



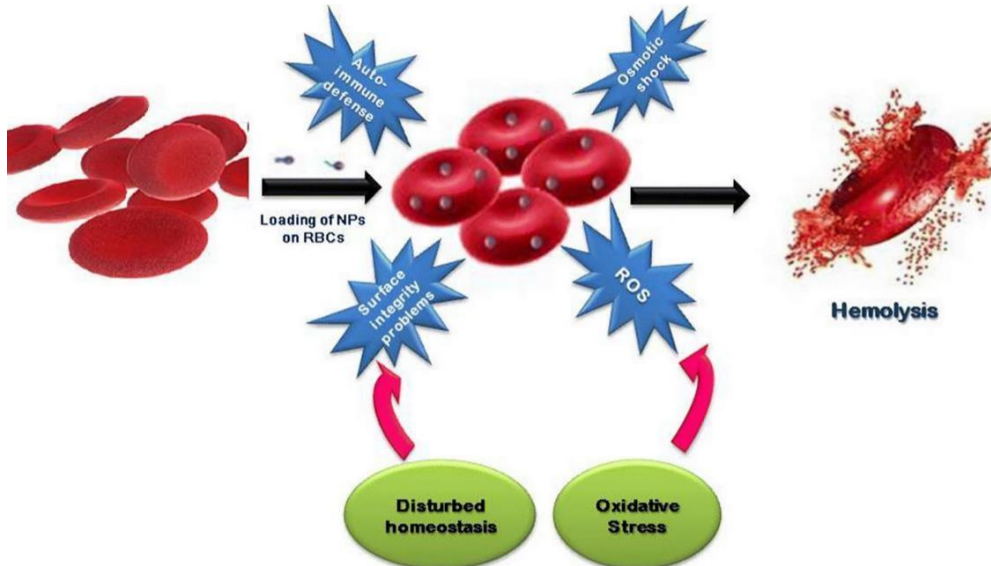
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων



Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία

Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

“Οξείδωση και δείκτες κυτταρικής εκκαθάρισης ερυθροκυττάρων στην ηπατοπάθεια”



Όνοματεπώνυμο Φοιτητή:
Νταβίντ Χούσι 19678339

Όνοματεπώνυμο Επιβλέποντα:
Κριεμπάρδης Αναστάσιος

Αιγάλεω, 2024



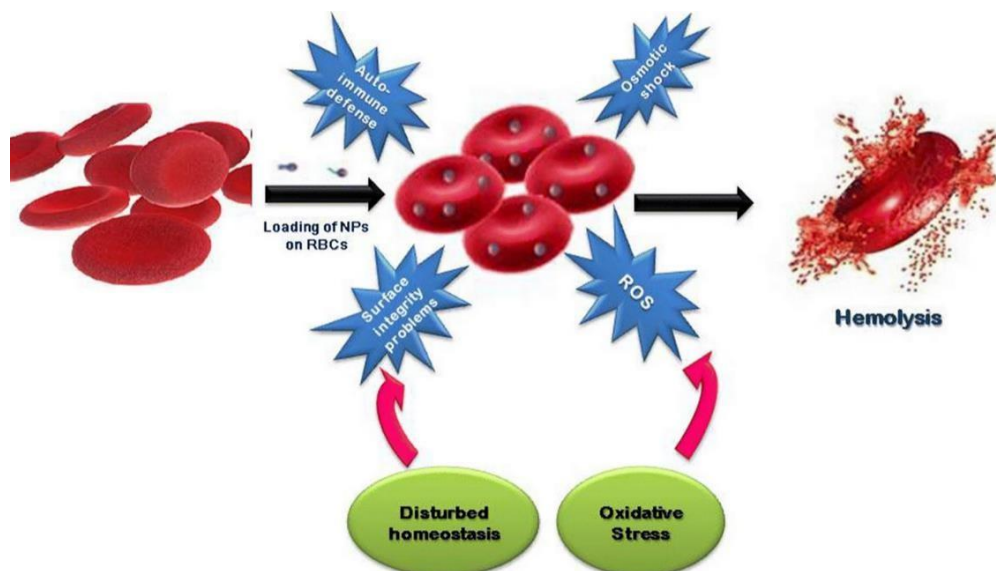
University of West Attica
Faculty of Health and Care
Sciences Department of
Biomedical Sciences Division:
Medical Laboratories



Research Lab of Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology

Pregraduate Dissertation

“Oxidation and Cell Clearance Indicators of Red Blood Cells in Liver Disease”



Student Name
David Hysi, 19678339

Name of Supervisor
Anastasios Kriebardis

Egaleo, 2024

Τίτλος Εργασίας

Οξείδωση και δείκτες κυτταρικής εκκαθάρισης
ερυθοκυττάρων στην ηπατοπάθεια

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής

Η προπτυχιακή διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι
Εξεταστική Επιτροπή:

1	ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ	ΕΠΙΤΡΟΠΗ	
2	ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΔΡΥΛΛΗΣ	ΕΠΙΤΡΟΠΗ	
3	ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΦΟΡΤΗΣ	ΕΠΙΤΡΟΠΗ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Νταβίντ Χούσι του Μαργκαρίτ, με αριθμό μητρώου 19678339 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Ιατρικών Εργαστηρίων του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών 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».

Ο Δήλων
Νταβίντ Χούσι

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	i
Abstract	ii
Εισαγωγή	iii
1. Φυσιολογία του ερυθροκυττάρου.....	1
1.1. Δομή	1
1.1.1. Μεμβράνη	1
1.1.2 Πρωτεΐνες	1
1.2 Κύκλος Ζωής	6
1.3. Οξειδωση	7
1.3.1 Τι είναι τα ROS	7
1.3.2 Οξειδωτικά μονοπάτια	8
1.3.3. Ερύπτωση	9
2. Ήπαρ και Ηπατοπάθεια	10
2.1 Φυσιολογία ήπατος και αιμοποίηση	10
2.1.1. Αντιοξειδωτική άμυνα του ήπατος και οι επιπτώσεις της οξειδωσης.....	11
2.1.2. Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα του ήπατος.....	12
2.1.3. Αλκοόλ και μεταβολισμός στο ήπαρ.....	14
2.2 Ηπατοπάθεια και η αλκοολική ηπατοπάθεια.....	14
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	16
3.1 Υλικά.....	16
3.1.1. Convergys X3 ng.....	16
3.1.2. Αναλυτικός ζυγός KERN ALJ 310-4A, αυτόματες πιπέτες και ρύγχη πιπέτας	16
3.1.3. Κυτταρόμετρο ροής (Flow Cytometry), BD FACSCanto	16
3.1.4. Διαλύματα	17
3.2. Μέθοδοι	17
3.2.1. Πρωτόκολλο Ανίχνευσης ROS και Ca	17
3.2.2. Πρωτόκολλο Ανίχνευσης IgG	18
3.2.3. Πρωτόκολλο Ανίχνευσης Φωσφατιδυλοσερίνης.....	18
4. Αποτελέσματα	18
4.1. Αποτελέσματα από γενικές αίματος	19
4.2 Αποτελέσματα από τα πειράματα.....	20
5. Συζήτηση	21
6. Συμπεράσματα	23
Βιβλιογραφία.....	24

i. Περίληψη

Αυτή η εργασία αναλύει την σχέση μεταξύ της οξείδωσης και των κυτταρικών δεικτών εκκαθάρισης των ερυθροκυττάρων σε συνδυασμό με την ηπατοπάθεια. Για να γίνει η σύνδεση μεταξύ των δύο, χρησιμοποιήσαμε γενική αίματος και κυτταρομετρία ροής για να μετρήσουμε ROS, IgGs στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, παρουσία φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων και την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου. Αυτοί οι αποπτωτικοί δείκτες μετρήθηκαν από 15 άτομα (12 άντρες, 3 γυναίκες, μέση ηλικία 44,7), από τους οποίους 9 έχουν αλκοολική ηπατοπάθεια. Τα αποτελέσματα δείχνουν μειωμένα ερυθροκύτταρα, με χαμηλό αιματοκρίτη και αυξημένη μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης, και τα δεδομένα του κυτταρόμετρου παρουσιάζουν αυξημένα ROS (p-value=0,036), αυξημένα IgGs (p-value=0,014) και αυξημένη παρουσία φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου σε ηπατοπαθείς (p-value=0,0013). Τα δεδομένα δείχνουν ότι η ηπατοπάθεια, συγκεκριμένα η αλκοολική, έχουν επίπτωση στην κυτταρική εκκαθάριση.

Λέξεις κλειδιά: Ηπατοπάθεια; ερυθροκύτταρο; οξειδωτικό στρες; κυτταρική εκκαθάριση; φωσφατιδυλοσερίνη; αλκοόλ

ii. Abstract

This paper analyzes the correlation between oxidation and red blood cell clearance indicators to liver disease. In order to establish a connection between the two, we used full blood count and flow cytometry to measure ROS, IgGs on the surface of RBCs, phosphatidylserine presence in the outer surface of the cell and the concentration of intracellular calcium. These apoptosis indicators were measured from 15 individuals (12 men, 3 women, mean age 44,7), 9 of whom have alcoholic liver disease. The results show decreased RBCs, with low HCT and high MCH, and as for the flow cytometry data it shows elevated ROS (p-value=0,036), IgGs (p-value=0,014) and PS presence in the outer surface of the cell in liver patients (p-value=0,0013). The data indicates that liver disease, in particular ALD, have an effect in blood cell clearance.

Keywords: Liver disease; erythrocyte; oxidative stress; cell clearance; phosphatidylserine; alcohol

Εισαγωγή

Για την εργασία αυτήν διεκπεραιώθηκαν πειράματα με κυτταρομετρία ροής (flow cytometry) , με δείγματα αίματος από ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια, μια μορφή ηπατοπάθειας λόγω αυξημένης κατανάλωσης αλκοόλ. Συγκεκριμένα τα πειράματα είναι τρία: α) Εύρεση και ποσοτικοποίηση εκτεθειμένης φωσφατυδυλοσερίνης, β) Μέτρηση ενδοκυττάριου ασβεστίου, γ) Μέτρηση ελεύθερων ριζών οξυγόνου και δ) Μέτρηση αντισωμάτων στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων. Τα τέσσερα αυτά πειράματα καλύπτουν όλες τις οδούς κυτταρικής εκκαθάρισης που θα αναλυθούν παρακάτω και το κυτταρόμετρο είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο και διαθέσιμο για την πραγματοποίηση όλων των πειραμάτων.

Η εργασία χωρίζεται σε διάφορες ενότητες. Η πρώτη ενότητα ασχολείται με τη φυσιολογία του ερυθροκυττάρου, συγκεκριμένα την μεμβράνη και τις πρωτεΐνες της, τον κύκλο ζωής του ερυθροκυττάρου. Τα ερυθροκύτταρα, ή αλλιώς ερυθρά αιμοσφαίρια, χαρακτηρίζονται από την έλλειψη πυρήνα του και άλλων οργανιδίων όπως μιτοχόνδρια και ριβοσώματα¹, την παρουσία της αιμοσφαιρίνης^{2 3} για την ανταλλαγή αερίων (οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα), τον μεμβρανικό σκελετό τους και τον αριθμό τους, καθιστώντας τα πιο άφθονα κύτταρα στο αίμα.

Η δεύτερη ενότητα αναλύει τη λειτουργία του ήπατος. Το ήπαρ, είναι αιμοποιητικό όργανο σημαντικό από την εμβρυική και βρεφική ανάπτυξη. Ένα όργανο που συμβάλλει σε πολλές διαδικασίες, όπως ο μεταβολισμός των μακροθρεπτικών στοιχείων, ειδικά των λιπιδίων, αλλά και των φαρμάκων, αποτοξίνωση του συστήματος από διάφορους μεταβολίτες, παραγωγή πρωτεϊνών, ομοιόσταση των λιπιδίων και της χοληστερόλης και συμβάλει σε ποίκιλα ενδοκρινή μονοπάτια του συστήματος⁴⁻⁶. Συγκεκριμένα το ρόλο που έχει στο αίμα όπως η αιμοποίηση, ο μεταβολισμός διάφορων μεταβολιτών και λιπιδίων, και η διαταραχή του ήπατος, συγκεκριμένα λόγω της κατανάλωσης αλκοόλ. Η ηπατοπάθεια, είναι η παθολογική λειτουργία του ήπατος. Λόγω της στενής σχέσης των λειτουργιών του με το αίμα, οι συνέπεια της ηπατοπάθειας πιθανώς επεκτείνεται και στην λειτουργία του αίματος.

Στην τρίτη ενότητα γίνεται αναφορά στα υλικά και στις μεθόδους με τα οποία πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα, με ανάλυση και το τρόπο λειτουργίας του κυτταρόμετρου. Στη τέταρτη ενότητα παρουσιάζονται οι στατιστικές αναλύσεις που δείχνουν την αύξηση παθολογικών τιμών και καταστάσεων σε συνδυασμό με γραφήματα. Τέλος ακολουθεί η συζήτηση των αποτελεσμάτων, τα συμπεράσματα και η βιβλιογραφία.

Ο σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη των μονοπατιών της κυτταρικής εκκαθάρισης του ερυθροκυττάρου σε σχέση με την παθολογική λειτουργία του ήπατος, την πιθανή συσχέτιση των δεδομένων αυτών με το αλκοόλ. Αυτή η εργασία αποτελεί κομμάτι μιας μεγαλύτερης έρευνας σχετικά με το αίμα και την αλκοολική ηπατοπάθεια.

Για να γίνει κατανοητή η πορεία της έρευνας, θα πρέπει να αναλύσουμε τους όρους με τους οποίους απασχολείται.

1. Φυσιολογία του ερυθροκυττάρου

1.1. Δομή

Τα ερυθροκύτταρα έχουν ιδιαίτερες δομικές ιδιότητες που δεν βρίσκονται σε άλλα κύτταρα. Αρχικά, έχουν την ικανότητα να παραμορφώνονται, να αλλάζουν σχήμα και να περνούν από πολύ στενά τριχοειδή. Μάλιστα αντέχουν υπό μεγάλες πιέσεις λόγω του σχήματος που θα πάρουν στο αίμα, συνήθως είτε σαν αλεξίπτωτο είτε σαν τορπίλη⁷. Αυτές οι ιδιότητες δε θα ήταν πιθανές χωρίς την δομή του.

Το σχήμα των ερυθροκυττάρων είναι αμφίκυκλος δίσκος και προέρχεται από τη μεμβράνη και το κυτταροσκελετό του ερυθρού κυττάρου. Κατά μέσον όρο, η επιφάνειά τους είναι περίπου 140μm, ο όγκος τους 90fL και η διάμετρός τους είναι 8μm⁸. Αυτό το σχήμα είναι ιδανικό για την μεγιστοποίηση της επιφάνειάς τους και σε συνδυασμό με το ιξώδες του και τον μεμβρανικό σκελετό, η παραμορφωσιμότητά τους είναι εφικτή.

1.1.1. Μembrάνη

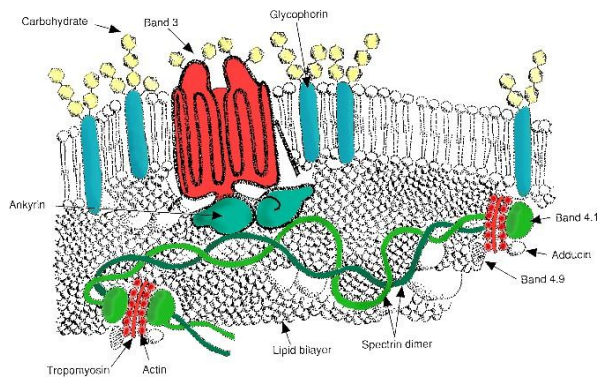
Η μεμβράνη του ερυθροκυττάρου περιλαμβάνει μια φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα. Αποτελείται από χοληστερόλη και φωσφολιπίδια. Μόνο η χοληστερόλη υπάρχει και στις 2 πλευρές της μεμβράνης σε αντίθεση τα υπόλοιπα 5 φωσφολιπίδια είναι μοιρασμένα ασυμμετρικά. Η εξωτερική στοιβάδα αποτελείται από φωσφατιδυλοχολίνη (Phosphatidylcholine [PC]) και σφιγγομυελίνη (Sphingomyelin [SM]). Η εσωτερική στοιβάδα αποτελείται κυρίως από φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (Phosphatidylethanolamine [PE]) και φωσφατιδυλοσερίνη (Phosphatidylserine [PS]), με μικρή ποσότητα φωσφοινοσιτόλης (Phosphoinositol [PI]).²

Αυτή η ασυμμετρία των φωσφολιπιδίων γίνεται λόγω της ηλεκτραρνητικότητάς τους. Τα εσωτερικά φωσφολιπίδια είναι ανιονικά και τα εξωτερικά το αντίθετο. Αυτό είναι εφικτό λόγω τριών διαμεμβρανικών ενζύμων, της φλιπάσης, φλοπάσης και σκραμπλάσης. Η φλιπάση περνάει εξωτερικά φωσφολιπίδια από την εξωτερική μεμβράνη στην εσωτερική, ενώ η φλοπάση κάνει το αντίστροφο. Και οι δύο πρωτεΐνες χρησιμοποιούν ATP. Η σκραμπλάση από την άλλη, δεν χρειάζεται ATP και αλλάζει φωσφολιπίδια και στις δύο κατευθύνσεις χωρίς κάποιο κριτήριο. Ενεργοποιείται μόνο σε πολύ συγκεκριμένες περιπτώσεις, όπως κυτταρική βλάβη ή απόπτωση και παραμένει ανενεργή για να μην διαταράξει την ισορροπία της διπλοστοιβάδας σε φυσιολογικές καταστάσεις.⁹

1.1.2 Πρωτεΐνες

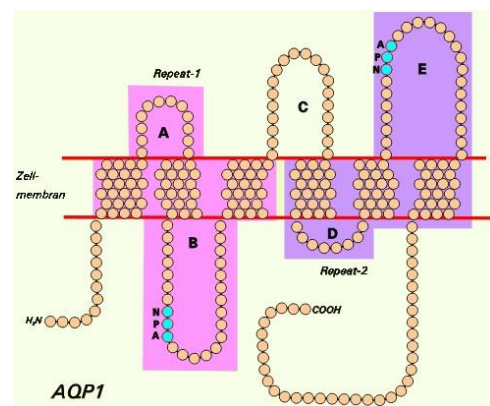
Υπάρχουν πάνω από 50 διαμεμβρανικές μεμβράνες. Η κάθε μια κυματίζεται από εκατοντάδες σε εκατομμύρια αντίγραφα πάνω σε ένα ερυθροκύτταρο με το ένα τέταρτο να αναλογεί σε πρωτεΐνες των ομάδων αίματος. Λειτουργίες μπορεί να είναι η μεταφορά, η προσκόλληση κυττάρου και η δομή.¹⁰

Band-3 (πρωτεΐνη-ζώνη 3): Πρωτεΐνη μεταφορέας ανιόντων, μεγέθους 911 αμινοξέων. Είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη, περίπου 1.2 εκατομμύρια αντίγραφα ανά κύτταρο. Είναι η κύρια πρωτεΐνη για την ανταλλαγή αερίων. Αυτό το επιτυγχάνει με την ανταλλαγή ιόντων του χλωρίου με το όξινο ανθρακικό (HCO_3^-) κατά τον μεταβολισμό του διοξειδίου του άνθρακα. Μάλιστα είναι ένα δομικό κομμάτι στην μεμβρανοσκελετική σύνδεση και στην σύνδεση αιμοσφαιρίνης και γλυκολυτικού ενζύμου.^{11,12}

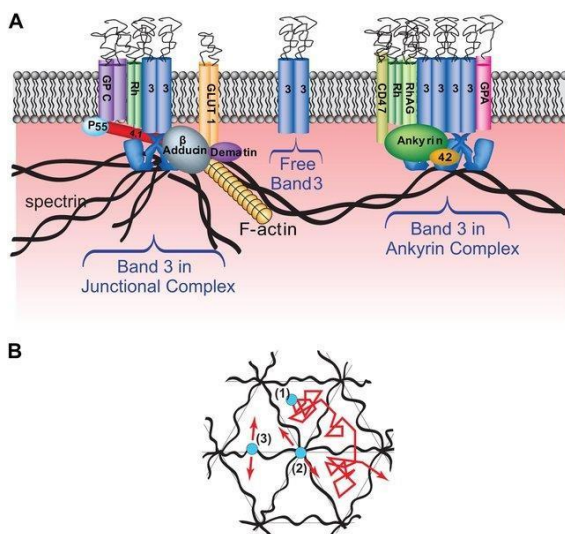


1. Δομή Πρωτεΐνης-ζώνης 3: Η πάνω πλευρά είναι η εξωτερική στοιβάδα και αποικονίζεται με κόκκινο χρώμα. *RBC_membrane_major_proteins.jpg: Author is Ernst Hempelmann derivative work: TimVickers, Public domain, via Wikimedia Commons*

Aquaporin-1 (ακουαπορίνη-1): Πρωτεΐνη μεταφορέας νερού. Είναι μια πρωτεΐνη που εκφράζεται όχι μόνο στα ερυθροκύτταρα, αλλά και σε ιστούς όπως νεφρό, εγκέφαλο και καρδιαγγειακό σύστημα. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 2 υπάρχουν 5 πτυχώσεις οι οποίες εξέχουν από τη διπλοστοιβάδα και ταξινομούνται με τα γράμματα A-E. Όπως φαίνεται και στην εικόνα το τμήμα A&B με D&E είναι επαναλήψεις της ίδιας αλληλουχίας Έχει διπλό ρόλο, ένας είναι η μεταφορά νερού και ο άλλος είναι ως ένα κανάλι κατιόντων.¹³



2 Η δομή της ακουαπορίνης. *Opossum58, CC BY-SA 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>, via Wikimedia Commons*

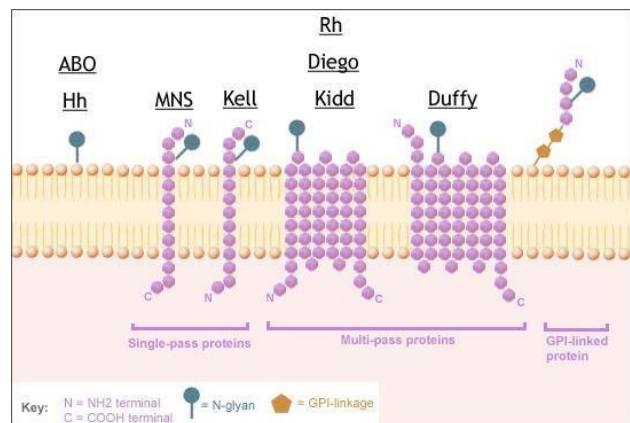


3. Απεικόνιση της *glut-1*: όπως φαίνεται και στο σχήμα A με πορτοκαλί χρώμα, η πρωτεΐνη είναι διαμεμβρανική και είναι συνδεδεμένη και με άλλα διαμεμβρανικά στοιχεία. Στο σχήμα 2 φαίνεται η κάτοψη της δομής.¹⁰⁹

Glut-1 (μεταφορέας γλυκόζης 1): Πρωτεΐνη μεταφορέας γλυκόζης. Το αίμα ως μέσο μεταφοράς οξυγόνου, είναι και μέσο μεταφοράς θρεπτικών συστατικών και ενέργειας, δηλαδή γλυκόζης. Λόγω της ανάγκης των ερυθροκυττάρων για ενέργεια από την έλλειψη μιτοχονδρίων, είναι αναγκαία η μεταφορά της γλυκόζης από το εξωτερικό της μεμβράνης στο εσωτερικό. Αυτό γίνεται μέσω της διαδικασίας της γλυκόλυσης, και η ενέργεια καταναλώνεται από τα κανάλια Na^+/K^+ και από την ATPάση. Η κατανάλωση αυτής της ενέργειας έχει ως προϊόν το NADH, που έχει αντιοξειδωτικές ικανότητες και αποτρέπει την οξείδωση της αίμης.¹⁴

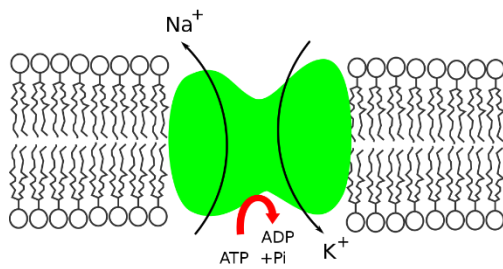
MCT1/ SLC16A1 (μεταφορέας μονοκαρβοξυλάσης 1): Πρωτεΐνη μεταφορέας μονοκαρβοξυλασών. Αναλυτικότερα, αυτή η πρωτεΐνη είναι αρκετά διαδεδομένη σε διαφόρους ιστούς του οργανισμού και λειτουργεί ως εξαρτώμενο από πρωτόνια μεταφορέα ή συμμεταφορέα. Η πρωτεΐνη μεταφέρει λακτάση, πυροσταφυλικό, ακετοξικό, β-υδροξυβουτυρικό και γ-υδροξυβουτυρικό στο ερυθρό αιμοσφαίριο. Αυτές η ουσίες υπάρχουν ως μονοκαρβοξυλικά ανιόντα που είναι αναγκαία ως το υπόστρωμα της πρωτεΐνης.¹⁵

Kidd antigen protein (αντιγόνο- πρωτεΐνη Kidd): Γλυκοπρωτεΐνη μεταφορέας ουρίας. Είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της ωσμωτικότητας του ερυθροκυττάρου. Έχει περίπου 14.000 θέσεις αντιγόνου στο ερυθροκύτταρο. Ωστόσο η γλυκοπρωτεΐνη βρίσκεται και στο νεφρό για την συμπύκνωση και επίτευξη μεγαλύτερης συγκέντρωσης ουρίας στα ούρα. Χωρίς αυτήν τα ερυθροκύτταρα η μεταφορά ουρίας είναι αρκετά πιο αργή, αλλά η απουσία της δεν σημαίνει και ασθένεια ¹⁶. Η γλυκοπρωτεΐνη διαπερνάει την μεμβράνη 10 φορές με απότοκο να έχει 5 θηλιές στο εξωτερικό και 4 θηλιές στο εσωτερικό. Μια N-γλυκίνη είναι παρούσα στο τρίτη θηλιά.^{17,18}



4. Απεικόνιση της γλυκοπρωτεΐνης Kidd. Η εικόνα είναι ενδεικτική. Η γλυκοπρωτεΐνη διαπερνά την μεμβράνη 10 φορές και όχι 6 έτσι όπως δείχνει η εικόνα. (16)

Na⁺/ K⁺- ATPase: Ένζυμο μεταφορέας Νατρίου/ Καλίου. Υπάρχει στην επιφάνεια όλων των κυττάρων και είναι υπεύθυνο για την μεταφορά 3 ατόμων Na⁺ με 2 K⁺ ατόμων δια μέσου της μεμβράνης. Είναι σημαντικό ένζυμο για τη διατήρηση της ωσμωτικότητας του κυττάρου αλλά και άλλων ουσιών, όπως άλλα ιόντα και θρεπτικά στοιχεία. Αποτελείται από 2 υπομονάδες, την α-υπομονάδα, που έχει καταλυτικό ρόλο και δεσμεύει τα κατιόντα νατρίου και καλίου, και την β-υπομονάδα, που είναι αναγκαία για την τοποθέτησή της στην πλασματική μεμβράνη.¹⁹



5. Απεικόνιση της $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$

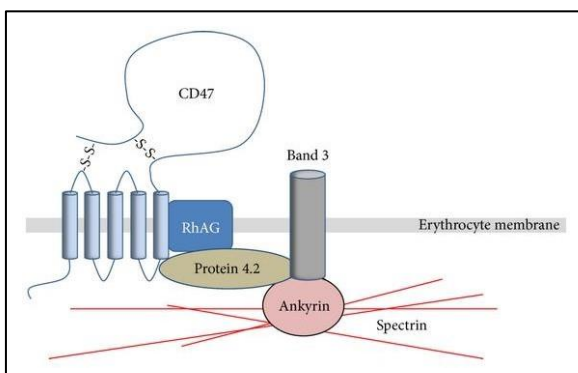
By Krompe2.jpg: Original uploader was Phi-Gastrein at fr.wikipedia/derivative work: sonia - NaKrompe2.jpg, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=15533290>

PMCA (Ca^{+2} ΑΤΡαση πλασματικής μεμβράνης): Πρωτεΐνη μεταφοράς ασβεστίου. Η PMCA, είναι μια διαμεμβρανική μεμβράνη που βρίσκεται σε αρκετούς ιστούς του οργανισμού, συμπεριλαμβάνοντας τα ερυθροκύτταρα. Το ένζυμο διαπερνάει την πλασματική μεμβράνη 10 φορές με διαμεμβρανικές έλικες με τη καρβοξυλική και αμινοτελική άκρη να βρίσκεται μέσα στο κυττόςολιο. Είναι υπεύθυνο για την διαχείριση του ασβεστίου μέσα στο κύτταρο, με την αφαίρεση του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Η λειτουργία της ελέγχεται από την καλμοδουλίνη, η οποία αλληλεπιδρά με την αντλία μόνο υπό την παρουσία ασβεστίου. Ωστόσο έχει δειχθεί ότι υπάρχει και ένας δεύτερος τρόπος στα ερυθροκύτταρα, μέσω οξικών φωσφολιπιδίων.^{20,21}

Ankyrin (Αγκυρίνη): Η αγκυρίνη είναι μια δομική πρωτεΐνη που ενώνει τον κυτταροσκελετό με τη πλασματική μεμβράνη. Αλληλοεπιδρά με πολλές πρωτεΐνες, μέσω του συμπλέγματος που κάνει μαζί τους. Το σύμπλεγμα αυτό αποτελείται από τη πρωτεΐνη ζώνη 3, την πρωτεΐνη 4.2, την γλυκοφορίνη A και B, τις πρωτεΐνες της ομάδας Rhesus RhAg, RhCE, αλλά και την GLUT1.²²

RhAg/ RhCE/ RhD (αντιγόνα ομάδας Rhesus): Το RhAg είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, η οποία εικάζεται ότι είναι μέρος της μεμβρανικής αντλίας που μεταφέρει αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα δια μέσου της πλασματικής μεμβράνης. Μάλιστα είναι σημαντικό στην έκφραση των άλλων αντισωμάτων της ίδιας ομάδας. Η απουσία της είναι καταστροφική στην δομή του ερυθροκυττάρου²³

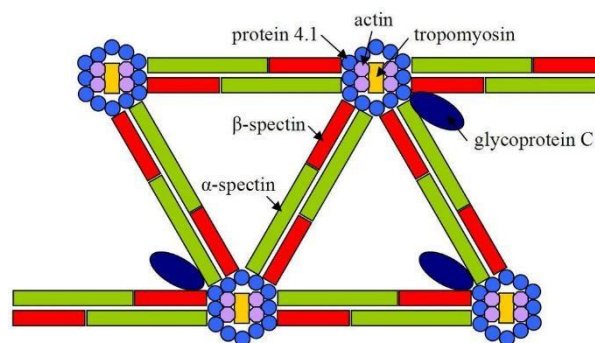
Το RhCE είναι και αυτό μια γλυκοπρωτεΐνη, η οποία εκφράζει τα αντιγόνα C, c, E και e. Έτσι όπως και η RhAg, και αυτή είναι μια μεμβράνη μεταφοράς χωρίς όμως να είναι γνωστή η λειτουργία της. Τέλος, το RhD είναι πάλι μια γλυκοπρωτεΐνη, η οποία εκφράζει το αντιγόνο D.



6. Απεικόνιση των αντιγόνων RhAg και RhCE. Το RhCE είναι η πρωτεΐνη δεξιά που διαπερνάει αρκετές φορές την μεμβράνη. Μάλιστα απεικονίζεται και η σχέση που έχουν τα αντιγόνα με το υπόλοιπο σύμπλεγμα αγκυρίνης. Per-Arne Oldenborg, "CD47: A Cell Surface Glycoprotein Which Regulates Multiple Functions of Hematopoietic Cells in Health and Disease" doi: 10.1155/2013/614619

Band 4.1 (πρωτεΐνη ζώνη 4.1): Η πρωτεΐνη ζώνης 4.1R, μια κυτταροσκελετική πρωτεΐνη, είναι η πρωτεΐνη που βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην μηχανοχημική ιδιότητα της μεμβράνης. Συγκεκριμένα, επιτυγχάνει αυτό το ρόλο με την πρόσδεσή του με την ακτίνη και την σπεκτρίνη και με την σύνδεση της μεμβράνης με τον κυτταροσκελετό. Η έλλειψη της πρωτεΐνης συνήθως συνδέεται με μειωμένη μηχανική ικανότητα και τάση για τμηματοποίηση.²⁴

Spectrin (Σπεκτρίνη): Η σπεκτρίνη είναι και αυτή μια δομική πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου. Η σπεκτρίνη αλληλοεπιδρά με την ακτίνη, αγκυρίνη και αντουσίνη, μια πρωτεΐνης που βοηθάει στην διάταξη του πλέγματος²⁵, για την δημιουργία ενός πολυσύνθετου δικτύου στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης. Το δίκτυο αυτό είναι σημαντικό για την διατήρηση του σχήματος και της παραμορφωσιμότητάς του. Όπως φαίνεται και στην εικόνα, η σπεκτρίνη έχει 2 υπομονάδες, την α-σπεκτρίνη και β-σπεκτρίνη. Συγκεκριμένα αποτελούνται από α1 και β1 σπεκτρίνες, οι οποίες με τη βοήθεια της ακτίνης, της πρωτεΐνης 4.1R τροπομυωσίνης και γλυκοπρωτεΐνης C, σχηματίζουν αυτή τη χαρακτηριστική δομή.²⁶



7. Απεικόνιση του πλέγματος. By The original uploader was Kupirijo at English Wikipedia. - Transferred from en.wikipedia to Commons by Jacopo Werther., CC BY 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2036953>

Ακτίνη: Η ακτίνη είναι δομικό κομμάτι του σκελετού των ερυθροκυττάρων. Παρόλο που ο ρόλος του είναι καθαρά δομικός, η αλλαγή στις ιδιότητές του μπορεί να προκαλέσει την παρουσία παθολογικών μορφών του ερυθροκυττάρου όπως είναι τα εχινοκύτταρα. Η πρωτεΐνη αυτή αλληλοεπιδρά κυρίως με την σπεκτρίνη, όπως φαίνεται στην εικόνα 7.^{27,28}

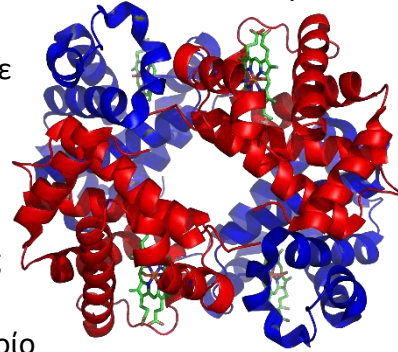
Η τροπομυωσίνη και η τρομοντουλίνη δημιουργούν ένα σύμπλεγμα και σταθεροποιούν τα κοντά νημάτια της ακτίνης. Αυτό έχει ως απότοκο την καλύτερη αλληλεπίδραση μεταξύ της ακτίνης με την σπεκτρίνη. Τέλος, η δεματίνη και η αντουσίνη, τυλίγουν τα νημάτια ακτίνης και η αντουσίνη μάλιστα προσαρμόζει το νημάτιο και σχηματίζει ένα τριμέρες σύμπλεγμα με την σπεκτρίνη- ακτίνη.²⁹

Γλυκοφορίνες: Οι γλυκοφορίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες και χωρίζονται σε δύο χαρακτηριστικές ομάδες. Οι γλυκοπρωτεΐνες έχουν ένα πρωτεϊνικό τμήμα, που είναι στην μεμβράνη και ένα υδατανθρακικό τμήμα που εξέχει στο εξωτερικό της μεμβράνης. Η πρώτη ομάδα είναι η γλυκοφορίνη A, B και E (GPA, GPB, GPE). Αυτές προέρχονται από διαφορετικά αλλά συγγενή γονίδια. Η δεύτερη ομάδα είναι η γλυκοφορίνη C και D (GPC,

GPD), τα οποία προκύπτουν από το ίδιο γονίδιο, αλλά λόγω της ωρίμανσης του mRNA και της διάταξης των εξωνίων του, καταφέρνουν να γίνουν 2 γλυκοπρωτεΐνες.

Ο ρόλος όλων των γλυκοφορινών δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Η γλυκοπρωτεΐνη C και D, έχουν δομικό ρόλο στον κυτταροσκελετό δίκτυο της μεμβράνης, ενώ για την αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια των ερυθρών ρόλο παίζει η γλυκοπρωτεΐνη A.^{29,30}

G6PD (γλυκόζη-6-φωσφατάση): Ένζυμο που βρίσκεται στο κυτοσόλιο των ερυθρών αλλά και όλων των κυττάρων του οργανισμού. Παίζει σημαντικό ρόλο στην αποφυγή κυτταρικής βλάβης από δραστικές μορφές οξυγόνου. Είναι ο καταλύτης στην παραγωγή NADP σε NADPH, μια άλλη αντιοξειδωτική ουσία.³¹



Αιμοσφαιρίνη: Η κυριότερη πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου. Ο ρόλος της αιμοσφαιρίνης είναι η μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς και διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς στους πνεύμονες. Η δομή του είναι ένα τετραμερές το οποίο αποτελείται από 2 α υπομονάδες, α1 και α2, και 2 β υπομονάδες, β1 και β2. Η κάθε α υπομονάδα συνδέεται με την β υπομονάδα, δημιουργώντας διμερή, α1β1 και α2β2 αντίστοιχα. Στη συνέχεια οργανώνονται συμμετρικά, όπως στο σχήμα 8 και σχηματίζουν ένα κενό στο κέντρο. Σε αυτό το κενό θα συνδεθεί η αίμη, ένας δαχτύλιος πορφυρίνης που συνδέεται με σίδηρο και πρωτοπορφυρίνη.³²

8. Τρισδιάστατη απεικόνιση των αλυσιδών α και β, στην τεταρτοταγή δομή τους. Από Zephyris from en.wikipedia.org, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.ph>

Gardos Channel (κανάλι Gardos (KCa3.1): Το κανάλι Gardos είναι ένα Ca^{+2} ευαίσθητο, ενδιάμεσης αγωγιμότητας, K^+ επιλεκτικό κανάλι. Ο ρόλος του είναι η διαρρύθμιση του όγκου του ερυθροκυττάρου. Ενεργοποιείται σε απόκριση αύξησης του κυτοσολιακού ασβεστίου στα ερυθροκύτταρα. Προκαλεί την μείωση του κυττάρου λόγω της εισχώρησης καλίου. Η διαδικασία αυτή, εικάζεται ότι γίνεται λόγω παραμόρφωσης της μεμβράνης.³³

1.2 Κύκλος Ζωής

Τα ερυθροκύτταρα, προέρχονται από πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSC [haemopoietic stem cell]), τα οποία με τους ποικίλους αυξητικούς παράγοντες ωριμάζουν στα επόμενα στάδια. Το πρώτο στάδιο ωρίμανσης είναι τα colony forming units granulocytic/ erythroid/ monocytic/ megakaryotic (CFU-GEMM), και μετά το Burst Forming Unit Erythroid (BFU-E/ Ερυθροειδές Μονάδα Σχηματισμού Έκρηξης) σε πρώιμο και τελικό στάδιο.

Στο τελικό στάδιο BFU-E ύστερα υπό την επίδραση της ερυθροποιητίνης, γίνονται σε Colony Forming Unit Erythroid (CFU-E/ Ερυθροειδές Μονάδα Σχηματισμού Αποικίας). Τα CFU-E γίνονται προερυθροβλάστες, όπου θα αρχίσει ή σύνθεση της αιμοσφαιρίνης, η συμπύκνωση του πυρήνα και η πόλωση του, και μετά οι προερυθροβλάστες θα γίνουν βασεοφιλικό ερυθροβλάστες. Σε αυτό το στάδιο η επίδραση της ερυθροποιητίνης σταματάει και έρχεται το πρώιμο στάδιο του πολυχρωματόφιλου ερυθροβλάστη και τελικό

στάδιο είναι οι ορθοχρωματόφιλοι ερυθροβλάστες. Σε αυτό το τελικό στάδιο θα γίνει και η αφαίρεση του πυρήνα και η κυκλοφορία των δικτυοερυθροκυττάρων (R1- reticulocytes) στο κυκλοφορικό σύστημα.³⁴⁻³⁶

Τα δικτυοερυθροκύτταρα από R1 γίνονται σε R2 με τη βοήθεια των μακροφάγων που βρίσκονται στο άλλο αιμοποιητικό όργανο, τον σπλήνα. Σε αυτή την διαδικασία θα γίνει η απομάκρυνση ή αποδόμηση τα απομεινάρια των οργανιδίων και RNA από το στάδιο R1, και να μικρύνουν σε μέγεθος αλλά και σε όγκο³⁷⁻³⁹. Τέλος, τα δικτυοερυθροκύτταρα γίνονται τα ώριμα ερυθροκύτταρα που βρίσκονται στο περιφερικό αίμα.

Η διάρκεια ζωής του ερυθροκυττάρου είναι κατά μέσο όρο 120 ημέρες, και έχει ως βασικό ρόλο την ανταλλαγή αερίων (O_2 , CO_2) από τους πνεύμονες και η ομοιοστάση του pH^2 . Μέσα σε αυτή την περίοδο το ερυθροκύτταρο θα έχει περάσει από διάφορα αγγεία, διαφόρων μεγεθών. Αυτά τα μεγέθη ποικίλουν σε αγγεία πάνω από 50 μm μέχρι και τριχοειδή 3-8 μm .⁴⁰

Κατά τη διάρκεια όμως αυτών των 120 ημερών, τα ερυθροκύτταρα δεν παραμένουν αμετάβλητα. Η αλλαγή στην αναλογία φωσφολιπιδίων στην επιφάνεια τους, αλλαγή στην ενζυματική δραστηριότητα και η αναλογία μεταξύ πρωτεΐνης 4.1 με πρωτεΐνης 4.2 είναι χαρακτηριστικά της γήρανσης ενός ερυθροκυττάρου. Αυτή η γήρανση είναι αποτέλεσμα μηχανικού στρες αλλά και χημικού στρες, όπως η ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Πιο συγκεκριμένα τα φωσφολιπίδια που κανονικά είναι στο εσωτερικό του κυττάρου, μέσω της τριάδας πρωτεϊνών φλοπάση, σκραμπλάση και φλιπάση βγαίνουν στην επιφάνεια του ερυθροκυττάρου και σε συνέχεια μειώνεται και η χολεστερόλη και τα εξωτερικά φωσφολιπίδια. Άλλες αλλαγές στα ερυθροκύτταρα είναι η μείωση σε μεμβρανικές πρωτεΐνες, μεμβράνη και αιμοσφαιρίνη. Αυτή η διαδικασία λειτουργεί σαν σήμα φαγοκυττάρωσης.^{40,41}

Το τέλος της ζωής του ερυθροκυττάρου είναι η φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα. Τα μακροφάγα αναγνωρίζουν τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα μέσω IgG αυτό-αντισωμάτων που έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων. Επειδή η γήρανση των ερυθρών κάνει τέτοιες αλλαγές στο κύτταρο, το τελικό ερυθροκύτταρο είναι πιο πυκνό από τα πιο νέα ερυθροκύτταρα. Το αντίσωμα είναι συγκεκριμένο για τη ζώνη 3 του ερυθροκυττάρου.⁴¹

1.3. Οξειδωση και Ερύπτωση

1.3.1 Τι είναι τα ROS

Τα ερυθροκύτταρα εκτίθενται σε μεγάλο αριθμό δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species ROS), λόγω της έκθεσής του στο οξυγόνο κατά τη διάρκεια των 120 ημερών στην κυκλοφορία του αίματος.⁴²

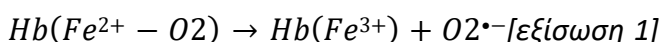
Τα ROS περιλαμβάνουν ρίζες υδροξυλίου, ανιόντα υπεροξειδίου O_2^- , μόρια οξυγόνου 1O_2 και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Υπό κανονικές συνθήκες, τα ROS λειτουργούν ως μόρια σηματοδότησης για τον προγραμματισμένο θάνατο ενός κυττάρου, συμπεριλαμβανομένου και του ερυθροκυττάρου. Για την αποφυγή του οξειδωτικού στρες υπάρχουν αντιοξειδωτικά τα οποία κρατούν το ερυθροκύτταρο σε μια ισορροπία. Ωστόσο όταν η ισορροπία διαταράσσεται είτε από την ελάττωση παραγωγής αντιοξειδωτικών ή

την υπερπαραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, το ερυθροκύτταρο αλλά και γενικά άλλα κύτταρα θα υποστούν οξειδωτικό στρες. ⁴²⁻⁴⁴

1.3.2 Οξειδωτικά μονοπάτια

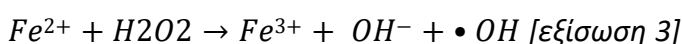
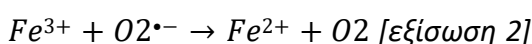
Η οξείδωση στα ερυθροκύτταρα είναι πιο συχνή, λόγω της μεγάλης έκθεσης τους στο οξυγόνο, και δέχεται οξειδωτικό στρες και στο εσωτερικό του αλλά και στο εξωτερικό του.

Αυτό-οξείδωση αιμοσφαιρίνης: Ο κύριος τρόπος είναι η οξείδωση της αιμοσφαιρίνης. Συγκεκριμένα η αυτό-οξείδωση της οξυαιμοσφαιρίνης (HbO₂) σε μεθαιμοσφαιρίνη και παράγει υπεροξειδίο. Αυτό το φαινόμενο της αυτό- οξείδωσης γίνεται μόνο στο 3% της συνολικής αιμοσφαιρίνης κάθε 24ώρο. Αυτή η αντίδραση είναι η πηγή των περισσότερων δραστικών μορφών οξυγόνου. (εξίσωση 1) ^{42,45,46}

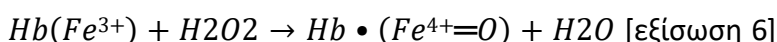
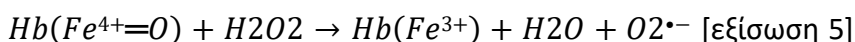
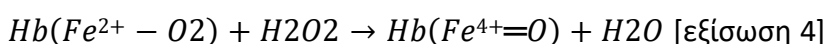


Παρόλη αυτά, μόνο το 1% της αιμοσφαιρίνης παραμένει τελικά στην κατάσταση της μεθαιμοσφαιρίνης. Αυτό επιτυγχάνεται από το ένζυμο cytochrome b5 reductase (κυτόχρωμα β5 ρεντουκτάση). Αυτό το ένζυμο καταφέρει με τη χρήση του NADH να επαναφέρει την Hb-Fe³⁺ σε Hb-Fe²⁺

Haber-Weiss/ Fenton reaction: Άλλη πηγή οξειδωτικής ουσίας είναι ο ελεύθερος σίδηρος (Fe⁺³) το οποίο μπορεί να έχει απομακρυνθεί από την μεθαιμοσφαιρίνη. Σε αυτή τη περίπτωση γίνεται μια αντίδραση που λέγεται Haber-Weiss αντίδραση (εξίσωση 2 και 3) Η αντίδραση ωστόσο δε γίνεται μόνη της, γίνεται σε συνδυασμό με την αντίδραση Fenton (εξίσωση 3). Η αντίδραση Haber Weiss, ουσιαστικά παράγει ρίζες υδροξυλίου από υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η φεριτίνη που υπάρχει στα ερυθρά θα προσπαθήσει να δεσμεύσει τον ελεύθερο σίδηρο που υπάρχει, με απότοκο η αντίδραση αυτή περιορίζεται. ^{42,45}



Οξείδωση αιμοχρωμάτων: Άλλο οξειδωτικό μονοπάτι είναι η αντίδραση μεταξύ του υπεροξειδίου του υδρογόνου με την αίμη της οξυαιμοσφαιρίνης (εξίσωση 4). Ύστερα το προϊόν από την πρώτη αντίδραση μπορεί να αντιδράσει με ένα δεύτερο μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου και παράγει μεθαιμοσφαιρίνη (εξίσωση 5). Η μεθαιμοσφαιρίνη που παράγεται ωστόσο από την αυτοοξείδωση μπορεί να αντιδράσει και αυτή με υπεροξειδίου του υδρογόνου (εξίσωση 6). ^{42,45}



Οξείδωση από NO: Ο μεταβολισμός του νιτρικού οξέος από το ενδοθήλιο ιστό παράγει νιτρικό οξύ και αντιδράει με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, με απότοκο την παραγωγή περοξυνιτρίου (εξίσωση 7)



Οξείδωση των λιπιδίων: Η ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, μπορούν να αντιδράσουν με τα ακόρεστα λιπίδια που υπάρχουν στην πλασματική μεμβράνη των ερυθρών, με απότοκο στην συνέχεια να αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο, και έτσι τη δημιουργία ενός φαύλου κύκλου ⁴⁶.

1.3.3. Ερύπτωσηση

1.3.3.1. Τι είναι η ερύπτωσηση

Η ερύπτωσηση είναι η αντίστοιχη διαδικασία της απόπτωσης, αλλά είναι αποκλειστική των ερυθροκυττάρων. Η ερύπτωσηση σε αντίθεση με την αιμόλυση, κρατάει την μεμβράνη και η αιμοσφαιρίνη μένει άθικτη και δεν υπάρχει λύση του κυττάρου. Όπως έχουμε αναφέρει από τον κύκλο ζωής, τα ερυθροκύτταρα έχουν χρόνο ζωής 120 ημέρες. Μέσα σε αυτές τις ημέρες, το ερυθροκύτταρο μεταβάλλεται τόσο στη δομή του, αλλά και σε χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος, η περιεκτικότητα σε αιμοσφαιρίνη. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι που ένα ερυθροκύτταρο καταλήγει στο στάδιο της ερύπτωσησης.^{40,47,48}

1.3.3.2. Ca^{2+} induced eryptosis (ερύπτωσηση παρακινούμενη από ασβέστιο)

Η ερύπτωσηση πρωτοαναφέρθηκε ως αυξημένα επίπεδα ανιόντων ασβεστίου στο κυτοσόλιο του κυττάρου. Το αυξημένο ασβέστιο προκαλείται από το στρες που έχει υποστεί το ερυθροκύτταρο. Αρχικά, πριν γίνει η ερύπτωσηση, θα γίνει ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης (PLA₂), που θα απελευθερώσει αραχνικό οξύ. Μετά τα αραχνικό οξύ θα μεταβολιστεί από την συνθετάση προσταγλαδίνης-ενδουπεροξειδίου.⁴⁹

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της προσταγλαδίνης E₂ που προκαλεί την κυστιδοποίηση, ενεργοποιώντας το ασβέστιο να εισχωρήσει στο εσωτερικό της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου. Με τη σειρά του το ασβέστιο θα ενεργοποιήσει το κανάλι Gardos, με αποτέλεσμα το ερυθροκύτταρο να διαρρεύσει KCl και νερό. Η προσταγλαδίνη E₂ θα αυξήσει και άλλο τα επίπεδα του ασβεστίου και θα φέρει στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου φωσφατιδυλοσερίνη, όταν αφαιρούνται κατιόντα χλωρίου.

Κατά τη διάρκεια της ερύπτωσησης, θα γίνει η ενεργοποίηση της ενδοπεπτιδάσης κυστεΐνης καλπαΐνης, η οποία θα αποδομήσει κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, όπως το σύμπλεγμα αγκυρίνης, με απότοκο η μεμβράνη να μην είναι σφαιρική, αλλά η επιφάνεια της να είναι τραχεία, όπως ένα εχινόκυτόταρο.⁴⁸

Αυτές οι αλλαγές θα αναγνωριστούν από τα μακρόφαγα και θα γίνει η φαγοκυττάρωση των ερυθροκυττάρων που έχουν υποστεί τις αλλαγές αυτές.

1.3.3.3 Ερύπτωσηση παρακινούμενη από κεραμίδια (Ceramide induced eryptosis)

Όπως έχουμε προαναφέρει, η σφιγγομυελίνη είναι λιπίδιο στην εξωτερική επιφάνεια των ερυθρών. Τα κεραμίδια, μια ουσία μεσάζοντα για την κυτταρική διαφοροποίηση,

απόπτωση των κυττάρων και γήρανση, δημιουργείται από την υδρόλυση της σγιμουελίνης από την σφιγγομυελινάση (SMase).

Έτσι όπως γίνεται και στην ερύπτωση παρακινούμενη από ασβέστιο, έτσι και εδώ η ερύπτωση προκαλείται από υπεροσμωτικό σοκ ή υπεροσμωτικά διαλύματα. Αυτές οι παράμετροι προκαλούν την παραγωγή κεραμιδίων από σφιγγομυελίνη.

Ένα άλλο μονοπάτι για τη δημιουργία των κεραμιδίων είναι ρυθμιζόμενη από τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor/ PAF), η κατεργασία των ερυθρών με χαλκό.^{47,48}

1.3.3.4. Oxidative induced eryptosis (ερύπτωση παρακινούμενη από οξείδωση)

Όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο της οξείδωσης, όταν η ισορροπία των ROS με την προστασία εναντίον των ROS εν είναι σωστή, τότε το ερυθροκύτταρο εκθέτει φωσφατιδυλοσερίνη στο εξωτερικό της επιφάνειας της πλασματικής μεμβράνης τους.

Η ακριβής διαδικασία δεν έχει βρεθεί, αλλά υπάρχει η συσχέτιση μεταξύ των καναλιών ασβεστίων, επίπεδα αντιοξειδωτικής γλουταθειόνης και δραστικών μορφών οξυγόνου.⁴⁷

1.3.3.5. Φερρόπτωση

Η φερρόπτωση είναι μια διαφορετική διαδικασία από την απόπτωση, νέκρωση και ερύπτωση. Χαρακτηρίζεται από την συσσώρευση ROS και λιπιδίων που έχουν υποστεί περοξείδωση από σίδηρο. Η κατάσταση αυτή δεν είναι φυσιολογική αλλά παθολογική.⁵⁰

Συνήθως γίνεται σε ασθενείς που δεν είναι σχετικές με το αίμα, αλλά πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι γίνεται και σε καταστάσεις μη ολοκληρωμένης ερύπτωσης, τουλάχιστον για τα παθολογικά ερυθρά.⁵¹⁻⁵⁵

2. Ήπαρ και Ηπατοπάθεια

2.1 Φυσιολογία ήπατος και αιμοποίηση

Το ήπαρ είναι ένα αιμοποιητικό όργανο, κατά την διάρκεια της εμβρυικής ζωής μέχρι και τη γέννα⁵⁶. Ωστόσο η σχέση του με το αίμα δεν σταματάει εκεί.

Υπάρχουν πολλά κύτταρα που βρίσκονται στο ήπαρ που αλληλοεπιδρούν με το αίμα. Τα ηπατοκύτταρα, που είναι η πλειοψηφία των κυττάρων του ήπατος (80%) έχουν διάφορους ρόλους. Αυτοί είναι, η παραγωγή ορμονών και χολής, εκκαθάριση τοξικών μεταβολιτών και η έκκριση πρωτεϊνών και λιπιδίων⁵⁷. Τα ηπατοκύτταρα παράγουν τη φερριτίνη και τη τρανσφερίνη. Η φερριτίνη είναι μια πρωτεΐνη που λειτουργεί ως αποθήκη σιδήρου ενώ η τρανσφερίνη, έτσι όπως και από το όνομά της, είναι πρωτεΐνη μεταφορέας του σιδήρου^{58,59}. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι αναγκαίες, εφόσον ο ελεύθερος σίδηρος είναι τοξικός για τον οργανισμό με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και δεν είναι διαλυτός από μόνος του. Είναι ένας από τους τρόπους που γίνεται ο μεταβολισμός του σιδήρου.⁶⁰

Τα χολαγγειοκύτταρα είναι ένας μικρότερος και ετερογενής πληθυσμός κυττάρων (3-5%) με βιοχημικές και μορφολογικές, ως προς το μέγεθος, διαφορές. Ασχολούνται σε συνεργασία με τα ηπατοκύτταρα στην έκκριση, τροποποίηση, και ρύθμιση της ροής της χολής.⁶¹

Τα ημιτονοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος (SEC) αποτελούν το 15-20% του ήπατος που βρίσκονται στην επιφάνεια των ηπατικών ημιτονοειδών, μιας δομής της οποίας αναμιγνύει το αίμα από την ηπατική αρτηρία με την πυλαία φλέβα^{60,62,63}. Η χαρακτηριστική τους δομή είναι η ασυνεχής επένδυση των ηπατικών ημιτονοειδών. Η μορφολογία τους αποτελεί μικρά ανοίγματα τα οποία τα καθιστούν διαπερατά. Αυτή η διαπερατότητα παρέχει στα ηπατοκύτταρα πρόσβαση σε συγκεκριμένες ουσίες. Είναι τα πρώτα κύτταρα τα οποία επηρεάζονται στην βλάβη του ήπατος.

Άλλη κατηγορία κυττάρων είναι τα αστεροειδή ηπατικά κύτταρα (HCSs) και λειτουργούν ως αποθήκες βιταμίνης Α. Η λειτουργία της, μάλιστα, έχει να κάνει με την ηπατική αναγέννηση και επισκευή του ήπατος^{64,65}, την ρύθμιση του εξωκυττάριου πλέγματος, ρύθμιση του ανοσοποιητικού και παραγωγή αυξητικών προϊόντων αναγκαία για την ηπατική ανάπτυξη.⁶⁰

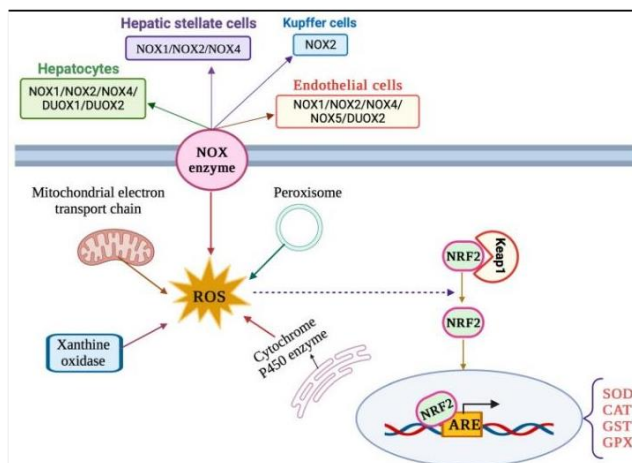
Τα μακροφάγα του κυττάρου ή αλλιώς κύτταρα Kupffer είναι κύτταρα του ήπατος και βρίσκονται στα ηπατικά ημιτονοειδή μαζί με τα ημιτονοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος (SEC). Αυτά τα κύτταρα είναι φίλτρο για παθογόνα του εντέρου που εισέρχονται από τη πυλαία φλέβα. Μάλιστα δεν περιορίζονται μόνο εκεί, παρέχουν μέσω της φαγοκυττάρωσης την εξολόθρευση επικίνδυνων ουσιών και κυκλοφορόντων παθογόνων. Είναι πολύ σημαντικά κύτταρα για το αίμα, λόγω της ομοιοστατικής λειτουργίας τους για το σίδηρο, και τον μεταβολισμό των λιπιδίων και της χοληστερόλης. Συγκεκριμένα για τον σίδηρο, αυτή η λειτουργία γίνεται με την εκκαθάριση των γερασμένων ερυθροκυττάρων, σε μια διαδικασία που λέγεται ερυθροφαγοκυττάρωση, και συνεχίζει με την ανακύκλωση του σιδήρου στην κυκλοφορία του αίματος για de novo ερυθροποίηση.^{64,66-68}

Άλλες πρωτεΐνες που παράγει το ήπαρ είναι η αίμη και η συνθάση του 5'-αμινολεβουλινικού οξέος 1 [5'-aminolevulinic acid synthase 1 (ALA-S 1)]. Η αίμη όπως έχει αναφερθεί είναι ένας δακτύλιος πορφυρίνης με σίδηρο και πρωτοπορφυρίνη. Η αίμη παράγεται και στο μυελό των οστών, σε μεγαλύτερο ποσοστό. Στο ήπαρ παράγεται από το ηπατοκύτταρο σε μικρότερο βαθμό, λόγω της βλάβης που μπορεί να προκαλέσει στα ηπατοκύτταρα. Η ALA-S είναι ένζυμο υπεύθυνο για την σύνθεση της αίμης στα ερυθροειδή κύτταρα (ALA-S2) και ήπαρ (ALA-S1).^{32,67,69}

2.1.1. Αντιοξειδωτική άμυνα του ήπατος και οι επιπτώσεις της οξειδωσης

Το ήπαρ, λόγω της αποτοξινωτικής και μεταβολικών λειτουργιών, είναι σημαντική πηγή ROS. Παράγονται μέσω μιτοχονδρίων με την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αλλά και από υπεροξεισώματα, οξειδάσες ξανθίνης, κυτόχρωμα P450 και οξειδάσες NADPH (NOX)⁶⁰.

Τα NOX είναι μια οικογένεια οξειδασών που χρησιμοποιούν NADPH και μοριακό οξυγόνο για την παραγωγή ρίζες υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) που γίνεται γρήγορα σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Υπάρχουν 7 πρωτεΐνες σε αυτήν την οικογένεια, οι NOX1-5 και οι διπλές οξειδάσες DUOX1-2. Όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας, πλην του NOX3, εκφράζονται σε διάφορα κύτταρα του ήπατος (σχήμα 9).



9. Απεικόνιση πηγών ROS, του ενζύμου NOX και το σηματοδοτικό μονοπάτι στα ηπατικά κύτταρα.
doi: 10.3390/antiox12091653

Η άμυνα του ήπατος από την οξείδωση βασίζεται σε διάφορες ουσίες. Τέτοιες ουσίες είναι ένζυμα όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), υπεροξειδάσες γλουταθειόνης των κυτοσολίων (GPX), ρεντουκτάσες γλουταθειόνης (GRX), υπεροξειρεδοξίνες (PRX), θειορεδοξίνες (TRX) και καταλάσες. Ο ρόλος των ενζυματικών αντιοξειδωτικών είναι ο μεταβολισμός των ROS.⁷⁰⁻⁷²

Η γλουταθειόνη, η χολερυθρίνη, το συνένζυμο Q10, το ουρικό οξύ και οι βιταμίνες A, C και E είναι μη ενζυματικές αντιοξειδωτικές ουσίες. Μάλιστα υπάρχουν αντιοξειδωτικές ουσίες που μέσω της πρόληψης τροφής που έχουν δειχθεί να βοηθάνε κατά του οξειδωτικού στρες. Ο ρόλος των μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών είναι η πρόληψη ή και η μετρίαση της οξειδωτικής ζημιάς. Συγκεκριμένα, λειτουργούν με την εξουδετέρωση των οξειδωτικών ουσιών.⁷⁰⁻⁷²

Το κυριότερο μονοπάτι σηματοδότησης είναι το μονοπάτι NFR2/ ARE. Το NFR2, ή αλλιώς πυρηνικός παράγοντας ερυθροειδούς 2- σχετιζόμενο παράγοντα 2, έχει κύριο ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης των αντιοξειδωτικών και αποτοξινωτικών γονιδίων. Ο παράγοντας υπό κανονικές συνθήκες είναι απομονωμένο στο κυτταρόπλασμα από τον υποδοχέα του, το Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Όταν τα κύτταρα συναντήσουν οξειδωτικές ουσίες, το Keap1 υπόκειται σε μορφολογικές τροποποιήσεις, με απότοκο την απελευθέρωση και την μετατόπισή του προς τον πυρήνα. Αυτή η σύνδεση γίνεται με στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης [antioxidant response element (AREs)], που βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων. Η σύνδεση NFR2/ ARE είναι η αφετηρία μεταγραφής κυτταροπροστατευτικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών ενζύμων.⁷²⁻⁷⁴

2.1.2. Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα του ήπατος

Παρόλη την συνεχόμενη έκθεση του ήπατος σε τοξίνες και σε μεταβολίτες, όπως είναι τα ROS, σε φυσιολογικές καταστάσεις τα επίπεδα τους παραμένουν σταθερά και σε μια ισορροπία. Η διαταραχή αυτής της ισορροπίας προς το οξειδωτικό στρες, είναι ένα αρχικό βήμα για παθολογικές καταστάσεις του ήπατος. Η διαταραχή μπορεί να προκληθεί από

παράγοντες όπως ιική λοίμωξη, διαβήτης, έκθεση του οργανισμού σε περιβαλλοντικές τοξίνες, βαρέα μέταλλα, ακτινοβολία UV, υπερβολική χρήση ναρκωτικών και αλκοόλ.^{72,75}

Στο οξειδωτικό στρες, επηρεάζονται αρκετά αμινοξέα, όπως η τυροσίνη, τρυπτοφάνη, ιστιδίνη και η κυστεΐνη, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι λειτουργίες, οι δομές των πρωτεϊνών και να είναι επιρρεπής σε πρωτεόλυση από τις πρωτεάσες.⁷⁶

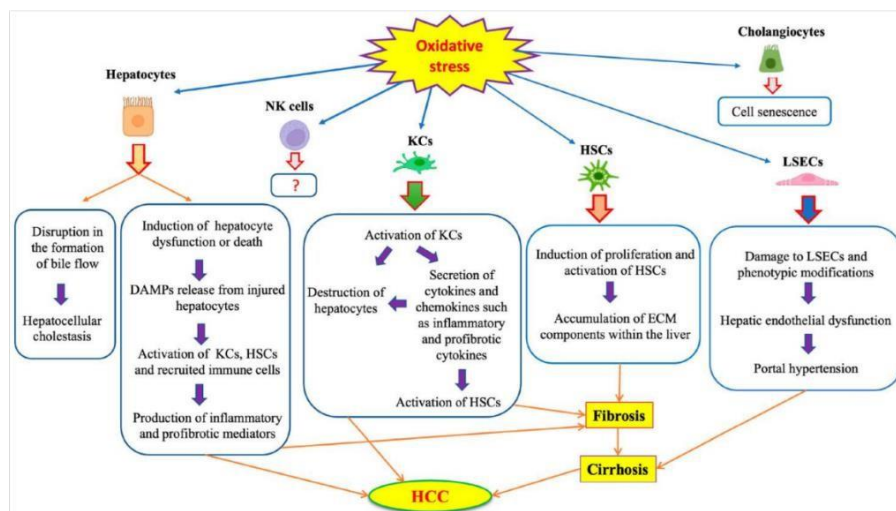
Μάλιστα το οξειδωτικό στρες έχει επιπτώσεις στα μιτοχόνδρια. Συγκεκριμένα, μειώνεται η παραγωγή ATP και μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, αλλαγή στο σύστημα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και βλάβη στο ίδιο το μιτοχονδριακό DNA.⁷⁶⁻⁷⁸

Στο ήπαρ, σχεδόν όλα τα κύτταρα επηρεάζονται από τα ROS. Συγκεκριμένα, τα αστεροειδή ηπατικά κύτταρα μέσω των ROS, υπόκεινται σε διαφοροποίηση σε μυοϊνοβλάστες. Οι μυοϊνοβλάστες οδηγούν στην έκκριση κολλαγόνου και σε χρόνιες καταστάσεις αυτό καταλήγει σε ηπατική ίνωση και ύστερα σε κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.^{79,80}

Τα κύτταρα Kupffer από μόνα τους παράγουν ROS, ως απόκριση σε ηπατοτοξίνες. Στο οξειδωτικό στρες εκφράζουν μια ποικιλία κυτοκινών και την επιστράτευση περισσότερων ανοσοποιητικών κυττάρων. Αυτή η αντίδραση προκαλεί την κατάρωση των ηπατοκυττάρων αλλά και την ενεργοποίηση των HSCs.⁸¹

Τα ηπατοκύτταρα στο οξειδωτικό στρες προκαλούν είτε την διακοπή του σχηματισμού χολής, που ως αποτέλεσμα οδηγεί σε ηπατοκυτταρική χολέσταση είτε στην δυσλειτουργία τους. Η δυσλειτουργία τους με τη σειρά τους, εκκρίνουν μόρια μοτίβα σχετιζόμενα με την κυτταρική ζημία [Damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs)]. Τέλος, τα μόρια ενεργοποιούν τα κύτταρα Kupffer και τα αστεροειδή ηπατικά κύτταρα και οδηγούν στο οίδημα του ήπατος.^{76,82}

Τα ημιτονοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος είναι πολύ ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες. Αυτό οφείλεται λόγω της μειωμένης ικανότητας εκκαθάρισης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η έκθεσή τους προκαλεί την έλλειψη αλληλοεπιδράσεων με μόρια, τα ηπατοκύτταρα και τα ημιτονοειδή του ήπατος.⁷⁶



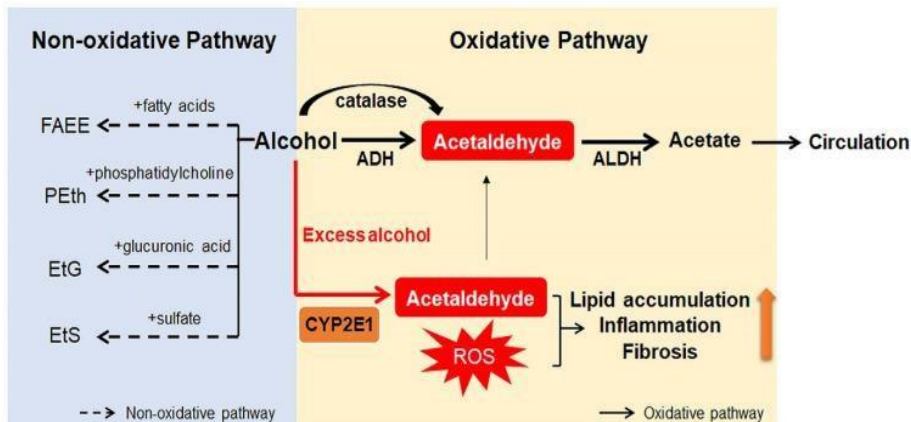
10 Εικόνα όπου περιγράφονται οι συνέπειες του οξειδωτικού στρες στο ήπαρ

<https://doi.org/10.3390%2Fantiox12091653>

2.1.3. Αλκοόλ και μεταβολισμός στο ήπαρ

Το αλκοόλ είναι μια ουσία που, επί το πλείστον, είναι βλαβερή και τοξική για τον οργανισμό. Τόσο βλαβερή που πάνω από 200 ασθένειες σχετίζονται με την συνεχή κατανάλωση αλκοόλ.

Το αλκοόλ που προσλαμβάνεται, απορροφάται από το στομάχι, το λεπτό και το παχύ έντερο. Παρόλα αυτά, η απέκκριση του γίνεται μόνο κατά 10% μέσω του ιδρώτα, της αναπνοής, και των ούρων. Με αυτόν τον τρόπο, το υπόλοιπο 90% καταλήγει στο ήπαρ από την πυλαία φλέβα.



11. Απεικόνιση των οξειδωτικών και μη οξειδωτικών μονοπατιών στον μεταβολισμό του αλκοόλ. Published online 2021 May 27. doi: 10.3390/ijms22115717

Το ήπαρ έχει δύο μονοπάτια για τον μεταβολισμό του αλκοόλ, τον οξειδωτικό, που είναι το κύριο μονοπάτι και τον μη οξειδωτικό, που είναι δευτερεύων μονοπάτι. Το οξειδωτικό μονοπάτι αρχίζει με την οξείδωση του σε ακεταλδεΐδη από το ένζυμο αλκοολική αφυδραγονάση [alcohol dehydrogenase (ADH)]. Σε περίπτωση υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ, γίνεται η έκφραση του κυτοχρώματος P450 2E1 (CYP2E1) και όχι της ADH. Το ένζυμο παράγει και αυτό ακεταλδεΐδη, με τη διαφορά ότι την παράγει μέσω ελεύθερων ριζών ROS. Το τοξικό κομμάτι στον μεταβολισμό του αλκοόλ είναι η ακεταλδεΐδη και βρίσκεται σε αυτό το βήμα

Το δεύτερο βήμα είναι η μετατροπή της ακεταλδεΐδης σε οξικό από το ένζυμο ακεταλδεΐδική αφυδραγονάση [aldehyde dehydrogenase (ALDH)]. Το οξικό τέλος, μεταβολίζεται σε διοξείδιο του άνθρακα, λιπαρά οξέα και νερό σε περιφερικούς ιστούς και όχι το ήπαρ.^{76,83}

2.2 Ηπατοπάθεια και η αλκοολική ηπατοπάθεια

Η ηπατοπάθεια, είναι η παθολογική λειτουργεία του ήπατος. Μερικά παραδείγματα από ηπατοπάθειες είναι, μη αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος. Έρευνα σε αυτή τη νόσο⁸⁴ δείχνει αλλαγές στα ερυθροκύτταρα όπως η αναλογία φωσφατιδυλοχολίνης προς φωσφατιδυλοεθανολαμίνη, γενική αλλαγή στη διαθεσιμότητα και δομή των λιπιδίων του ερυθροκύτταρο και αυξημένο RDW και την έκθεση της φωσφατυδυλοσερίνης στην επιφάνεια του ερυθροκυττάρου, λόγω της υψηλού σε λίπους δίαιτα και μεταβολικά σύνδρομα. Αυτό το γεγονός δείχνει κάποια σχέση μεταξύ της ηπατοπάθειας και της μεταβολής της ερυθροποίησης.

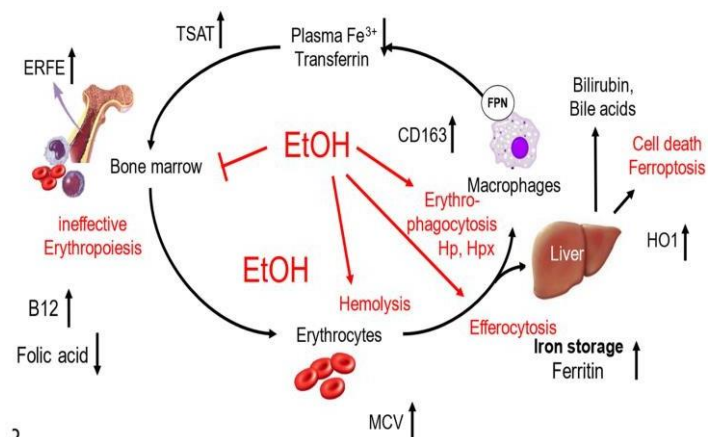
Μια άλλη έρευνα⁸⁵, πάλι βρίσκει αλλαγές στα ερυθροκύτταρα, αλλά σε νόσους όπως καρκίνο του ήπατος, ηπατική κίρρωση και ηπατίτιδες. Βρέθηκε αλλαγή στον αριθμό των ερυθροκυττάρων, με την ασθένεια να έχει διαφορετική συσχέτιση με το φυσιολογικό αριθμό.

Σε σχέση με την ερύπτωση των ερυθροκυττάρων, υπάρχουν 2 πρόσφατες έρευνες^{86,87}, που μελετούν την ερύπτωση σε περιπτώσεις ηπατοπάθειας. Τα αποτελέσματα που βγάζουν είναι αναιμία, λόγω του αυξημένου ρυθμού της ερύπτωσης.

Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα της εργασίας ασχολούνται με ένα είδος ηπατοπάθειας, την αλκοολική ηπατοπάθεια. Η αλκοολική ηπατοπάθεια προκαλείται από την υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ. Ο λόγος που το αλκοόλ προκαλεί αυτό το φαινόμενο έχει να κάνει με το μεταβολισμό της ουσίας που αναφέρθηκε παραπάνω, και συγκεκριμένα έχει να κάνει με την παρουσία της ακεταλδεΐδης. Η ακεταλδεΐδη, είναι καταστροφική ουσία για το γενετικό υλικό του DNA και προκαλεί τραύμα στον ιστό. Η μετατροπή της σε οξικό, γίνεται, σε καταστάσεις υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ, με τη βοήθεια των ROS. Αυτή η διαδικασία ωστόσο οδηγεί σε οξειδωτικό στρες.

Η αλκοολική ηπατοπάθεια σε σχέση με το αίμα έχει σχετιζόμενα δεδομένα, αλλά δεν έχει εξακριβωθεί αν το αλκοόλ είναι υπαίτιο για αυτά. Για παράδειγμα, άτομα με υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, εμφάνιζαν αιμολυτική αναιμία και είχαν μεγαλύτερα ερυθροκύτταρα με μεγαλύτερο μέσο όγκο ερυθρών. Μάλιστα έχουν παθολογικές μορφολογικές αλλαγές όπως εχνοκύτταρα, στοματοκύτταρα, ακανθοκύτταρα, και έχουν πρόωρα αφαιρεθεί από τα μακροφάγα του σπλήνα. Ως προς βιοχημικά δεδομένα, οι τιμές της φερριτίνης και LDH είναι αυξημένες, ενώ το φυλλικό οξύ είναι μειωμένο, και σε βιοψίες δείχνει να υπάρχουν συσσωρεύσεις σιδήρου σε μακροφάγα και ηπατοκύτταρα.⁸⁸⁻⁹²

Ένα από τα πιθανά μοντέλα είναι η εικόνα 12. Έτσι όπως δείχνει το EtOH, η αιθανόλη δηλαδή, παρεμβαίνει σε 3 σημεία. Το πρώτο είναι στην αιμοποίηση στο μυελό των οστών. Το δεύτερο σημείο είναι η αύξηση της ευθραστότητας των ερυθρών και τρίτο σημείο είναι στην ερυθροφαγοκυττάρωση και την εφεροκυττάρωση. Η διαφορά μεταξύ των δύο είναι ότι η ερυθροφαγοκυττάρωση είναι η εκκαθάριση μη αποδοτικών αιμοσφαιρίων σε αντίθεση με την εφεροκυττάρωση.⁹²



12. Απεικόνιση του μοντέλου του αλκοόλ και των επιπτώσεων στα ερυθρά αιμοσφαίρια. <https://doi.org/10.3390/biom14040404>

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1. Convergys X3 NG

Για τα πειράματα πρέπει να ξέρουμε κάποια αιματολογικά δεδομένα όπως ο αιματοκρίτης. Αυτή η διαδικασία γίνεται με τη βοήθεια του αυτόματο αιματολογικού αναλυτή Convergys x3 ng. Ο συγκεκριμένος αναλυτής μπορεί να κάνει αιματολογικές εξετάσεις και δίνει τιμές για τα λευκά, ερυθρά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια με τη χρήση 25μl ολικού αίματος για 22 συνολικά παραμέτρους.

3.1.2. Αναλυτικός ζυγός KERN ALJ 310-4A, αυτόματες πιπέτες και ρύγχη πιπέτας

Για τη δημιουργία των διαλυμάτων χρειάζεται η ζύγιση των υλικών, με σχετικά μεγάλη ακρίβεια. Ο συγκεκριμένος ζυγός έχει 4 δεκαδικά ψηφία ακρίβειας.

Όσο για τις πιπέτες και τα ρύγχη, λόγω των όγκων και την ακρίβεια που χρειάζονται, χρησιμοποιήθηκαν αυτόματες πιπέτες των όγκων 2-20μl, 20-200μl και 100-1000μl με τα αντίστοιχα ρύγχη

3.1.3. Κυτταρόμετρο ροής (Flow Cytometry), BD FACSCanto

Τα τέσσερα πειράματα γίνονται στο κυτταρόμετρο ροής. Το κυτταρόμετρο ροής εφευρέθηκε στα τέλη του 1960, είναι αρκετά ευέλικτο για πολλές χρήσεις λόγω της ποσοτικής και ποιοτικής ανάλυσης των κυττάρων.^{93,94}

Το κυτταρόμετρο αποτελείται από 3 βασικά μέρη. Τη μηχανική των ρευστών, την οπτική, και το ηλεκτρονικό σύστημα. Το ρυθμιστικό διάλυμα, περιέχει και υγρό για το περίβλημα (sheath fluid) και είναι υπό πίεση. Το υγρό είναι σημαντικό για την βέλτιστη ροή των κυττάρων, έτσι ώστε να διαπερνούν τα λέιζερ ένα προς ένα, για την ακριβή μέτρηση και σωστά αποτελέσματα. Για τα οπτικά συστήματα του κυτταρομέτρου, αποτελείται από λέιζερ, που παράγουν ορατό και φθορίζων φως και αισθητήρες που θα μετρήσουν το σήμα που παράγεται. Συγκεκριμένα, όταν θα περάσει το κύτταρο μπροστά από τη πηγή φωτός, το κύτταρο, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του θα διαχέει το φως διαφορετικά. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι το μέγεθος και τα κοκκίδια που έχει. Το φως που θα διαχυθεί σε γωνία 0° θα δείξει το μέγεθος ενώ η διάχυση που θα γίνει σε 90° θα είναι η κοκκίωση του κυττάρου. Τέλος το ηλεκτρονικό σύστημα αποτελείται από ένα μηχάνημα το οποίο θα αναλύσει το σήμα και θα εξαγάγει όλη την πληροφορία και θα την απεικονίσει σε μορφή διαγραμμάτων και τιμών στους χρήστες.⁹³

Με την πάροδο του χρόνου, η τεχνολογία έχει εξελιχθεί με τη βοήθεια περισσότερων λέιζερ, με την ένταξη άλλων τεχνολογιών όπως η φασματομετρία μάζας και η ένταξη διαλυμάτων όπως φθοριοχρώματα και αντισώματα. Με αυτές τις μεθόδους και έχει βρει την χρήση του σε διάφορους τομείς όπως η ανοσολογία και την βιολογία του καρκίνου. Συγκεκριμένα σε αυτούς τους 2 τομείς, χρήσιμη είναι η ιδιότητα του κυτταρομέτρου να μπορεί να ταξινομήσει και αναλύσει μικτούς πληθυσμούς κυττάρων. Μια τέτοια περίπτωση είναι στο αίμα, με τη πληθώρα από διάφορα κύτταρα.^{93,94}

Στα πειράματα της εργασίας, το κυτταρόμετρο BD FACSCanto II χρησιμοποιείται για την ανάλυση ορισμένων παραμέτρων στα ερυθροκύτταρα. Τέτοιες παράμετροι είναι αποπτωτικοί δείκτες στην επιφάνεια του ερυθροκυττάρου, η ποσότητα ενδοκυττάρου

ασβεστίου, η σύσταση φωσφολιπιδίων της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου και η μέτρηση ερυθρών αιμοσφαιρίων που έχουν υποστεί ζημία λόγω των ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Αυτό είναι εφικτό με τη χρήση ορισμένων διαλυμάτων που θα αναλυθούν παρακάτω.

3.1.4. Διαλύματα

Για τα 4 πειράματα υπάρχουν πολλά διαλύματα τα οποία τα φτιαχτήκανε στο εργαστήριο και αντιδραστήρια τα οποία είναι προμηθευμένα. Παρακάτω στο πίνακα αναγράφονται τα διαλύματα (Πίνακας 1)

Όνομα διαλύματος/Ουσίας	Περιγραφή του διαλύματος
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών [Phosphate Buffered saline (PBS)]	Διάλυμα για την πλύση των ερυθρών, διαλύτης για άλλα διαλύματα
PBS-γλυκόζη 1%	Διάλυμα PBS το οποίο προστίθεται γλυκόζη. Χρήση ως διαλύτης.
Αλβουμίνη ορού από βοειδή [Bovine Serum Albmin (BSA)]	Διαλύεται σε PBS-glucose 1%, σε περιεκτικότητα 0.1% w/v. Βοηθάει στον κορεσμό περιττών σημείων πρόσδεσης πρωτεϊνών ⁹⁵
Διοξική Διχλωροδιυδροφθοροσκεΐνη [dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)]	Φθορίζων ουσία που διαλύεται στο διάλυμα PBS-glucose-BSA. Μέσω του φθορίζοντος χρώματος βοηθάει στην εντόπιση ROS ⁹⁶
Αντι-IgG διάλυμα με 5-ισοθειοκυανική φθορορεσκεΐνη [Fluorescein isothiocyanate (FITC)]	Διάλυμα το οποίο περιέχει φθοριόχρωμα προσδεμένο σε αντίσωμα αντι-IgG.
Διάλυμα με αντι-ανθρώπινο CD235a προερχόμενο από ποντικό, με αλλοφυκοκυανίνης ή 5-ισοθειοκυανική φθορορεσκεΐνη [Allophycocyanin (APC) or Fluorescein isothiocyanate (FITC) Mouse Anti-Human CD235a]	Η APC, η αλλιώς αλλοφυκοκυανίνη είναι ένα φθοριόχρωμα και αυτή ή η FITC είναι προσδεμένη σε αντίσωμα αντι-γλυκοφορίνης A ⁹⁷
Ρυθμιστικό διάλυμα Φυκοερυθρίνης Αννεξίνης 5 [Re-Phycoerythrin (PE) annexin v buffer]	Η PE είναι μια χρώση και η αννεξίνη είναι μια πρωτεΐνη που έχει την ικανότητα να προσδένει στην φωσφατοδυλοσερίνη. ⁹⁸

3.2. Μέθοδοι

Αρχικά έγιναν οι γενικές αίματος τους για την αναγνώριση βασικών παραμέτρων όπως ο αιματοκρίτης. Ύστερα γίνονται τα παρακάτω πειράματα

3.2.1. Πρωτόκολλο Ανίχνευσης ROS και Ca

Το πείραμα αρχικά ασχολείται με την τοποθέτηση ολικού αίματος σε μια διαδικασία όπου θα γίνει αφαίρεση των λευκών και του πλάσματος έτσι ώστε να υπάρχουν μόνο τα ερυθρά, δηλαδή αφαίρεση του υπερκείμενου. Ύστερα ακολουθεί πλύση με PBS και φυγοκέντρηση για την εκκαθάριση του δείγματος από τυχόν απομεινάρια πλάσματος και λευκών και ξανά αφαίρεση του υπερκείμενου. Έτσι θα καταλήξουμε με αίμα γνωστής

συγκέντρωσης αιματοκρίτη (40% HCT). Για τα 2 πειράματα θα χρειαστούμε 4% άρα θα γίνει μια αραίωση 1/10 με PBS.

Τα επόμενα βήματα έχουν να κάνουν με την δημιουργία διαλυμάτων για μέτρηση στο κυτταρόμετρο. Θα φτιαχτούν ένα τυφλό και ένα διάλυμα για κάθε δείγμα. Το τυφλό θα περιέχει PBS-glucose, BSA και δείγμα, ενώ στο άλλο διάλυμα θα μπει και DCFDA. Όλα τα διαλύματα θα ανακινηθούν σε κλίβανο και μετά θα πάρουμε συγκεκριμένη ποσότητα από το κάθε διάλυμα και θα τοποθετηθούν σε σωληνάριο κυτταρομετρίας με PBS-glucose-BSA.

3.2.2. Πρωτόκολλο Ανίχνευσης IgG

Για το πείραμα αυτό θα χρειαστούμε δείγματα τα οποία έχουν αραιωθεί 1/10 με ισότονο PBS. Το αραιωμένο αίμα θα μπει σε σωληνάριο κυτταρομετρίας με PBS, FITC και CD235-APC. Ως τυφλό θα χρησιμοποιηθεί ίδιο διάλυμα που δεν θα έχει το CD235-APC. Τέλος θα γίνει επώαση στο σκοτάδι και θα γίνει η μέτρηση στο κυτταρόμετρο ύστερα από προσθήκη PBS.

3.2.3. Πρωτόκολλο Ανίχνευσης Φωσφατιδυλοσερίνης

Για το πείραμα αυτό θα χρειαστούμε πάλι δείγματα τα οποία έχουν αραιωθεί 1/10 με ισότονο PBS. Το αραιωμένο αίμα ύστερα θα τοποθετηθεί σε σωληνάριο κυτταρομετρίας μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα ανεξίνης-BSA, annexin-PE και CD235-FITC. Για τυφλό θα χρησιμοποιηθεί παρόμοιο διάλυμα χωρίς το CD235-FITC. Θα ακολουθήσει επώαση στο σκοτάδι και τέλος γίνεται πρόσθεση ποσότητας ανεξίνης-BSA για την μέτρηση στο κυτταρόμετρο

4. Αποτελέσματα

Τα πειράματα έγιναν με σύνολο δειγμάτων 15. Από τα 15, τα 9 είναι οι ασθενείς με αλκοολική ηπατοπάθεια και τα άλλα 6 είναι η ομάδα ελέγχου (control group). Οι ηλικίες κυμαίνονται από 23-92 ετών με μέση ηλικία να είναι το 45, και συγκεκριμένα οι μάρτυρες έχουν μέση ηλικία τα 40 έτη ενώ οι ασθενείς έχουν μέση ηλικία 50. Σε σχέση με το φύλο, τα δείγματα αποτελούνται από 12 άντρες και 3 γυναίκες, με 8 άντρες και 1 γυναίκα να είναι οι ασθενείς ενώ 4 άντρες και 2 γυναίκες να είναι στην ομάδα ελέγχου.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με Mann Whitney test, μη παραμετρική, ασύζευκτη με το πρόγραμμα SPSS Statistics, και τα γραφήματα με το πρόγραμμα GraphPad Prism 8.0.3. Θεωρούμε στατιστικά σημαντικά δεδομένα με p-value να είναι μικρότερο του 0,05. Η επιλογή αυτή έγινε λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων, ο πληθυσμός δεν είναι ομοιόμορφα κατανομημένος, και τέλος επειδή οι τιμές είναι συνεχής.⁹⁹

4.1. Αποτελέσματα από γενικές αίματος

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

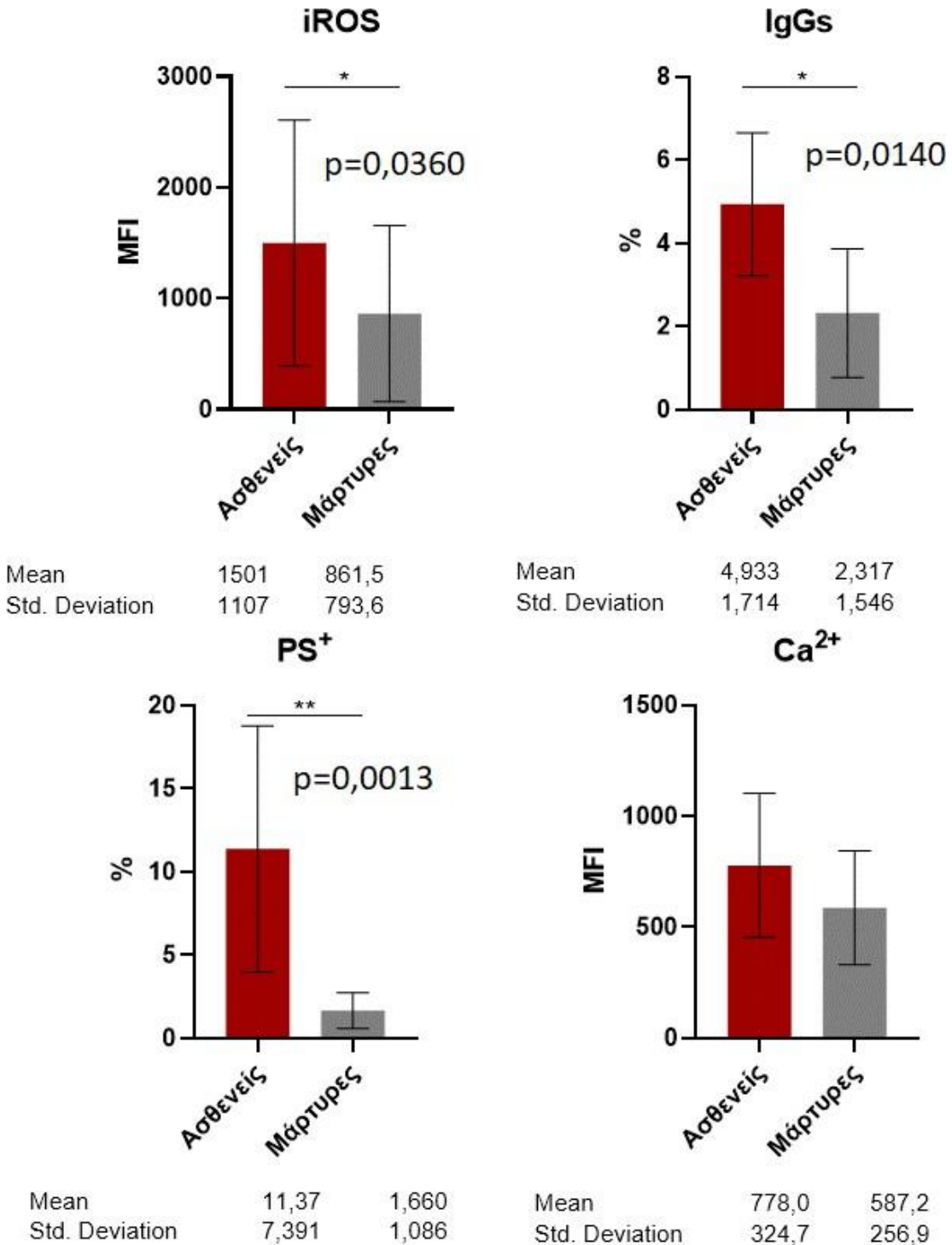
Τα δεδομένα των 2 ομάδων δείχνουν να έχουν κάποιες διαφορές. Σε γενικές γραμμές οι ασθενείς έχουν αυξημένα λευκά, μειωμένα ερυθρά και μειωμένα αιμοπετάλια συγκεκριμένα, με βάση των παραπάνω πίνακα (Πίνακας 2):

- Μειωμένα λεμφοκύτταρα (LYM), μέση τιμή κάτω του φυσιολογικού ($\mu=1,17$), σε σχέση με τη κατώτατη φυσιολογική τιμή (1,3) και τη μέση τιμή της ομάδας ελέγχου ($\mu=2,12$)
- Μειωμένα ερυθρά (RBC), με μέση τιμή $\mu=2,88$, κάτω του φυσιολογικού, ενώ η κατώτατη τιμή είναι ίση με 4,2 και η ομάδα ελέγχου έχει μέση τιμή $\mu=4,59$
- Μειωμένη αιμοσφαιρίνη (HGB), με 9,7 να είναι η μέση τιμή των ασθενών, 12 η κατώτατη φυσιολογική τιμή και 13,25 να είναι η μέση τιμή της ομάδας ελέγχου
- Αυξημένη μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (MCH), με μέση τιμή των ασθενών να είναι ίση με 35,7, ενώ η ανώτατη φυσιολογική τιμή είναι ίση με 31,0 και ο μέσος όρος της ομάδας ελέγχου να είναι ίση με 28,4
- Αυξημένο εύρος κατανομής ερυθρών (RDW) στους ασθενείς ($\mu=19,4$), παραπάνω από την ανώτατη φυσιολογική τιμή του (14,5) και τη μέση τιμή της ομάδας ελέγχου ($\mu=17,7$)
- Στον αριθμό αιμοπεταλίων (PLT) παρατηρείται μειωμένη μέση τιμή στους ασθενείς με μέση τιμή=74,6, κάτω του φυσιολογικού (κατώτατη φυσιολογική τιμή=130) και της ομάδας ελέγχου, που η μέση τιμή=161

- Τέλος, ο αιμοπεταλιοκρίτης των ασθενών είναι κάτω του φυσιολογικού με μέση τιμή ($\mu=0,1$) κάτω του φυσιολογικού (κατώτατη φυσιολογική τιμή=0,16) και της ομάδας ελέγχου ($\mu=0,13$)

4.2 Αποτελέσματα από τα πειράματα

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις είναι μαζεμένα στην Εικόνα 13:



Με βάση την παραπάνω εικόνα έχουμε τα εξής αποτελέσματα:

- Ros: Το διάγραμμα απεικονίζει τη μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity) μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Παρατηρείται ότι οι ασθενείς έχουν υψηλότερη μέση τιμή (1501) από τους μάρτυρες (861,5) και p-value να είναι 0,0360.
- IgG: Στο διάγραμμα απεικονίζεται το ποσοστό των αντισωμάτων στους ασθενείς και των μαρτύρων. Πάλι οι ασθενείς δείχνει να έχουν μεγαλύτερο ποσοστό αντισωμάτων κατά μέσο όρο (4,93%) ενώ οι μάρτυρες έχουν λιγότερο (2,31%) με p-value να είναι ίσο με 0,014
- Φωσφατιδυλοσερίνη (PS): Στο διάγραμμα φαίνονται τα ποσοστά φωσφατιδυλοσερίνης σε ασθενείς και σε μάρτυρες. Για άλλη μια φορά οι ασθενείς έχουν μεγαλύτερο ποσοστό φωσφατιδυλοσερίνης στο εξωτερικό της μεμβράνης τους με αυτό το ποσοστό να έχει μέσο όρο 11,37%, σε αντίθεση με τους μάρτυρες να έχουν κατά μέσο όρο μόνο 1,660%. Η p-value είναι ίση με 0,0013
- Ασβέστιο (Ca^{+2}): Τέλος το διάγραμμα του ασβεστίου έχει συγκεντρωμένα την μέση ένταση φθορισμού των ασθενών και των μαρτύρων. Σε αυτό το πείραμα δεν φαίνεται να υπάρχει αρκετά μεγάλη διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων, εξού και δεν υπάρχει κάποια p-value

5. Συζήτηση

Η εργασία αυτή άρχισε με σκοπό να βρεθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ των ερυθρών αιμοσφαιρίων και της ηπατοπάθειας. Συγκεκριμένα για την οξειδωση και τους δείκτες κυτταρικής εκκαθάρισης όπως η φωσφατιδυλοσερίνη, ο οψωνισμός, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και το εσωκυττάριο ασβέστιο.

Τα δεδομένα δείχνουν να έχουν κάποια σχέση μεταξύ τους. Συγκεκριμένα οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και τα ποσοστά αντισωμάτων IgG για τον οψωνισμό έχουν p-value κάτω του 0,05. Μάλιστα το ποσοστό της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων έχει ακόμα πιο μικρή τιμή p-value, μικρότερη του 0,01 και είναι πολύ κοντά στο 0,001. Από την άλλη ωστόσο το ασβέστιο που υπάρχει στα ερυθροκύτταρα δεν φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντικό για το πείραμα αυτό.

Μπορούμε να πούμε ότι ναι, η ηπατοπάθεια έχει μεγάλη επιρροή στα ερυθροκύτταρα, και λόγω των δειγμάτων θα μπορούσαμε να πούμε ότι ακόμη και το αλκοόλ προκαλεί αλλαγές. Τα αποτελέσματα από τη μια είναι αναμενόμενα να δείξουν κάποια σχέση, λόγω της μεγάλης σχέσης μεταξύ του αίματος και του ήπατος και της βιβλιογραφίας για τη σχέση μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, τα αιματολογικά δεδομένα, η μείωση των ερυθροκυττάρων, η μειωμένη αιμοσφαιρίνη αλλά η υψηλή περιεκτικότητα των ερυθρών σε αιμοσφαιρίνη είναι δείκτης αναιμίας. Αυτό συμβαίνει παρόλη την έλλειψη σιδήρου και ερυθροκυττάρων, λόγω του πολύ χαμηλότερου πληθυσμού ερυθροκυττάρων στους ασθενείς. Αυτά είναι μια τυπική εικόνα αναιμίας.

Ως προς τα πειραματικά δεδομένα, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ήταν αναμενόμενο να ήταν υψηλότερες στους ασθενείς. Αυτό μπορεί να αιτιολογηθεί από την συνεχή έκθεση σε οξειδωτικό στρες, με μια από τις οξειδωτικές ουσίες να είναι το αλκοόλ και μια άλλη ο ελεύθερος σίδηρος, να κάνουν βλάβη στο ήπαρ που παράγει αντιοξειδωτικές ουσίες. Αυτό

έχει απότοκο να αλλάζει η ισορροπία και να μην μπορεί να αντισταθμίσει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και να καταλήγει στο τέλος και πάνω στα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Αναλυτικότερα, στα πειραματικά δεδομένα, το ποσοστό φωσφατιδυλοσερίνης, κυτταρικός δείκτης απόπτωσης ήταν αναμενόμενο να είναι υψηλότερο στους ασθενείς. Η εξήγηση βασίζεται στο γεγονός ότι τα άτομα με ηπατοπάθεια έχουν υψηλό εύρος κατανομής (RDW). Συγκεκριμένα, εφόσον τα ερυθροκύτταρα των ασθενών φαίνεται να είναι είτε πολύ μικρά είτε πολύ μεγάλα, δηλαδή μια εικόνα μακροκυτταρικής αναιμίας, από τη συνεχή έκθεση σε οξειδωτικό στρες, αυτό έχει και επίπτωση στο προσδόκιμο ζωής των κυττάρων, άρα και στην ποιότητα της πλασματικής μεμβράνης, δηλαδή της σύστασης της εξωτερικά από φωσφατιδυλοσερίνη.

Μάλιστα, εφόσον το οξειδωτικό στρες αυξάνει την κυτταρική απόπτωση, αναμενόμενο θα ήταν και η ποσότητα IgGs στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, που μέσω των αντισωμάτων αυτών θα γίνει η εφεροκυττάρωση, να είναι υψηλότερα στα άτομα με ηπατοπάθεια.

Από την άλλη πλευρά, θα περιμέναμε ότι και το ενδοκυττάριο ασβέστιο θα έχει κάποια σχέση με την ηπατοπάθεια. Αυτό μπορεί να γίνεται λόγω του φαινομένου ότι δεν φαγοκυτταρώνονται μόνο τα αποπτωτικά ερυθροκύτταρα αλλά και τα μη αποπτωτικά μέσω της ερυθροφαγοκυττάρωσης, στο ήπαρ. Μια άλλη πιθανότητα θα ήταν ότι τα αποπτωτικά κύτταρα στους ηπατοπαθείς δεν θα κάνουν απόπτωση μέσω του ασβεστίου αλλά μέσω των άλλων δίοδων, δηλαδή των ROS και του ανοσοποιητικού από τη φωσφατιδυλοσερίνη και τα αντισώματα.

Αυτά τα δεδομένα θα μπορέσουν να γίνουν βάση για άλλες έρευνες. Αυτό μπορούμε να το υποθέσουμε λόγω της έλλειψης εκτενούς βιβλιογραφίας σε αυτά τα θέματα σε συνδυασμό με τέτοια δεδομένα. Η βιβλιογραφία ^{46,60,75,78,80,100} δεν έχει την αλκοολική ηπατοπάθεια σε συνδυασμό με την ερυθροκυτταρική απόπτωση, αλλά μόνο μιλάνε για την αναιμία και το οξειδωτικό στρες σε συνάρτηση με τα ερυθροκύτταρα.

Τα πειράματα ωστόσο είχαν αρκετούς περιορισμούς. Αρχικά θα πρέπει να αναφέρουμε τον αριθμό των ατόμων που πήραν μέρος σε αυτό που είναι μικρός. Ένα άλλο θέμα έχει να κάνει με το φύλο, που κατά πλειοψηφία ήταν άντρες στους ασθενείς ενώ οι γυναίκες ήταν πιο πολύ μάρτυρες. Για αυτό μιλάμε πιο πολύ για την σωστή αντιπροσώπηση και των 2 φύλων και στις 2 ομάδες. Τέλος θα πρέπει να αναφέρουμε και το εύρος ηλικιών των συμμετεχόντων, η μέση ηλικία των μαρτύρων ήταν πιο νέοι εκτός από ένα, ενώ οι ασθενείς έχουν κατά μέσο όρο μεγαλύτερη ηλικία. Αυτό μπορεί να θεωρηθεί περιορισμός λόγω της έλλειψης αντιπροσώπησης νέων, σε ηλικία, ασθενών και μεγαλύτερων ατόμων που είναι πιο κοντά στο μέσο όρο των ασθενών να είναι στην ομάδα ελέγχου.

Παρόλα αυτά πιστεύω ότι με την ένταξη παραπάνω ατόμων με βάση τα παραπάνω στα πειράματα, δε θα άλλαζε την συσχέτιση αλλά θα την εδραίωνε περαιτέρω ειδικά με περαιτέρω πειράματα. Η έρευνα θα μπορούσε να επεκταθεί και σε πρακτικές εφαρμογές, όπως η φαρμακολογία για την εύρεση πιθανών φαρμάκων για την αντιμετώπιση των μηχανισμών της ηπατοπάθειας και όχι απλά μείωση των συμπτωμάτων, στην ιατρική ως περαιτέρω ιατρικές εξετάσεις για την ένδειξη αναιμίας για παράδειγμα. Μία άλλη

εφαρμογή θα ήταν σε άλλες έρευνες όπου θα επεκτεινόταν και άλλοι παράμετροι όπως για παράδειγμα η μικροσκόπηση των δειγμάτων, ο έλεγχος άλλων κυτταρικών μονοπατιών απόπτωσης, η επίδραση που έχει η αλκοολική ηπατοπάθεια στα λευκά αιμοσφαίρια και στα αιμοπετάλια έτσι ώστε να βρεθεί και ένας καθορισμένος μηχανισμός για το πως επιδρά το αλκοόλ τελικά στο αίμα.

Μελλοντικές έρευνες θα πρέπει προσέχουν στην καλύτερη αντιπροσώπευση του γενικού πληθυσμού, με μεγαλύτερη πληθώρα δειγμάτων και θα ήταν καλό η συνεργασία με διάφορους φορείς, όπως νοσοκομεία και κέντρα απεξάρτησης για την επέκταση των πιθανών ατόμων σε έρευνες. Επίσης, ελπίζουμε ότι αυτά τα δεδομένα να φανούν χρήσιμα σε οποιαδήποτε μελλοντική προσπάθεια και ως καταλήξουν να είναι περιττά.

6. Συμπεράσματα

Με αυτά τα δεδομένα μπορούμε να πούμε ότι η ηπατοπάθεια έχει επιρροή στα ερυθροκύτταρα, ως προς το προσδόκιμο ζωής τους και την ποιότητα τους, και ειδικά με το παράγοντα του αλκοόλ να ενσωματώνεται μέσα σε όλα αυτά. Τα πειράματα μέσω του κυτταρομέτρου θεωρούμε ότι για το σκοπό της εργασίας ήταν τα πιο αξιόπιστα και ακριβή, εφόσον δεν υπήρχαν προηγούμενα δεδομένα. Συγκεκριμένα, χωρίς το κυτταρόμετρο και τις ήδη υπάρχοντες μεθόδους, η εύρεση και εφαρμογή μιας νέας θα προκαλούσε περισσότερα προβλήματα αντί να βοηθήσει το σκοπό της εργασίας.

Τα αποτελέσματα δείχνουν στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα ROS και το ποσοστό αντισωμάτων IgG, και στατιστικά πολύ σημαντικά το ποσοστό φωσφατιδυλοσερίνης, ενώ στατιστικά σημαντικά δεν ήταν τα επίπεδα ασβεστίου στο εσωτερικό των ερυθροκυττάρων

Οι γνώσεις που πηγάζουν από τα πειράματα είναι ακόμη σε πρώιμο στάδιο, εφόσον δεν υπάρχει επαρκής και πρόσφατη βιβλιογραφία. Ωστόσο με αυτήν την έρευνα είναι εφικτό να αρχίσουν και άλλες παρεμφερείς έρευνες όπως αναφέραμε παραπάνω, για την κατανόηση των μηχανισμών της ηπατοπάθειας και την πρακτική τους εφαρμογή.

Βιβλιογραφία

1. Minetti G, Campbell R, Barshtein G, et al. Red Blood Cells: Chasing Interactions. Published online 2019. doi:10.3389/fphys.2019.00945
2. Kuhn V, Diederich L, Keller TCS, et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxid Redox Signal*. 2017;26(13):718-742. doi:10.1089/ars.2016.6954
3. Minetti G, Campbell R, Barshtein G, et al. Red Blood Cells: Chasing Interactions. Published online 2019. doi:10.3389/fphys.2019.00945
4. Lee AS, Persoff J, Lange SM. Liver Function Tests. *Mayo Clinic Medical Manual*. Published online July 30, 2023:373-387. doi:10.1201/b14283-48
5. Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, Tuma F. Physiology, Liver. *StatPearls*. Published online May 1, 2023. Accessed June 20, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>
6. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Current Biology*. 2017;27(21):R1147-R1151. doi:10.1016/j.cub.2017.09.019
7. Trejo-Soto C, Lázaro GR, Pagonabarraga I, Hernández-Machado A. Microfluidics Approach to the Mechanical Properties of Red Blood Cell Membrane and Their Effect on Blood Rheology. *Membranes 2022, Vol 12, Page 217*. 2022;12(2):217. doi:10.3390/MEMBRANES12020217
8. Chen M, Leng Y, He C, et al. Red blood cells: a potential delivery system. *J Nanobiotechnology*. 2023;21(1):288. doi:10.1186/S12951-023-02060-5
9. Fraser M, Matuschewski K, Maier AG. The enemy within: lipid asymmetry in intracellular parasite–host interactions. *Emerg Top Life Sci*. 2023;7(1):67. doi:10.1042/ETLS20220089
10. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. 2008;112(10):3939-3948. doi:10.1182/BLOOD-2008-07-161166
11. Satchwell TJ, Toye AM. Band 3, an essential red blood cell hub of activity. *Haematologica*. 2021;106(11):2792. doi:10.3324/HAEMATOL.2021.278643
12. Hsu K. Exploring the potential roles of band 3 and aquaporin-1 in blood CO₂ transport-inspired by comparative studies of glycophorin B-A-B hybrid protein GP. *Mur. Front Physiol*. 2018;9(JUN):379497. doi:10.3389/FPHYS.2018.00733/BIBTEX
13. Chow PH, Cox CD, Pei J V., et al. Inhibition of the Aquaporin-1 Cation Conductance by Selected Furan Compounds Reduces Red Blood Cell Sickling. *Front Pharmacol*. 2022;12:794791. doi:10.3389/FPHAR.2021.794791/BIBTEX
14. Guizouarn H, Allegrini B. Erythroid glucose transport in health and disease. *Pflugers Arch*. 2020;472(9):1371-1383. doi:10.1007/S00424-020-02406-0
15. Vijay N, Morris ME. Role of Monocarboxylate Transporters in Drug Delivery to the Brain. *Curr Pharm Des*. 2014;20(10):1487. doi:10.2174/13816128113199990462
16. Dean L. The Kidd blood group. Published online 2005. Accessed June 25, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2272/>

17. Lawicki S, Covin RB, Powers AA. The Kidd (JK) Blood Group System. *Transfus Med Rev.* 2017;31(3):165-172. doi:10.1016/J.TMRV.2016.10.003
18. Quraishy N, Sapatnekar S. Advances in Blood Typing. *Adv Clin Chem.* 2016;77:221-269. doi:10.1016/BS.ACC.2016.06.006
19. Costa TGF, Oliveira MM, Toledo MM, et al. Effect of Fe³⁺ on Na,K-ATPase: Unexpected activation of ATP hydrolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2022;1864(4):183868. doi:10.1016/J.BBAMEM.2022.183868
20. Krebs J. The plasma membrane calcium pump (PMCA): Regulation of cytosolic Ca²⁺, genetic diversities and its role in sub-plasma membrane microdomains. *Adv Exp Med Biol.* 2017;981:3-21. doi:10.1007/978-3-319-55858-5_1/FIGURES/3
21. Cali T, Brini M, Carafoli E. The PMCA pumps in genetically determined neuronal pathologies. *Neurosci Lett.* 2018;663:2-11. doi:10.1016/J.NEULET.2017.11.005
22. Vallese F, Kim K, Yen LY, et al. Architecture of the human erythrocyte ankyrin-1 complex. *Nat Struct Mol Biol.* 2022;29(7):706. doi:10.1038/S41594-022-00792-W
23. RHAG Rh associated glycoprotein [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Accessed June 25, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6005>
24. Liu J, Ding C, Liu X, Kang Q. Cytoskeletal Protein 4.1R in Health and Diseases. *Biomolecules.* 2024;14(2). doi:10.3390/BIOM14020214
25. ADD1 - Alpha-adducin - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt. Accessed June 26, 2024. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P35611/entry#function>
26. Li S, Liu T, Li K, et al. Spectrins and human diseases. *Translational Research.* 2022;243:78-88. doi:10.1016/J.TRSL.2021.12.009
27. Li N, Chen S, Xu K, et al. Structural basis of membrane skeleton organization in red blood cells. *Cell.* 2023;186(9):1912-1929.e18. doi:10.1016/J.CELL.2023.03.017
28. Krüger-Genge A, Jung F, Küpper JH, Lehmann C, Franke RP. Actin type and distribution in erythrocytes. *J Cell Biotechnol.* 2018;3(2):81-83. doi:10.3233/JCB-179014
29. Pasini EM, Lutz HU, Mann M, Thomas AW. Red blood cell (RBC) membrane proteomics--Part I: Proteomics and RBC physiology. *J Proteomics.* 2010;73(3):403-420. doi:10.1016/J.JPROT.2009.06.005
30. Aoki T. A Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins. *Membranes (Basel).* 2017;7(4). doi:10.3390/MEMBRANES7040056
31. Richardson SR, O'Malley GF. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *StatPearls.* Published online September 26, 2022. Accessed June 26, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470315/>
32. Farid Y, Bowman NS, Lecat P. Biochemistry, Hemoglobin Synthesis. *StatPearls.* Published online May 1, 2023. Accessed June 27, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536912/>
33. Fermo E, Bogdanova A, Petkova-Kirova P, et al. 'Gardos Channelopathy': a variant of hereditary Stomatocytosis with complex molecular regulation. *Scientific Reports 2017 7:1.* 2017;7(1):1-13. doi:10.1038/s41598-017-01591-w

34. Han H, Rim YA, Ju JH. Recent updates of stem cell-based erythropoiesis. *Human Cell* 2023 36:3. 2023;36(3):894-907. doi:10.1007/S13577-023-00872-Z
35. Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis: Development and Differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(4). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A011601
36. Ebdon C, Batty P, Smith G. Haematopoiesis and red blood cells. *Surgery (Oxford).* 2010;28(6):248-253. doi:10.1016/J.MPSUR.2010.02.006
37. Lee EM, Choi HS, Hwang JH, Hoh JK, Cho YH, Baek EJ. The RNA in reticulocytes is not just debris: It is necessary for the final stages of erythrocyte formation. *Blood Cells Mol Dis.* 2014;53(1-2):1-10. doi:10.1016/J.BCMD.2014.02.009
38. Ovchynnikova E, Aglialoro F, von Lindern M, van den Akker E. The shape shifting story of reticulocyte maturation. *Front Physiol.* 2018;9(JUL):369100. doi:10.3389/FPHYS.2018.00829/BIBTEX
39. Stevens-Hernandez CJ, Bruce LJ. Reticulocyte Maturation. *Membranes (Basel).* 2022;12(3):311. doi:10.3390/MEMBRANES12030311
40. Corrons JLV, Casafont LB, Frasnado EF. Concise review: how do red blood cells born, live, and die? *Ann Hematol.* 2021;100(10):2425-2433. doi:10.1007/S00277-021-04575-Z/FIGURES/9
41. Badior KE, Casey JR. Molecular mechanism for the red blood cell senescence clock. *IUBMB Life.* 2018;70(1):32-40. doi:10.1002/IUB.1703
42. Möller MN, Orrico F, Villar SF, et al. Oxidants and Antioxidants in the Redox Biochemistry of Human Red Blood Cells. *ACS Omega.* 2022;8:147-168. doi:10.1021/ACSOMEGA.2C06768/ASSET/IMAGES/LARGE/AO2C06768_0004.JPEG
43. Gwozdziński K, Pieniazek A, Gwozdziński L. Reactive Oxygen Species and Their Involvement in Red Blood Cell Damage in Chronic Kidney Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021. doi:10.1155/2021/6639199
44. Liu J, Han X, Zhang T, Tian K, Li Z, Luo F. Reactive oxygen species (ROS) scavenging biomaterials for anti-inflammatory diseases: from mechanism to therapy. *Journal of Hematology & Oncology* 2023 16:1. 2023;16(1):1-34. doi:10.1186/S13045-023-01512-7
45. Kuhn V, Diederich L, Stevenson Keller TC, et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. doi:10.1089/ars.2016.6954
46. Orrico F, Laurance S, Lopez AC, et al. Oxidative Stress in Healthy and Pathological Red Blood Cells. *Biomolecules* 2023, Vol 13, Page 1262. 2023;13(8):1262. doi:10.3390/BIOM13081262
47. Dreischer P, Duszenko M, Stein J, Wieder T. Eryptosis: Programmed Death of Nucleus-Free, Iron-Filled Blood Cells. *Cells.* 2022;11(3). doi:10.3390/CELLS11030503
48. Alghareeb SA, Alfihli MA, Fatima S. Molecular Mechanisms and Pathophysiological Significance of Eryptosis. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 5079. 2023;24(6):5079. doi:10.3390/IJMS24065079
49. Restivo I, Attanzio A, Tesoriere L, Allegra M. Suicidal Erythrocyte Death in Metabolic Syndrome. *Antioxidants.* 2021;10(2):1-13. doi:10.3390/ANTIOX10020154

50. Su Y, Zhao B, Zhou L, et al. Ferroptosis, a novel pharmacological mechanism of anti-cancer drugs. *Cancer Lett.* 2020;483:127-136. doi:10.1016/J.CANLET.2020.02.015
51. Lin S, Zheng Y, Chen M, Xu L, Huang H. The interactions between ineffective erythropoiesis and ferroptosis in β -thalassemia. *Front Physiol.* 2024;15:1346173. doi:10.3389/FPHYS.2024.1346173/BIBTEX
52. Liu Y, Wan Y, Jiang Y, Zhang L, Cheng W. GPX4: The hub of lipid oxidation, ferroptosis, disease and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.* 2023;1878(3):188890. doi:10.1016/J.BBCAN.2023.188890
53. El Hoss S, Cochet S, Godard A, et al. Fetal hemoglobin rescues ineffective erythropoiesis in sickle cell disease. *Haematologica.* 2021;106(10):2707-2719. doi:10.3324/HAEMATOL.2020.265462
54. Ono K, Fujiwara T, Saito K, et al. Congenital sideroblastic anemia model due to ALAS2 mutation is susceptible to ferroptosis. *Sci Rep.* 2022;12(1). doi:10.1038/S41598-022-12940-9
55. Cazzola M. Ineffective erythropoiesis and its treatment. *Blood.* 2022;139(16):2460-2470. doi:10.1182/BLOOD.2021011045
56. Fanni D, Angotzi F, Lai F, et al. Four stages of hepatic hematopoiesis in human embryos and fetuses. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018;31(6):701-707. doi:10.1080/14767058.2017.1297400
57. Schulze RJ, Schott MB, Casey CA, Tuma PL, McNiven MA. The cell biology of the hepatocyte: A membrane trafficking machine. *J Cell Biol.* 2019;218(7):2096-2112. doi:10.1083/JCB.201903090
58. Ogun AS, Adeyinka A. Biochemistry, Transferrin. *StatPearls.* Published online November 16, 2022. Accessed June 27, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532928/>
59. Garcia-Casal MN, Pasricha SR, Martinez RX, Lopez-Perez L, Peña-Rosas JP. Serum or plasma ferritin concentration as an index of iron deficiency and overload. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021;2021(5). doi:10.1002/14651858.CD011817.PUB2
60. Allameh A, Niayesh-Mehr R, Aliarab A, Sebastiani G, Pantopoulos K. Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease. *Antioxidants.* 2023;12(9). doi:10.3390/ANTIOX12091653
61. Banales JM, Huebert RC, Karlsen T, Strazzabosco M, LaRusso NF, Gores GJ. Cholangiocyte pathobiology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(5):269-281. doi:10.1038/S41575-019-0125-Y
62. Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol.* 2017;66(1):212-227. doi:10.1016/J.JHEP.2016.07.009
63. Gracia-Sancho J, Caparrós E, Fernández-Iglesias A, Francés R. Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18(6):411-431. doi:10.1038/S41575-020-00411-3
64. Kitto LJ, Henderson NC. Hepatic Stellate Cell Regulation of Liver Regeneration and Repair. *Hepatol Commun.* 2020;5(3):358-370. doi:10.1002/HEP4.1628

65. Vitamin A and Carotenoids - Health Professional Fact Sheet. Accessed September 16, 2024. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminA-HealthProfessional/>
66. Vogt ACS, Arsiwala T, Mohsen M, Vogel M, Manolova V, Bachmann MF. On Iron Metabolism and Its Regulation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9). doi:10.3390/IJMS22094591
67. Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, Tuma F. Physiology, Liver. *StatPearls.* Published online May 1, 2023. Accessed June 27, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>
68. Woltman: Macrophages: Biology and Role in the Pathology... - Google Scholar. Accessed September 17, 2024. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Macrophages:+Biology+and+Role+in+the+Pathology+of+Diseases&author=A.M.+Woltman&author=A.+Boonstra&author=M.+Naito&author=P.J.M.+Leenen&publication_year=2014&
69. Ogun AS, Joy N V., Valentine M. Biochemistry, Heme Synthesis. *StatPearls.* Published online May 1, 2023. Accessed June 27, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537329/>
70. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 1999;31(4):261-272. doi:10.1080/10715769900300841
71. Casas-Grajales S. Antioxidants in liver health. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2015;6(3):59. doi:10.4292/WJGPT.V6.I3.59
72. Allameh A, Niayesh-Mehr R, Aliarab A, Sebastiani G, Pantopoulos K. Oxidative Stress in Liver Pathophysiology and Disease. *Antioxidants.* 2023;12(9). doi:10.3390/ANTIOX12091653
73. Galicia-moreno M, Lucano-landeros S, Monroy-ramirez HC, et al. Roles of Nrf2 in Liver Diseases: Molecular, Pharmacological, and Epigenetic Aspects. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(10):1-23. doi:10.3390/ANTIOX9100980
74. Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:401. doi:10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-011112-140320
75. Li S, Tan HY, Wang N, et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci.* 2015;16(11):26087-26124. doi:10.3390/IJMS161125942
76. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology : WJG.* 2014;20(25):8082. doi:10.3748/WJG.V20.I25.8082
77. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol.* 2013;87(7):1157-1180. doi:10.1007/S00204-013-1034-4
78. Wang CH, Wu SB, Wu YT, Wei YH. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013;238(5):450-460. doi:10.1177/1535370213493069
79. Liang S, Kisseleva T, Brenner DA. The Role of NADPH Oxidases (NOXs) in Liver Fibrosis and the Activation of Myofibroblasts. *Front Physiol.* 2016;7(FEB). doi:10.3389/FPHYS.2016.00017

80. Ramos-Tovar E, Muriel P. Molecular Mechanisms That Link Oxidative Stress, Inflammation, and Fibrosis in the Liver. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(12):1-21. doi:10.3390/ANTIOX9121279
81. Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(46):7413-7420. doi:10.3748/WJG.V12.I46.7413
82. Tanaka M, Miyajima A. Liver regeneration and fibrosis after inflammation. *Inflamm Regen*. 2016;36(1). doi:10.1186/S41232-016-0025-2
83. Hyun J, Han J, Lee C, Yoon M, Jung Y. Pathophysiological Aspects of Alcohol Metabolism in the Liver. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11). doi:10.3390/IJMS22115717
84. PAPADOPOULOS C, TENTES I, ANAGNOSTOPOULOS K. Red Blood Cell Dysfunction in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Marker and Mediator of Molecular Mechanisms. *Maedica (Bucur)*. 2020;15(4):513. doi:10.26574/MAEDICA.2020.15.4.513
85. Xie X, Wang L, Yao M, et al. [Correlation between red blood cell count and liver function status]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2016;24(2):119-122. doi:10.3760/CMA.J.ISSN.1007-3418.2016.02.009
86. Mei C, Peng F, Yin W, et al. Increased suicidal erythrocyte death in patients with hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2022;323(1):G9-G20. doi:10.1152/AJPGI.00050.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/AJPGI.00050.2020_F005.JPEG
87. Xu W, Peng F, Deng Y, Fan X, Li N. The emerging roles of eryptosis in liver diseases. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2019;26(4):336-340. doi:10.1016/J.TRACLI.2019.05.004
88. Silva I, Rausch V, Seitz HK, Mueller S. Does Hypoxia Cause Carcinogenic Iron Accumulation in Alcoholic Liver Disease (ALD)? *Cancers (Basel)*. 2017;9(11). doi:10.3390/CANCERS9110145
89. Mueller S, Chen C, Mueller J, Wang S. Novel Insights into Alcoholic Liver Disease: Iron Overload, Iron Sensing and Hemolysis. *J Transl Int Med*. 2022;10(2):92-124. doi:10.2478/JTIM-2021-0056
90. Mueller S, Rausch V. The role of iron in alcohol-mediated hepatocarcinogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2015;815:89-112. doi:10.1007/978-3-319-09614-8_6
91. Mueller S, Seitz HK, Rausch V. Non-invasive diagnosis of alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(40):14626-14641. doi:10.3748/WJG.V20.I40.14626
92. Osna NA, Tikhanovich I, Ortega-Ribera M, et al. Alcohol-Associated Liver Disease Outcomes: Critical Mechanisms of Liver Injury Progression. *Biomolecules 2024, Vol 14, Page 404*. 2024;14(4):404. doi:10.3390/BIOM14040404
93. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120:5.1.1. doi:10.1002/CPIM.40
94. Drescher H, Weiskirchen S, Weiskirchen R. Flow Cytometry: A Blessing and a Curse. *Biomedicines*. 2021;9(11). doi:10.3390/BIOMEDICINES9111613

95. Bovine Serum Albumin (BSA) Blocking Buffer. Accessed September 20, 2024. <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/support/calculators-and-apps/bsa-blocking-buffer?srltid=AfmBOOpz1lkhdTeYRHvV85ypU1zu19zZMjGqLFm7pkb87vH9MWUC9FhX>
96. Figueroa D, Asaduzzaman M, Young F. Real time monitoring and quantification of reactive oxygen species in breast cancer cell line MCF-7 by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2018;94:26-33. doi:10.1016/J.VASCN.2018.03.007
97. APC Mouse Anti-Human CD235a. Accessed September 20, 2024. <https://wwwbdbiosciences.com/en-eu/products/reagents/flow-cytometry-reagents/research-reagents/single-color-antibodies-ruo/apc-mouse-anti-human-cd235a.551336>
98. PE Annexin V. Accessed September 20, 2024. <https://wwwbdbiosciences.com/en-eu/products/reagents/flow-cytometry-reagents/research-reagents/single-color-antibodies-ruo/pe-annexin-v.556421>
99. McKnight PE, Najab J. Mann-Whitney U Test. *The Corsini Encyclopedia of Psychology*. Published online January 30, 2010:1-1. doi:10.1002/9780470479216.CORPSY0524
100. Niemelä O, Halkola AS, Bloigu A, et al. Blood Cell Responses Following Heavy Alcohol Consumption Coincide with Changes in Acute Phase Reactants of Inflammation, Indices of Hemolysis and Immune Responses to Ethanol Metabolites. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21). doi:10.3390/IJMS232112738
101. Tzounakas VL, Dzieciatkowska M, Anastasiadi AT, et al. Red cell proteasome modulation by storage, redox metabolism and transfusion. *Blood Transfusion*. 2022;20(1):27. doi:10.2450/2020.0179-20
102. Kriebardis: Progressive oxidation of cytoskeletal... - Google Scholar. Accessed October 14, 2024. <https://scholar.google.com/scholar?cluster=5546714368813900376&hl=en&oi=scholar>
103. Antonelou MH, Kriebardis AG, Buehler P, et al. In Sickness and in Health: Erythrocyte Responses to Stress and Aging. *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol 23, Page 6957*. 2022;23(13):6957. doi:10.3390/IJMS23136957
104. Antonelou MH, Kriebardis AG, Papassideri IS. Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood Transfusion*. 2010;8(Suppl 3):s39. doi:10.2450/2010.007S
105. Antonelou MH, Kriebardis AG, Velentzas AD, Kokkalis AC, Georgakopoulou SC, Papassideri IS. Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. *J Proteomics*. 2011;74(11):2441-2452. doi:10.1016/j.jprot.2011.04.009
106. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulin G binding, lipid raft rearrangement, and caspase activation. *Transfusion (Paris)*. 2007;47(7):1212-1220. doi:10.1111/J.1537-2995.2007.01254.X

107. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. RBC-derived vesicles during storage: Ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. *Transfusion (Paris)*. 2008;48(9):1943-1953. doi:10.1111/J.1537-2995.2008.01794.X
108. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *J Cell Mol Med*. 2007;11(1):148-155. doi:10.1111/J.1582-4934.2007.00008.X
109. Kodippili GC, Spector J, Sullivan C, et al. Imaging of the diffusion of single band 3 molecules on normal and mutant erythrocytes. *Blood*. 2009;113(24):6237-6245. doi:10.1182/BLOOD-2009-02-205450