



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ



**Ωσμωτική και μηχανική αντίσταση
ερυθροκυττάρων σε δείγματα ασθενών με βλάβη στο ήπαρ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ : ΙΩΑΝΝΑ ΜΥΛΩΝΑ
Α.Μ: 20678218**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Γ. ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ

ΤΙΤΛΟΣ: Καθηγητής Εργαστηριακής Αιματολογίας Παθοφυσιολογίας Διατήρησης του Ερυθροκυττάρου και Αιμοδοσίας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών

Διευθυντής Εργαστηρίου Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία

Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αθήνα (ΠΑΔΑ), Ελλάδα.

ΑΘΗΝΑ 2024



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



**Osmotic and mechanical resistance of erythrocytes
in samples from patients with liver damage**

DISSERTATION

NAME: IOANNA MYLONA
CANDIDATE NUMBER: 20678218

SUPERVISOR: ANASTASIOS G. KRIEBARDIS

TITLE: Professor of Laboratory Hematology and Transfusion Medicine

Dpt of Biomedical Sciences

Head Lab Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology

University of West Attica, Athens (UniWA), Greece

ATHENS 2024

Επιτροπή Εξέτασης της Διπλωματικής Εργασίας

<u>Όνοματεπώνυμο</u>	<u>Υπογραφή</u>
ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ	
ΔΡΥΛΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ	
ΦΟΡΤΗΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ	

Πίνακας περιεχομένων

Δήλωση Συγγραφέα	6
Ευχαριστίες	7
Περίληψη	8
Abstract.....	9
Συνοπμογραφίες.....	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Το αίμα.....	11
1.2 Τα ερυθρά αιμοσφαίρια.....	11
1.2.1 Τα λιπίδια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης	11
1.2.2. Οι λιπιδικές σχεδίες	12
1.2.3 Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης.....	12
1.3 Το ήπαρ.....	15
1.2.1 Βασική δομή	15
1.2.2 Κύριες λειτουργίες	16
1.4 ALD.....	18
1.3.1 Ο μεταβολισμός της αιθανόλης στο ήπαρ	18
1.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό του αλκοόλ.....	20
1.3.3 Το εύρος της Αλκοολικής Νόσου του Ήπατος	21
1.3.4 Συσχέτιση μεταξύ αλλαγών στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη επαγόμενες από αλκοόλ και αιμόλυση σε χρόνια αλκοολικούς	22
1.4 Η ωσμωτική αντίσταση των ερυθροκυττάρων	23
1.4.4 Θεωρητικό υπόβαθρο	23
1.5 Η μηχανική αντίσταση των ερυθροκυττάρων	24
1.5.4 Θεωρητικό υπόβαθρο	24
1.6 Η οξειδωτική αιμόλυση με Φαινυλδραζίνη.....	25
1.7 Σκοπός της εργασίας	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1 Δειγματοληψία.....	27
2.2 Προετοιμασία.....	27
2.3 Μέτρηση Οσμωτικής Ευθραυστότητας.....	27
2.4 Μέτρηση Μηχανικής Ευθραυστότητας.....	28
2.5 Μέτρηση της Οξειδωτικής Αιμόλυσης	30
2.6 Στατιστική Ανάλυση.....	30
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
3.1 Γενική ανάλυση αίματος	31

3.2 Μέτρηση Ωσμωτικής Ευθραυστότητας	32
3.3 Μέτρηση Μηχανικής Ευθραυστότητας	33
3.4 Μέτρηση Οξειδωτικής Αιμόλυσης.....	34
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	35
Βιβλιογραφία	37

Δήλωση Συγγραφέα

Η κάτωθι υπογεγραμμένη ΙΩANNA ΜΥΛΩΝΑ του ΑΛΕΞΙΟΥ, φοιτήτρια στη Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών στην κατεύθυνση των Ιατρικών Εργαστηρίων, με αριθμό μητρώου 20678218, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

Η Δηλούσα



Ιωάννα Μυλωνά

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου εκτίμηση στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνάς μου, και στον κ. Σωτήριο Φόρτη, Ακαδημαϊκό Υπότροφο του τμήματος, για την σημαντική συμβολή του στην περάτωση της εργασίας μου.

Επίσης, ευχαριστώ τους συμφοιτητές μου Δήμητρα Σκουλουφινάκη και Χούσι Ντάβιντ, για τη βοήθειά τους και την υποστήριξη σε κάθε βήμα της διαδικασίας. Ευχαριστώ επίσης την Μάρα Κοσμά, υποψήφια Διδάκτορα του Τμήματος, για την βοήθεια που μας προσέφερε στην περάτωση των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και την οικογένειά μου για την αμέριστη στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Χωρίς την αγάπη και την υπομονή τους, τίποτα από αυτά δεν θα ήταν δυνατό.

Περίληψη

Η παρούσα μελέτη διερευνά τη μηχανική και ωσμωτική αντίσταση των ερυθροκυττάρων σε ασθενείς με ηπατική βλάβη, με ιδιαίτερη έμφαση σε όσους πάσχουν από Αλκοολική Νόσο του Ήπατος (ALD). Το ήπαρ διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον μεταβολισμό της αιθανόλης και η βλάβη του μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση και τη λειτουργικότητα της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων. Αυτές οι αλλαγές ενδέχεται να μειώσουν την ικανότητα των ερυθροκυττάρων να αντέχουν σε ωσμωτικό και μηχανικό στρες, καθιστώντας τα πιο επιρρεπή σε αιμόλυση. Η έρευνα στοχεύει να αποσαφηνίσει τη σχέση μεταξύ των αλλαγών στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων που προκαλούνται από το αλκοόλ και της αυξημένης αιμόλυσης σε χρόνιους αλκοολικούς.

Η μελέτη ξεκινά με μια λεπτομερή εξέταση του αίματος και των ερυθροκυττάρων, δίνοντας έμφαση στα λιπίδια και τις πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Η λιπιδική διπλοστιβάδα και οι σχετιζόμενες πρωτεΐνες της μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένων αυτών που εμπλέκονται στις λιπιδικές σχέδιες, είναι κρίσιμες για τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας και της λειτουργικότητας των ερυθροκυττάρων. Οι διαταραχές σε αυτά τα συστατικά, που προκαλούνται συχνά από το οξειδωτικό στρες και τα παραπροϊόντα του μεταβολισμού της αιθανόλης, υποτίθεται ότι συμβάλλουν στην αυξημένη ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων σε ασθενείς με ηπατική βλάβη.

Στη συνέχεια, αναλύεται η δομή και οι κύριες λειτουργίες του ήπατος, καθώς και η ALD, η παθογένειά της και οι παράγοντες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό του αλκοόλ στο ήπαρ. Η έρευνα εξετάζει το φάσμα της ALD, από το λιπώδες ήπαρ έως την κίρρωση, και τις συστηματικές της επιδράσεις, ιδίως στη μεμβρανική ακεραιότητα των ερυθροκυττάρων. Η σύνδεση μεταξύ της ALD και της αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων θεμελιώνεται μέσω της ανασκόπησης της υπάρχουσας βιβλιογραφίας και της παρουσίασης υποθέσεων για το πώς οι αλλαγές στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων που προκαλούνται από το αλκοόλ θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αυξημένη μηχανική και ωσμωτική ευθραυστότητα.

Η μεθοδολογία περιλαμβάνει τη συλλογή δειγμάτων αίματος από ασθενείς με ηπατική βλάβη, ακολουθούμενη από την προετοιμασία και ανάλυση αυτών των δειγμάτων για την αξιολόγηση της ωσμωτικής και μηχανικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων. Η έρευνα περιλαμβάνει επίσης δοκιμές οξειδωτικής αιμόλυσης με τη χρήση φαινυλυδραζίνης για να εκτιμηθεί η ευαισθησία των ερυθροκυττάρων στο οξειδωτικό στρες. Αυτές οι πειραματικές διαδικασίες έχουν σχεδιαστεί για να παρέχουν μια ολοκληρωμένη κατανόηση του πώς η ηπατική βλάβη επηρεάζει τη διαρκή ανθεκτικότητα των ερυθροκυττάρων υπό διαφορετικές συνθήκες στρες.

Η μελέτη διεξήχθη πιλοτικά σε ένα μικρό πληθυσμό ασθενών και υγείων ατόμων, προκειμένου να αξιολογήσουμε και να σχεδιάσουμε περαιτέρω την πορεία της έρευνας. Τα αποτελέσματα έδειξαν σαφή στατιστική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών στην δοκιμασία ωσμωτικής ευθραυστότητας, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία. Παρόλα αυτά, το ίδιο δεν ισχύει για την μέτρηση της μηχανικής ευθραυστότητας και την οξειδωτική αιμόλυση, διότι αμφότερες οι δοκιμασίες κρίθηκαν μη αξιολογήσιμες με τιμή p -value > 0.05.

Η κατανόηση των κυτταρικών αλλαγών που προκαλούνται από την ηπατική βλάβη και των συνεπειών τους για την υγεία των ερυθροκυττάρων είναι υψίστης σημασίας. Η έρευνα αναδεικνύει την προοπτική των ευρημάτων να συμβάλουν στη βελτίωση των θεραπευτικών στρατηγικών με στόχο τη μείωση της αιμόλυσης και τη βελτίωση της κλινικής διαχείρισης των ασθενών με ALD.

Λέξεις- κλειδιά: ερυθροκύτταρα, ωσμωτική ευθραυστότητα, μηχανική ευθραυστότητα, οξειδωτική αιμόλυση, αλκοολική ηπατοπάθεια.

Abstract

This study investigates the mechanical and osmotic resistance of erythrocytes in patients with liver damage, with a particular emphasis on those suffering from Alcoholic Liver Disease (ALD). The liver plays a crucial role in ethanol metabolism, and its impairment can lead to significant changes in the composition and functionality of the erythrocyte membrane. These changes may reduce the erythrocytes' ability to withstand osmotic and mechanical stress, making them more susceptible to hemolysis. The research aims to clarify the relationship between alcohol-induced changes in the erythrocyte membrane and increased hemolysis in chronic alcoholics.

The study begins with a detailed examination of blood and erythrocytes, focusing on the lipids and proteins of the erythrocyte membrane. The lipid bilayer and associated membrane proteins, including those involved in lipid rafts, are critical for maintaining the structural integrity and functionality of erythrocytes. Disruptions in these components, often caused by oxidative stress and ethanol metabolism byproducts, are hypothesized to contribute to the increased fragility of erythrocytes in patients with liver damage.

Next, the structure and primary functions of the liver, along with ALD, its pathogenesis, and the factors affecting alcohol metabolism in the liver, are analyzed. The research examines the spectrum of ALD, from fatty liver to cirrhosis, and its systemic effects, particularly on the membrane integrity of erythrocytes. The connection between ALD and erythrocyte hemolysis is established through a review of the existing literature and hypotheses on how alcohol-induced changes in the erythrocyte membrane could lead to increased mechanical and osmotic fragility.

The methodology includes the collection of blood samples from patients with liver damage, followed by the preparation and analysis of these samples to assess the osmotic and mechanical fragility of the erythrocytes. The research also involves oxidative hemolysis assays using phenylhydrazine to evaluate the erythrocytes' susceptibility to oxidative stress. These experimental procedures are designed to provide a comprehensive understanding of how liver damage affects the ongoing durability of erythrocytes under different stress conditions.

The study was conducted as a pilot in a small population of patients and healthy individuals to evaluate and further design the research trajectory. The results showed a clear statistical difference between the populations in the osmotic fragility test, which is consistent with the literature. However, the same was not observed for the mechanical fragility and oxidative hemolysis tests, as both were deemed non-evaluable with a p -value > 0.05 .

Understanding the cellular changes caused by liver damage and their implications for erythrocyte health is of utmost importance. This research highlights the potential of these findings to contribute to improving therapeutic strategies aimed at reducing hemolysis and enhancing the clinical management of patients with ALD.

Keywords: erythrocytes, osmotic fragility, mechanical fragility, oxidative hemolysis, alcoholic liver disease.

Συντομογραφίες

ADH1B	Αφυδρογονάση Αλκοόλης 1B
ALDH2	Αφυδρογονάση Αλδεΐδης 2
ALD	Αλκοολική Νόσος του Ήπατος
CO2	Διοξείδιο του Άνθρακα
CYP2E1	Κυτόχρωμα P450 2E1
CYP450	Κυτόχρωμα P450
DAMPS	Πρότυπα Μοριακής Βλάβης
DHA	L-αφυδροασκορβικό οξύ
FPM	Μεταβολισμός Πρώτης Διόδου
GLUT1	Μεταφορέας Γλυκόζης 1
GPI	Γλυκοσυλοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
MF	Μηχανική Ευθραυστότητα
NAD+	Νικοτιδάμινο- αδένινο Δινουκλεοτίδιο
NADH	Νικοτιδάμινο- αδένινο Δινουκλεοτίδιο(αναχθείσα μορφή)
PE	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PHZ	Φαινυλδραζίνη
PIP2	4,5- διφωσφορική φωσφατυδυλοϊνοσιτόλη
PS	Φωσφατιδυλοσερίνη
RAHAG	Σχετιζόμενη με τον παράγοντα Rhesus γλυκοπρωτεΐνη
RBCS	Ερυθρά Αιμοσφαίρια
RNS	Δραστικές Ρίζες Αζώτου
ROS	Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου
SM	Σφιγγομυελίνη
UGT	Γλυκουρονυλοτρανσφεράση διφωσφορικής ουριδίνης

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το αίμα

Το αίμα είναι ένας υγρός συνδετικός ιστός, μείζονος σημασίας για τη διατήρηση της ζωής. Εκτελεί πολλές σημαντικές λειτουργίες, ανάμεσα στην οποίες είναι η παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στους ιστούς και η απομάκρυνση μεταβολικών αποβλήτων, όπως είναι το διοξείδιο του άνθρακα, η ουρία και το γαλακτικό οξύ. Το αίμα, συμβάλλει επίσης στην άμυνα του οργανισμού με τα λευκά αιμοσφαίρια να ανιχνεύουν και να καταπολεμούν τα ξένα προς τον οργανισμό ερεθίσματα. Καίρια για την διαφύλαξη της ακεραιότητας του οργανισμού, είναι η ικανότητα του αίματος να πήζει μέσα από μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, όποτε αυτό είναι απαραίτητο. Επιπρόσθετα, το αίμα βοηθά στη ρύθμιση του ομοιοστατικού μηχανισμού και συμμετέχει σε μια πληθώρα σηματοδοτικών λειτουργιών όπως είναι η μεταφορά ορμονών ή η ενεργοποίηση του αμυντικού μηχανισμού.

Η σύσταση του αίματος χωρίζεται σε δύο κύριες κατηγορίες: το πλάσμα και τα έμμορφα στοιχεία, δηλαδή τα κύτταρα. Το πλάσμα, αποτελεί το υγρό μέρος του αίματος και σχηματίζει περίπου το 55% του συνολικού όγκου του. Περιλαμβάνει τα έμμορφα συστατικά όπως επίσης και νερό, ηλεκτρολύτες, πρωτεΐνες, θρεπτικά συστατικά, ορμόνες, αέρια και διάφορα άλλα παραπροϊόντα. Το υπόλοιπο 45% του αίματος αποτελείται από κύτταρα, τα ερυθρά και τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια, με τα δύο τελευταία να αποτελούν μόνο το 1% των έμμορφων στοιχείων. Τα λευκά αιμοσφαίρια σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση, ενώ τα αιμοπετάλια εμπλέκονται στον σχηματισμό του θρόμβου στη διαδικασία της πήξης. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια αναλύονται εκτενέστερα παρακάτω στην παρούσα εργασία, καθώς αποτελούν και το αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Πρέπει βέβαια να αναφερθεί ότι ανεξάρτητα από τις λειτουργίες που επιτελούν, όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από τα πολυδύναμα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα στον μυελό των οστών, και στη συνέχεια διαφοροποιούνται στις παραπάνω κατηγορίες με την επίδραση αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων.

1.2 Τα ερυθρά αιμοσφαίρια

Τα υγιή ερυθροκύτταρα αποτελούνται από μια συγκεκριμένη δομή, η οποία τους επιτρέπει να επιτελούν την βασική τους λειτουργία, δηλαδή την μεταφορά οξυγόνου προς τους ιστούς και η διαμεσολάβηση της απελευθέρωσης του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) από αυτούς. Είναι απύρνηνα, με σχήμα αμφίκιουλου δίσκου και μια διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων προσκολλημένη στην πυρηνική τους μεμβράνη. Η ιδιαίτερη κατασκευή τους επιτρέπει παραμορφώνονται αναστρέψιμα κατά το πέρασμά τους από τα διάφορα τριχοειδή στην διάρκεια της τετράμηνης ζωής τους. (Böhler, 1992)

1.2.1 Τα λιπίδια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη αποτελείται στο 52% από πρωτεΐνη, 40% από λιπίδια και 8% από υδρογονάνθρακες. (Mohandas N. &., 1994)

Τα κύρια λιπιδικά συστατικά είναι χοληστερόλη και φωσφολιπίδια, τα οποία ανευρίσκονται σχεδόν σε ισομοριακές ποσότητες ενώ, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τα γλυκολιπίδια συναντώνται σε μικρές ποσότητες. Η φωσφολιπιδική σύνθεση της μεμβράνης έχει ως εξής: 30% φωσφατιδυλοχολίνη (PC), 25% σφιγγομυελίνη (SM), 28% φωσφατιδυλαιθανολαμίνη(PE), και 14% φωσφατυδιλοσερίνη (PS), με φωσφολιπίδια όπως το φωσφατιδικό οξύ, 4-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνσοσιτόλη και 4, 5- διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνσοσιτόλη να αποτελούν το 2-3% του συνόλου. Τα φωσφολιπίδια αυτά είναι ασύμμετρα διανεμημένα στη μεμβράνη με περισσότερο από 75% των περιεχόντων χολίνη ουδέτερων λιπιδίων PC και SM βρίσκονται κυρίως στην εξωτερική μονοστιβάδα ενώ, το 80% της PE, όλη η PS και τα ελάσσονα συστατικά φωσφοϊνσοσιτιδίου -αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια- περιορίζονται στην εσωτερική στιβάδα. (Mohandas N. &, 1994) Αυτή η ασυμμετρία διατηρείται χάρη στην ύπαρξη ειδικών πρωτεϊνών-μεταφορέων, τις φλιππάσες, τις φλοππάσες και τις σκραμπλάσες. Οι φλιππάσες, μετακινούν φωσφολιπίδια από την εξωτερική στην έσω μονοστιβάδα ενώ, οι φλοππάσες κάνουν ακριβώς το αντίθετο ενάντια στην κλίση της συγκέντρωσης, χρησιμοποιώντας ενέργεια. Οι σκραμπλάσες μετακινούν φωσφολιπίδια αμφοτερόπλευρα, σύμφωνα με την κλίση της συγκέντρωσης με παθητική μεταφορά.

Η ασυμμετρία αυτή καθαυτή, είναι μείζονος σημασίας για την επιβίωση και ορθή λειτουργία του κυττάρου. Η παρουσία της PS στην έξω φωσφολιπιδική μονοστιβάδα σημάνει τα ερυθροκύτταρα για φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα. Επιπρόσθετα, ο περιορισμός της PS στην εσωτερική στιβάδα αποτρέπει την προσκόλληση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, επιτρέποντας την ομαλή διέλευση των ερυθροκυττάρων εντός του κυκλοφορικού συστήματος. Η αλληλεπίδραση της PS και της 4,5- διφωσφορικής φωσφατυδιλοϊνσοσιτόλης (PIP2) με τις σκελετικές πρωτεΐνες σπεκτρίνη και πρωτεΐνη 4.1R μπορεί να ρυθμίσει την μηχανική λειτουργία της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου. Συγκεκριμένα, η πρόσδεση της PS με τη σπεκτρίνη ενισχύει την μηχανική σταθερότητα. Η PIP2 ενισχύει τον δεσμό μεταξύ της 4.1R με την γλυκοφορίνη C αλλά μειώνει την αλληλεπίδραση με την ζώνη 3, επομένως έτσι ρυθμίζεται η σύνδεση της διπλοστιβάδας με τον μεμβρανικό σκελετό. (Mohandas N. &, 2008)

1.2.2. Οι λιπιδικές σχεδίες

Η διαδικασία μετακίνησης των διαφόρων λιπιδίων στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα γίνεται με τις λιπιδικές σχεδίες. Πρόκειται για δομές πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια και περιέχουν κατά βάση λιπιδικά τροποποιημένες πρωτεΐνες, όπως αυτές προσδεμένες με γλυκοζυλοφωσφατιδυλοϊνσοσιτόλη (GPI). Εκτός αυτών, οι πιο άφθονες μεμβρανικές πρωτεΐνες που βρέθηκαν περιλαμβάνουν φλοπιλλίνες, στοματίνη, ακτίνη, σπεκτρίνες, τις ζώνες 4.1 και 4.2, G-πρωτεΐνες και β-αδρενεργικούς υποδοχείς. Μάλιστα, η στοματίνη και οι φλοπιλλίνες παρουσιάζονται ως ανεξάρτητα ολιγομερή υψηλής τάξης, υποδεικνύοντας ότι αυτά τα σύμπλοκα δρουν ως ανεξάρτητα ικρίωματα των λιπιδικών σχεδίων. (Mohandas N. &, 2008) (Salzer, 2001)

1.2.3 Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης

Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης διαχωρίζονται σε δυο κύρια γκρουπ: τις διαμεμβρανικές και τις περιφερικές. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες είναι καλά προσκολλημένες στη μεμβράνη μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με τα λιπίδια της διπλοστιβάδας. Η ζώνη 3 και οι γλυκοφορίνες ανήκουν σε αυτή την ομάδα, εκτείνουν την μεμβράνη και έχουν διακριτές δομικές και λειτουργικές μονάδες, τόσο εντός όσο και εκατέρωθεν της μεμβράνης. Οι περιφερικές πρωτεΐνες είναι τοποθετημένες στην κυτταροπλασματική επιφάνεια της λιπιδικής διπλοστιβάδας και δύνανται να

απελευθερώνονται εύκολα από τη μεμβράνη μέσω αλλαγών στην ιοντική ισχύ του περιβάλλοντος ή διαφόρων άλλων πρωτεϊνικών διαταραχών. Στις περιφερικές πρωτεΐνες περιλαμβάνονται η σπεκτρίνη, η ακτίνη, η πρωτεΐνη 4.1. και άλλες, οι οποίες αποτελούν τον μεμβρανικό σκελετό. (Mohandas N. &, 1994)

ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν μια πληθώρα μεταφορέων ιόντων, νερού, γλυκόζης και ουρίας, πρωτεΐνες προσκόλλησης και αντλίες ιόντων. Σε αυτά ανήκει και η ακουαπορίνη 1 (AQP1), ένας διάυλος ιόντων νερού, υπεύθυνος για την ταχεία απάντηση του ερυθροκυττάρου όσον αφορά το μέγεθός του έπειτα από μεταβολή της ωσμωτικότητας του πλάσματος. (Mohandas N. &, 2008) (Huang, 2019)

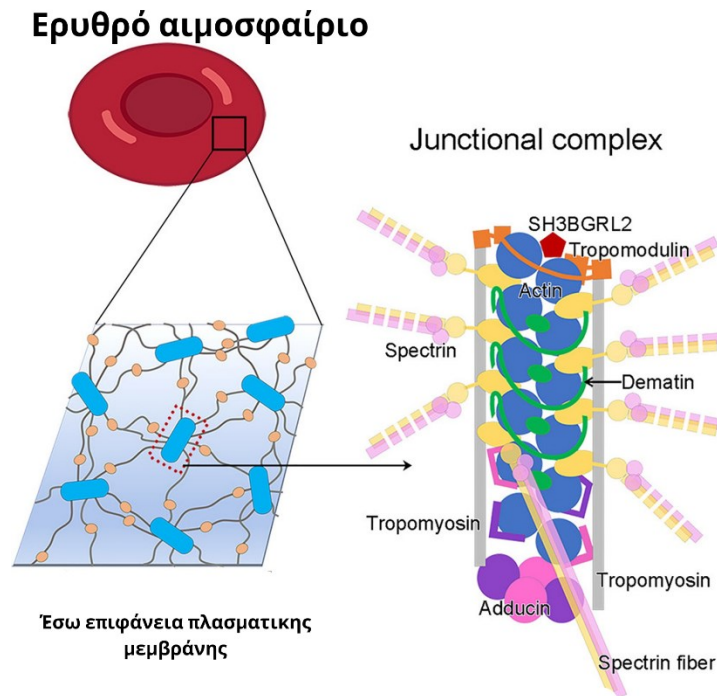
Η δομική ακεραιότητα της μεμβράνης συνδέεται άμεσα με δυο μακρομοριακά συμπλέγματα πρωτεϊνών, ένα με βάση την αγκυρίνη και ένα με βάση την πρωτεΐνη 4.1R. Η ζώνη 3 και η σχετιζόμενη με τον παράγοντα Rhesus γλυκοπρωτεΐνη (RhAG, μεταφορέας αερίων) ενώνουν την διπλοστιβάδα στον μεμβρανικό σκελετό διαμέσου της αλληλεπίδρασής τους με την αγκυρίνη. Η γλυκοφορίνη C και οι παράγοντες XK, Rh και Duffy επιτυγχάνουν το ίδιο μέσω της σύνδεσής τους στην πρωτεΐνη 4.1R. Έχει φανεί επίσης, ότι η αδδουσίνη και η δεματίνη δρουν ως συνδετικές πρωτεΐνες αλληλοεπιδρώντας με την ζώνη 3 και τον μεταφορέα γλυκόζης Glut1 αντίστοιχα. Αυτά τα συμπλέγματα μεμβρανικών και σκελετικών πρωτεϊνών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της συνοχής μεταξύ της λιπιδικής διπλοστιβάδας και του μεμβρανικού σκελετού, επιτρέποντας στα ερυθροκύτταρα να διατηρούν το χαρακτηριστικό τους σχήμα και να αποφεύγουν την κυστιδιοποίηση. Εκτός από τις συνδετικές της ικανότητες, η ζώνη 3 δύναται επίσης να συγκεντρώνει διάφορα γλυκολυτικά ένζυμα, διοξειδίο του άνθρακα και καρβονική ανυδράση σε μακρομοριακά συναθροίσματα ρυθμίζοντας έτσι τον κυτταρικό μεταβολισμό και την λειτουργία μεταφοράς ιόντων και αερίων. (Mohandas N. &, 2008) Επιπλέον, Ο Glut-1 μπορεί και μεταφέρει επιπλέον το κατά πολύ όμοιο με τη γλυκόζη L-αφυδροασκορβικό οξύ (DHA). Το DHA ανάγεται σε ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) όταν εισαχθεί στο κύτταρο το οποίο είναι απαραίτητη συστατική της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Με τη συμβολή της στοματικής επιλέγεται ποιο μόριο θα μεταφερθεί κάθε φορά. (Montel-Hagen, 2008)

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΥΠΟΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΥ ΣΚΕΛΕΤΟΥ

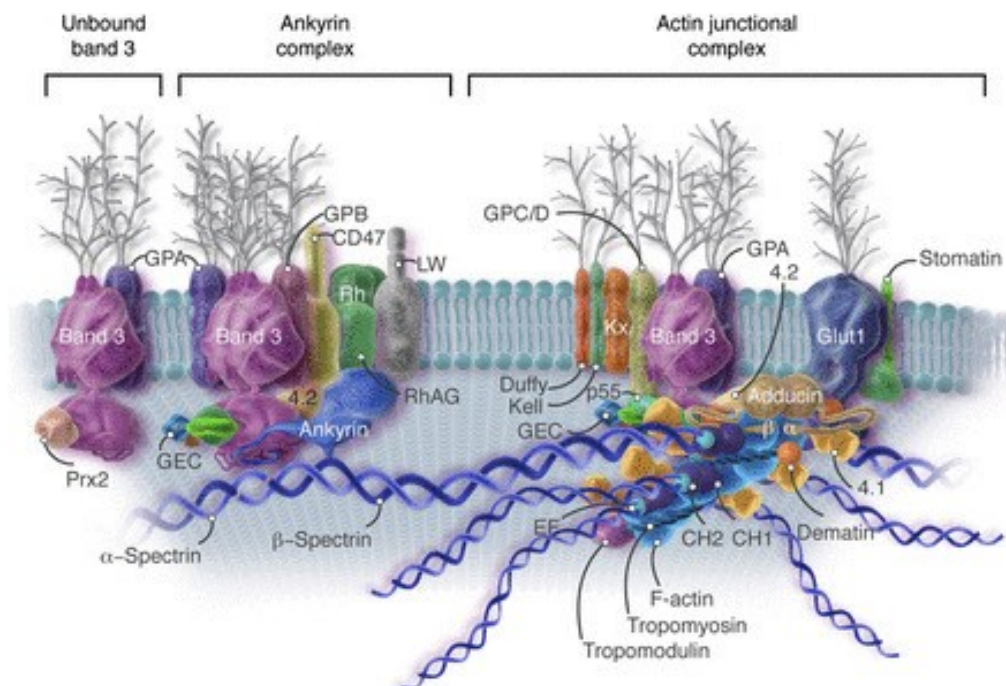
Τα κύρια πρωτεϊνικά συστατικά του δισδιάστατου μεμβρανικού σκελετού με βάση την σπεκτρίνη, αποτελούν το δίκτυο της α- και β- σπεκτρίνης, η ακτίνη, η πρωτεΐνη 4.1R, η αδδουσίνη, η δεματίνη, η τροπομουσίνη και η τροπομοντουλίνη και η αγκυρίνη. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των διμερών σπεκτρίνης και το σύμπλεγμα σύνδεσης σπεκτρίνης-ακτίνης-πρωτεΐνης 4.1R είναι βασικοί ρυθμιστές της μηχανικής σταθερότητας της μεμβράνης και παίζουν κρίσιμο ρόλο στην πρόληψη του κατακερματισμού της μεμβράνης που προκαλείται από παραμόρφωση καθώς το κύτταρο αντιμετωπίζει υψηλές διατμητικές τάσεις στην κυκλοφορία. (Mohandas N. &, 2008) (Kriebardis, 2007)

Τέσσερα με έξι μόρια σπεκτρίνης απλώνονται ακτινωτά από το κέντρο κάθε πρωτονήματος ακτίνης, σχηματίζοντας ένα υπερμοριακό σύμπλεγμα που ονομάζεται «σύμπλεγμα διασταύρωσης (junctional complex)». Αυτά τα σύμπλοκα επεξεργάζονται περαιτέρω με επιπρόσθετες πρωτεΐνες, όπως είναι η τροπομοντουλίνη, η τροπομουσίνη, η πρωτεΐνη 4.1R, η πρωτεΐνη 4.2 και η αδδουσίνη, οι οποίες παίζουν σπουδαίο ρόλο στον σχηματισμό γεφυρών μεταξύ του κυτταροσκελετού και της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Έτσι με αυτόν τον τρόπο ενισχύουν την συγγένεια μεταξύ ακτίνης-

σπεκτρίνης είτε άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπλέγματος. Οι τροπομοντουλίνη, τροπομοσίνη και αδδουσίνη, έχουν επίσης ταυτοποιηθεί ως μεσολαβητές στην οργάνωση του δικτύου της ακτίνης. Η τροπομοντουλίνη βοηθά στην ρύθμιση από τη μεριά της ακτίνης ενώ, η τροπομοσίνη ενισχύει την μηχανική σταθερότητα του ερυθροκυττάρου ελέγχοντας το μήκος των πρωτονηματίων της ακτίνης. (Franco, 2010)



Εικόνα 1 Αδρή αναπαράσταση της δομής του ερυθροκυττάρου. Ανατύπωση από (Li, 2023)



Εικόνα 2 Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού. Ανατύπωση από (Lux S. E., 2016)

1.3 Το ήπαρ

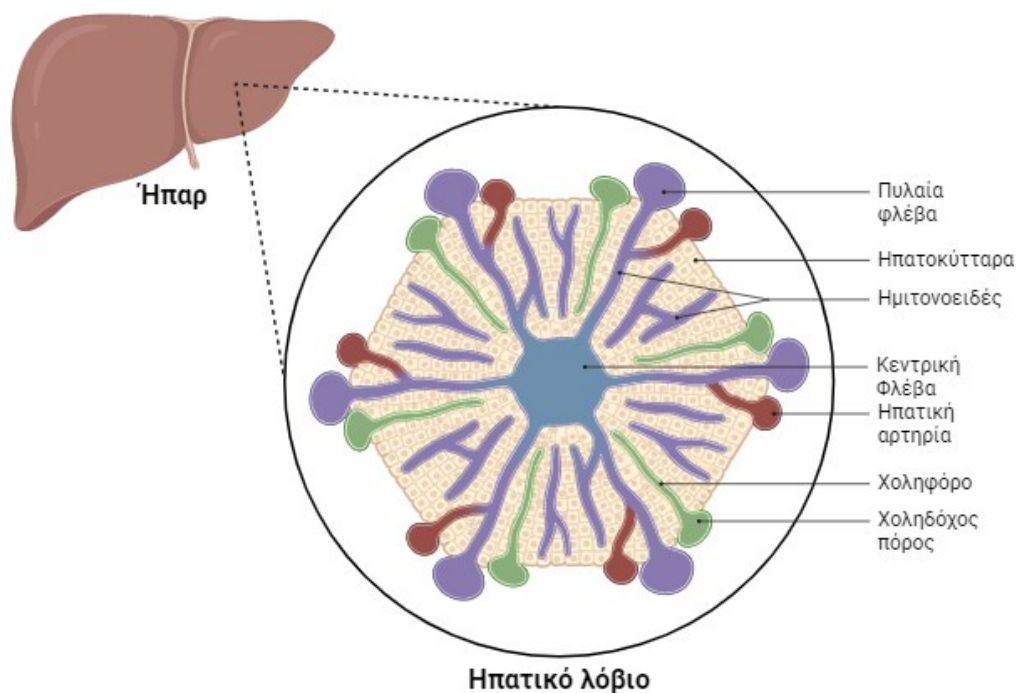
1.2.1 Βασική δομή

Το ήπαρ, είναι το μεγαλύτερο εσωτερικό όργανο, ζυγίζοντας περίπου 1,2 με 1,5 κιλά στους ενήλικες. Βρίσκεται στο δεξί υποχόνδριο και προστατεύεται εν μέρη από τα πλευρά. Αποτελείται από έναν μεγάλο λοβό στα δεξιά και έναν μικρότερο στα αριστερά. Παρόλο που βασικοί λοβοί διαχωρίζονται από συνδέσμους, το όργανο αποτελεί μια ενιαία μάζα δίχως ινώδη διαφράγματα να παρεμβαίνουν μεταξύ τους. Το αγγειακό και χοληφόρο σύστημα των διαφορετικών λοβών είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους. (Israel, 1991)

Η αιμάτωση του ήπατος είναι μοναδικά σχεδιασμένη έτσι ώστε το όργανο να μπορεί να ανταπεξέλθει στις διάφορες μεταβολικές διεργασίες και ιδιαίτερα στον μεταβολισμό των θρεπτικών συστατικών και της αποτοξίνωσης. Το οξυγονωμένο αρτηριακό αίμα εισέρχεται μέσω της ηπατικής αρτηρίας ενώ το πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά φλεβικό αίμα μεταφέρεται από τον σπλήνα, το πάγκρεας και το έντερο στο ήπαρ με την πυλαία φλέβα. Αμφότερα τα αγγεία εισέρχονται μέσω της πύλης του ήπατος και έπειτα διχάζονται σε διαφορετικούς κλάδους στον αριστερό και τον δεξιό λοβό. Το πυλαίο σύστημα προσκομίζει στο ήπαρ όλα τα απορροφημένα από το έντερο συστατικά, δηλαδή υδατάνθρακες, λίπη, πρωτεΐνες, φάρμακα αλλά και τοξίνες. Το αίμα έπειτα εξέρχεται μέσω των ηπατικών φλεβών, οι οποίες εκβάλλουν στην κάτω κοίλη φλέβα. (Israel, 1991)

Το χοληφόρο σύστημα ξεκινά από το ήπαρ και τροφοδοτεί με χολή το λεπτό έντερο προκειμένου να βοηθήσει στην απορρόφηση των λιπών. Η χολή εκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα και αποχετεύεται από το δίκτυο των χοληφόρων πόρων στο δωδεκαδάκτυλο. Η ανατομική οδός που ακολουθούν τα παραπάνω συστατικά ονομάζεται εντεροηπατική κυκλοφορία και κατέχει σημαντικό ρόλο στην ορθή λειτουργία του μεταβολισμού. (Israel, 1991)

Η μικροσκοπική δομή του ήπατος αποτελείται κυρίως από ηπατοκύτταρα, τα λειτουργικά κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την πλειοψηφία των βιοχημικών λειτουργιών του ήπατος. Η δομική και λειτουργική υπομονάδα του ήπατος είναι το λόβιο, το οποίο έχει πυραμοειδές σχήμα με την κεντρική φλέβα στο κέντρο του και την πυλαία τριάδα στην περιφέρεια. Την πυλαία τριάδα απαρτίζουν ένα χοληφόρο αγγείο, ένα παρακλάδι της πυλαίας φλέβας και ένα της ηπατικής αρτηρίας. Ανάμεσα στις πυλαίες τριάδες και την κεντρική ηπατική φλέβα, τα ηπατοκύτταρα διατάσσονται σε μονόστιβες πλάκες, οι οποίες περιβάλλονται από ενδοθήλιο και ηπατικά κολλοειδή. Στα κολλοειδή λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή πλάσματος και ουσιών ώστε τα ηπατοκύτταρα να συνεχίσουν τη μεταβολική και την εκκριτική διαδικασία. Επιπλέον υπάρχουν και τα κύτταρα του Kupffer, τα οποία κάνουν φαγοκυττάρωση και αποτελούν σημαντικό μέρος του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. (Israel, 1991) Τέλος, τα αστρικά κύτταρα αντιπροσωπεύουν έναν δυναμικό πληθυσμό κυττάρων που μπορεί να υπάρχει σε ενεργή ή αδρανή κατάσταση. Σε κατάσταση ηρεμίας, τα αστρικά κύτταρα αποθηκεύουν τη βιταμίνη Α σε σταγονίδια λιπιδίων. Ωστόσο, άλλες λειτουργίες σε αυτή την κατάσταση ηρεμίας παραμένουν ασαφείς. Η βλάβη στο ήπαρ οδηγεί στην ενεργοποίηση των αστρικών κυττάρων. Κατά την ενεργοποίηση, τα αστρικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και σταδιακά χάνουν τα αποθέματα βιταμίνης Α. Τα αυτά κύτταρα είναι επίσης υπεύθυνα για την εναπόθεση και οργάνωση του κολλαγόνου στο τραυματισμένο ήπαρ, συμβάλλοντας έτσι στην δημιουργία ουλώδους ιστού, κατάσταση η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε κίρρωση, μια κρίσιμη παθολογία που συμβάλλει στην ηπατική νόσο τελικού σταδίου. (Trefts, 2017)



Created in BioRender.com

Εικόνα 3 Το ηπατικό λόβιο

1.2.2 Κύριες λειτουργίες

Η φυσιολογική λειτουργία τού ήπατος είναι απαραίτητη για την ανθρώπινη ζωή. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το ήπαρ είναι το όργανο όπου λαμβάνει χώρα ο μεταβολισμός των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Επιπρόσθετα, έχει καίριο ρόλο στον μεταβολισμό της χολερυθρίνης, φαρμάκων, τοξινών, βιταμινών και μετάλλων. Οι διάφορες ηπατικές παθολογίες οφείλονται συνήθως σε διαταραχή αυτών των μεταβολικών οδών. (Israel, 1991)

Το ήπαρ ελέγχει την διαθεσιμότητα γλυκόζης, και άρα ενέργειας στον στο σώμα μέσω του μεταβολισμού των υδατανθράκων. Τα ηπατοκύτταρα μετατρέπουν την γαλακτόζη σε γλυκόζη, από την οποία φτιάχνουν γλυκογόνο με τη συνέργεια γλυκερόλης, γαλακτικού και πυροσταφυλικού οξέος. Το γλυκογόνο αυτό δύνανται να το αποθηκεύουν ή να το διασπούν ξανά σε γλυκόζη σύμφωνα πάντα με τις ανάγκες του οργανισμού. Μάλιστα, δυνατή είναι και η εκ νέου σύνθεση γλυκόζης από αμινοξέα και άλλες πρόδρομες ουσίες. Οι παραπάνω διαδικασίες είναι γνωστές ως γλυκογονόλυση και γλυκονεογένεση αντίστοιχα. (Israel, 1991)

Επιπρόσθετα, το ήπαρ αποτελεί το κύριο σημείο διάσπασης και σύνθεσης πρωτεϊνών στο ανθρώπινο σώμα. Ορισμένες πρωτεΐνες υφίστανται τρανσαμίνωση ή απαμίνωση σε κετοξέα, τα οποία στη συνέχεια μεταβολίζονται μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος ή της ουρίας. Στην οξεία ηπατική νόσο, πρέπει να αχρηστευφθεί το 85% του ήπατος ωστόσο να παρατηρηθεί αύξηση στα επίπεδα των αμινοξέων στο αίμα ή στα ούρα. Μάλιστα, η παραγωγή ουρίας είναι επίσης επηρεασμένη, αλλά η ικανότητα του ήπατος για αυτή την λειτουργία είναι τόσο μεγάλη που σπάνια

παρατηρούνται χαμηλές συγκεντρώσεις σε κεραυνοβόλο ηπατική ανεπάρκεια. Στο ήπαρ συντίθενται επίσης πολλές βασικές πρωτεΐνες του πλάσματος και η μείωση των επιπέδων τους σε περιπτώσεις ηπατικής βλάβης έχει συχνά σημαντικές κλινικές συνέπειες. Ανάμεσα σε αυτές περιλαμβάνονται και οι πρωτεΐνες οξείας φάσης: αλβουμίνη, ινωδογόνο, α1-αντιθρυψίνη, επτασφαιρίνη, σεουλοπλασμίνη και τρανσφερίνη. Πέραν αυτών όμως, στο ήπαρ συντίθενται αναστολείς πρωτεασών που ρυθμίζουν τον καταρράκτη της πήξης και όλοι οι παράγοντες πήξης του αίματος με εξαίρεση τον παράγοντα von Willebrand και του ινωδολυτικούς παράγοντες. Στην διεργασία αυτή αξιοσημείωτος είναι ο ρόλος της βιταμίνης K, αν και η ίδια ούτε αποθηκεύεται ούτε μεταβολίζεται στο ήπαρ. (Israel, 1991) (Kalra, 2023) Ο χρόνος ημίσειας ζωής των πρωτεϊνών αυτών είναι μικρός, και επομένως, εξαντλούνται γρήγορα με την έναρξη της ηπατικής δυσλειτουργίας. (Israel, 1991)

Ο μεταβολισμός των λιπών που κυκλοφορούν στο πλάσμα, όπως είναι η χοληστερόλη, τα φωσφολιπίδια, τα τριγλυκερίδια και οι λιποπρωτεΐνες μεταβολίζονται στο ήπαρ. Η παραγωγή και έκκριση χολής από το ήπαρ επιτρέπει την αποτελεσματική απορρόφηση των λιπών κατά την χώνεψη. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση του ήπατος εξάγει τα λιπαρά οξέα από τα χυλομικρά και μέσω ειδικών πρωτεϊνών μεταφέρονται στα ηπατοκύτταρα. Στη συνέχεια, το ήπαρ χρησιμοποιεί τα λιπαρά οξέα ως εσωτερική πηγή ενέργειας μέσω οξειδωτικών οδών, αλλά μπορεί επίσης να παρέχει ενέργεια σε άλλα όργανα μέσω των κετογονικών προϊόντων (ακετοξικό και β-υδροξυβουτυρικό). Μάλιστα, αυτή η απελευθέρωση κετονών από το συκώτι αποτρέπει τον υπερβολικό σχηματισμό ενδιάμεσων του κύκλου τρικαρβοξυλικού προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο την οξειδωτική κατάσταση. Επίσης, το ήπαρ χρησιμοποιεί τα λιπαρά οξέα μαζί με γλυκερόλη για να συνθέσει τριγλυκερίδια, τα οποία πακετάρονται σε πρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας και εκκρίνονται στην κυκλοφορία. Αυτά, με τη σειρά τους καταθάνουν σε άλλους ιστούς όπως για παράδειγμα στον λιπώδη ιστό για αποθήκευση ή στον μυϊκό ιστό για άντληση ενέργειας. Φυσικά, η ικανότητα του ήπατος να διαχειρίζεται τα λίπη είναι σημαντική για την απορρόφηση λιποδιαλυτών βιταμινών. (Trefths, 2017) Επιπρόσθετα στις παραπάνω λειτουργίες, το ήπαρ ρυθμίζει την ομοιόσταση της χοληστερόλης στον οργανισμό. Η χοληστερόλη, απορροφάται από το έντερο ή συντίθεται de novo στο ήπαρ από το οξικό στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων και αποτελεί την πηγή όλης της ενδογενώς παραγόμενης στερόλης. Ανευρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες συντελώντας στην διατήρηση της ρευστότητάς τους και είναι πρόδρομη ουσία των χολικών οξέων και των στεροϊδών ορμονών. Παρόλο που η έλλειψη χοληστερόλης είναι επιβλαβής για την υγεία, το ίδιο ισχύει και για την περίσσεια της, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρά καρδιαγγειακά προβλήματα. (Israel, 1991) (Trefths, 2017)

Σημαντικό μέρος της αιμόλυσης λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, τον σπλήνα και τον μυελό των οστών. Η αίμη διασπάται σε χολοπρασίνη, η οποία στη συνέχεια ανάγεται σε μη συζευγμένη χολερυθρίνη. Το ήπαρ λαμβάνει μη συζευγμένη χολερυθρίνη συνδεδεμένη με λευκωματίνη από την κυκλοφορία. Η μη συζευγμένη χολερυθρίνη στη συνέχεια υφίσταται σύζευξη μέσω του συστήματος γλυκουρονυλοτρανσφεράση διφωσφορικής ουριδίνης (UGT), προκειμένου να γίνει υδρόφιλη. Η συζευγμένη χολερυθρίνη εκκρίνεται στη συνέχεια μέσω των χοληφόρων πόρων στη χολή, ή μικρές ποσότητες διαλύονται στο αίμα, όπου στη συνέχεια φιλτράρεται για απέκκριση από τα νεφρά. Η πλειονότητα της χολερυθρίνης εισέρχεται στη χολή και αποβάλλεται μέσω αυτής στα κόπρανα καθώς δεν απορροφάται από το εντερικό τοίχωμα. Κάποια ποσότητα χολερυθρίνης μετατρέπεται σε ουροχολινογόνο ή μη συζευγμένη χολερυθρίνη από βακτήρια του εντέρου για επαναρρόφηση και εισέρχεται στην εντεροηπατική κυκλοφορία. (Kalra, 2023) Ηπατοκυτταρική νόσος μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ίκτερο λόγω περίσσειας χολερυθρίνης στην αιματική κυκλοφορία, με τα συμπτώματα να περιλαμβάνουν επίσης σκούρο δέρμα και κνησμό όταν η χολερυθρίνη εισέλθει στους ιστούς. (Israel, 1991)

Ο μεταβολισμός των φαρμάκων και των τοξινών εξαρτάται σημαντικά από την ορθή λειτουργία του ήπατος και διενεργείται σε δύο φάσεις, με σκοπό την μετατροπή τους από λιπόφιλη σε υδρόφιλη μορφή. Οι αντιδράσεις αυτές διενεργούνται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων. Η Φάση 1, αποτελεί την κύρια μεταβολική οδών των φαρμάκων και των ουσιών όπως η αλκοόλη, μέσω οξειδωσης, αναγωγής και υδρόλυσης χρησιμοποιώντας κυρίως την οικογένεια ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (CYP450). Τα προϊόντα της Φάσης 1 έχουν μια επιπλέον ρίζα οξυγόνου που τα βοηθά να αντιδράσουν καλύτερα με τα ένζυμα των αντιδράσεων της Φάσης 2. Στην Φάση 2, τα εν λόγω προϊόντα γίνονται ακόμη πιο υδρόφιλα με σκοπό την έκκρισή τους στη χολή ή την κυκλοφορία. Υπάρχουν τρεις κύριοι τρόποι σύζευξης που εκτελούνται σε αντιδράσεις φάσης II: σύζευξη με γλυκουρονικό, γλουταθειόνη ή θειικό. Παρόλο που οι καταλύτες των αντιδράσεων της Φάσης 2 ανευρίσκονται και αλλού στο σώμα, παρουσιάζουν αυξημένες συγκεντρώσεις στο ήπαρ. Σε ασθενείς με ηπατική νόσο, ο χρόνος ημίσειας ζωής των φαρμάκων συχνά παρατείνεται σε συσχέτιση με την έκταση της ηπατοκυτταρικής βλάβης. (Israel, 1991) (Kalra, 2023)

1.4ALD

Η Αλκοολική Νόσος του Ήπατος (Alcoholic Liver Disease, ALD) αποτελεί κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως, περιλαμβάνοντας ένα ευρύ φάσμα ηπατικών διαταραχών από μια απλή στεάτωση σε στεατοηπατίτιδα, προχωρημένη ίνωση, κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Η παθογένεια της ALD έγκειται τόσο σε γενετικές, όσο και σε επιγενετικές αλλαγές, οξειδωτικό στρες, τοξικότητα κατευθυνόμενη από ακεταλδεΐδες, φλεγμονή προκαλούμενη από κυτοκίνες και χημειοκίνες, μεταβολικό επαναπρογραμματισμό, ανοσιακή βλάβη και δυσβίωση της μικροχλωρίδας του εντέρου.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η κατανάλωση αλκοόλ ευθύνεται για 3.3 εκατομμύρια θανάτους ετησίως. Επηρεάζονται πολλαπλά σπλαχνικά όργανα, τα οποία υπόκεινται σοβαρές βλάβες, με τους μεταβολίτες του αλκοόλ να διασπείρονται συστηματικά μέσω της κυκλοφορίας. Το ήπαρ, ως το κύριο σημείο καταβολισμού της αιθανόλης, δέχεται βαρύτερο φορτίο ιστικής αλλοίωσης ως απόρροια της υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ. (Chen, 2023)

1.3.1 Ο μεταβολισμός της αιθανόλης στο ήπαρ

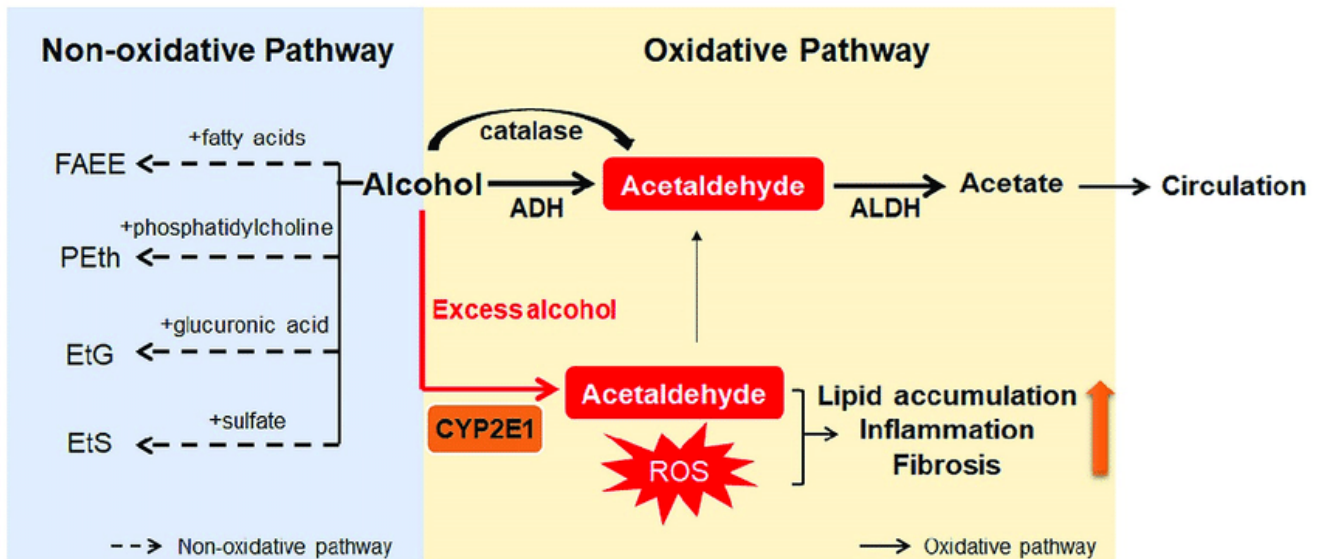
Ο μεταβολισμός του αλκοόλ στο ήπαρ, λαμβάνει χώρα στα κύρια παρεγχυματικά κύτταρα – τα ηπατοκύτταρα- τα οποία αποτελούν το 70% της ολικής μάζας του οργάνου. Είναι υπεύθυνα για την έκφραση των κύριων οξειδωτικών ενζύμων, της αλκοολικής δεϋδρογονάσης (ADH), η οποία εδράζεται στο κυτοσόλιο, και του κυτοχρώματος P450 2E1 (CYP2E1), που εντοπίζεται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα ηπατοκύτταρα εκφράζουν επιπρόσθετα αυξημένα επίπεδα καταλάσης, ενός ενζύμου των υπεροξειδιοσωμάτων. Η καταλάση φυσιολογικά διεκπεραιώνει την μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) σε νερό και οξυγόνο. Ωστόσο, παρουσία αιθανόλης η καταλάση έχει επικουρικό ρόλο στον μεταβολισμό της αξιοποιώντας το H₂O₂ για να οξειδώσει την αιθανόλη σε ακεταλδεΐδη. Πρόκειται για διαδικασίες της Φάσης 1.

Η ADH αποτελεί το πιο αποτελεσματικό ένζυμο στον μεταβολισμό της αιθανόλης. Φτάνει τον ημίσειο ρυθμό δράσης της όταν τα επίπεδα κυκλοφορούσας αλκοόλης είναι περίπου, 5 -10 mg/dL, ποσότητα πολύ μικρότερη από αυτή που προκαλεί μέθη. Το συγκεκριμένο μονοπάτι οξειδωσης

χρησιμοποιεί το νικοτιδάμινο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (NAD⁺) σαν συμπαράγοντα, παράγοντας την ανηγμένη του μορφή (NADH) και ακεταλδεΐδη. Η ακεταλδεΐδη είναι μια εξαιρετικά δραστική και τοξική ουσία. Δύναται να συνδέεται ομοιοπολικά με πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, σχηματίζοντας σχετικά παραπροϊόντα και εμποδίζοντας έτσι την βασική λειτουργία των παραπάνω μακρομορίων. Ένας τρόπος που τα ηπατοκύτταρα ελαχιστοποιούν την τοξικότητα των αλδευδών είναι μέσα στα μιτοχόνδρια, μετατρέποντάς τις ταχύτατα σε οξικό, με τη βοήθεια του ενζύμου αλδευδική δεϋδρογονάση 2 (ALDH2). Πρόκειται για άλλη μια αντίδραση οξειδοαναγωγής που παράγει NADH και οξικό, το τελευταίο εκ των οποίων διαχέεται στην κυκλοφορία ώστε να συμμετέχει σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια. Η αυξημένη παραγωγή NADH στις αντιδράσεις τόσο από την ADH όσο και από το ALDH2, μειώνει την φυσιολογική αναλογία NAD⁺/NADH ενδοηπατικά. Μια τέτοια αλλαγή, επηρεάζει το μεταβολικό μονοπάτι ευνοώντας την αναγωγική σύνθεση και επομένως τον σχηματισμό λιπαρών οξέων, τα οποία συμβάλλουν στην ανάπτυξη λιπώδους ήπατος.

Το CYP2E1 είναι το άλλο κύριο ηπατικό ένζυμο που καταλύει την οξείδωση της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη. Παρόλο που η δράση του CYP2E1 είναι αρκετά πιο αργή σε σχέση με το ADH, το CYP2E1 έχει την δυνατότητα πρόσδεσης δεκαπλάσιας ποσότητας αιθανόλης, φτάνοντας το σημείο ημικορεσμού στα 46-92 mg/dL. Επίσης σημαντικό είναι ότι το CYP2E1 είναι προσαρμοστικό ένζυμο, τούτέστιν το ηπατοκυτταρικό του περιεχόμενο αυξάνεται κατά τη χρόνια κατανάλωση αιθανόλης. Η αιθανόλη αλληλοεπιδρά άμεσα με το CYP2E1, αλλάζοντας την τριτοταγή δομή του ενζύμου έτσι ώστε να ανθίσταται στον κατακερματισμό από το σύστημα πρωτεασών ουμπικουιλίνης, έχοντας ως αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση CYP2E1.

Η αναγωγή του CYP2E1 έχει αρκετές σημαντικές επιδράσεις στα άτομα που καταχρώνται το αλκοόλ. Αρχικά, λόγω του γεγονότος ότι περισσότερο CYP2E1 οξειδώνει αιθανόλη, οι πότες αναπτύσσουν «μεταβολική ανοχή», δηλαδή χρειάζεται να καταναλώσουν περισσότερο αλκοόλ προκειμένου να φτάσουν τα επίπεδα μέθης που έφταναν στο παρελθόν πίνοντας πολύ λιγότερο. Έπειτα, ο αυξημένος μεταβολισμός αλκοόλης από αυξημένα επίπεδα CYP2E1 θέτει τα ηπατοκύτταρα σε μεταβολικό κίνδυνο καθότι, αφενός παράγονται μεγάλες ποσότητες ακεταλδεΐδης, αφετέρου η ανηγμένη μορφή του ενζύμου απελευθερώνει μεγαλύτερες ποσότητες ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), ριζών υδροξυλαιθέρα, ανιόντα υπεροξειδίου και ρίζες υδροξυλίου. Η συνεχής παραγωγή αυτών των ενεργών μορίων στους χρήστες δημιουργεί μια κατάσταση γνωστή και ως οξειδωτικό στρες. Υπό αυτές τις συνθήκες ο ρυθμός παραγωγής των ROS υπερβαίνει την ικανότητα του ήπατος να τα εξισορροπήσει με φυσικά αντιοξειδωτικά ή να τα απομακρύνει με τα αντίστοιχα ένζυμα. Το οξειδωτικό στρες εντείνεται όταν οι ROS αντιδρούν δευτερευόντως με πρωτεΐνες ή ακόρεστα λιπίδια. Μάλιστα, ο σχηματισμός λιπιδικών υπεροξειδίων και η αντίδρασή τους με άλλες πρωτεΐνες και ακεταλδεΐδες, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων ικανών να εγείρουν ανοσολογική απόκριση. Τέλος, ένεκα του μεγάλου εύρους υποστρώματος του CYP2E1, επιταχύνεται και η μετατροπή περίσσειας άλλων υποστρωμάτων εκτός της αιθανόλης όπως είναι η αναλγητική και αντιφλεγμονώδης ουσία ακεταμινοφαίνη, η οποία λαμβάνει μια πολύ τοξική ενεργή μορφή. Αυτό με τη σειρά του θέτει τον χρήστη σε άμεσο κίνδυνο ηπατικής νόσου ή οξείας ανεπάρκειας, ιδίως μετά από υπερβολική δόση ακεταμινοφαίνης. (Osna, 2017)



Εικόνα 4 Ο μεταβολισμός της αλκοόλης στο ήπαρ. Μη-Οξειδωτικό και Οξειδωτικό μονοπάτι. Ανατύπωση από (Hyun J, 2021)

1.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό του αλκοόλ

Ο μεταβολισμός του αλκοόλ είναι πράγματι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει την διάσπαση της αιθανόλης σε λιγότερο τοξικές ουσίες και περατώνεται κυρίως στο ήπαρ. Παρόλο που το κύριο μεταβολικό μονοπάτι είναι καλά κατανοητό, η αποτελεσματικότητα και η ταχύτητα των διαδικασιών διαφέρει αξιοσημείωτα μεταξύ των ανθρώπων. Αυτή η ποικιλομορφία επηρεάζεται από έναν αριθμό παραγόντων που εκτείνονται πέρα από την ποσότητα αιθανόλης που προσλαμβάνεται από τα άτομα. Πρόκειται για γενετικούς, φυσιολογικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίοι συνδυαστικά διαμορφώνουν την μεταβολική ικανότητα του καθενός ξεχωριστά.

Γενετικές τροποποιήσεις των ενζύμων ADH και ALDH2 επηρεάζουν την ικανότητα του οργανισμού να καταπολεμά τις ιστικές βλάβες που προκαλεί το αλκοόλ. Μάλιστα, συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν τα εν λόγω ένζυμα απαντώνται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα άτομα κάποιων φυλών, για παράδειγμα η ισομορφή του αλληλίου ADH1B*1 βρίσκεται συχνότερα σε άτομα της μαύρης ή της καυκάσια φυλής ενώ, το αλληλίο ADH1B*2 συναντάται συχνότερα σε Κινέζους, Ιάπωνες και 25% των ατόμων εβραϊκής καταγωγής. Ανάλογα λοιπόν με το αλληλίο που φέρουν, τα άτομα δύνανται να μεταβολίζουν το αλκοόλ με γρήγορους ή αργούς ρυθμούς. Σε κάποιους άλλους πληθυσμούς είναι συχνός ο πολυμορφισμός των γονιδίων που εκφράζουν την ALDH, με κάποιες παραλλαγές να παράγουν μια φαινομενικά ανενεργή μορφή του ενζύμου και άρα, τα άτομα αυτά να αναπτύσσουν μεγάλα επίπεδα τοξικότητας. (S., 2006) Η συγκέντρωση ακεταλδεΐδης ένεκα της έκφρασης των παραπάνω αλληλίων, έχει επίσης συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης στο ήπαρ. (Seitz, 2007)

Επιπρόσθετα, η περίσσεια ακεταλδεΐδης, αποδίδεται εκτός από γενετικούς και σε επιγενετικούς παράγοντες. Η αυξημένη κατανάλωση αιθανόλης, έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη διάφορων καρκινικών μηχανισμών επηρεάζοντας το DNA με μεθυλιώσεις, παρεμβαίνοντας στην αντιγραφή ή με θραύση και παραγωγή ανώμαλων προϊόντων, κάποια από τα οποία είναι και παραλλαγές των γονιδίων για τα οποία γίνεται λόγος παραπάνω. Ακολουθώντας λοιπόν μια σειρά

από αντιδράσεις, η παραλλαγή στα γονίδια αυξάνει το οξειδωτικό στρες και σε συνδυασμό με τα λοιπά τοξικά παραπροϊόντα (π.χ. ακεταλδεΐδη, ROS) δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος ανατροφοδότησης του οργανισμού με αυτά, δυσχεραίνοντας έτσι σε βάθος χρόνων την ικανότητα επεξεργασίας της αιθανόλης. (Seitz, 2007)

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την ικανότητα του οργανισμού να απομακρύνει το αλκοόλ, είναι η ηλικία. Έχει βρεθεί ότι το φαινόμενο πρώτης διόδου - First Pass Metabolism (FPM)- της αιθανόλης μειώνεται στα άτομα προχωρημένης ηλικίας, τα οποία μάλιστα εμφανίζουν αυξημένη συγκέντρωση αιθανόλης στον ορό του αίματος. (Oneta) Αυτό αποδίδεται στο ότι η το νερό και αναλογία στεγνής μάζας σώματος και μάζας των σκελετικών μυών μειώνονται ενώ, το ποσοστό σωματικού λίπους αυξάνεται. (Vatsalya, 2023)

Αξιοσημείωτο επίσης είναι ότι η ικανότητα μεταβολισμού του καταναλωθέντος από του στόματος αλκοόλ διαφέρει ανάμεσα στα δύο φύλα. Σε μελέτες που οι γυναίκες κατανάλωσαν αναλογικά συγκρίσιμες ποσότητες αλκοόλ με τους άνδρες, βρέθηκαν να μεταβολίζουν την αιθανόλη πολύ πιο αργά και μάλιστα να είναι πιο επιρρεπείς στην ανάπτυξη αλκοολικής νόσου του ήπατος. Τα παραπάνω αποδίδονται στην σημαντικά μικρότερη δραστηριότητα της αλκοολικής δεϋδρογονάσης στο στομάχι των γυναικών σε σχέση με τους άνδρες, αφού μάλιστα το εν λόγω ένζυμο ανευρίσκεται σε συγκριτικά μικρότερες συγκεντρώσεις. (Frezza, 1990) Επίσης, δεδομένου ότι η αιθανόλη είναι υδατοδιαλυτή και οι γυναίκες έχουν υψηλότερα ποσοστά σωματικού λίπους, εμφανίζουν σαφώς υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης στο αίμα. Ο μικρότερος όγκος του γυναικείου ήπατος αποτελεί επιπλέον σημαντικό παράγοντα διαφοροποίησης στον μεταβολισμό του αλκοόλ. (Vatsalya, 2023) Τέλος, η ισορροπία μεταξύ των ορμονών προγεστερόνης και οιστρογόνων έχει φανεί να επηρεάζει την τάση των γυναικών για κατανάλωση αιθανόλης, υπό διάφορες συνθήκες, ανάμεσα τις οποίες ανήκουν η ηλικία και το κάπνισμα. (Maddern, 2024)

1.3.3 Το εύρος της Αλκοολικής Νόσου του Ήπατος

Η υπερβολική κατανάλωση αιθανόλης έχει ως αποτέλεσμα μια σειράς από βλάβες στο ήπαρ, με τις πιο χαρακτηριστικές να είναι η στεάτωση, η ηπατίτιδα και η ίνωση/ κίρρωση. (Osna, 2017)

Το λιπώδες ήπαρ (στεάτωση) είναι η πρώιμη, πιο κοινή αντίδραση του οργανισμού που αναπτύσσεται στην συντριπτική πλειοψηφία των ανθρώπων που καταναλώνουν 4 με 5 ποτά ημερησίως σε βάθος χρόνων. Παρόλα αυτά, η στεάτωση αναπτύσσεται και σε άτομα που υπερκαταναλώνουν αλκοόλ, τουτέστιν 4 με 5 ποτά σε λιγότερο από δύο ώρες. Η λιπώδης διήθηση του ήπατος στο παρελθόν θεωρούταν μια καλοήθης συνέπεια της κατάχρησης αλκοόλ. Χαρακτηρίζεται από την εναπόθεση σταγονιδίων λίπους, αρχικά στα ηπατοκύτταρα που περιβάλλουν την ηπατική κεντρική φλέβα, προχωρώντας στα μεσολοβιακά ηπατοκύτταρα, φτάνοντας τελικά στα ηπατοκύτταρα που περιβάλλουν την πυλαία φλέβα. Σε περίπτωση που οι πότες διακόψουν την χρήση αλκοόλης, η στεάτωση είναι αναστρέψιμη και, μάλιστα, με καλή πρόγνωση. Ωστόσο, ασθενής με χρόνια λιπώδη διήθηση του ήπατος είναι πιο επιρρεπείς στην νόσο του ινώδους ήπατος, ένεκα του γεγονότος ότι η παρουσία λίπους αποτελεί μεγαλύτερο κίνδυνο οξειδωτικής βλάβης. (Osna, 2017) Στους μηχανισμούς που συμβάλλουν στην πρόκληση στεάτωσης, εμπλέκονται επίσης βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1 (HIF-1) και οι ρυθμιστές του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων. Επάγεται αναστολή του PPARα – μεταγραφικός παράγοντας σχετικός με τον πολλαπλασιασμό υπεροξειδιοδωμάτων- και θετική ρύθμιση της ADRP (πρωτεΐνη που

σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, επίσης γνωστή ως περιλιπίνη-2), μιας πρωτεΐνης που σταθεροποιεί τα σταγονίδια λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα. (Hosseini, 2019)

Η αλκοολική ηπατίτιδα είναι μια πιο οξεία, φλεγμονώδης κατάσταση ηπατικού τραύματος. Χαρακτηρίζεται από οίδηματώδη, φθίνοντα ηπατοκύτταρα, ουδετερόφιλη διήθηση και ανάπτυξη μπερδεμένων συσσωματωμάτων από αδιάλυτες πρωτεΐνες εντός των ηπατικών κυττάρων, που ονομάζονται σωματίδια Mallory-Denk. Καίριο ρόλο στην ανάπτυξη ηπατίτιδας είναι η ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer, τα οποία όντας φαγοκύτταρα εγείρουν ανοσιακή απάντηση. (Osna, 2017) Το επαγόμενο από αλκοόλ στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενεργοποιεί γονίδια που διεγείρουν τις ιντερφερόνες, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν αποπτωτικά μονοπάτια. Τα βλαμμένα ηπατοκύτταρα απελευθερώνουν σχετιζόμενα με βλάβη μοτίβα (DAMPs), τα οποία αναγνωρίζονται από το ήπαρ ως επικίνδυνα σήματα σε μια προ-φλεγμονώδη κατάσταση. (Hosseini, 2019)

Η ίνωση και το τελικό της στάδιο, η κίρρωση, αναφέρονται στην εναπόθεση αφύσικης ποσότητας εξωκυττάρων πρωτεϊνών μήτρας, κυρίως ενεργοποιημένων ηπατικών αστρικών κυττάρων. Οι ασθενείς παρουσιάζουν αρχικά περικυτταρική ίνωση, η οποία στη συνέχεια μπορεί να εξελιχθεί σε κίρρωση. Βέβαια, πάντα συνυπάρχει και ένας βαθμός ηπατίτιδας στους κίρρωτικούς ασθενείς, σε αντίθεση με την λιπώδη διήθηση που σπανίζει σε αυτά τα άτομα. (Osna, 2017) Μάλιστα, είναι η παρουσία των φλεγμονωδών κυττάρων στα ηπατικά κολποειδή που ενεργοποιεί τα αστρικά κύτταρα. Αυτά παράγουν κολλαγόνο ακατάπαυστα, και σε συνδυασμό με τη δράση μυοϊνοβλαστών οδηγούν στην δημιουργία ουλώδους ιστού. (Hosseini, 2019)

1.3.4 Συσχέτιση μεταξύ αλλαγών στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη επαγόμενες από αλκοόλ και αιμόλυση σε χρόνια αλκοολικούς

Ανάμεσα στις λιγότερο συζητημένες αλλά κλινικά σημαντικές συνέπειες της χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ είναι εκείνες στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Στους εν λόγω ασθενείς, οι επαγόμενες από αιθανόλη αλλαγές στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και τον μεμβρανικό σκελετό, δύνανται να προκαλέσουν αιμόλυση, δηλαδή πρώιμη καταστροφή των ερυθροκυττάρων. Αυτή η κατάσταση μπορεί να οδηγήσει σε αναιμία, ίκτερο, δρεπάνωση, δικτυοερυθροκυττάρωση και ανεπάρκεια του ενζύμου γλυκοζο-6- φωσφορική δεϋδρογονάση, δυσχεραίνοντας περεταίρω την υγεία των ατόμων που ήδη αντιμετωπίζουν πλείστες επιπλοκές από την κατάχρηση αιθανόλης. (Bulle S, 2017)

Σε μια μελέτη τους οι Bulle και συνεργάτες, πήραν δείγμα αίματος από n=30 άρρενες εθελοντές ηλικίας 35-45 ετών οι οποίοι κατανάλωναν σε καθημερινή βάση τουλάχιστον 70-80 γραμμάρια αλκοόλ επί 8-10 συναπτά έτη. Έλαβαν επίσης δείγματα από n=30 άρρενες εθελοντές ίδιας ηλικίας με φυσιολογική μεταβολική κατάσταση και όχι χρήστες αλκοόλ, προκειμένου να τους χρησιμοποιήσουν ως υγιή control.

Η ομάδα περάτωσε μια σειρά από δοκιμές που περιλάμβαναν: μέτρηση ενζύμων- δεικτών στο πλάσμα, επίπεδα νιτρικών, νιτρωδών και προϊόντα διάσπασης λιπών στα ερυθροκύτταρα, απομόνωση μεμβρανών, καθορισμός ολικής μεμβρανικής χοληστερόλης, φωσφολιπιδίων και το κλάσμα αυτών στα ερυθροκύτταρα, ανάλυση της μορφολογίας των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ηλεκτροφόρηση και χρώση αργύρου για την ανάλυση και διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Από τα παραπάνω εξήγαγαν ότι ο χρόνιος αλκοολισμός οδηγεί σε παρατεταμένη βλάβη των ερυθροκυττάρων από οξειδωτικές κυρίως διαδικασίες που επηρεάζουν την δομή της μεμβράνης και του σκελετού. Αναπόφευκτα, οι επιδράσεις του αλκοόλ στα ερυθροκύτταρα έγιναν ορατές με την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, όπου παρατηρήθηκαν στοματοκύτταρα και εχνοκύτταρα, πιθανόν

λόγω των αυξημένων λιπιδικών υπεροξειδίων, πρωτεϊνικών καρβονυλίων και τροποποιημένης λιπιδικής- πρωτεϊνικής σύνθεσης.

Ανάμεσα στα πειράματα που διεξήγαγαν, ήταν και η μέτρηση της ωσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η διαδικασία που ακολούθησαν περιλαμβάνει ανάμειξη διαλύματος ερυθροκυττάρων με χλωριούχο νάτριο, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση και φωτομέτρηση του υπερκείμενου σε μήκος κύματος 540 νανόμετρα έναντι τυφλού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ερυθροκύτταρα των αλκοολικών είναι λιγότερο ανθεκτικά και παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα αιμόλυσης σε σχέση με τα υγιή control. Η αυξημένη αιμόλυση ενδεχομένως να οφείλεται στην οξειδωση των μεμβρανικών λιπιδίων και πρωτεϊνών αλλά και στην αλλαγή των πρωτεϊνών του σκελετού μέσω της επίδρασης των ROS/RNS. Επίσης, παρατηρήθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της αιμόλυσης και των επιπέδων οξειδίων του αζώτου και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους αλκοολικούς. Το ίδιο συμπέρασμα ανέφεραν και άλλες επιστημονικές ομάδες. Μάλιστα, τα μειωμένα επίπεδα αγκυρίνης στα δείγματα των αλκοολικών, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποσταθεροποίηση και πρόσδεση του σκελετού στην μεμβράνη, γεγονός που οδήγησε εν τέλει στην λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. (Bulle S, 2017)

1.4 Η ωσμωτική αντίσταση των ερυθροκυττάρων

Η ωσμωτική ισορροπία στο πλάσμα του αίματος των θηλαστικών κυμαίνεται από 270 έως 310 mosmol, χάρη στα κύρια ενδοκυττάρια ωσμωτικά ενεργά ιόντα (κάλιο, νάτριο, χλώριο, όξινο ανθρακικό). Ο βαθμός αντίστασης των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην λύση ως αποτέλεσμα της μειωμένης συγκέντρωσης NaCl στο περιβάλλον τους αποτελεί την αρχή της δοκιμασίας της ωσμωτικής ευθραυστότητας. Η αιμοσφαιρίνη, ούσα η κύρια πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων, μπορεί να φωτομετρηθεί όταν ελευθερωθεί σε διάλυμα έπειτα από ωσμωτική ρήξη του κυττάρου σε υπότονο μέσο, με την βέλτιστη απορρόφηση να γίνεται σε μήκος κύματος $\lambda = 540 \text{ nm}$. Η ωσμωτική ευθραυστότητα ορίζεται από τις μετατοπίσεις της καμπύλης αιμόλυσης, η οποία προβάλλει την απορρόφηση του φωτός ενάντια στην συγκέντρωση NaCl, και συχνά καθορίζεται από το 50% των σημείων αιμόλυσης. (Walski, 2014)

Η ωσμωτική ευθραυστότητα, χρησιμοποιείται ευρέως για την αποσαφήνιση μηχανισμών της επίδρασης που έχουν διάφοροι παράγοντες στις ωσμωτικές ιδιότητες των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών, όπως η διατμητική τάση και η μηχανική αιμόλυση, η θερμοκρασία, η ακτινοβολία, τα φάρμακα και οι υπέρηχοι. Η ωσμωτική ευθραυστότητα χρησιμεύει επίσης στην διάγνωση ορισμένων αιματολογικών νοσημάτων που σχετίζονται με αιμόλυση. Η καμπύλη ωσμωτικής ευθραυστότητας αντανακλά όχι μόνο τις μέσες μεμβρανικές και κυτταροπλασματικές ιδιότητες, αλλά επιπλέον δίνει πληροφορίες για την κατανομή αυτών των ιδιοτήτων εντός του δείγματος. (Walski, 2014)

1.4.4 Θεωρητικό υπόβαθρο

Η αιμοσφαιρίνη απελευθερώνεται από αιμολυτικούς πόρους, οι οποίοι σχηματίζονται στις τεταμένες μεμβράνες διογκωμένων σφαιρικών κυττάρων σε ένα υποτονικό μέσο. Η κυτταρική λύση συμβαίνει αμέσως μετά την διόγκωσή του στο σφαιρικό σχήμα. Κατά την ωσμωτική αιμόλυση, το ερυθροκύτταρο γίνεται σφαιρικό, καταλαμβάνοντας μέγιστο όγκο από 1,5 έως 1,6 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με τον όγκο του αρχικού δισκοειδούς κυττάρου σε ιστονικό διάλυμα. Η διόγκωση είναι μια περιοριστική διαδικασία της κυτταρικής λύσης. Έτσι, η ωσμωτική ευθραυστότητα αντανακλά την

ικανότητα του κυττάρου να προσλαμβάνει νερό σε ένα υποτονικό μέσο. Όταν η εξωτερική ωσμωτική πίεση μειώνεται, ο όγκος των κυττάρων αυξάνεται. (Walski, 2014)

Επομένως, αναμένεται μια κατανομή των κρίσιμων όγκων σε σχέση με την κατανομή των κρίσιμων ωσμωτικών πιέσεων. Οι απόλυτες τιμές του ωσμωτικά μη υπεύθυνου νερού είναι περίπου 3,57 και 0,33 g νερού/γραμμάριο ξηρής μάζας στο διάλυμα αιμοσφαιρίνης και στα ερυθροκύτταρα, αντίστοιχα. Προτάθηκε ότι η έκταση του ωσμωτικά μη ανταποκρινόμενου νερού συσχετίζεται με το νερό που αλληλοεπιδρά με την πρωτεΐνη. Η αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-νερού είναι ένας παράγοντας κλειδί στον περιορισμό της διάχυσης του νερού μέσα στο κύτταρο. Μάλιστα, ένα 20% του ενδοκυττάρου νερού σχετίζεται άμεσα με τις ενδοκυττάρια πρωτεΐνες αναφορικά με το ωσμωτικό φαινόμενο στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα. Η καμπύλη αιμόλυσης έχει τη μορφή μιας καμπύλης Gauss, προκύπτει από την συνάρτηση της κατανομής της δύναμης των μεμβρανών των ερυθροκυττάρων και δείχνει τον βαθμό κυτταρικής λύσης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης άλατος. (Walski, 2014)

1.5 Η μηχανική αντίσταση των ερυθροκυττάρων

Η ευαισθησία των ερυθροκυττάρων στην μηχανικά επαγόμενη αιμόλυση αποτελεί σημαντικό δείκτη της υγείας του κυττάρου. Η μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης σε μια μονάδα ερυθρών αιμοσφαιρίων υπολογίζει τον βαθμό αιμόλυσης που έχει ήδη συμβεί, αλλά δεν δίνει ένα μέτρο στο πώς τα μεμβρανικά βλαμμένα ερυθροκύτταρα αντέχουν την διατμητική τάση. Μια ευαίσθητη μέθοδος καθορισμού της ακεραιότητας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, και επομένως, της ικανότητας ενός αβλαβούς κυττάρου να υπομένει την διατμητική τάση, είναι η δοκιμασία της μηχανικής ευθραυστότητας (Mechanical Fragility, MF). Υπολογίζεται μετρώντας την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος αφότου τα κύτταρα υποβληθούν σε συγκεκριμένη μηχανική πίεση για καθορισμένη χρονική διάρκεια. (Raval, 2010)

Η επεξεργασία με σφαιρίδια, χρησιμοποιώντας το μηχανικό στρες από ένα ή περισσότερα αντικείμενα ταλαντευόμενα σε ένα δοχείο, αποτελεί μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές διάσπασης βιολογικών δειγμάτων. Μια εφαρμογή βασισμένη στη διάσπαση με σφαιρίδια, είναι η μέτρηση της μηχανικής ευθραυστότητας στα RBCs. Οι σφαιρικές χάντρες δημιουργούν μηχανικές πιέσεις και προκαλούν την αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων μέσω ταλάντωσης. Σε υγρό μέσο, η ρήξη του κυττάρου προέρχεται κυρίως από την ταραχώδη ροή που δημιουργεί η κίνηση της χάντρας. Μάλιστα, έχει φανεί ότι με σφαιρικές χάντρες, το μέγεθος της προκύπτουσας αιμόλυσης μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από το κυτταρικό περιβάλλον, ιδίως από την παρουσία αλβουμίνης σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων (ακόμη και της φυσιολογικής), η οποία προστατεύει τα RBCs από μηχανικές βλάβες. (Alfano, 2016)

1.5.4 Θεωρητικό υπόβαθρο

Η μηχανική ρήξη και ο κατακερματισμός της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου είναι κυρίως αποτέλεσμα της της ακραίας ελαστικής παραμόρφωσης της μεμβράνης του. Η παραμορφωτική δύναμη ασκείται σε αυτήν ωστόσο να επιτευχθεί το σημείο διαρροής του μεμβρανικού υλικού. Από αυτό το σημείο και μετά, οιοσδήποτε περεταίρω πιέσεις έχουν ως αποτέλεσμα την μη αναστρέψιμη πλαστική παραμόρφωση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Η παραμόρφωση αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί από διάφορες μηχανικές ιδιότητες των υλικών, όπως είναι : 1) η διατμητική (εκτατική)

ελαστικότητα – τουτέστιν αναστρέψιμη παραμόρφωση- 2) το ιξώδες διάτμησης (επιφανείας)- περιγράφει τον ρυθμό της ελαστικής παραμόρφωσης- 3) η κρίσιμη διατμητική δύναμη – καθορίζει την τάση που προκαλεί πλαστική παραμόρφωση- και 4) ο συντελεστής πλαστικού ιξώδους- χαρακτηρίζει τον ρυθμό μεμβρανικής βλάβης. (Böhler, 1992)

1.6 Η οξειδωτική αιμόλυση με Φαινυλδραζίνη

Η οξειδωτική αιμόλυση είναι μια μορφή αιμόλυσης όπου τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) καταστρέφονται λόγω οξειδωτικού στρες, το οποίο υπερνικά τις αντιοξειδωτικές άμυνες των κυττάρων. Η φαινυλδραζίνη (PHZ) είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που χρησιμοποιείται συχνά σε πειραματικά μοντέλα για να προκαλέσει οξειδωτική αιμόλυση, μιμούμενη τις συνθήκες της αιμολυτικής αναιμίας. Όταν εισάγεται η PHZ, αλληλοεπιδρά με την αιμοσφαιρίνη στα RBCs, προκαλώντας την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και την οξείδωση της αιμοσφαιρίνης σε μεθαιμοσφαιρίνη, η οποία δεν μπορεί να μεταφέρει αποτελεσματικά το οξυγόνο. (Qin, 2022)

Η οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από την PHZ εκτείνεται πέρα από την αιμοσφαιρίνη. Επηρεάζει επίσης την ακεραιότητα της μεμβράνης των RBCs και τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, με αποτέλεσμα τη μείωση της ευκαμψίας των κυττάρων και την αύξηση της ευθραυστότητας. Αυτό κάνει τα RBCs πιο ευάλωτα στην καταστροφή καθώς περνούν από τη μικροκυκλοφορία, ιδιαίτερα στον σπλήνα, όπου τα κατεστραμμένα κύτταρα απομονώνονται και απομακρύνονται από την κυκλοφορία. Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την PHZ μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό σωμάτων Heinz—αδιάλυτων συσσωματωμάτων αιμοσφαιρίνης που προσκολλώνται στην εσωτερική μεμβράνη των RBCs—τα οποία σημάνουν περαιτέρω τα ερυθροκύτταρα για καταστροφή. (Liu, 2019) (Gordon-Smith, 1974)

Στην έρευνα, η οξειδωτική αιμόλυση που προκαλείται από την PHZ χρησιμεύει ως πολύτιμο μοντέλο για τη μελέτη των αιμολυτικών αναιμιών, παρέχοντας γνώσεις σχετικά με τον ρόλο του οξειδωτικού στρες στην παθολογία των RBCs και βοηθώντας στην ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών για συναφείς διαταραχές.

1.7 Σκοπός της εργασίας

Το αλκοόλ, απορροφάται κατά βάσει στο λεπτό έντερο και μεταβολίζεται κυρίως από το ήπαρ, οδηγώντας σε μη φυσιολογική λειτουργία του ηπατικού μεταβολισμού. Η σχετιζόμενη με το αλκοόλ ηπατική βλάβη αποτελεί ένα από τα πιο κοινά ηπατολογικά νοσήματα παγκοσμίως, περιλαμβάνοντας μια πληθώρα διαταραχών, ανάμεσα στις οποίες είναι και οι αλλαγές στην λειτουργία της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. (Mackowiak, 2024), (Bulle S, 2017)

Με έναυσμα τα παραπάνω, στην παρούσα εργασία εξετάζονται η ωσμωτική, η μηχανική και η οξειδωτική επιρρέπεια σε λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων από ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια. Τα ίδια πειραματικά μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν και στην έρευνα των (Tzounakas V. L., 2022) και (Tzounakas VL K. A.-P., 2016) και υπήρξαν αρκετά κατατοπιστικά ως προς το αντικείμενο μελέτης. Πρόκειται για ασθενείς των οποίων η κατάσταση δεν έχει εξελιχθεί σε κακοήθεια (προς αποφυγήν ψευδών συμπερασμάτων), ένεκα του μεγάλου οξειδωτικού φορτίου και του παθολογικού βιοχημικού προφίλ, που ως γνωστόν συνοδεύουν την παθοφυσιολογία του καρκίνου.

Πρόκειται για μια μικρή δοκιμαστική μελέτη, στην οποία αναλύθηκαν δείγματα από εννέα ασθενείς και έξι υγιή άτομα (controls) με σκοπό να βρούμε την επίδραση της χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και τον υπομεμβρανικό σκελετό των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία

Αναλύθηκαν δείγματα από $n=9$ ασθενείς εκ των οποίων η μία μόνο είναι γυναίκα, και από $n=6$ control εκ των οποίων οι δύο είναι γυναίκες. Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών και των υγείων ατόμων υπολογίστηκε στα 45 έτη. Όλοι οι συμμετέχοντες στο πείραμα δήλωσαν εγγράφως την συγκατάθεσή τους, όπως ορίζεται από την ισχύουσα νομοθεσία. Είναι σημαντικό να αναφερθεί επίσης, ότι η αιμοληψία έγινε από την ίδια ιατρό σε όλους τους συμμετέχοντες και περιλάμβανε συλλογή ολικού αίματος σε σωληνάριο με αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο και λήψη πήγματος σε σωληνάριο με gel και clot activator.

2.2 Προετοιμασία

Με την άφιξη των δειγμάτων στο εργαστήριο ακολουθεί η καταγραφή και η κωδικοποίησή τους στο αρχείο. Οι ασθενείς έχουν τον κωδικό PL (Patient Liver) και τα υγιή άτομα έχουν το κωδικό CL (Control Liver). Έπειτα γίνεται η κλασματοποίηση των δειγμάτων σε erpendorf ανάλογα με την ποσότητα που απαιτείται για την διεξαγωγή του εκάστοτε πειράματος. Όλα τα πειράματα είναι σημαντικό να διεξάγονται εντός 24 ωρών από τη λήψη του δείγματος, καθότι μετά το χρονικό αυτό πλαίσιο οι μετρήσεις είναι αναξιόπιστες.

2.3 Μέτρηση Ωσμωτικής Ευθραυστότητας

Αρχή μεθόδου

Η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl) βασίζεται στο φαινόμενο της ώσμωσης. Για το λόγο αυτό, παρασκευάζονται υπότονα διαλύματα NaCl με υπερκαθαρό νερό WFI (Water For Injection) σε συγκεντρώσεις από 0% έως 0,7% (συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται διαλύματα NaCl 0%, 0,3%, 0,35%, 0,4%, 0,45%, 0,5% και 0,55%). Η μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων σε κάθε διάλυμα NaCl δείχνει τον βαθμό λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση, τόσο περισσότερα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν αιμολυθεί. Την αρχή μεθόδου περιγράφουν οι (Tzounakas V. L., 2017).

Υλικά/ Σκεύη/ Αντιδραστήρια

- Λυοφιλοποιημένο NaCl
- Αναλυτικός ζυγός
- Μαγνήτες και συσκευή ανάδευσης
- Κωνική φιάλη του ενός 1 λίτρου (1 L)

- Ποτήρια ζέσεως
- Ογκομετρικές φιάλες
- Πιπέττες
- Φυγόκεντρος
- Φασματοφωτόμετρο
- Vortex
- Υπερκάθαρο νερό-WFI
- Στατώ
- Σωληνάρια κυτταρομετρίας
- Αλουμινόχαρτο

Πρωτόκολλο ωσμωτικής αντίστασης RBCs

1. Προσθήκη 2,0 mL (= 2.000 μ L) του εκάστοτε διαλύματος NaCl (π.χ. 0% NaCl, 0,3% NaCl, κλπ.) στο αντίστοιχο σωληνάριο που έχουμε σημειώσει
2. Προσθήκη 20 μ L ολικού αίματος σε κάθε σωληνάριο κυτταρομετρίας
3. Ανάδευση σε vortex για ένα δευτερόλεπτο (sec) max
4. Γίνεται επώαση 15' λεπτών (mins) σε Room Temperature (θερμοκρασία δωματίου)
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1.500 στροφές για 5' λεπτά (mins)
6. Πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 540 nm έναντι τυφλού. Το τυφλό διάλυμα αποτελείται από 2020 μ L WFI.
7. Υπολογισμός της Μέσης Σωματιδιακής Ευθραυστότητας (MCF, Mean Corpuscular Fragility)

2.4 Μέτρηση Μηχανικής Ευθραυστότητας

Αρχή μεθόδου

Τα ερυθροκύτταρα υποβάλλονται σε μηχανική καταπόνηση με τη χρήση μεταλλικών σφαιριδίων και έπειτα γίνεται μέτρηση της αιμοσφαιρίνης με τη μέθοδο Harboe όπως περιγράφουν οι (Tzounakas V. L., 2017). Παράλληλα τρέχουμε δείγματα που δεν υφίστανται ανάδευση με σφαιρίδια, τα οποία χρησιμοποιούμε για control. . Για τον υπολογισμό του ποσοστού των ερυθρών αιμοσφαιρίων που λύονται, υπολογίζεται και η συνολική ενδοκυττάρια αιμοσφαιρίνη των δειγμάτων.

Υλικά/ Σκεύη/ Αντιδραστήρια

- Eppendorf
- Ψυχόμενη και απλή φυγόκεντρο
- Μηχανικός αναδευτήρας (ρόδα)
- Πιπέττες
- Vortex
- Στατώ
- Δ/μα PBS 1x 310 mOsm
- Φασματοφωτόμετρο

- Μεταλλικά Σφαιρίδια

Πρωτόκολλο μηχανικής ευθραυστότητας RBCs

1. Φυγοκέντρηση ολικού αίματος στα 1000g για 10 λεπτά.
2. Αφαίρεση του υπερκείμενου και αποθήκευση για χρήση αργότερα. Τα πακεταρισμένα ερυθρά έχουν αιματοκρίτη 80%
3. Αραίωση 1/4 των πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων ώστε να αποκτήσουν αιματοκρίτη 20% με PBS 1x 310 mOsm (δ/μα 1). Σε αυτό ο δ/μα θέλουμε να μετρήσουμε την ενδοκυττάρια αιμοσφαιρίνη.
4. Στο δ/μα 1 γίνεται αραίωση 1:10 dH₂O σε νέο erpendorf (δ/μα 2), όπου προσθέτω 10μL δ/τος 1 και 90μL dH₂O.
5. Ήπια ανάδευση σε vortex του δ/τος 2 και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση στα 1000g για 5 λεπτά σεRT .
7. Αραίωση δ/τος 2 1:2500 με dH₂O σε νέο erpendorf (δ/μα 3), όπου προσθέτω 5μL δ/τος 2 και 1245μL dH₂O.
8. Ήπια ανάδευση σε vortex του δ/τος 3 και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
9. Φωτομέτρηση στα 380, 415 και 450nm. Και υπολογισμός της ενδοκυττάριας αιμοσφαιρίνης με τη μέθοδο Harboe.

(Συνεχίζουμε με το δ/μα 1).

10. Σε Erpendorf σημασμένο ως R (Rocked) προσθέτουμε 2 μεταλλικά σφαιρίδια και 550 λ δ/ματος 1 .
11. Τοποθετώ το δείγμα στον μηχανικό ανακινητήρα και το αφήνω να επωαστεί 1 ώρα.
12. Σε Erpendorf σημασμένο ως NR (Non-Rocked) προσθέτουμε 450 λ δ/ματος 1
13. Επώαση των NR στον πάγκο για 1 ώρα (παράλληλα με τα R)
14. Με το πέρας της μίας ώρας αφαιρούμε 450μL από τα R και τα τοποθετούμε σε νέο Erpendorf.
15. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 2750xg για 15 λεπτά, στους 4oC.
16. Λήψη 200μL από το υπερκείμενο και τοποθέτηση τους σε νέα Erpendorfs.
17. Φυγοκέντρηση στα 20800xg για 20 λεπτά, στους 4oC.
18. Λήψη 100μL από το υπερκείμενο και αραίωση τους με 900μL dH₂O.
19. Επώαση των δειγμάτων 5 λεπτά στον πάγκο και φωτομέτρηση τους στα 380, 415 και 450nm. Μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης με τη μέθοδο Harboe.
20. Υπολογισμός του δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας (MFI, mechanical fragility index) με τη χρήση του τύπου $MFI(\%) = [(PF\ Hb\ rocked - PF\ Hb\ control) / (Hb\ aliquot - PF\ Hb\ control)] \times 100$, όπου PF Hbrocked είναι η μέση τιμή ελεύθερης Hb στο υπερκείμενο των δειγμάτων που ήταν σε συνεχή ανάδευση με τα μεταλλικά σφαιρίδια (rocked-R), PF Hbcontrol η μέση τιμή ελεύθερης Hb στο υπερκείμενο των δειγμάτων που δεν ήταν σε συνεχή ανάδευση (non-rocked-NR), Hbaliquot η μέση τιμή ενδοκυττάριας Hb των ερυθρών αιμοσφαιρίων με αιματοκρίτη 20%

2.5 Μέτρηση της Οξειδωτικής Αιμόλυσης

Αρχή μεθόδου

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια επώάζονται με φαινυλδραζίνη (PHZ), μια ισχυρά οξειδωτική ουσία η οποία προκαλεί την *in vitro* λύση των κυττάρων, μιμούμενη τον μηχανισμό λύσης της αιμολυτικής αναιμίας.

Υλικά/ Σκεύη/ Αντιδραστήρια

- Φυγόκεντρος
- Eppendorf
- Πιπέττες
- Vortex
- Επωαστικός κλίβανος
- PHZ 17mM
- Φασματοφωτόμετρο

Πρωτόκολλο Οξειδωτικής Λύσης RBCs

1. Φυγοκέντρηση δείγματος στα 1000g για 10 λεπτά. Θέλουμε με το πέρας της διαδικασίας να έχουμε 50μL πακεταρισμένα ερυθροκύτταρα (Hct = 80%).
2. Αραίωση δείγματος 1/10 (450μL PBS 1x 310 mOsm στα 50μL συμπυκνωμένα ερυθρά)
3. Προσθήκη 23,24μL PHZ 17mM
4. Ανάδευση με το χέρι
5. Επώαση σε ξηρό κλίβανο στους 37ο C για 1 ώρα
6. Φυγοκέντρηση στα 1000xg για 10 λεπτά
7. Αραίωση των 100μL υπερκείμενου σε 900μL dH₂O (1:10)
8. Vortex
9. Επώαση στο πάγκο για 5 λεπτά
10. Φωτομέτρηση υπερκείμενου στα 380, 415 και 450nm
11. Μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο κατά Harboe.

Η PHZ είναι σε μορφή σκόνης και γίνεται ανασύσταση προσθέτοντας 20πλάσιο όγκο dH₂O. Αποθηκεύεται στους -20 οC.

2.6 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο Mann-Whitney U test. Πρόκειται ένα μη-παραμετρικό τεστ που χρησιμοποιείται προκειμένου να καθορίσει αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των κατανομών δύο ανεξάρτητων πληθυσμών (unpaired). Η εν λόγω ανάλυση προτιμάται συνήθως όταν τα δεδομένα δεν ακολουθούν κανονική κατανομή ή όταν το δείγμα είναι μικρό, όπως συμβαίνει στη δική μας περίπτωση. Στατιστικά σημαντική τιμή θεωρείται $p\text{-value} < 0.05$. Τα γραφήματα και η ανάλυσή τους έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού GraphPad Prism 8.0.3

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Γενική ανάλυση αίματος

Διεξήχθη γενική αίματος σε όλα τα δείγματα. Στον Πίνακα 1 παρατίθεται το αιματολογικό προφίλ των ασθενών και των μαρτύρων. Για ευκολία σύγκρισης, η τρίτη στήλη περιέχει το φυσιολογικό εύρος των τιμών. Οι τιμές αυτές προέρχονται από το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση.

Παρατηρείται ότι οι παράμετροι των ερυθροκυττάρων RBCs, HGB, HCT και οι PLT, PCT των αιμοπεταλίων παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των δύο πληθυσμών δειγμάτων και μάλιστα, οι ασθενείς αποκλίνουν αρκετά από το κατώτερο φυσιολογικό όριο. Γίνεται εμφανές επομένως με μια πρώτη ματιά, πως η αλκοολική ηπατοπάθεια έχει άμεσο αντίκτυπο στα κύτταρα του αίματος.

Τα χαμηλά επίπεδα των αιμοπεταλίων μπορούν να αποδοθούν στην ηπατική βλάβη, αφού ανάμεσα και σε άλλους παράγοντες, η θρομβοποιητίνη – η ορμόνη υπεύθυνη για την ρύθμιση της παραγωγής των PLTs- παράγεται στο ήπαρ.

	Ασθενείς	Μάρτυρες	Φυσιολογικές τιμές
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	7,08 \pm 2,32	6,16 \pm 1,54	5,2-12,4
LYM ($10^3/\mu\text{L}$)	1,17 \pm 0,49	2,12 \pm 0,72	1,3-4,0
MID($10^3/\mu\text{L}$)	0,35 \pm 0,27	0,31 \pm 0,15	0,3-1,0
GRA($10^3/\mu\text{L}$)	5,49 \pm 2,18	3,74 \pm 1,11	2,4-7,6
LYM%	17,89 \pm 9,13	34,40 \pm 8,43	19,0-48,0
MID%	4,96 \pm 3,31	5,05 \pm 2,22	4,5-12,1
GRA%	75,59 \pm 10,28	60,55 \pm 10,27	40,0-74,00
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	2,88 \pm 0,97	4,59 \pm 1,00	4,2 – 6,1
HGB (g/dl)	9,73 \pm 2,86	13,25 \pm 1,87	12,0-18,0
HCT %	27,54 \pm 8,81	37,31 \pm 5,30	37,0 – 52,0
MCV fl	86,83 \pm 27,94	82,67 \pm 11,02	80,0 – 99,0
MCH pg	34,23 \pm 2,21	28,43 \pm 4,27	27,0 – 31,0
MCHC (g/dl)	35,68 \pm 1,62	34,28 \pm 1,70	33,0 – 37,0
RDWc %	19,36 \pm 3,19	17,73 \pm 1,97	11,5 – 14,5
PLT($10^3/\mu\text{L}$)	74,56 \pm 39,41	161,00 \pm 77,07	130 - 400
PCT %	0,10 \pm 0,12	0,13 \pm 0,06	0,16 – 0,36
MPV fl	8,61 \pm 1,70	7,78 \pm 0,35	7,2 – 11,1
PDWc%	37,19 \pm 3,86	38,33 \pm 1,91	37,8 – 43,6

Πίνακας 1. Συγκεντρωτική Γενική Ανάλυση Αίματος

3.2 Μέτρηση Ωσμωτικής Ευθραυστότητας

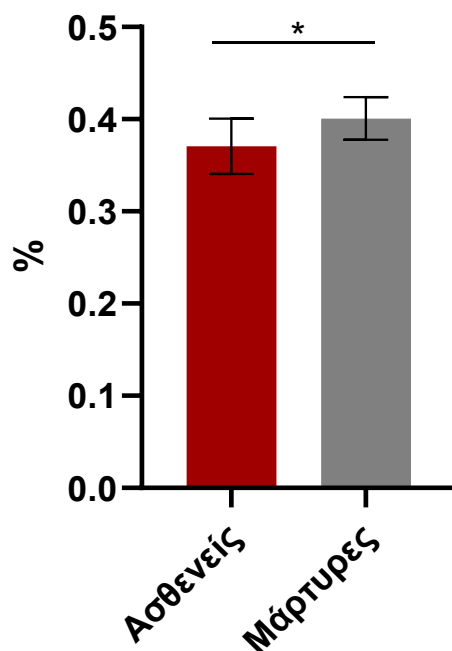
Υπολογίστηκε η αντίσταση του ερυθροκυττάρου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ωσμωτικών διαλυμάτων σύμφωνα με τον μαθηματικό τύπο: OD εξεταστέου / OD με 100% αιμόλυση x 100.

Ο δείκτης MCF αντιστοιχεί στη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου όπου η αιμόλυση είναι στο 50%. Στο παρόν πείραμα (Γράφημα 1) η μέση τιμή MCF για το δείγμα των ασθενών είναι 0,3706% με τυπική απόκλιση 0,02994% και οι μάρτυρες αναφέρουν τιμή MCF = 0,4008% ± 0,02311% (Πίνακας 1). Το p-value= 0.0320 επομένως εξάγεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο γκρουπ. Στο γράφημα, ο αστερίσκος υποδηλώνει την τιμή του $p < 0.05$.

	Ασθενείς	Μάρτυρες
Mean MCF (%)	0,3706	0,4008
Std.Deviation	0,02994	0,02311

Πίνακας 1. Μελέτη Ωσμωτικής Ευθραυστότητας. Αποτύπωση της μέσης τιμής του δείκτη MCF και της τυπικής απόκλισης στον πληθυσμό των ασθενών και των υγιών control.

Ωσμωτική ευθραυστότητα



Γράφημα 1 Μελέτη Ωσμωτικής Ευθραυστότητας

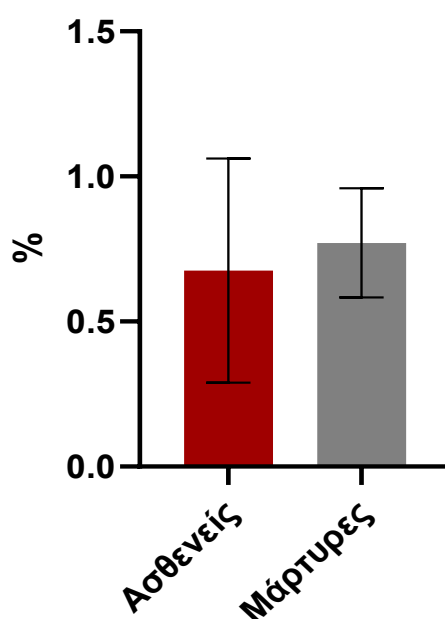
3.3 Μέτρηση Μηχανικής Ευθραυστότητας

Υπολογίστηκε ο δείκτης MFI για κάθε δείγμα σύμφωνα με την εξίσωση: $MFI(\%) = [(PF\ Hb\ rocked - PF\ Hb\ control) / (Hb\ aliquot - PF\ Hb\ control)] \times 100$. Η στατιστική ανάλυση έδειξε για τους ασθενείς μέση τιμή μηχανικής ευθραυστότητας $0,6756\% \pm 0,3858\%$. Για τους μάρτυρες, ο δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας κυμαίνεται στο $0,7710\% \pm 0,1879\%$ (Πίνακας 2). Εν προκειμένω, οι δυο πληθυσμοί δεν εμφανίζουν στατιστικά υπολογίσιμη διαφορά, όπως υποδηλώνει η απουσία αστερίσκων στο *Γράφημα 2*, δηλαδή $p\text{-value} > 0.05$.

	Ασθενείς	Μάρτυρες
Mean MFI (%)	0,6756	0,7710
Std.Deviation	0,3858	0,1879

Πίνακας 2 Μελέτη Μηχανικής Ευθραυστότητας. Αποτύπωση της μέσης τιμής του δείκτη MFI και της τυπικής απόκλισης στον πληθυσμό των ασθενών και των υγιών control.

Μηχανική ευθραυστότητα



Γράφημα 2 Μελέτη Μηχανικής Ευθραυστότητας

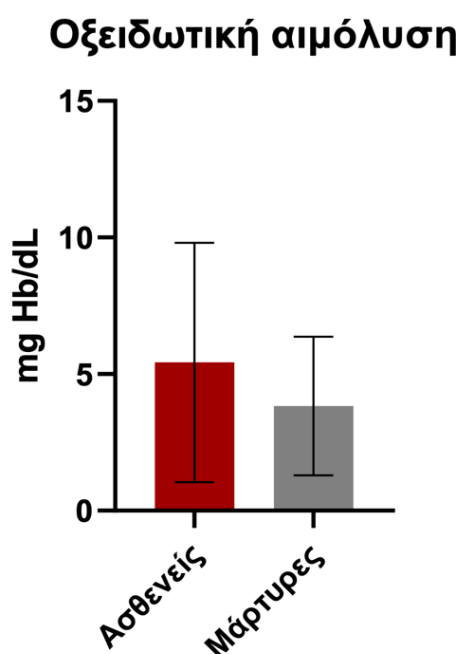
3.4 Μέτρηση Οξειδωτικής Αιμόλυσης

Για την μέτρηση της αιμοσφαιρίνης σε κάθε δείγμα, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση: $Hb(mg/100ml) = [(167.2 \times A_{415}) - (83.6 \times A_{380}) - (83.6 \times A_{450})] \times 1/1000 \times \text{dilution (in dH}_2\text{O)} \times 100$ (Allen correction).

Υπολογίστηκε έπειτα η οξειδωτική αιμόλυση για τους δύο πληθυσμούς. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3, οι ασθενείς εμφανίζουν $5,428 \pm 4,379$ mg αιμοσφαιρίνης ανά δεκατόλιτρο και οι ασθενείς $3,832 \pm 2,539$ mg HB/dL. Οι δύο πληθυσμοί δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά, αναπαράσταση στο Γράφημα 3, αφού $p\text{-value} > 0.05$.

	Ασθενείς	Μάρτυρες
Mean mg Hb/dL	5,428	3,832
Std.Deviation	4,379	2,539

Πίνακας 3 Μελέτη Οξειδωτικής Αιμόλυσης. Αποτύπωση της μέσης τιμής mg HB/dL και της τυπικής απόκλισης στον πληθυσμό των ασθενών και των υγιών control.



Γράφημα 3 Μελέτη Οξειδωτικής Αιμόλυσης.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ως γνωστόν το αλκοόλ και τα ερυθροκύτταρα αποτελούν έκαστα αντικείμενα εκτενούς μελέτης, οι έρευνες που συνδυάζουν αμφότερα τα αντικείμενα δεν έχουν καταλήξει σε ένα βέβαιο αποτέλεσμα αφήνοντας πάντα αρκετά ερωτηματικά και υποθέσεις. Αξίζει μάλιστα να αναφερθεί ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων αλκοολικής βλάβης του ήπατος συνυπάρχει ένας αξιόλογος βαθμός αιμόλυσης. Το αυτό επιβεβαιώνουν πλείστες επιστημονικές ομάδες στα τέλη του προηγούμενου αιώνα (Tyulina). Μάλιστα, στην βιβλιογραφία βρέθηκε μόνο μία πρόσφατη σχετική καταχώρηση από τους Bulle et al., η οποία αναλύθηκε παραπάνω στην παράγραφο 1.3.4. Με έναυσμα τα παραπάνω λοιπόν, διεξήχθη η παρούσα εργασία με σκοπό την διερεύνηση της επίδρασης του αλκοόλ στην μεμβράνη του ερυθροκυττάρου.

Από τα πειράματα που περατώθηκαν είναι η μέτρηση της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθροκυττάρων των χρόνια αλκοολικών ασθενών. Με αυτό το τεστ θεωρητικά ελέγχεται η ακεραιότητα της μεμβράνης των κυττάρων. Επομένως αυξημένες τιμές του δείκτη MCF, υποδηλώνουν αυτόματα την εμπλοκή της μεμβράνης στην αιμόλυση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στον δείκτη αιμόλυσης των αλκοολικών ασθενών σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, παρόλο που ο αριθμός των δειγμάτων ήταν μικρός. Τα ίδια αποτελέσματα σημειώνουν επίσης οι Bulle et al. Αναφορικά με την ωσμωτική αιμόλυση, οι (Tzounakas VL A. A., 2021) τονίζουν την καλή επαναληψιμότητα του πειράματος σε διαφορετικά δείγματα ίδιων ατόμων, δηλώνοντας έτσι μια γενετική συσχέτιση όσον αφορά την αντίδραση των ερυθροκυττάρων στο ωσμωτικό στρες.

Τα ερυθροκύτταρα των αλκοολικών ασθενών παρουσιάζουν μικροσκοπικά αλλαγμένη μορφολογία (Bulle S, 2017). Εύλογα λοιπόν προκύπτει η υπόθεση ότι εκτός από την διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων, επηρεάζεται και ο υπομεμβρανικός σκελετός των ερυθρών αιμοσφαιρίων, με έμφαση να δίνεται στις βασικές πρωτεΐνες σπεκτρίνη- ακτίνη- 4.1R, ούσες ρυθμιστές της μηχανικής σταθερότητας (Mohandas N. &, 2008). Στην μελέτη των (Anastasiadi AT, 2022) φαίνεται μια έντονα θετική συσχέτιση στον βαθμό αιμόλυσης στα πειράματα ωσμωτικής και μηχανικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων σε δείγματα βThal+ ατόμων πριν και μετά την αποθήκευση. Επομένως, αφού η ωσμωτική αντίσταση παρουσιάζεται μειωμένη παραπάνω, ίσως να αναμέναμε κάτι αντίστοιχο και στην μηχανική δοκιμασία, για να δούμε αν πράγματι επηρεάζεται ταυτόχρονα ο κυτταροσκελετός με την μεμβράνη στα δείγματα των αλκοολικών ασθενών μας. Ταυτόχρονα αναφέρεται όμως ότι η ωσμωτική και η μηχανική ευθραυστότητα δεν συνδέονται άμεσα, αλλά επηρεάζουν η μια την άλλη (Anastasiadi, 2023). Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα των περαμάτων αντιτίθενται των παραπάνω προσδοκιών, αφού δεν καταγράφεται αξιόλογη στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών δειγμάτων. Μάλιστα, η τυπικές αποκλίσεις σε αμφότερα τα γκρουπ είναι αρκετά υψηλές, καθιστώντας αδύνατη την εξαγωγή κάποιου βέβαιου αποτελέσματος.

Οι προαναφερθείσες επιστημονικές ομάδες (Bulle S, 2017) (Tyulina) υπέδειξαν επίσης μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης αλκοόλ και της πρόκλησης οξειδωτικής αιμόλυσης. Συγκεκριμένα, τα ευρήματα τους αναφέρουν έναν υψηλό βαθμό συσχέτισης μεταξύ των οξειδωτικών και νιτρωδών ριζών που παράγονται κατά τον μεταβολισμό της αιθανόλης, και της αιμόλυσης, καθώς και την επίδραση αυτών των παραγόντων στη διαταραχή της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και του κυτταροσκελετού. Ωστόσο, τα δεδομένα της παρούσας ανάλυσης δεν επιβεβαιώνουν αυτή τη συσχέτιση. Αντιθέτως, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι δεν υπάρχει καμία σημαντική διαφορά ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς δειγμάτων όσον αφορά την επίδραση του αλκοόλ στην αιμόλυση.

Βέβαια, αναφέρεται ότι η οξειδωτική αιμόλυση δεν εμφανίζει άμεση συσχέτιση με τις δοκιμασίες της ωσμωτικής και μηχανικής καταπίεσης των ερυθροκυττάρων, δημιουργώντας έτσι την υπόθεση ότι οι οξειδωτικοί παράγοντες πιθανώς επηρεάζουν άλλες ερυθροκυτταρικές παραμέτρους, που δεν αφορούν σωματοδομικά φαινόμενα (Anastasiadi, 2023).

Με βάση τα παραπάνω, εξάγεται με σιγουριά το συμπέρασμα ότι, πράγματι, το αλκοόλ επιδρά στις πρωτεΐνες συγκρότησης της φωσφορικής διπλοστιβάδας. Για την μηχανική και οξειδωτική αντίσταση των ερυθρών αιμοσφαιρίων χρειάζεται να γίνουν περαιτέρω αναλύσεις για να επιβεβαιώσουμε τις υποθέσεις μας. Η αδυναμία εξαγωγής συμπεράσματος εν προκειμένω, πιθανώς να οφείλεται στον μικρό αριθμό των δειγμάτων ή σε άλλους παράγοντες που ενδεχομένως να μην λήφθηκαν υπόψη κατά τη διεξαγωγή των αναλύσεων. Όπως και να έχει είναι σημαντικό να συνεχιστούν τα πειράματα με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και η περάτωση επιπρόσθετων αναλύσεων των πρωτεϊνών π.χ. με SDS-PAGE και ανοσοφθορισμός. Η κατανόηση του μηχανισμού λύσης των ερυθροκυττάρων υπό μηχανικό και οξειδωτικό στρες θα συμβάλλει στην γρηγορότερη και ασφαλέστερη διάγνωση και θεραπεία, ακόμη και στην πρόληψη των επιπλοκών.

Βιβλιογραφία

- Alfano, K. M. (2016). Differences in bead-milling-induced hemolysis of red blood cells due to shape and size of oscillating bead. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 27(4), 405-412. doi:<https://doi.org/10.3233/BME-161594>
- Anastasiadi AT, A. V. (2022). Corpuscular Fragility and Metabolic Aspects of Freshly Drawn Beta-Thalassemia Minor RBCs Impact Their Physiology and Performance Post Transfusion: A Triangular Correlation Analysis In Vitro and In Vivo. *Biomedicines*, 10(3), 530. doi:<https://doi.org/10.3390/biomedicines10030530>
- Anastasiadi, A. T. (2023). The time-course linkage between hemolysis, redox, and metabolic parameters during red blood cell storage with or without uric acid and ascorbic acid supplementation. *Frontiers in aging*(4). doi:<https://doi.org/10.3389/fragi.2023.1161565>
- Böhler, T. L. (1992). Mechanical Fragility of Erythrocyte Membrane in Neonates and Adults. *Pediatric research*, 32(1), 92-96. doi:<https://doi.org/10.1203/00006450-199207000-00018>
- Bulle S, R. V. (2017). Association between alcohol-induced erythrocyte membrane alterations and hemolysis in chronic alcoholics. *ournal of clinical biochemistry and nutrition*, 60(1), 63-69. doi:<https://doi.org/10.3164/jcfn.16-16>
- Chen, M. Z. (2023). Alcohol and the mechanisms of liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 38(8), 1233–1240. doi:<https://doi.org/10.1111/jgh.16282>
- Franco, T. &. (2010). Erythrocyte adducin: a structural regulator of the red blood cell membrane. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*, 17(3), 87–94. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2010.05.008>
- Frezza, M. d. (1990). High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. *The New England journal of medicine*, 322(2), 95-99. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1056/NEJM199001113220205>
- Gordon-Smith, E. C. (1974). Oxidative haemolysis and Heinz body haemolytic anaemia. *British journal of haematology*, 26(4), 513–517. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1974.tb00494.x>
- Hosseini, N. S. (2019). Alcoholic Hepatitis: A Review. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 54(4), 408-416. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1093/alcalc/agg036>
- Huang, Y. C. (2019). High-Intensity Interval Training Improves Erythrocyte Osmotic Deformability. *edicine and science in sports and exercise*, 51(7), 1404–1412. doi:10.1249/MSS.0000000000001923
- Hyun J, H. J. (2021). Pathophysiological Aspects of Alcohol Metabolism in the Liver. *International Journal of Molecular Sciences.*, 22(11). Ανάκτηση από ResearchGate: <https://doi.org/10.3390/ijms22115717>
- Israel, J. &. (1991). Liver structure, function, and anatomy: effects of hepatitis B virus. *Current topics in microbiology and immunology*, 168, 1-20. Ανάκτηση από https://doi.org/10.1007/978-3-642-76015-0_1
- Kalra, A. Y. (2023). Physiology, Liver. *StatPearls Publishing*. Ανάκτηση από <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>
- Kriebardis, A. G.-P. (2007). Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 11(1), 148–155. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00008.x>
- Li, N. C. (2023). Structural basis of membrane skeleton organization in red blood cells. *Cell*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.017>
- Liu, F. D. (2019). Versatile cell ablation tools and their applications to study loss of cell functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 76(23), 4725–4743. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03243-w>
- Lux S. E., 4. (2016). Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-512772>
- Mackowiak, B. F. (2024). Alcohol-associated liver disease. *The Journal of clinical investigation*, 134(3). doi:<https://doi.org/10.1172/JCI176345>

- Maddern, X. J. (2024). Sex Differences in Alcohol Use: Is It All About Hormones?. *Endocrinology*, 165(9). Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1210/endo/bqae088>
- Mohandas, N. &. (1994). Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 23, 787-818. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.bb.23.060194.004035>
- Mohandas, N. &. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939–3948. doi:<https://doi.org/10.1182%2Fblood-2008-07-161166>
- Montel-Hagen, A. K. (2008). Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C. *Cell*, 132(6), 1039–1048. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.042>
- Oneta, C. M. (χ.χ.). Age and bioavailability of alcohol. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*, 39(9), 783-788. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1055/s-2001-17196>
- Osna, N. A. (2017). Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Current Management. *Alcohol research : current reviews*, 38(2), 147-161. Ανάκτηση από <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28988570/>
- Qin, Z. Y. (2022). The Oxidative Injury of Extracellular Hemoglobin Is Associated With Reactive Oxygen Species Generation of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Frontiers in immunology*, 13. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.843662>
- Raval, J. S. (2010). The use of the mechanical fragility test in evaluating sublethal RBC injury during storage. *Vox sanguinis*, 99(4), 325-331. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2010.01365.x>
- S., Z. (2006). Overview: how is alcohol metabolized by the body?. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 29(4), 245-254. Ανάκτηση από <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17718403/>
- Salzer, U. &. (2001). Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood*, 97(4), 1141–1143. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1182/blood.v97.4.1141>
- Seitz, H. K. (2007). Alcohol metabolism and cancer risk. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 30(1), 38-47. Ανάκτηση από <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17718399/>
- Trefts, E. G. (2017). The liver. *Current biology*, 27(21), R1147–R1151. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- Tzounakas VL, A. A. (2021). Osmotic hemolysis is a donor-specific feature of red blood cells under various storage conditions and genetic backgrounds. *Transfusion*, 61(9), 2538-2544. doi:<https://doi.org/10.1111/trf.16558>
- Tzounakas VL, K. A.-P. (2016). Data on how several physiological parameters of stored red blood cells are similar in glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient and sufficient donors. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.06.018>
- Tzounakas, V. L. (2017). Temperature-dependent haemolytic propensity of CPDA-1 stored red blood cells vs whole blood - Red cell fragility as donor signature on blood units. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, 15(5), 447–455. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.2450/2017.0332-16>
- Tzounakas, V. L. (2022). Supplementation with uric and ascorbic acid protects stored red blood cells through enhancement of non-enzymatic antioxidant activity and metabolic rewiring. *Redox biology*(57). Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102477>
- Vatsalya, V. B. (2023). Influence of age and sex on alcohol pharmacokinetics and subjective pharmacodynamic responses following intravenous alcohol exposure in humans. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 107, 144-152. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2022.08.010>
- Walski, T. C. (2014). Individual osmotic fragility distribution: a new parameter for determination of the osmotic properties of human red blood cells. *BioMed research international*. doi:<https://doi.org/10.1155/2014/162102>
- Tyulina, O. V. (χ.χ.). Does ethanol metabolism affect erythrocyte hemolysis? *Biochimica et biophysica acta*, 1535(1), 69-77. Ανάκτηση από [https://doi.org/10.1016/s0925-4439\(00\)00086-7](https://doi.org/10.1016/s0925-4439(00)00086-7)