used. Patients were a posteriori categorized using the information regarding L-glutamine consumption or a two-step cluster analysis (in the case of RDW). The differences between groups were evaluated by parametric and non-parametric tests according to the distribution profile of each parameter. Significance was accepted at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Variation from Controls

The first step of the study was to ensure that our patient cohort presented the anticipated divergence from the healthy controls. As expected, SCD patients were characterized as anemic due to decreased RBC counts, intracellular Hb, and hematocrit, but an increased red cell distribution width (RDW) (Table 1). Besides the higher levels of HbF and HbS, more reticulocytes were found in the SCD samples. While the complete number of white blood cells did not differ from that in the controls, the proportion of monocytes and basophils was found increased. The biochemical analysis showed that markers of hemolysis, like bilirubin and lactate dehydrogenase, along with markers of inflammation (ferritin, C-reactive protein) and liver function (e.g., alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transferase), also presented higher values in the serum of SCD patients compared to controls. Several hemostasis and coagulation parameters, including the levels of D-dimers and von Willebrand factor, and the procoagulant activity of EVs, were elevated in the disease cohort. Lastly, the free Hb and plasma antioxidant capacity were higher in SCD patients, along with the ROS cargo of their RBCs, while osmotic hemolysis was lower (Table 1).

Table 1. Variations in SCD patients from healthy controls.

	Patients	Controls	Normal Range
Age (years)	49.8 ± 11.9	44.7 ± 7.6	
General Blood Test			
White blood cells (×10 ³ /μL)	7.6 ± 1.7	6.4 ± 1.3	5.2–12.4
Neutrophils (%)	57.4 ± 9.0	56.8 ± 7.1	40.0–74.0
Lymphocytes (%)	29.3 ± 7.3	31.3 ± 6.5	19.0–48.0
Monocytes (%)	7.5 ± 3.1 *	5.8 ± 1.3	3.4–9.0
Eosinophils (%)	2.5 ± 1.3 *	3.6 ± 1.8	0.0–7.0
Basophils (%)	1.0 ± 0.5 *	0.7 ± 0.3	0.0–1.5
Neutrophil/lymphocyte ratio	2.2 ± 1.0	1.9 ± 0.5	-
Red blood cells (×10 ⁶ /μL)	3.8 ± 0.9 *	5.0 ± 0.4	4.2–6.1
Hemoglobin (g/dL)	10.0 ± 1.5 *	14.2 ± 1.1	12.0–18.0
Hematocrit (%)	31.8 ± 4.4 *	44.0 ± 3.6	37.0–52.0
MCV (fL)	86.4 ± 12.0	88.9 ± 4.0	80.0–99.0
MCH (pg)	27.1 ± 4.2	28.6 ± 1.3	27.0–31.0
MCHC (gr/dL)	31.3 ± 1.3 *	32.2 ± 0.7	33.0–37.0
RDW (%)	19.3 ± 2.3 *	13.1 ± 0.9	11.5–14.5
Platelets (×10 ³ /μL)	310.7 ± 189.2	273.4 ± 40.0	130.0–400.0
Mean platelet volume (MPV; fL)	10.0 ± 1.2	9.5 ± 1.4	7.2–11.1
Reticulocyte count (%)	8.0 ± 4.8 *	1.5 ± 0.3	0.5–2.0
HbS (%)	65.9 ± 14.3 *	0.0 ± 0.0	0
HbF (%)	14.3 ± 9.6 *	0.3 ± 0.1	0.8–2
Serum Biochemical Analysis			
Glucose (mg/dL)	89.3 ± 10.1 *	81.5 ± 10.8	70–105
Urea (mg/dL)	28.8 ± 13.7	27.2 ± 5.1	18.0–55.0
Creatinine (mg/dL)	0.78 ± 0.18	0.83 ± 0.09	0.72–1.25
Uric acid (mg/dL)	5.1 ± 1.0	4.7 ± 0.8	3.5–7.2
Cholesterol (mg/dL)	149.4 ± 25.4 *	183.1 ± 22.6	0.0–200.0
Triglycerides (mg/dL)	124.7 ± 53.1	99.7 ± 37.0	0.0–150.0
Calcium (mg/dL)	9.2 ± 0.6	9.3 ± 0.4	8.4–10.2
Phosphorus (mg/dL)	3.4 ± 0.5	3.4 ± 0.5	2.4–4.7
Potassium (mmol/L)	4.3 ± 0.3	4.2 ± 0.2	3.5–5.1
Sodium (mmol/L)	138.6 ± 1.8	139.4 ± 1.8	136.0–145.0
Chlorine (mmol/L)	105.7 ± 1.9	105.8 ± 1.8	98.0–107.0
Magnesium (mg/dL)	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.1	1.60–2.60
Iron (mg/dL)	130.0 ± 96.1	109.4 ± 51.0	50–150 (F); 60–160 (M)
Ferritin (ng/mL)	359.9 ± 215.5 *	61.0 ± 42.3	14.0–233.0 (F); 16.4–293.3 (M)

Table 1. Cont.

	Patients	Controls	Normal Range
B12 (pg/mL)	336.3 ± 146.2	371.4 ± 185.0	179.0–1162.0
Folate (ng/mL)	24.1 ± 15.0 *	6.4 ± 2.5	2.5–17.0
Proteins (mg/dL)	7.4 ± 0.6	7.3 ± 0.4	6.40–8.30
Albumin (gr/dL)	4.4 ± 0.3	4.4 ± 0.3	3.50–5.00
SGOT (U/L)	32.4 ± 11.5 *	19.0 ± 6.3	5.0–34.0
SGPT (U/L)	28.8 ± 25.0	22.3 ± 12.6	0.0–55.0
Gamma-glutamyl transferase (U/L)	34.4 ± 24.1 *	19.2 ± 9.6	12.0–64.0
Alkaline phosphatase (ALP; U/L)	78.5 ± 23.1 *	63.1 ± 11.9	40.0–150.0
HDL (mg/dL)	39.9 ± 8.7 *	55.4 ± 14.1	>50
LDL (mg/dL)	84.7 ± 20.9 *	107.8 ± 18.9	<110
Immunoglobulins (g/dL)	3.0 ± 0.7	2.9 ± 0.7	
Total bilirubin (mg/dL)	2.2 ± 1.1 *	0.6 ± 0.2	0.2–1.2
Indirect bilirubin (mg/dL)	1.4 ± 0.9 *	0.3 ± 0.1	0.01–0.9
Direct bilirubin (mg/dL)	0.7 ± 0.3 *	0.2 ± 0.1	0.00–0.30
Lactate dehydrogenase (IU/L)	337.9 ± 102.1 *	184.5 ± 31.7	125.0–220.0
Creatine phosphokinase total (IU/L)	41.8 ± 29.7 *	107.7 ± 80.9	30.0–200.0
Vitamin D (ng/mL)	24.3 ± 11.1	21.4 ± 8.2	30.0–100.0
C-reactive protein (mg/L)	6.0 ± 5.9 *	1.7 ± 1.6	0.0–5.0
Hemostasis–Coagulation Parameters			
Prothrombin time INR	1.1 ± 0.4 *	1.0 ± 0.1	0.8–1.1
APTT (s)	29.7 ± 5.0	29.2 ± 2.9	<36
Fibrinogen (mg/dL)	306.2 ± 115.5	327.9 ± 74.1	180–350
D-Dimer (µg/L)	2552.6 ± 2186.0 *	261.9 ± 98.4	<500
Factor VIII (%)	90.6 ± 31.0 *	123.3 ± 17.6	60–140
von Willebrand factor (%)	166.3 ± 82.4 *	110 ± 20.8	60–140
TAT complex (µg/L)	7.0 ± 3.7 *	3.2 ± 0.6	2.0–4.2
EV procoagulant activity (nM PS)	28.0 ± 12.2 *	20.3 ± 8.5	
Hemolysis and Redox Status			
Hemolysis (%)	0.20 ± 0.09 *	0.09 ± 0.08	
Osmotic fragility (% [NaCl])	0.33 ± 0.04 *	0.46 ± 0.02	
Intracellular ROS (MFI)	744.1 ± 258.5 *	480.6 ± 211.2	
Plasma TAC (µM Fe ²⁺)	782.6 ± 184.9 *	506.3 ± 109.4	
Plasma UAdAC (µM Fe ²⁺)	438.2 ± 106.9 *	306.2 ± 125.1	
Plasma UAiAC (µM Fe ²⁺)	344.4 ± 166.2 *	200.0 ± 59.8	

Values are presented as mean ± SD. Bold, (*): $p < 0.05$ patients vs. controls. APTT: activated partial thromboplastin time; A.U.: arbitrary units; EV: extracellular vesicles; HDL: high-density lipoproteins; LDL: low-density lipoproteins; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV: mean corpuscular volume; MFI: mean fluorescence intensity; PS: phosphatidylserine; RDW: red cell distribution width; ROS: reactive oxygen species; SGOT: serum glutamic-oxaloacetic transaminase; SGPT: serum glutamate-pyruvate transaminase; TAC: total antioxidant capacity; TAT complex: thrombin–antithrombin complex; UAdAC: uric-acid-dependent antioxidant capacity; UAiAC: uric-acid-independent antioxidant capacity.

3.2. Glutamine-Based Categorization

The patient cohort varied in terms of therapy; therefore, the next step of the present study was to evaluate the effect of the dose of orally consumed L-glutamine to hydroxyurea-treated SCD patient samples. Transfusion-dependent patients were excluded from this categorization so as to consider only the effect of the dose of L-glutamine supplementation. The subgroup that consumed 15 g or more of glutamine per day presented elevated neutrophils and monocytes but decreased lymphocytes (Table 2). Regarding RBC values, mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular volume (MCV) were reduced in the high-intake group, along with the presence of nucleated erythrocytes. The levels of inflammation-related molecules, like iron, ferritin, and immunoglobulins, were diminished in the same group, while markers of hemolysis, including lactate dehydrogenase and hemolysis percentage, presented a non-statistically significant trend for lower levels ($0.05 < p < 0.10$). It should be noted that the levels of HbF were decreased after supplement-

tation with >15 g glutamine. Interestingly, the thrombin–antithrombin complex, fibrinogen, and D-dimers were decreased in the high-intake cohort, a result that also arose in oxidative stress parameters, like ROS accumulation and membrane-bound hemoglobin dimers (Table 2).

Table 2. Variations in SCD hydroxyurea-administered patients upon additional supplementation with glutamine of less or more than 15 g/day.

	<15 g/day (n = 10)	≥15 g/day (n = 9)
Age (years)	50.5 ± 14.7	40.3 ± 14.7
General Blood Test		
White blood cells (×10 ³ /μL)	5.7 ± 1.7	6.1 ± 2.0
Neutrophils (%)	55.4 ± 7.0 *	65.8 ± 7.3
Lymphocytes (%)	33.9 ± 6.3 *	22.8 ± 5.8 (33%)
Monocytes (%)	5.2 ± 1.1 *	6.7 ± 1.1
Eosinophils (%)	2.5 ± 1.0	2.4 ± 1.4
Basophils (%)	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.3
Neutrophil/lymphocyte ratio	1.7 ± 0.7 *	3.1 ± 1.2
Red blood cells (×10 ⁶ /μL)	3.4 ± 0.3 (100%)	4.0 ± 1.2 (55%)
Hemoglobin (g/dL)	10.2 ± 1.1 (90%)	10.2 ± 2.2 (66%)
Hematocrit (%)	32.5 ± 2.4 (100%)	32.4 ± 6.6 (66%)
Mean corpuscular volume (MCV; fL)	97.0 ± 11.3 * (30%)	82.8 ± 9.8 (66%)
Mean corpuscular hemoglobin (MCH; pg)	30.5 ± 4.5 * (40%)	26.0 ± 2.8 (66%)
MCH concentration (MCHC; gr/dL)	31.4 ± 1.2 (80%)	31.5 ± 1.6 (77%)
Red cell distribution width (RDW; %)	19.4 ± 2.4 (100%)	18.6 ± 2.7 (100%)
Platelets (×10 ³ /μL)	351.7 ± 263.3 (20%)	306.9 ± 201.9 (77%)
Mean platelet volume (MPV; fL)	10.0 ± 1.2 (10%)	9.6 ± 1.2
Reticulocyte count (%)	7.1 ± 1.6 (100%)	8.4 ± 6.7 (100%)
Nucleated red blood cells (%)	19.8 ± 9.8 *	9.8 ± 7.3
HbS (%)	68.9 ± 6.4 (100%)	73.5 ± 9.3 (100%)
HbF (%)	23.2 ± 7.9 * (100%)	10.3 ± 9.8 (100%)
Serum Biochemical Analysis		
Glucose (mg/dL)	88.7 ± 9.6	84.4 ± 6.8
Urea (mg/dL)	27.5 ± 17.2 (20%)	21.6 ± 7.7 (33%)
Creatinine (mg/dL)	0.78 ± 0.12 (20%)	0.73 ± 0.13 (22%)
Uric acid (mg/dL)	5.2 ± 0.7	5.3 ± 1.2 (11%)
Cholesterol (mg/dL)	156.9 ± 24.4	153.3 ± 27.9
Triglycerides (mg/dL)	136.0 ± 30.2 * (20%)	91.2 ± 47.1 (11%)
Calcium (mg/dL)	9.6 ± 0.8 * (20%)	8.9 ± 0.5 (11%)
Phosphorus (mg/dL)	3.5 ± 0.3	3.4 ± 0.4
Potassium (mmol/L)	4.4 ± 0.3	4.2 ± 0.3
Sodium (mmol/L)	139.1 ± 1.4	140.0 ± 1.2
Chlorine (mmol/L)	105.8 ± 1.5	106.3 ± 1.4
Magnesium (mg/dL)	2.0 ± 0.6 (10%)	2.0 ± 0.1
Iron (mg/dL)	106.5 ± 29.1 *	69.4 ± 26.5 (22%)
Ferritin (ng/mL)	338.8 ± 152.5 * (70%)	56.5 ± 36.0 (11%)
B12 (pg/mL)	269.1 ± 85.0 (20%)	311.2 ± 98.7
Folate (ng/mL)	20.5 ± 16.6 (50%)	25.1 ± 14.5 (55%)
Proteins (mg/dL)	7.8 ± 0.3 *	7.0 ± 0.4
Albumin (g/dL)	4.7 ± 0.2	4.5 ± 0.4
Serum glutamic-oxaloacetic transaminase (SGOT; U/L)	27.8 ± 6.8 (10%)	26.4 ± 14.2 (11%)
Serum glutamate-pyruvate transaminase (SGPT; U/L)	19.8 ± 7.3	22.4 ± 15.2
Gamma-glutamyl transferase (U/L)	20.1 ± 14.1	34.5 ± 15.6
Alkaline phosphatase (ALP; U/L)	76.1 ± 14.6	86.7 ± 24.8
High-density lipoproteins (HDL; mg/dL)	41.5 ± 7.8 (80%)	39.7 ± 9.0 (66%)
Low-density lipoproteins (LDL; mg/dL)	88.5 ± 20.1 (10%)	95.6 ± 22.3 (33%)
Immunoglobulins (g/dL)	3.2 ± 0.4 *	2.5 ± 0.6
Total bilirubin (mg/dL)	1.9 ± 0.9 (80%)	1.7 ± 0.8 (66%)

Table 2. Cont.

	<15 g/day (n = 10)	≥15 g/day (n = 9)
Indirect bilirubin (mg/ dL)	1.3 ± 0.8 (50%)	1.1 ± 0.7 (44%)
Direct bilirubin (mg/ dL)	0.65 ± 0.13 (100%)	0.58 ± 0.16 (100%)
Lactate dehydrogenase (IU/L)	284.5 ± 57.9 (80%)	251.8 ± 27.8 (77%)
Creatine phosphokinase total (IU/L)	33.4 ± 19.8 (50%)	47.0 ± 35.6 (11%)
Vitamin D (ng/ mL)	21.7 ± 6.8 (70%)	22.9 ± 7.8 (66%)
C-reactive protein (mg/L)	4.3 ± 2.4 (10%)	6.7 ± 6.4 (33%)
Hemostasis–Coagulation Parameters		
Prothrombin time INR	1.02 ± 0.06 (10%)	1.08 ± 0.12 (22%)
Activated partial thromboplastin time (APTT; s)	28.2 ± 2.0	29.1 ± 2.9
Fibrinogen (mg/ dL)	364.0 ± 79.5 * (40%)	257.1 ± 104.6 (55%)
D-dimer (µg/L)	1187.6 ± 360.9 * (100%)	693.1 ± 307.1 (55%)
Factor VIII (%)	78.2 ± 23.4 (10%)	75.3 ± 33.4 (33%)
von Willebrand factor (%)	126.8 ± 21.2 (20%)	141.1 ± 84.2 (33%)
Thrombin–antithrombin complex (µg/L)	5.8 ± 1.4 * (50%)	4.3 ± 1.3 (22%)
EV procoagulant activity (nM PS)	22.5 ± 7.6	27.2 ± 6.3
Hemolysis and Redox Status		
Hemolysis (%)	0.21 ± 0.08	0.15 ± 0.05
Osmotic fragility (% [NaCl])	0.33 ± 0.06	0.34 ± 0.02
Intracellular reactive oxygen species (MFI)	880.5 ± 194.9 *	585.4 ± 231.4
Plasma TAC (µM Fe ²⁺)	778.7 ± 177.5	745.2 ± 211.2
Plasma UadAC (µM Fe ²⁺)	417.1 ± 99.7	435.0 ± 95.0
Plasma UaiAC (µM Fe ²⁺)	361.5 ± 158.2	310.2 ± 225.9
Membrane-bound hemoglobin dimers (A.U.)	1.51 ± 0.89 *	0.64 ± 0.46

Values are presented as mean ± SD. Bold, (*): $p < 0.05$ glutamine administration <15 g/day vs. glutamine administration ≥15 g/day. The percentages in parentheses indicate the proportion of patient samples with values outside the normal range. A.U.: arbitrary units; EV: extracellular vesicles; MFI: mean fluorescence intensity; PS: phosphatidylserine; TAC: total antioxidant capacity; UadAC: uric-acid-dependent antioxidant capacity; UaiAC: uric-acid-independent antioxidant capacity.

3.3. RDW-Based Categorization

Through clustering analyses, we sought to categorize all SCD patients, regardless of the choice of therapy, based on one of the parameters measured. The analysis outcome revealed that RDW had good potential in dichotomizing our heterogeneous patient group (Figure 1). A cut-off value of RDW = 19% split our cohort into two distinct subgroups with minimal overlap (Figure 1) and significant differences. To initially examine the effect of L-glutamine consumption upon RDW stratification, we checked the presence of high- and low-dose glutamine recipients in the new cohorts. There was representation of both L-glutamine groups in both RDW categories (six low- and four high-dose in the high-RDW group vs. four low- and five high-dose in the low-RDW group, dose of glutamine: 13.5 ± 6.3 vs. 16.7 ± 7.1 g, respectively, $p = 0.315$).

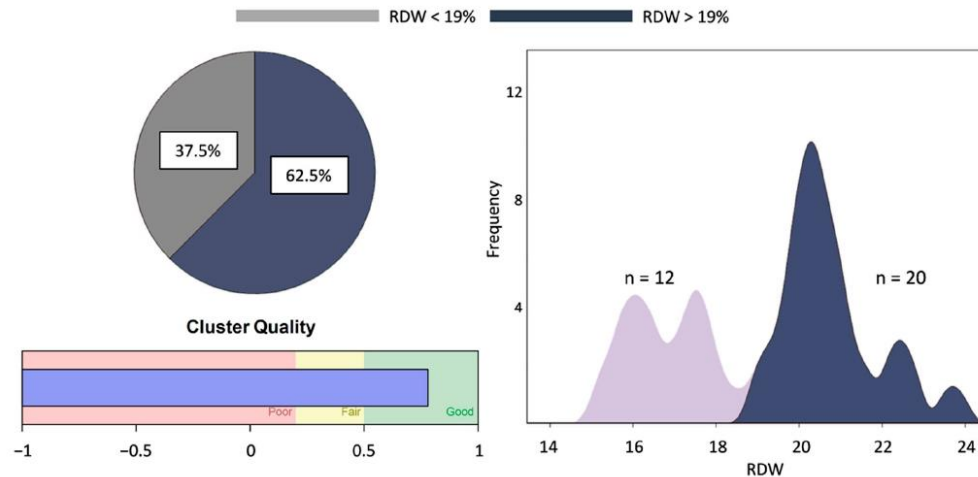


Figure 1. Cluster analysis revealed two subgroups stratified by RDW values.

Regarding RBC parameters, the levels of intracellular Hb were lower in the group of RDW > 19% (10.8 ± 1.8 vs. 9.5 ± 1.1 g/dL, lower RDW vs. higher RDW, $p = 0.017$), in contrast to the percentages of reticulocytes and nucleated RBCs, which exhibited the opposite result (reticulocytes: 4.3 ± 1.1 vs. $9.4 \pm 4.2\%$; nucleated RBCs: 5.4 ± 5.1 vs. $24.7 \pm 15.2\%$, lower RDW vs. higher RDW, $p = 0.01$ and 0.005 , respectively). While bilirubin did not differ between the two groups, the levels of hemolysis and serum lactate dehydrogenase were higher in the patients with increased RDW (Figure 2A). Osmotic hemolysis presented lower values in the same group (Figure 2A), while extracellular K^+ was elevated (4.1 ± 0.2 vs. 4.4 ± 0.3 mmol/L, lower RDW vs. higher RDW, $p = 0.006$). Oxidative stress markers, like intracellular ROS accumulation and the binding of Hb to the membrane and the cytoskeleton, were also elevated in patients of higher RDW compared to their counterparts (Figure 2B). Nonetheless, plasma antioxidant capacity was similar between the two groups (Figure 2B).

Hemostasis and coagulation parameters were notably dissimilar between the two groups, with most of them, including platelets, von Willebrand factor, fibrinogen, and D-dimers, exhibiting increased values in the higher-RDW group (Figure 3). Of note, neither the prothrombin time nor the activated partial thromboplastin time were altered (Figure 3).

The white blood cell count was higher in the group with increased RDW, with monocytes following the same pattern but the neutrophil to lymphocyte ratio being inferior compared to the lower-RDW group (Figure 4). In the same context, markers of inflammation, like C-reactive protein and globulins, were elevated in the group of RDW > 19%, even though interleukin-6 was unaffected (Figure 4). Finally, the levels of serum albumin were lower in the same group (4.7 ± 0.3 vs. 4.3 ± 0.3 g/dL, lower RDW vs. higher RDW, $p = 0.003$).

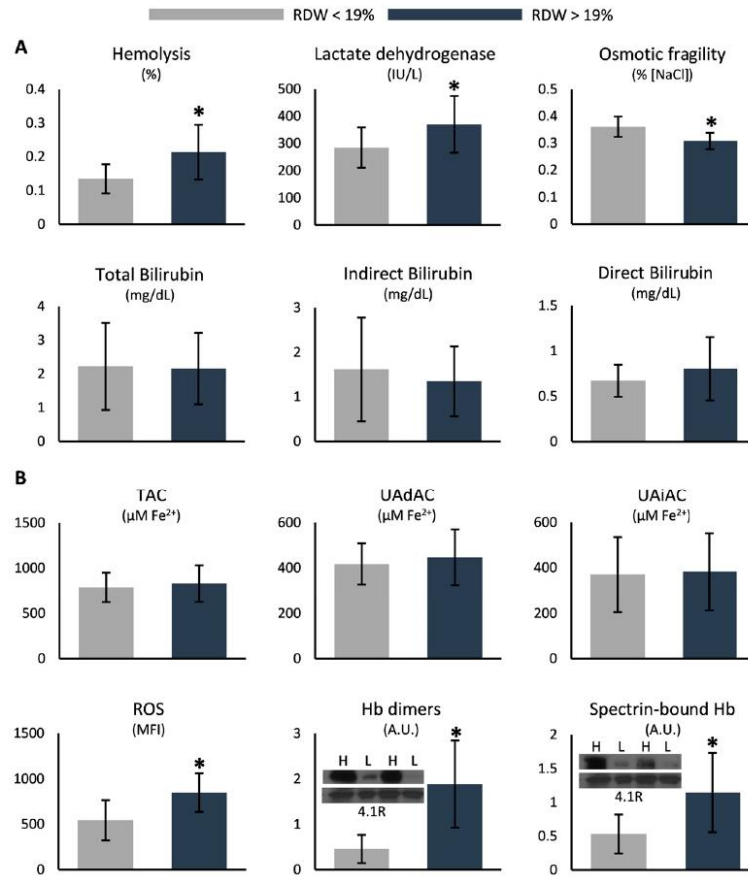


Figure 2. Differences in (A) hemolysis markers and (B) redox parameters between SCD samples stratified by their RDW values. Inserts: immunoblots of selected samples for high (H) and low (L) RDW subgroups. The 4.1R protein was used as an internal loading control. TAC: total antioxidant capacity; UAdAC: uric-acid-dependent antioxidant capacity; UAiAC: uric-acid-independent antioxidant capacity; ROS: reactive oxygen species; MFI: mean fluorescence intensity; Hb: hemoglobin. (*) $p < 0.05$.

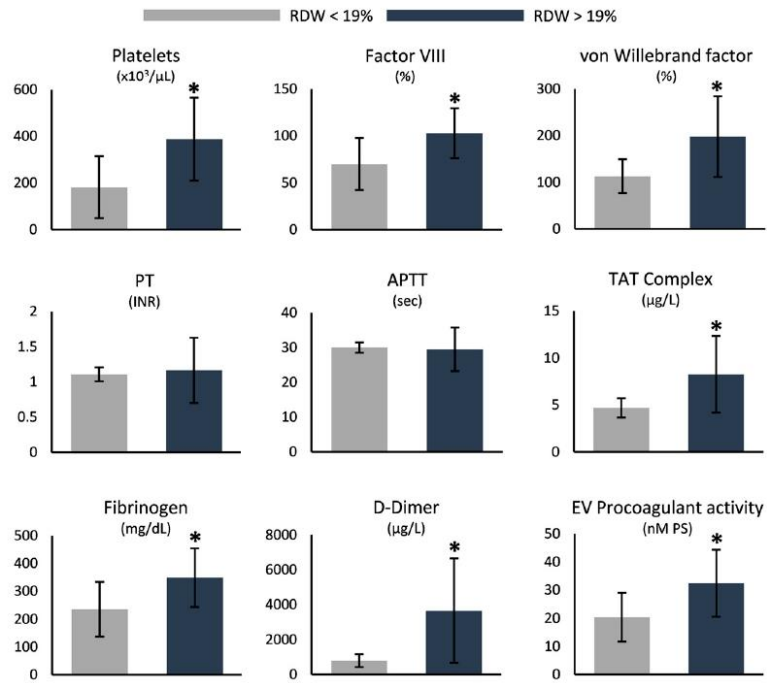


Figure 3. Differences in hemostasis and coagulation parameters between SCD samples stratified by their RDW values. PT: prothrombin time; INR: international normalized ratio; APTT: activated partial thromboplastin time; TAT: thrombin–antithrombin; EV: extracellular vesicles; PS: phosphatidylserine. (*) $p < 0.05$.

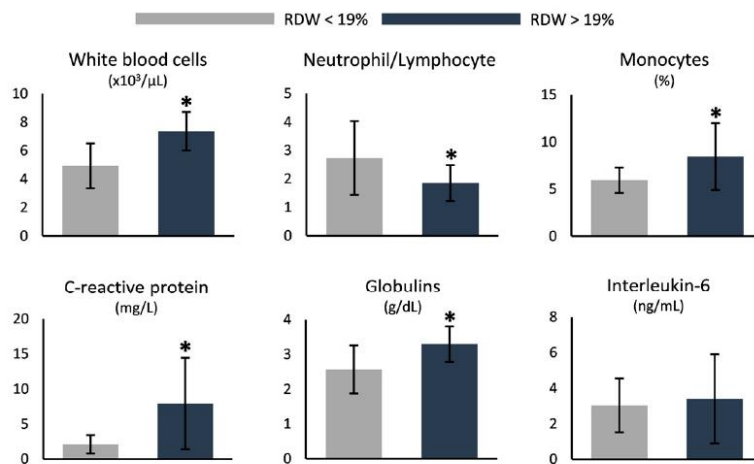


Figure 4. Differences in indicators of inflammation between SCD samples stratified by their RDW values. (*) $p < 0.05$.

4. Discussion

Compound heterozygotes are a highly heterogeneous group of SCD patients, mainly owing to the nature of the second mutation in β -genes that accompanies β^S . The combination of the alleles is expected to influence both hallmarks of the disease's manifestations, as well as the overall clinical picture. In this context, we hereby present (a) data regarding the impact of the dose of glutamine consumption upon markers of oxidation, inflammation, and coagulation and (b) the potential of RDW to categorize heterogeneous patient cohorts with regard to familiar features of SCD-related phenomena, such as free hemoglobin, oxidative stress, hemostasis, and pro-inflammatory molecules. Both analyses of the research were carried out in a compact patient cohort that was distinguished from healthy controls as expected.

4.1. Higher Dose of L-Glutamine Is Protective in Terms of Oxidation, Coagulation, and Inflammation

The first drug to be approved for SCD was hydroxyurea, which leads to the elevation of HbF levels, diluting, in this way, HbS and decreasing the probability of its polymerization [17]. In 2017, L-glutamine was also approved as an SCD medication, and it attenuates the disease's symptoms when administered either alone or in combination with hydroxyurea [18]. Glutamine can strengthen the erythrocytic antioxidant power by contributing to glutathione synthesis, as well as the synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and its reduced form, NADH [19]. In this context, the currently presented low oxidative markers in the group that was characterized by higher doses of L-glutamine were rather anticipated.

While the introduction of L-glutamine as an SCD therapeutic agent was based on its potential antioxidant effect, it should be noted that L-glutamine is a quite versatile amino acid. The orally administered L-glutamine supports L-arginine production, the bioavailability of which is reduced in SCD patients but is vital for the formation of nitric oxide (NO) [19]. Among its other roles, NO inhibits hemostatic activation and adhesion molecules [20]. Interestingly, in our study, some parameters of coagulation and fibrinolysis, like the thrombin–antithrombin complex and D-dimers, were reduced after higher L-glutamine supplementation. Accordingly, SCD patients treated with oral L-glutamine present reduced adhesion of sickle erythrocytes to endothelial cells [21]. In a different disease setting, namely hypertension, there are drugs that lead to a D-dimer decrease and, at the same time, NO elevation [22]. Whether the production of NO after glutamine administration is responsible for the current observation is not yet clear.

It should not be omitted that glutamine is an important amino acid for the metabolism of immune cells and a significant modulator of leukocyte function. Among white blood cells, neutrophils –increased in the current study– consume glutamine at the highest rates [23], to support their energy and redox metabolism. Nonetheless, glutamine is also known for its anti-inflammatory roles, since it suppresses the NF κ B and STAT pro-inflammatory pathways [24]; therefore, in a disease characterized by a steady inflammatory state, like SCD, its administration could be beneficial in terms of inflammatory phenotypes. Indeed, our results support a slightly differentiated inflammation profile when glutamine is present in higher doses, as evidenced by the lower levels of lymphocytes, and immunoglobulins, which might both be increased in the specific disease setting [25,26], as well as the decreased levels of inflammation markers like ferritin.

While hemolysis parameters did not differ significantly between the two subgroups, there was a trend for improved lysis profiles after high-dose glutamine consumption, a finding consistent with a recent study that examined the effect of prolonged glutamine administration on the clinical, hematological, and biochemical features of SCD patients [27]. Another indicator of disease severity that was significantly reduced was the presence of nucleated RBCs, which reflects increased erythropoietic drive or bone marrow necrosis [28]. On the other hand, the observed lower levels of HbF in the higher-dose group are a finding that needs further investigation, since, to our knowledge, there is not a reported relation

between glutamine administration and HbF production. Of note, the secondary outcomes of a recent clinical trial [18] regarding glutamine supplementation/HbF production are still anticipated.

4.2. Increased RDW Is Linked to Markers of Disease Severity

RDW is a hematological parameter that seems to characterize systemic abnormalities, since it has been suggested as a potential biomarker in several pathological states, including cardiovascular diseases [29], autoimmunity [30], and cancer [31]. Sickle cell disease is not absent from this list, since, in $\beta^S\beta^S$ patients, low RDW has been found to be associated with milder clinical manifestations and improved hemoglobin parameters [32]. It was recently suggested that oxidative stress affects RDW [33]; therefore, redox disequilibrium could lie behind the constant emergence of the biomarker potential of this parameter.

In fact, in the current study, oxidative stress, as evidenced by ROS accumulation and Hb binding to the membrane, was increased in the higher-RDW group. Intracellular ROS have a significant impact on the physiology of RBCs. The membrane and the cytoskeleton are the two main sites of oxidative stress manifestation, through the carbonylation of proteins, peroxidation of lipids, and attachment of hemichromes [34]. All these make RBCs more prone to lysis, in consistency with our current hemolysis findings. Notably, osmotically induced hemolysis was inversely associated with the levels of RDW. It is well known that in hemoglobinopathies, such as thalassemic syndromes and SCD, the affected cells, mostly in the disease state but also in heterozygous conditions, are less fragile following osmotic stress. Moreover, at least in the beta-thalassemia trait, the higher the severity of the mutation, the more osmotically resistant RBCs are [35], while the irreversibly sickled cells have been linked to lower osmotic fragility in SCD due to their excessive damage [36].

The RDW index was recently suggested to be associated with the interactions of RBCs with vessels [37]. The size of erythrocytes, as indicated by RDW, may contribute to the platelet margination effect by altering the dynamic behavior in the bulk flow [37,38]. Platelets can then interact with adhesive proteins, including von Willebrand factor, aggregate, and become activated. The initiation of the coagulation cascade, supported by the elevated levels of factor VIII, thrombin, and fibrinogen, can then lead to the formation of thrombus, which can be then lysed via fibrinolysis, as indicated by the increased levels of D-dimers. In addition, the higher hemolysis in those with increased anisocytosis can lead to the generation of free heme [39], which can act in a prothrombotic way, as recently presented in detail [40]. Lastly, the increased levels of extracellular vesicles that expose phosphatidylserine on their exterior can also activate the coagulation cascade due to the negatively charged surface that enhances the activation of prothrombin to thrombin [41].

In previous studies, RDW has been closely associated with inflammation markers, like interleukins and C-reactive protein [42]. Accordingly, in the current study, the high-RDW group was associated with a slight increase in some inflammation markers, like leukocyte counts, C-reactive protein, and immunoglobulins. Monocytes, which have been reported to be elevated in SCD and were also increased in the currently presented high-RDW subgroup, are often modulated into inflammatory monocytes [43], which intensifies the production of pro-inflammatory molecules in SCD. Inflammation and the altered macrophages can alter both erythropoiesis and erythrocyte survival, which can lead to a mixed RBC population in circulation, mirrored by RDW [44]. Consequently, the modified inflammatory profile could be attributed to the increased extracellular hemoglobin (which acts as a damage-associated molecular pattern [45]), the high oxidative stress [46], or the activation of hemostasis [47] in the high-anisocytosis group, and its occurrence might positively feedback the observed size heterogeneity in the circulating RBCs [48]. To support this, the increased presence of nucleated RBCs and reticulocytes in the high-RDW group is suggestive of stress erythropoiesis [44].

Our study has several limitations. First of all, the a posteriori stratification used both for L-glutamine and RDW renders our findings essentially descriptive. In fact, and since

the presented study was not designed as a clinical trial, the examined groups were not constructed beforehand but the patients were only studied for a period during which some of them were already under oral L-glutamine consumption, hydroxyurea treatment, or transfusion therapy. In this context, the fact that there are no data regarding the period before the start of L-glutamine consumption limits the potential to better (a) appreciate the effect of glutamine administration and (b) evaluate dose-dependent outcomes. Such information would be of great value for future studies, and especially randomized clinical trials, since it would support the evaluation of the patients' cohorts both before and after supplement administration, instead of reporting a snapshot. However, we strongly believe that, in light of the few studies that focus on L-glutamine in the context of SCD, and especially the less studied group of $\beta^S\beta^+$ compound heterozygotes, the reported data remain valuable and challenging and can give insight into the biochemical and physiological profiles of these patients in relation to food supplement consumption.

5. Conclusions

The present study suggests that glutamine in combination with hydroxyurea has a beneficial effect on $\beta^S\beta^+$ blood parameters, probably due to its implication in enhancing the antioxidant defenses. Moreover, despite the high variability in several parameters, RDW seems to adequately subcategorize patients, with its levels being related to well-known contributors to the disease, such as hemolysis, oxidative stress, inflammation, and coagulation. While it is true that "RDW cannot be regarded as the 'panacea' of the new century", as perfectly stated by Lippi and Plebani [49], it seems to be an informative parameter in heterogeneous conditions such as sickle cell disease.

Author Contributions: Conceptualization, A.G.K.; methodology, H.T.G., S.P.F. and V.L.T.; validation, S.P.F., A.T.A., V.L.T. and A.G.K.; formal analysis, A.G., H.T.G., A.T.A., E.G.P. (Effie G. Papageorgiou) and V.L.T.; investigation, A.G., H.T.G., S.P.F. and E.G.P. (Efthimia G. Pavlou); resources, A.G., E.G.P. (Efthimia G. Pavlou), E.G.N., M.P.D., A.K., A.X. and A.G.K.; writing—original draft preparation, A.G., H.T.G., S.P.F., A.T.A., V.L.T. and A.G.K.; writing—review and editing, E.G.P. (Efthimia G. Pavlou), E.G.N., M.P.D., A.K., A.X., C.F. and E.G.P. (Effie G. Papageorgiou); visualization, A.T.A. and V.L.T.; supervision, C.F., E.G.P. (Effie G. Papageorgiou) and A.G.K.; project administration, A.G.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The "Biomedical Methods and Technology in Diagnosis" graduate program funded part of the consumables used in this research (3/02-12-2022).

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the Research Ethics Committee of the University of West Attica (UniWA) (approval number: 51108/01-07-2021). The research was conducted ethically, with all study procedures being performed in accordance with the requirements of the World Medical Association's Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All data presented in this study are available upon request.

Acknowledgments: The authors would like to thank all patients that voluntarily participated in this study; Marinos Akridas, Sante Plus, Kallithéa, for the kind offer of the glutamine supplement; Maria Sioumala, Stavroula Daskalaki, Areti Giannioti and Maria Liosi for their contribution to blood sampling; and Marianna Antonelou for the help that she offered regarding the immunoblotting experiments. The authors would also like to thank the postgraduate program "Pedagogy through innovative Technologies and Biomedical approaches" for supporting this research. Finally, all authors would like to thank Sophia Delicou, Clinical Hematologist, Thalassemia and Sickle Cell Unit, Expertise Center of Hemoglobinopathies and Their Complications, Hippokrateio General Hospital, for her help and critical comments on this publication.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Li, X.; Dao, M.; Lykotrafitis, G.; Karniadakis, G.E. Biomechanics and biorheology of red blood cells in sickle cell anemia. *J. Biomech.* **2017**, *50*, 34–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rees, D.C.; Williams, T.N.; Gladwin, M.T. Sickle-cell disease. *Lancet* **2010**, *376*, 2018–2031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Driss, A.; Asare, K.O.; Hibbert, J.M.; Gee, B.E.; Adamkiewicz, T.V.; Stiles, J.K. Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. *Genom. Insights* **2009**, *2009*, 23–48. [[CrossRef](#)]
- Alapan, Y.; Matsuyama, Y.; Little, J.A.; Gurkan, U.A. Dynamic deformability of sickle red blood cells in microphysiological flow. *Technology* **2016**, *4*, 71–79. [[CrossRef](#)]
- Knisely, M.R.; Tanabe, P.J.; Walker, J.K.L.; Yang, Q.; Shah, N.R. Severe Persistent Pain and Inflammatory Biomarkers in Sickle Cell Disease: An Exploratory Study. *Biol. Res. Nurs.* **2022**, *24*, 24–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- White, J.; Callaghan, M.U.; Gao, X.; Liu, K.; Zaidi, A.; Tarasev, M.; Hines, P.C. Longitudinal assessment of adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 at steady state and during vaso-occlusive crises in sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **2022**, *196*, 1052–1058. [[CrossRef](#)]
- Sangkokaya, C.; Telen, M.J.; Chi, J.T. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood* **2010**, *116*, 4338–4348. [[CrossRef](#)]
- Gbotosho, O.T.; Kapetanaki, M.G.; Kato, G.J. The Worst Things in Life are Free: The Role of Free Heme in Sickle Cell Disease. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 561917. [[CrossRef](#)]
- Du, M.; Van Ness, S.; Gordeuk, V.; Nouraie, S.; Nekhai, S.; Gladwin, M.; Steinberg, M.H.; Sebastiani, P. Biomarker signatures of sickle cell disease severity. *Blood Cells Mol. Dis.* **2018**, *72*, 1–9. [[CrossRef](#)]
- Tumburu, L.; Ghosh-Choudhary, S.; Seifuddin, F.T.; Barbu, E.A.; Yang, S.; Ahmad, M.M.; Wilkins, L.H.W.; Tunc, I.; Sivakumar, I.; Nichols, J.S.; et al. Circulating mitochondrial DNA is a proinflammatory DAMP in sickle cell disease. *Blood* **2021**, *137*, 3116–3126. [[CrossRef](#)]
- Moriconi, C.; Dzieciatkowska, M.; Roy, M.; D'Alessandro, A.; Roingard, P.; Lee, J.Y.; Gibb, D.R.; Tredicine, M.; McGill, M.A.; Qiu, A.; et al. Retention of functional mitochondria in mature red blood cells from patients with sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **2022**, *198*, 574–586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Esperiti, S.; Nader, E.; Stier, A.; Boisson, C.; Carin, R.; Marano, M.; Robert, M.; Martin, M.; Horand, F.; Cibiel, A.; et al. Increased retention of functional mitochondria in mature sickle red blood cells is associated with increased sickling tendency, hemolysis and oxidative stress. *Haematologica* **2023**, *108*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Serjeant, G.R.; Serjeant, B.E.; Fraser, R.A.; Hambleton, I.R.; Higgs, D.R.; Kulozik, A.E.; Donaldson, A. Hb S-beta-thalassemia: Molecular, hematological and clinical comparisons. *Hemoglobin* **2011**, *35*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Notarangelo, L.D.; Agostini, A.; Casale, M.; Samperi, P.; Arcioni, F.; Gorello, P.; Perrotta, S.; Masera, N.; Barone, A.; Bertoni, E.; et al. HbS/beta+ thalassemia: Really a mild disease? A National survey from the AIEOP Sickle Cell Disease Study Group with genotype-phenotype correlation. *Eur. J. Haematol.* **2020**, *104*, 214–222. [[CrossRef](#)]
- Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [[CrossRef](#)]
- Pavlou, E.G.; Georgatzakou, H.T.; Fortis, S.P.; Tsante, K.A.; Tsantes, A.G.; Nomikou, E.G.; Kapota, A.I.; Petras, D.I.; Venetikou, M.S.; Papageorgiou, E.G.; et al. Coagulation Abnormalities in Renal Pathology of Chronic Kidney Disease: The Interplay between Blood Cells and Soluble Factors. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1309. [[CrossRef](#)]
- McGann, P.T.; Ware, R.E. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. *Expert Opin. Drug Saf.* **2015**, *14*, 1749–1758. [[CrossRef](#)]
- Niihara, Y.; Miller, S.T.; Kanter, J.; Lanzkron, S.; Smith, W.R.; Hsu, L.L.; Gordeuk, V.R.; Viswanathan, K.; Sarmaik, S.; Osunkwo, I.; et al. A Phase 3 Trial of L-Glutamine in Sickle Cell Disease. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 226–235. [[CrossRef](#)]
- Sadaf, A.; Quinn, C.T. L-glutamine for sickle cell disease: Knight or pawn? *Exp. Biol. Med.* **2020**, *245*, 146–154. [[CrossRef](#)]
- Goncalves, R.P. Nitric oxide status in sickle cell anemia. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **2012**, *34*, 255. [[CrossRef](#)]
- Niihara, Y.; Matsui, N.M.; Shen, Y.M.; Akiyama, D.A.; Johnson, C.S.; Sunga, M.A.; Magpayo, J.; Embury, S.H.; Kalra, V.K.; Cho, S.H.; et al. L-glutamine therapy reduces endothelial adhesion of sickle red blood cells to human umbilical vein endothelial cells. *BMC Blood Disord.* **2005**, *5*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhang, W.R.; Sun, M.; Luo, J.K. Serum nitric oxide and D-dimer before and after administering antihypertensive drugs in essential hypertension. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao Hunan Yike Daxue Xuebao Bull. Hunan Med. Univ.* **2003**, *28*, 382–384.
- Pithon-Curi, T.C.; De Melo, M.P.; Curi, R. Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: A comparative study. *Cell Biochem. Funct.* **2004**, *22*, 321–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Liboni, K.C.; Li, N.; Scumpia, P.O.; Neu, J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through IkappaB/NF-kappaB in human fetal and adult intestinal epithelium. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 245–251. [[CrossRef](#)]
- Balandya, E.; Reynolds, T.; Obaro, S.; Makani, J. Alteration of lymphocyte phenotype and function in sickle cell anemia: Implications for vaccine responses. *Am. J. Hematol.* **2016**, *91*, 938–946. [[CrossRef](#)]
- Cherif-Alami, S.; Hau, I.; Arnaud, C.; Kamdem, A.; Coulon, B.; Idoux, E.; Bechet, S.; Creidy, R.; Bernaudin, F.; Epaud, R.; et al. Serum Immunoglobulin Levels in Children with Sickle Cell Disease: A Large Prospective Study. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1688. [[CrossRef](#)]
- Elenga, N.; Loko, G.; Etienne-Julan, M.; Al-Okka, R.; Adel, A.M.; Yassin, M.A. Real-World data on efficacy of L-glutamine in preventing sickle cell disease-related complications in pediatric and adult patients. *Front. Med.* **2022**, *9*, 931925. [[CrossRef](#)]

28. Ballantine, J.D.; Kwon, S.; Liem, R.I. Nucleated Red Blood Cells in Children With Sickle Cell Disease Hospitalized for Pain. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **2019**, *41*, e487–e492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Arkew, M.; Gemechu, K.; Haile, K.; Asmerom, H. Red Blood Cell Distribution Width as Novel Biomarker in Cardiovascular Diseases: A Literature Review. *J. Blood Med.* **2022**, *13*, 413–424. [[CrossRef](#)]
30. Vaya, A.; Alis, R.; Hernandez, J.L.; Calvo, J.; Mico, L.; Romagnoli, M.; Ricarte, J.M. RDW in patients with systemic lupus erythematosus. Influence of anaemia and inflammatory markers. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2013**, *54*, 333–339. [[CrossRef](#)]
31. Huang, D.P.; Ma, R.M.; Xiang, Y.Q. Utility of Red Cell Distribution Width as a Prognostic Factor in Young Breast Cancer Patients. *Medicine* **2016**, *95*, e3430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Thame, M.; Grandison, Y.; Mason, K.; Thompson, M.; Higgs, D.; Morris, J.; Serjeant, B.; Serjeant, G. The red cell distribution width in sickle cell disease—is it of clinical value? *Clin. Lab. Haematol.* **1991**, *13*, 229–237. [[CrossRef](#)]
33. Joosse, H.J.; van Oirschot, B.A.; Kooijmans, S.A.A.; Hoefler, I.E.; van Wijk, R.A.H.; Huisman, A.; van Solinge, W.W.; Haitjema, S. In-vitro and in-silico evidence for oxidative stress as drivers for RDW. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 9223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wang, Q.; Zennadi, R. The Role of RBC Oxidative Stress in Sickle Cell Disease: From the Molecular Basis to Pathologic Implications. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Anastasiadi, A.T.; Tzounakas, V.L.; Dzieciatkowska, M.; Arvaniti, V.Z.; Papageorgiou, E.G.; Papassideri, I.S.; Stamoulis, K.; D'Alessandro, A.; Kriebardis, A.G.; Antonelou, M.H. Innate Variability in Physiological and Omics Aspects of the Beta Thalassemia Trait-Specific Donor Variation Effects. *Front. Physiol.* **2022**, *13*, 907444. [[CrossRef](#)]
36. Figueiredo, M.S.; Zago, M.A. The role of irreversibly sickled cells in reducing the osmotic fragility of red cells in sickle cell anemia. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. Organo La Asoc. Latinoam. Cienc. Fisiol. Y La Asoc. Latinoam. Farmacol.* **1985**, *35*, 49–56.
37. Ananthaseshan, S.; Bojakowski, K.; Sacharczuk, M.; Poznanski, P.; Skiba, D.S.; Prah Wittberg, L.; McKenzie, J.; Szkulmowska, A.; Berg, N.; Andziak, P.; et al. Red blood cell distribution width is associated with increased interactions of blood cells with vascular wall. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 13676. [[CrossRef](#)]
38. Weisel, J.W.; Litvinov, R.I. Red blood cells: The forgotten player in hemostasis and thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **2019**, *17*, 271–282. [[CrossRef](#)]
39. Vallelian, F.; Buehler, P.W.; Schaer, D.J. Hemolysis, free hemoglobin toxicity, and scavenger protein therapeutics. *Blood* **2022**, *140*, 1837–1844. [[CrossRef](#)]
40. Mubeen, S.; Domingo-Fernandez, D.; Diaz Del Ser, S.; Solanki, D.M.; Kodamullil, A.T.; Hofmann-Apitius, M.; Hopp, M.T.; Imhof, D. Exploring the Complex Network of Heme-Triggered Effects on the Blood Coagulation System. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 5975. [[CrossRef](#)]
41. Nader, E.; Garnier, Y.; Connes, P.; Romana, M. Extracellular Vesicles in Sickle Cell Disease: Plasma Concentration, Blood Cell Types Origin Distribution and Biological Properties. *Front. Med.* **2021**, *8*, 728693. [[CrossRef](#)]
42. Lippi, G.; Targher, G.; Montagnana, M.; Salvagno, G.L.; Zoppini, G.; Guidi, G.C. Relation between red blood cell distribution width and inflammatory biomarkers in a large cohort of unselected outpatients. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2009**, *133*, 628–632. [[CrossRef](#)]
43. Liu, Y.; Zhong, H.; Vinchi, F.; Mendelson, A.; Yazdanbakhsh, K. Patrolling monocytes in sickle cell hemolytic conditions. *Transfus. Clin. Biol. J. De La Soc. Fr. De Transfus. Sang.* **2019**, *26*, 128–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sesti-Costa, R.; Costa, F.F.; Conran, N. Role of Macrophages in Sickle Cell Disease Erythrophagocytosis and Erythropoiesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 6333. [[CrossRef](#)]
45. Bozza, M.T.; Jeney, V. Pro-inflammatory Actions of Heme and Other Hemoglobin-Derived DAMPs. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1323. [[CrossRef](#)]
46. Lugrin, J.; Rosenblatt-Velin, N.; Parapanov, R.; Liaudet, L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol. Chem.* **2014**, *395*, 203–230. [[CrossRef](#)]
47. Foley, J.H.; Conway, E.M. Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 1392–1408. [[CrossRef](#)]
48. Paulson, R.F.; Ruan, B.; Hao, S.; Chen, Y. Stress Erythropoiesis is a Key Inflammatory Response. *Cells* **2020**, *9*, 634. [[CrossRef](#)]
49. Lippi, G.; Plebani, M. Red blood cell distribution width (RDW) and human pathology. One size fits all. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2014**, *52*, 1247–1249. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.