



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



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αιμοσυμβατότητα νανοσωματιδίων σχεδιασμένα για φορείς φαρμάκων

POST GRADUATE THESIS

Heamocompatibility of nanoparticles designed for drug carriers



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

ΚΟΣΜΑ ΜΑΡΙΑ-ΑΣΠΑΣΙΑ

KOSMA MARIA-ASPASIA

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ

ANASTASIOS KRIEBARDIS

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024



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



POST GRADUATE THESIS

Heamocompatibility of nanoparticles designed for drug carriers

KOSMA MARIA-ASPASIA

22012

dml22012@uniwa.gr

FIRST SUPERVISOR

ANASTASIOS KRIEBARDIS

SECOND SUPERVISOR

SOTIRIOS FORTIS

AIGALEO 2024

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 01/10/2024

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1 ^{ος} Εξεταστής	ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ	
2 ^{ος} Εξεταστής	ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΦΟΡΤΗΣ	

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κοσμά Μαρία-Ασπασία του Ευσταθίου, με αριθμό μητρώου 22012 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

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

Η Δηλούσα

Κοσμά Μαρία-Ασπασία

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή και πρώτο επιβλέποντα της διπλωματικής μου **κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη** για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ σε αυτό το πρωτοποριακό ερευνητικό εγχείρημα, για τη μεταλαμπάδευση των εργαστηριακών γνώσεων και της νοοτροπίας του ερευνητή καθώς και για τις καίριες επεμβάσεις του στην αντιμετώπιση των εκάστοτε προβλημάτων.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ακαδημαϊκό υπότροφο και μεταδιδακτορικό ερευνητή **κ. Σωτήριο Φόρτη** για την καθοδήγηση που μου προσέφερε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, την εμπειρία του στις πειραματικές τεχνικές, τις εύστοχες παρατηρήσεις του και την ψυχολογική του υποστήριξη.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, η συμμετοχή των οποίων ήταν καταλυτική τις ημέρες μεγάλου φόρτου εργασίας.

Αφιερώσεις

Αφιερώνω την εργασία μου στην οικογένεια μου για τη στήριξη τους κατά τη διάρκεια όλων των φοιτητικών μου χρόνων και για την αγάπη τους που με παρακινεί να ακολουθώ τα όνειρά μου και να εξελίσσομαι.

Περίληψη

Εισαγωγή: Η ραγδαία ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας ενισχύεται με την ευρεία χρήση των νανοσωματιδίων σε όλο και περισσότερες εφαρμογές των βιοϊατρικών επιστημών. Η χρήση των πολυμερικών νανοσωματιδίων συνιστάται για τη μεταφορά θεραπευτικών ουσιών. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκαν πολυμερικά νανοσυστήματα αλγινικού με εγκλωβισμένη ουσία τη χρυσίνη, τα οποία παρασκευάστηκαν με τη συνθετική μέθοδο της ιοντοτροπικής πηκτωμάτωσης. Η χρυσίνη (ChR) ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών και ξεχωρίζει για τις αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές της ιδιότητες. Το βασικό της μειονέκτημα είναι ο χαμηλός βαθμός βιοδιαθεσιμότητας, χαρακτηριστικό που αντισταθμίζεται με τον εγκλωβισμό της στα πολυμερικά νανοσωματίδια αλγινικού. Το αλγινικό (ALG) είναι ένας υδροφιλικός πολυσακχαρίτης, ο οποίος θεωρείται μη τοξικός και διακρίνεται για ιδιότητες όπως η βιοσυμβατότητα, η βιοαποικοδομησιμότητα, η βλεννοσυσκολλητική δράση καθώς και για τη διαδεδομένη χρήση του στις φαρμακευτικές εφαρμογές. Η αλληλεπίδραση των νανοσυστημάτων με τα ερυθρά αιμοσφαίρια, που αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα των κυττάρων του αίματος, μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη δομή, τη μορφολογία, τη λειτουργικότητα και τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Σκοπός: Σκοπός της εργασίας ήταν η αξιολόγηση της αιμοσυμβατότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων έπειτα από την επίδραση των πολυμερικών νανοσυστημάτων αλγινικού με εγκλωβισμένη ουσία τη χρυσίνη (ChR – ALG NPs). Η εξασφάλιση της ελαχιστοποίησης της τοξικής δράσης των συγκεκριμένων νανοσυστημάτων στην κυκλοφορία του αίματος, αποτελεί το βασικό κριτήριο για τη μελλοντική χρήση τους ως φορείς φαρμάκων.

Υλικά και Μέθοδοι: ChR-ALG NPs παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ιοντοτροπικής πηκτωμάτωσης και χαρακτηρίστηκαν με διάφορες αναλυτικές τεχνικές: θερμοσταθμική ανάλυση, φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier, ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης, δυναμική σκέδαση φωτός και ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων. Για τον έλεγχο της αιμοσυμβατότητας, ερυθροκύτταρα από υγιείς αιμοδότες επώαστηκαν στους 37°C υπό ανάδευση με: (α) ChR-ALG NPs, (β) ALG NPs, και (γ) ChR για 4 ώρες. Ερυθροκύτταρα χωρίς επώαση με NPs και ερυθροκύτταρα ύστερα από επώαση με PBS στους 37°C χαρακτηρίστηκαν ως εσωτερικοί μάρτυρες. Μετρήθηκε η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος, η ωσμωτική και μηχανική

ευθραυστότητα, η επιδεκτικότητα σε εξωγενές οξειδωτικό ερέθισμα και η κρυσταλλοποίηση. Ακόμη, μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής τα επίπεδα των ενδοκυττάρων ελεύθερων οξειδωτικών ριζών (iROS) καθώς και η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) και των ενδοκυττάρων κατιόντων iCa^{2+} . Η μορφολογία των ερυθροκυττάρων αξιολογήθηκε με μικροσκοπία. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το SPSS v.27.

Αποτελέσματα: Τα ChR-ALG NPs είχαν μέγεθος $122,7 \pm 7,3$ nm, με καλή διασπορά μεγέθους και ικανοποιητική σταθερότητα σε αιώρημα. Όλα τα NPs προκάλεσαν αιμόλυση (ChR-ALG NPs: $p=0,0020$, ALG NPs: $p=0,0020$ και ChR: $p=0,0156$) των ερυθροκυττάρων και φάνηκε να τα καθιστούν ευθραυστότερα σε οξειδωτικό ερέθισμα (ChR-ALG NPs: $p=0,0078$, ALG NPs: $p=0,0068$ και ChR: $p=0,0195$). Παρουσία ChR τα ερυθροκύτταρα ήταν πιο επιρρεπή στο μηχανικό ερέθισμα ($p=0,0234$) ενώ η ωσμωτική αντίσταση και η κρυσταλλοποίηση δεν επηρεάστηκαν από την παρουσία NPs. Αύξηση του αριθμού των ακανθοκυττάρων παρατηρήθηκε παρουσία ChR-ALG NPs και ALG NPs ($p=0,0085$ και $p=0,0005$ αντίστοιχα). Τα ερυθροκυτταρικά iCa^{2+} και η PS ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα παρουσία όλων των NPs συγκριτικά με τους μάρτυρες ($p < 0,005$). Τέλος η ChR φάνηκε να αυξάνει τα ερυθροκυτταρικά iROS σε σχέση με τους μάρτυρες ($p=0,0067$).

Συζήτηση: Η μελέτη παρέχει νέα γνώση σχετικά με την αιμοσυμβατότητα των ChR-ALG NPs, τονίζοντας τη σημασία της αξιολόγησης πιθανών δυσμενών επιπτώσεων στα ερυθροκύτταρα κατά το σχεδιασμό νανοσωματιδίων για εφαρμογές χορήγησης φαρμάκων. Απαιτούνται πρόσθετες μελέτες για την κατανόηση των πιθανών πλεονεκτημάτων των ChR-ALG NPs για τη βελτιστοποίηση της σύνθεσής τους με βάση την προβλεπόμενη χρήση τους.

Λέξεις Κλειδιά: Πολυμερικά νανοσυστήματα, αλγινικό οξύ, χρυσίνη, εγκλωβισμός, βιοδιαθεσιμότητα, ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοσυμβατότητα, ερυθρόπωση, αιμόλυση.

Abstract

Introduction: The rapid development of nanotechnology has been induced by the use of nanomaterials in a wide range of biomedical applications. Polymeric nanoparticles are considered to be ideal candidates for drug delivery. This research project focuses on the alginate-based nanoparticles loaded with chrysin. They had been manufactured using ionic gelation method. Chrysin (ChR) is a flavone that possesses antioxidant and anticancer properties. However, its limited solubility results in poor bioavailability, an issue that can be resolved by its entrapment in the alginate-based nanoparticles. Alginate (ALG) is a hydrophilic polysaccharide that is non-toxic. This polymer is also biocompatible, biodegradable and presents mucoadhesive properties, among its pharmaceutical applications. The interaction between the nanoparticles and red blood cells could possibly affect the structure, morphology, functionality and viability of the cells.

Purpose: The aim of this study was to evaluate the hemocompatibility of red blood cells after exposure to alginate nanoparticles loaded with chrysin (ChR-ALG NPs). Ensuring hemocompatibility and low levels of toxicity is of utmost significance when developing novel nanoparticles, designed for drug carriers.

Method: ChR – ALG NPs were manufactured using ionic gelation method and were also characterized with different analytical techniques: thermogravimetry, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS) and observative analysis of nanoparticles (NPs). For the hemocompatibility control, RBCs were obtained from healthy volunteers and were incubated at 37° C, under stirring, with the presence of: a) ChR - ALG NPs, b) ALG NPs and c) ChR, for 4 hours. RBCs with no incubation and RBCs with incubation with PBS at 37° C, were used as internal control. The free hemoglobin plasma concentration, osmotic and mechanical fragility, susceptibility to oxidative stress and cryohemolysis were estimated. Therefore, the levels of intracellular reactive oxygen species (iROS) and the percentage of the phosphatidylserine's (PS) and intracellular calcium cations (Ca^{+2}) externalization were measured. Last but not least, the RBCs' morphology was evaluated by microscopy. SPSS v.27 was used for the data analysis.

Results: The size of ChR – ALG NPs was measured at $122,7 \pm 7,3$ nm, with good size distribution and an adequate stability in suspension. All NPs had hemolytic properties (ChR-ALG NPs: $p=0,0078$, ALG NPs: $p=0,0068$ and ChR: $p=0,0195$). RBCs were more sensitive to

oxidative stress ((ChR-ALG NPs: $p=0,0078$, ALG NPs: $p=0,0068$ και ChR: $p=0,0195$) and were also prone to mechanical stress ($p=0,0234$), in the presence of chrysin. Osmotic fragility index and cryohemolysis were not affected by the interaction with NPs. Microscopic observation demonstrated an increased number of acanthocytes after the incubation with ChR – ALG NPs and ALG NPs ($p=0,0085$ και $p=0,0005$ respectively). The levels of intracellular Ca^{+2} and the percentage of PS externalization were statically higher than the controls ($p<0,005$). Last but not least, chrysin was found able to increase the iROS levels, compared to controls ($p=0,0067$).

Discussion: The study provides valuable insights into the hemocompatibility of the ChR – ALG NPs, emphasizing on the consequences of their interaction with blood cells. The polymeric nanoparticles' behavior in blood circulation should be more investigated, so that they can be widely used as drug carriers.

Key words: Polymeric nanoparticles, alginate, chrysin, entrapment, bioavailability, RBCs, hemocompatibility, eryptosis, hemolysis.

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	iv
Ευχαριστίες.....	v
Αφιερώσεις.....	vi
Περίληψη.....	vii
Abstract	ix
Συνοτομογραφίες.....	xiii
Πρόλογος.....	1
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή Μέρος 1 ^ο : Παθοφυσιολογία Ερυθροκυττάρου	3
1.1. Κύτταρα του αίματος.....	3
1.2. Ερυθροκύτταρα	3
1.2.1. Μορφολογία και λειτουργικότητα των ερυθροκυττάρων.....	5
1.3. Ερυθροκυτταρική μεμβράνη	7
1.3.1. Πρωτεϊνική σύσταση ερυθροκυτταρικής μεμβράνης	7
1.3.2. Λιπιδική σύσταση ερυθροκυτταρικής μεμβράνης	15
1.4. Μεταβολισμός ερυθροκυττάρου.....	17
1.4.1. Μεταβολισμός οξειδωτικών ριζών.....	17
1.5. Μηχανισμοί ερυθροκυτταρικής γήρανσης	21
1.5.1. Εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS).....	22
1.5.2. Μονοπάτι γήρανσης συσχετιζόμενο με την πρωτεΐνη CD47	22
1.5.3. Μονοπάτι γήρανσης συσχετιζόμενο με τη ζώνη 3	23
1.6. Ερυθρόπτωση	24
Κεφάλαιο 2. Εισαγωγή Μέρος 2 ^ο : Νανοτεχνολογία	27
2.1. Νανοδομημένα ως φορείς φαρμάκων.....	27
2.2. Ταξινόμηση νανοσωματιδίων.....	28
2.3. Πολυμερικά νανοσωματίδια.....	29
2.3.1. Σύνθεση.....	29
2.3.2. Χαρακτηρισμός.....	32
2.4. Πολυμερικά Νανοδομημένα Αλγινικού-Χρυσίνης.....	35
2.4.1. Αλγινικό οξύ.....	35
2.4.2. Χρυσίνη (5,7 υδροξυ-φλαβόνη).....	38
2.5. Νανοδομημένα και Αιμοσυμβατότητα.....	41
2.5.1. Νανοδομημένα και Αιμόλυση.....	42

2.5.2. Νανοσυστήματα και Ερυθρόπτωση	44
Κεφάλαιο 3. Υλικά και Μέθοδοι	46
3.1. Σκοπός της ερευνητικής μελέτης	46
3.2. Υλικά και Αντιδραστήρια	46
3.2.1. Αναλώσιμα.....	46
3.2.2. Όργανα, Συσκευές και Αναλυτές.....	47
3.3.3. Χημικά Αντιδραστήρια και αντισώματα	47
3.3. Συλλογή, προετοιμασία και ανάλυση δειγμάτων	48
3.3.1. Αιμολυτικές παράμετροι.....	49
3.2. Ενδοκυττάρια Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου (ROS).....	51
3.3. Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης	51
3.4. Εξωτερίκευση ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου Ca^{+2}	52
3.5. Χρώση May-Grünwald-Giemsa και Μικροσκοπική Παρατήρηση των κυττάρων	52
3.5. Γενική αίματος	53
Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα	53
4.1. Αιματολογική εικόνα.....	54
4.2. Μορφολογία ερυθροκυττάρων	58
4.3. Ενδοκυττάρια ελεύθερες ρίζες οξυγόνου	60
4.4. Εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης.....	62
4.4. Εξωτερίκευση ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου Ca^{+2}	64
4.5. Αιμόλυση.....	66
4.5.1. Ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος.....	66
4.5.2. Οξειδωτική Αιμόλυση	67
4.5.3. Μηχανικά επαγόμενη αιμόλυση	68
4.5.4. Οσμωτική αιμόλυση και Ποσοστό Κρυσταλλοποίησης	69
Κεφάλαιο 5. Συζήτηση - Συμπεράσματα.....	71
5.1. Συζήτηση	71
5.2. Συμπεράσματα	72
Συγκεντρωτικός πίνακας εικόνων	74
Συγκεντρωτικός πίνακας πινάκων.....	78
Συγκεντρωτικός πίνακας γραφημάτων	79
Βιβλιογραφία.....	81

Συντομογραφίες

Συντομογραφία	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
NPs	Nanoparticles	Νανοσωματίδια
ALG	Alginate	Αλγινικό
ChR	Chrysin	Χρυσίνη
RBCs	Red Blood Cells	Ερυθροκύτταρα
Hct	Hematocrit	Αιματοκρίτης
MCF	Mean Corpuscular Fragility	Δείκτης Ωσμωτικής Ευθραυστότητας
MFI	Mechanical Fragility Index	Δείκτης Μηχανικής Ευθραυστότητας
iROS	Intracellular Reactive Oxygen Species	Ενδοκυττάρειες Ρίζες Οξυγόνου
PS	Phosphatidylserine	Φωσφατιδυλοσερίνη
IL	Interleukin	Ιντερλευκίνη
TNF	Tumor Necrosis Factor	Νεκρωτικός Παράγοντας Όγκου
PBS	Phosphate Buffer Saline	Αλατούχο Φωσφορικό Ρυθμιστικό Διάλυμα
GLUT1	Glucose Transporter 1	Μεταφορέας Γλυκόζης 1
AQP1	Aquaporin 1	Υδατοπορίνη 1
ATP	Adenosine Triphosphate	Τριφωσφορική Αδενοσίνη
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) + Hydrogen (H)	Φωσφορικό νικοτιναμίδο-αδενινοδινουκλεοτίδιο
2,3 DPG	2,3 - diphosphoglycerate	2,3 – διφωσφωγλυκερικό οξύ
RNS	Reactive nitrogen species	Δραστικές μορφές αζώτου
GSH	Glutathione	Γλουταθειόνη
Gpx	Glutathione Peroxidase	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
Prx	Peroxidoxine	Υπεροξειδοξίνη
Prx2	Peroxidoxine 2	Υπεροξειδοξίνη 2
SOD	Superoxide dismutase	Δισμουτάση Υπεροξειδίου

TSP-1

Thrombospondin 1

Θρομβοσπονδίνη 1

SIRP-a

Signal Regulatory Protein-a

Ρυθμιστική πρωτεΐνη σηματοδότησης-α

Πρόλογος

Η παρούσα ερευνητική προσέγγιση στοχεύει στον έλεγχο αιμοσυμβατότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων έπειτα από την έκθεσή τους σε πολυμερικά νανοσυστήματα αλγινικού με εγκλωβισμένη ουσία την χρυσίνη, σχεδιασμένα για δυνητική χρήση ως φορείς φαρμάκων. Τα πολυμερικά αυτά νανοσωματίδια παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της ιονοτροπικής ηλεκτροπηξίας. Μελετήθηκε ο βαθμός τοξικότητας τους και ο τρόπος με τον οποίο επιδρούν στα ερυθρά αιμοσφαίρια, έπειτα από την επώασή τους, στους 37° C. Με τον τρόπο αυτό προσεγγίστηκε πειραματικά η συμπεριφορά τους στην κυκλοφορία του αίματος με απώτερο σκοπό τον έλεγχο αιμοσυμβατότητάς τους.

Η Διπλωματική Εργασία αποτελείται από τέσσερα διακριτά μέρη. Στο πρώτο μέρος γίνεται αρχικά μια εισαγωγή στα στερεά πολυμερικά νανοσωματίδια και συγκεκριμένα στα νανοσωματίδια αλγινικού που έχουν εγκλωβίσει τον θεραπευτικό παράγοντα χρυσίνη. Ιδιαίτερα έμφαση δίνεται στις ιδιότητες εκείνες που τα καθιστούν ιδανικά για φορείς φαρμάκων, όπως είναι η βιοσυμβατότητα, βιοαποικοδομησιμότητα και σημαντικά ελεγχόμενα χαρακτηριστικά, όπως το σχήμα, το μέγεθος και το φορτίο της μεμβράνης. Ακόμη γίνεται αναφορά στα βασικά κύτταρα του αίματος με επίκεντρο τα ερυθρά αιμοσφαίρια καθώς και τα βασικά δομικά και λειτουργικά τους χαρακτηριστικά, τα οποία είναι πιθανό να επηρεαστούν από την επίδραση των προαναφερθέντων νανοσωματιδίων.

Στο δεύτερο μέρος παρουσιάζονται τα υλικά, οι μέθοδοι και οι πειραματικές τεχνικές που πραγματοποιήθηκαν με στόχο τον έλεγχο της τοξικότητας των νανοσωματιδίων και την επίδρασή τους στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η μελέτη της συμπεριφοράς των νανοσωματιδίων, έγινε με τη χρήση τεσσάρων διαφορετικών διαλυμάτων με σκοπό να συγκριθεί το νανοςύστημα με την εγκλωβισμένη ουσία (διάλυμα 1, NP1: ChR – Alg NPs), το νανοςύστημα μόνο του (διάλυμα 2, NP2: Alg NPs) καθώς και η εγκλωβισμένη ένωση διαλυμένη σε PBS (διάλυμα 3, NP3: ChR). Τα ερυθροκύτταρα χωρίς να επωαστούν και τα ερυθροκύτταρα με την προσθήκη ισότονου διαλύματος (PBS), στους 37°, αποτέλεσαν τους μάρτυρες των πειραμάτων. Τα δείγματα επώαστηκαν σε συγκεκριμένη συγκέντρωση με τα αντίστοιχα διαλύματα, για 4 ώρες στους 37° C. Μετά το πέρας της επώασης υπολογίστηκαν το ποσοστό της αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων με τη μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος και ο δείκτης ωσμωτικής ευθραυστότητας (MCF, Mean Corpuscular Fragility Test) μέσω της έκθεσης των

ερυθροκυττάρων σε υποτονικές συγκεντρώσεις NaCl. Υπολογίστηκε επίσης το ποσοστό της οξειδωτικής αιμόλυσης και ο δείκτης της μηχανικής καταπόνησης των ερυθροκυττάρων (MFI, Mechanical Fragility Index). Ακόμη πραγματοποιήθηκε η μέτρηση των ενδοκυττάρων οξειδωτικών ριζών (iROS) καθώς και το ποσοστό εξωτερίκευσης της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) και των ενδοκυττάρων κατιόντων Ca^{+2} με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής. Οι πειραματικές αυτές διαδικασίες συνοδεύτηκαν από τη μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων μετά την επώαση, έπειτα από τη δημιουργία επιχρισμάτων και τη χρώση τους με τη βασική αιματολογική χρώση May-Grunwald Giemsa. Τέλος έλαβε χώρα, πριν και μετά την επώαση, μια γενική ανάλυση αίματος των δειγμάτων με σκοπό την απόκτηση του πλήρους αιματολογικού τους προφίλ (RBCs, MCV, RDW κ.α.).

Το τρίτο μέρος της εργασίας αφορά στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων έπειτα από τη στατιστική τους ανάλυση και το τελευταίο μέρος περιλαμβάνει την αξιολόγησή τους και τη διεξαγωγή συμπεράσματος. Η κατακλείδα της ερευνητικής μελέτης εστιάζει στην πιθανότητα μελλοντικής χρήσης των πολυμερικών αυτών νανοσυστημάτων ως φορείς φαρμάκων και προτείνει τη συνδυαστική τους δράση με άλλα εξίσου αποτελεσματικά νανοσωματίδια με απώτερο σκοπό την αντιμετώπιση σοβαρών αιματολογικών παθήσεων.

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή Μέρος 1^ο: Παθοφυσιολογία Ερυθροκυττάρου

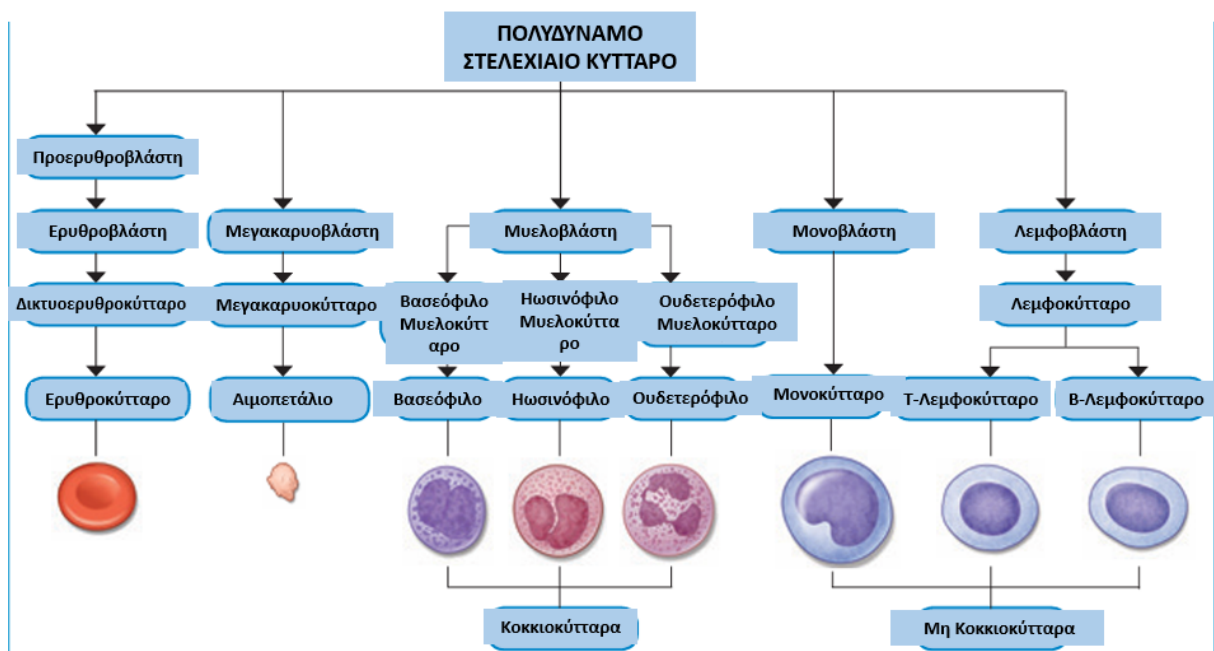
1.1. Κύτταρα του αίματος

Το αίμα αποτελεί ένα σημαντικό συνδετικό ιστό του ανθρώπινου οργανισμού και περιέχει δύο βασικά συστατικά, το πλάσμα και τα κύτταρα του αίματος. Το πλάσμα είναι ένα διαυγές υγρό το οποίο καλύπτει το 55% του συνολικού όγκου του αίματος. Συνίσταται στο μεγαλύτερο μέρος του από νερό (91,5%), ενώ το υπόλοιπο απαρτίζεται, κατά κύριο λόγο από πρωτεΐνες, βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Σε αυτό εναιωρούνται τα κύτταρα του αίματος (45% του συνολικού όγκου του), τα οποία διακρίνονται σε ερυθρά αιμοσφαίρια (Red Blood Cells, RBCs), λευκά αιμοσφαίρια (White Blood Cells, WBCs) και αιμοπετάλια (Platelets, PLTs). Τα ερυθροκύτταρα αποτελούν την πολυπληθέστερη κατηγορία κυττάρων του αίματος και είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά οξυγόνου στους διάφορους. Στα λευκοκύτταρα περιλαμβάνονται τα κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα, βασεόφιλα και ηωσινόφιλα), τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα (B-Λεμφοκύτταρα, T-λεμφοκύτταρα και κύτταρα «Φυσιικοί Φονείς»). Τα κύτταρα αυτά συμμετέχουν ενεργά στην άμυνα του οργανισμού έναντι οποιουδήποτε ξενιστή. Τέλος τα αιμοπετάλια είναι θραύσματα μεγαλύτερων κυττάρων και διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στην αιμόσταση (Farley et al., 2012).

1.2. Ερυθροκύτταρα

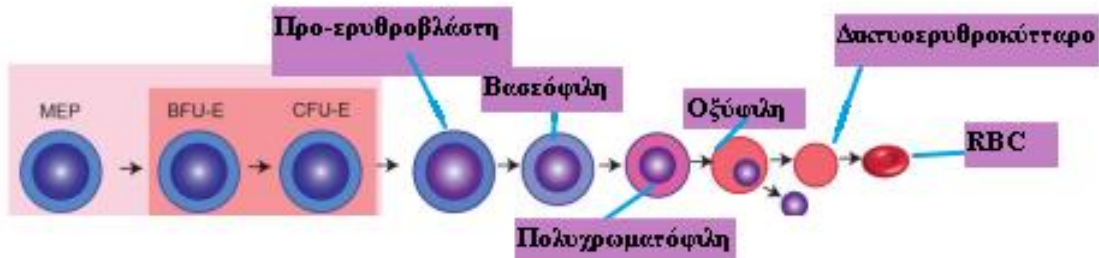
Η παραγωγή των κυττάρων του αίματος πραγματοποιείται στο μυελό των οστών μέσω αλληπάλληλων πολλαπλασιασμών και διαφοροποιήσεων των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, με σκοπό τα κύτταρα να αποκτήσουν την τελική ώριμη μορφή τους (Dzierzak & Philipsen, 2013). Υπάρχουν δύο διαφορετικές οδοί διαφοροποίησης, η μυελοειδής σειρά και η λεμφική σειρά. Στην πρώτη ανήκουν η ερυθρά σειρά, από την οποία προκύπτουν τελικά τα ώριμα ερυθροκύτταρα, η κοκκιοκυτταρική από την οποία παράγονται τα κοκκιοκύτταρα και η μεγακαρυοκυτταρική που είναι η σειρά προέλευσης των αιμοπεταλίων. Η λεμφική σειρά είναι υπεύθυνη για την ωρίμανση και τελική διαφοροποίηση των λευκοκυττάρων (Dzierzak & Philipsen, 2013; Farley et al., 2012).

Η προέλευση και η εξελικτική πορεία των κυττάρων του αίματος παρουσιάζονται αναλυτικά στην **Εικόνα 1**. Συγκεκριμένα, η μορφολογική διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων (**Εικόνα 2**) ξεκινάει από την πρώιμη μορφή της προερυθροβλάστης και στηρίζεται στη σταδιακή ελάττωση του μεγέθους τους, στη μείωση της ποσότητας του ενδοκυττάριου RNA και στη συστηματική αύξηση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης (Farley et al., 2012). Έτσι η προερυθροβλάστη κατέχει το μεγαλύτερο μέγεθος και κατά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή της εξελίσσεται στη μορφή της βασεόφιλης ερυθροβλάστης, με μικρότερο μέγεθος και πυκνότερη πυρηνική σύσταση. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αποκτούν τις μορφές της πολυχρωματόφιλης και οξύφιλης ερυθροβλάστης, οι οποίες χαρακτηρίζονται από οξύφιλο κυτταρόπλασμα και ενισχυμένη την παρουσία της αιμοσφαιρίνης. Ακολούθως αποβάλλεται ο πυρήνας και τα κύτταρα έχουν πλέον τη μορφή του δικτυοερυθροκυττάρου, μορφή στην οποία ο πυρήνας συσσωρεύεται σαν δίκτυο. Με την τελική απομάκρυνση των ριβοσωμάτων και των μιτοχονδρίων, οργανιδίων που είναι υπεύθυνα για την πρωτεϊνσύνθεση της αιμοσφαιρίνης, η ίδια αποκτά την τελική της θέση περιμετρικά του κυττάρου και έτσι προκύπτει η ώριμη μορφή του ερυθροκυττάρου (Nandakumar et al., 2016; Pretini et al., 2019).



Εικόνα 1: Οδοί διαφοροποίησης των πολυδύναμων στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων. Στην εικόνα αποτυπώνεται η μορφολογική εξελικτική πορεία από τις άωρες βλάστες στα βασικά ώριμα

κύτταρα του αίματος (ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια, κοκκιοκύτταρα, μη κοκκιοκύτταρα) (Ανατύπωση από Farley et al., 2012).



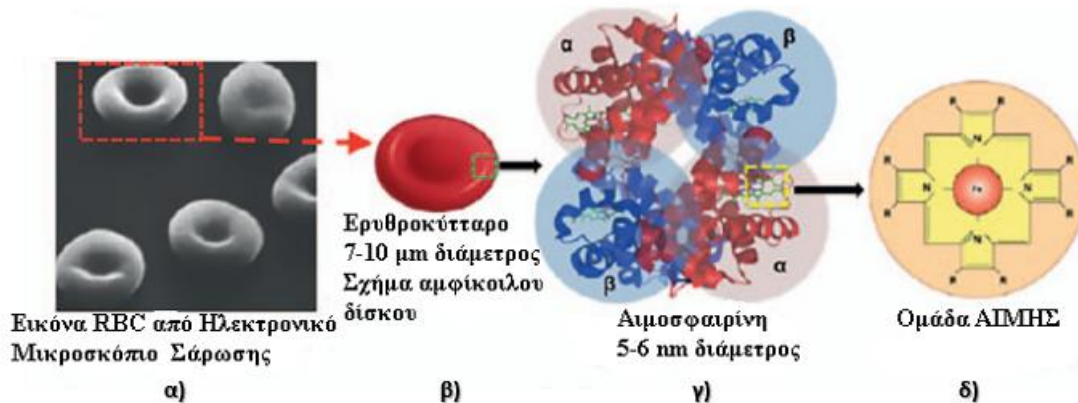
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της κυτταρικής διαφοροποίησης της ερυθράς σειράς. Από τις αποικίες των ομοειδών θυγατρικών κυττάρων και με συνεχή πολλαπλασιασμό, προκύπτει η τελική ώριμη μορφή του ερυθροκυττάρου (Ανατύπωση από Nandakumar et al., 2016).

1.2.1. Μορφολογία και λειτουργικότητα των ερυθροκυττάρων

Τα ερυθροκύτταρα (RBCs) αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα κυττάρων που συναντάται στην κυκλοφορία του αίματος (Pretini et al., 2019). Στους άνδρες έχει υπολογισθεί ότι ο αριθμός τους ανέρχεται στα $4,7 - 6,1 \times 10^6$ RBCs, ενώ στις γυναίκες στα $4,2 - 5,4 \times 10^6$ RBCs (Dzierzak & Philipsen, 2013). Η επιβίωσή τους στην κυκλοφορία του αίματος διαρκεί συνολικά 120 μέρες ενώ κάθε δευτερόλεπτο παράγονται και εντοπίζονται στην κυκλοφορία δύο εκατομμύρια ερυθροκύτταρα. Ο μεγάλος ρυθμός παραγωγής τους συνοδεύεται και από τον αντίστοιχο αποπτωτικό ρυθμό. Η έλλειψη πυρήνα και βασικών λειτουργικών οργανιδίων επηρεάζει τη συνολική λειτουργικότητα του κυττάρου (Pretini et al., 2019).

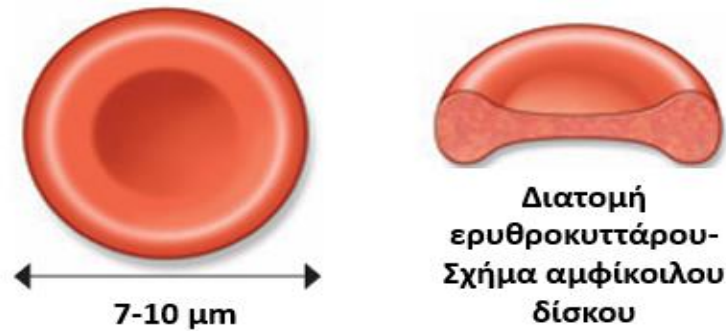
Ο πρωταρχικός τους ρόλος είναι η δέσμευση του οξυγόνου (O_2) και η μεταφορά του από τους πνεύμονες στους διάφορους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού (Bryk & Wiśniewski, 2017). Η λειτουργία του αυτή επιτυγχάνεται μέσω της αιμοσφαιρίνης, βασικό συστατικό του ερυθροκυττάρου που κατανέμεται περιμετρικά του. Το μόριο της αιμοσφαιρίνης αποτελείται από τέσσερις διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες καθεμία από τις οποίες είναι συνδεδεμένη με μία ομάδα αίμης, η οποία με τη σειρά της δεσμεύει ένα μόριο O_2 (**Εικόνα 3**). Έτσι τα ερυθροκύτταρα καλύπτουν τις ανάγκες των ιστών για

οξυγόνο και συμβάλλουν θετικά σε συνθήκες χαμηλής οξυγόνωσης, όπως η ιστική υποξία (Sen Gupta, 2019). Ακόμη η συνεισφορά των RBCs στη ρύθμιση της αναπνοής εντοπίζεται στη μεταφορά του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) από τους περιφερικούς ιστούς στους πνεύμονες (Pretini et al., 2019).



Εικόνα 3: Η εσωτερική διαμόρφωση και το χαρακτηριστικό σχήμα του ερυθροκυττάρου. Στην υποεικόνα α) παρουσιάζεται το ερυθροκύτταρο όπως φαίνεται σε ένα Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης, στη β) το γνωστό σχήμα του αμφίκιουλου δίσκου, στη γ) η πολύπλοκη δομή της τετραμερούς αιμοσφαιρίνης και στη δ) η χημική δομή της αίμης (Ανατύπωση από Sen Gupta, 2019).

Τα ερυθροκύτταρα έχουν ένα χαρακτηριστικό σχήμα αμφίκιουλου δίσκου και διάμετρο 7-10 μm (**Εικόνα 4**). Το διακριτό τους αυτό σχήμα και η μεγάλη τους επιφάνεια συμβάλλει ενεργά στην επιτυχημένη ανταλλαγή αερίων (Farley et al., 2012; Pretini et al., 2019). Το αμφίκιλο σχήμα και η περιμετρική κατανομή της αιμοσφαιρίνης είναι αποτελέσματα της τελικής ωρίμανσης των RBCs. Συγκεκριμένα, όταν τα δικτυοερυθροκύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, χάνουν το 20% της πλασματικής τους μεμβράνης, τα ριβοσώματα και τα μιτοχόνδρια. Με τον τρόπο αυτό τερματίζεται η παραγωγή της αιμοσφαιρίνης, η ίδια καταλαμβάνει τη θέση της στο κύτταρο και παράγονται τα ώριμα πλέον ερυθροκύτταρα. Τα RBCs διαθέτουν υψηλό βαθμό ελαστικότητας και παραμορφωσιμότητας και έτσι διαπερνούν τα τριχοειδή, τα οποία έχουν πολύ μικρότερη διάμετρο. Στα χαρακτηριστικά τους αυτά διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο μια σημαντική κυτταρική δομή, η ερυθροκυτταρική μεμβράνη (Gurkan, 2021).



Εικόνα 4: Διατομή ενός ερυθρού αιμοσφαιρίου και επισήμανση της διαμέτρου του (Ανατύπωση από Farley et al., 2012).

1.3. Ερυθροκυτταρική μεμβράνη

Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι μια συμπαγής δομή που αποτελείται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα στην οποία βρίσκονται ενσωματωμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και στηρίζεται υπομεμβρανικά από ένα δισδιάστατο δίκτυο σκελετικών πρωτεϊνών. Το δίκτυο αυτό είναι γνωστό ως σύμπλεγμα 4.1 R ή αλλιώς κυτταροσκελετός σπεκτρίνης – ακτίνης και συμβάλλει ενεργά στη δομική σταθερότητα και ακεραιότητα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Pretini et al., 2019). Τα χαρακτηριστικά αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του σχήματος του ερυθροκυττάρου και διασφαλίζουν την επιβίωση και την προσαρμοστικότητα του κατά την κυκλοφορία του στον ανθρώπινο οργανισμό (Lux, 2016; Nandakumar et al., 2016). Συμπερασματικά, η ερυθροκυτταρική μεμβράνη προσδίδει στο κύτταρο αντοχή, ευελιξία και ανθεκτικότητα λόγω της μοναδικής πρωτεϊνικής και λιπιδικής της σύστασης (Mohandas & Gallagher, 2008; Pretini et al., 2019).

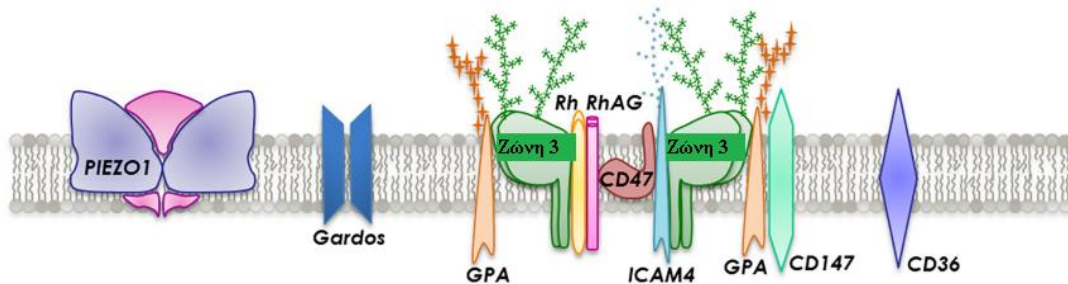
1.3.1. Πρωτεϊνική σύσταση ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

Οι πρωτεΐνες που στελεχώνουν την ερυθροκυτταρική μεμβράνη χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τις διαμεμβρανικές, τις περιφερειακές ή σκελετικές και τις μεμβρανικές. Οι διαμεμβρανικές έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τη διπλοστιβάδα λιπιδίων και να αλληλοεπιδρούν με τον υδρόφιλο λιπιδικό πυρήνα. Οι περιφερειακές πρωτεΐνες σχηματίζουν τον κυτταροσκελετό και έρχονται σε επαφή με μεμβρανικές πρωτεΐνες και λιπίδια. Τέλος οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι αυτές που συνδέονται αποκλειστικά με τη

μεμβράνη (Mohandas & Gallagher, 2008; Pretini et al., 2019). Ακολούθως παρατίθενται οι σημαντικότερες πρωτεΐνες της κάθε κατηγορίας.

1.3.1.a. Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες

Πρόκειται για μια ομάδα πρωτεϊνών με πολλαπλές λειτουργίες οι οποίες συνοψίζονται στη μεταφορά, την προσκόλληση του κυττάρου σε γειτονικά κύτταρα, την κατάλυση αντιδράσεων και την υποδοχή ερεθισμάτων (Pretini et al., 2019). Στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς ανήκουν η ζώνη 3 ή διάυλος ανταλλαγής ανιόντων, η υδατοπορίνη 1 (AQP1), ο μεταφορέας της γλυκόζης (GLUT1), το κανάλι κατιόντων PIEZO 1, η πρωτεΐνη CD47, τα κανάλια Gardos, τα αντιγόνα Kidd, η γλυκοπρωτεΐνη του αντιγόνου Rhesus, οι γλυκοφορίνες A,B,C,D, το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης 4 (ICAM-4) κ.α. (Εικόνα 5). Αξίζει να αναφερθεί, ότι έχουν αναγνωρισθεί περισσότερες από 50 διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι περισσότερες εκ των οποίων συγκαταλέγονται στα αντιγόνα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Mohandas & Gallagher, 2008).



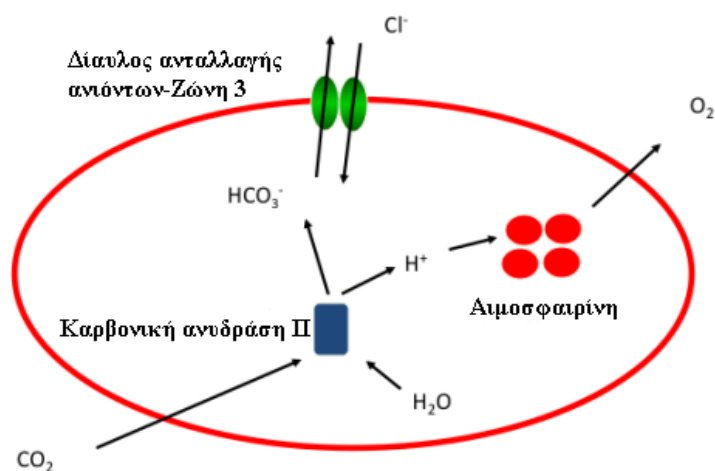
Εικόνα 5: Πρωτεϊνική σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης με επίκεντρο της βασικότερες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Ανατύπωση από Pretini et al., 2019).

Ζώνη 3 ή διάυλος ανταλλαγής ανιόντων

Η πρωτεΐνη ζώνη 3 (band 3) ή ανιοντοανταλλάκτης 1 (AE1) είναι μία βασική διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, η οποία εντάσσεται στην οικογένεια των διπτανθρακικών μεταφορέων πρωτεϊνών ανταλλαγής ανιόντων (SLC4A1). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 100 kDa που αποτελείται από 911 αμινοξέα και κωδικοποιείται από το γονίδιο *SLC4A1*. Αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές: α) ένα αμινοτελικό κυτοσολικό άκρο, β) ένα καρβοξυλικό κυτοσολικό άκρο και γ) μία διαμεμβρανική περιοχή διαπέρασης της μεμβράνης (12-14 φορές) (Reithmeier et al., 2016). Η δομική της κατανομή, επιτρέπει

στη ζώνη-3 να δημιουργεί σύμπλοκα και να συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες της μεμβράνης, όπως οι γλυκοφορίνες A και B, τα αντιγόνα Rhesus, το μεταφορέα GLUT1 και τη στοματίνη. Ακόμη συνδέεται και με τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, συγκεκριμένα με τη σπεκτρίνη μέσω της αγκυρίνης και της πρωτεΐνης 4,2 R και με την ακτίνη μέσω των πρωτεϊνών 4,1 R, 4,2 R, p55 και αδουσίνη (Lux, 2016).

Ο πρωταρχικός ρόλος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης εντοπίζεται στην ανταλλαγή αερίων μέσω της ανταλλαγής ανιόντων Cl^- με τα διττανθρακικά ιόντα, ως προϊόντα μεταβολισμού του διοξειδίου του άνθρακα (Εικόνα 6). Η μετατροπή του CO_2 σε διττανθρακικά ιόντα και πρωτόνια επιτυγχάνεται με τη δράση της καρβονικής ανυδράσης II (Reithmeier et al., 2016) Όπως ήδη αναφέρθηκε, η ζώνη 3 δημιουργεί σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες της μεμβράνης, εξασφαλίζοντας με αυτό τον τρόπο τη δομική ακεραιότητα και σταθερότητα του κυττάρου (van den Akker et al., 2010). Η ζώνη 3 συμμετέχει ενεργά τόσο στη ρύθμιση του μεταβολισμού όσο και τον προγραμματισμένο θάνατο των RBCs, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια.

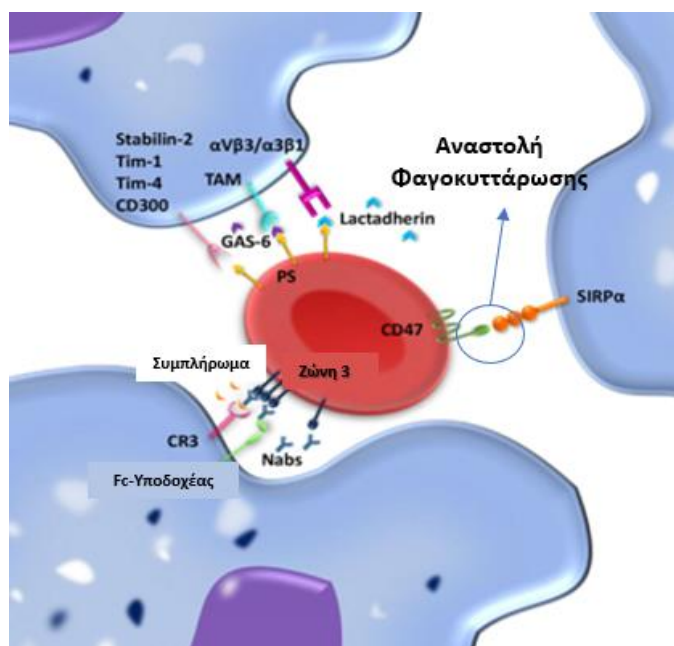


Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της βασικής ανιοντοανταλλακτικής λειτουργίας της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης Ζώνης 3 (Ανατύπωση από Reithmeier et al., 2016).

CD47

Πρόκειται για μια πρωτεΐνη αναγνώρισης εαυτού των ερυθροκυττάρων, η οποία ανήκει στην οικογένεια των γλυκοπρωτεϊνών και εμφανίζει μεγάλο βαθμό συνάφειας με τη θρομβοσπονδίνη (TSP) και την πρωτεΐνη ρύθμισης σήματος α (SIRPa) (Lutz & Bogdanova,

2013). Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν συστατικά της μεμβράνης των μακροφάγων, έτσι η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης CD47 με την SIRPα οδηγεί στην αναστολή της φαγοκυττάρωσης (**Εικόνα 7**) (Klei et al., 2017a) Η έλλειψη της πρωτεΐνης CD47 έχει ως αποτέλεσμα τον αυξημένο ρυθμό καταστροφής των ερυθροκυττάρων από το σπλήνα. Η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στη μεμβράνη, επηρεάζεται άμεσα σε συνθήκες έντονου οξειδωτικού στρες (Burger et al., 2012).

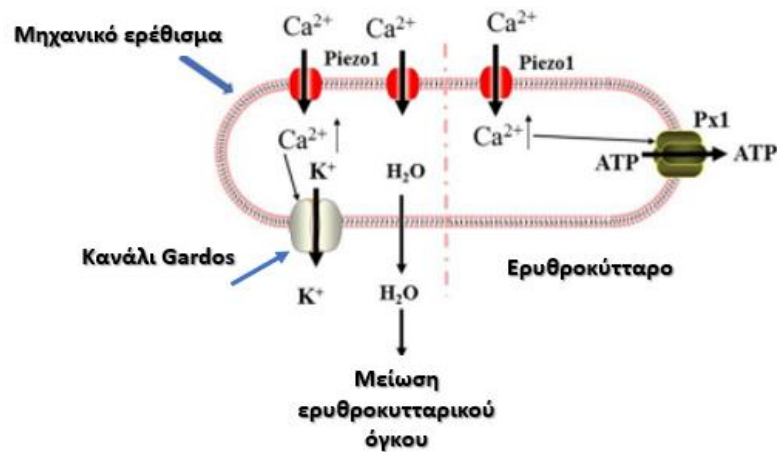


Εικόνα 7: Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των ερυθροκυττάρων με τα μακροφάγα. Η σύνδεση της πρωτεΐνης CD47 με την SIRPα σηματοδοτεί την αναστολή της φαγοκυττάρωσης (Ανατύπωση από Klei et al., 2017).

PIEZO 1 και Κανάλια Gardos

Ακόμη ένα σημαντικό συστατικό της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης είναι το κανάλι κατιόντων PIEZO 1. Πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 2.500 αμινοξέων που κωδικοποιείται από το γονίδιο PIEZO 1. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη ανταποκρίνεται με ευαισθησία στο μηχανικό στρες και λειτουργεί ως ρυθμιστής του όγκου του ερυθροκυττάρου (Svetina et al., 2019). Πιο αναλυτικά, ο μηχανισμός του ενεργοποιείται με την επίδραση κάποιου μηχανικού ερεθίσματος και συνοδεύεται από την αυξημένη συγκέντρωση ενδοκυττάρων κατιόντων Ca^{+2} καθώς και την ενισχυμένη εκροή ιόντων K^{+}

(Εικόνα 8)(Fang et al., 2021) . Η αυξημένη παραγωγή των ενδοκυττάρων Ca^{2+} οδηγεί στην ενεργοποίηση των καναλιών Gardos, τα οποία με τη σειρά τους έχουν την ικανότητα να απομακρύνουν την περίσσεια των κατιόντων καλίου και των μορίων νερού(Cahalan et al., 2015). Επομένως οι δράσεις των καναλιών PIEZO 1 και Gardos είναι αλληλοεξαρτώμενες(Pretini et al., 2019).



Εικόνα 8: Ο ρυθμιστικός μηχανισμός των καναλιών Piezo 1 στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη (Ανατύπωση από Fang et al., 2021).

Λοιπές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες

Στον ακόλουθο πίνακα (**Πίνακας 1**) είναι συγκεντρωμένες οι υπόλοιπες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργικότητα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, καθώς και οι βασικές τους ιδιότητες (Benga, 2012; Pretini et al., 2019).

Πίνακας 1: Πίνακας καταγραφής σημαντικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και των αντίστοιχων λειτουργιών τους.

<u>Πρωτεΐνες</u>	<u>Λειτουργία</u>
Υδατοπορίνη-1 (AQP1)	Ωσμωτική ή διαχυτική μεταφορά μορίων H_2O , μεταβολισμός και μεταφορά CO_2 .
Γλυκοφορίνες	Αρνητικό φορτίο ερυθροκυτταρικής επιφάνειας.

Μεταφορέας γλυκόζης (Glut 1)	Παθητική διάχυση μορίων γλυκόζης, ενίσχυση αντιοξειδωτικού δυναμικού, συνάφεια μεμβράνης-κυτταροσκελετού
Αντλία Na⁺/K⁺	Ισορροπία ενδοκυττάριου εξωκυττάριου χώρου, διατήρηση ηλεκτροχημικής αναλογίας ιόντων K ⁺ /Na ⁺
Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης (ICAM 4)	Συμμετοχή στις διαδικασίες αιμόστασης και θρόμβωσης

1.3.1.β. Πρωτεΐνες Κυτταροσκελετού

Ο κυτταροσκελετός αποτελεί ένα βασικό υπομεμβρανικό δομικό στοιχείο του ερυθροκυττάρου. Το κυριότερό του συστατικό είναι η σκελετική πρωτεΐνη **σπεκτρίνη**. Ο υπομεμβρανικός αυτός σκελετός εντοπίζεται στο εσωτερικό τμήμα της μεμβράνης και σχηματίζει ένα ψευδοεξαγωνικό δισδιάστατο δίκτυο, καθώς συνδέεται με πρωτεϊνικά σύμπλοκα (**Εικόνα 9**) (Lux, 2016). Τα τετραμερή σπεκτρίνης συνδέουν τις πλευρές και τις ακτίνες των σχηματιζόμενων εξάγωνων και συντίθεται από αντιπαράλληλες α' και β' αλυσίδες. Οι αλυσίδες αυτές υπό την επίδραση πλευρικών δυνάμεων, σχηματίζουν σε πρώτη φάση ετεροδιμερή τα οποία σταδιακά μετατρέπονται σε ετεροτετραμερή. Τα άκρα της σπεκτρίνης μπορεί να συνδέονται με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως την αγκυρίνη, τις πρωτεΐνες 4.1R και 4.2R και την ακτίνη. Οι κεντρικές και γωνιακές περιοχές της απαρτίζουν τα σύμπλοκα ζεύξης ακτίνης (Lux, 2016; Mohandas & Gallagher, 2008). Η δομική αυτή πολυπλοκότητα της σπεκτρίνης προσδίδει στο ερυθροκύτταρο ελαστικότητα και κατ'επέκταση τη δυνατότητα παραμορφωσιμότητας κατά την κυκλοφορία του (Johnson et al., 2007).

Τα νημάτια ακτίνης καταλαμβάνουν εξίσου σημαντική θέση στην πρωτεϊνική σύσταση του υπομεμβρανικού σκελετού. Τα νημάτια αυτά χαρακτηρίζονται από μικρό μήκος, είναι μονομερή και δημιουργούν διπλή έλικα. Η ακτίνη συνδέεται με την σπεκτρίνη μέσω της πρωτεΐνης 4.1R, καθώς και με άλλες σκελετικές πρωτεΐνες όπως η αδουσίνη η δεματίνη και η χωρεΐνη. Άμεσα συνδεδεμένες με τα νημάτια ακτίνης είναι οι πρωτεΐνες τροπομοσίνη (TM) και τροπομοντουλίνη 1 (TMD 1). Η τροπομοσίνη είναι ένα

μακροσκελές διμερές το οποίο συνδέεται σε μια από τις δύο έλικες που σχηματίζει το δίκτυο της ακτίνης (Lux, 2016). Η πρωτεΐνη TMD 1 καλύπτει το σημείο που επιτρέπει την επέκταση των νηματίων ακτίνης, καθορίζοντας έτσι το τελικό τους μήκος. Ακόμη ένα μόριο TMD1 μπορεί να δεσμεύει τόσο τα διμερή TM όσο και τα νημάτια ακτίνης (Sui et al., 2014)

Οι πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού αλληλεπιδρούν με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, σχηματίζοντας πρωτεϊνικά σύμπλοκα (**Εικόνα 9**) που συμβάλλουν στη συνολική ακεραιότητα της μεμβράνης αλλά και στην αλληλεπίδραση του υπομεμβρανικού δικτύου σπεκτρίνης-ακτίνης με το λιπιδικό τμήμα της μεμβράνης.

Σύμπλοκο αγκυρίνης ή ζώνης 3

Το σύμπλοκο αγκυρίνης ονομάζεται αλλιώς σύμπλοκο ζώνης 3, καθώς τα τετραμερή της διαμεμβρανικής αυτής πρωτεΐνης αποτελούν το βασικό του άξονα. Το σύμπλοκο αλληλεπιδρά κάθετα στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, καθώς η αμινοτελική περιοχή της κυρίαρχης αυτής πρωτεΐνης δημιουργεί δεσμούς με την αγκυρίνη και την πρωτεΐνη 4.2 R (MankeLOW et al., 2012). Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σύμπλοκο αντιστοιχούν σε εκείνες που συνδέονται με τις τρεις λειτουργικές περιοχές της αγκυρίνης. Συγκεκριμένα το αμινοτελικό της άκρο προσδένεται στη ζώνη 3, η κεντρική της περιοχή συνδέεται με τη σπεκτρίνη ενώ καρβοξυτελικά διαθέτει ρυθμιστικές λειτουργίες (Lux, 2016). Η συμμετοχή του συμπλόκου Rhesus – η σύσταση του οποίου θα αναλυθεί στη συνέχεια - έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός εκτεταμένου συμπλόκου αγκυρίνης, γνωστό ως μακροσύμπλοκο ζώνης 3. Τέλος σημαντικό ρόλο στο εν λόγω σύμπλοκο, διαδραματίζουν και οι γλυκοφορίνες A (Lux, 2016).

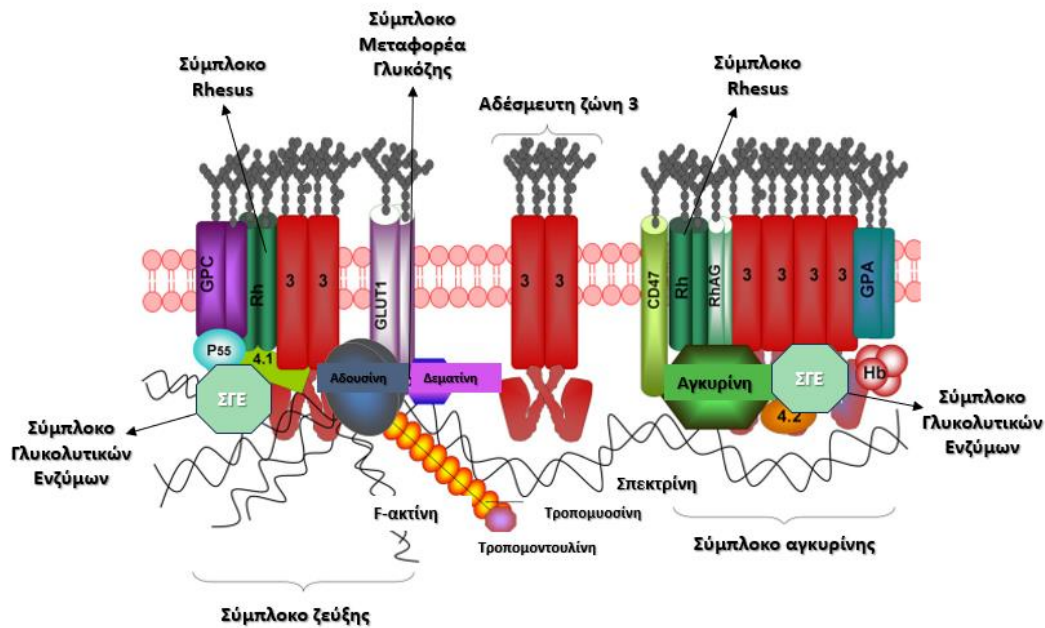
Σύμπλοκο ζεύξης

Ένα ακόμη σημαντικό σύμπλοκο της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης είναι το σύμπλοκο ζεύξης ακτίνης. Ο πυρήνας του συμπλόκου δημιουργείται με τη σύνδεση της πρωτεΐνης 4.1 R, της ακτίνης και της β' σπεκτρίνης. Βέβαια, η τελευταία αφήνει ένα κενό κατά την πρόσδεσή της, το οποίο καλύπτει η πρωτεΐνη 4.1 R. Η πρωτεΐνη αυτή έχει την ικανότητα δέσμευσης των υπολοίπων σκελετικών πρωτεϊνών, δημιουργώντας δεσμούς υψηλής συγγένειας. Μέσω του αμινοτελικού της άκρου αλληλεπιδρά με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες γλυκοφορίνη C και ζώνη 3, συμβάλλοντας έτσι στη σύνδεση του κυτταροσκελετού με τη μεμβράνη με κάθετο τρόπο (Han et al., 2000) Το σύμπλοκο ζεύξης

περιλαμβάνει επίσης τις πρωτεΐνες p55, δεματίνη και αδουσίνη καθώς και ορισμένα γλυκολυτικά ένζυμα, όπως τα αντιγόνα Kx, Kell και Duffy. Η σύνδεση της αδουσίνης και της δεματίνης με το μεταφορέα γλυκόζης 1 (Glut 1) δημιουργεί το επιμέρους σύμπλοκο του μεταφορέα γλυκόζης ενώ ο συνδυασμός των προαναφερθέντων γλυκολυτικών ενζύμων αποτελεί το σύμπλοκο γλυκολυτικών ενζύμων (Εικόνα 9) (Kodippili et al., 2012; Lux, 2016).

Σύμπλοκο Rhesus

Το σύμπλοκο Rhesus ολοκληρώνει τη δομική συνέχεια των προαναφερθέντων συμπλόκων. Πρόκειται για ένα τετραμερές που αποτελείται από Rhesus πεπτίδια και το ετεροτριμερές της Rhesus γλυκοπρωτεΐνης (RhAg), το οποίο ενισχύει τη σταθερότητα και ακεραιότητα της μεμβράνης. Συμμετέχει ενεργά στο μακροσύμπλοκο ζώνης 3, καθώς μπορεί να συνδέεται με τις πρωτεΐνες CD47 και γλυκοφορίνη B. Ο βασικός όμως συνδέτης του συμπλόκου Rhesus και του συμπλόκου ζώνης 3 είναι η πρωτεΐνη 4.2 R, η οποία δεσμεύει την πρωτεΐνη εαυτού CD47. Τέλος το σύμπλοκο Rhesus αλληλεπιδρά έμμεσα και με τη σπεκτρίνη, καθώς συνδέεται με την αγκυρίνη. Αξίζει να αναφερθεί η συνεισφορά του συγκεκριμένου συμπλόκου στην Ιατρική των Μεταγγίσεων, λόγω της μεγάλης εξειδίκευσης που παρουσιάζουν τα αντιγόνα τους (Pretini et al., 2019).



Εικόνα 9: Τα σύμπλοκα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και η σύνδεσή τους με τις σημαντικές σκελετικές και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Ανατύπωση από Kodirpili et al., 2012).

1.3.1.γ. Μεμβρανικές πρωτεΐνες

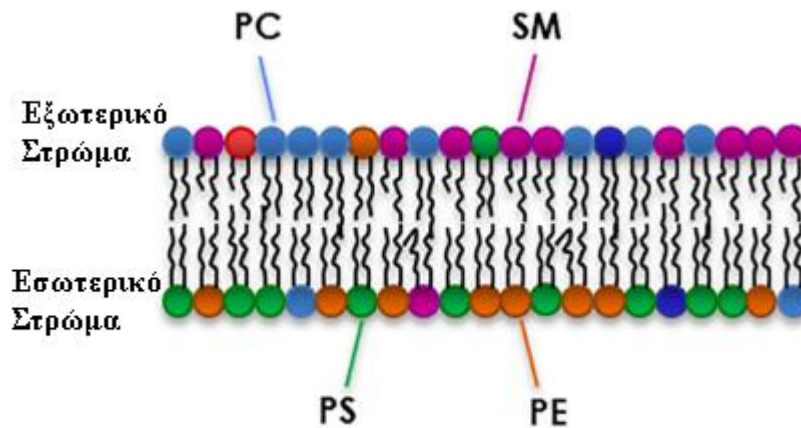
Πρόκειται για τις πρωτεΐνες που βρίσκονται ενσωματωμένες στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, χωρίς την ικανότητα να την διαπερνούν και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες της. Η σημαντικότερη πρωτεΐνη αυτής της κατηγορίας είναι η στοματίνη. Ονομάζεται αλλιώς και πρωτεΐνη 7.2, διότι αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό στη δημιουργία της ζώνης 7 της μεμβράνης. Αποτελεί βασικό συστατικό στη δημιουργία των λιπιδικών σχεδίων της μεμβράνης καθώς αλληλεπιδρά ισχυρά με το λιπιδικό της τμήμα και συγκεκριμένα με το μόριο της χοληστερόλης. Ακόμη συνδέεται και με σημαντικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως ο μεταφορέας γλυκόζης, η ζώνη 3, η υδατοπορίνη 1 κ.α. (Rungaldier et al., 2013). Αξίζει να αναφερθεί πως η στοματίνη έχει την ικανότητα να σχηματίζει ολιγομερή, έχοντας παρόμοια συμπεριφορά με τις σκελετικές πρωτεΐνες (Flatt & Bruce, 2018).

1.3.2. Λιπιδική σύσταση ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

Το λιπιδικό τμήμα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης αποτελείται από φωσφολιπίδια και μόρια χοληστερόλης, σε ίση μεταξύ τους αναλογία. Στη δομική σύσταση της λιπιδικής

διπλοστιβάδας συμμετέχουν 4 διαφορετικά είδη φωσφολιπιδίων, τα οποία εμφανίζουν ασύμμετρη κατανομή και διαφέρουν ανάλογα με τη μονοστιβάδα στην οποία ανήκουν. Στην εξωτερική στιβάδα εντοπίζονται η φωσφατιδυχολίνη (PC) και η σφιγγομυελίνη (SM), ενώ η εσωτερική απαρτίζεται από την φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), την φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και τα φωσφοϊνοσιτίδια (PI) (Εικόνα 10). Η PC κυριαρχεί στο εξωτερικό στρώμα με ποσοστό 27% επί των συνολικών φωσφολιπιδίων, ενώ στο εσωτερικό υπερσχύει η PE που αποτελεί το 30% των μεμβρανικών λιπιδίων. Αξίζει ακόμη να αναφερθεί ότι στην εσωτερική μονοστιβάδα, η εξωτερίκευση της PS αποτελεί αποπτωτικό δείκτη του κυττάρου, καθώς σηματοδοτεί την έναρξη της φαγοκυττάρωσης από τα μακροφάγα, αλλά και ενισχύει τη διαδικασία προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στα συστατικά της λιπιδικής διπλοστιβάδας εντάσσονται οι φλιππάσες, οι φλοππάσες και οι σκραμπλάσες, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταφορά λιπιδίων καθώς και στη διατήρηση της ασύμμετρης κατανομής τους. Η δράση των πρωτεϊνών αυτών, έγκειται στη δυνατότητα των φλιππασών να μετακινούν τα φωσφολιπίδια από την εξωτερική στην εσωτερική μονοστιβάδα και των φλοππασών να τα μεταφέρουν προς την αντίστροφη κατεύθυνση. Οι σκραμπλάσες, από την άλλη, δύνανται να καλύψουν την κινητικότητα και προς τις δύο κατευθύνσεις. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ασυμμετρία της λιπιδικής μεμβράνης, η οποία είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη συνολική λειτουργικότητα του ερυθροκυττάρου (Pretini et al., 2019). Οι διεργασίες αυτές άλλες φορές απαιτούν ενεργειακή κατανάλωση και άλλες όχι (Mohandas & Gallagher, 2008).

Ωστόσο, σημαντική είναι και η συνεισφορά της χοληστερόλης στην ομαλή λειτουργία της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Πιο αναλυτικά, έχει αποδειχθεί ότι τα μόρια χοληστερόλης μπορούν να αποτρέψουν την αιμόλυση των κυττάρων σε συνθήκες υψηλής υδροστατικής πίεσης, μέσω της ενίσχυσης της σύνδεσης του κυτταροσκελετού με το λιπιδικό σώμα της μεμβράνης. Ακόμη, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, στη δημιουργία των λιπιδικών σχεδίων, καθώς σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς με τη σφιγγομυελίνη της εξωτερικής στιβάδας (Yamaguchi et al., 2021).



Εικόνα 10: Δομή λιπιδικής διπλοστιβάδας με έμφαση στα βασικά φωσφολιπίδια του εσωτερικού και εξωτερικού τμήματος (Ανατύπωση από Pretini et al., 2019).

1.4. Μεταβολισμός ερυθροκυττάρου

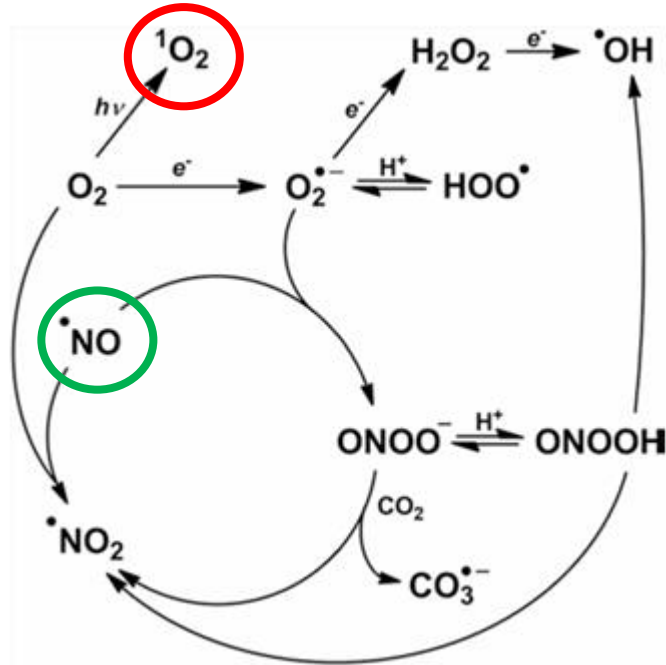
Παρότι τα ερυθροκύτταρα υπολείπονται βασικών λειτουργικών οργανιδίων, διαθέτουν ένα ενεργό σύστημα μεταβολισμού, το οποίο διασφαλίζει τη λειτουργικότητά τους. Σημαντικός είναι για τα ερυθροκύτταρα ο μεταβολισμός της γλυκόζης, μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η αναερόβια γλυκόλυση. Ο βιοχημικός αυτός μηχανισμός της αναερόβιας γλυκόλυσης, καλύπτει τις ενεργειακές απαιτήσεις του ερυθροκυττάρου, καθώς το κύτταρο στερείται μιτοχονδρίων και έχει ως τελικά προϊόντα το ATP, το NADH και το μόριο 2,3 DPG (Nemkov et al., 2016). Καθοριστικό ρόλο στις μεταβολικές απαιτήσεις των RBCs, διαδραματίζουν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του, που αντισταθμίζουν το υψηλό οξειδωτικό φορτίο που τα συνοδεύει. Οι μηχανισμοί αυτοί εντάσσονται στο μεταβολισμό των οξειδωτικών ριζών και θα αναλυθούν στη συνέχεια.

1.4.1. Μεταβολισμός οξειδωτικών ριζών

1.4.1.α. Συνθήκες οξειδωτικού στρες

Το ερυθροκυτταρικό περιβάλλον χαρακτηρίζεται από την παρουσία υψηλών επιπέδων μοριακού οξυγόνου, αίμης και σιδήρου. Για το λόγο αυτό τα ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν μια ευαισθησία σε μεταβολές του οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου. Η έκθεση των ερυθροκυττάρων σε ενδογενή και εξωγενή οξειδωτικά οδηγεί στην παραγωγή οξειδωτικών ριζών (ROS) και δραστικών μορφών αζώτου (RNS) αντίστοιχα (Εικόνα 11)

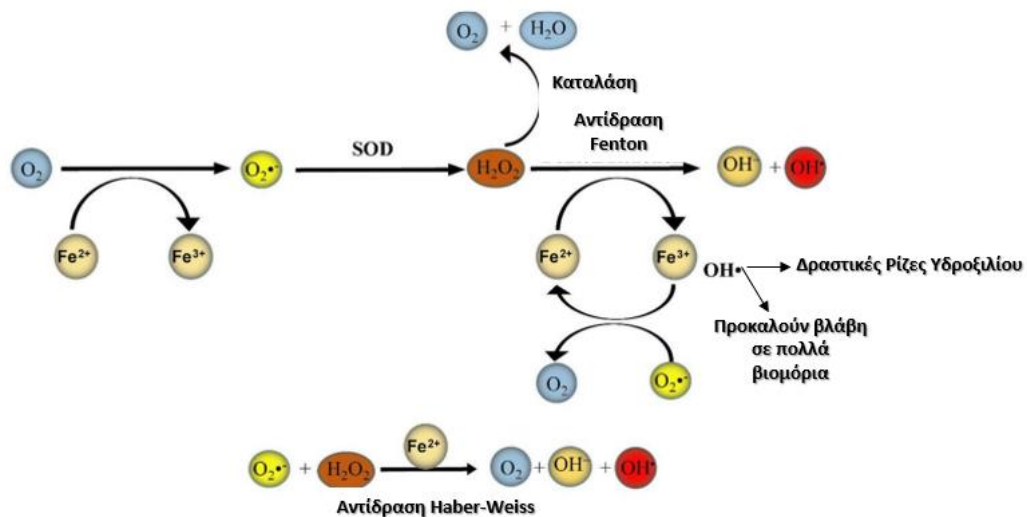
(Möller et al., 2019). Οι μεταβολές του οξειδοαναγωγικού αυτού ισοζυγίου, αποτελούν το οξειδωτικό στρες.



Εικόνα 11: Χημικές αντιδράσεις παραγωγής ενδοκυττάρων ριζών οξυγόνου (ROS) και εξωκυττάρων δραστικών μορφών αζώτου (RNS). Το O_2 (κυκλωμένο με κόκκινο χρώμα) είναι το πρόδρομο μόριο για την παραγωγή των ROS ενώ το NO (κυκλωμένο με πράσινο χρώμα) το πρόδρομο μόριο της παραγωγής RNS (Ανατύπωση από Möller et al., 2019).

Ο κύριος μηχανισμός παραγωγής ενδοκυττάρων ROS εντοπίζεται στην αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης η οποία οδηγεί στη δημιουργία της μεθαιμοσφαιρίνης, στην παραγωγή υπεροξειδικών ανιόντων (O_2^-) και στην απελευθέρωση τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) που επιδεικνύει οξειδωτική δράση (Orrico et al., 2023). Η συμμετοχή των ριζών O_2^- στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), η παρουσία του οποίου στις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss (Εικόνα 12) μπορεί να αποβεί καταστροφική για το κύτταρο. Η αρνητική επίδραση του H_2O_2 οφείλεται στο γεγονός ότι από αυτές τις αντιδράσεις προκύπτουν

δραστικές ρίζες υδροξιλίου και οξειδωμένος σίδηρος (Bardestani et al., 2021; Koppenol, 2001).

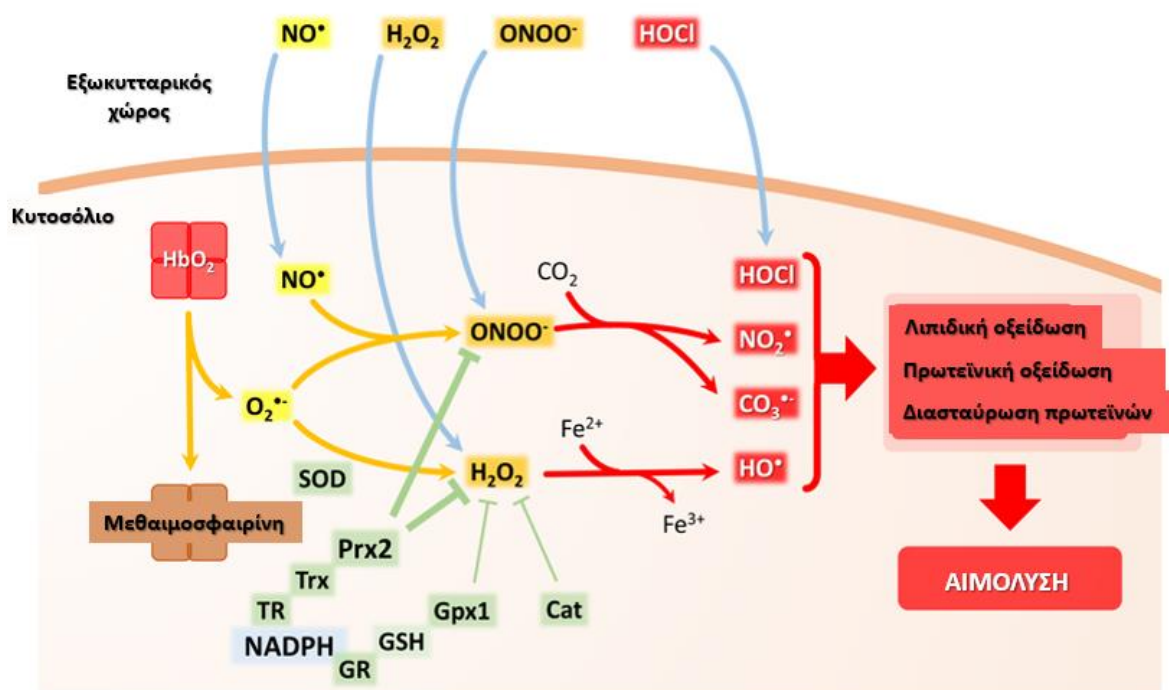


Εικόνα 12: Οι αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss. SOD: υπεροξειδική δισμουτάση, ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή των υπεροξειδικών ανιόντων ($O_2^{\bullet-}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (Ανατύπωση από Bardestani et al., 2021).

Οι οξειδωτικές βλάβες, λόγω του οξειδωτικού στρες, μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία αιμοχρωμάτων. Πρόκειται για ασταθείς δομές που προκύπτουν από την οξειδωτική επίδραση στο μόριο της μεθαιμοσφαιρίνης, οι οποίες αναπτύσσουν ομοιοπολικούς δεσμούς με σημαντικές πρωτεΐνες του εσωτερικού τμήματος της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, όπως η διαμεμβρανική πρωτεΐνη ζώνη-3. Η συσσώρευση τους σε αυτή την περιοχή της μεμβράνης, αναστέλλει την ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης του κυττάρου, δημιουργώντας προβλήματα στην κυκλοφορία του. Η διακοπή των οξειδωτικών αντιδράσεων πραγματοποιείται μέσω της εκκαθάρισης του αδέσμευτου σιδήρου. Για την εκκαθάριση αυτή δραστηριοποιείται η φερριτίνη, που είναι η αποθηκευτική πρωτεΐνη σιδήρου του ερυθροκυττάρου (Kuhn et al., 2017).

1.4.1.β. Αντιοξειδωτικοί ερυθροκυτταρικοί μηχανισμοί

Η απάντηση των ερυθροκυττάρων στις επιδράσεις του οξειδωτικού στρες δίνεται μέσω αντιοξειδωτικών μηχανισμών, που συμβάλλουν στη ρύθμιση του οξειδοναγωγικού ισοζυγίου. Στους μηχανισμούς αυτούς συμμετέχουν τόσο ενζυμικές όσο και μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες. Σημαντικό ρόλο στις αντιοξειδωτικές διεργασίες του ερυθροκυττάρου (**Εικόνα 13**) διαδραματίζει η γλουταθειόνη (GSH), η οποία ανήκει στα μη ενζυμικά μόρια. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί την οξείδωση της GSH ενώ η επαναφορά της στη μη οξειδωμένη μορφή γίνεται μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης και του NADPH, που λειτουργεί σα συμπαράγοντας. Βέβαια και η ίδια η γλουταθειόνη μπορεί να δράσει σα συμπαράγοντας, προκειμένου να προστατέψει το κύτταρο από την παραγωγή των ROS. Συγκεκριμένα, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) χρησιμοποιεί την GSH, προκειμένου να μετατρέψει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό. Όσον αφορά στα αντιοξειδωτικά ενζυμικά μόρια, καθοριστική είναι η συμβολή της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), της καταλάσης (CAT) και των υπεροξειδοξινών (Prx). Όπως ήδη αναφέρθηκε, η SOD καταλύει την αντίδραση μετατροπής των υπεροξειδικών ανιόντων (O_2^-) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και έχει πρωταρχικό ρόλο στην αντιμετώπιση των επιπτώσεων του οξειδωτικού στρες. Το ένζυμο CAT επεμβαίνει όταν τα επίπεδα του H_2O_2 είναι ιδιαίτερα αυξημένα, αποβάλλοντας την περίσσειά τους με την ταυτόχρονη δράση του μορίου Gpx. Τέλος οι υπεροξειδοξίνες συναντώνται στα ερυθροκύτταρα με την ομάδα των υπεροξειδοξινών 2 (Prx2), οι οποίες κυριαρχούν στα αντιοξειδωτικά συστήματα και εντοπίζονται στο κυτοσόλιο. Η δράση τους είναι κυρίως ανταγωνιστική, καθώς συμβάλλει στη διαδικασία εκκαθάρισης του H_2O_2 , όπως τα βιομόρια Gpx και CAT (Orrico et al., 2023). Αξίζει να αναφερθεί ότι το έντονο οξειδωτικό στρες προκαλεί τη μετατόπιση των Prx2 στην περιοχή της μεμβράνης (Low et al., 2008).



Εικόνα 13: Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του ερυθροκυττάρου και η συμμετοχή των βασικών ενζυμικών και μη αντιοξειδωτικών βοηθητικών μορίων (Ανατύπωση από Orrico et al., 2023).

1.5. Μηχανισμοί ερυθροκυτταρικής γήρανσης

Τα ερυθροκύτταρα επιβιώνουν στην κυκλοφορία του αίματος για 120 ημέρες και έρχονται αντιμέτωπα με πληθώρα μεταβολικών και λειτουργικών τροποποιήσεων. Τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα μεταφέρονται στο σπλήνα και στο ήπαρ, όπου πραγματοποιείται η καταστροφή τους. Η φαγοκυττάρωσή τους επιτυγχάνεται μέσω της δράσης των τοπικών μακροφάγων, τα οποία μπορούν και αναγνωρίζουν τα λεγόμενα σήματα «eat me» που εξωτερικεύονται στην επιφάνεια των οψωνισμένων ερυθροκυττάρων (Klei et al., 2017b). Χαρακτηρίζονται, επίσης, από αυξημένη εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και χαμηλά επίπεδα σιαλικών οξέων και συστατικών του λιπιδικού τμήματος της μεμβράνης, όπως η χοληστερόλη και τα φωσφολιπίδια (Antonellou et al., 2010). Ακόμη, η γήρανση των RBCs συνοδεύεται από ενισχυμένη κυστιδιοποίηση, εξαιτίας της οποίας μειώνεται η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης και αποβάλλονται σημαντικά μεμβρανικά συστατικά, με τελικό αποτέλεσμα την κυτταρική συρρίκνωση. Οι διεργασίες αυτές που οδηγούν στην ερυθροκυτταρική γήρανση, είναι αποτέλεσμα της αποτυχίας των ομοιοστατικών και

αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου (Corrongs et al., 2021). Αξίζει να αναφερθεί πως η ερυθροφαγοκυττάρωση (EP) έχει προστατευτικό ρόλο για τα γηρασμένα και πλέον ευαίσθητα RBCs, καθώς τα οδηγεί στον προγραμματισμένο τους κυτταρικό θάνατο, εμποδίζοντας την αιμόλυση τους από κάποιο ενδογενή ή εξωγενή παράγοντα. Στους βασικότερους αιτιολογικούς μηχανισμούς της EP ανήκουν: α) το οξειδωτικό στρες καθώς, όπως έχει ήδη αναφερθεί, από την αρχική αυτοοξειδωση της μεθαιμοσφαιρίνης και την ανακύκλωσή της, το κύτταρο οδηγείται στην απώλεια της ελαστικότητας του, β) η εξωτερική της φωσφατιδυλοσερίνης, γ) η σηματοδότηση μέσω της πρωτεΐνης CD47 και δ) το σηματοδοτικό μονοπάτι της ζώνης 3.

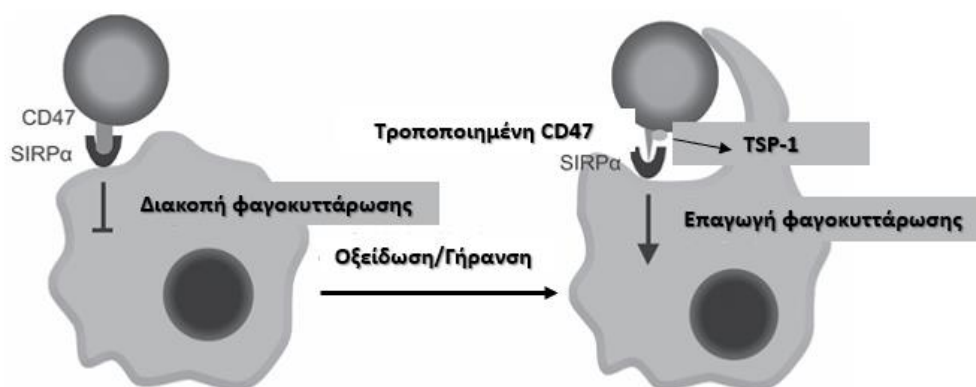
1.5.1. Εξωτερική της φωσφατιδυλοσερίνης (PS)

Η φωσφατιδυλοσερίνη είναι ένα από τα κυρίαρχα φωσφολιπίδια της λιπιδικής διπλοστιβάδας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και εντοπίζεται στο εξωτερικό της στρώμα. Όπως είναι γνωστό, η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων χαρακτηρίζεται από ασυμμετρία, γεγονός που συμβάλει στη λειτουργικότητα του κυττάρου. Η γήρανση των RBCs συνοδεύεται από έλλειψη αυτής της ασυμμετρίας, με αποτέλεσμα η PS να εξωτερικεύεται σε μεγαλύτερο βαθμό και τα μακροφάγα να φαγοκυτταρώνουν με αυξημένο ρυθμό (Klei et al., 2017b). Οι αιτίες που μπορεί να οδηγήσουν στην ενισχυμένη εξωτερική της PS, οφείλονται σε διεργασίες που πραγματοποιούνται κατά τη γήρανση και συνοψίζονται στις ακόλουθες: α) στην οξειδωση της PS, β) στα αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάρου Ca^{+2} , ως επακόλουθο της ενεργειακής αδρανοποίησης της φλιπάσης και ενεργοποίησης της σκραμπλάσης, γ) στις μεταβολές των συνδέσεων κυτταροσκελετού μεμβράνης που οδηγεί στην απουσία της ασύμμετρης κατανομής και δ) στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3, η οποία έχει παρατηρηθεί κυρίως σε *in vitro* προσεγγίσεις (Arashiki & Takakuwa, 2017; Bratosin et al., 2001).

1.5.2. Μονοπάτι γήρανσης συσχετιζόμενο με την πρωτεΐνη CD47

Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη CD47, όπως προηγουμένως έχει αναλυθεί, συμμετέχει ενεργά στην αναστολή της φαγοκυττάρωσης των RBCs από τα σπληνικά και ορισμένα ηπατικά μακροφάγα. Ο ανασταλτικός της ρόλος οφείλεται στην πρόσδεσή της με τον υποδοχέα SIRPα των μακροφάγων, η οποία διακόπτει τη σηματοδότηση που θα οδηγήσει στην ερυθροφαγοκυττάρωση. Τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα χαρακτηρίζονται είτε από

έλλειψη αυτής της πρωτεΐνης είτε από δομικές της τροποποιήσεις. Οι στερεοδομικές αυτές αλλαγές στην επιφάνεια της CD47, δημιουργούν μία καινούρια θέση με την οποία θα αλληλεπιδράσει η θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1) και θα ενισχύσει την ερυθροφαγοκυτταρική διαδικασία (**Εικόνα 14**) (Burger et al., 2012; Klei et al., 2017b).

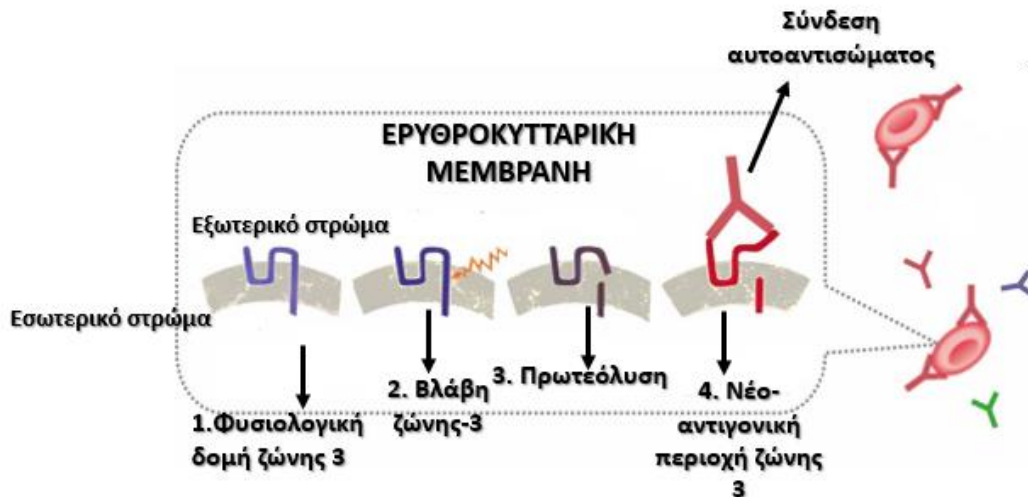


Εικόνα 14: Η βασική λειτουργία της πρωτεΐνης CD47 πριν και μετά την επίδραση της γήρανσης του ερυθροκυττάρου. Οι αλλοιώσεις στην επιφάνεια της CD47 έχουν ως επακόλουθο την πρόσδεση της TSP-1 και την επαγωγή της φαγοκυττάρωσης (Ανατύπωση από Burger et al., 2012).

1.5.3. Μονοπάτι γήρανσης συσχετιζόμενο με τη ζώνη 3

Στη μεμβράνη των γηρασμένων RBCs παρατηρούνται αλλοιώσεις στη δομή της βασικής διαμεμβρανικής πρωτεΐνης ζώνη-3. Τα ολιγομερή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης αναγνωρίζονται από αυτό-αντισώματα που υπάρχουν στη γηρασμένη μεμβράνη και η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στη σηματοδότηση της φαγοκυττάρωσης από τα μακροφάγα. Υπάρχουν αρκετές θεωρίες που εξηγούν την παρουσία του νεοσυντιθέμενου αυτού αντιγόνου στη μεμβράνη κατά τη γήρανση, δεν έχει όμως διευκρινισθεί ποια είναι η επικρατέστερη. Έχει παρατηρηθεί ότι η δημιουργία των αιμοχρωμάτων συμβάλλει στη δημιουργία του νέο-αντιγόνου γήρανσης της ζώνης 3, λόγω της συσσώρευσής τους στην κυτταροπλασματική πλευρά της πρωτεΐνης. Ακόμη θεωρείται πιθανό οι τροποποιήσεις

στη στερεοταξική δομή της ζώνης-3, να είναι υπεύθυνες για το νέο-αντιγόνο γήρανης. Αναλυτικότερα, η επιβολή του οξειδωτικού στρες στη μεμβράνη οδηγεί στην πρωτεόλυση της πρωτεΐνης και έτσι προκύπτουν νέες αντιγονικές περιοχές μεταξύ των θραυσμάτων, που δύνανται να αναγνωρισθούν από τα αντισώματα (**Εικόνα 15**) (Bosman, 2013; Klei et al., 2017b).



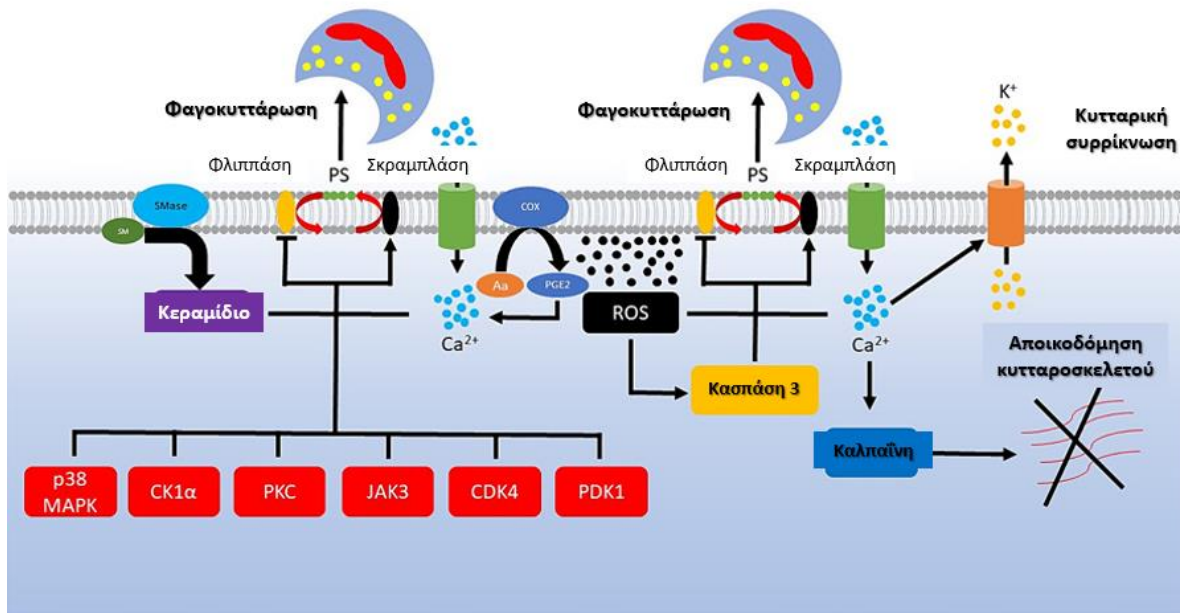
Εικόνα 15: Η δημιουργία του νέο-αντιγόνου της ζώνης 3 κατά τη γήρανση και η αναγνώρισή του από τα υπάρχοντα αυτοαντισώματα (Ανατύπωση από Bosman, 2013).

1.6. Ερυθρόπτωση

Ως ερυθρόπτωση ορίζεται ο προγραμματισμένος θάνατος του ερυθροκυττάρου, ο οποίος έχει αποπτωτικά χαρακτηριστικά και αποτελεί αποκλειστικό μηχανισμό των RBCs. Ο προγραμματισμένος αυτός κυτταρικός θάνατος, όπως ήδη αναφέρθηκε, προστατεύει το κύτταρο από την αιμόλυση, διαδραματίζοντας καθοριστικό ρόλο στη βιωσιμότητά του. Η ερυθρόπτωση συνοδεύεται από κυτταρική συρρίκνωση και αυξημένη εκροή κατιόντων ασβεστίου, αλλά σε καμία περίπτωση δεν οδηγεί σε λύση της μεμβράνης. Η καταστροφή της ερυθροκυτταρικής πλασματικής μεμβράνης είναι αποτέλεσμα της κλασικής αιμόλυσης (Lang et al., 2012; Repsold & Joubert, 2018).

Βασική προϋπόθεση για την έναρξη των μηχανισμών της ερυθρόπτωσης, αποτελεί η αύξηση των ενδοκυττάρων Ca^{+2} , η οποία οδηγεί στην ενισχυμένη εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης μέσω της ρύθμισης της λειτουργίας των πρωτεϊνών σκραμπλάση

και φλιπάση. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι υπεύθυνες για την ασύμμετρη τοποθέτηση των φωσφολιπιδίων πάνω στη μεμβράνη (Föllner & Lang, 2020). Η αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση των κατιόντων ασβεστίου συνδέεται άμεσα με την συρρίκνωση του κυττάρου, μέσω της ρύθμισης των κάλιο-εξαρτώμενων καναλιών Gardos (Klei et al., 2020). Βέβαια η εισροή των Ca^{+2} επιτυγχάνεται και με τη δράση άλλων καναλιών, η ρύθμιση των οποίων καθορίζεται από παράγοντες όπως η συγκέντρωση Cl^- , το οξειδωτικό στρες, το φαινόμενο της υπερόσμωσης και από μόρια ενεργοποίησης όπως η προσταγλανδίνη τύπου 2 (PGE2) και η πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Μεγάλης σημασίας είναι τα ROS και οι PGE2, καθώς αυξάνουν τη συγκέντρωση των δισθενών κατιόντων ασβεστίου και ενισχύουν τη διαπερατότητα των διαύλων τους, με συμπαράγοντες την κυκλοοξυγονάση (COX) και το αραχιδονικό οξύ (Tkachenko, 2024). Κατά την ερυθρόπτωση σημαντική είναι και η συμβολή της πρωτεΐνης καλπαΐνης, η οποία είναι υπεύθυνη για τις μορφολογικές διαταραχές και τις αλλοιώσεις του σχήματος του κυττάρου. Συγκεκριμένα, η μη λυσοσωμική αυτή πρωτεΐνη κυστεΐνης, ενισχύει την αποικοδόμηση του κυτταροσκελετού, επηρεάζοντας έτσι τη συνολική ακεραιότητα του ερυθροκυττάρου (Velásquez et al., 2015). Τέλος, τα κεραμίδια αποτελούν θεμελιώδες επαγωγικό ερέθισμα για την ενεργοποίηση του ερυθροπρωτικού μηχανισμού. Πρόκειται για μόρια τα οποία προκύπτουν από την υδρόλυση της σφιγγομυελίνης, η οποία εντοπίζεται στο εσωτερικό λιπιδικό μεμβρανικό τμήμα. Το κεραμίδιο διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ευαισθητοποίηση του κυττάρου ως προς τα Ca^{+2} και επάγει την εξωτερίκευση της PS, καθώς μπορεί να τη μετακινεί από την εσωτερική στην εξωτερική διπλοστιβάδα με την ταυτόχρονη δράση της σκραμπλάσης (Föllner & Lang, 2020). Ο μηχανισμός της ερυθρόπτωσης παρουσιάζεται αναλυτικά, στην **Εικόνα 15**.



Εικόνα 16: Σχηματική προσέγγιση του μηχανισμού της ερυθρόπτωσης (Ανατύπωση από Tkachenko, 2024).

Τα γηρασμένα RBCs, είναι πιο επιρρεπή στην ερυθρόπτωση, λόγω των προαναφερθέντων χαρακτηριστικών τους. Επομένως η ερυθρόπτωση απομακρύνει τα ερυθροκύτταρα από την κυκλοφορία του αίματος, ενισχύοντας έτσι τον προστατευτικό της ρόλο (Ghashghaeinia et al., 2012).

Κεφάλαιο 2. Εισαγωγή Μέρος 2^ο: Νανοτεχνολογία

2.1. Νανουσυστήματα ως φορείς φαρμάκων

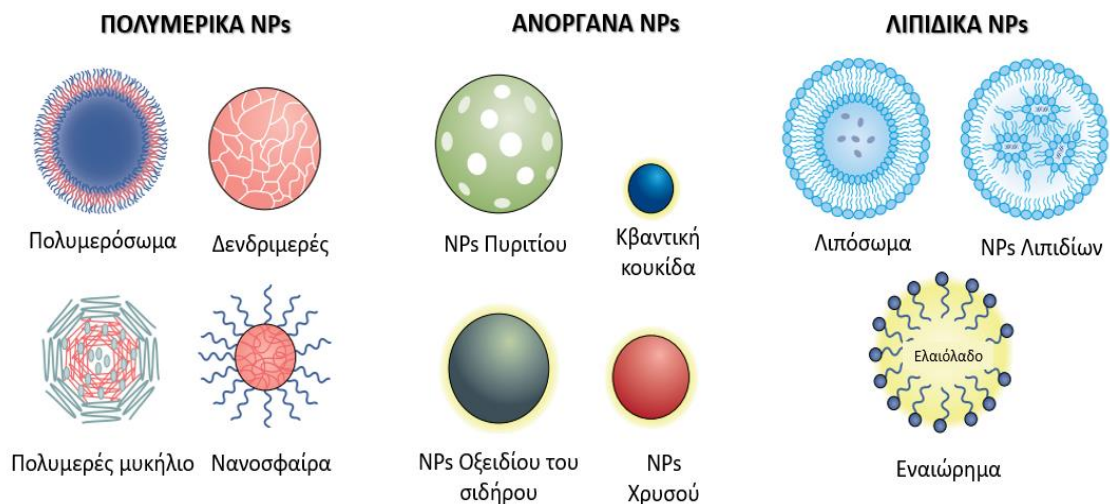
Η ανάπτυξη της Νανοτεχνολογίας είναι ραγδαία τα τελευταία χρόνια και κερδίζει όλο και μεγαλύτερο έδαφος στον τομέα των βιοϊατρικών επιστημών. Συγκεκριμένα η χρήση των νανοϋλικών-νανοσυστημάτων καθώς και οι πιθανές εφαρμογές τους απασχολεί ευρέως τη σύγχρονη επιστημονική κοινότητα. Ως νανοϋλικό ή νανοσωματίδιο ορίζεται η δομή εκείνη που διαθέτει μοναδικές φυσικές και χημικές ιδιότητες και το μέγεθός της δεν ξεπερνάει τα 100 nm (Su et al., 2018). Τα νανοσωματίδια (Nanoparticles, NPs) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοαισθητήρες, σε βιοαπεικονίσεις, σε αντικαρκινικές θεραπείες , σε διαγνώσεις με γενετικό υπόβαθρο καθώς και ως δυνητικοί φορείς φαρμάκων(Tian et al., 2021).

Η συμμετοχή τους στη μεταφορά θεραπευτικών ουσιών είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα των διαγνώσεων και να θέσει γερά θεμέλια για την εδραίωση της εξατομικευμένης θεραπείας(Mitchell et al., 2021). Η εξασφάλιση της βιοασφάλειας και η σωστή διαχείριση των πολύπλοκων φυσικοχημικών ιδιοτήτων των NPs, αποτελούν βασικά κριτήρια για τις ερευνητικές μελέτες που διεξάγονται στα πλαίσια της νανοϊατρικής (Su et al., 2018). Η ευρεία εφαρμογή τους στη μεταφορά φαρμάκων στοχεύει στη βελτιστοποίηση της βιοδιαθεσιμότητας της θεραπευτικής ουσίας στα διάφορα σημεία απορρόφησης των ιστών του ανθρώπινου οργανισμού (Drobohanova et al., 2013). Η υπεροχή των νανοφορέων, έναντι των συμβατικών μεθόδων χορήγησης φαρμάκων οφείλεται στα ακόλουθα χαρακτηριστικά τους: α) μπορούν να διαπερνούν το ενδοθήλιο και να απορροφούνται από τα κύτταρα μέσω της πινοκύττωσης, ενισχύοντας έτσι το βαθμό βιοδιαθεσιμότητας(Nichols & Bae, 2012), β) βελτιώνουν τη διαλυτότητα υδρόφοβων φαρμάκων λόγω της μεγάλης τους επιφάνειας, γ) βοηθούν τις θεραπευτικές ουσίες να φτάσουν αποτελεσματικότερα στα κύτταρα στόχους, λόγω του ειδικού σχεδιασμού τους, δ) αυξάνουν το χρόνο ημιζωής κατά τη φάση απέκκρισης του φαρμάκου, συμβάλλοντας έτσι στην αποτελεσματικότερη κατανομή της συγκέντρωσής του(Wang et al., 2016), ε) διαπερνούν πιο εύκολα τους βιολογικούς φραγμούς του ανθρώπινου σώματος όπως τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό καθώς και άλλες κυτταρικές μεμβράνες και στ') μειώνουν τις παρενέργειες του φαρμάκου καθώς έχουν στοχευμένη δράση (Su et al., 2018).

2.2. Ταξινόμηση νανοσωματιδίων

Η ενίσχυση της σταθερότητας και διαλυτότητας των εγκλωβισμένων θεραπευτικών ουσιών, είναι το βασικό πλεονέκτημα των νανοσωματιδίων που χρησιμοποιούνται ως φορείς φαρμάκων. Ανάλογα με τη σύνθεσή τους και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες διακρίνονται σε λιπιδικά νανοσωματίδια, πολυμερικά και ανόργανα (Εικόνα 17). Τα λιπιδικά νανοσωματίδια αποτελούνται από τουλάχιστον μια λιπιδική στιβάδα η οποία περιβάλλεται από ένα εσωτερικό υδατικό διαμέρισμα (Sercombe et al., 2015). Έχουν σφαιρική δομή και τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους εντοπίζονται στα παρακάτω: α) διαθέτουν πληθώρα φυσικοχημικών ιδιοτήτων που συμβάλλει στον απλό σχηματισμό τους, β) διακρίνονται για τον υψηλό βαθμό διαθεσιμότητάς τους, και γ) προσφέρουν ευελιξία ωφέλιμου φορτίου. Στον αντίποδα των προαναφερθέντων πλεονεκτημάτων, τα λιπιδικά νανοσωματίδια χαρακτηρίζονται από χαμηλό βαθμό ενσωμάτωσης της θεραπευτικής ουσίας και κατ'επέκταση δυσκολία στη βιοκατανομή τους.

Στην κατηγορία των ανόργανων νανοσωματιδίων ανήκουν κυρίως τα νανοσωματίδια χρυσού, σιδήρου και πυριτίου. Πρόκειται για λεπτομερώς σχεδιασμένα νανοϋλικά, τα οποία εμφανίζουν ποικιλομορφία στο μέγεθος, στη δομή και στη γεωμετρία τους. Ακόμη διαθέτουν εξειδικευμένες ηλεκτρικές, μαγνητικές και οπτικές ιδιότητες, είναι κατάλληλα για προγνωστικές θεραπείες, ενώ εμφανίζουν περιορισμούς στη διαλυτότητα και στην τοξικότητά τους.



Εικόνα 17: Ταξινόμηση νανοσωματιδίων. Οι τρεις βασικές κατηγορίες νανοφορέων και οι υποκατηγορίες τους ανάλογα με τις μορφολογικές και λειτουργικές τους διακρίσεις (Ανατύπωση από Mitchell et al., 2021).

Η τρίτη και σημαντικότερη κατηγορία, είναι τα πολυμερικά νανοσωματίδια, η χρήση των οποίων ενδείκνυται για τη μεταφορά θεραπευτικών ουσιών, λόγω του υψηλού βαθμού βιοδιαθεσιμότητας που τα χαρακτηρίζει (Mitchell et al., 2021). Τα χαρακτηριστικά και η σύνθεση των πολυμερικών νανοσωματιδίων αναλύονται εκτενώς στο ακόλουθο κεφάλαιο.

2.3. Πολυμερικά νανοσωματίδια

2.3.1. Σύνθεση

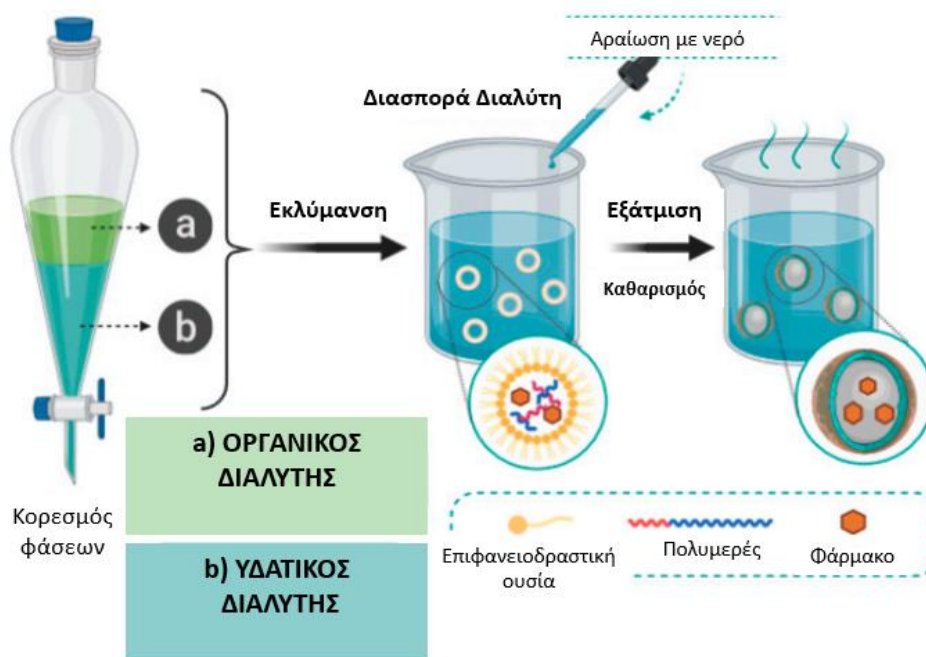
Μια μεγάλη ποικιλία φυσικών ή συνθετικών πολυμερών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή στερεών πολυμερικών νανοσωματιδίων (Crucho & Barros, 2017, Gagliardi et al., 2021). Οι μελέτες εστιάζουν στα βιοδιασπώμενα πολυμερή με επικρατέστερα το πολύ-γαλακτικό οξύ (PLA), το πολυγαλακτικό-γλυκολικό οξύ (PLGA) και την πολύ-καπρολακτόνη (PCL) (Gagliardi et al., 2021).

Η σύνθεσή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί με ποικίλους τρόπους, με συνηθέστερο την ιοντοτροπική πηκτωματοποίηση (He et al., 2020). Άλλες μέθοδοι είναι η εκτόπιση ή διάχυση του διαλύτη καθώς και η τεχνική της νανοκατακρήμνισης (Mitchell et al., 2021). Όλες αυτές οι συνθετικές διεργασίες καταλήγουν σε διαφορετικό αποτέλεσμα.

Η επιλογή της μεθόδου παραγωγής πολυμερικών νανοσυστημάτων, εξαρτάται από το είδος του φαρμάκου που θα ενσωματωθεί καθώς και τις απαιτήσεις της οδού χορήγησης. Η σύνθεσή τους πραγματοποιείται είτε με διασπορά προσχηματισμένων πολυμερών, είτε με πολυμερισμό μονομερών (Ahmed et al., 2021; Zielí Nska et al., 2020.).

Η μέθοδος της ιοντοτροπικής πηκτωμάτωσης βασίζεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του πολυμερικού νανοσυστήματος και της εγκλωβισμένης ένωσης. Η αρνητικά φορτισμένη καρβοξυλομάδα του πολυμερικού αλληλοεπιδρά με τη θετικά φορτισμένη αμινομάδα της ένωσης που επρόκειτο να εγκλωβιστεί – εφόσον αυτές έχουν την απαιτούμενη χημική δομή – προκειμένου να πραγματοποιηθεί συρρίκνωση του πολυμερικού νανοσυστήματος και η διάταξή του σε χαμηλές τιμές pH. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται καθώς ο πολυμερικός πυρήνας έρχεται σε επαφή με ένα υδατικό διάλυμα κατιόντων και συνοδεύεται με την προσθήκη ανιονικού πολυμερούς υπό ταυτόχρονη μηχανική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η συγκεκριμένη τεχνική παρασκευής επιλέγεται συχνά λόγω της υψηλής απόδοσης εγκλωβισμού που προσφέρει, του χαμηλού κόστους, της ευκολίας στη διαχείριση των πρωτοκόλλων καθώς και λόγω του ότι είναι ασφαλής για τον παρασκευαστή. Με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται η σύνθεση των πολυμερικών νανοσυστημάτων αλγινικού (Choukaife et al., 2020).

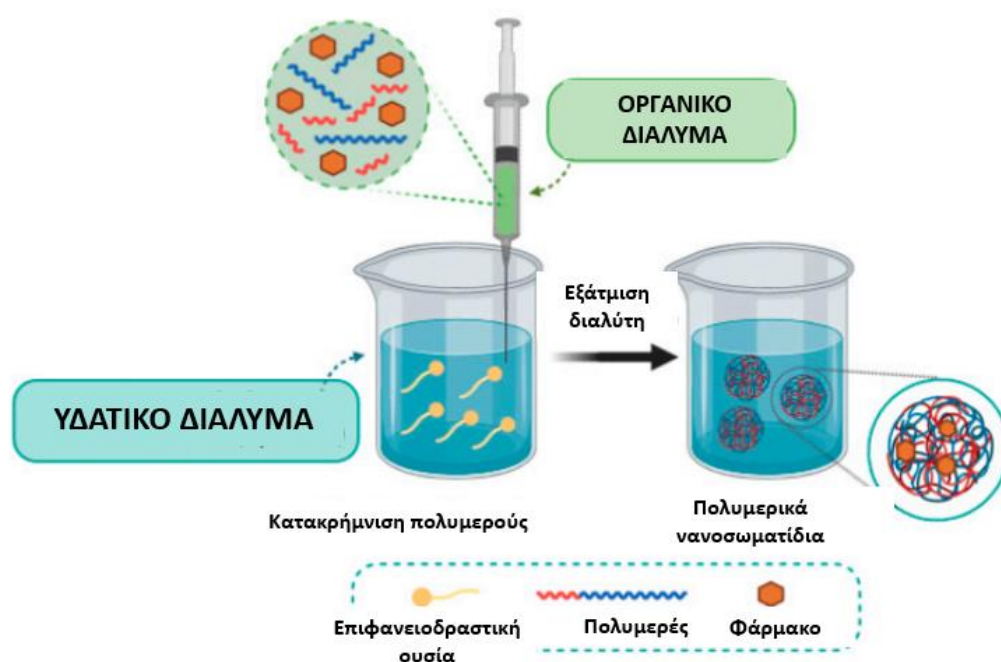
Όσον αφορά στη μέθοδο της εκτόπισης/διάχυσης του διαλύτη, αυτή στηρίζεται στην εκλύμανση μεταξύ ενός μερικώς υδατοδιαλυτού διαλύτη - ο οποίος περιέχει το πολυμερές και το εγκλωβισμένο σε αυτό φάρμακο – και ενός διαλύτη που περιέχει μια επιφανειοδραστική ουσία (Souto et al., 2019). Στο ενδιάμεσο στάδιο της μεθόδου χρησιμοποιείται ένας οργανικός διαλύτης που μπορεί να διαλυθεί μερικώς στο νερό, για τον οποίο έχει προηγουμένως επιτευχθεί θερμοδυναμική ισορροπία (**Εικόνα 18**). Με την τεχνική αυτή, είναι δυνατόν να παρασκευαστούν νανοσωματίδια μεγάλου εύρους (80 – 900 nm) παρά το μειονέκτημα της εκτεταμένης υδατικής φάσης (Zielí Nska et al., 2020.)



Εικόνα 18: Η τεχνική παρασκευής πολυμερικών νανοσυστημάτων με τη μέθοδο της εκτόπισης - διάχυσης του διαλύτη (Ανατύπωση από Zielí Nska et al., 2020).

Τέλος η μέθοδος της νανοκατακρήμισης ανήκει επίσης στην κατηγορία τεχνικών μετατόπισης διαλύτη και βασίζεται στη χρήση δύο διαφορετικών διαλυτών που μπορούν να αναμιχθούν (Εικόνα 19). Ο διεπιφανειακός διαμερισμός του πολυμερούς μετά τη μετατόπιση του οργανικού διαλύτη στην υδατική φάση, μέσω ενός λιποφιλικού διαλύματος, αποτελεί τη βασική αρχή της συγκεκριμένης παρασκευαστικής μεθόδου (Salatin et al., 2017). Η διάχυση του διαλύτη από τα νανοσταγονίδια οδηγεί στη δημιουργία των πολυμερικών νανοσυστημάτων που θα έχουν τη μορφή της νανोकάψουλας ή της νανοσφαίρας. Η γενική αρχή της μεθόδου είναι η ανάμιξη της οργανικής φάσης με την υδατική. Με τη μέθοδο της νανοκατακρήμισης, παρασκευάζονται πολυμερικά νανοσωματίδια με διαστάσεις περίπου 170 nm. Το πλεονέκτημα της, έναντι της προαναφερθείσας μεθόδου της εκτόπισης του διαλύτη, είναι ότι τα νεοσύστατα πολυμερικά νανοσωματίδια έχουν καλά καθορισμένο μέγεθος και κατ'επέκταση μικρότερο εύρος κατανομής. Ακόμη η τεχνική αυτή επιτρέπει τον καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ των δυο βασικών μορφών των πολυμερικών νανοσωματιδίων. Έτσι με τη διάλυση της δραστικής ουσίας σε πολυμερικό διάλυμα αποκτώνται οι νανοσφαίρες,

ενώ με τη διάλυση του φαρμάκου σε λιπόφιλο υλικό και τη μετέπειτα διασπορά του σε οργανικό πολυμερικό διαλύτη, απομονώνονται οι νανοκάψουλες (Martínez Rivas et al., 2017).



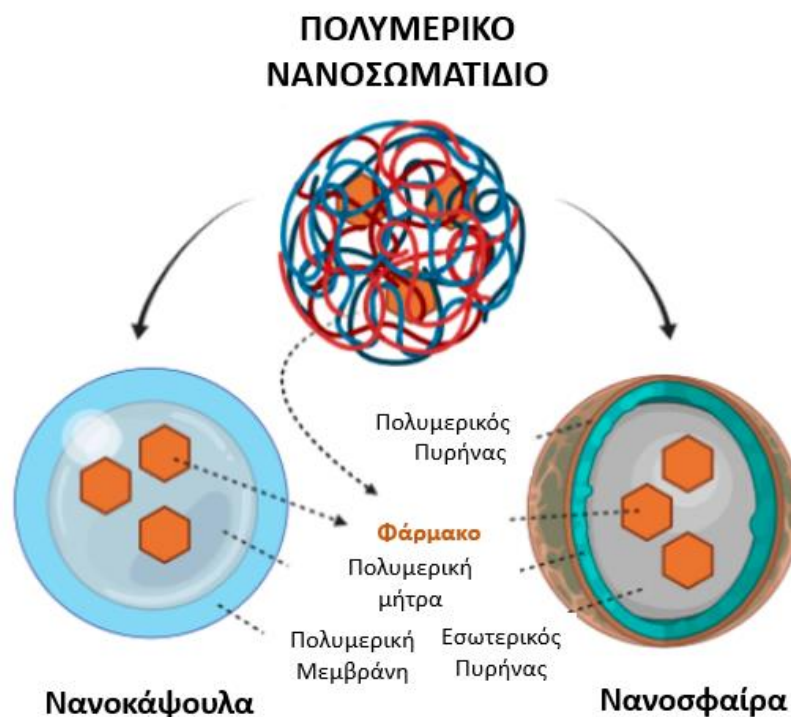
Εικόνα 19: Η παρασκευαστική μέθοδος της νανοκατακρήμισης (Ανατύπωση από Zielí Nska et al., 2020).

2.3.2. Χαρακτηρισμός

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια εμφανίζουν διαφορές στη σύσταση, τη συγκέντρωση, το σχήμα, τις επιφανειακές τους ιδιότητες (π.χ. το φορτίο της επιφάνειάς τους), την κρυσταλλικότητά τους καθώς και την ικανότητα διασποράς τους. Οι διαφορές αυτές μπορούν να επιβεβαιωθούν είτε με την παρατήρηση των νανοσωματιδίων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είτε με τη διεξαγωγή μεθόδων όπως η δυναμική σκέδαση του φωτός (Dynamic light scattering, DLS), η φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων (Photon Correlation Spectroscopy, PCS), η ηλεκτροφόρηση, η χρωματογραφία κ.α.(Silva et al., 2019). Χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό βιοσυμβατότητας και

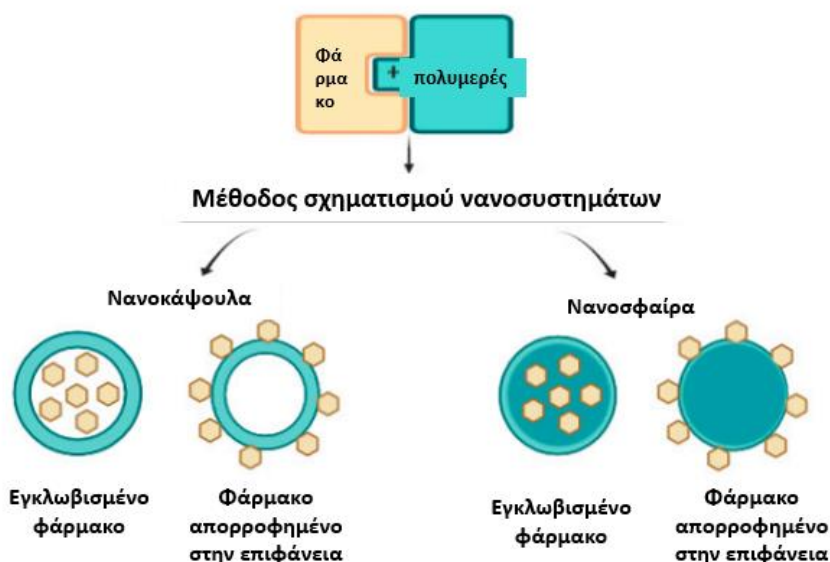
βιοαποικοδομησιμότητας, ιδιότητες που τους προσδίδουν πλεονεκτική θέση ως φορείς φαρμάκων (Gagliardi et al., 2021).

Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο αλληλοεπιδρούν με την θεραπευτική ουσία καθώς και τη μορφολογική τους διαφοροποίηση διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις νανοσφαίρες και τις νανοκάψουλες (**Εικόνα 20**). Οι νανοσφαίρες διαθέτουν μία συμπαγή πολυμερική μήτρα στην οποία ο θεραπευτικός παράγοντας μπορεί να διαλυθεί, να εγκλωβιστεί, να αναπτύξει ομοιοπολικούς δεσμούς ή και να προσροφηθεί. Από την άλλη οι νανοκάψουλες διαθέτουν μία κοιλότητα γύρω από τον λιπόφιλο πυρήνα στην οποία πραγματοποιείται ο εγκλωβισμός της ουσίας και η οποία προστατεύεται από πολυμερικό περίβλημα λεπτής διατομής (περίπου 5 nm) ,(Gagliardi et al., 2021; Zielí Nska et al., 2020.; Zielinska et al., 2020).



Εικόνα 20: Οι μορφολογικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο βασικών τύπων των πολυμερικών νανοσυστημάτων, της νανοκάψουλας και νανοσφαίρας. Στην εικόνα επισημαίνεται και η περιοχή εγκλωβισμού της θεραπευτικής ουσίας (Ανατύπωση από Zielí Nska et al., 2020).

Τόσο οι νανοσφαίρες όσο και οι νανοκάψουλες έχουν ένα συγκεκριμένο τρόπο αλληλεπίδρασης με τον κάθε θεραπευτικό παράγοντα. Η αλληλεπίδραση μεταξύ φαρμάκου και πολυμερούς είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη, καθώς δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ της αδέσμευτης περιοχής του φαρμάκου και της θέσης αλληλεπίδρασης. Η σχέση διάδρασης μεταξύ νανοσυστήματος και πολυμερούς επηρεάζεται από παράγοντες όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου, το pH του μέσου διασποράς, τη φυσική προέλευση του πολυμερικού συστήματος καθώς και τη συγκέντρωση της χρησιμοποιούμενης θεραπευτικής ουσίας. Τροποποιήσεις στην επιφάνεια του νανοσυστήματος μπορεί να επηρεάσουν το βαθμό απορρόφησης του φαρμάκου. Ανάλογα το είδος του πολυμερικού νανοφορέα, παρατηρείται διαφορετική αλληλεπίδραση με τη θεραπευτική ουσία (Εικόνα 21). Όπως ήδη αναφέρθηκε, στις νανοσφαίρες το φάρμακο έχει την ικανότητα να διαλύεται ή να διασπείρεται μέσα στην πολυμερική μήτρα, ακόμη και να απορροφάται, ενώ στις νανοκάψουλες τα λιπόφιλα φάρμακα εγκλωβίζονται από την πολυμερική μεμβράνη του εξίσου λιπόφιλου πυρήνα (Patra et al., 2018) .



Εικόνα 21: Απεικόνιση της σχέσης αλληλεπίδρασης πολυμερούς και θεραπευτικής ουσίας ανάλογα το είδος του πολυμερικού νανοσυστήματος (Ανατύπωση από Zielí Nska et al., 2020).

2.4. Πολυμερικά Νανοσυστήματα Αλγινικού-Χρυσίνης

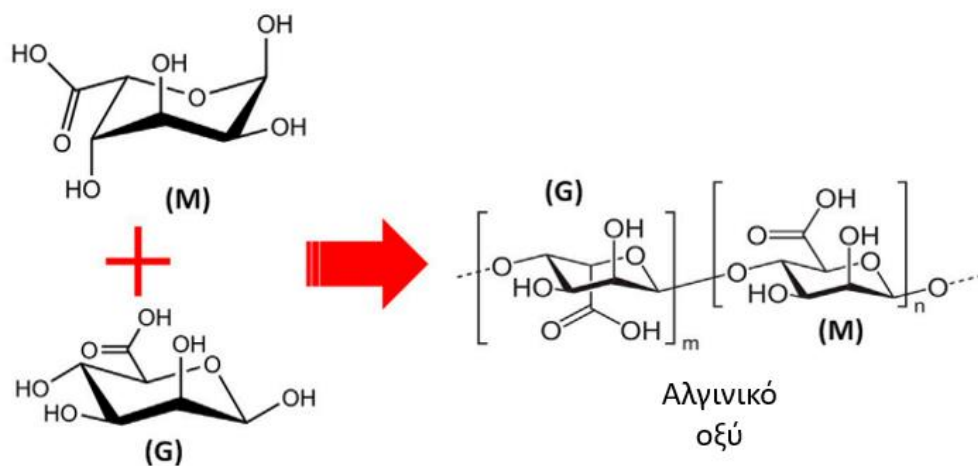
Για το σχηματισμό των πολυμερικών νανοσυστημάτων παίζει καθοριστικό ρόλο η επιλογή του πολυμερικού φορέα. Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτει το πολυμερές σα φορέας είναι η βιοαποικοδομησιμότητα και η έλλειψη τοξικότητας (Crucho & Barros, 2017). Ωστόσο υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που μπορούν να καθορίσουν την αποτελεσματικότητά τους στη μεταφορά των θεραπευτικών ουσιών και αυτοί συνοψίζονται στους ακόλουθους: α) το μοριακό βάρος του πολυμερούς, το οποίο σχετίζεται άμεσα με την οδό χορήγησης του φαρμάκου, τον τρόπο απέκκρισης του καθώς και την προέλευσή του (φυσικό ή συνθετικό), β) η αρχιτεκτονική δομή του πολυμερούς, η οποία επηρεάζει την κυκλοφορία του στον ανθρώπινο οργανισμό καθώς μπορεί να χαρακτηρίζεται από διακλαδώσεις, ευκαμψία ή αυξημένο χρόνο ημιζωής και γ) η ικανότητα φόρτωσης του πολυμερικού νανοφορέα με τη θεραπευτική ουσία, η οποία αν είναι υψηλή μπορεί να συμβάλει στον εγκλωβισμό πολλαπλών φαρμάκων με απώτερο σκοπό τη στόχευση ποικίλων κυττάρων στόχων (Crucho & Barros, 2017; Lu et al., 2021).

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια ανήκουν στην κατηγορία των βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών και προτιμώνται στη μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών. Η αποικοδόμησή τους *in vivo* βασίζεται σε ενζυμικές και χημικές αντιδράσεις που καταλήγουν στην αποβολή τους στη μορφή βιοσυμβατών παραγώγων. Σε όλες αυτές τις διεργασίες συμβάλλουν οι πλεονεκτικές τους ιδιότητες όπως η υψηλή βιοσυμβατότητα και βιοδιαθεσιμότητα καθώς και ο χαμηλός βαθμός τοξικότητας (Fiandra et al., 2023). Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών, τα φυσικά και τα συνθετικά. Τα συνθετικά πολυμερή παράγονται με χημικές μεθόδους και σε αυτά συγκαταλέγονται τα PLA, PGLA και PCL. Από την άλλη τα φυσικά πολυμερή είναι φυτικής ή ζωικής προέλευσης και σε αυτή την κατηγορία ανήκουν η χιτοζάνη, η αγαρόζη και το αλγινικό οξύ. Το χαμηλό κόστος που απαιτείται για τη σύνθεσή τους και η δυνατότητα βέλτιστης διασταύρωσης είναι κάποια ακόμη χαρακτηριστικά που εντείνουν τη χρήση των βιοαποικοδομήσιμων πολυμερικών νανοσυστημάτων για τη μεταφορά θεραπευτικών ουσιών (das Neves et al., 2015).

2.4.1. Αλγινικό οξύ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια αλγινικού, με εγκλωβισμένη ουσία την χρυσίνη, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των νανοσφαιρών. Τα αλγινικά

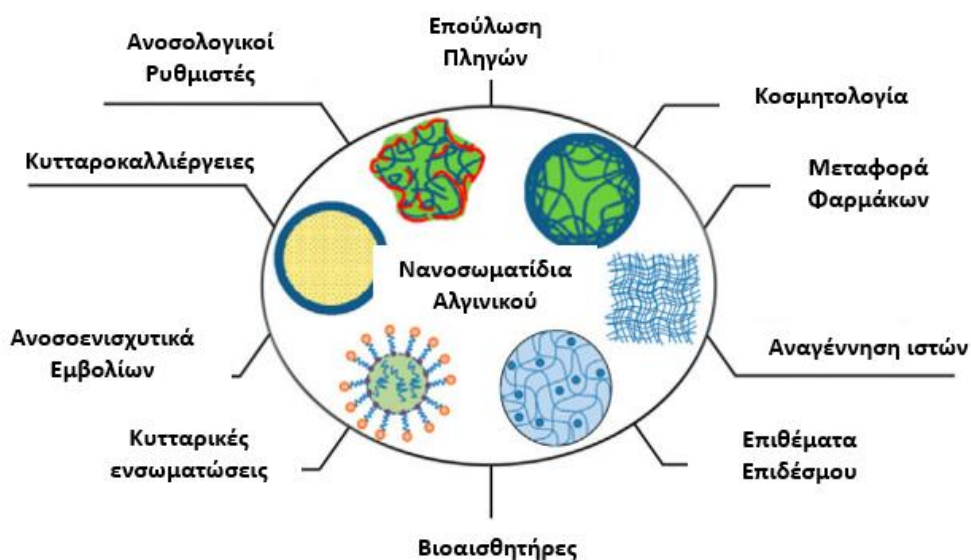
οξέα, όπως αναφέρθηκε, είναι φυσικά πολυμερή και ανήκουν στους γραμμικούς, μη διακλαδισμένους πολυσακχαρίτες. Αποτελούνται από αλυσίδες α-L- γουλουρονικού (G) οξέος και β- D – μανουρονικού οξέος (M) (Εικόνα 22), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με 1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς. Μπορούν να απομονωθούν από θαλάσσια καφέ φύκια (είδος *Macrocystis Pyrifera*, *Laminaria Hyperborea*, *Ascophyllum Nodosum* κ.α.) ή να παραχθούν μέσω βακτηριακής βιοσύνθεσης (Al-Hatamleh et al., 2022). Η απομόνωση αυτή επιτυγχάνεται με την αρχική ξήρανση των φυκιών, την διεξαγωγή διάφορων χημικών μεθόδων για την απομάκρυνση των αποβλήτων και τέλος την επεξεργασία με ειδικά υδατικά αλκαλικά διαλύματα (π.χ. καυστικό νάτριο) με σκοπό την τελική σύνθεση του υδατοδιαλυτού αλγινικού οξέος (dos Santos Araújo et al., 2019). Η χημική σύνταξη του αλγινικού οξέος μπορεί να γίνει με τρεις διαφορετικούς τρόπους ανάλογα με το είδος προέλευσής τους και την αναλογία των τμημάτων γουλουρονικού (G) και μανουρονικού οξέος (M) (Al-Hatamleh et al., 2022).



Εικόνα 22: Η χημική δομή του αλγινικού οξέος. Στην εικόνα παρουσιάζεται η σύνδεση του γουλουρινικού (G) οξέος και του μανουρονικού (M) οξέος, που οδηγεί στην τελική σύνθεση του αλγινικού (Ανατύπωση από Al-Hatamleh et al., 2022).

Τα αλγινικά θεωρούνται κατάλληλα για τη μεταφορά φαρμάκων και μορίων θεραπευτικής σκοπιμότητας λόγω των σημαντικών βιολογικών ιδιοτήτων που διαθέτουν. Έχουν χαμηλό βαθμό τοξικότητας και λειτουργικά πλεονεκτήματα όπως μεγάλη απορρόφηση και συγκράτηση στο νερό, μηχανισμούς πύκνωσης και πηκτωματοποίησης καθώς και την ικανότητα να αυξάνουν ή να σταθεροποιούν το ιξώδες των υδατικών

συστατικών με τα οποία αλληλοεπιδρούν (Cervino et al., 2019). Έχουν την ικανότητα να υποβάλλονται σε επεξεργασία με δισθενή ιόντα και κυρίως με δισθενή κατιόντα ασβεστίου Ca^{+2} (παρασκευαστική μέθοδος ιονοτροπικής πηκτωμάτωσης) με απώτερο σκοπό το σχηματισμό νανοσωματιδίων. Η ιδιότητά τους αυτή τα καθιστά ιδανικά για την παρασκευή υδρογελών. Ακόμη διαθέτουν χαρακτηριστικά όπως η βιοαποικοδομησιμότητα και η βιοσυμβατότητα καθώς και αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή δράση (Alves et al., 2021). Όλα αυτά οδηγούν στην ευρεία χρήση των αλγινικών οξέων για σχηματισμό νανοσωματιδίων σε πολλαπλές βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές (Εικόνα 23).



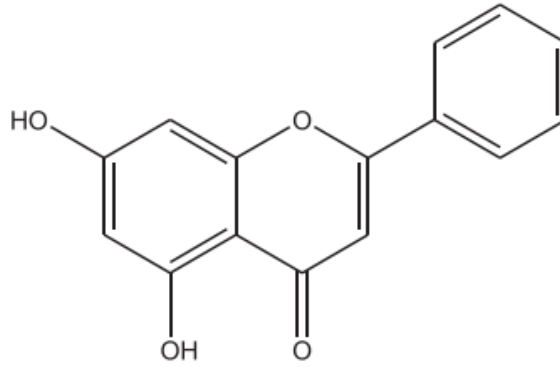
Εικόνα 23: Το σύνολο των παροντικών αλλά και μελλοντικών βιοϊατρικών και φαρμακευτικών εφαρμογών των νανοσυστημάτων αλγινικού (Ανατύπωση από Al-Hatamleh et al., 2022).

Τα νανοσωματίδια αλγινικού καταλαμβάνουν διαρκώς όλο και μεγαλύτερο έδαφος στο χώρο των προηγμένων βιοϊατρικών εφαρμογών, καθώς συνδυάζουν τα πλεονεκτικά χαρακτηριστικά του αλγινικού οξέος (Song et al., 2018). Έχουν την ικανότητα να μιμούνται την εξωκυττάριο περιβάλλον των κυττάρων με τα οποία αλληλοεπιδρούν, ενισχύοντας έτσι λειτουργικά τους χαρακτηριστικά όπως η προσκόλληση σε άλλα κύτταρα, ο πολλαπλασιασμός, η δυνατότητα μεταπήδησης και η διαφοροποίηση (Kalva et

al., 2021). Σημαντική είναι η συνεισφορά τους στην αναγέννηση των ιστών και επούλωση των πληγών, λόγω της συμμετοχής τους στη διέγερση των μονοκυττάρων η οποία επιτυγχάνεται με την αυξημένη παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι ιντερλευκίνες 1 και 6 (IL-1, IL-6) και ο νεκρωτικός παράγοντας όγκου (TNF) (Eming et al., 2007). Όσον αφορά στη χρήση τους ως νανοφορείς, η δράση τους μπορεί να ξεπερνά τις δυσκολίες που προκύπτουν κατά την κυκλοφορία των νανοσωματιδίων με την εγκλωβισμένη ουσία, στους διάφορους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού (Andretto et al., 2021). Τα νανοσωματίδια αλγινικού έχουν την ικανότητα να ενισχύουν την αποτελεσματικότητα του εγκλωβισμού, της αποδέσμευσης, της βιοπροσβασιμότητας και της βιοδιαθεσιμότητας του θεραπευτικού παράγοντα που μεταφέρουν (Hariyadi & Islam, 2020). Ακόμη μία σημαντική τους ιδιότητα είναι ότι μπορούν να αντιδρούν στα εξωτερικά ερεθίσματα και να αποδεσμεύουν την εγκλωβισμένη σε αυτά ουσία έπειτα από μεταβολές στη θερμοκρασία και στο pH. Σε όξινο pH το αλγινικό υφίσταται συρρίκνωση, με αποτέλεσμα την αδυναμία αποδέσμευσης του θεραπευτικού παράγοντα ενώ σε αλκαλικό παρατηρείται διόγκωση του φορέα και κατ'επέκταση γρήγορη αποδέσμευση του φαρμάκου (Akalın, 2023).

2.4.2. Χρυσίνη (5,7 υδροξυ-φλαβόνη)

Η χρυσίνη ή 5,7 υδροξυ-φλαβόνη είναι μια φυτοχημική ένωση που ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών και μπορεί να απομονωθεί από φυτά όπως το λουλούδι του πάθους καθώς και από φυτικά προϊόντα όπως το μέλι και η πρόπολη (Mani & Natesan, 2018). Η χημική της δομή είναι η χαρακτηριστική δομή μιας φλαβόνης (**Εικόνα 24**), με ένα βασικό σκελετό που αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα. Η διαφοροποίησή της από τα υπόλοιπα φλαβονοειδή είναι ότι δεν περιέχει ομάδα υδροξυλίου (Naz et al., 2019).



Εικόνα 24: Η χημική δομή της χρυσίνης (Ανατύπωση από Naz et al., 2019).

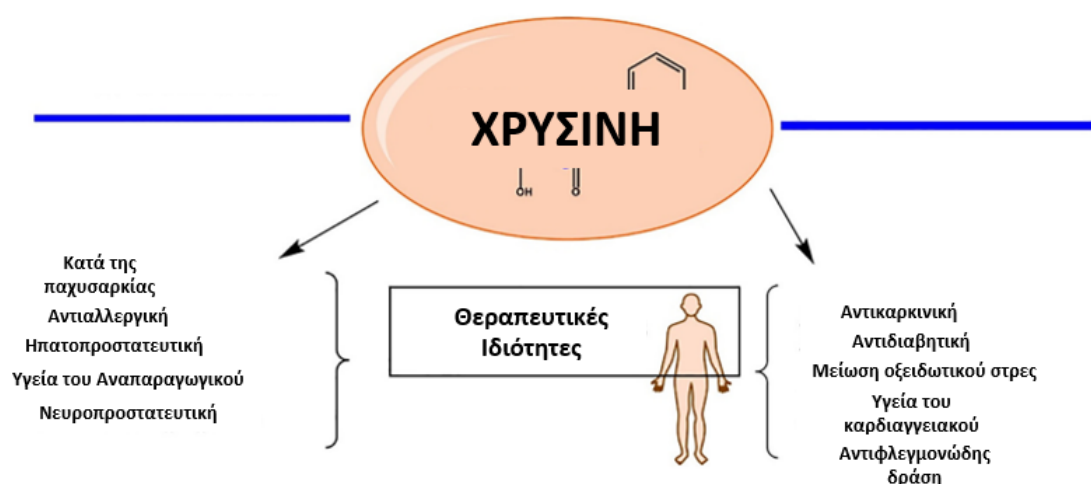
Τα φλαβονοειδή με τη σειρά τους συγκαταλέγονται στους δευτερογενείς μεταβολίτες και συναντώνται σε φυτά, φρούτα, λαχανικά καθώς και αλκοολούχα ποτά, πηγές οι οποίες είναι υπεύθυνες για χαρακτηριστικά όπως το χρώμα, το άρωμα και η γεύση (Sarıhan et al., 2021). Ανήκουν στην κατηγορία των πολυφαινολών, της ευρύτερης οικογένειας των φαινολικών ενώσεων και εμφανίζουν δομική ποικιλομορφία με τουλάχιστον έξι χιλιάδες διαφορετικές δομικές παραλλαγές (Khan et al., 2021). Το κοινό χαρακτηριστικό των διαφορετικών αυτών δομικών μορφών, είναι ένας φαινυλοβενζοπυρανικός σκελετός, δηλαδή ένας ανθρακικός σκελετός, με 15 άτομα άνθρακα και δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με έναν ετεροκυκλικόπυρανικό δακτύλιο. Με βάση τα δομικά τους αυτά χαρακτηριστικά, ταξινομούνται σε έξι διακριτές κατηγορίες: α) τις φλαβόνες, β) φλαβανόνες, γ) φλαβανόλες, δ) ανθοκυανίνες, ε) φλαβονόλες, και στ) ισοφλαβόνες (**Εικόνα 25**).



Εικόνα 25: Οι χημικές δομές των έξι χαρακτηριστικών κατηγοριών των φλαβονοειδών καθώς και των πηγών προέλευσής τους (Ανατύπωση από Sarian et al., 2021).

Η χρυσίνη χρησιμοποιείται σαν εγκλωβισμένη ουσία των νανοφορέων, λόγω των σημαντικών βιολογικών και φαρμακευτικών ιδιοτήτων που διαθέτει (αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, νεφροπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική και καρδιοπροστατευτική δράση (Falbo & Aiello, 2023, Gao et al., 2021, Mani & Natesan, 2018), **(Εικόνα 26)**. Η χορήγησή της σε συγκεκριμένη δοσολογία έχει τα ακόλουθα θεραπευτικά αποτελέσματα : α) αντικαρκινική δράση μέσω της αναστολής ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων, β) δράση κατά της παχυσαρκίας μέσω της ρύθμισης της πρωτεϊνουρίας, γ) βελτίωση της ανταπόκρισης στο οξειδωτικό στρες, δ) ρύθμιση της καρδιαγγειακής λειτουργίας μέσω καταστολής βιοχημικών μονοπατιών που μπορεί να οδηγήσουν σε θρόμβωση και βλάβη της αορτής του ενδοθηλίου, ε) αντιφλεγμονώδης δράση μέσω της ρύθμισης της έκκρισης κυτταροκινών που συνδέονται με χρόνιες παθήσεις, στ) προστατευτική δράση έναντι αλλεργικών αντιδράσεων, ζ) βελτίωση δυσλειτουργιών που σχετίζονται με το γυναικείο και ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα και η) ηπατοπροστατευτική δράση και διασφάλιση της ομαλής ηπατικής λειτουργίας (Naz et al., 2019). Ωστόσο, παρά τις πολυάριθμες ευεργετικές της λειτουργίες, η χρυσίνη παρουσιάζει χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και κατ'επέκταση χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, με αποτέλεσμα να απορροφάται με δυσκολία

από τον οργανισμό (Falbo & Aiello, 2023). Το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με την ενσωμάτωση της χρυσίνης σε πολυμερικά νανοσυστήματα, τα οποία θα ενισχύσουν την κυκλοφορία και απορρόφηση του μη υδατοδιαλυτού αυτού θεραπευτικού παράγοντα.



Εικόνα 26: Οι θεραπευτικές ιδιότητες της χρυσίνης (Ανατύπωση από Naz et al., 2019).

2.5. Νανοσυστήματα και Αιμοσυμβατότητα

Τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων έχουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς δύνανται να ενισχύσουν τη φαρμακολογική και θεραπευτική λειτουργία ποικίλων βιοδραστικών ενώσεων, επηρεάζοντας άμεσα τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, το χρόνο και το ποσοστό αποδέσμευσής τους, τη διάρκεια και την περιοχή δραστηριοποίησής τους καθώς και το συνολικό θεραπευτικό τους αποτέλεσμα. Με τον τρόπο αυτό οι νανοφορείς καθορίζουν τη φαρμακοδυναμική και φαρμακοκινητική του θεραπευτικού παράγοντα που μεταφέρουν (Talebi et al., 2021). Στην προσπάθειά τους να αυξήσουν το βαθμό βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων που εγκλωβίζουν, αλληλοεπιδρούν με τα κύτταρα των διάφορων ιστών του ανθρώπινου οργανισμού. Η σημαντικότερη αλληλεπίδραση τους είναι με τα κύτταρα του αίματος, η οποία θα καθορίσει και το βαθμό αιμοσυμβατότητας υπό την παρουσία των νανοσυστημάτων.

Κατά την είσοδό τους στην κυκλοφορία του αίματος και την ενδοφλέβια χορήγησή τους, τα νανοσυστήματα έρχονται σε πρώτη επαφή με τα ερυθροκύτταρα, τα οποία

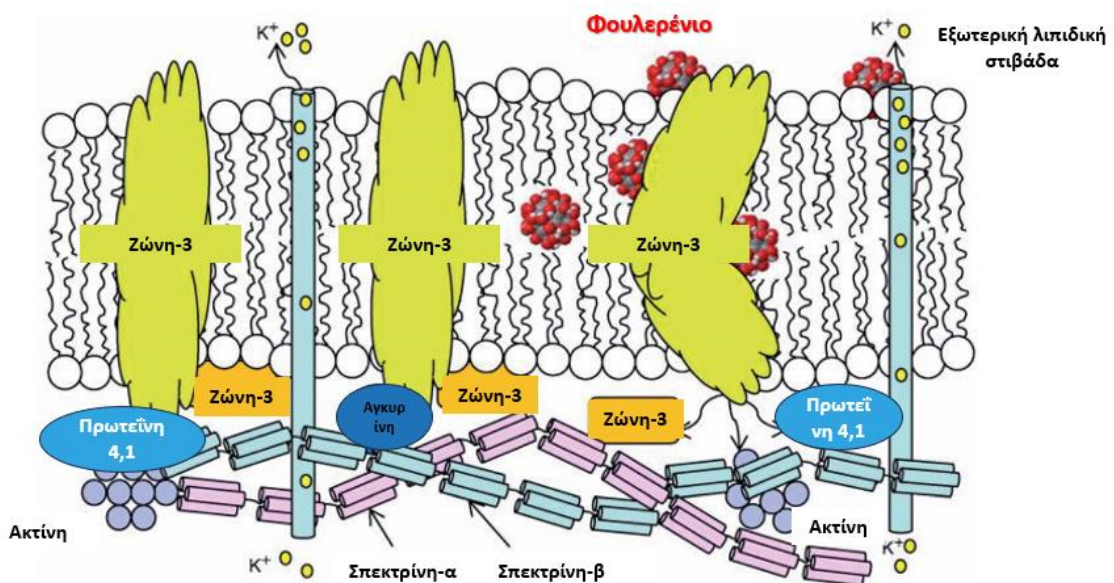
αποτελούν και την πολυπληθέστερη ομάδα των κυττάρων του αίματος. Ο απώτερος σκοπός της μελέτης της αλληλεπίδρασης μεταξύ νανοσυστημάτων και ερυθροκυττάρων, είναι να χρησιμοποιηθούν τα ίδια τα ερυθροκύτταρα ως βιονικοί φορείς φαρμάκων. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημιζωής των θεραπευτικών παραγόντων *in vivo* καθώς και την καλύτερη στόχευση των κυττάρων «στόχων» (Tian et al., 2021).

2.5.1. Νανοσυστήματα και Αιμόλυση

Έχει παρατηρηθεί ότι τα νανοσυστήματα διαθέτουν αιμολυτικές ιδιότητες, στις οποίες συμβάλλουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που διαθέτουν, όπως το επιφανειακό τους φορτίο, το μέγεθος, η γεωμετρική τους κατανομή, η περιεκτικότητα σε οξυγόνο, η λιπιδική υπεροξείδωση κ.α. Η αιμολυτική δράση των NPs βασίζεται κυρίως στην ικανότητά τους να διαλύουν την ερυθροκυτταρική μεμβράνη και κατ'επέκταση να παρεμβαίνουν στους ενδοκυτταρίους μηχανισμούς. Η δυναμική των νανοσυστημάτων να προκαλούν βλάβες στα κύτταρα με τα οποία αλληλοεπιδρούν, ανήκει στον ευρύτερο τομέα της νανοτοξικολογίας. Οι σύγχρονες ερευνητικές προσεγγίσεις, που αφορούν στην αιμοσυμβατότητα των νανοσωματιδίων, εστιάζουν στη συμβολή τους τόσο στην αιμόλυση όσο και στην ερυθρόπτωση των κυττάρων, καθώς και για το ποιος από αυτούς τους δύο μηχανισμούς είναι ο επικρατέστερος (Tian et al., 2021; Tkachenko, 2024).

Ο βασικός ρόλος των νανοσυστημάτων στην αιμόλυση των ερυθροκυττάρων, εντοπίζεται στην επίδρασή τους στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, καθώς καταφέρνουν να ελαχιστοποιούν τη σταθερότητα της, πλήττοντας τη συνολική λειτουργικότητα του ερυθροκυττάρου (Luna-Vázquez-gómez et al., 2021; Yedgar et al., 2022). Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του φουλερενίου – γνωστό ανόργανο νανοϋλικό που συγκαταλέγεται στα αλλότροπα του άνθρακα – η αλληλεπίδραση του οποίου με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη είχε ως αποτέλεσμα την αλλοίωση του κυτταροσκελετού καθώς και ολόκληρης της ερυθροκυτταρικής μορφολογίας. Οι μεταβολές αυτές οφείλονται στην ικανότητα των φουλερενίων καθώς τοποθετούνται στο εξωτερικό λιπιδικό υπόστρωμα, να συνδέονται με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη ζώνη-3 αλλά και με τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού όπως η σπεκτρίνη, η ακτίνη κ.α. **(Εικόνα 27)**. Με τον τρόπο αυτό αναστέλλονται βασικές λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης, με σημαντικότερη τη δυνατότητα ελαστικής παραμόρφωσης, μέσω της οποίας τα ερυθροκύτταρα κυκλοφορούν στους διάφορους ιστούς και διαπερνούν στενά τριχοειδή αγγεία. Επηρεάζεται ακόμη η σταθερότητα, η

κινητικότητα και η ισορροπημένη πρωτεϊνική σύσταση της ερυθροκυτταρικής αυτής δομής με αποτέλεσμα την ευκολότερη λύση του κυττάρου και την αυξημένη πιθανότητα δημιουργίας συσσωματωμάτων (Tkachenko, 2024). Οι μεμβρανικές αυτές διαταραχές μπορεί να οδηγήσουν σε μηχανισμούς επαγωγής της απόπτωσης των ερυθροκυττάρων, όπως τα αυξημένα ποσοστά εξωτερίκευσης της PS αλλά και η καταστολή του μορίου CD47. Συμπερασματικά, έχει αποδειχθεί ότι με την επίδραση των νανοσυστημάτων, μειώνεται το προσδόκιμο ζωής των ερυθροκυττάρων (Tian et al., 2021).



Εικόνα 27: Οι σχέσεις αλληλεπίδρασης του φουλερενίου με τις βασικές πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Στην εικόνα φαίνεται η πρόσδεση του νανοϋλικού στη διαμεμβρανική πρωτεΐνη ζώνη-3, η οποία κατ'επέκταση επηρεάζει τη σύνδεσή της με τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (Ανατύπωση από Tkachenko, 2024).

Ωστόσο η αιμολυτική δράση των νανοσυστημάτων δεν περιορίζεται στην τροποποίηση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Έχει παρατηρηθεί ότι τα νανοσυστήματα συμμετέχουν και στο οξειδωτικό στρες. Η αλληλεπίδραση ερυθροκυττάρων και νανοσυστημάτων οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και κατ' επέκταση στην ενίσχυση του οξειδωτικού στρες. Οι συνθήκες αυτές υψηλής οξείδωσης έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικές βιολογικές διακυμάνσεις για το ερυθροκύτταρο, όπως η υπεροξείδωση της μεμβράνης και οξείδωση των μεμβρανικών

πρωτεϊνών που τελικώς οδηγούν σε ομοιοστατική ανισορροπία και αιμόλυση (Li et al., 2008; Sahoo et al., 2016).

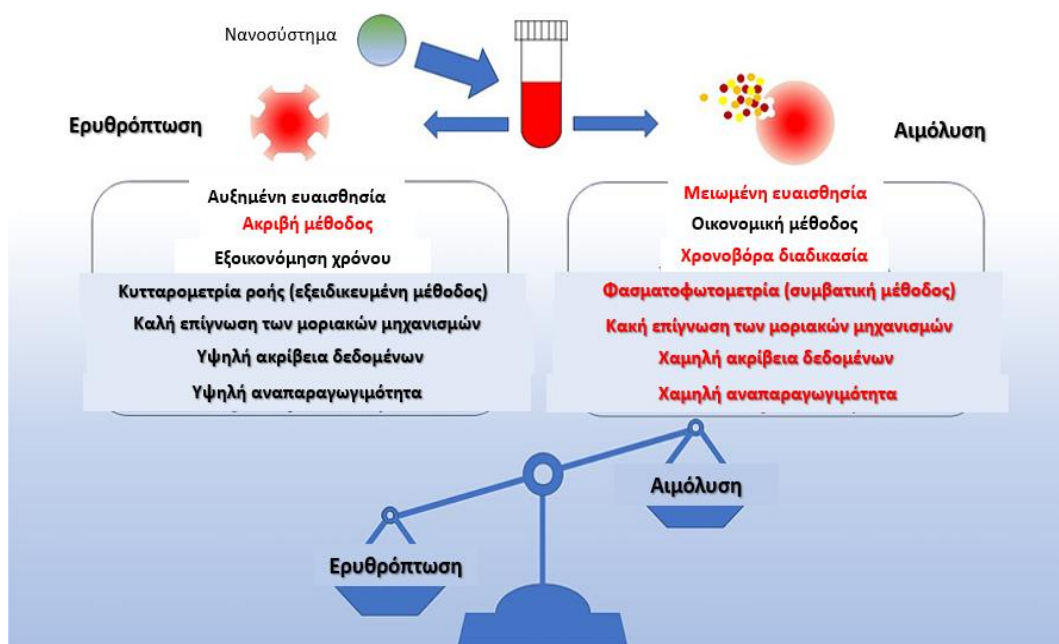
Ωστόσο υπάρχουν ερευνητικές προσεγγίσεις που υποστηρίζουν ότι τα νανοϋλικά μπορούν να προστατεύουν το ερυθροκύτταρο από την λύση ειδικά κάτω από συνθήκες υψηλής ενεργειακής ακτινοβολίας. Ο κυριότερος προστατευτικός τους ρόλος είναι η δέσμευση των παραγόμενων δραστικών οξειδωτικών ριζών (ROS) και η απομάκρυνσή τους, με απώτερο σκοπό την αποφυγή της αιμόλυσης (Grebowski et al., 2018). Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι η χρήση νανοσυστημάτων μπορεί να αυξήσει το χρόνο επιβίωσης των αποθηκευμένων ερυθρών, γεγονός που δημιουργεί νέες προοπτικές στον τομέα της ιατρικής των μεταγγίσεων (Fortis et al., 2024; Ma et al., 2014).

2.5.2. Νανοσυστήματα και Ερυθρόπτωση

Είναι γνωστό πως η ερυθρόπτωση, όπως ήδη έχει αναφερθεί, συνοδεύεται από κυτταρική συρρίκνωση και αυξημένη έκφραση κυτοσολικών κατιόντων Ca^{+2} (Lang et al., 2012). Η αλληλεπίδραση των νανοσυστημάτων με τα ερυθροκύτταρα οδηγεί σε όλες τις περιπτώσεις σε υψηλά επίπεδα εξωτερίκευσης κατιόντων ασβεστίου και αυτό έχει ως επακόλουθο την ασυμμετρία της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και κατ'επέκταση την ενισχυμένη εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (Föllner & Lang, 2020). Η ανίχνευση αυτής της ανισορροπίας στη σύσταση της πρωτεϊνικής μεμβράνης, επιτυγχάνεται με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής και τη χρήση ειδικά σημασμένων αντισωμάτων. Αξίζει να αναφερθεί ότι η υψηλή έκφραση κυτοσολικών Ca^{+2} , μπορεί να προκληθεί και από την επαγόμενη παραγωγή ROS, την πιο συχνή αιτία νανοτοξικότητας (Khanna et al., 2015). Η ερυθρόπτωση υπό την επίδραση των νανοϋλικών, προκαλεί επίσης λιπιδική υπεροξείδωση, μειωμένη εξάντληση γλουταθειόνης και τροποποίηση της λειτουργίας αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η δισμουτάση υπεροξειδίου (Chen et al., 2022).

Ο έλεγχος της νανοτοξικότητας πραγματοποιείται τόσο με τις δοκιμασίες ερυθρόπτωσης όσο και με τις δοκιμασίες αιμόλυσης. Η σύγκριση των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων των δύο αυτών μηχανισμών, αποτελεί τον κύριο στόχο των ερευνητικών προσεγγίσεων που αφορούν στην επίδραση των νανοσυστημάτων στην αιμοσυμβατότητα. Η κυριότερη διαφορά τους εντοπίζεται στο ότι η αιμόλυση επαγόμενη

από τα νανοσυστήματα σχετίζεται με βλάβες στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και τις έμμεσες συνέπειες αυτών ενώ η ερυθρόπτωση επαγόμενη από τα νανοϋλικά συνδέεται με την αυξημένη έκφραση των ROS και των ενδοκυττάρων κυτοσολικών κατιόντων ασβεστίου (Tkachenko, 2024). Σημαντική είναι και η συσχέτιση που αφορά στο ρόλο της «πρωτεΐνης κορόνα», η οποία δημιουργείται μέσω της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης των νανοσυστημάτων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (Monopoli et al., 2011). Το πρωτεϊνικό αυτό στρώμα αποτελεί ένα βασικό δομικό στοιχείο της επιφάνειας των νανοσυστημάτων, το οποίο έχει την ικανότητα να τροποποιεί τη λειτουργικότητά τους και ορισμένα βιολογικά τους χαρακτηριστικά (Konduru et al., 2017). Όσον αφορά στον αιμολυτικό χαρακτήρα των νανοσυστημάτων, η πρωτεΐνη αυτή λοιπόν λειτουργεί προστατευτικά, ενώ ο ρόλος της στο μηχανισμό της ερυθρόπτωσης είναι διαφορετικός και δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως (Chen et al., 2022). Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της αιμολυτικής και ερυθροπρωτικής συμπεριφοράς των νανοσυστημάτων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 28**, με τις πειραματικές δοκιμασίες της ερυθρόπτωσης να έχουν πλεονεκτική θέση στον έλεγχο του βαθμού νανοτοξικότητας.



Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση της σύγκρισης των πλεονεκτικών και μειονεκτικών χαρακτηριστικών των διαδικασιών ελέγχου αιμόλυσης και ερυθρόπτωσης, υπό την επίδραση των νανοσυστημάτων. Τα πλεονεκτήματα αναγράφονται με μαύρο χρώμα ενώ τα μειονεκτήματα με κόκκινο. Στην εικόνα φαίνεται ότι οι δοκιμασίες ερυθρόπτωσης προτιμώνται για τους ελέγχους νανοτοξικότητας (Ανατύπωση από Tkachenko, 2024).

Κεφάλαιο 3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Σκοπός της ερευνητικής μελέτης

Η χρήση πολυμερικών νανοσωματιδίων για τη μεταφορά θεραπευτικών ουσιών μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ενδείκνυται λόγω του υψηλού βαθμού διαθεσιμότητας τους, είναι γνωστό όμως ότι μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργικότητα και βιωσιμότητα των κυττάρων του αίματος. Σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης, ήταν η αξιολόγηση του βαθμού αιμοσυμβατότητας των πολυμερικών νανοσυστημάτων αλγινικού – χρυσίνης έπειτα από την αλληλεπίδρασή τους με τα ερυθροκύτταρα υγιών αιμοδοτών.

Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης εργασίας συγκεντρώθηκαν δείγματα ολικού αίματος, από 15 υγιείς εθελοντές αιμοδότες. Τα δείγματα αυτά επεξεργάστηκαν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να παρατηρηθεί τελικώς η συμπεριφορά των ερυθροκυττάρων, ύστερα από την αλληλεπίδρασή τους με τα πολυμερικά νανοσωματίδια αλγινικού – χρυσίνης.

3.2. Υλικά και Αντιδραστήρια

3.2.1. Αναλώσιμα

- Πεταλούδες αιμοληψίας 21 G (BD Vacutainer)
- Σωληνάρια αιμοληψίας Citrate (BD)
- Γυάλινα αποστειρωμένα σωληνάρια
- Cryotubes (Cryovial, Simport)
- Eppendorfs χωρητικότητας 1,5 mL (FL Medical)
- Falcons διαφόρων όγκων (FALCON)
- Ρύγχη για πιπέτες εταιρίας Gilson
- Κυβέτες φωτόμετρου (Eppendorf)

- Σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής (Facs Tubes)
- Μεταλλικά σφαιρίδια
- Αντικειμενοφόρες πλάκες για μικροσκόπηση (BioOptica)
- Καλυπτρίδες (Knittel GLASS)
- Τριχοειδή (VITREX MEDICAL A/S)
- Πλαστικά Pasteur για απόχυση (APTACA)

3.2.2. Όργανα, Συσκευές και Αναλυτές

- Αναλυτής κυτταρομετρίας, BD FACS Canto II, BD Bioscience.
- Αιματολογικός αναλυτής, CONVERGYS X3 NG.
- Φασματοφωτόμετρο τύπου LKB Novaspec.
- Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος, MicroCL17 (Thermo Fisher Scientific).
- Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος, Hettich Micro 22R.
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας (Kern Q Control).
- Ηλεκτρονικό πεχάμετρο (Consort C3860)
- Επωαστικός κλίβανος τύπου « Shake n Stack» (Hybaid).
- Υδατόλουτρα (Thermo Fisher Scientific).
- Μηχανικός αναδευτήρας (VELP SCIENTIFICA)
- Πιπέτες εταιρίας BD.

3.3.3. Χημικά Αντιδραστήρια και αντισώματα

- Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl)
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH)
- Αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS)
- Hepes
- Πυροσταφιλικό νάτριο
- Σουκρόζη
- Γλυκόζη

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- CM- H_2DCFDA (Invitrogen)
- Φαινυλιδραζίνη (PHZ) σε σκόνη (Sigma)
- Bovine Serum Albumin, BSA, Sigma
- Μεθανόλη
- Tween-20
- Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
- Fluo-4 AM, Thermo Fisher Scientific
- Annexin-V PE, ImmunoTools
- Anti-glycophorin A-FITC (CD235), (Becton Dickinson)

3.3. Συλλογή, προετοιμασία και ανάλυση δειγμάτων

Οι μετρήσεις των αιμολυτικών και κυτταρομετρικών παραμέτρων πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα αίματος ύστερα από επώασή τους με τα πολυμερικά νανοσυστήματα αλγινικού. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, συλλέχθηκε αίμα υγιών αιμοδοτών, διαφόρων ηλικιών (20 έως 48 ετών). Η συλλογή ολικού αίματος των εθελοντών αιμοδοτών έγινε σε σωληνάρια με βασικό αντιπηκτικό τα κιτρικά. Ένα σωληνάριο με ολικό αίμα χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αιμόλυσης *in vivo*. Τα αποτελέσματα αυτά αξιολογήθηκαν ως μάρτυρες (controls) πριν την επώαση με τα νανοϋλικά. Αρχικά τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 1.000 g για 10 λεπτά και ακολούθησε η απομάκρυνση της στιβάδας των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων (buffy coat). Στη συνέχεια έγινε μεταφορά των δειγμάτων σε falcon και πραγματοποιήθηκε η πλύση τους με ισότονο διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline).

Μετά την πρώτη αυτή πλύση, ακολούθησε η επώαση των δειγμάτων με τα τρία διαφορετικά διαλύματα των NPs (NP1, NP2 και NP3), σε συγκεκριμένη συγκέντρωση, στους 37° C. Το διάλυμα NP1 περιείχε τα παρασκευασμένα νανοσυστήματα αλγινικού μαζί με την εγκλωβισμένη χρυσίνη διαλυμένα σε PBS, το NP2 μόνο τα νανοσυστήματα διαλυμένα σε PBS ενώ το NP3 περιείχε τη διαλυμένη χρυσίνη. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε και ένα τέταρτο δείγμα, το αραιωμένο αίμα χωρίς την προσθήκη κάποιου διαλύματος, που αποτέλεσε το μάρτυρα (control) μετά την επώαση με

τα νανοσυστήματα. Αφού αναμίχθηκε το αίμα με τα NPs, τα δείγματα επώαστηκαν με ήπια ανάδευση στους 37° C για 4 ώρες. Όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα εφαρμόστηκαν στα δείγματα μετά την επώαση και έτσι παρατηρήθηκαν τα επίπεδα αιμόλυσης υπό την επίδραση των προαναφερθέντων νανοσυστημάτων.

3.3.1. Αιμολυτικές παράμετροι

3.3.1.α. Ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος

Η συγκέντρωση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος υπολογίστηκε φωτομετρικά, έπειτα από φυγοκέντρηση του δείγματος μετά την επώαση στα 1000 G για 10 λεπτά και αραίωση του υπερκείμενου. Η φωτομετρική αυτή μέθοδος κατά Harboe (Harboe 1959) πραγματοποιείται σε τρία μήκη κύματος 380, 415 και 450 nm και βασίζεται στο ότι το μέγιστο απορρόφησης της οξυ-αιμοσφαιρίνης είναι στα 415 nm. Οι μετρήσεις στα άλλα δύο μήκη κύματος γίνονται για την αφαίρεση του μεγίστου απορρόφησης των ουσιών που επίσης απορροφούν στα 415 nm. Η τελική συγκέντρωση δίνεται από τον τύπο: $Hb (mg/100 ml) = [(167,2 \times A_{415}) - (83,6 \times A_{380}) - (83,6 \times A_{450}) \times 1/1.000 \times \text{αραίωση} \times 100$ (Tzounakas et al., 2021).

3.3.1.β. Μέτρηση ωσμωτικής ευθραυστότητας

Η αξιολόγηση της ωσμωτικής ανθεκτικότητας των ερυθροκυττάρων πραγματοποιήθηκε με την έκθεση αίματος επωασμένο με νανοϋλικά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε διαδοχικές συγκεντρώσεις NaCl. Το διάλυμα 0,9% NaCl είναι ισότονο διάλυμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση που παρατηρείται 0% αιμόλυση, ενώ το 0% NaCl (απιονισμένο νερό) ως η συγκέντρωση που παρατηρείται 100% αιμόλυση. Μετά την παρασκευή διαλυμάτων αυξανόμενης συγκέντρωσης (0%-0,9% NaCl) ακολούθησε προσθήκη ολικού δείγματος (αραίωση 1/100), επώαση για 15 min, φυγοκέντρηση σε 1.500 RPM για 5 min και τελική φωτομέτρηση υπερκειμένου στα 540 nm. Με την κατασκευή της καμπύλης ωσμωτικής ευθραυστότητας – ποσοστό απορρόφησης προς συγκέντρωση NaCl – υπολογίστηκε ο δείκτης ωσμωτικής ευθραυστότητας, MCF. Ο δείκτης αυτός ορίζεται ως η συγκέντρωση NaCl που παρατηρείται το 50% λύσης των ερυθροκυττάρων (Bouchla et al., 2022; Tzounakas et al., 2021).

3.3.1.γ. Μέτρηση μηχανικής ευθραυστότητας

Τα ερυθροκύτταρα αναδεδύτηκαν παρουσία ειδικών μεταλλικών σφαιριδίων για 1 ώρα, για την πρόκληση μηχανικού στρες. Μετά από αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στους 4°C σε διαφορετικές συνθήκες και μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης κατά Harboe στο τελικό υπερκείμενο. Με δείγμα 20% αιματοκρίτη υπολογίστηκε και η ενδοκυττάρια Hb κατά Harboe, με τη μέθοδο διαδοχικών αραιώσεων. Ο δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας, MFI υπολογίστηκε από τον τύπο: $MFI \% = [(Ελεύθερη Hb_{με\ σφαιρίδια} - Ελεύθερη Hb_{μάρτυρας}) / (Hb_{20\%} - Ελεύθερη Hb_{μάρτυρας}) \times 100$ (Bouchla et al., 2022).

3.3.1.δ. Οξειδωτικά Επαγόμενη Αιμόλυση

Η οξειδωτική καταπόνηση των ερυθροκυττάρων, ύστερα από την επίδραση των νανοσυστημάτων, αξιολογήθηκε με τη μέτρηση της οξειδωτικής αιμόλυσης. Για τον υπολογισμό της πραγματοποιήθηκε η επώασή των δειγμάτων με φαινυλυδραζίνη (PHZ). Πρόκειται για ένα μόριο που προκαλεί βλάβες στη δομή της αιμοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα η δεύτερη να έχει την ικανότητα να προσκολλάται στην κυτταρική μεμβράνη και τον κυτταροσκελετό, προσδίδοντάς τους έτσι ακαμψία και μειωμένη σταθερότητα. Όλα αυτά διευκολύνουν τη λύση των ερυθροκυττάρων (Ramot et al., 2008). Όσον αφορά στο πειραματικό πρωτόκολλο, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 1000 G για 10 λεπτά, αραιώθηκαν με ισότονο διάλυμα PBS και επώαστηκαν για 1 ώρα με την προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα PHZ (17 mM) στους 37° C. Μετά το τέλος της επώασης, ακολούθησε μια φυγοκέντρηση στα 1.000 G για 10 λεπτά και το υπερκείμενο αραιώθηκε με απιονισμένο νερό και φωτομετρήθηκε κατά Harboe (Tzounakas et al., 2022).

3.3.1.ε. Υπολογισμός ποσοστού Κρυοαιμόλυσης

Η μέθοδος αυτή αποσκοπεί στον υπολογισμό του ποσοστού αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων σε συνθήκες έντονου θερμοκρασιακού στρες. Για την πραγματοποίηση του πειράματος παρασκευάστηκε buffer σουκρόζης (0,7 M). Χρησιμοποιήθηκε ισότονο κρύο διάλυμα NaCl 0,9% με το οποίο τα δείγματα πλύθηκαν 3 διαδοχικές φορές, έτσι ώστε τα RBCs να πακεταριστούν σε ένα ποσοστό περίπου 60-70%. Τα πακεταρισμένα πλέον ερυθροκύτταρα προστέθηκαν σε σωληνάρια που περιείχαν διάλυμα σουκρόζης. Το απιονισμένο νερό χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για την 100% αιμόλυση. Πριν την

προσθήκη του δείγματος, τα σωληνάρια αυτά είχαν επωαστεί για 10 λεπτά στους 37° C. Ακολούθως, τα σωληνάρια με τα δείγματα αναδεύτηκαν ήπια και επώαστηκαν στους 37° C για 10 λεπτά, ενώ στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στον πάγο (4° C) και φυγοκεντρήθηκαν. Τα υπερκείμενα αραιώθηκαν σε απιονισμένο νερό και φωτομετρήθηκαν στα 540 nm. Ο υπολογισμός του ποσοστού % κρυσταλλοποίησης δόθηκε από τον ακόλουθο μαθηματικό τύπο: $Cryohemolysis (\%) = (OD_{\text{δείγματος}540} / OD_{\text{δείγματος}100\% \text{αιμόλυσης}}) \times 5$, όπου OD είναι η απορρόφηση που εμφανίζουν τα δείγματα στα 540 nm (Emilse et al., 2018).

3.2. Ενδοκυττάρια Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου (ROS)

Τα ενδοκυττάρια επίπεδα δραστικών ριζών οξυγόνου (Intracellular Reactive Oxygen Species, iROS) μετρήθηκαν με τη χρήση του εστέρα CMH₂DCFDA. Ο εστέρας αυτός χαρακτηρίζεται ως λιπόφιλος και δύναται να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και να εισχωρεί στο εσωτερικό του κυττάρου. Με την επίδραση ειδικών εστερασών, εγκλωβίζεται στο κύτταρο όπου προκαλείται οξείδωση του εστέρα και κατ'επέκταση παραγωγή οξειδωτικών ριζών. Η μέση ένταση φθορισμού των επιπέδων αυτών οξειδωτικών ριζών αντιστοιχεί στη συγκέντρωση των ROS. Πειραματικά, τα κύτταρα (μετά την επώαση με τα νανοϋλικά) αραιώθηκαν με ισότονο διάλυμα PBS. Στη συνέχεια επώαστηκαν σε διάλυμα γλυκόζης 5 mM με προσθήκη του εστέρα για 1 ώρα στους 37° C. Μέσω κυτταρομετρίας ροής (BD FACS Canto II, BD Bioscience) υπολογίστηκαν η μέση ένταση φθορισμού και το ποσοστό των ROS θετικών κυττάρων. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό BD FACS Diva™ Software (Rzagalinski et al., 2020).

3.3. Εξωτερίκευση Φωσφατιδυλοσερίνης

Με κυτταρομετρία ροής υπολογίστηκε το ποσοστό εξωτερίκευσης της φωσφατιδυλοσερίνης (PS), η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, έπειτα από την επίδραση των νανοσυστημάτων. Κατά την πειραματική διαδικασία, τα κύτταρα επώαστηκαν με το σημασμένο αντίσωμα ισοθειοκυανική φθοροεσκεΐνη (FITC) έναντι της γλυκοφορίνης-A (CD235), η οποία αποτελεί σημαντικό ερυθροκυτταρικό δείκτη καθώς και με την αννεξίνη V (Annexin-V) με φθοριόχρωμα την φυκοερυθρίνη (PE). Η επώαση έγινε σε σωληνάρια κυτταρομετρίας, τα οποία τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος για 20 λεπτά, σε ρυθμιστικό διάλυμα αννεξίνης. Το διάλυμα αυτό επαναχρησιμοποιήθηκε για τη διακοπή της αντίδρασης. Μέσω

κυτταρομετρίας ροής (BD FACS Canto II, BD Bioscience) υπολογίστηκε το ποσοστό εξωτερίκευσης της PS, καθώς η FITC εκπέμπει στα 520 nm και η PE στα 580 nm. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό BD FACS Diva™ Software (Tzounakas et al., 2016).

3.4. Εξωτερίκευση ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου Ca^{+2}

Η μέθοδος αυτή αποσκοπεί στον ακριβή προσδιορισμό των ενδοκυττάρων επιπέδων κυτοσολικών κατιόντων ασβεστίου Ca^{+2} . Για τον υπολογισμό της συσσώρευσης αυτής του ασβεστίου, χρησιμοποιήθηκε ο λιπόφιλος εστέρας Fluo 4-AM, ο οποίος έχει επίσης την ικανότητα να διαπερνά τη μεμβράνη του ερυθροκυττάρου και να εγκλωβίζεται σε αυτή. Η αντίδρασή του εστέρα με τα κατιόντα ασβεστίου οδηγεί σε επίπεδα φθορισμού τα οποία αντιστοιχούν στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση του Ca^{+2} . Πειραματικά τα δείγματα αραιώθηκαν με ισότονο διάλυμα PBS και επώαστηκαν παρουσία του εστέρα Fluo 4-AM στους 37° C. Η επώαση αυτή πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση και παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου. Για τη διακοπή της αντίδρασης, επαναχρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο διάλυμα. Μέσω κυτταρομετρίας ροής (BD FACS Canto II, BD Bioscience) υπολογίστηκαν η μέση ένταση φθορισμού και το ποσοστό των επιπέδων ενδοκυττάρου Ca^{+2} . Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό BD FACS Diva™ Software (Tzounakas et al., 2016)

3.5. Χρώση May-Grünwald-Giemsa και Μικροσκοπική Παρατήρηση των κυττάρων

Οι παρατηρήσεις των προαναφερθέντων πειραματικών διαδικασιών ολοκληρώθηκαν με τη μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων. Επιχρίσματα αίματος, μετά την αλληλεπίδρασή τους με τα νανοϋλικά, βάφτηκαν με τη βασική αιματολογική χρώση May-Grünwald-Giemsa. Πρόκειται για μια πανοπτική χρώση που έχει την ικανότητα να βάψει όλα τα κυτταρικά συστατικά. Όσον αφορά στην πειραματική διαδικασία, τα επιχρίσματα τοποθετούνται αρχικά σε ειδικά μπανάκια και εμποτίζονται με μεθανόλη, έτσι ώστε να επιτευχθεί μονιμοποίηση των κυτταρικών στοιχείων. Στη συνέχεια βάφονται με τη χρωστική May-Grünwald και τέλος με τη χρωστική Giemsa, η οποία είχε προηγουμένως αραιωθεί με τη χρήση απιονισμένου νερού. Μεταξύ του εμποτίσματος στη μεθανόλη αλλά και στις διαφορετικές χρωστικές, πραγματοποιήθηκε απόρριψη της περίσσειας. Ακολούθησαν εκπλύσεις με άφθονο νερό βρύσης και τελικά στέγνωμα σε θερμοκρασία

δωματίου (Fortis et al., 2024). Στη συνέχεια τα επιχρίσματα των δειγμάτων παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο (Olympus CX23 RFS1, 1000x, LED) για χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλοιώσεις. Τα αποτελέσματα της μικροσκόπησης συσχετίστηκαν με τα αποτελέσματα των εργαστηριακών μεθόδων.

3.6. Γενική αίματος

Το αιματολογικό πρότυπο των αιμοδοτών ολοκληρώθηκε με τη διεξαγωγή γενικών αίματος, για τα διαφορετικά δείγματα των 15 υγιών αιμοδοτών. Τα δείγματα μετά την τετράωρη επώασή τους με τα νανοσυστήματα, μεταφέρθηκαν σε ειδικά σωληνάρια και αναλύθηκαν από τον γενικό αιματολογικό αναλυτή CONVERGYS X3 NG. Τα αποτελέσματα των γενικών, υπέδειξαν μεταβολές σε βασικούς αιματολογικούς δείκτες (MCV, RDW κ.α.).

Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα

Από την αξιολόγηση των προαναφερθέντων αιμολυτικών και κυτταρομετρικών παραμέτρων των ερυθρών αιμοσφαιρίων υγιών αιμοδοτών, έπειτα από την αλληλεπίδρασή τους με τα διαλύματα ChR-ALG NPs, ALG-NPs και ChR προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα, τα οποία παρατίθενται υπό τη μορφή πινάκων, γραφημάτων και εικόνων. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται σε σύγκριση με τους μάρτυρες πριν την επώαση καθώς και με τους μάρτυρες μετά την επώαση στους 37° C. Η στατιστική τους επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της εφαρμογής GraphPad 8.0.3 καθώς και με τη διεξαγωγή Wilcoxon t test (paired, non parametric).

4.1. Αιματολογική εικόνα

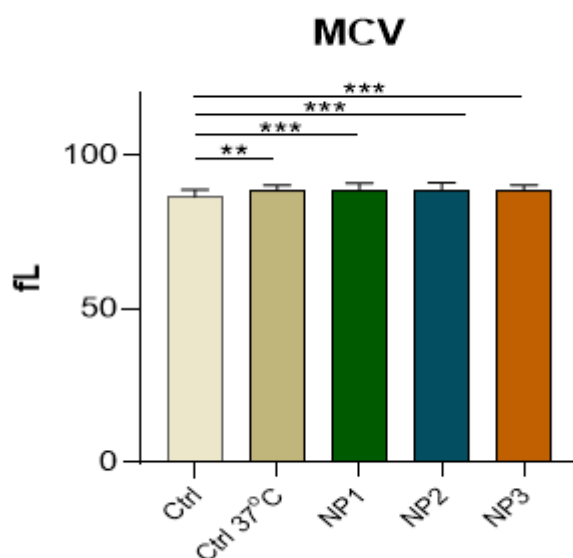
Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζεται το πλήρες αιματολογικό προφίλ των αιμοδοτών, στον οποίο αναγράφονται οι φυσιολογικές τιμές που επιβεβαιώνουν ότι πρόκειται για υγιείς δότες.

<u>ΠΙΝΑΚΑΣ ΓΕΝΙΚΩΝ</u>	<u>ΔΟΤΕΣ</u>	<u>ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ</u>
RBCs ($\times 10^6 / \mu\text{l}$)	4,41 \pm 0,52	♂ : 4,2 – 6,4
		♀ : 3,6 – 5
Hb (gr/dl)	13,11 \pm 1,56	♂ : 14 – 17
		♀ : 12 – 16
Hct (%)	38,06 \pm 4,47	♂ : 42 – 52
		♀ : 37 – 47
MCV (fl)	86,54 \pm 2,40	82 – 98
MCH (pg)	29,76 \pm 1,21	26 – 34
MCHC (g/dl)	34,44 \pm 1,08	31 – 37
RDW (CV%)	15,39 \pm 0,88	11,5 – 14,5

Πίνακας 2: Ο μέσος όρος \pm την τυπική απόκλιση των αιματολογικών δεικτών των αιμοδοτών, πριν την επώαση των ερυθροκυττάρων με τα ναουϊλικά. Παρατηρείται ότι όλες οι τιμές είναι εντός των φυσιολογικών ορίων.

Η γενική ανάλυση αίματος, των δειγμάτων μετά την επώαση με τα νανοσυστήματα, υπέδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση για το Μέσο Όγκο των Ερυθρών

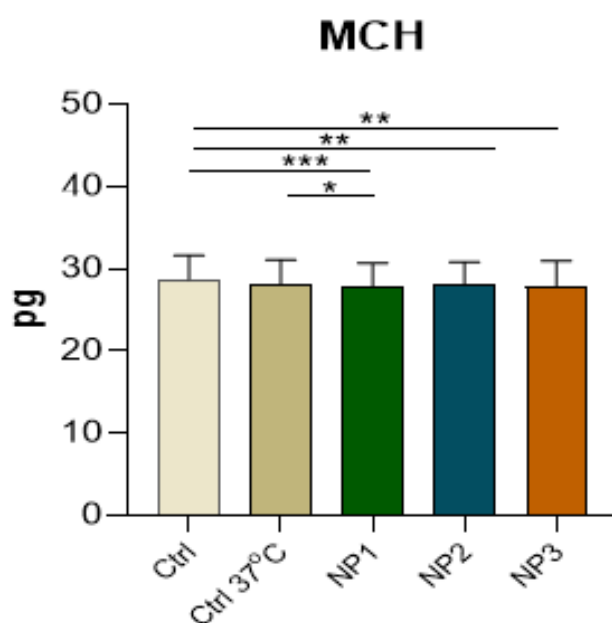
(MCV). Συγκεκριμένα ο δείκτης MCV για το μάρτυρα των ερυθροκυττάρων μετά την επώαση (Ctrl37) ($88,62 \pm 1,71$ fl) καταγράφηκε ελάχιστα μεγαλύτερος από τον MCV του μάρτυρα των φυσιολογικών RBCs (Ctrl) ($86,54 \pm 2,4$ fl), με $p < 0,01$. Ακόμη ο MCV των ερυθροκυττάρων που επώαστηκαν με το διάλυμα NP1 ($89 \pm 2,04$ fl) βρέθηκε να είναι μεγαλύτερος από αυτόν του μάρτυρα πριν την επώαση ($86,54 \pm 2,4$ fl) με $p < 0,001$. Τέλος ο MCV των RBCs που επώαστηκαν με το διάλυμα NP2 ($89,08 \pm 2,06$ fl) και με το διάλυμα NP3 ($88,85 \pm 1,63$ fl) φάνηκε να είναι οριακά αυξημένος και για τα δύο διαλύματα συγκριτικά με τον ίδιο μάρτυρα ($86,54 \pm 2,4$ fl) με $p < 0,001$. Το διάλυμα NP3 (διάλυμα χρυσίνης), είχε τη μικρότερη επίδραση στον MCV σε σχέση με τα υπόλοιπα διαλύματα νανοσυστημάτων, αλλά όλες οι τιμές ήταν κοντά στην τιμή του control μετά την επώαση (Γράφημα 1).



Γράφημα 1: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του δείκτη μέσου όγκου των ερυθρών (MCV) μετά την επίδραση των νανοϋλικών, συγκριτικά με τα controls πριν και μετά την επώαση. (** $p < 0,01$ και *** $p < 0,001$). **Ctrl:** μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37:** μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1:** διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2:** διάλυμα ALG NPs και **NP3:** διάλυμα ChR.

Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων μετά την επώαση με τα νανοϋλικά και των μαρτύρων των αιμοδοτών, παρουσιάστηκε και στο δείκτη Μέσης Περιεκτικότητας Αιμοσφαιρίνης (MCH). Αναλυτικά ο δείκτης MCH των κυττάρων μετά την

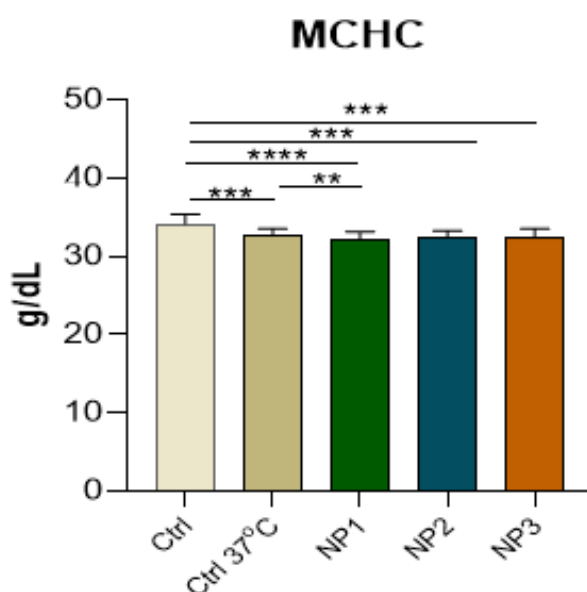
επώαση με το διάλυμα NP1 ($27,75 \pm 2,99$ pg) βρέθηκε να είναι ελάχιστα μικρότερος από τον MCH του μάρτυρα πριν την επώαση ($28,75 \pm 2,9$ pg), με $p < 0,001$. Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε και από τη σύγκρισή του με το μάρτυρα μετά την επώαση ($28,21 \pm 2,87$ pg), με $p < 0,05$. Επιπλέον, ο MCH των ερυθροκυττάρων που επώαστηκαν με το διάλυμα NP2 ($28,01 \pm 2,86$ pg) δεν εμφάνισε σημαντική διαφορά από αυτόν του Ctrl ($28,75 \pm 2,9$ pg) με $p < 0,01$. Τέλος ο MCH των RBCs που επώαστηκαν με το διάλυμα NP3 ($27,98 \pm 2,99$ pg) ήταν οριακά μειωμένος συγκριτικά με το Ctrl, με $p < 0,01$. Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε ότι το διάλυμα NP1 είχε την ίδια επίδραση στον MCH, με το διάλυμα NP3 (Γράφημα 2).



Γράφημα 2: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στον δείκτη μέσης περιεκτικότητας της Hb (MCH), στα δείγματα μετά την επώαση με τα NPs, συγκριτικά με τα αντίστοιχα control τους (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ και *** $p < 0,001$). **Ctrl:** μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37:** μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1:** διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2:** διάλυμα ALG NPs και **NP3:** διάλυμα ChR.

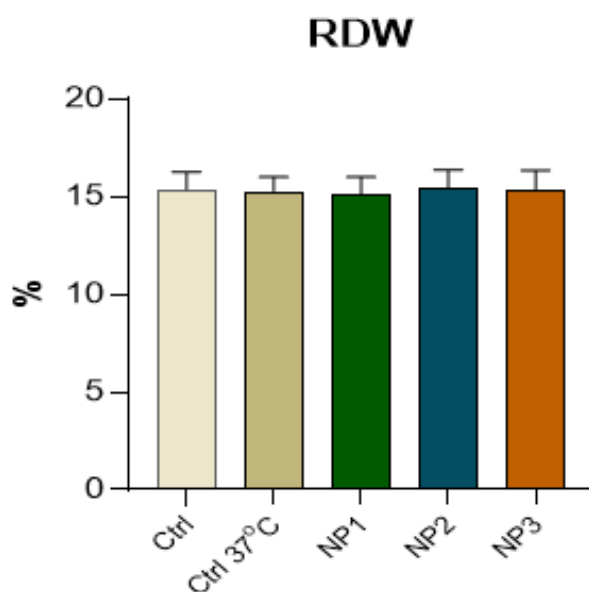
Όσον αφορά στο δείκτη Μέσης Πυκνότητας Αιμοσφαιρίνης (MCHC), (Γράφημα 3) αποτυπώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων μετά την επώαση με τα νανοϋλικά και των μαρτύρων των αιμοδοτών. Συγκεκριμένα ο δείκτης MCHC των ερυθροκυττάρων μετά την επώαση (Ctrl37) ($32,63 \pm 0,92$ gr/dL) βρέθηκε μικρότερος από

τον MCHC των φυσιολογικών κυττάρων (Ctrl) ($34,17 \pm 1,26$ gr/dL), με $p < 0,001$. Επιπρόσθετα ο MCHC των RBCs που επώαστηκαν με το διάλυμα NP1 ($32,09 \pm 1,09$ gr/dL) ήταν μικρότερος κατά τουλάχιστον δύο μονάδες από αυτόν του Ctrl ($34,17 \pm 1,26$ gr/dL) με $p < 0,0001$, ενώ η τιμή του ήταν ίδια με την τιμή του μάρτυρα πριν την επώαση ($32,63 \pm 0,92$ gr/dL), με $p < 0,01$. Το ίδιο αποτέλεσμα, σε σχέση με το μάρτυρα πριν την επώαση, παρουσίασε και ο δείκτης MCHC των κυττάρων που επώαστηκαν με το διάλυμα NP2 ($32,41 \pm 0,90$ gr/dL) καθώς και με το διάλυμα NP3 ($32,38 \pm 1,19$ gr/dL) με $p < 0,001$.



Γράφημα 3: Διαγραμματική απεικόνιση της σύγκρισης των τιμών του δείκτη Μέσης Πυκνότητας Αιμοσφαιρίνης (MCHC), για δείγματα και controls (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ και **** $p < 0,0001$). **Ctrl:** μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37:** μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1:** διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2:** διάλυμα ALG NPs και **NP3:** διάλυμα ChR.

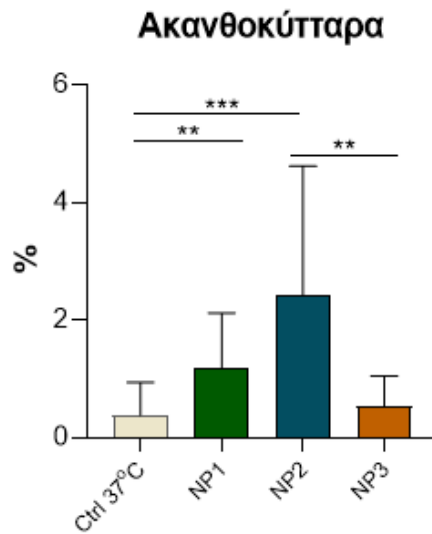
Τέλος, τα αποτελέσματα της γενικής αίματος δεν υπέδειξαν σημαντικά στατιστική διαφορά στις τιμές του δείκτη Εύρους Κατανομής Μεγέθους (RDW) για δείγματα μετά την επώαση και τους αντίστοιχους μάρτυρές τους. Όλες οι τιμές του RDW βρέθηκαν να είναι κοντά στο 15 (**Γράφημα 4**).



Γράφημα 4: Διαγραμματική απεικόνιση της σύγκρισης των τιμών του δείκτη RDW μεταξύ των επωασμένων με NPs δειγμάτων και των αντίστοιχων control τους. **Ctrl:** μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37:** μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1:** διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2:** διάλυμα ALG NPs και **NP3:** διάλυμα ChR.

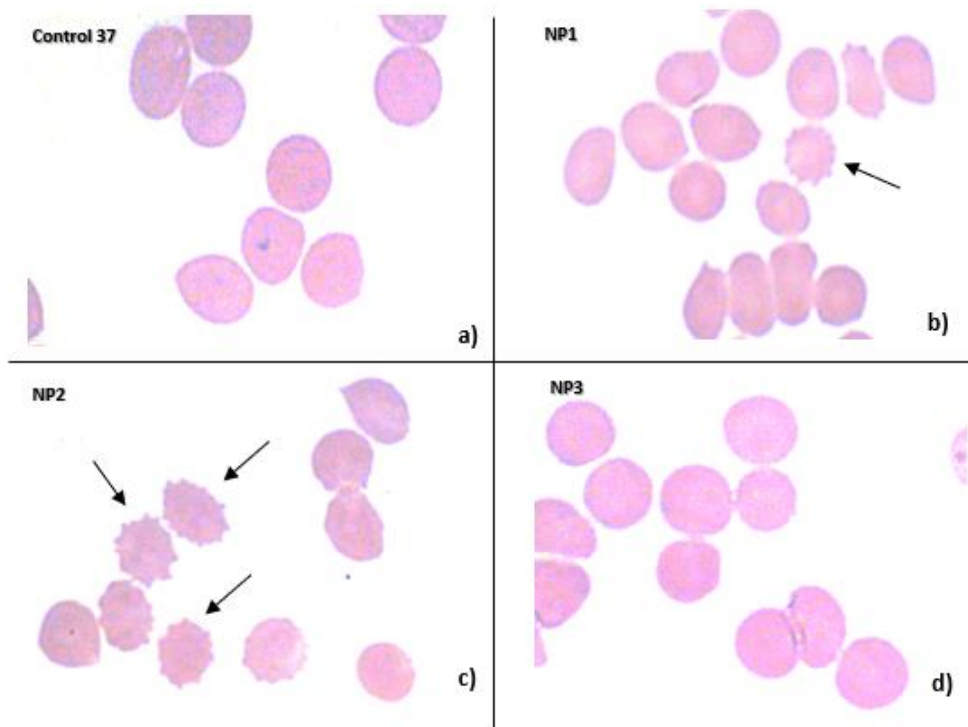
4.2. Μορφολογία ερυθροκυττάρων

Η ανάλυση των μικροσκοπικών εικόνων υπέδειξε ότι η βασική μορφολογική αλλοίωση που υπέστησαν τα ερυθροκύτταρα, μετά την επίδραση των νανοϋλικών, ήταν η παρουσία ακανθωδών προσεκβολών. Οι εικόνες μελετήθηκαν και υπολογίστηκε το ποσοστό των ακανθοκυττάρων σε σχέση με τα φυσιολογικά RBCs (**Γράφημα 5**). Συγκεκριμένα το ποσοστό των ακανθοκυττάρων στα δείγματα που επώαστηκαν με το διάλυμα NP2 ($2,41 \pm 2,2\%$), βρέθηκε να έχει μεγάλη αύξηση, συγκριτικά με το μάρτυρα μετά την επώαση ($0,38 \pm 0,56\%$), με $p < 0,001$. Σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε και στα κύτταρα που επώαστηκαν με το διάλυμα NP1 ($1,17 \pm 0,95\%$), σε σχέση πάντα με το μάρτυρα μετά την επώαση, με $p < 0,01$. Στατιστική σημαντικότητα υπέδειξε και η σύγκριση των συνθηκών NP2 και NP3 ($p < 0,01$), με το ποσοστό των ακανθοκυττάρων που επώαστηκαν με το διάλυμα NP2 να είναι μεγαλύτερο και το ποσοστό εκείνων που επώαστηκαν με το διάλυμα NP3 ($0,54 \pm 0,51$) να είναι κοντά στο μάρτυρα μετά την επώαση.



Γράφημα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του ποσοστού των ακανθοκυττάρων για τα δείγματα μετά την επώαση συγκριτικά με το control μετά την επώαση (** $p < 0,01$ και *** $p < 0,001$). **Ctrl:** μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37:** μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1:** διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2:** διάλυμα ALG NPs και **NP3:** διάλυμα ChR.

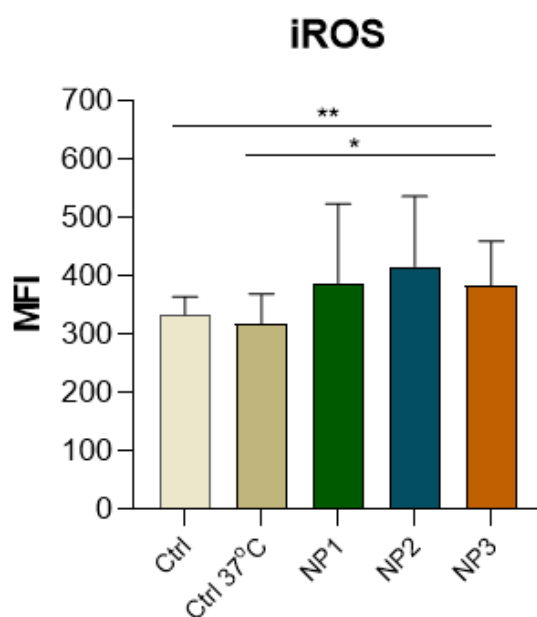
Στην **Εικόνα 29**, παρουσιάζονται ενδεικτικές μικροσκοπικές εικόνες των κυττάρων, βαμμένων με τη χρωστική May-Grünwald-Giemsa, μετά την επώασή τους με τα διαφορετικά διαλύματα νανοσυστημάτων. Η μικροσκοπική παρατήρηση επιβεβαίωσε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ακανθοκυττάρων βρέθηκε στα δείγματα που επώαστηκαν με το διάλυμα NP2 (**εικόνα c**). Η ύπαρξη των ακανθοκυττάρων παρατηρήθηκε και στα δείγματα της συνθήκης NP1 (**εικόνα b**), ενώ τα κύτταρα που επώαστηκαν με το διάλυμα χρυσίνης (NP3) ήταν μορφολογικά όμοια με τα κύτταρα του control (**εικόνες a και d**).



Εικόνα 29: Σχηματική αναπαράσταση των ενδεικτικών εικόνων που έδωσε η μικροσκόπηση, για τα δείγματα μετά την επώαση με τα νανοϋλικά (NP1, NP2 και NP3) και του αντίστοιχου control τους. Με μαύρο βέλος εντοπίζονται τα ακανθοκύτταρα (εικόνες b και c), ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα εμφανίζονται με τη φυσιολογική τους μορφή. Για τη χρώση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η βασική αιματολογική χρώση May-Grünwald-Giemsa.

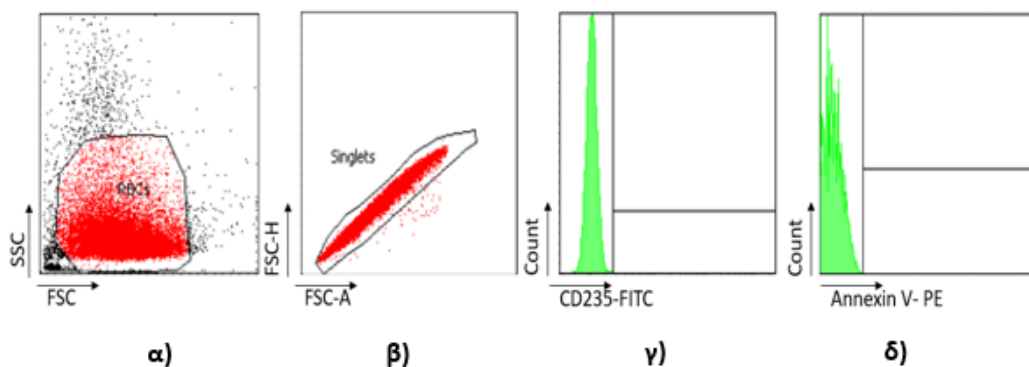
4.3. Ενδοκυττάριας ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

Η μέτρηση των ενδοκυττάριας ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) έδειξε στατιστική σημαντικότητα για τα δείγματα μετά την επώαση με το διάλυμα NP3. Συγκεκριμένα η μέση ένταση φθορισμού (MFI) των ROS στα δείγματα NP3 ($383,9 \pm 76,11$) βρέθηκε να είναι αυξημένη σε σχέση με τους μάρτυρες πριν την επώαση ($333,9 \pm 30,81$) καθώς και με τους μάρτυρες μετά την επώαση ($318,7 \pm 50,57$), με $p < 0,01$ και $p < 0,05$ αντίστοιχα. Ο MFI των δειγμάτων NP1 ($388,4 \pm 135,8$) και NP2 ($416,7 \pm 119,9$) παρατηρήθηκε επίσης αυξημένος σε σχέση με τους μάρτυρες, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα (**Γράφημα 6**), (**Εικόνες 30,31**).



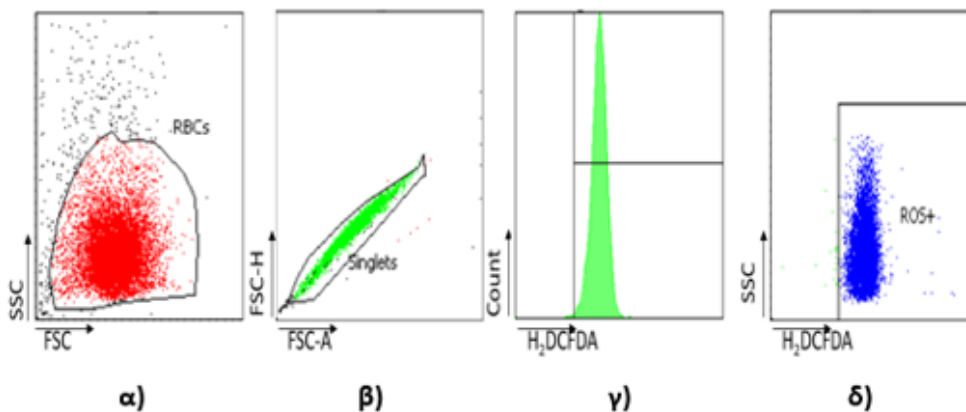
Γράφημα 6: Διαγραμματική απεικόνιση της μέσης έντασης φθορισμού των ROS των δειγμάτων μετά την επώαση με τα νανοσυστήματα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα control τους (* $p < 0,05$, ** το $p < 0,01$). **Ctrl:** μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37:** μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1:** διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2:** διάλυμα ALG NPs και **NP3:** διάλυμα ChR.

ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ



Εικόνα 30: Στρατηγική ανάλυσης των ROS των RBCs σε ένα αρνητικό δείγμα, το οποίο χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του ορίου του αρνητικού φθορισμού, με τη χρήση του εστέρα H_2DCFDA (ιστόγραμμα γ). Στην υποεικόνα α) παρουσιάζεται το στικτόγραμμα κατανομής των RBCs, όπου όρος FSC αναφέρεται στον πρόσθιο σκεδασμό (μέγεθος) ενώ ο όρος SSC στον πλάγιο σκεδασμό (πολυπλοκότητα). Στην υποεικόνα β) με τον όρο singlets προσδιορίζονται τα ερυθροκύτταρα που διαπερνούν ως μονάδες τη δέσμη laser του κυτταρομετρητή. Τέλος το στικτόγραμμα δ) απεικονίζει την οριοθέτηση του πλαισίου για τα θετικά για H_2DCFDA RBCs (Ανατύπωση από BD FACS Diva™ Software).

ΘΕΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

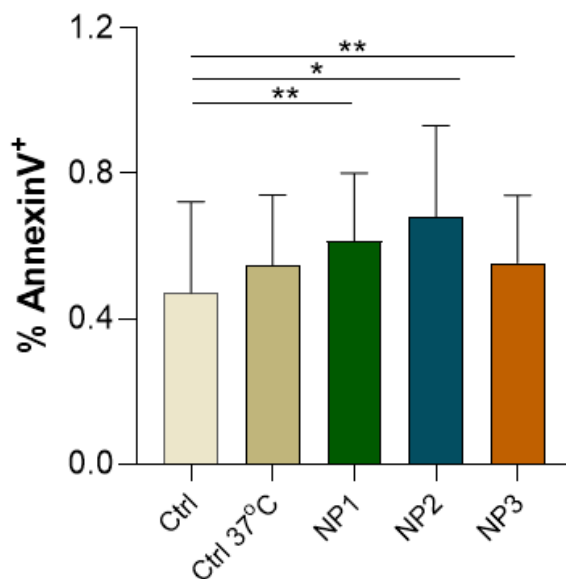


Εικόνα 31: Στρατηγική ανάλυσης των ROS των RBCs σε ένα θετικό δείγμα, με τη χρήση του εστέρα H₂DCFDA. Στο ιστόγραμμα γ) φαίνεται η μετατόπιση της κορυφής για τα θετικά για H₂DCFDA RBCs, δεξιότερα από το αρνητικό όριο φθορισμού. Στην υποεικόνα α) παρουσιάζεται το σικτόγραμμα κατανομής των RBCs, όπου όρος FSC αναφέρεται στον πρόσθιο σκεδασμό (μέγεθος) ενώ ο όρος SSC στον πλάγιο σκεδασμό (πολυπλοκότητα). Στην υποεικόνα β) με τον όρο singlets προσδιορίζονται τα ερυθροκύτταρα που διαπερνούν ως μονάδες τη δέσμη laser του κυτταρομετρητή. Τέλος το σικτόγραμμα δ) δείχνει τα θετικά για H₂DCFDA RBCs, που βρίσκονται μέσα στο πλαίσιο (μπλε χρώμα) (Ανατύπωση από BD FACS Diva™ Software).

4.4. Εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης

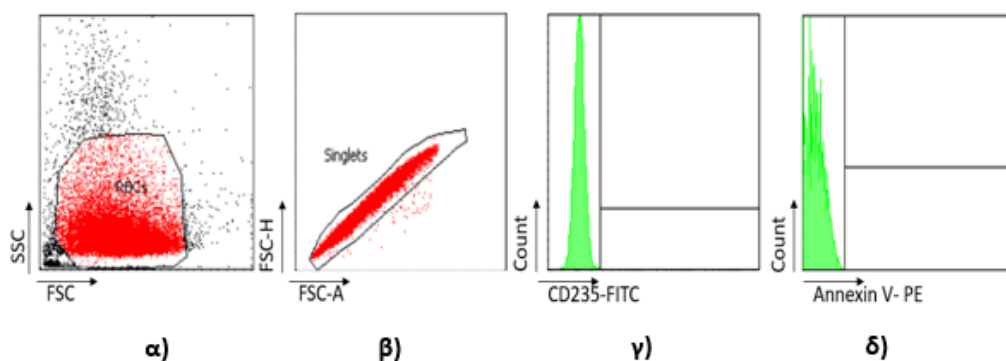
Αναφορικά με το ποσοστό εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης (PS), το ποσοστό των PS⁺ ερυθροκυττάρων μετά την επώαση με το διάλυμα NP1 ($0,62 \pm 0,19$ %) καταγράφηκε μεγαλύτερο από εκείνο των φυσιολογικών κυττάρων (Ctrl) ($0,47 \pm 0,25$ %), με $p < 0,01$. Ακόμη τα ποσοστά των PS⁺ κυττάρων που επώαστηκαν με το διάλυμα NP2 ($0,68 \pm 0,25$ %) αλλά και με το NP3 ($0,55 \pm 0,19$ %) βρέθηκαν να είναι επίσης μεγαλύτερα από αυτά του μάρτυρα πριν την επώαση με $p < 0,05$ και $p < 0,01$ αντίστοιχα (**Γράφημα 7, Εικόνες 32,33**).

Εξωτερίκευση PS



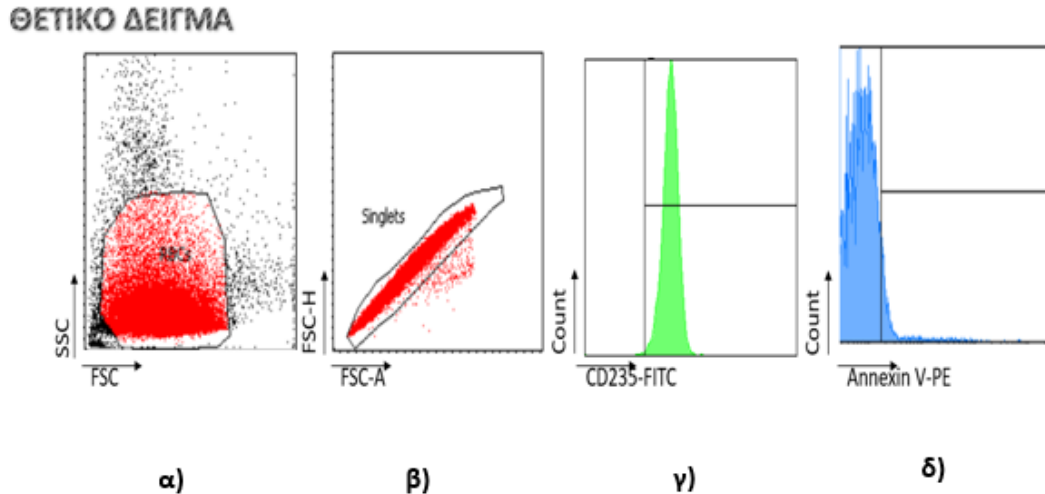
Γράφημα 7: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του ποσοστού εξωτερίκευσης της PS των δειγμάτων μετά την επώαση με τα νανούλικά συγκριτικά με τα αντίστοιχα control τους (* $p < 0,05$, ** το $p < 0,01$). **Ctrl:** μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37:** μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1:** διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2:** διάλυμα ALG NPs και **NP3:** διάλυμα ChR.

ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ



Εικόνα 32: Στρατηγική ανάλυσης της έκφρασης της PS στα RBCs σε ένα αρνητικό δείγμα, το οποίο χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του ορίου του αρνητικού φθορισμού, με τη χρήση των CD235-FITC και Annexin V-PE (ιστόγραμμα γ και δ). Στην υποεικόνα α) παρουσιάζεται το σικτόγραμμα κατανομής των RBCs, όπου όρος FSC αναφέρεται στον πρόσθιο σκεδασμό (μέγεθος) ενώ ο όρος SSC στον πλάγιο σκεδασμό (πολυπλοκότητα). Στην υποεικόνα β) με τον όρο singlets προσδιορίζονται τα ερυθροκύτταρα που διαπερνούν ως μονάδες τη δέση laser του

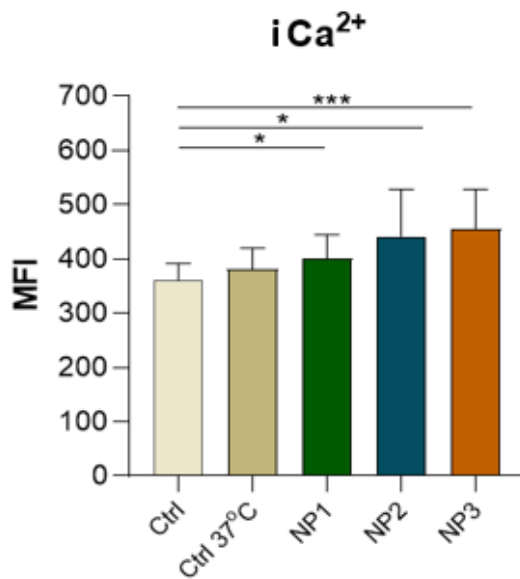
κυτταρομετρητή. Τέλος το σικτιόγραμμα δ) απεικονίζει την οριοθέτηση του πλαισίου για τα θετικά για H₂DCFDA RBCs (Ανατύπωση από BD FACS Diva™ Software).



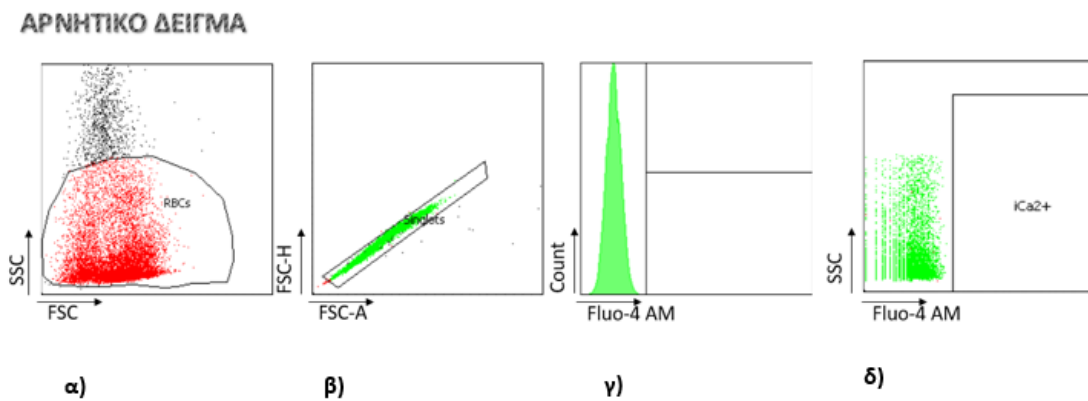
Εικόνα 33: Στρατηγική ανάλυσης της έκφρασης της PS στα RBCs σε ένα θετικό δείγμα, με τη χρήση CD235-FITC και Annexin V-PE. Στο ιστόγραμμα γ) φαίνεται η μετατόπιση της κορυφής για τα θετικά CD235-FITC RBCs, δεξιότερα από το αρνητικό όριο φθορισμού ενώ στο δ) για τα θετικά Annexin V-PE RBCs. Στην υποεικόνα α) παρουσιάζεται το σικτιόγραμμα κατανομής των RBCs, όπου όρος FSC αναφέρεται στον πρόσθιο σκεδασμό (μέγεθος) ενώ ο όρος SSC στον πλάγιο σκεδασμό (πολυπλοκότητα). Στην υποεικόνα β) με τον όρο singlets προσδιορίζονται τα ερυθροκύτταρα που διαπερνούν ως μονάδες τη δέσμη laser του κυτταρομετρητή. (Ανατύπωση από BD FACS Diva™ Software).

4.4. Εξωτερίκευση ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου Ca⁺²

Η Μέση ένταση φθορισμού των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca⁺² (MFI) μετά την επώαση με το διάλυμα NP1 (400,6 ± 44,25) βρέθηκε να είναι μεγαλύτερη από εκείνη των φυσιολογικών ερυθροκυττάρων (Ctrl) (361,1 ± 30,52), με p < 0,01. Ακόμη τα επίπεδα ενδοκυττάρου Ca⁺² των κυττάρων που επώαστηκαν με το διάλυμα NP2 (441,9 ± 86,75) αλλά και με το NP3 (456,2 ± 72,67) υπολογίστηκαν αρκετά πιο αυξημένα από αυτά του μάρτυρα πριν την επώαση με p < 0,05 και p < 0,001 αντίστοιχα. Ο MFI που αφορούσε στις συνθήκες NP2 και NP3 ήταν μεγαλύτερος από τον MFI που αφορούσε τη συνθήκη NP1, που βρέθηκε να είναι πιο κοντά στο μάρτυρα (**Γράφημα 8, Εικόνες 34,35**).

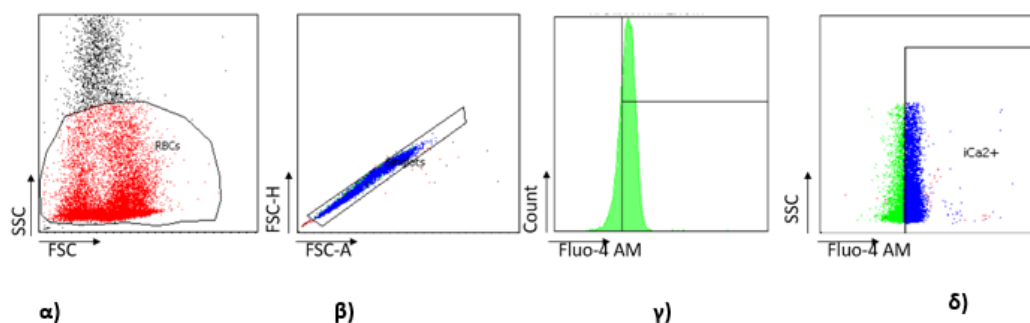


Γράφημα 8: Διαγραμματική απεικόνιση της σύγκρισης του MFI των παραγόμενων επιπέδων ενδοκυττάριου ασβεστίου Ca^{+2} μεταξύ των δειγμάτων μετά την επώαση με τα νανοϋλικά και των αντίστοιχων control τους (* $p < 0,05$, *** το $p < 0,001$). **Ctrl:** μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37:** μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1:** διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2:** διάλυμα ALG NPs και **NP3:** διάλυμα ChR.



Εικόνα 34: Στρατηγική ανάλυσης της εξωτερίκευσης των ενδοκυττάριων επιπέδων Ca^{+2} στα RBCs σε ένα αρνητικό δείγμα, το οποίο χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του ορίου του αρνητικού φθορισμού, με τη χρήση του εστέρα Fluo-4 AM (ιστόγραμμα γ). Στην υποεικόνα α) παρουσιάζεται το στικτόγραμμα κατανομής των RBCs, όπου όρος FSC αναφέρεται στον πρόσθιο σκεδασμό (μέγεθος) ενώ ο όρος SSC στον πλάγιο σκεδασμό (πολυπλοκότητα). Στην υποεικόνα β) με τον όρο singlets προσδιορίζονται τα ερυθροκύτταρα που διαπερνούν ως μονάδες τη δέσμη laser του κυτταρομετρητή. Τέλος το στικτόγραμμα δ) απεικονίζει την οριοθέτηση του πλαισίου για τα θετικά για Fluo-4 AM RBCs (Ανατύπωση από BD FACS Diva™ Software).

ΘΕΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

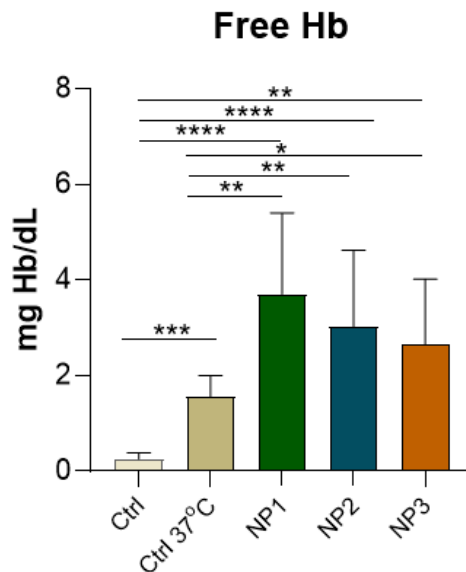


Εικόνα 35: Στρατηγική ανάλυσης της εξωτερίκευσης των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{+2} στα RBCs σε ένα θετικό δείγμα, με τη χρήση του εστέρα Fluorochrome 4 AM. Στο ιστόγραμμα γ) φαίνεται η μετατόπιση της κορυφής για τα θετικά Fluorochrome 4 AM για RBCs, δεξιότερα από το αρνητικό όριο φθορισμού. Στην υποεικόνα α) παρουσιάζεται το στικτόγραμμα κατανομής των RBCs, όπου όρος FSC αναφέρεται στον πρόσθιο σκεδασμό (μέγεθος) ενώ ο όρος SSC στον πλάγιο σκεδασμό (πολυπλοκότητα). Στην υποεικόνα β) με τον όρο singlets προσδιορίζονται τα ερυθροκύτταρα που διαπερνούν ως μονάδες τη δέσμη laser του κυτταρομετρητή. Τέλος το στικτόγραμμα δ) παρουσιάζει τα θετικά για Fluorochrome 4 AM RBCs, που επεκτείνονται στο εσωτερικό του πλαισίου (μπλε χρώμα) (Ανατύπωση από BD FACS Diva™ Software).

4.5. Αιμόλυση

4.5.1. Ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος

Η συγκέντρωση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος (mg/dL) στα δείγματα που επώαστηκαν με το διάλυμα NP1 ($3,70 \pm 1,7$ mg/dl) παρουσιάστηκε αυξημένη τόσο σε σχέση με το control πριν την επώαση ($0,25 \pm 0,13$ mg/dl) όσο και με το control μετά την επώαση ($1,55 \pm 0,45$ mg/dl) με $p < 0,0001$ και $p < 0,01$ αντίστοιχα. Οι μάρτυρες εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά και μεταξύ τους, με το μάρτυρα μετά την επώαση να είναι αυξημένος σε σχέση με το μάρτυρα πριν την επώαση ($p < 0,001$). Ακόμη η συγκέντρωση της Hb για τη συνθήκη NP2 ($3,03 \pm 1,6$ mg/dl) αλλά και για τη συνθήκη NP3 ($2,65 \pm 1,37$) υπολογίστηκε μεγαλύτερη σε σχέση με το μάρτυρα πριν με $p < 0,0001$ και $p < 0,01$ αντίστοιχα, αλλά και σε σύγκριση με το μάρτυρα μετά, με $p < 0,01$ και $p < 0,05$ αντίστοιχως. Η μικρότερη αύξηση παρατηρήθηκε στη συνθήκη NP3, ενώ για τις συνθήκες NP1 και NP2 η αύξηση ήταν περίπου ίδια ($CHb_{NP1} > CHb_{NP2}$) (Γράφημα 8).

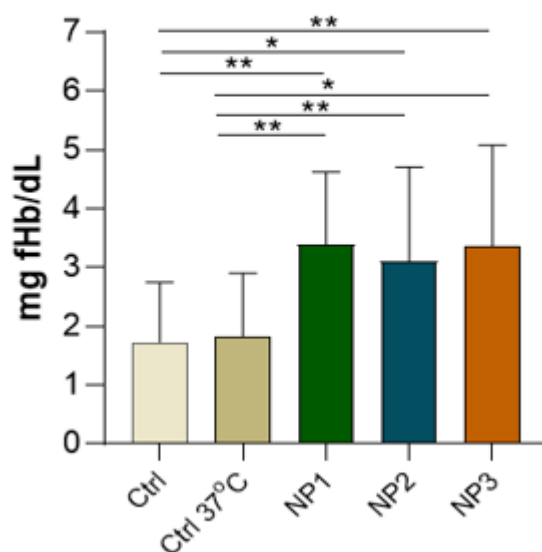


Γράφημα 9: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στη συγκέντρωση της Hb των δειγμάτων υπό την επίδραση των νανοϋλικών, συγκριτικά με τα controls πριν και μετά την επώαση (* $p < 0,05$, ** το $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ και **** $p < 0,0001$). **Ctrl:** μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37:** μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1:** διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2:** διάλυμα ALG NPs και **NP3:** διάλυμα ChR.

4.5.2. Οξειδωτική Αιμόλυση

Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης μετά την οξειδωτική λύση, στα δείγματα που επώαστηκαν με το διάλυμα NP1 ($3,39 \pm 1,24$ mgfHb/dL) βρέθηκε να είναι αυξημένη τόσο σε σχέση με το μάρτυρα πριν την επώαση ($1,73 \pm 1,01$ mgfHb/dL) όσο και με το μάρτυρα μετά την επώαση ($1,83 \pm 1,06$ mgfHb/dL) με $p < 0,01$. Επιπρόσθετα η συγκέντρωση της Hb για τη συνθήκη NP2 ($3,11 \pm 1,6$ mgfHb/dL) αλλά και για τη συνθήκη NP3 ($3,36 \pm 1,71$ mgfHb/dL) υπολογίστηκε μεγαλύτερη σε σχέση με το μάρτυρα πριν την επίδραση των NPs με $p < 0,05$ και $p < 0,01$ αντίστοιχα, αλλά και σε σύγκριση με το μάρτυρα μετά, με $p < 0,01$ και $p < 0,05$ αντίστοιχως. Μετά την επώαση με τα νανοσυστήματα, παρατηρήθηκε αύξηση της οξειδωτικής αιμόλυσης, για όλες τις συνθήκες (**Γράφημα 9**).

Οξειδωτική Αιμόλυση

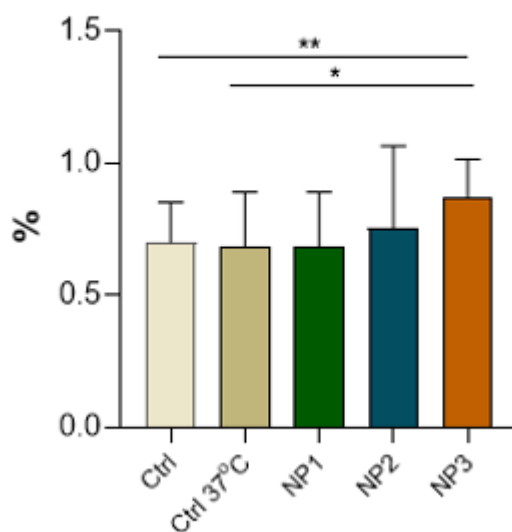


Γράφημα 10: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στη συγκέντρωση της ελεύθερης Hb πλάσματος, λόγω της οξειδωτικά επαγόμενης των δειγμάτων υπό την επίδραση των νανοϋλικών, συγκριτικά με τα controls πριν και μετά την επώαση (* $p < 0,05$ και ** $p < 0,01$). **Ctrl:** μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37:** μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1:** διάλυμα ChR-ALG NPs, **NP2:** διάλυμα ALG NPs και **NP3:** διάλυμα ChR.

4.5.3. Μηχανικά επαγόμενη αιμόλυση

Το ποσοστό μηχανικής αιμόλυσης, στα δείγματα που επώαστηκαν με το διάλυμα NP3 ($0,87 \pm 0,15$ %) βρέθηκε να είναι αυξημένο τόσο σε σχέση με το μάρτυρα πριν την επώαση ($0,7 \pm 0,15$ %) όσο και με το μάρτυρα μετά την επώαση ($0,69 \pm 0,21$ %) με $p < 0,01$ και $p < 0,05$. Αυξημένος σε σχέση με τα controls, παρατηρήθηκε ο βαθμός μηχανικής αιμόλυσης για τη συνθήκη NP2 ($0,75 \pm 0,31$ %), χωρίς όμως να εμφανίζει στατιστική σημαντικότητα. Όσον αφορά στην επίδραση που είχε το μηχανικό στρες στα κύτταρα που επώαστηκαν με το διάλυμα NP1 ($0,69 \pm 0,20$ %), υπολογίστηκε κοντά στους μάρτυρες πριν και μετά την επώαση, χωρίς στατιστική σημαντικότητα (**Γράφημα 10**).

Μηχανική Αιμόλυση

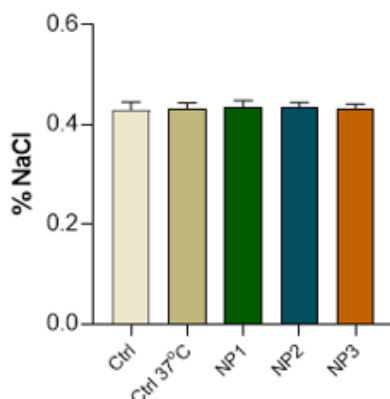


Γράφημα 11: Διαγραμματική απεικόνιση των μεταβολών του ποσοστού μηχανικής αιμόλυσης των δειγμάτων υπό την επίδραση των νανοϋλικών, συγκριτικά με τα controls πριν και μετά την επώαση (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). **Ctrl:** μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37:** μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1:** διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2:** διάλυμα ALG NPs και **NP3:** διάλυμα ChR.

4.5.4. Ωσμωτική αιμόλυση και Ποσοστό Κρυοαιμόλυσης

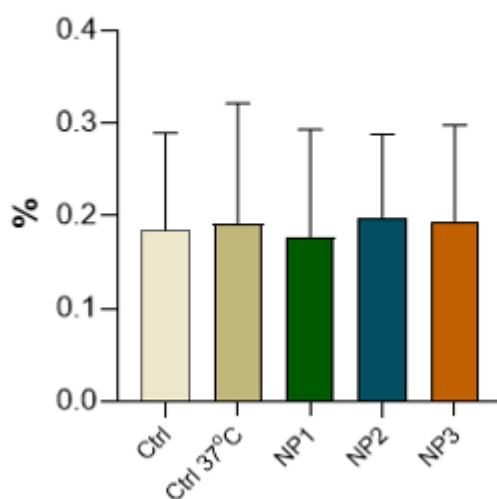
Το **Γράφημα 12** απεικονίζει τις μεταβολές του δείκτη MCF (δείκτης ωσμωτικής ευθραυστότητας, συγκέντρωση % NaCl που παρατηρείται το 50% της λύσης των κυττάρων) στα δείγματα μετά την επίδραση των νανοϋλικών, συγκριτικά με τους αντίστοιχους μάρτυρες. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών δεν έδωσε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Όλες οι τιμές βρέθηκαν να είναι κοντά στο 0,43 % NaCl. Μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα έδωσε και η ανάλυση των αποτελεσμάτων της κρυοαιμόλυσης (**Γράφημα 13**). Το ποσοστό της κρυοαιμόλυσης για όλα τα δείγματα, υπολογίστηκε κοντά στο 0,19%.

Ωσμωτική Αιμόλυση



Γράφημα 12: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας για τα δείγματα μετά την επώαση συγκριτικά με τα αντίστοιχα control τους. Δεν παρατηρείται στατιστική σημαντικότητα. **Ctrl:** μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37:** μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1:** διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2:** διάλυμα ALG NPs και **NP3:** διάλυμα ChR.

Κρυοαιμόλυση



Γράφημα 13: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του ποσοστού κρυοαιμόλυσης για τα δείγματα μετά την επώαση συγκριτικά με τα αντίστοιχα control τους. Δεν παρατηρείται στατιστική σημαντικότητα. **Ctrl:** μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37:** μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1:** διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2:** διάλυμα ALG NPs και **NP3:** διάλυμα ChR.

Κεφάλαιο 5. Συζήτηση - Συμπεράσματα

5.1. Συζήτηση

Ο βασικός άξονας γύρω από τον οποίο κινήθηκε η διπλωματική εργασία, είναι η αξιολόγηση της επίδρασης των πολυμερικών νανοσυστημάτων αλγινικού, με ή χωρίς την εγκλωβισμένη ουσία, στα ερυθροκύτταρα. Η εκτίμηση αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω της προσομοίωσης της χορήγησης των νανοφορέων στην κυκλοφορία του αίματος, καθώς η τεχνική αλληλεπίδρασης NPs και RBCs βασίστηκε στη μέθοδο της διάχυσης, με επώαση των νανοϋλικών και των κυττάρων υπό ανακίνηση. Τα ευρήματα του ελέγχου της αιμοσυμβατότητας των πολυμερικών αυτών νανοσυστημάτων υπέδειξαν τόσο αιμολυτικές ιδιότητες όσο και ερυθροπρωτικά χαρακτηριστικά, όπως έχει παρατηρηθεί και σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ανόργανα νανοσυστήματα αργύρου (Luna-Vázquez-gómez et al., 2021).

Πιο αναλυτικά, η αύξηση των ROS μετά την επίδραση μόνο των νανοσυστημάτων (NP2) οφείλεται στο ότι τα νανοσυστήματα ενισχύουν τις συνθήκες οξειδωτικού στρες καθώς μπορούν να επιδράσουν στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη προκαλώντας λιπιδική και πρωτεϊνική υπεροξείδωση (Sahoo et al., 2016). Επιβεβαιώνει ακόμη την επιστημονική άποψη, ότι η ενισχυμένη παραγωγή των ROS είναι η συχνότερη αιτιολογία νανατοξικότητας (Khanna et al., 2015). Η αύξηση των δραστικών οξειδωτικών ριζών, ενισχύει τον αιμολυτικό χαρακτήρα των νανοσυστημάτων. Περαιτέρω διερεύνηση απαιτεί η αύξηση των ROS μετά την επίδραση του διαλύματος χρυσίνης, κι αυτό γιατί το συγκεκριμένο φλαβονοειδές είναι ευρέως γνωστό για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Η χρυσίνη παρά τις ευεργετικές τις λειτουργίες, χαρακτηρίζεται από χαμηλό βαθμό υδατοδιαλυτότητας (Mani & Natesan, 2018). Για το λόγο αυτό μελετάται η χρήση της ως εγκλωβισμένη ουσία, προκειμένου να αυξηθεί ο βαθμός βιοδιαθεσιμότητάς της. Τα αυξημένα επίπεδα ROS λοιπόν είναι πιθανό να οφείλονται στη δυσκολία διάλυσης της χρυσίνης στο αίμα, μετά τον απεγκλωβισμό της από τα πολυμερικά νανοσυστήματα. Η αιμολυτική δράση των πολυμερικών αυτών νανοσυστημάτων, εντοπίζεται και στα ευρήματα της υψηλής συγκέντρωσης ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος αλλά και του αυξημένου ποσοστού οξειδωτικής αιμόλυσης. Ακόμη σημαντική είναι η εύρεση υψηλού ποσοστού ακανθοκυττάρων, κατά τη μικροσκόπηση των δειγμάτων μετά την επίδραση του διαλύματος NP2. Η έντονη ακανθοκυττάρωση επιβεβαιώνει την ισχυρή επίδραση των

νανοσυστημάτων στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, κυρίως στον κυτταροσκελετό της, και έρχεται να προσδώσει μια νέα διάσταση στην έρευνα του *Li* και των συνεργατών του. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές υποστήριξαν ότι τα νανοσυστήματα αλληλεπιδρούν με τις σκελετικές πρωτεΐνες της μεμβράνης και προκαλούν εχνοκυττάρωση, αλλοιώνοντας έτσι τη μορφολογία της (Tian et al., 2021). Μεταβολές στη σύνδεση του κυτταροσκελετού και της μεμβράνης, υποδεικνύει και το εύρημα της αυξημένης έκφρασης της φωσφατιδυλοσερίνης μετά την επίδραση των ChR-ALG NPs, καθώς η PS συμμετέχει στη διατήρηση της ασυμμετρίας της μεμβράνης (Arashiki & Takakuwa, 2017).

Όσον αφορά στο ρόλο των ChR-Alg NPs στο μηχανισμό της ερυθρόπτωσης, η αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{+2} μετά την επίδρασή τους, υποδεικνύει την επαγωγή του. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνει και τα ερευνητικά πορίσματα του *Tkachenko* και των συνεργατών του, οι οποίοι απέδειξαν πειραματικά την αυξημένη εισροή κατιόντων ασβεστίου, μετά την αλληλεπίδραση των κυττάρων με τα νανοσυστήματα (Tkachenko, 2024). Ακόμη η αυξημένη εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης, μετά την αλληλεπίδραση των RBCs με τα νανοϋλικά, είναι επακόλουθο των ενισχυμένων επιπέδων ενδοκυττάρου ασβεστίου (Ca^{+2}) και συμβάλλει στην αποτελεσματική διεξαγωγή του ερυθροπρωτικού μηχανισμού. Στον αντίποδα της αιμολυτικής τους δράσης, η προσφορά των Alg-Nps στην ενίσχυση της ερυθρόπτωσης, τους προσδίδει και ένα προστατευτικό χαρακτήρα, καθώς τα οδηγεί σε ένα προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και στην αποφυγή των καταστροφικών επιδράσεων της αιμόλυσης. Για τον προστατευτικό ρόλο των νανοσυστημάτων, έχουν κάνει λόγο και ο *Grebowsky* με τους συνεργάτες του (Grebowski et al., 2018).

Αξίζει να αναφερθεί ότι καμία αιμολυτική παράμετρος δεν ήταν εξαιρετικά αυξημένη συγκριτικά με τα αντίστοιχα controls, δηλαδή κανένα από τα αποτελέσματα δεν υπέδειξε υψηλό βαθμό τοξικότητας. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι παρότι της αιμολυτικές τους επιδράσεις στα ερυθροκύτταρα, τα συγκεκριμένα νανοσυστήματα, μπορούν να θεωρηθούν ότι είναι αιμοσυμβατά και να χρησιμοποιηθούν στη μεταφορά θεραπευτικών ουσιών. Η επιλογή των θεραπευτικών παραγόντων μπορεί να βασιστεί στην αντιστάθμιση των επιβλαβών τους χαρακτηριστικών.

5.2. Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, τα νανοσωματίδια αλγινικού (ALG NPs) φαίνεται ότι μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμάκων καθώς επιδεικνύουν αιμοσυμβατό χαρακτήρα και

η μεγαλύτερη συμμετοχή τους εντοπίζεται στον ερυθροπρωτικό μηχανισμό, ο έλεγχος του οποίου εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα. Όσον αφορά στα αιμολυτικά τους χαρακτηριστικά, αυτά είναι πιθανό να μπορούν να αντισταθμιστούν με τον εγκλωβισμό των κατάλληλων θεραπευτικών ουσιών, οι οποίες είναι προτιμότερο να εμφανίζουν μεγαλύτερο βαθμό διαλυτότητας από τη χρυσίνη. Εν κατακλείδι, η μελέτη της ναυατοξικότητας αποτελεί αδιαμφισβήτητα ένα από τα φλέγοντα ερευνητικά ζητήματα και η χρήση πολυμερικών νανοσυστημάτων αλγινικού μπορεί να προσδώσει νέα δεδομένα στη συμβολή τους στον τομέα της φαρμακολογίας και της μεταφοράς θεραπευτικών παραγόντων.

Συγκεντρωτικός πίνακας εικόνων

Εικόνα 1: Οδοί διαφοροποίησης των πολυδύναμων στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων. Στην εικόνα αποτυπώνεται η μορφολογική εξελικτική πορεία από τις άωρες βλάστες στα βασικά ώριμα κύτταρα του αίματος (ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια, κοκκιοκύτταρα, μη κοκκιοκύτταρα) (Ανατύπωση από Farley et al., 2012).	4
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της κυτταρικής διαφοροποίησης της ερυθράς σειράς. Από τις αποικίες των ομοειδών θυγατρικών κυττάρων και με συνεχή πολλαπλασιασμό, προκύπτει η τελική ώριμη μορφή του ερυθροκυττάρου (Ανατύπωση από Nandakumar et al., 2016).	5
Εικόνα 3: Η εσωτερική διαμόρφωση και το χαρακτηριστικό σχήμα του ερυθροκυττάρου. Στην υποεικόνα α) παρουσιάζεται το ερυθροκύτταρο όπως φαίνεται σε ένα Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης, στη β) το γνωστό σχήμα του αμφίκιουλου δίσκου, στη γ) η πολύπλοκη δομή της τετραμερούς αιμοσφαιρίνης και στη δ) η χημική δομή της αίμης (Ανατύπωση από Sen Gupta, 2019).	6
Εικόνα 4: Διατομή ενός ερυθρού αιμοσφαιρίου και επισήμανση της διαμέτρου του (Ανατύπωση από Farley et al., 2012).	7
Εικόνα 5: Πρωτεϊνική σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης με επίκεντρο της βασικότερες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Ανατύπωση από Pretini et al., 2019).	8
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της βασικής ανιοντοανταλλακτικής λειτουργίας της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης Ζώνης 3 (Ανατύπωση από Reithmeier et al., 2016).	9
Εικόνα 7: Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των ερυθροκυττάρων με τα μακροφάγα. Η σύνδεση της πρωτεΐνης CD47 με την SIRPα σηματοδοτεί την αναστολή της φαγοκυττάρωσης (Ανατύπωση από Klei et al., 2017).	10
Εικόνα 8: Ο ρυθμιστικός μηχανισμός των καναλιών Piezo 1 στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη (Ανατύπωση από Fang et al., 2021).	11
Εικόνα 9: Τα σύμπλοκα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και η σύνδεσή τους με τις σημαντικές σκελετικές και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Ανατύπωση από Kodippili et al., 2012).	15
Εικόνα 10: Δομή λιπιδικής διπλοστιβάδας με έμφαση στα βασικά φωσφολιπίδια του εσωτερικού και εξωτερικού τμήματος (Ανατύπωση από Pretini et al., 2019).	17
Εικόνα 11: Χημικές αντιδράσεις παραγωγής ενδοκυττάρων ριζών οξυγόνου (ROS) και εξωκυττάρων δραστικών μορφών αζώτου (RNS). Το O ₂ (κυκλωμένο με κόκκινο χρώμα) είναι το πρόδρομο μόριο για την παραγωγή των ROS ενώ το NO (κυκλωμένο με πράσινο χρώμα) το πρόδρομο μόριο της παραγωγής RNS (Ανατύπωση από Möller et al., 2019)..	18
Εικόνα 12: Οι αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss. SOD: υπεροξειδική δισμουτάση, ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή των υπεροξειδικών ανιόντων (O ₂ ⁻) σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H ₂ O ₂) (Ανατύπωση από Bardestani et al., 2021).	19
Εικόνα 13: Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του ερυθροκυττάρου και η συμμετοχή των βασικών ενζυμικών και μη αντιοξειδωτικών βοηθητικών μορίων (Ανατύπωση από Orrico et al., 2023).	21
Εικόνα 14: Η βασική λειτουργία της πρωτεΐνης CD47 πριν και μετά την επίδραση της γήρανσης του ερυθροκυττάρου. Οι αλλοιώσεις στην επιφάνεια της CD47 έχουν ως	

επακόλουθο την πρόσδεση της TSP-1 και την επαγωγή της φαγοκυττάρωσης (Ανατύπωση από Burger et al., 2012).	23
Εικόνα 15: Η δημιουργία του νέο-αντιγόνου της ζώνης 3 κατά τη γήρανση και η αναγνώρισή του από τα υπάρχοντα αυτοαντισώματα (Ανατύπωση από Bosman, 2013).	24
Εικόνα 16: Σχηματική προσέγγιση του μηχανισμού της ερυθρόπτωσης (Ανατύπωση από Tkachenko, 2024).	26
Εικόνα 17: Ταξινόμηση νανοσωματιδίων. Οι τρεις βασικές κατηγορίες νανοφορέων και οι υποκατηγορίες τους ανάλογα με τις μορφολογικές και λειτουργικές τους διακρίσεις (Ανατύπωση από Mitchell et al., 2021).	29
Εικόνα 18: Η τεχνική παρασκευής πολυμερικών νανοσυστημάτων με τη μέθοδο της εκτόπισης -διάχυσης του διαλύτη (Ανατύπωση από Zielí Nska et al., 2020).	31
Εικόνα 19: Η παρασκευαστική μέθοδος της νανοκατακρήμνισης (Ανατύπωση από Zielí Nska et al., 2020).	32
Εικόνα 20: Οι μορφολογικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο βασικών τύπων των πολυμερικών νανοσυστημάτων, της νανोकάψουλας και νανοσφαίρας. Στην εικόνα επισημαίνεται και η περιοχή εγκλωβισμού της θεραπευτικής ουσίας (Ανατύπωση από Zielí Nska et al., 2020).	33
Εικόνα 21: Απεικόνιση της σχέσης αλληλεπίδρασης πολυμερούς και θεραπευτικής ουσίας ανάλογα το είδος του πολυμερικού νανοσυστήματος (Ανατύπωση από Zielí Nska et al., 2020).	34
Εικόνα 22: Η χημική δομή του αλγινικού οξέος. Στην εικόνα παρουσιάζεται η σύνδεση του γουλουρινικού (G) οξέος και του μανουρονικού (M) οξέος, που οδηγεί στην τελική σύνθεση του αλγινικού (Ανατύπωση από Al-Hatamleh et al., 2022).	36
Εικόνα 23: Το σύνολο των παροντικών αλλά και μελλοντικών βιοϊατρικών και φαρμακευτικών εφαρμογών των νανοσυστημάτων αλγινικού (Ανατύπωση από Al-Hatamleh et al., 2022).	37
Εικόνα 24: Η χημική δομή της χρυσίνης (Ανατύπωση από Naz et al., 2019).	39
Εικόνα 25: Οι χημικές δομές των έξι χαρακτηριστικών κατηγοριών των φλαβονοειδών καθώς και των πηγών προέλευσής τους (Ανατύπωση από Sarian et al., 2021).	40
Εικόνα 26: Οι θεραπευτικές ιδιότητες της χρυσίνης (Ανατύπωση από Naz et al., 2019)..	41
Εικόνα 27: Οι σχέσεις αλληλεπίδρασης του φουλερενίου με τις βασικές πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Στην εικόνα φαίνεται η πρόσδεση του νανοϋλικού στη διαμεμβρανική πρωτεΐνη ζώνη-3, η οποία κατ'επέκταση επηρεάζει τη σύνδεσή της με τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (Ανατύπωση από Tkachenko, 2024).	43
Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση της σύγκρισης των πλεονεκτικών και μειονεκτικών χαρακτηριστικών των διαδικασιών ελέγχου αιμόλυσης και ερυθρόπτωσης, υπό την επίδραση των νανοσυστημάτων. Τα πλεονεκτήματα αναγράφονται με μαύρο χρώμα ενώ τα μειονεκτήματα με κόκκινο. Στην εικόνα φαίνεται ότι οι δοκιμασίες ερυθρόπτωσης προτιμώνται για τους ελέγχους νανοτοξικότητας (Ανατύπωση από Tkachenko, 2024). ..	46
Εικόνα 29: Σχηματική αναπαράσταση των ενδεικτικών εικόνων που έδωσε η μικροσκόπηση, για τα δείγματα μετά την επώαση με τα νανοϋλικά (NP1, NP2 και NP3) και του αντίστοιχου control τους. Με μαύρο βέλος εντοπίζονται τα ακανθοκύτταρα (εικόνες b και c), ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα εμφανίζονται με τη φυσιολογική τους μορφή.	

Για τη χρώση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η βασική αιματολογική χρώση May-Grünwald-Giemsa. 60

Εικόνα 30: Στρατηγική ανάλυσης των ROS των RBCs σε ένα αρνητικό δείγμα, το οποίο χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του ορίου του αρνητικού φθορισμού, με τη χρήση του εστέρα H₂DCFDA (ιστόγραμμα γ). Στην υποεικόνα α) παρουσιάζεται το στικτόγραμμα κατανομής των RBCs, όπου όρος FSC αναφέρεται στον πρόσθιο σκεδασμό (μέγεθος) ενώ ο όρος SSC στον πλάγιο σκεδασμό (πολυπλοκότητα). Στην υποεικόνα β) με τον όρο singlets προσδιορίζονται τα ερυθροκύτταρα που διαπερνούν ως μονάδες τη δέσμη laser του κυτταρομετρητή. Τέλος το στικτόγραμμα δ) απεικονίζει την οριοθέτηση του πλαισίου για τα θετικά για H₂DCFDA RBCs (Ανατύπωση από BD FACS Diva™ Software). 61

Εικόνα 31: Στρατηγική ανάλυσης των ROS των RBCs σε ένα θετικό δείγμα, με τη χρήση του εστέρα H₂DCFDA. Στο ιστόγραμμα γ) φαίνεται η μετατόπιση της κορυφής για τα θετικά για H₂DCFDA RBCs, δεξιότερα από το αρνητικό όριο φθορισμού. Στην υποεικόνα α) παρουσιάζεται το στικτόγραμμα κατανομής των RBCs, όπου όρος FSC αναφέρεται στον πρόσθιο σκεδασμό (μέγεθος) ενώ ο όρος SSC στον πλάγιο σκεδασμό (πολυπλοκότητα). Στην υποεικόνα β) με τον όρο singlets προσδιορίζονται τα ερυθροκύτταρα που διαπερνούν ως μονάδες τη δέσμη laser του κυτταρομετρητή. Τέλος το στικτόγραμμα δ) δείχνει τα θετικά για H₂DCFDA RBCs, που βρίσκονται μέσα στο πλαίσιο (μπλε χρώμα) (Ανατύπωση από BD FACS Diva™ Software). 62

Εικόνα 32: Στρατηγική ανάλυσης της έκφρασης της PS στα RBCs σε ένα αρνητικό δείγμα, το οποίο χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του ορίου του αρνητικού φθορισμού, με τη χρήση των CD235-FITC και Annexin V-PE (ιστόγραμμα γ και δ). Στην υποεικόνα α) παρουσιάζεται το στικτόγραμμα κατανομής των RBCs, όπου όρος FSC αναφέρεται στον πρόσθιο σκεδασμό (μέγεθος) ενώ ο όρος SSC στον πλάγιο σκεδασμό (πολυπλοκότητα). Στην υποεικόνα β) με τον όρο singlets προσδιορίζονται τα ερυθροκύτταρα που διαπερνούν ως μονάδες τη δέσμη laser του κυτταρομετρητή. Τέλος το στικτόγραμμα δ) απεικονίζει την οριοθέτηση του πλαισίου για τα θετικά για H₂DCFDA RBCs (Ανατύπωση από BD FACS Diva™ Software). 63

Εικόνα 33: Στρατηγική ανάλυσης της έκφρασης της PS στα RBCs σε ένα θετικό δείγμα, με τη χρήση CD235-FITC και Annexin V-PE. Στο ιστόγραμμα γ) φαίνεται η μετατόπιση της κορυφής για τα θετικά CD235-FITC RBCs, δεξιότερα από το αρνητικό όριο φθορισμού ενώ στο δ) για τα θετικά Annexin V-PE RBCs. Στην υποεικόνα α) παρουσιάζεται το στικτόγραμμα κατανομής των RBCs, όπου όρος FSC αναφέρεται στον πρόσθιο σκεδασμό (μέγεθος) ενώ ο όρος SSC στον πλάγιο σκεδασμό (πολυπλοκότητα). Στην υποεικόνα β) με τον όρο singlets προσδιορίζονται τα ερυθροκύτταρα που διαπερνούν ως μονάδες τη δέσμη laser του κυτταρομετρητή. (Ανατύπωση από BD FACS Diva™ Software). 64

Εικόνα 34: Στρατηγική ανάλυσης της εξωτερίκευσης των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca⁺² στα RBCs σε ένα αρνητικό δείγμα, το οποίο χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του ορίου του αρνητικού φθορισμού, με τη χρήση του εστέρα Fluo-4 AM (ιστόγραμμα γ). Στην υποεικόνα α) παρουσιάζεται το στικτόγραμμα κατανομής των RBCs, όπου όρος FSC αναφέρεται στον πρόσθιο σκεδασμό (μέγεθος) ενώ ο όρος SSC στον πλάγιο σκεδασμό (πολυπλοκότητα). Στην υποεικόνα β) με τον όρο singlets προσδιορίζονται τα ερυθροκύτταρα που διαπερνούν ως μονάδες τη δέσμη laser του κυτταρομετρητή. Τέλος

το στικτόγραμμα δ) απεικονίζει την οριοθέτηση του πλαισίου για τα θετικά για Fluo-4 AM RBCs (Ανατύπωση από BD FACS Diva™ Software). 65

Εικόνα 35: Στρατηγική ανάλυσης της εξωτερίκευσης των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{+2} στα RBCs σε ένα θετικό δείγμα, με τη χρήση του εστέρα Fluo-4 AM. Στο ιστόγραμμα γ) φαίνεται η μετατόπιση της κορυφής για τα θετικά Fluo-4 AM για RBCs, δεξιότερα από το αρνητικό όριο φθορισμού. Στην υποεικόνα α) παρουσιάζεται το στικτόγραμμα κατανομής των RBCs, όπου όρος FSC αναφέρεται στον πρόσθιο σκεδασμό (μέγεθος) ενώ ο όρος SSC στον πλάγιο σκεδασμό (πολυπλοκότητα). Στην υποεικόνα β) με τον όρο singlets προσδιορίζονται τα ερυθροκύτταρα που διαπερνούν ως μονάδες τη δέσμη laser του κυτταρομετρητή. Τέλος το στικτόγραμμα δ) παρουσιάζει τα θετικά για Fluo-4 AM RBCs, που επεκτείνονται στο εσωτερικό του πλαισίου (μπλε χρώμα) (Ανατύπωση από BD FACS Diva™ Software). 66

Συγκεντρωτικός πίνακας πινάκων

Πίνακας 1: Πίνακας καταγραφής σημαντικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και των αντίστοιχων λειτουργιών τους. 11

Πίνακας 2: Ο μέσος όρος \pm την τυπική απόκλιση των αιματολογικών δεικτών των αιμοδοτών, πριν την επώαση των ερυθροκυττάρων με τα νανοϋλικά. Παρατηρείται ότι όλες οι τιμές είναι εντός των φυσιολογικών ορίων..... 54

Συγκεντρωτικός πίνακας γραφημάτων

Γράφημα 1: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του δείκτη μέσου όγκου των ερυθρών (MCV) μετά την επίδραση των νανοϋλικών, συγκριτικά με τα controls πριν και μετά την επώαση. (** $p < 0,01$ και *** $p < 0,001$). Ctrl: μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, Ctrl 37: μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, NP1: διάλυμα ChR- ALG NPs, NP2: διάλυμα ALG NPs και NP3: διάλυμα ChR.	55
Γράφημα 2: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στον δείκτη μέσης περιεκτικότητας της Hb (MCH), στα δείγματα μετά την επώαση με τα NPs, συγκριτικά με τα αντίστοιχα control τους (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ και *** $p < 0,001$). Ctrl: μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, Ctrl 37: μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, NP1: διάλυμα ChR- ALG NPs, NP2: διάλυμα ALG NPs και NP3: διάλυμα ChR.	56
Γράφημα 3: Διαγραμματική απεικόνιση της σύγκρισης των τιμών του δείκτη Μέσης Πυκνότητας Αιμοσφαιρίνης (MCHC), για δείγματα και controls (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ και **** $p < 0,0001$). Ctrl: μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, Ctrl 37: μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, NP1: διάλυμα ChR- ALG NPs, NP2: διάλυμα ALG NPs και NP3: διάλυμα ChR.	57
Γράφημα 4: Διαγραμματική απεικόνιση της σύγκρισης των τιμών του δείκτη RDW μεταξύ των επωασμένων με NPs δειγμάτων και των αντίστοιχων control τους. Ctrl: μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, Ctrl 37: μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, NP1: διάλυμα ChR- ALG NPs, NP2: διάλυμα ALG NPs και NP3: διάλυμα ChR.	58
Γράφημα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του ποσοστού των ακανθοκυττάρων για τα δείγματα μετά την επώαση συγκριτικά με το control μετά την επώαση (** $p < 0,01$ και *** $p < 0,001$). Ctrl: μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, Ctrl 37: μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, NP1: διάλυμα ChR- ALG NPs, NP2: διάλυμα ALG NPs και NP3: διάλυμα ChR.....	59
Γράφημα 6: Διαγραμματική απεικόνιση της μέσης έντασης φθορισμού των ROS των δειγμάτων μετά την επώαση με τα νανοσυστήματα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα control τους (* $p < 0,05$, ** το $p < 0,01$). Ctrl: μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, Ctrl 37: μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, NP1: διάλυμα ChR- ALG NPs, NP2: διάλυμα ALG NPs και NP3: διάλυμα ChR.	61
Γράφημα 7: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του ποσοστού εξωτερίκευσης της PS των δειγμάτων μετά την επώαση με τα νανοϋλικά συγκριτικά με τα αντίστοιχα control τους (* $p < 0,05$, ** το $p < 0,01$). Ctrl: μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, Ctrl 37: μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, NP1: διάλυμα ChR- ALG NPs, NP2: διάλυμα ALG NPs και NP3: διάλυμα ChR.	63
Γράφημα 8: Διαγραμματική απεικόνιση της σύγκρισης του MFI των παραγόμενων επιπέδων ενδοκυττάρου ασβεστίου Ca^{+2} μεταξύ των δειγμάτων μετά την επώαση με τα νανοϋλικά και των αντίστοιχων control τους (* $p < 0,05$, *** το $p < 0,001$). Ctrl: μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, Ctrl 37: μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, NP1: διάλυμα ChR- ALG NPs, NP2: διάλυμα ALG NPs και NP3: διάλυμα ChR.	65
Γράφημα 9: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στη συγκέντρωση της Hb των δειγμάτων υπό την επίδραση των νανοϋλικών, συγκριτικά με τα controls πριν και μετά	

την επώαση (* $p < 0,05$, ** το $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ και **** $p < 0,0001$). **Ctrl**: μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37**: μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1**: διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2**: διάλυμα ALG NPs και **NP3**: διάλυμα ChR. 67

Γράφημα 10: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στη συγκέντρωση της ελεύθερης Hb πλάσματος, λόγω της οξειδωτικά επαγόμενης των δειγμάτων υπό την επίδραση των νανοϋλικών, συγκριτικά με τα controls πριν και μετά την επώαση (* $p < 0,05$ και ** $p < 0,01$). **Ctrl**: μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37**: μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1**: διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2**: διάλυμα ALG NPs και **NP3**: διάλυμα ChR. ... 68

Γράφημα 11: Διαγραμματική απεικόνιση των μεταβολών του ποσοστού μηχανικής αιμόλυσης των δειγμάτων υπό την επίδραση των νανοϋλικών, συγκριτικά με τα controls πριν και μετά την επώαση (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). **Ctrl**: μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37**: μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1**: διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2**: διάλυμα ALG NPs και **NP3**: διάλυμα ChR. 69

Γράφημα 12: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας για τα δείγματα μετά την επώαση συγκριτικά με τα αντίστοιχα control τους. Δεν παρατηρείται στατιστική σημαντικότητα. **Ctrl**: μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37**: μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1**: διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2**: διάλυμα ALG NPs και **NP3**: διάλυμα ChR. 70

Γράφημα 13: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του ποσοστού κρυσταλλοποίησης για τα δείγματα μετά την επώαση συγκριτικά με τα αντίστοιχα control τους. Δεν παρατηρείται στατιστική σημαντικότητα. **Ctrl**: μάρτυρας δειγμάτων πριν την επώαση, **Ctrl 37**: μάρτυρας δειγμάτων μετά την επώαση, **NP1**: διάλυμα ChR- ALG NPs, **NP2**: διάλυμα ALG NPs και **NP3**: διάλυμα ChR..... 70

Βιβλιογραφία

- Ahmed, A., Sarwar, S., Hu, Y., Munir, M. U., Nisar, M. F., Ikram, F., Asif, A., Rahman, S. U., Chaudhry, A. A., & Rehman, I. U. (2021). Surface-modified polymeric nanoparticles for drug delivery to cancer cells. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *18*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1822321>
- Akalin, G. O. (2023). Alginate/carboxymethylcellulose-based hydrogels as pH-sensitive drug delivery systems: facile production with enhanced degradation, thermal and mechanical properties. *Iranian Polymer Journal (English Edition)*, *32*(8), 1013–1032. <https://doi.org/10.1007/S13726-023-01182-9/TABLES/4>
- Al-Hatamleh, M. A. I., Alshaer, W., Hatmal, M. M., Lambuk, L., Ahmed, N., Mustafa, M. Z., Low, S. C., Jaafar, J., Ferji, K., Six, J. L., Uskoković, V., & Mohamud, R. (2022). Applications of Alginate-Based Nanomaterials in Enhancing the Therapeutic Effects of Bee Products. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *9*. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2022.865833>
- Alves, Z., Ferreira, N. M., Mendo, S., Ferreira, P., & Nunes, C. (2021). Design of Alginate-Based Bionanocomposites with Electrical Conductivity for Active Food Packaging. *J. Mol. Sci*, *22*. <https://doi.org/10.3390/ijms>
- Andretto, V., Rosso, A., Briançon, S., & Lollo, G. (2021). Nanocomposite systems for precise oral delivery of drugs and biologics. *Drug Delivery and Translational Research*, *11*(2), 445–470. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00905-w>
- Antonelou, M. H., Kriebardis, A. G., & Papassideri, I. S. (2010). Aging and death signalling in mature red cells: From basic science to transfusion practice. In *Blood Transfusion* (Vol. 8, Issue SUPPL. 3). <https://doi.org/10.2450/2010.007S>
- Arashiki, N., & Takakuwa, Y. (2017). Maintenance and regulation of asymmetric phospholipid distribution in human erythrocyte membranes: Implications for erythrocyte functions. In *Current Opinion in Hematology* (Vol. 24, Issue 3, pp. 167–172). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000326>
- Bardestani, A., Ebrahimpour, S., Esmaeili, A., & Esmaeili, A. (2021). Quercetin attenuates neurotoxicity induced by iron oxide nanoparticles. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01059-0>
- Benga, G. (2012). The first discovered water channel protein, later called aquaporin 1: Molecular characteristics, functions and medical implications. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 33, Issues 5–6, pp. 518–534). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.06.001>
- Bosman, G. J. C. G. M. (2013). Survival of red blood cells after transfusion: Processes and consequences. In *Frontiers in Physiology: Vol. 4 DEC*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00376>

- Bouchla, A., Kriebardis, A. G., Georgatzakou, H. T., Fortis, S. P., Thomopoulos, T. P., Lekkakou, L., Markakis, K., Gkotzias, D., Panagiotou, A., Papageorgiou, E. G., Pouliakis, A., Stamoulis, K. E., Papageorgiou, S. G., Pappa, V., & Valsami, S. (2022). Red Blood Cell Abnormalities as the Mirror of SARS-CoV-2 Disease Severity: A Pilot Study. *Frontiers in Physiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.825055>
- Bratosin, D., Estaquier, J., Petit, F., Arnoult, D., Quatannens, B., Tissier, J.-P., Slomianny, C., Sartiaux, C., Alonso, C., Huart, J.-J., Montreuil, J., & Ameisen, J. C. (n.d.). *Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria*. www.nature.com/cdd
- Bryk, A. H., & Wiśniewski, J. R. (2017). Quantitative Analysis of Human Red Blood Cell Proteome. *Journal of Proteome Research*, *16*(8), 2752–2761. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00025>
- Burger, P., De Korte, D., Van Den Berg, T. K., & Van Bruggen, R. (2012). CD47 in erythrocyte ageing and clearance-the dutch point of view. In *Transfusion Medicine and Hemotherapy* (Vol. 39, Issue 5, pp. 348–352). <https://doi.org/10.1159/000342231>
- Cahalan, S. M., Lukacs, V., Ranade, S. S., Chien, S., Bandell, M., & Patapoutian, A. (n.d.). *Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume*. <https://doi.org/10.7554/eLife.07370.001>
- Cervino, G., Fiorillo, L., Herford, A. S., Laino, L., Troiano, G., Amoroso, G., Crimi, S., Matarese, M., D'Amico, C., Siniscalchi, E. N., & Cicciù, M. (2019). Alginate materials and dental impression technique: A current state of the art and application to dental practice. In *Marine Drugs* (Vol. 17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md17010018>
- Chen, Z., Yang, B., Yan, Z., Song, E., & Song, Y. (2022). Eryptosis is an indicator of hematotoxicity in the risk assessment of environmental amorphous silica nanoparticles exposure: The role of macromolecule corona. *Toxicology Letters*, *367*, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2022.07.007>
- Choukaife, H., Doolaanea, A. A., & Alfatama, M. (2020). Alginate Nanoformulation: Influence of Process and Selected Variables. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, *13*(11), 1–35. <https://doi.org/10.3390/PH13110335>
- Corrons, J. L. V., Casafont, L. B., & Frasnado, E. F. (2021). Concise review: how do red blood cells born, live, and die? In *Annals of Hematology* (Vol. 100, Issue 10, pp. 2425–2433). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04575-z>
- Crucho, C. I. C., & Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, *80*, 771–784. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.06.004>

- das Neves, J., Nunes, R., Machado, A., & Sarmiento, B. (2015). Polymer-based nanocarriers for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *92*, 53–70. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2014.12.004>
- dos Santos Araújo, P., Belini, G. B., Mambrini, G. P., Yamaji, F. M., & Waldman, W. R. (2019). Thermal degradation of calcium and sodium alginate: A greener synthesis towards calcium oxide micro/nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, *140*, 749–760. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.103>
- Drbohlavova, J., Chomoucka, J., Adam, V., Ryvolova, M., Eckschlager, T., Hubalek, J., & Kizek, R. (2013). Nanocarriers for anticancer drugs--new trends in nanomedicine. *Current Drug Metabolism*, *14*(5), 547–564. <https://doi.org/10.2174/1389200211314050005>
- Dzierzak, E., & Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: Development and differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *3*(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011601>
- Emilse, L. A. M., Cecilia, H., María, T. M., Eugenia, M. M., Alicia, I. B., & Lazarte, S. S. (2018). Cryohemolysis, erythrocyte osmotic fragility, and supplementary hematimetric indices in the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Blood Research*, *53*(1), 10–17. <https://doi.org/10.5045/br.2018.53.1.10>
- Eming, S. A., Krieg, T., & Davidson, J. M. (2007). Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. In *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 127, Issue 3, pp. 514–525). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>
- Falbo, F., & Aiello, F. (2023). Chrysin: A polyedric flavone as a tool to explore new phytotherapeutic applications and drug design. *Archiv Der Pharmazie*, *356*(2), 2200347. <https://doi.org/10.1002/ARDP.202200347>
- Fang, X. Z., Zhou, T., Xu, J. Q., Wang, Y. X., Sun, M. M., He, Y. J., Pan, S. W., Xiong, W., Peng, Z. K., Gao, X. H., & Shang, Y. (2021). Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels. In *Cell and Bioscience* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00522-z>
- Farley, A., Hendry, C., & McLafferty, E. (2012). Blood components. *Nursing Standard (Royal College of Nursing (Great Britain): 1987)*, *27*(13), 35–42. <https://doi.org/10.7748/NS2012.11.27.13.35.C9449>
- Fiandra, E. F., Shaw, L., Starck, M., McGurk, C. J., & Mahon, C. S. (2023). Designing biodegradable alternatives to commodity polymers. *Chemical Society Reviews*, *52*(23), 8085–8105. <https://doi.org/10.1039/D3CS00556A>
- Flatt, J. F., & Bruce, L. J. (2018). The molecular basis for altered cation permeability in hereditary stomatocytic human red blood cells. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 9, Issue APR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00367>

- Föllner, M., & Lang, F. (2020). Ion Transport in Eryptosis, the Suicidal Death of Erythrocytes. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00597>
- Fortis, S. P., Batrinou, A., Georgatzakou, H. T., Tsamesidis, I., Albanidis, G., Papageorgiou, E. G., Stamoulis, K., Gkiliopoulos, D., Pouroutzidou, G. K., Theocharidou, A., Kontonasaki, E., & Kriebardis, A. G. (2024). Effect of silica-based mesoporous nanomaterials on human blood cells. *Chemico-Biological Interactions*, 387. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110784>
- Gagliardi, A., Giuliano, E., Venkateswararao, E., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V., & Cosco, D. (2021). Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 601626. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>
- Gao, S., Siddiqui, N., Etim, I., Du, T., Zhang, Y., & Liang, D. (2021). Developing nutritional component chrysin as a therapeutic agent: Bioavailability and pharmacokinetics consideration, and ADME mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 142. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.112080>
- Ghashghaenia, M., Cluitmans, J. C. A., Akel, A., Dreischer, P., Toulany, M., Köberle, M., Skabytska, Y., Saki, M., Biedermann, T., Duszenko, M., Lang, F., Wieder, T., & Bosman, G. J. C. G. M. (2012). The impact of erythrocyte age on eryptosis. *British Journal of Haematology*, 157(5), 606–614. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2012.09100.x>
- Grebowski, J., Kazmierska, P., Litwinienko, G., Lankoff, A., Wolszczak, M., & Krokosz, A. (2018). Fullerenol C 60 (OH) 36 protects human erythrocyte membrane against high-energy electrons. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1860(8), 1528–1536. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.005>
- Gurkan, U. A. (2021). Biophysical and rheological biomarkers of red blood cell physiology and pathophysiology. In *Current Opinion in Hematology* (Vol. 28, Issue 3, pp. 138–149). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000639>
- Han, B.-G., Nunomura, W., Takakuwa, Y., Mohandas, N., & Jap, B. K. (2000). *letters Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization*. <http://structbio.nature.com>
- Hariyadi, D. M., & Islam, N. (2020). Current status of alginate in drug delivery. In *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/8886095>
- He, C., Yue, H., Xu, L., Liu, Y., Song, Y., Tang, C., & Yin, C. (2020). siRNA release kinetics from polymeric nanoparticles correlate with RNAi efficiency and inflammation

- therapy via oral delivery. *Acta Biomaterialia*, 103, 213–222.
<https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2019.12.005>
- Johnson, C. P., Tang, H. Y., Carag, C., Speicher, D. W., & Discher, D. E. (2007). Forced unfolding of proteins within cells. *Science*, 317(5838), 663–666.
<https://doi.org/10.1126/science.1139857>
- Kalva, S. N., Augustine, R., Al Mamun, A., Dalvi, Y. B., Vijay, N., & Hasan, A. (2021). Active agents loaded extracellular matrix mimetic electrospun membranes for wound healing applications. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 63). Editions de Sante. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102500>
- Khan, J., Deb, P. K., Priya, S., Medina, K. D., Devi, R., Walode, S. G., & Rudrapal, M. (2021). Dietary flavonoids: Cardioprotective potential with antioxidant effects and their pharmacokinetic, toxicological and therapeutic concerns. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 13). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26134021>
- Khanna, P., Ong, C., Bay, B. H., & Baeg, G. H. (2015). Nanotoxicity: An interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. In *Nanomaterials* (Vol. 5, Issue 3, pp. 1163–1180). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nano5031163>
- Klei, T. R. L., Dalimot, J. J., Beuger, B. M., Veldhuis, M., Ichou, F. A., Verkuijlen, P. J. J. H., Seignette, I. M., Ligthart, P. C., Kuijpers, T. W., Van Zwieten, R., & Van Bruggen, R. (2020). The Gardos effect drives erythrocyte senescence and leads to Lu/BCAM and CD44 adhesion molecule activation. *Blood Advances*, 4(24), 6218–6229.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003077>
- Klei, T. R. L., Meinderts, S. M., van den Berg, T. K., & van Bruggen, R. (2017a). From the cradle to the grave: The role of macrophages in erythropoiesis and erythrophagocytosis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue FEB). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00073>
- Klei, T. R. L., Meinderts, S. M., van den Berg, T. K., & van Bruggen, R. (2017b). From the cradle to the grave: The role of macrophages in erythropoiesis and erythrophagocytosis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue FEB). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00073>
- Kodippili, G. C., Spector, J., Hale, J., Giger, K., Hughes, M. R., McNagny, K. M., Birkenmeier, C., Peters, L., Ritchie, K., & Low, P. S. (2012). Analysis of the mobilities of band 3 populations associated with ankyrin protein and junctional complexes in intact murine erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(6), 4129–4138.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.294439>
- Konduru, N. V., Molina, R. M., Swami, A., Damiani, F., Pyrgiotakis, G., Lin, P., Andreozzi, P., Donaghey, T. C., Demokritou, P., Krol, S., Kreyling, W., & Brain, J. D. (2017). Protein corona: Implications for nanoparticle interactions with pulmonary cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0223-3>

- Koppenol, W. H. (2001). The Haber-Weiss cycle - 70 years later. In *Redox Report* (Vol. 6, Issue 4, pp. 229–234). <https://doi.org/10.1179/135100001101536373>
- Kuhn, V., Diederich, L., Keller, T. C. S., Kramer, C. M., Lückstädt, W., Panknin, C., Suvorava, T., Isakson, B. E., Kelm, M., & Cortese-Krott, M. M. (2017). Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 26, Issue 13, pp. 718–742). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6954>
- Lang, F., Lang, E., & Filler, M. (2012). Physiology and pathophysiology of eryptosis. In *Transfusion Medicine and Hemotherapy* (Vol. 39, Issue 5, pp. 308–314). <https://doi.org/10.1159/000342534>
- Li, S. Q., Zhu, R. R., Zhu, H., Xue, M., Sun, X. Y., Yao, S. De, & Wang, S. L. (2008). Nanotoxicity of TiO₂ nanoparticles to erythrocyte in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3626–3631. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.012>
- Low, F. M., Hampton, M. B., & Winterbourn, C. C. (2008). Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 10, Issue 9, pp. 1621–1629). <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2081>
- Lu, H., Zhang, S., Wang, J., & Chen, Q. (2021). A Review on Polymer and Lipid-Based Nanocarriers and Its Application to Nano-Pharmaceutical and Food-Based Systems. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.783831>
- Luna-Vázquez-gómez, R., Arellano-García, M. E., García-Ramos, J. C., Radilla-Chávez, P., Salas-Vargas, D. S., Casillas-Figueroa, F., Ruiz-Ruiz, B., Bogdanchikova, N., & Pestryakov, A. (2021). Hemolysis of human erythrocytes by argovit™ agnps from healthy and diabetic donors: An in vitro study. *Materials*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/ma14112792>
- Lutz, H. U., & Bogdanova, A. (2013). Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. In *Frontiers in Physiology: Vol. 4 DEC*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00387>
- Lux, S. E. (2016). *Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions*. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12>
- Ma, Z., Bai, J., Wang, Y., & Jiang, X. (2014). Impact of shape and pore size of mesoporous silica nanoparticles on serum protein adsorption and RBCS hemolysis. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(4), 2431–2438. <https://doi.org/10.1021/am404860q>
- Mani, R., & Natesan, V. (2018). Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry*, 145, 187–196. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2017.09.016>

- Mankelow, T. J., Satchwell, T. J., & Burton, N. M. (2012). Refined views of multi-protein complexes in the erythrocyte membrane. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 49(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2012.03.001>
- Martínez Rivas, C. J., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q. A., Galindo Rodríguez, S. A., Román, R. Á., Fessi, H., & Elaissari, A. (2017). Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(1), 66–81. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.08.064>
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 20, Issue 2, pp. 101–124). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: Past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939–3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
- Möller, M. N., Cuevasanta, E., Orrico, F., Lopez, A. C., Thomson, L., & Denicola, A. (2019). Diffusion and transport of reactive species across cell membranes. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1127, pp. 3–19). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11488-6_1
- Monopoli, M. P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Baldelli Bombelli, F., & Dawson, K. A. (2011). Physical-Chemical aspects of protein corona: Relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 133(8), 2525–2534. <https://doi.org/10.1021/ja107583h>
- Nandakumar, S. K., Ulirsch, J. C., & Sankaran, V. G. (2016). Advances in understanding erythropoiesis: Evolving perspectives. In *British Journal of Haematology* (Vol. 173, Issue 2, pp. 206–218). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/bjh.13938>
- Naz, S., Imran, M., Rauf, A., Orhan, I. E., Shariati, M. A., IqraYasmin, Shahbaz, M., Qaisrani, T. B., Shah, Z. A., Plygun, S., & Heydari, M. (2019). Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. In *Life Sciences* (Vol. 235). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116797>
- Nemkov, T., Hansen, K. C., Dumont, L. J., & D'Alessandro, A. (2016). Metabolomics in transfusion medicine. In *Transfusion* (Vol. 56, Issue 4, pp. 980–993). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/trf.13442>
- Nichols, J. W., & Bae, Y. H. (2012). Odyssey of a cancer nanoparticle: from injection site to site of action. *Nano Today*, 7(6), 606–618. <https://doi.org/10.1016/J.NANTOD.2012.10.010>
- Orrico, F., Laurance, S., Lopez, A. C., Lefevre, S. D., Thomson, L., Möller, M. N., & Ostuni, M. A. (2023). Oxidative Stress in Healthy and Pathological Red Blood Cells. In *Biomolecules* (Vol. 13, Issue 8). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biom13081262>

- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1).
<https://doi.org/10.1186/S12951-018-0392-8>
- Pretini, V., Koenen, M. H., Kaestner, L., Fens, M. H. A. M., Schiffelers, R. M., Bartels, M., & Van Wijk, R. (2019). Red blood cells: Chasing interactions. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 10, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00945>
- Ramot, Y., Koshkaryev, A., Goldfarb, A., Yedgar, S., & Barshtein, G. (2008). Phenylhydrazine as a partial model for beta-thalassaemia red blood cell hemodynamic properties. *British Journal of Haematology*, 140(6), 692–700.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.2007.06976.X>
- Reithmeier, R. A. F., Casey, J. R., Kalli, A. C., Sansom, M. S. P., Alguel, Y., & Iwata, S. (2016). Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1858, Issue 7, pp. 1507–1532). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.030>
- Repsold, L., & Joubert, A. M. (2018). Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death. In *BioMed Research International* (Vol. 2018). Hindawi Limited.
<https://doi.org/10.1155/2018/9405617>
- Rungaldier, S., Oberwagner, W., Salzer, U., Csaszar, E., & Prohaska, R. (2013). Stomatin interacts with GLUT1/SLC2A1, band 3/SLC4A1, and aquaporin-1 in human erythrocyte membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(3), 956–966. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.030>
- Rzigalinski, B. A., Giovinco, H. M., & Cheatham, B. J. (2020). Cerium Oxide Nanoparticles Improve Lifespan of Stored Blood. *Military Medicine*, 185, 103–109.
<https://doi.org/10.1093/milmed/usz210>
- Sahoo, K., Koralege, R. S. H., Flynn, N., Koteeswaran, S., Clark, P., Hartson, S., Liu, J., Ramsey, J. D., Pope, C., & Ranjan, A. (2016). Nanoparticle Attachment to Erythrocyte Via the Glycophorin a Targeted ERY1 Ligand Enhances Binding without Impacting Cellular Function. *Pharmaceutical Research*, 33(5), 1191–1203.
<https://doi.org/10.1007/s11095-016-1864-x>
- Salatin, S., Barar, J., Barzegar-Jalali, M., Adibkia, K., Kiafar, F., & Jelvehgari, M. (2017). Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water-soluble drug into Eudragit RL nanoparticles. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.199041>
- Sapian, S., Taib, I. S., Latip, J., Katas, H., Chin, K. Y., Nor, N. A. M., Jubaidi, F. F., & Budin, S. B. (2021a). Therapeutic Approach of Flavonoid in Ameliorating Diabetic Cardiomyopathy by Targeting Mitochondrial-Induced Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/IJMS222111616>

- Sapian, S., Taib, I. S., Latip, J., Katas, H., Chin, K. Y., Nor, N. A. M., Jubaidi, F. F., & Budin, S. B. (2021b). Therapeutic approach of flavonoid in ameliorating diabetic cardiomyopathy by targeting mitochondrial-induced oxidative stress. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 21). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/ijms222111616>
- Sen Gupta, A. (2019). Hemoglobin-based oxygen carriers: Current state-of-the-art and novel molecules. In *Shock* (Vol. 52, Issue 1S, pp. 70–83). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001009>
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6(DEC). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2015.00286>
- Silva, A. M., Alvarado, H. L., Abrego, G., Martins-Gomes, C., Garduño-Ramirez, M. L., García, M. L., Calpena, A. C., & Souto, E. B. (2019). In Vitro Cytotoxicity of Oleonic/Ursolic Acids-Loaded in PLGA Nanoparticles in Different Cell Lines. *Pharmaceutics*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS11080362>
- Song, R., Murphy, M., Li, C., Ting, K., Soo, C., & Zheng, Z. (2018). Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. In *Drug Design, Development and Therapy* (Vol. 12, pp. 3117–3145). Dove Medical Press Ltd.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S165440>
- Souto, E. B., Souto, S. B., Campos, J. R., Severino, P., Pashirova, T. N., Zakharova, L. Y., Silva, A. M., Durazzo, A., Lucarini, M., Izzo, A. A., & Santini, A. (2019). Nanoparticle Delivery Systems in the Treatment of Diabetes Complications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(23). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24234209>
- Su, H., Wang, Y., Gu, Y., Bowman, L., Zhao, J., & Ding, M. (2018). Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 38(1), 3–24. <https://doi.org/10.1002/JAT.3476>
- Sui, Z., Nowak, R. B., Bacconi, A., Kim, N. E., Liu, H., Li, J., Wickrema, A., An, X. L., & Fowler, V. M. (2014). Tropomodulin3-null mice are embryonic lethal with anemia due to impaired erythroid terminal differentiation in the fetal liver. *Blood*, 123(5), 758–767.
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-492710>
- Svetina, S., Švelc Kebe, T., & Božič, B. (2019). A Model of Piezo1-Based Regulation of Red Blood Cell Volume. *Biophysical Journal*, 116(1), 151–164.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.11.3130>
- Talebi, M., Talebi, M., Farkhondeh, T., Kopustinskiene, D. M., Simal-Gandara, J., Bernatoniene, J., & Samarghandian, S. (2021). An updated review on the versatile role of chrysin in neurological diseases: Chemistry, pharmacology, and drug delivery approaches. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 141). Elsevier Masson s.r.l.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111906>

- Tian, Y., Tian, Z., Dong, Y., Wang, X., & Zhan, L. (2021). Current advances in nanomaterials affecting morphology, structure, and function of erythrocytes. *RSC Advances*, *11*(12), 6958–6971. <https://doi.org/10.1039/D0RA10124A>
- Tkachenko, A. (2024). Hemocompatibility studies in nanotoxicology: Hemolysis or eryptosis? (A review). *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, *98*. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2024.105814>
- Tzounakas, V. L., Anastasiadi, A. T., Drossos, P. V., Karadimas, D. G., Valsami, S., Stamoulis, K. E., Papassideri, I. S., Politou, M., Antonelou, M. H., & Kriebardis, A. G. (2021). Sex-related aspects of the red blood cell storage lesion. *Blood Transfusion*, *19*(3), 224–236. <https://doi.org/10.2450/2020.0141-20>
- Tzounakas, V. L., Anastasiadi, A. T., Stefanoni, D., Cendali, F., Bertolone, L., Gamboni, F., Dzieciatkowska, M., Rousakis, P., Vergaki, A., Soulakis, V., Tsitsilonis, O. E., Stamoulis, K., Papassideri, I. S., Kriebardis, A. G., D'Alessandro, A., & Antonelou, M. H. (2022). Beta thalassemia minor is a beneficial determinant of red blood cell storage lesion. *Haematologica*, *107*(1), 112–125. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.273946>
- Tzounakas, V. L., Kriebardis, A. G., Papassideri, I. S., & Antonelou, M. H. (2016). Donor-variation effect on red blood cell storage lesion: A close relationship emerges. In *Proteomics - Clinical Applications* (Vol. 10, Issue 8, pp. 791–804). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/prca.201500128>
- van den Akker, E., Satchwell, T. J., Williamson, R. C., & Toye, A. M. (2010). Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *45*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2010.02.019>
- Velásquez, F. C., Maté, S., Bakás, L., & Herlax, V. (2015). Induction of eryptosis by low concentrations of E. coli alpha-hemolysin. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1848*(11), 2779–2788. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2015.08.012>
- Wang, X., Wang, S., & Zhang, Y. (2016). Advance of the application of nano-controlled release system in ophthalmic drug delivery. *Drug Delivery*, *23*(8), 2897–2901. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1116025>
- Yamaguchi, T., Manaka, C., Ogura, A., & Nagadome, S. (2021). Importance of Cholesterol Side Chain in the Membrane Stability of Human Erythrocytes. In *Biol. Pharm. Bull* (Vol. 888, Issue 6).
- Yedgar, S., Barshtein, G., & Gural, A. (2022). Hemolytic Activity of Nanoparticles as a Marker of Their Hemocompatibility. In *Micromachines* (Vol. 13, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/mi13122091>
- Zielí Nska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (n.d.). *Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology*. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>

Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Nagasamy Venkatesh, D., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25(16). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25163731>