



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

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Κυτταροβιολογική μελέτη των ερυθροκυττάρων σε ασθενείς με  
Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα**



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ  
ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ:

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΔΕΜΙΡΤΖΟΓΛΟΥ**

**ΑΜ:18678306**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ :

**ΧΑΡΑ ΓΕΩΡΓΑΤΖΑΚΟΥ**

**ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ  
ΠΑΛΑ**



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

Διπλωματική εργασία με θέμα:  
**«Κυτταροβιολογική μελέτη των ερυθροκυττάρων σε ασθενείς  
με Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα»**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ:  
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΔΕΜΙΡΤΖΟΓΛΟΥ  
ΑΜ:18678306

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ :  
ΧΑΡΑ ΓΕΩΡΓΑΤΖΑΚΟΥ  
ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ ΠΑΔΑ



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

Dissertation title:

**“Cytobiological study on erythrocytes in patients of Myelodysplastic syndromes”**

STUDENT NAME:  
KONSTANTINA DEMIRTZOGLU  
CANDIDATE NUMBER:18678306

SUPERVISOR NAME:  
CHARA GEORGATZAKOU  
ACADEMIC ASSISTANT

ATHENS 2022



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

**ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**  
**ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑΣ**

ΑΞΙΟΛΟΓΗΤΕΣ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
ΧΑΡΑ ΓΕΩΡΓΑΤΖΑΚΟΥ	
ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ	
ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΦΟΡΤΗΣ	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κωνσταντίνα Δεμιρτζόγλου , με αριθμό μητρώου 18678306 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

Η Δηλούσα



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>7</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>12</b>
<i>1. ΕΡΥΘΡΟΠΤΩΣΗ</i> .....	<i>12</i>
1.1. Ερυθρά αιμοσφαίρια-Γενικά .....	12
1.2. Ερυθρόπτωση-Εξωαγγειακή αιμόλυση .....	12
1.3. Χημικές-μορφολογικές μεταβολές .....	13
1.4. Ενδοαγγειακή αιμόλυση .....	15
<i>2. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ</i> .....	<i>17</i>
2.1. Οξειδωτικό στρες γενικά-ROS .....	17
2.2. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί .....	18
2.2.α. Ενζυμικές πρωτεϊνικές μορφές άμυνας .....	18
2.2.β. Μη ενζυμικές πρωτεϊνικές μορφές άμυνας .....	19
2.3. Χημικές μεταβολές .....	19
2.4.α. Ερυθρόπτωση ως αίτιο οξειδωτικού στρες σε απώλεια σιδήρου .....	19
2.4.β. Ερυθρόπτωση ως αίτιο οξειδωτικού στρες σε αρτηριακή υπέρταση και υπερλιπιδαιμία .....	20
2.5. Διαγνωστικοί βιοδείκτες .....	20
<i>3. ΓΗΡΑΝΣΗ</i> .....	<i>22</i>
3.1. Γήρανση γενικά – φαγοκυττάρωση γερασμένων ερυθρών .....	22
3.2. Μέθοδος ηλικιακής ταξινόμησης .....	22
3.3. Φυσιολογικές μεταβολές –βιοδείκτες γήρανσης .....	23
3.3.α. Ζώνη 3 – δείκτης IgG .....	23
3.3.β <sub>1</sub> Οξειδωτικό στρες δείκτης caspases-3 – δείκτης ROS .....	24
3.3.γ Ενδοκυττάρια ιόντα Ca <sup>+2</sup> - εξωτερίκευση δείκτη PS .....	26
3.4. Annexin V .....	27
<i>4. ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ</i> .....	<i>30</i>

4.1. Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα – Γενικά .....	30
4.2. Ταξινόμηση ΜΔΣ βάση της French-American-British (FAB) .....	31
4.3. Ταξινόμηση ΜΔΣ βάση του International prognostic scoring system (IPSS ,IPSS-R) .....	32
4.4. Ταξινόμηση ΜΔΣ βάση του WHO Prognostic Scoring System (WPSS) .....	33
4.5. Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και γήρανση στα κύτταρα ασθενών με ΜΔΣ .....	34
4.6. Οξειδωτικό στρες σε ασθενείς με ΜΔΣ .....	36
4.7. Εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης σε ασθενείς με ΜΔΣ .....	38
4.8. Ενεργοποιημένη κασπάση-3 σε ασθενείς με ΜΔΣ .....	38
4.9. IgG αυτοαντισώματα σε ασθενείς με ΜΔΣ .....	39
4.10. Μεταβολές κυτοσολικού Ca +2 σε ασθενείς με ΜΔΣ .....	39
<b>Β.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ .....</b>	<b>42</b>
<b>Γ.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>43</b>
1.1. Ανοσοεντόπιση εξωτερικευμένης Ps μέσω Annexin-V στα ερυθρά αιμοσφαίρια .....	43
1.2.Μέτρηση ενδοκυττάρων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) στα ερυθρά αιμοσφαίρια .....	44
1.3.Μέτρηση επιπέδων κυτοσολικών ιόντων ασβεστίου Ca+2 στα ερυθρά αιμοσφαίρια .....	45
1.4.Μέτρηση επιπέδων ενεργοποιημένων κασπασών-3 στα ερυθρά αιμοσφαίρια .....	46
1.5.Μέτρηση επιπέδων ανοσοσφαιρινών IgG στα ερυθρά αιμοσφαίρια .....	47
<b>Δ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>48</b>
1.1 Αποτελέσματα ερυθροκυτταρικών δεικτών από τις γενικές αίματος των ασθενών και των υγείων απόμων .....	48
1.2 Έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική στιβάδα της πλασματικής μεμβράνης .....	49
1.3 Ενδοκυττάρια δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) .....	51
1.4 Κυτοσολικά κατιόντα ασβεστίου (Ca <sup>+2</sup> ) .....	53
1.5 Ενεργοποιημένες caspases-3 .....	55
1.6 Μεμβρανοσυνδεδεμένες ανοσοσφαιρίνες IgG .....	57
<b>Ε.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>59</b>
<b>ΣΤ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>63</b>

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε κατά την περίοδο του 2022 στα πλαίσια των προπτυχιακών μου σπουδών στο Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία του τομέα των Βιοϊατρικών Επιστημών του τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου ,Ακαδημαϊκή Υπότροφο ,**κ. Χαρά Γεωργατζάκου** για την μεγάλη προθυμία της να προσφέρει την βοήθεια της κατά την πειραματική και εργαστηριακή εκμάθηση των πρωτοκόλλων και την θέληση της να μου μεταδώσει τις γνώσεις της πάνω στο συγκεκριμένο ερευνητικό αντικείμενο. Ακόμη θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την στήριξη της και τις συμβουλές της κατά την διάρκεια την συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας και για την καθοδήγηση και επίλυση των προβλημάτων .

Επίσης ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή **κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη** για τις πολύ χρήσιμες γνώσεις που μου παρείχε σε πρακτικό επίπεδο κατά την εκπαίδευση μου στο εργαστήριο και την μετάδοση της προσωπικής του όρεξης και προθυμίας για δουλειά και έρευνα. Επιπλέον θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την δυνατότητα που μου πρόσφερε να συνεργαστούμε πάνω στο συγκεκριμένο ερευνητικό πρόγραμμα ως η πρώτη ερευνητική μου απόπειρα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον **κ. Σωτήριο Φόρτη** για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή .



## **ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ**

- 4-HNE:** Αλδεϋδη 4-υδροξυ-2-νενεάλη
- AML:** Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία
- ANN-V :** Αννεξίνη 5
- ATP:** Τριφοσφωρική Αδενοσίνη
- CAT :** Καταλάση
- CMML:** Χρόνια Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία
- FAB:** Γαλλοαμερικάνικη-βρετανική ταξινόμησης
- FR:** Ελεύθερες ρίζες
- GCLM:** Τροποποιητής Γλουταμικής Λιγάνσης Κυστεΐνης
- GPX:** υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
- GSH :** Γλουταθειόνη
- HDL:** Λιποπρωτεΐνη Υψηλής Πυκνότητας
- IPSS:** Διεθνές Σύστημα Προγνωστικής Βαθμολόγησης
- IPSS-R:** Διεθνές Σύστημα Προγνωστικής Βαθμολόγησης
- LDH:** Γαλακτική Αφυδρογονάση
- LDL:** Λιποπρωτεΐνη Χαμηλής Πυκνότητας
- MDA:** Μαλονδιαλδεϋδη
- MDS-U:** Αταξινόμητη Μορφή Μυελοδυσπλαστικού Συνδρόμου
- NADPH:** Φωσφορικό Δινουκλεοτίδιο Νικοτιναμίδης Αδενίνης
- NFR2:** Πυρηνικός Ερυθροειδής Παράγοντας 2
- NOS:** Υπεροξειδίου του αζώτου
- PAF:** Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
- PC:** Φωσφατιδυλοχολίνη
- PE:** Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη
- PKC :** Πρωτεϊνική κινάση C
- PS:** Φωσφατιδυλοσερίνη
- RA:** Ανθεκτική Αναιμία
- RAEB:** Ανθεκτική Αναιμία με Περίσσεια Βλαστών

**RAEB-t** : Ανθεκτική Αναιμία με Περίσσεια Βλαστών σε Μεταλλαγή

**RARS**: Ανθεκτική Αναιμία με Δακτυλιοειδείς Σιδηροβλάστες

**RBCs**: Ερυθροκύτταρα

**RCMD**: Ανθεκτική Κυτταροπενία με Πολυγραμμική Δυσπλασία

**RCMD-RS**: Ανθεκτική Κυτταροπενία με Πολυγραμμική Δυσπλασία με Δακτυλιοειδείς Σιδηροβλάστες

**RNS**: Δραστικές Μορφές Αζώτου

**ROS**: Δραστικές μορφές οξυγόνου

**SM**: Σφυγγομυελίνη

**SOD**: Υπεροξειδική δισμουτάση

**TH**: Ολικό Υπεροξειδίο του Υδρογόνου

**WPSS**: Σύστημα Προγνωστικής Βαθμολόγησης του Π.Ο.Υ

**ΔΕΚ**: Δικτυοερυθροκύτταρα

**ΜΔΣ/ΜDS**: Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα

**Π.Ο.Υ**: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ερυθρόπτωση ή αλλιώς προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος , περιγράφει τη διαδικασία που ακολουθεί το κύτταρο πριν επέλθει ο φυσιολογικός του θάνατος από φυσική φθορά και την τελική του φαγοκυττάρωση από ειδικά κύτταρα του οργανισμού. Το οξειδωτικό στρες από την άλλη οφείλεται σε ανισορροπία παραγωγής και απομάκρυνσης των οξειδωτικών μορίων , και αναστολής ή αδράνειας του αντίστοιχου αντιοξειδωτικού μηχανισμού άμυνας . Οι δύο αυτές καταστάσεις συνδέονται άμεσα μεταξύ τους καθώς η πρώτη είναι απόρροια της δεύτερης και η δεύτερη αποτελεί έναν από τους αποπτωτικούς δείκτες των κυττάρων , μαζί με την έκφραση της PS στην εξωτερική στιβάδα της πλασματικής μεμβράνης , την αύξηση του κυτοσολικού ασβεστίου , τις ενεργοποιημένες κασπάσες-3 και τις ανοσοσφαιρίνες της τάξης IgG . Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης αποτέλεσε η κυτταροβιολογική μελέτη των ερυθρών αιμοσφαιρίων , δηλαδή η εύρεση δεικτών ερυθρόπτωσης και οξειδωτικού στρες σε δείγματα αίματος ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα , και η χρήση αυτών για την έγκαιρη και αξιόπιστη διάγνωση των νεοπλασιών. Οι αποπτωτικοί δείκτες της annexin-V PS , των ROS και των anti-IgG φάνηκαν να ανταποκρίνονται και να συμφωνούν με τα υπάρχοντα δεδομένα που είχαν μελετηθεί σε προηγούμενες έρευνες ανάλυσης τόσο της ερυθρόπτωσης και του οξειδωτικού στρες όσο και των ΜΔΣ . Σε αντίθεση με τους δείκτες των ενεργοποιημένων κασπασών-3 και των ενδοκυττάρων επιπέδων  $Ca^{+2}$  , όπου υπήρξε αύξηση μόνο στην μέτρηση του μέσου όρου-τυπική απόκλιση των παθολογικών έναντι των υγείων . Συμπερασματικά η κυτταροβιολογική μελέτη που έγινε στα ερυθρά αιμοσφαίρια των δύο πληθυσμών , ασθενών με ΜΔΣ και υγείων, μπόρεσε να αποδείξει την επίδραση και τον τρόπο λειτουργίας των παραμέτρων που αναλύθηκαν στις συγκεκριμένες συνθήκες που επικρατούσαν . Σε ορισμένες από αυτές κατάφερε να επιβεβαιώσει τη δράση τους στην διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου βάση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας , ενώ σε άλλες υπήρξαν εικασίες και πιθανά ενδεχόμενα συμμετοχής στα συγκεκριμένα μυελοειδή σύνδρομα .

## **ABSTRACT**

Eryptosis or programmed cell death describes the process that is followed by the cell itself before its natural death caused by natural wear and tear occurs and its final phagocytosis by special cells of the organism. Oxidative stress, on the other hand, is caused by an imbalance between the production and the removal of oxidative molecules and the inhibition or inactivity of the respective anti-oxidant defence mechanism. These two conditions are directly interconnected as the former results from the latter while the latter constitutes one of the apoptotic markers of the cells, in addition to the expression of PS on the outer layer of plasma membrane, the rise of cytosolic calcium, the activated caspases-3 and the IgG class immunoglobulins. This study aimed to serve as a cyto-biological study of red blood cells, that is, to help the finding of eryptosis markers and oxidative stress in blood samples of patients with myelodysplastic syndromes, as well as their usage for early and reliable diagnosis of neoplasms. Apoptotic markers of annexin-V PS, ROS and anti-IgG seem to have been responsive and in line with already existing data that had been studied in previous analyses both on eryptosis and oxidative stress and on MDS. In contrast to that, activated caspases-3 markers and intracellular levels of  $\text{Ca}^{+2}$  demonstrated some increase only in the measurement of mean – standard deviation of pathological versus healthy populations. Conclusively, the cyto-biological study that was carried out on red blood cells of the two populations, patients with MDS and healthy ones, has been able to prove the influence and the operation of those parameters that were analysed under these specific conditions. In some cases, this study even managed to corroborate their role in the process of programmed cell death based on existing bibliography, while in other cases there were only conjectures on their potential participation in these myeloid syndromes.

## **A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.ΕΡΥΘΡΟΠΤΩΣΗ**

#### **1.1 Ερυθρά αιμοσφαίρια - Γενικά**

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια αποτελούν μια από τις πολυπληθέστερες ομάδες κυττάρων του αίματος <sup>[1]</sup> που παράγονται στον ερυθρό μυελό των οστών από τα πρώιμα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται ερυθροποίηση. <sup>[2]</sup> Τα πρόδρομα βλαστοκύτταρα υπόκεινται σε μια σταδιακή διαφοροποίηση ενδιάμεσων προγονικών κυττάρων ρυθμιζόμενη από τοπικούς αλλά και ευρύτερους παράγοντες μέχρι να φτάσουν στο στάδιο της ερυθροειδούς σειράς. <sup>[3]</sup> Από το σημείο αυτό τα προγονικά κύτταρα της ερυθροειδούς σειράς διαδέχονται τα αναπτυξιακά στάδια που περιλαμβάνουν τις προερυθροβλάστες ,τις βασεόφιλες και πολυχρωματόφιλες ερυθροβλάστες και τέλος τις νορμοβλάστες από όπου και προκύπτουν τα δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ) <sup>[4]</sup> . Τα σχηματιζόμενα ΔΕΚ ακολουθούν μια σειρά σταδίων μορφολογικών αλλαγών όπου από ανώριμα κύτταρα του μυελού των οστών διέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και μετατρέπονται σε ερυθρά αιμοσφαίρια με απουσία του πυρήνα και των κυτταρικών οργανιδίων τους. <sup>[5]</sup> Το χρονικό διάστημα που παραμένουν στην κυκλοφορία του αίματος ως ώριμα κύτταρα είναι 120 ημέρες έως ότου επέλθει ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατός τους ή η γήρανση. <sup>[6]</sup> <sup>[7]</sup> Η κύρια λειτουργία των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς και η απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα από τους πνεύμονες. <sup>[8]</sup> Οι μεταβολικές διεργασίες που λαμβάνουν μέρος στα ερυθρά αιμοσφαίρια καθόλη την διάρκεια της ζωής τους συμβάλουν στην μεταβολή του σχήματος τους. <sup>[8]</sup> <sup>[9]</sup> Η δίοδος τους στην μικροκυκλοφορία του οργανισμού δηλαδή η παρουσία τους εντός των τριχοειδών απαιτεί την αλλαγή της δομής τους εξαιτίας την πολύ μικρότερης από αυτά διαμέτρου των αγγείων .

#### **1.2 Ερυθρόπτωση – Εξωαγγειακή αιμόλυση**

Η καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων ονομάζεται ερυθρόπτωση <sup>[10]</sup> <sup>[11]</sup> και οφείλεται σε ένα ευρύ φάσμα παραγόντων που υφίστανται τα κύτταρα όπως είναι το οξειδωτικό και το ωσμωτικό στρες , διάφορα φάρμακα όπως ορισμένα αντιβιοτικά , η ενεργειακή εξάντληση και η έκθεση σε ακτινοβολία. <sup>[12]</sup> <sup>[13]</sup> Καθημερινά τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά την πορεία της κυκλοφορίας τους στο αίμα διέρχονται από διάφορες στρεσογόνες καταστάσεις που τα αναγκάζουν να μεταβάλουν την δομή ενώ ταυτόχρονα επηρεάζουν και τη λειτουργία τους <sup>[10]</sup> . Αυτού του είδους ο κυτταρικός θάνατος επέρχεται πριν την ολοκλήρωση της διάρκειας ζωής τους , δηλαδή δεν οφείλεται στο φυσιολογικό μηχανισμό της γήρανσης των κυττάρων . <sup>[14]</sup> Συγκεκριμένα η ερυθρόπτωση είναι η αντίστοιχη διαδικασία της απόπτωσης όλων των εμπύρηνων κυτταρικών μορφών

καθώς εμφανίζει τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της συρρίκνωσης του κυττάρου , την δημιουργία κυστιδίων στην μεμβράνη και τη μεταφορά του φωσφολιπιδίου φωσφατιδυλοσερίνη από την εσωτερική στην εξωτερική στοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. <sup>[12] [15]</sup>

### 1.3 Χημικές - μορφολογικές μεταβολές

Σε καταστάσεις οξειδωτικού και ωσμωτικού στρες στα ερυθρά αιμοσφαίρια λαμβάνουν χώρα χημικές αντιδράσεις οι οποίες στα πρώιμα στάδια τους χαρακτηρίζονται από την αύξηση των ιόντων ασβεστίου στο κυτοσόλιο και την έναρξη της διαδικασίας της απόπτωσης των RBCs . <sup>[14] [16] [17]</sup> Τα ιόντα ασβεστίου ( $Ca^{+2}$ ) εισέρχονται στο εσωτερικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων μέσω των διαύλων ιόντων οι οποίοι ενεργοποιούνται από το μόριο της προσταγλανιδης  $E_2$  και άλλους διεγέρτες <sup>[18]</sup> . Η αύξηση των κατιόντων οδηγεί στην ενεργοποίηση των αντλιών καλίου  $K^+$  <sup>[19] [20]</sup> και κατ' επέκταση στην απομάκρυνση του χλωριούχου καλίου (KCl) από το εσωτερικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων με αποτέλεσμα την αυξημένη εκροή εξωκυττάρου  $K^+$  και την απώλεια  $Cl^-$  <sup>[21]</sup> . Αυτές οι κυτταρικές διεργασίες που πραγματοποιούνται οδηγούν τα κύτταρα σε απώλεια της φυσιολογικής δομής τους και στη μείωση του μεγέθους τους . <sup>[10]</sup> Αντίστοιχα η εμφάνιση της φυσαλιδοποίησης της κυτταρικής μεμβράνης και η αποκοπή κυστιδίων από αυτήν οφείλονται στην έκφραση της προσταγλανιδης  $E_2$  όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. <sup>[22] [23]</sup> Το λιπιδικό αυτό μόριο είναι υπεύθυνο να ενεργοποιεί με την σειρά του την ασβέστιο-εξαρτώμενη πρωτεάση κυστεΐνης , καλπαΐνη , η οποία συμβάλει σημαντικά στην αποδόμηση του κυτταροσκελετού των ερυθρών αιμοσφαιρίων. <sup>[22] [23]</sup>

Η αύξηση των κατιόντων ασβεστίου προωθεί την διατάραξη της αρχιτεκτονικής της πρωτεϊνικής μεμβράνης των κυττάρων με αποτέλεσμα την ανακατανομή της ασυμμετρίας της φωσφατιδυλοσερίνης. <sup>[24]</sup> Στην αναδιάταξη της κυτταρικής μεμβράνης συμμετέχουν ταυτόχρονα τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες που την συγκροτούν . Η εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης στη επιφάνεια του κυττάρου εκκινεί την διαδικασία της φαγοκυττάρωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων από τα μακροφάγα και άρα την απομάκρυνση τους από την κυκλοφορία. <sup>[25] [26] [27]</sup> Η μείωση του μεγέθους των ερυθρών αιμοσφαιρίων που προκαλείται από την επαγόμενη ερυθρόπτωση προωθεί τη απελευθέρωση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF : Platelet Activating Factor) <sup>[28]</sup> . Ο PAF είναι ένας μεσολαβητής φωσφολιπιδιακής σύστασης ο οποίος μετέχει στην ρύθμιση διαφόρων διεργασιών όπως είναι η φλεγμονή , η θρόμβωση , η καρδιαγγειακή λειτουργία . Παράλληλα διεγείρει την απελευθέρωση του κεραμιδίου από τα ερυθρά αιμοσφαίρια μέσω της διάσπασης της σφιγγομυελίνης με την βοήθεια του ενζύμου σφυγγομυελινάση. <sup>[28] [29]</sup> Ο PAF απομακρύνεται από τα

προγονικά κύτταρα των ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά την δραστηριοποίηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου, ενώ η δράση του στη ερυθρόπτωση είναι ανεξάρτητη από την ποσότητα αυτών των κατιόντων. <sup>[30]</sup>

Ο σχηματισμός του κεραμιδίου και η απομάκρυνση του από το κύτταρο διεγείρει περαιτέρω τα κανάλια  $K^+$  ενισχύοντας τη δράση των κατιόντων ασβεστίου στο κυτοσόλιο. <sup>[10]</sup> Σε συνθήκες ωσμωτικού στρες των ερυθρών αιμοσφαιρίων η παρουσία του κεραμιδίου επιδρά στη κυτταρική μεμβράνη και προκαλεί την άμεση δράση του PAF στην έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης στο πρωτεϊνικό περίβλημα λόγω της κίνησης που προκαλεί στα λιπίδια της διπλοστιβάδας φωσφολιπιδίων της πλασματικής μεμβράνης. <sup>[10]</sup> Η ανάμειξη και διατάραξη της ασυμμετρίας της φωσφατιδυλοσερίνης οφείλεται στην επίδραση μίας πρωτεΐνης γνωστή ως σκραμπλάση έπειτα από την αυξημένη παρουσία κυτοσολικού ασβεστίου. <sup>[31]</sup> <sup>[32]</sup> Όπως επίσης και η κινάση JAK3 η οποία ενεργοποιείται από την ενεργειακή εξάντληση των κυττάρων διαθέτει την ικανότητα αναδιάταξης της πρωτεϊνικής σύστασης ως προς την δομή των λιποπρωτεϊνικών μορίων που την συγκροτούν <sup>[28]</sup>. Η διαδικασία αυτή εξυπηρετεί την έκφραση αποπτωτικών σημάτων πάνω στα ερυθρά αιμοσφαίρια όπως τη PS (phosphatidylserine) η οποία αναγνωρίζεται από αντίστοιχους υποδοχείς που φέρουν τα φαγοκύτταρα του σπλήνα και τα CD207+ δένδριτικά κύτταρα. <sup>[33]</sup> Η αναγνώριση αυτή της εξωτερίκευσης της φωσφατιδυλοσερίνης στην κυτταρική μεμβράνη ερευνητικά επιτυγχάνεται με την πρόσδεση μορίων αννεξίνης (ANN-V). <sup>[34]</sup>

Αναφέροντας πιο αναλυτικά τους παράγοντες που σηματοδοτούν την έναρξη του μηχανισμού του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των ερυθρών αιμοσφαιρίων με σκοπό να απομακρυνθούν από το κυκλοφορικό σύστημα επισημαίνονται αρχικά το οξειδωτικό στρες και η υπερωσμωτικότητα. <sup>[28]</sup> Όπως συζητήθηκε προηγουμένως τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά την κυκλοφορία τους, διέρχονται μέσω του μυελού των νεφρών όπου στο σημείο αυτό υπόκεινται σε ακραίες συνθήκες ωσμωτικής πίεσης, ενώ κατά την διέλευση τους από τους πνεύμονες υφίστανται οξείδωση. <sup>[10]</sup> <sup>[35]</sup> Αυτά τα γεγονότα με την σειρά τους προκαλούν την ενεργοποίηση ορισμένων πρωτεασών μέσω της ενεργοποίησης των ασβέστιο-εξαρτώμενων καναλιών κατιόντων και ανιόντων  $Cl^-$ . <sup>[36]</sup> Οι συνθήκες οξειδωτικού στρες που επικρατούν ενεργοποιούν παράλληλα και τις κασπάσες των ερυθρών αιμοσφαιρίων που αποτελούν δείκτες πρόωρης γήρανσης και αυτοκαταστροφής οι οποίες δρουν πρωτεολύοντας τον ανιοναναταλλάκτη της κυτταρικής μεμβράνης, ζώνη-3. <sup>[28]</sup> [...]

Στην συνέχεια η εξάντληση ενέργειας των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι μια δεύτερη διαδικασία του οργανισμού που υποκινεί την απόπτωση τους. <sup>[28]</sup> Κατά την διάρκεια αυτής παρατηρείται αδυναμία επαναφοράς της οξειδωμένης γλουταθειόνης στην

ανηγμένη μορφή της (GSH) και άρα αναστολή της αντιοξειδωτικής δράσης των κυττάρων καθιστώντας τα επιρρεπή σε μορφολογικές αλλαγές. <sup>[28]</sup> Επιπλέον συμβάλει στην ενεργοποίηση των αντλιών  $K^+$  της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και στην συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου εσωτερικά των κυττάρων προάγοντας της ερυθρόπτωση μέσω συγκρότησης της προσταγλανδίνης E2 και διαταράσσοντας την λειτουργικότητα της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC: Protein kinase C) αντίστοιχα. <sup>[36]</sup> Ταυτόχρονα ενεργοποιείται η εξαρτώμενη από την δραστηριότητα της PKC φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών της μεμβράνης καθώς και τα αποπτωτικά σήματα όπως η έκθεση της PS . Η είσοδος ιόντων ασβεστίου στα κύτταρα προκαλείται και από την έκφραση του αντισώματος A της τάξης ανοσοσφαιρινών IgG σε απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι της έκφρασης του αντιγόνου A σε νοσηρές αυτοάνοσες καταστάσεις . <sup>[37][38]</sup> Το συγκεκριμένο αντίσωμα είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση των ερυθρών αιμοσφαιρίων που έχουν υποστεί βλάβες. <sup>[28]</sup>

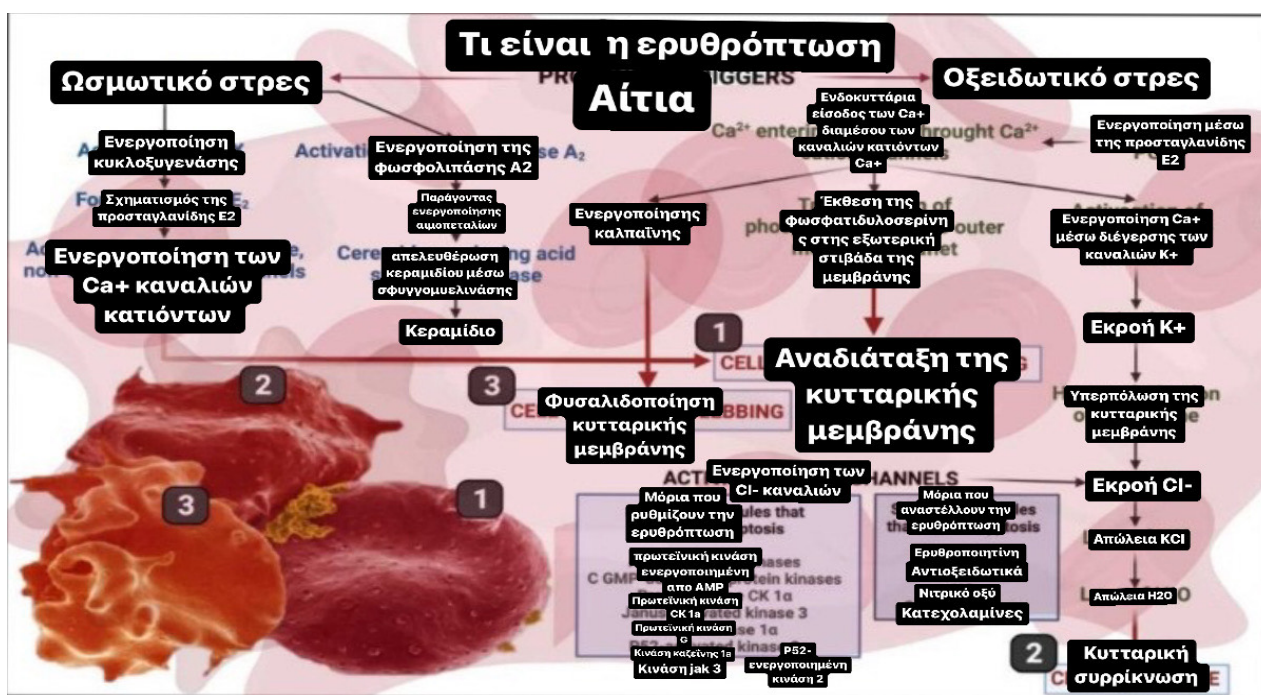
Αντίστοιχα με άλλους κυτταρικούς τύπους τα ερυθρά αιμοσφαίρια απαιτούν αμυντικούς μηχανισμούς έναντι στρεσογόνων περιβαλλοντικών παραγόντων αλλά και της κυτταρικής εκκαθάρισης προκρινόμενου να εξασφαλιστεί η φυσιολογική λειτουργία του κυκλοφορικού συστήματος . <sup>[12]</sup> Η ερυθρόπτωση αποτελεί μια σημαντική παράμετρο διασφάλισης της λειτουργικότητας των κυττάρων αποτρέποντας τη λύση κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβες και επομένως την απελευθέρωση του ενδοκυττάρου περιεχομένου τους στον εξωκυττάριο χώρο, κυρίως της αιμοσφαιρίνης της οποίας η παρουσία στον εξωκυττάριο χώρο μπορεί να αποβεί εξαιρετικά επιβλαβής. <sup>[15]</sup> Τα ερυθρά αιμοσφαίρια στερούνται μιτοχόνδρια και πυρήνα , στοιχεία κρίσιμα για την εκκίνηση του καταρράκτη αντιδράσεων με σκοπό την αυτοκαταστροφή των εμπύρηνων κυττάρων. <sup>[1]</sup> Παρόλα αυτά έχουν αναπτύξει διαφορετικούς μηχανισμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου αποτρέποντας ταυτόχρονα τις συνέπειες της ενδοαγγειακής αιμόλυσης όπως η μεγάλη αύξηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στον οργανισμό και η φλεγμονή. <sup>[39]</sup> Η αποφυγή της ενδοαγγειακής αιμόλυσης επιτυγχάνεται στην περίπτωση όπου η πρόωρη αυτοκαταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων προηγηθεί της αύξησης του μεγέθους των κυττάρων με έκφραση των αποπτωτικών σημάτων (Εικόνα 1). <sup>[1]</sup> Η συστηματική ερυθρόπτωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων απαιτεί επίσης την αντίστοιχη συχνότητα παραγωγής και σύνθεσης νέων κυττάρων ώστε να αποτραπεί η εξέλιξη αναιμίας.

#### **1.4 Ενδοαγγειακή αιμόλυση**

Η ενδοαγγειακή αιμόλυση , από την άλλη πλευρά , μπορεί να επέλθει έπειτα από τραυματισμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων όπου οδηγεί τα κύτταρα σε αύξηση του όγκου και ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης. <sup>[28][1]</sup> Η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων οφείλεται



σε εξάντληση της ενέργειας και στην ελαττωματική Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ΑΤΡάση με αποτέλεσμα να εισέρχονται ιόντα νατρίου και να αποβάλλονται κατιόντα καλίου από τα κύτταρα προκειμένου να εξισορροπηθεί η ωσμωτικότητα <sup>[37]</sup>. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη του πλάσματος μπορεί και απομακρύνεται από τον οργανισμό δημιουργώντας σύμπλοκα μετά την δέσμευση της με το μόριο της απτοσφαιρίνης με την συμβολή κυττάρων όπως των μονοκύτταρων και των μακροφάγων . <sup>[40]</sup> Βέβαια σε καταστάσεις αυξημένης εκροής αιμοσφαιρίνης από την καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων η πρωτεΐνη του πλάσματος δεν έχει την ικανότητα πλήρους αποκατάστασης της αιμοσφαιριναιμίας. <sup>[41]</sup> Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες πολλών οργάνων, συμπεριλαμβανομένης της νεφρικής ανεπάρκειας καθώς η κυκλοφορούσα στο πλάσμα αιμοσφαιρίνη υφίσταται επεξεργασία από τα νεφρικά σωληνάρια. <sup>[42]</sup>



(Εικόνα 1)<sup>[43]</sup> Σηματοδοτικοί παράγοντες εκκίνησης του αποπτωτικού θανάτου των ερυθρών αιμοσφαιρίων ωσμωτικό και οξειδωτικό στρες. Αριστερά της εικόνας περιγράφονται τα στάδια που λαμβάνουν χώρα κατά το ωσμωτικό στρες με την ενεργοποίηση της κυκλοξυγενάσης, τον σχηματισμό της προσταγλανιδής E2, την ευαισθητοποίηση των καναλιών κατιόντων Ca<sup>2+</sup> και τελικά την αναδιάταξη της δομής της κυτταρικής μεμβράνης. Ταυτόχρονα ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A2, απελευθέρωση παράγοντα αιμοπεταλίων, απελευθέρωση κεραμιδίου μέσω της σφυγγομυελινάσης. Δεξιά της εικόνας περιγράφονται τα στάδια που λαμβάνουν χώρα κατά το οξειδωτικό στρες με την ενδοκυττάρια είσοδο Ca<sup>2+</sup> μέσω της προσταγλανιδής E2 στα ερυθρά, την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική στιβάδα και τελικά την αναδιάταξη της δομής της κυτταρικής μεμβράνης. Ταυτόχρονα την ενεργοποίηση της καλπαΐνης και τελικά της φυσαλιδοποίησης της κυτταρικής μεμβράνης. Είτε την ενεργοποίηση των Ca<sup>2+</sup> μέσω της διέγερσης καναλιών K<sup>+</sup>, την εκροή K<sup>+</sup>, την υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, την εκροή Cl<sup>-</sup>, την απώλεια KCl, την απώλεια H<sub>2</sub>O και τελικά την κυτταρική συρρίκνωση. Κάτω δεξιά στην εικόνα αναγράφονται ρυθμιστές και αναστολείς της ερυθρόπτωσης.

## **2.ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ**

### **2.1.Οξειδωτικό στρες γενικά – ROS**

Οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται η διαδικασία κατά τη οποία παρατηρείται η έντονη παραγωγή και ο σχηματισμός δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) είτε η μειωμένη απομάκρυνση τους από τον οργανισμό .<sup>[44]</sup> Η διατήρηση ισορροπίας μεταξύ αυτών των δύο συνθηκών της απομάκρυνσης και της σύνθεσης ενεργών μορφών οξυγόνου ονομάζεται οξειδοαναγωγική κατάσταση.<sup>[45]</sup> Υπό φυσιολογικές συνθήκες και ποσότητες τα μόρια αυτά έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στον έλεγχο μονοπατιών που ρυθμίζουν την παραγωγή , την ενεργοποίηση και την μετακίνηση των κυτταρικών δομών , ενώ ταυτόχρονα μπορούν να συμβάλουν και στην ελάττωση σχηματισμού κακοηθειών και ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών. <sup>[46]</sup> <sup>[47]</sup> Σε παθολογικές καταστάσεις, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου συσσωρεύονται στον οργανισμό και οδηγούν σε επιβλαβείς συνέπειες καθώς τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια ενεργοποιούν έναν καταρράκτη αντιδράσεων με αποτέλεσμα να οξειδώνονται πολλά από τα σημαντικά μακρομόρια όπως λιπίδια , πρωτεΐνες , σάκχαρα και νουκλεϊκά οξέα επηρεάζοντας τελικά την δραστηριότητα και των ιοντικών διαύλων της μεμβράνης .<sup>[44]</sup> <sup>[48]</sup>

Η σύνθεση των ROS εντοπίζεται συχνότερα στα μιτοχόνδρια λόγω της συμβολής των μηχανισμών της αναπνευστικής αλυσίδας που παρέχονται παρόλα αυτά ο σχηματισμός τους μπορεί να πραγματοποιηθεί στο κυτταρόπλασμα , στο εξωκυττάριο υγρό και στα φαγοσώματα. <sup>[49]</sup> <sup>[50]</sup> Υπάρχουν διαφορετικές ομάδες ελευθέρων ριζών οξυγόνου ανάλογα με τον αριθμό μορίων υδρογόνου και οξυγόνου που διαθέτουν όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) , το υπεροξείδιο ( $O_2$ ) και το υδροξύλιο (OH) <sup>[44]</sup> .Καθεμία από τις κατηγορίες αυτές διαφέρει ως προς την δραστικότητα και την διάρκεια της λειτουργικότητας της <sup>[44]</sup> . Ο χρόνος ημιζωής των ελευθέρων ριζών FR (free radicals) είναι πολύ σύντομος , της τάξης ορισμένων δευτερολέπτων, σε αντίθεση με τα σύνθετα μόρια οξυγόνου όπου ο χρόνος δράσης τους μπορεί να διαρκεί μέρες έως και ώρες λόγω της σταθερότητας της δομής τους. <sup>[51]</sup> Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το οξειδωτικό στρες αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες ερυθρόπτωσης και πρόωρης γήρανσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. <sup>[52]</sup> Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι υπεύθυνα για την μεταφορά και την ανταλλαγή των αναπνευστικών αερίων στο οργανισμό γεγονός που τα καθιστά ευάλωτα και επιρρεπή στην δράση των ενεργών μορίων  $O_2$  και άρα στο οξειδωτικό στρες . <sup>[44]</sup> Στα ερυθρά αιμοσφαίρια η ενδοκυττάρια σύνθεση δραστικών μορίων οξυγόνου οφείλεται στην σταδιακή οξείδωση του δισθενούς σιδήρου  $Fe^{+2}$  σε  $Fe^{+3}$  του μορίου της αιμοσφαιρίνης (Hb) σε μεθαιμοσφαιρίνη κατά την μεταφορά οξυγόνου στον οργανισμό. <sup>[53]</sup> Όπως και οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες NOX (NADPH oxidase) υπεύθυνες για την

οξειδωση του NADPH συμβάλλουν στην παραγωγή ROS μέσω της σύνθεσης υπεροξειδίου στην κυκλοφορία του αίματος. <sup>[54]</sup>

## **2.2. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί**

Γι' αυτό το λόγο τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ορισμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ώστε να μπορούν να επιβιώνουν σε αντίξοες συνθήκες παρουσία των ROS. <sup>[43]</sup> Τα αντιοξειδωτικά συστατικά σχηματίζονται ενδογενώς ή προέρχονται εξωγενώς και είναι ικανά να αντισταθμίσουν τις ROS που δημιουργούνται απενεργοποιώντας τις είτε άμεσα είτε έμμεσα. <sup>[55]</sup> Στην άμυνα αυτή συμμετέχουν ενζυμικές και μη ενζυμικές πρωτεϊνικές μορφές όπως η γλουταθειόνη (GSH : glutathione ) , η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX : glutathione peroxidase) , η καταλάση (CAT : catalase) , η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD : superoxide dismutase) και οι βιταμίνες όπως η C και η E. <sup>[56] [57]</sup>

### **2.2.α. Ενζυμικές πρωτεϊνικές μορφές άμυνας**

Ένα από τα κύρια αντιοξειδωτικά μόρια είναι η γλουταθειόνη (GSH) που συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες δεσμεύοντας τις δραστικές ρίζες οξυγόνου που δημιουργούνται. <sup>[44]</sup> Η σημασία αυτού του μορίου στην επιβίωση των ερυθροκυττάρων μελετήθηκε και τελικά επιβεβαιώθηκε σε μία ερεύνα που διεξήχθη από τους Foller και τους συνεργάτες του , όπου μελέτησαν την αντίδραση και την συμπεριφορά των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε περιβάλλον όπου απουσίαζε ο τροποποιητής GCLM ( Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit ) απαραίτητος για την σύνθεση της GSH. <sup>[58] [59]</sup> Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα έτειναν να εκφράζουν υψηλότερα ποσοστά φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια τους σε συνθήκες οξείδωσης απ' ότι τα κύτταρα τα οποία διέθεταν φυσιολογικές συγκεντρώσεις του μορίου για επαρκή σύνθεση της GSH. <sup>[59]</sup> Επιπλέον η SOD μαζί με άλλα ένζυμα υπεύθυνα για την εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου συντελούν την αρχική γραμμή άμυνας της αντιοξειδωτικής κατάστασης. <sup>[60]</sup> Συγκεκριμένα η SOD που βρίσκεται σε ορισμένα μόνο κύτταρα στον εξωκυττάριο χώρο τους είναι υπεύθυνη για την κυτταρική μεμβράνη και γι' αυτό τον λόγο υπάρχουν μόρια που μιμούνται της δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης και μπορούν να διαθέτουν την ικανότητα κατάλυσης ενώσεων όπως H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. <sup>[60]</sup> Η δραστηριότητα των μορίων αυτών είναι αυξημένη στον χώρο εκτός κυττάρου καθώς παρατηρείται χαμηλότερη συγκέντρωση των υπολοίπων αντιοξειδωτικών παραγόντων εντός κυτταροπλάσματος. Η αμυντική δράση ενάντια στο O<sub>2</sub> ανατίθεται στο ενδοκυττάριο ένζυμο SOD και αντίστοιχα η απομάκρυνση των υπεροξειδίων στη καταλάση. <sup>[60]</sup>(Εικόνα 2)

## **2.2.β. Μη ενζυμικές πρωτεϊνικές μορφές άμυνας**

Η βιταμίνη C η αλλιώς ασκορβικό οξύ είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη και δεν αποτελεί ενδογενές στοιχείο του οργανισμού ,αντίθετα η πρόσληψη της στον οργανισμό είναι διατροφικό συστατικό. <sup>[60]</sup> Αποτελεί ένα κύριο αντιοξειδωτικό στοιχείο για την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες χάρη του ηλεκτρονίου που διαθέτει και έτσι καταφέρνει να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που σχηματίζονται . <sup>[60]</sup> <sup>[61]</sup> Αντίστοιχα η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη που εντοπίζεται στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και λαμβάνει μέρος σε διάφορες από τις βιολογικές διαδικασίες του κυττάρου. <sup>[62]</sup> Η δράση της στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού περιλαμβάνει την απομάκρυνση του υπεροξειδίου και την σύνθεση μιας ρίζας από την οποία στην συνέχεια θα μπορέσει να απαλλαχτεί με την συμβολή της βιταμίνης C. <sup>[63]</sup> Συγκεκριμένα η βιταμίνη E μπορεί να οξειδωθεί και να μετατραπεί σε ρίζα τοκοφεροξυλίου το οποίο στην συνέχεια μπορεί να αναστραφεί με τη παρέμβαση του ασκορβικού οξέος και την δωρεά ενός μορίου υδρογόνου <sup>[63]</sup> <sup>[64]</sup> . Η προστασία που παρέχει ως προς τα οξειδωτικά στοιχεία είναι η ρύθμιση και διασφάλιση της ενεργότητας των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. <sup>[60]</sup>

## **2.3. Χημικές μεταβολές**

Η μη διατήρηση της ισορροπίας της οξειδοαναγωγικής κατάστασης θέτει τα RBCs σε έντονο οξειδωτικό στρες και κατ' επέκταση σε διέγερση του καταρράκτη αντιδράσεων ερυθρόπτωσης. Η συσσώρευση οξειδωτικών μορίων στα ερυθρά αιμοσφαίρια κινητοποιεί αρχικά τα κανάλια κατιόντων  $Ca^{+2}$  με αποτέλεσμα την εισροή ιόντων στο εσωτερικό τους . <sup>[65]</sup> Στην συνέχεια ακολουθεί η ενεργοποίηση των καναλιών  $K^-$  με απώλεια ιόντων  $Cl^-$  και ενδοκυττάρου νερού συμβάλλοντας στην ελάττωση του μεγέθους των ερυθρών αιμοσφαιρίων . <sup>[66]</sup> Έπειτα παρατηρείται η ευαισθητοποίηση της μεμβράνης σε ιόντα ασβεστίου με έκθεση του μορίου της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των κυττάρων , αποπτωτικό στοιχείο σηματοδότησης φαγοκυττάρωσης. <sup>[67]</sup>

## **2.4.α. Ερυθρόπτωση ως αίτιο οξειδωτικού στρες σε απώλεια σιδήρου**

Το οξειδωτικό στρες εντοπίζεται σε διάφορες καταστάσεις σχετιζόμενο με την ερυθρόπτωση όπως είναι η απώλεια σιδήρου. <sup>[68]</sup> Μια από τις πιο κοινές αιτίες αναιμίας είναι η ανεπάρκεια σιδήρου στον οργανισμό σε νοσηρές καταστάσεις, λόγω της πρόωρης καταστροφής των ερυθρών αιμοσφαιρίων εξαιτίας μη επαρκούς ποσότητας σιδήρου για την σύνθεση τους. <sup>[44]</sup> Έρευνες απέδειξαν ότι η μειωμένη παρουσία σιδήρου αύξησε την εξωτερίκευση της PS από την εσωτερική στιβάδα προς την κυτταρική επιφάνεια. <sup>[68]</sup> Το οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί την δράση των καναλιών κατιόντων και των επακόλουθων βημάτων άρα, την απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων από την

κυκλοφορία του οργανισμού λόγω έλλειψης σιδήρου και τελικά την έκφραση αναιμίας.  
[44]

#### **2.4.β. Ερυθρόπτωση ως αίτιο οξειδωτικού στρες σε αρτηριακή υπέρταση και υπερλιπιδαιμία**

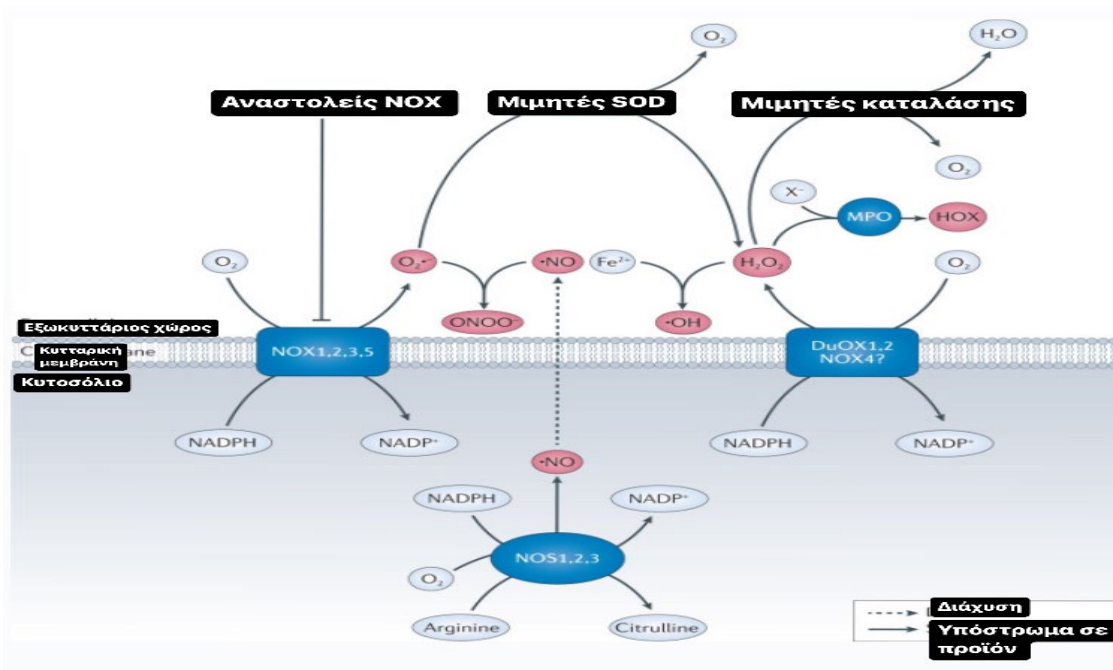
Επιπλέον η αυξημένη παρουσία λιπιδικών μορίων στο αίμα γνωστή ως υπερλιπιδαιμία η οποία πολλές φορές συνυπάρχει με την υπέρταση συντελούν αιτίες οξειδωτικού στρες.  
[44] Βάση μελετών που πραγματοποιήθηκαν εξετάστηκαν ασθενείς με τις συγκεκριμένες κλινικές εκδηλώσεις (αυξημένη συστολική ή διαστολική πίεση ,αυξημένη συγκέντρωση LDL,HDL και τριγλυκεριδίων στο αίμα) και παρατηρήθηκε ότι διέθεταν χαμηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικού παράγοντα GSH και άρα αυξημένη υπεροξείδωση των λιπιδίων της μεμβράνης . [69] Εκτός από τις μειωμένες συγκεντρώσεις γλουταθειόνης παρατηρήθηκε και ελλιπής δράση των υπόλοιπων προστατευτικών μορίων ενάντια στις οξειδωτικές συνθήκες όπως GPX , CAT και SOD. [70] Επιπλέον, σε αυτούς τους ασθενείς παρατηρήθηκε ακόμη πιο έντονη δραστηριότητα των καναλιών κατιόντων ασβεστίου με είσοδο ιόντων στο κυτταρόπλασμα τους . [44] Ως αποτέλεσμα ήταν επιρρεπείς στην έκφραση των δεικτών ερυθρόπτωσης σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα . Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι μια ακόμη περίπτωση νοσηρότητας όπου αναφέρεται το οξειδωτικό στρες ως αιτία βλάβης και ερυθρόπτωσης. [71] [72] Τα ερυθρά αιμοσφαίρια των συγκεκριμένων ασθενών εμφανίζουν συχνότερη έκφραση του μορίου της PS στην επιφάνεια τους σηματοδοτώντας τη διαδικασία φαγοκυττάρωσης τους και την απομάκρυνση από την κυκλοφορία του αίματος. Η αύξηση αυτή της απόπτωσης των ερυθρών ενισχύεται ε με το σχηματισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου . [72]

#### **2.5. Διαγνωστικοί βιοδείκτες**

Σύμφωνα με την καταστροφή που προκαλεί το οξειδωτικό στρες στα μακρομόρια του οργανισμού όπως προαναφέρθηκε προηγουμένως έχουν ταυτοποιηθεί ορισμένοι βιοδείκτες που βοηθούν στην κλινική ανίχνευση . Οι κυτταρικές μεμβράνες συγκροτούνται από λιπίδια τα οποία είναι ευαίσθητα στην έντονη οξείδωση λόγω των ROS σε συνθήκες οξειδωτικού στρες που εκτίθενται με αποτέλεσμα να υφίστανται μη αναστρέψιμη κυτταρική βλάβη. [55] Το TH (total hydroperoxide) είναι ένας δείκτης ικανός να μετράει τα ενδιάμεσα προϊόντα των λιπιδίων και πεπτιδίων που υπάρχουν και να προσδιορίζει τον βαθμό οξείδωσης στον οργανισμό. [55] Έπειτα η μαλονδιαλδεΰδη (MDA) είναι ένα μόριο με αυξημένη κυτταροτοξική δράση λόγω την ικανότητας της να δεσμεύει σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα πρωτεΐνες και λιπίδια και γι' αυτό χρησιμοποιείται ως δείκτης ανίχνευσης υπεροξείδωσης των κορεσμένων λιπιδίων της πρωτεϊνικής μεμβράνης. [73] Βέβαια δεν διαθέτει εξειδίκευση για την συγκεκριμένη διεργασία και έτσι απαιτείται ο συνδυασμός υπολοίπων βιοδεικτών . [74] Σε αντίθεση με την αλδεΰδη 4-υδροξυ-2-νενεάλη (4-HNE) θεωρείται ένας από τους πιο αξιόπιστους δείκτες όπου

συνήθως ανιχνεύεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ σε φυσιολογικές τιμές παρατηρείται νέκρωση και απόπτωση των κυττάρων. [55] Στο οξειδωτικό στρες επηρεάζει τον μεταβολισμό την γλουταθειόνης, ενεργοποιεί την σύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και δημιουργεί ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ πρωτεϊνών κυστεΐνης που περιέχουν θειόλη και συμβάλλουν στην οξειδοαναγωγή παρεμβαίνοντας στον μηχανισμό της. [55] [75] [76]

Η αλλαντοΐνη είναι ένας ακόμη αξιόπιστος βιοδείκτης προσδιορισμού και επιβεβαίωσης του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό. [77] Αποτελεί το τελικό μη ενζυμικό προϊόν της οξείδωσης του ουρικού οξέος με την συμβολή των δραστικών ριζών οξυγόνου και αζώτου (ROS/RNS). [78] [79] Εξαιτίας της σταθερότητας της είναι εύκολη στην κλινική της διάγνωση καθώς παραμένει ανεπηρέαστη από τις μεταβολές στη συγκέντρωση του ουρικού οξέος. [80] Το ουρικό οξύ με την σειρά του προκύπτει ως το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών και είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών αζώτου και οξυγόνου από τον οργανισμό. [80] Αντίστοιχα τα ROS παρεμβαίνουν στην δομή και κατά επέκταση στην λειτουργικότητα των πρωτεϊνών. [55] Η οξείδωση που υφίστανται τα πρωτεϊνικά μόρια έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών με την είσοδο καρβονυλικών ομάδων στις πεπτιδικές τους αλυσίδες. [55] Σχηματίζονται μόρια τα οποία ονομάζονται τελικά προϊόντα υψηλής μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης και προέρχονται από τις αντιδράσεις αναγωγής των σακχάρων από ελεύθερες αμινομάδες μακρομορίων όπως πρωτεϊνών, λιπιδίων και γενετικού υλικού. [81] Η ποσοτικοποίηση του καρβονυλίου επιτρέπει την ταυτοποίηση της βλάβης των πρωτεϊνών της μεμβράνης των κυττάρων εξαιτίας του οξειδωτικού στρες που υπέστησαν. [55]



(Εικόνα 2) <sup>[60]</sup> Ενζυμικές πρωτεϊνικές μορφές άμυνας των ερυθρών έναντι του οξειδωτικού στρες . Η παραγωγή υπεροξειδίου μέσω της μεμβρανικής NADPH οξειδάσης μπορεί να ανασταλεί με την πρόσδεση αναστολέων NOX. Μέσω μιμητικών μορίων της δράσης της SOD το O<sub>2</sub> μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου με αποφυγή σχηματισμού ONOO. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που σχηματίζεται μειώνεται μέσω της δράσης μιμητών καταλάσης με αποφυγή σχηματισμού ενώσεων HOX .

### **3.ΓΗΡΑΝΣΗ**

#### **3.1.Γηρανση γενικά – φαγοκυττάρωση γερασμένων ερυθρών**

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια ως κύτταρα με απουσία των κύριων κυτταρικών τους οργανιδίων μπορούν και διατηρούν ζωτικές λειτουργίες όπως είναι η κυτταρική σηματοδότηση, η αναερόβια γλυκόλυση και η ερυθρόπτωση οι οποίες τα καθιστούν πιο εύχρηστα για μελέτη του μηχανισμού γήρανσης ως μοντέλο σύγκρισης με τα υπόλοιπα εμπύρνηνα κύτταρα . <sup>[82]</sup> <sup>[83]</sup> Η απομάκρυνση και η εκκαθάριση των ερυθρών αιμοσφαιρίων από την κυκλοφορία του αίματος πραγματοποιείται με δύο τρόπους ,είτε αυτή αφορά τα γερασμένα κύτταρα του αίματος που υπέστησαν φυσιολογική φθορά με το πέρας του χρόνου , είτε κύτταρα που υπέστησαν βλάβη από ενδογενής ή εξωγενής παράγοντες πριν την ολοκλήρωση του προσδόκιμου ζωής τους . <sup>[84]</sup> <sup>[85]</sup> Η απομάκρυνση των γερασμένων κυττάρων από το αίμα πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο από ένα λεμφικό όργανο που ονομάζεται σπλήνας. <sup>[86]</sup> Ο χώρος που πραγματοποιείται η εκκαθάριση των εκφυλισμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι ο κόκκινος πολφός του σπλήνα . Ο ερυθρός πολφός είναι πλούσιος σε σπληνικά μακροφάγα τα οποία έχουν ως σκοπό να αναγνωρίσουν και να προωθήσουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια προς τους σπληνικούς κόλπους όπου είναι και το σημείο που τελικά θα φαγοκυτταρωθούν . <sup>[87]</sup> Αν και ο σπλήνας είναι απαραίτητο όργανο για την αιμοποίηση αλλά ταυτόχρονα και για την εκκαθάριση του οργανισμού από τα κατεστραμμένα ερυθρά αιμοσφαίρια μένει να επιβεβαιωθεί η συμβολή του στα γερασμένα κύτταρα του αίματος. <sup>[87]</sup> Επομένως παρατηρείται ένα σύνολο δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένους βιοδείκτες και αντικατοπτρίζουν τις μεταβολές των ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά το πέρας του χρόνου .

#### **3.2. Μέθοδος ηλικιακής ταξινόμησης**

Για την ανάλυση και μελέτη των βιοδεικτών που αφορούν τις μορφολογικές και χημικές αλλοιώσεις των RBCs κατά την αναπτυξιακή τους πορεία μέχρι να επέλθει ο φυσιολογικός τους θάνατος, τα κύτταρα μελετώνται με διάφορους τρόπους . Η συχνότερη μέθοδος διαχωρισμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων που χρησιμοποιείται με βάση την ηλικία των κυττάρων , βασίζεται στην πυκνότητά τους με χρήση ενός υλικού που ονομάζεται Percoll σε συνδυασμό με φυγοκέντρωση η οποία βασίζεται στην

μεταβλητότητα του όγκου. <sup>[88] [89]</sup> Με το πείραμα αυτό αποδείχθηκε ότι με το πέρας της χρονικής διάρκειας ζωής των κυττάρων γίνονται πιο πυκνά και βάση αυτής την τεχνική θα μπορούσε να γίνει η αρχική διάκριση της ηλικίας και έπειτα η μελέτη περαιτέρω δεικτών γήρανσης. <sup>[87] [88]</sup> Όμως όπως αποδείχθηκε αργότερα δεν αποτελεί το μοναδικό κριτήριο διάκρισης και ταξινόμησης των γερασμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων καθώς υπήρξαν παράγοντες που ανέστρεψαν τη θεώρηση αυτή, όπως το μηχανικό στρες που μπορεί να υποστούν πριν τη γήρανσή τους και τελικά να μεταβάλει την κατανομή της πυκνότητάς τους. <sup>[89] [91]</sup>

### **3.3. Φυσικοχημικές μεταβολές –βιοδείκτες γήρανσης**

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια όπως προαναφέρθηκε είναι υπεύθυνα για την μεταφορά του οξυγόνου στους ιστούς του σώματος με καθοριστικό παράγοντα της ιδιότητας αυτής το σχήμα τους. Η διατήρηση της ικανότητας τους να μεταβάλουν το σχήμα τους εξασφαλίζεται από τον υπομεμβρανικό κυτταροσκελετό ο οποίος αποτελείται από ένα σύμπλεγμα ελαστικών πρωτεϊνών. <sup>[92]</sup> Επομένως ένα πρώτο χαρακτηριστικό της εκφύλισης των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η μορφολογία και κατά επέκταση η μείωση της παραμορφωσιμότητάς τους εξαιτίας της σταδιακής απώλειας της κυτταρικής τους μεμβράνης καθιστώντας τα τελικά επιρρεπή στην απομάκρυνσή τους από όργανα όπως ο σπλήνας όπου εκεί τα κύτταρα χρειάζεται να διέλθουν από πολύ μικρής διαμέτρου αγγεία. <sup>[93]</sup> Αυτό οδηγεί στην δημιουργία συσσωματωμάτων ερυθρών αιμοσφαιρίων λόγω της αδυναμίας προώθησής τους δια μέσου των αγγείων και την καταστροφή τους στο σημείο αυτό. <sup>[87]</sup> Η διέλευση των RBCs από την μικροκυκλοφορία υπό φυσιολογικές συνθήκες τα υποβάλει σε συνεχή καταπόνηση και αλλαγή του αμφίκυκλου σχήματός τους το οποίο εξαιτίας της ελαστικότητας και ευκαμψίας της μεμβράνης εξασφαλίζει την ακεραιότητά τους. <sup>[87]</sup> Χωρίς να υπάρχει κάτι απόλυτα αποδεδειγμένο για τις αιτίες της μειωμένης παραμόρφωσης της δομής των κυττάρων πολύ πιθανόν να εμπλέκονται αλλοιώσεις στην ελαστικότητα της πλασματικής μεμβράνης όπως και στο κυτταροπλασματικό ιξώδες εξαιτίας της λιπιδιακής αναδιάταξης της μεμβράνης. <sup>[87] [93]</sup> Παράλληλα έχει παρατηρηθεί μια δυσαναλογία μεταξύ της εξωτερικής κυτταρικής επιφάνειας και του όγκου των ερυθρών αιμοσφαιρίων επακόλουθη της κυστιδοποίησης της μεμβράνης η οποία συμβάλει και αυτή στην ακαμψία και την ευθραυστότητα των κυττάρων. <sup>[94] [95]</sup> Η μείωση του όγκου τους που εντοπίζεται με μια ταυτόχρονη χαρακτηριστική αύξηση της πυκνότητας των κυττάρων κατά την γήρανση οφείλεται στην απώλεια ορισμένων συστατικών του κυτοσολίου και εκροής ενδοκυττάριου νερού. <sup>[96]</sup>

#### **3.3.α. Ζώνη 3 – δείκτης IgG**

Η φυσαλιδοποίηση της μεμβράνης περιλαμβάνει το σχηματισμό κυστιδίων τα οποία περιέχουν ποσότητες φωσφατιδυλοσερίνης, ανοσοφαιρίνης IgG και ουσιών διάσπασης



της ζώνης-3 .<sup>[92] [97] [98]</sup> Η ζώνη-3 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη υπεύθυνη για την διατήρηση του σχήματος του κυττάρου λόγω της σύνδεσης της μεμβράνης με τον κυτταροσκελετό μέσω αλληλεπιδράσεων της με την ζώνη-4 και την αγκυρίνη , την αλληλεπίδραση των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών με τη μεμβράνη χάρη της παρουσίας του αμινοτελικού της άκρου στο κυτταρόπλασμα και την διατήρηση της ιοντικής ομοιόστασης του κυττάρου ως ανιονανταλλάκτης .<sup>[87] [92]</sup> Η πρωτεολυτική διάσπαση της ζώνης-3 και η δημιουργία στιβάδων της εξαιτίας της οξειδωμένης και μετουσιωμένης αιμοσφαιρίνης που προσκολλάται στην μεμβράνη προωθεί την έκφραση αντιγονικών επίτοπων στα ερυθρά αιμοσφαίρια προσελκύνοντας την δέσμευση αντισωμάτων της τάξης IgG .<sup>[99] [100]</sup> Συγκεκριμένα η αποδιοταγμένη αιμοσφαιρίνη δημιουργεί αιμοχρώματα τα οποία συγκεντρώνονται στην περιοχή της μεμβράνης του κυττάρου με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του συσσωματώματος της ζώνης-3 και κατά επέκταση στην έκφραση των αντιγόνων<sup>[101] [102] [103]</sup> (Εικόνα 4) . Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα αντιγόνα αυτά βρίσκονται στην περιοχή της ζώνης-3 , όπου έπειτα με διάφορες τροποποιήσεις που υφίσταται η δομή και η αρχιτεκτονική της μεμβράνης των κυττάρων , αυτός ο αντιγονικός επίτοπος γίνεται προσβάσιμος στην προσέλκυση των φυσικών αντισωμάτων.<sup>[104] [105]</sup> Η σύζευξη αυτή των αυτοαντισωμάτων IgGs με τα αντιγόνα της επιφάνειας των γερασμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελεί σήμα φαγοκυττάρωσης και οψωνισμού των εκφυλισμένων RBC από τα μακροφάγα και μονοκύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος .<sup>[106] [107]</sup>

### **3.3.β1 Οξειδωτικό στρες δείκτης caspases-3 – δείκτης ROS**

Η συσσώρευση δραστικών ριζών οξυγόνου από οξειδωμένες μορφές πρωτεϊνών όπως η μεθαιμοσφαιρίνη στο κυκλοφορικό σύστημα είτε η έκθεση των RBCs σε εξωγενείς οξειδωτικούς παράγοντες αλλά και η μειωμένη απόκριση της αντιοξειδωτικής άμυνας σηματοδοτούν την γήρανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στον οργανισμό.<sup>[87] [108]</sup> Ο τρόπος με τον οποίο το οξειδωτικό στρες επηρεάζει άμεσα την διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης πραγματοποιείται μέσω της διαταραχής της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου  $Ca^{+2}$ , είτε μέσω της ενεργοποίησης κασπάσης 3 , είτε μέσω της συσσωμάτωσης της ζώνης-3 και ενεργοποίησης ειδικών αντιγόνων όπως προαναφέρθηκε παραπάνω .<sup>[85] [100] [109]</sup> Αρχικά οι ενεργοποιημένες κασπάσες 3 και 8 όπως και ο σχηματισμός του συμπλέγματος Fas στην λιπιδιακή στιβάδα που εντοπίζονται στα γερασμένα ερυθρά αιμοσφαίρια θα μπορούσε να οδηγήσει στην διατάραξη της ζώνης-3 και τελικά στην εξωτερίκευση της PS ως δείκτης γήρανσης των κυττάρων.<sup>[110]</sup> Συγκεκριμένα μελετήθηκε η δράση της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 υπό την επίδραση του οξειδωτικού στρες στον έλεγχο των γερασμένων κυττάρων με εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης μέσω της ικανότητας της να ρυθμίζει την δραστηριότητα και κυρίως την αναστολή της φλιπάσης .<sup>[111]</sup> Βέβαια μια τέτοιου είδους θεώρηση βασίζεται σε

αλληλεπίδραση της κασπάσης 3 των ερυθρών με την ζώνη-3 και την φωσφατιδυλοσερίνη σε πειράματα που έχουν πραγματωθεί σε εργαστηριακό επίπεδο παροτρύνοντας την περαιτέρω *in vivo* μελέτη των RBCs .<sup>[111] [112]</sup>

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια προκειμένου να οξυγονωθούν και να μεταφέρουν επιτυχώς το οξυγόνο στον οργανισμό απαιτούν την παρουσία ανηγμένου σιδήρου ( $Fe^{+2}$ ) στο μόριο της αίμης .<sup>[92]</sup> Η μη οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη συνδέεται σε θέσεις υψηλής συγγένειας της ζώνης-3, στο αμινοτελικό της άκρο που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, αυξάνοντας το ποσοστό αυτοοξειδωσης της .<sup>[92]</sup> Η οξείδωση του δισθενούς σιδήρου της αιμοσφαιρίνης σε τρισθενή σίδηρο οδηγεί στη σύνθεση της οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης και στην παραγωγή ιόντος υπεροξειδίου .<sup>[87] [92]</sup> Η σύνθεση του υπεροξειδίου πραγματοποιείται με δυο τρόπους, μέσω των ενζύμων NADPH που εντοπίζονται εσωτερικά των ερυθρών αιμοσφαιρίων ή μέσω αντίδρασης NOS όταν η συγκέντρωση της L-αργινίνης είναι μειωμένη (Εικόνα 3) .<sup>[113] [114]</sup> Πέρα από την αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης τα ερυθρά αιμοσφαίρια εκτίθενται και σε εξωτερικά οξειδωτικά μόρια τα οποία οξειδώνουν την αιμοσφαιρίνη αλλά και τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης των κυττάρων .<sup>[115]</sup> Το παραγόμενο υπεροξείδιο ( $O_2$ ) από τις οξειδωτικές αυτές αντιδράσεις αλληλεπιδρά τόσο με τη SOD σχηματίζοντας υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) όσο και με το διαθέσιμο μονοξείδιο του νατρίου (NO) συνθέτοντας υπεροξυνιτρώδες ONOO- .<sup>[92]</sup> Η σύνθεση του μονοξειδίου του νατρίου οφείλεται είτε σε εξωγενή προέλευση στο κυκλοφορικό σύστημα είτε ως παράγωγο της συνθάσης του μονοξειδίου του νατρίου που εντοπίζεται ενδοκυτταρικά ως e NOS .<sup>[116]</sup> Η δράση αυτού του ισχυρού οξειδωτικού ONOO- στην σηματοδότηση της γήρανσης είναι η εξής, ένα τμήμα του υπεροξυνιτρώδους αντιδράει με την οξυαιμοσφαιρίνη με σκοπό να σχηματιστεί μεθαιμοσφαιρίνη και νιτρικά όπως και ελάχιστες ποσότητες φερρυλαιμοσφαιρίνης και διοξειδίου του νατρίου ( $NO_2$ ) .<sup>[117]</sup> Οι χημικές αυτές ενώσεις που συντίθενται επηρεάζουν την μορφολογία της μεμβράνης των RBCs ως ισχυρά οξειδωτικά μόρια ενεργοποιώντας τα φαγοκυτταρικά σήματα (κασπάση-3, PS, ζώνη 3) .<sup>[118] [119]</sup> Παράλληλα με τα οξειδωμένα προϊόντα που προκύπτουν από τις παραπάνω αντιδράσεις που αναφέρθηκαν, παρατηρείται σχηματισμός προϊόντων αποικοδόμησης της αίμης ως απόρροια οξειδωτικού στρες στα ερυθρά αιμοσφαίρια .<sup>[120]</sup> Η παραγόμενη φερρυλαιμοσφαιρίνη αντιδράει με το υπεροξείδιο του υδρογόνου προς την σύνθεση δραστικής ρίζας υπεροξειδίου το οποίο εν τέλει ανοικοδομεί την αίμη και απελευθερώνει το σίδηρο .<sup>[120] [121] [122]</sup> Η παρουσία ελεύθερου σιδήρου αναφέρθηκε ως παράγοντας προσέλευσης των ανοσοσφαιρινών IgG στα RBCs .<sup>[123]</sup> Αν και πολλές από τις μεταβολές που αναφέρονται να διαδραματίζονται κατά την διάρκεια του οξειδωτικού στρες στην γήρανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι αμφιλεγόμενες, η ικανότητα των

κυττάρων να αντιτίθενται σε δραστικές μορφές οξυγόνου φαίνεται στην πραγματικότητα να ελαττώνεται παράλληλα με την διάρκεια ζωής του ερυθρού αιμοσφαιρίου .<sup>[124]</sup>

### 3.3.γ Ενδοκυττάρια ιόντα $Ca^{+2}$ - εξωτερίκευση δείκτη PS

Σε ορισμένα κύτταρα τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης τους είναι τοποθετημένα ασύμμετρα με χαρακτηριστική την παρουσία του φωσφολιπιδίου σφυγγομυελίνης ( SM : *Sphingomyelin* ) και φωσφατιδυλοχολίνης ( PC : *Phosphatidylcholine* ) στην εξωτερική στοιβάδα , ενώ στην εσωτερική στοιβάδα συναντιούνται κυρίως η φωσφατιδυλοσερίνη ( PS : *Phosphatidylserine* ) και η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη ( PE : *Phosphatidylethanolamine* ) .<sup>[125]</sup> (Εικόνα 5) Ένζυμα η δράση των οποίων εξαρτάται από το σχηματιζόμενο ATP όπως είναι οι φλιπάσες είναι υπεύθυνες για την μετακίνηση των λιπιδίων από την εξωτερική στοιβάδα της μεμβράνης του κυττάρου προς την εσωτερική πλευρά, σε αντίθεση με τις φλοπάσες που καταλύουν την ακριβώς ανάστροφη κίνηση των λιπιδίων από την εσωτερική επιφάνεια του προς την εξωτερική.<sup>[126] [127]</sup>

Συγκεκριμένα, παρουσία ενδοκυτταροπλασματικού ιοντικού ασβεστίου ευαισθητοποιείται μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη , η σκραμπλάση , η οποία είναι υπεύθυνη να διατηρεί την ασυμμετρία της διπλοστιβάδας της πλασματικής μεμβράνης επιτρέποντας στα φωσφολιπίδια να κινούνται μέσα σε αυτήν .<sup>[128] [129] [130]</sup> Με την ενεργοποίηση του ενζύμου αυτού από την μεταβολή της συγκέντρωσης των  $Ca^{+2}$  στα κύτταρα προκαλείται εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική στοιβάδα και ταυτόχρονα αναστολή της φλιπάσης.<sup>[131]</sup> Έπειτα από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν διαπιστώθηκε ότι η διεγερσιμότητα των αντλιών ασβεστίου της μεμβράνης ελαχιστοποιείται σταδιακά με την ηλικία των κυττάρων.<sup>[132]</sup> Βάση των δεδομένων που προέκυψαν από τις έρευνες , τα νεαρά ερυθρά αιμοσφαίρια διαθέτουν αυξημένη δραστικότητα αντλιών ασβεστίου σε σχέση με τα ώριμα , όμως παρατηρείται μικρότερη συγκέντρωση ενδοκυττάρου ασβεστίου στο κυτοσόλιο τους .<sup>[133]</sup> Βέβαια η αναλογική σχέση μεταξύ του ενδοκυττάρου ασβεστίου και της έκφρασης της φωσφατιδυλοσερίνης δεν έχει επιβεβαιωθεί στην φυσιολογική γήρανση των κυττάρων.<sup>[85]</sup> Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι κύτταρα τα οποία εμφανίζουν κάποια αύξηση του φωσφολιπιδίου στην μεμβράνη δεν έχουν αντίστοιχη αύξηση του κυτοσολικού ασβεστίου σε συνάρτηση με την ηλικία τους .<sup>[134]</sup> Ένας από τους παράγοντες που δυσκολεύει αυτήν την συσχέτιση αποτελεί η γρήγορη απομάκρυνση των σηματοδοτημένων ερυθρών αιμοσφαιρίων με PS από τα μακροφάγα του σπλήνα και του ήπατος , με αποτέλεσμα να μην μπορούν να μελετηθούν σε σύγκριση με την περιεκτικότητά τους σε ιόντα  $Ca^{+2}$  .<sup>[135]</sup>

Παρόλα αυτά όπως αναφέρθηκε προηγουμένως κατά την ερυθρόπτωση οι αντίστοιχες μεταβολές του ενδοκυττάρου ασβεστίου αποτελούν αιτία απομάκρυνσης των μη

λειτουργικών ερυθρών αιμοσφαιρίων .<sup>[10]</sup> Η διατάραξη της συγκέντρωσης του στο ενδοκυττάριο χώρο και οι οδοί σηματοδότησης του (π.χ PEG2,PKC) ,υποβάλλουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε εκδήλωση φαγοκυτταρικών και αποπτωτικών σημάτων .<sup>[10]</sup> Μένει οι φυσικοχημικές αλλαγές των αποπτωτικών κυττάρων ως προς την συγκέντρωση κατιόντων ασβεστίου και του αποπτωτικού σηματοδότη PS να συσχετισθούν με την ηλικιακή φθορά των ερυθρών αιμοσφαιρίων και την φυσιολογική γήρανση με την διεξαγωγή περαιτέρω μελετών βασιζόμενες στα ήδη υπάρχοντα δεδομένα .

### **3.4. Annexin-V**

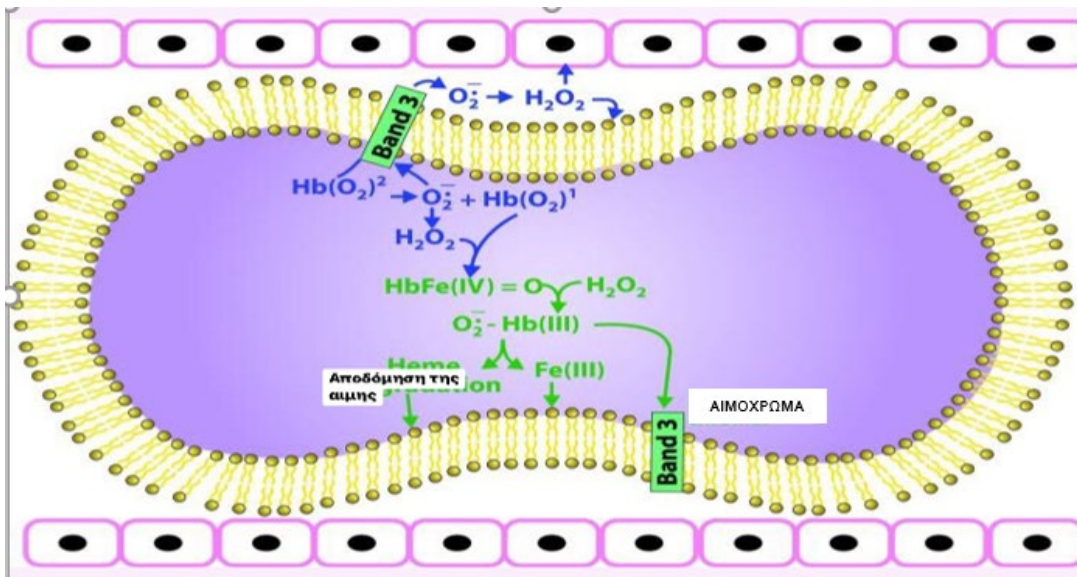
Για την εργαστηριακή ποσοτικοποίηση και ανεύρεση των κυττάρων που εκφράζουν το φωσφολιπίδιο φωσφατιδυλοσερίνη χρησιμοποιείται η φθορίζουσα χρωστική annexin V-PE λαμβάνοντας τα αντίστοιχα σήματα φθορισμού στο κυτταρόμετρο ροής.<sup>[136]</sup> Οι αννεξίνες είναι πρωτεϊνικά μόρια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των κυττάρων όπου η δράση τους εξαρτάται από την παρουσία των ιόντων ασβεστίου καθώς δεσμεύουν τα ιόντα και αλληλοεπιδρούν με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης ανάλογα με την συγκέντρωση του  $Ca^{+2}$  που εντοπίζεται.<sup>[137]</sup> Οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες την μεμβράνης όπως είναι μια από αυτές η διαδικασία επιδιόρθωσης και ανασύστασης της . Η επισκευή της κυτταρικής μεμβράνης απαιτεί την παρουσία εξωκυττάρου ασβεστίου , τον σχηματισμό κυστιδίων αλλά και την μείωση της τάσης της , μέσω της σύναψης της με τον κυτταροσκελετό .<sup>[138] [139] [140]</sup> Η πρωτεϊνική σύσταση των αννεξινών συγκροτείται από τέσσερις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες αμινοξέων και ένα αμινοτελικό άκρο το οποίο τις προσδίδει τις διαφορετικές ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά τους .<sup>[141]</sup> Όλες βρίσκονται σε μια κοινή διάταξη η οποία περιλαμβάνει έναν κύριο πυρήνα με μια καμπυλωτή επιφάνεια δέσμευσης με τα ιόντα ασβεστίου και μια άλλη κοίλη διάταξη από την οποία εκφύεται το αμινοτελικό τους άκρο.<sup>[142]</sup> Συγκεκριμένα ο σχηματισμός της annexin V σε δισδιάστατη μορφή συναντάται σε μεμβράνες που έχουν εκφράσει αρνητικά φορτισμένα λιπίδια στην επιφάνεια τους όπως φωσφατιδυλοσερίνη υπό την επίδραση ενδοκυττάρου ασβεστίου.<sup>[143]</sup>

Η αννεξίνη A5 έχει μελετηθεί για την συμβολή της στην διαδικασία σύντηξης της μεμβράνης έπειτα από κάποια βλάβη .<sup>[140]</sup> Σε καταστάσεις διαρρηγμένης κυτταρικής μεμβράνης από την καταπόνηση των κυττάρων τα ενδοκυττάρια συστατικά αναμιγνύονται με τα εξωκυττάρια υγρά , με αποτέλεσμα το εξωκυττάριο ασβέστιο να εκκινεί την διαδικασία δέσμευσης των μορίων αννεξίνης A5 στο φωσφολιπίδιο PS που συναντάται στις τραυματισμένες πλέον και εκτεθειμένες ως προς την εξωτερική στιβάδα μεμβράνης.<sup>[140]</sup> Μια τέτοια σχέση σύνδεσης που δημιουργείται μεταξύ της annexin V και της PS επιτρέπει στην μεμβράνη να περιορίζει την βλάβη που υπέστη στο σημείο ρήξης της και να διατηρεί την ακεραιότητα της . Αυτό πραγματοποιείται με την ικανότητα της

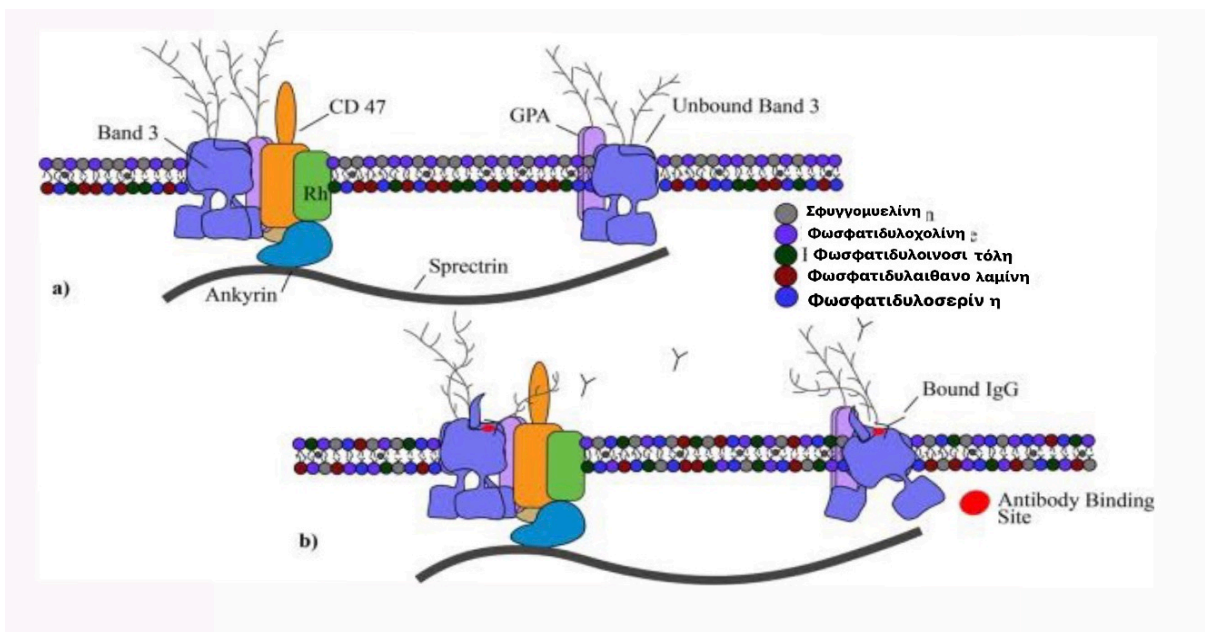
αννεξίνης έπειτα από την σύνδεση της , να σταθεροποιεί την αρχιτεκτονική δομή της μεμβράνης αναστέλλοντας την κίνηση των λιπιδίων μέσω της ακινητοποίησης τους στην θέση τους .<sup>[144]</sup> Η annexin V αυτοσυναρμολογείται σχηματίζοντας δισδιάστατες δομές στα σημεία ρήξης της μεμβράνης προσαρμόζοντας τις ιδιότητες της μεμβράνης ως προς το πάχος , την διαπερατότητα της σε ουσίες και την ακαμψία της με οργάνωση της εξωτερικής της στιβάδας.<sup>[145]</sup> Οι φυσικοχημικές αλλαγές αυτές της μεμβράνης κατά την προσέλευση των μορίων της αννεξίνης και των ιόντων  $Ca^{+2}$  στο σημείο τραυματισμού εξασφαλίζουν στα κύτταρα να διατηρούνται ζωντανά και συνεχίζουν κανονικά την φυσιολογική τους λειτουργία .<sup>[145]</sup> Αντίστοιχα με την διαδικασία αυτή και την συμβολή των αννεξινών στην επιδιόρθωση της κυτταρικής μεμβράνης συμμετέχουν συνδυαστικά και τα ενδοκυτταρικά κυστίδια μέσω σύνδεσης τους με το σημείο της μεμβράνης που υπέστη βλάβη επισφραγίζοντας την επούλωση της .<sup>[146]</sup> Επομένως οι αννεξίνες λειτουργούν ως προστατευτικά μόρια έναντι επιβλαβών επιπτώσεων που προκύπτουν από την διάσπαση των κυττάρων με απελευθέρωση ενδοκυττάριου περιεχομένου στην κυκλοφορία. Ένα αντίστοιχο παράδειγμα αποτελεί η απομάκρυνση των μορίων PS στο αίμα και η ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης .<sup>[147]</sup>



(Εικόνα 3)<sup>[92]</sup> Οξειδωτικό στρες στα ερυθρά αιμοσφαίρια ως παράγοντας γήρανσης και λειτουργικής βλάβης στα κύτταρα .Είτε μέσω ενδογενών οξειδωτικών μορίων που προκύπτουν από την αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης στα αριστερά της εικόνας και οδηγούν σε παραμόρφωση του σχήματος του κυττάρου και ως αποτέλεσμα μειωμένη ροή αίματος λόγω αδυναμίας κυτταρικής παραμόρφωσης . Είτε από ενδογενή οξειδωτικά που εισέρχονται στα RBCs και αντιδρούν με την αιμοσφαιρίνη όπως είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου στα δεξιά της εικόνας και έπειτα οδηγούν σε φλεγμονή .



(Εικόνα 4)<sup>[92]</sup>Ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή οξειδωτικών μορίων που καταλύουν την αυτοοξείδωση της συνδεδεμένης με την μεμβράνη αιμοσφαιρίνης και τον σχηματισμό της μεθαιμοσφαιρίνης. Η μετουσιωμένη αιμοσφαιρίνη που σχηματίζεται δημιουργεί ημικρωμιά η οποία συγκεντρώνεται στην μεμβράνη στην περιοχή της ζώνης 3.



(Εικόνα 5)<sup>[148]</sup>Στην φωτογραφία α απεικονίζεται υπό φυσιολογικές συνθήκες η αρχιτεκτονική δομή της πλασματικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων όπου στην εξωτερική στιβάδα εντοπίζονται τα φωσfolιπίδια της σφυγγομυελίνης και της φωσφατιδυλοχολίνης και διάφορες άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, ενώ η εσωτερική πλευρά της μεμβράνης συγκροτείται από τα φωσfolιπίδια της φωσφατιδυλοσερίνης και της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης. Η ζώνη 3 εντοπίζεται στην μεμβράνη του κυττάρου ως διμερές. Στην φωτογραφία β απεικονίζεται υπό συνθήκες βλάβης του κυττάρου όπου παρατηρείται εξωτερίκευση των φωσfolιπιδίων της εσωτερικής στιβάδας και η διάσπαση της ζώνης 3 με αποτέλεσμα τη έκφραση των αντιγονικών επιτόπων και την προσέλκυση των φυσικών αντισωμάτων σε αυτά της τάξης IgG.

## **4. ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ**

### **4.1. Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα - Γενικά**

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) αποτελούν μια ετερογενή κατηγορία μυελοειδών νεοπλασιών που σχετίζονται με αναποτελεσματική σύνθεση κυττάρων του αίματος λόγω ανεπαρκούς λειτουργίας του μυελού των οστών και σημαντική πιθανότητα κινδύνου εξέλιξης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (acute myeloid leukemia (AML) ανάλογη του υπότυπου του ΜΔΣ .<sup>[149]</sup> <sup>[150]</sup> Η πλειονότητα των ειδών ΜΔΣ είναι ιδιοπαθείς ασθένειες που σχετίζονται με την διαδικασία της γήρανσης στον οργανισμό , ενώ ως προς τις δευτεροπαθείς περιπτώσεις στους παράγοντες κινδύνου της νόσου αναφέρονται η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία , οι κυκλικές αρωματικές ενώσεις όπως το βενζόλιο , το κάπνισμα αλλά και προηγούμενες ανοσκατασταλτικές θεραπείες <sup>[150]</sup> <sup>[152]</sup> Επιπρόσθετοι παράμετροι που οφείλεται η μη λειτουργική αιμοποίηση αποτελούν διάφορες γεννητικές ανωμαλίες και η απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος .<sup>[153]</sup> <sup>[154]</sup> Η μελέτη του καρυότυπου εξαιτίας της ετερογένειας των χρωμοσωμικών δυσμορφιών που παρατηρούνται στα ΜΔΣ είναι κρίσιμο σημείο για την τελική έκβαση του ασθενή και την χορήγηση της απαραίτητης κλινικής αντιμετώπισης .<sup>[155]</sup> Στηριζόμενη σε αυτήν την ανάλυση των χρωμοσωμάτων συγκροτήθηκε ένα σύστημα πρόγνωσης κινδύνου το οποίο κατέταξε τους ασθενείς σε συγκεκριμένες ομάδες ως προς την επιβίωση τους είτε ως προς την μεταλλαγή σε λευχαιμία .<sup>[156]</sup> Στα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου ανήκουν η κυτταροπενία και η χαρακτηριστική δυσπλασία των πρόδρομων βλαστοκυττάρων αλλά και ώριμων κυττάρων του μυελού .<sup>[157]</sup> <sup>[158]</sup> Η κυτταροπενία χρειάζεται να παραμένει σταθερή για πάνω από έξι μήνες προκειμένου να υπάρχει αντικειμενική αξιολόγηση της διάγνωσης αν αποτελεί το μοναδικό εύρημα , διαφορετικά αν εντοπιστούν χρωμοσωμικές δυσμορφίες είτε δυσπλασία σε δυο κυτταρικές σειρές απαιτείται σταθεροποίηση της κυτταροπενίας μόνο για δυο μήνες για την επιβεβαίωση της νόσου .<sup>[159]</sup> Η συχνότητα εμφάνισης των συνδρόμων αυτών εντοπίζεται να συνδέεται με την ηλικία των ασθενών καθώς σε ηλικιωμένους ασθενείς ο επιπολασμός είναι αυξημένος .<sup>[157]</sup> Η διάγνωση της νόσου βασίζεται στην εξέταση επιχρίσματος περιφερικού αίματος αλλά και μυελού των οστών όπως και στην ανάλυση βιοψίας δείγματος μυελού .<sup>[149]</sup> Η αναρρόφηση δείγματος μυελού των οστών και αίματος επιτρέπει την κυτταρική ανάλυση με λεπτομερή χαρακτηρισμό αλλά και την ποσοτικοποίηση των βλαστών που υπάρχουν εκεί .<sup>[151]</sup> Παράλληλα η βιοψία του μυελού επιτρέπει την κατανόηση της αρχιτεκτονικής , της σύστασης των κυττάρων στον μυελό των οστών , τον βαθμό ίνωσης , την κατανομή και τον εντοπισμό πρόδρομων κοκκιοκυττάρων .<sup>[151]</sup> <sup>[160]</sup> Η καταμέτρηση του αριθμού των βλαστών αποτελεί τον βασικό άξονα για την κατανόηση και αξιολόγηση του κινδύνου και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας για τους ασθενείς <sup>[151]</sup> . Οι βλάστες είναι κύτταρα με αυξημένη

πυρηνοκυτταροπλασματική αναλογία με το κυτταρόπλασμα τους να είναι λιγοστό σε σχέση με την πυρηνική συγκέντρωση, εκτός και αν οι βλάστες είναι κοκκιώδεις όπου στην περίπτωση αυτή η κυτταροπλασματική αναλογία υπερτερεί.<sup>[159]</sup> Κλινικά ευρήματα που παρατηρήθηκαν κατά την εξέταση των δειγμάτων του μυελού κατέδειξαν ότι οι ασθενείς εμφανίζουν έναν υπερκυτταρικό μυελό με άτυπα μεγακαρυοκύτταρα, αυξημένη παρουσία σιδηροβλαστών και αναποτελεσματική ωρίμανση της μυελοειδούς σειράς.<sup>[161]</sup> Ενώ η αιματολογική εξέταση περιλαμβάνει την παρουσία μακροκυττάρωσης, ανώριμων ερυθροειδών και μυελοειδών κυττάρων.<sup>[162]</sup>

Όσον αφορά την πρόγνωση των συνδρόμων η δυσπλασία μιας κυτταρικής σειράς φέρει καλύτερη πρόγνωση έναντι της δυσπλασίας πολλών διαφορετικών μυελοειδών κυττάρων, όπως αντίστοιχα ισχύει και με την παρουσία βλαστών στο περιφερικό αίμα και τον μυελό.<sup>[163]</sup> Για την επιβεβαίωση της δυσπλασίας του μυελού των οστών και την τελική κατάταξη των ασθενών στις ομάδες ΜΔΣ, υπάρχουν τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά χαρακτηριστικά.<sup>[152]</sup> Προκειμένου να διαγνωσθεί η δυσμορφία μιας συγκεκριμένης κατηγορίας απαιτούνται τουλάχιστον 10% των πρόδρομων ερυθρών να εμφανίζουν κάποιο είδος δυσπλασίας χωρίς να συμπεριλαμβάνονται σε αυτά τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια είτε να εντοπίζεται ταυτόχρονα ή μη η παρουσία 10% δυσπλαστικών γνωρισμάτων στην κοκκιώδη κυτταρική σειρά συμπεριλαμβανομένων και των ώριμων σε ένα σύνολο 200 κυττάρων κάθε γενιάς.<sup>[152]</sup> Η διαφορετική έκφραση της κλινικής εικόνας αλλά και της παθογένειας των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά νοσήματα οδήγησε στην ανάγκη δημιουργίας και συγκρότησης συστημάτων πρόγνωσης της εξέλιξης της νόσου ως προς τη επιβίωση των ασθενών και ως προς τη μεταλλαγή της σε λευχαιμία ώστε να χορηγηθεί η κατάλληλη θεραπεία και αντιμετώπιση.<sup>[152]</sup>

#### **4.2. Ταξινόμηση ΜΔΣ βάση της French-American-British (FAB)**

Η πρώτη προσπάθεια κατάταξης των υποομάδων των ΜΔΣ πραγματοποιήθηκε από το σύστημα της Γαλλοαμερικάνικη-βρετανική ταξινόμησης (FAB : French-American-British), η οποία περιλάμβανε τις εξής πέντε υποκατηγορίες : 1) ανθεκτική αναιμία (RA : refractory anemia), 2) ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS : RA with ring sideroblasts), 3) ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (RAEB : RA with excess of blasts), 4) ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μεταλλαγή (RAEB-t : RA with excess of blasts in transformation), 5) χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (CMML : chronic myelomonocytic leukemia).<sup>[164]</sup> Η κατηγοριοποίηση των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων βάση αυτού του συστήματος βαθμολόγησης βασίστηκε κυρίως σε μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως ο βαθμός κυτταροπενίας του μυελού των οστών και παράλληλα στην πιθανότητα για μεταλλαγή του συνδρόμου σε λευχαιμία. Αποτέλεσε τον βασικό γνώμονα την κλινικής πρόγνωσης των ασθενών



κατατάσσοντας τους στην μικρότερη ομάδα κινδύνου αυτούς με ανθεκτική αναιμία (RA) , έως αυτούς που έπασχαν από αναθετική αναιμία με περίσσεια βλαστών με μεταλλαγή , με τον υψηλότερο κίνδυνο και άρα το χαμηλότερο προσδόκιμο ζωής. <sup>[164]</sup>

#### **4.3. Ταξινόμηση ΜΔΣ βάση του International prognostic scoring system (IPSS ,IPSS-R)**

Βασιζόμενοι σε αυτά τα δεδομένα που όρισε η FAB που ήδη χρησιμοποιούνταν σε ασθενείς με ΜΔΣ προτάθηκαν προσθετικοί προγνωστικοί παράμετροι που βελτίωσαν και αναβάθμισαν την διάγνωση των νεοπλασιών αυτών . Συστήματα όπως το διεθνές σύστημα προγνωστικής βαθμολόγησης (IPSS : International prognostic scoring system ) εισήγαγε κυτταρογενητικά χαρακτηριστικά που αφορούσαν κλωνικές κυτταρικές μεταλλάξεις πέρα από την καταμέτρηση του αριθμού των βλαστών στον μυελό και την ανάλυση των κυττάρων που εντοπίζονται εκεί. Συγκεκριμένα οι διαγνωστικές μεταβλητές που χρησιμοποιούνταν ήταν ο βαθμός συγκέντρωσης βλαστοκυττάρων , η ανάλυση του καρυότυπου και οι κυτταροπενίες . <sup>[152]</sup> Αργότερα μια τροποποιημένη μορφή του διεθνούς συστήματος το IPSS-R προσδιόρισε πέντε ομάδες γεννητικών ανωμαλιών που πιθανόν ευθύνονταν για την συμμετοχή τους ως παράγοντες κινδύνου του συνδρόμου . <sup>[165]</sup> Συγκεκριμένα οι ομάδες αυτές περιλάμβαναν τις εξής μεταλλάξεις : α) Y del(11q) άτομα με αυτή την χρωμοσωμική μεταλλαγή είχαν τον χαμηλότερο κίνδυνο , β) del(5q) και del(20q) μεμονωμένες ή διπλές τα άτομα ανήκανε στην χαμηλού βαθμού κινδύνου , γ) del(7q) , +8 , +19 οι οποίες κατατάσσουν τα άτομα στο ενδιάμεσο επίπεδο κινδύνου , δ) -7, inv(3)/t(3q)/del(3q) είτε διπλές -7/del(7q) είτε τριπλές ανωμαλίες με υψηλό βαθμό επικινδυνότητας και στην τελευταία ομάδα οι μεταλλάξεις αφορούσαν πάνω από τρεις χρωμοσωμικές ανωμαλίες . <sup>[152]</sup> (Εικόνα 6) Αν και ένα μεγάλο σύνολο μεταλλαγών είναι γνωστό και έχει ταξινομηθεί με βάση την προγνωστική του αξία ένα άλλο τμήμα αυτών δεν έχει γίνει απόλυτα γνωστό για την συμβολή του στην πρόγνωση της πορείας νόσου. <sup>[166]</sup> Ένα πλήθος γονιδίων έχει εντοπιστεί να παρουσιάζει συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε επαναλαμβανόμενες αναλύσεις ασθενών με ΜΔΣ , τα οποία συμμετέχουν σε κρίσιμες λειτουργίες όπως είναι η σηματοδότηση διαφόρων μονοπατιών , η ρύθμιση διεργασιών όπως η μεταγραφή , η επιδιόρθωση βλαβών και η μεθυλίωση του γενετικού υλικού . <sup>[158]</sup> (Εικόνα 7) Συγκεκριμένα το αρχικό σύστημα βαθμολόγησης διαιρούσε τους ασθενείς σε τέσσερις διαφορετικές υποομάδες με βάση τον αντίστοιχο βαθμό επικινδυνότητας που διέτρεχαν . <sup>[165]</sup> Η πρώτη κατηγορία ήταν η χαμηλού βαθμού κινδύνου , ακολουθούσε η intermediate- 1 , η intermediate-2 και τέλος η υψηλού βαθμού κινδύνου . <sup>[165]</sup> Στην συνέχεια όπως προαναφέρθηκε η δεύτερη εξελιγμένη έκδοση του διεθνούς συστήματος πρόγνωσης IPSS-R κατέταξε τους ασθενείς σε πέντε ομάδες δίνοντας μια πιο σαφή και λεπτομερή ταξινόμηση στους νοσούντες των δύο ενδιάμεσων επιπέδων .Επομένως οι ομάδες με την χαμηλότερη επικινδυνότητα ήταν δύο , αυτή με το πολύ χαμηλό βαθμό και εκείνη με τον χαμηλό βαθμό . <sup>[165]</sup>

Αντίστοιχα οι ομάδες υψηλού κινδύνου ήταν και αυτές δύο με την μία να είναι υψηλού κινδύνου και η άλλη πολύ υψηλού , ενώ ανάμεσα από τις δύο ομάδες αυτές χαμηλού και υψηλού δημιουργήθηκε μια ενδιάμεσου επιπέδου στην οποία οι ασθενείς διέτρεχαν στην πραγματικότητα μέση πιθανότητα κινδύνου ΜΔΣ. <sup>[165]</sup> Επιπλέον χαρακτηριστικά πρόγνωσης για τις πέντε κατηγορίες του IPSS-R ως προς την πιθανότητα επιβίωσης των ασθενών με ΜΔΣ αποτέλεσαν η φερριτίνη του ορού και η συγκέντρωση της LDH (Lactate Dehydrogenase) . <sup>[167]</sup> <sup>[168]</sup> Η επίδραση της αυξημένης παρουσίας φερριτίνης στον ορό (1000 ng/ml) χαρακτηρίζεται ως αρνητική παράμετρος των ΜΔΣ και πιθανόν οφείλεται σε προηγούμενες μεταγγίσεις ερυθρών ως θεραπεία , οι οποίες όμως τελικά συμβάλουν σε μεγάλο βαθμό στην υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο και κατά συνέχεια αυτού στις τοξικές επιδράσεις του στον οργανισμό. <sup>[163]</sup>

#### **4.4. Ταξινόμηση ΜΔΣ βάση του WHO Prognostic Scoring System (WPSS)**

Βάση των προυπάρχοντων παραμέτρων της κυτταρογενετικής ταξινόμησης του IPSS , ο Παγκόσμιος οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ) πρότεινε βελτιωμένες αλλά και νέες παραμέτρους πρόγνωσης των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων εξετάζοντας τις ήδη εφαρμοσμένες ως προς την απόδοση και την αποτελεσματικότητά τους . Ο Π.Ο.Υ επαναξιολόγησε το σύστημα προγνωστικής βαθμολόγησης το οποίο τελικά περιλάμβανε οκτώ διαφορετικούς τύπους ΜΔΣ τα οποία βασίζονταν πέρα από την κυτταρογένεια του μυελού των οστών , τον αριθμό των βλαστών και τις χαρακτηριστικές κλωνικές γεννητικές ανωμαλίες που είχαν προστεθεί από τα προηγούμενα πρωτόκολλα , στην ανάγκη μετάγγισης των ασθενών με ΜΔΣ για την καλύτερη έκβαση της νόσου . <sup>[165]</sup> <sup>[169]</sup> (Εικόνα 8) . Στηρίχθηκε επομένως τόσο σε μορφολογικά χαρακτηριστικά όσο και σε γεννητικά , ανοσοφαινοτυπικά προκειμένου να οριοθετήσει κλινικά τις ομάδες των ασθενών . <sup>[170]</sup> Τα κριτήρια αυτά προσδιόριζαν την διάρκεια ζωής των ασθενών και κατά επέκταση την πιθανότητα θνησιμότητάς τους προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για την σωστότερη επιλογή θεραπείας και διαχείρισης τους . <sup>[163]</sup> Αρχικά διατήρησε τις ομάδες των RA και RARS περιγράφοντας τις μορφολογικές δυσμορφίες και δυσπλασίες να εντοπίζονται συγκεκριμένα στην ερυθροειδή σειρά και όχι στις υπόλοιπες . <sup>[170]</sup> Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε η προσθήκη της ομάδας ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία (RCMD : refractory cytopenia with multilineage dysplasia) με χαρακτηριστική διάγνωση την ύπαρξη πάνω από 10% δυσπλαστικά κύτταρα σε δύο ή περισσότερες μυελοειδείς κυτταρικές σειρές , παρουσία βλαστών κάτω από 5% στον μυελό και απουσία ραβδίων Auer .Ενώ αντίστοιχη κλινική εικόνα της RCDM με ταυτόχρονη παρουσία δακτυλοειδών σιδηροβλαστών στον μυελό πάνω από 15 % η διάγνωση των ασθενών χαρακτηρίστηκε ως ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία με δακτυλοειδείς σιδηροβλάστες (RCMD-RS : RCMD with ringed sideroblasts ) . <sup>[170]</sup> Επιπλέον δύο υπότυποι της ομάδας RAEB ,RAEB 1 και 2 με χαρακτηριστικό της

πρώτης υποκατηγορίας το ποσοστό των βλαστών του μυελού να κυμαίνεται μεταξύ 5%-9% και αντίστοιχα της δεύτερης μεταξύ 10%-19% .<sup>[170]</sup> Επίσης ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας προσδιόρισε μια ακόμη κατηγορία αυτή του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου με μεμονωμένη del5q κυτταρογενετική ανωμαλία , η οποία περιλάμβανε την διαγραφή των περιοχών του μεγάλου βραχίονα q21 και q32 του χρωμοσώματος 5 . Η διάγνωση του τελευταίου τύπου ΜΔΣ βασίζεται σε αυξημένη συγκέντρωση μεγακαρυοκυττάρων με υπολοβίωση των πυρηνών τους , παρουσία βλαστών κάτω από 5% στο μυελό τους και την ιδιόμορφη μεταλλαγή του χρωμοσώματος 5 στον καρυότυπο του ασθενούς. <sup>[170]</sup>  
<sup>[171]</sup> Τελευταία κατηγορία είναι η αταξινόμητη μορφή μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου MDS-U (MDS-unclassified) η οποία με την σειρά της περιλαμβάνει τρεις άλλες υποομάδες που είναι οι εξής : είτε συναντάται μαζί με βλάστες περιφερικού αίματος 1% , είτε μαζί με δυσπλασία και πανκυτταροπενία σε μία κυτταρική σειρά , είτε με κυτταρογενετική ανωμαλία που σχετίζεται με την συγκεκριμένη δυσπλασία του μυελού .<sup>[152]</sup> Ενώ σε αυτή εντάσσεται και μια ακόμη ομάδα , αυτή της ανθεκτικής κυτταροπενίας της παιδικής ηλικίας με χαρακτηριστικά κλινικά ευρήματα δυσπλασία σε μια έως τρεις σειρές , κυτταροπενίες περιφερικού αίματος , βλάστες κάτω από 5% και 2% στον μυελό των οστών και στο επίχρισμα περιφερικού αίματος αντίστοιχα .<sup>[152]</sup> Παράλληλα μια βασική διαφορά του (WPSS : WHO Prognostic Scoring System ) ήταν η μείωση του ποσοστού των βλαστών στο περιφερικό αίμα αλλά και τον μυελό για την διάγνωση της οξείας μυελογενής λευχαιμίας περίπου στο 20% με αποτέλεσμα άτομα με το ποσοστό βλαστών που αναφέρθηκε χαρακτηρίστηκαν πάσχοντες λευχαιμίας με κατάργηση της ομάδας RAEB-t του FAB .<sup>[170]</sup>

#### **4.5. Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και γήρανση στα κύτταρα ασθενών με ΜΔΣ**

Κύρια κλινικά γνωρίσματα των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων αποτελούν οι κυτταροπενίες και η μη ρυθμιζόμενη απόπτωση των αιμοποιητικών κυττάρων . Όπως έχει προαναφερθεί η απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ο οποίος συνοδεύεται μαζί με την παρουσία μορφολογικών και λειτουργικών ανωμαλιών έως ότου τα αποπτωτικά κύτταρα να απομακρυνθούν από τον οργανισμό μέσω των μακροφάγων και φαγοκυττάρων .<sup>[172]</sup> Σκοπός των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί όσον αφορά την διαδικασία της ενδομυελικής απόπτωσης στους ασθενείς με ΜΔΣ επιδιώκουν να αναγνωρίσουν και να γνωστοποιήσουν αποπτωτικούς δείκτες πρόγνωσης και διάγνωσης στα πρώτα ακόμα στάδια εξέλιξης της , προκειμένου να υπάρξει η αντίστοιχη αντιμετώπιση των ασθενών . Η δραστηριοποίηση του κυτταρικού θανάτου οφείλεται είτε σε ανοσολογικούς παράγοντες είτε σε βλάβες των στρωματικών και αιμοποιητικών κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος του μυελού απορυθμίζοντας τον κυτταρικό κύκλο και τον φυσιολογικό πολλαπλασιασμό .<sup>[173]</sup> Η απόπτωση στα ΜΔΣ έχει περιγραφεί πιο επιθετική κατά την έναρξη της έκφρασης τους από ότι στα επόμενα

στάδια υψηλότερου κινδύνου μεταλλαγής σε λευχαιμία. <sup>[174]</sup> Η μελέτη γονιδίων που σηματοδοτούν τον κυτταρικό θάνατο επιβεβαιώνει τη συσχέτιση τους με τα ΜΔΣ είτε μέσω υπερέκφρασης τους είτε μέσω μεταλλάξεων σε αυτούς τους γονιδιακούς τόπους . <sup>[175]</sup> <sup>[176]</sup> Από την ανάλυση μελετών έχει βρεθεί αυξημένη συγκέντρωση μακροφάγων στον μυελό των οστών ασθενών με ΜΔΣ , αλλά και υπερέκφραση αποπτωτικών δεικτών όπως του Fas και του παράγοντα Tnf-α ενεργοποιώντας την διαδικασία απόπτωσης των στρωματικών και αιμοποιητικών κυττάρων . <sup>[177]</sup> Βασιζόμενη στην μελέτη που διεξάχθηκε σε πειραματόζωα ως προς την ανακάλυψη μοριακών οδών που ευαισθητοποιούν τους αποπτωτικούς δείκτες έδειξε ότι η υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης MCM2 ήταν ικανή να σηματοδοτήσει την αυτοκαταστροφή των αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού . <sup>[178]</sup> Η πρωτεΐνη αυτή όταν εκφράζεται σε μη φυσιολογικά κύτταρα ξενιστών όπως είναι των συγκεκριμένων στελεχών της έρευνας έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα απόπτωσης στα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού με συνυπάρχουσα λοίμωξη και βλάβη του γενετικού υλικού . <sup>[178]</sup> Έτσι σε ασθενείς με ΜΔΣ διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη αυτή ήταν ανάλογη με την συγκέντρωση των ενεργοποιημένων κασπασών-3 στα αποπτωτικά κύτταρα και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης προσδιορισμού παθολογίας και συνθηκών του μυελού των οστών . <sup>[179]</sup> Η γήρανση είναι μια από τις κυριότερες προδιαθεσικές παραμέτρους εμφάνισης και εξέλιξης των μυελοδυσπλαστικών νοσημάτων καθώς τα γερασμένα συστήματα αιμοποίησης υφίστανται λειτουργική απορρύθμιση η οποία τελικά προάγει την κυτταρική θανάτωση . <sup>[180]</sup> Οι μηχανισμοί που οδηγούν στον κυτταρικό αποσυντονισμό των βιολογικών διεργασιών δεν είναι γνωστό από τι πυροδοτούνται , αν και υπάρχουν εικασίες ότι πιθανόν να οφείλονται σε εξωτερικούς παράγοντες , παρόλα αυτά προκαλούν ένα σύνολο συσσωρευμένων βλαβών (πχ. επιγενετική απορρύθμιση , βλάβες του DNA , μείωση του μήκους των τελομερών ) . <sup>[181]</sup> <sup>[182]</sup> Κατά την εξέλιξη των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων παρατηρούνται λειτουργικές αλλαγές στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα , στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών όπως και του ανοσοποιητικού συστήματος . <sup>[158]</sup> Η διατάραξη της σταθερότητας του γενετικού υλικού οφείλεται στην συσσώρευση λαθών και την αδυναμία επιδιόρθωσης τους με αποτέλεσμα να προωθούν την εξέλιξη την πρόωρης γήρανσης στα κύτταρα και την ανάπτυξη των ΜΔΣ , λόγω αυξημένων σωματικών μεταλλάξεων στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα . <sup>[158]</sup> <sup>[183]</sup> Αντίστοιχη διαδικασία αστάθειας του DNA είναι η βράχυνση των τελομερών τα οποία συμμετέχουν στη πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων μέσω της διαδικασίας της αντιγραφής και επάγουν την κυτταρική εξασθένηση. <sup>[184]</sup> Η επιγενετική απορρύθμιση λόγω γονιδιακών μεταλλάξεων συμβάλει στην συσσώρευση βλαβών στο κύτταρο μέσω της επίδρασης της , στην μεθυλίωση του γενετικού υλικού . Ένα βασικό γνώρισμα της γήρανσης είναι η διατάραξη της διαδικασίας της μεθυλίωση

του DNA όπως και άλλων πρωτεϊνών επομένως πολύ πιθανόν να σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη των μυελοδυσπλαστικών νοσημάτων .<sup>[185][186]</sup> Οι μεταλλαγές των γονιδίων που ρυθμίζουν τη συναρμογή του RNA και το άθροισμα των βλαβών κατά την μετάφραση των πρωτεϊνών επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την λειτουργία των μιτοχονδρίων που συνδέεται με την παθολογία των ΜΔΣ μέσω της αύξησης δραστικών μορφών οξυγόνου και της γενικότερης μεταβολικής ασυμφωνίας .<sup>[187][188]</sup> Οι αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών αποτελούν μια από τις κυριότερες παραμέτρους ανάπτυξης ΜΔΣ σε συνάρτηση με την κυτταρική γήρανση . Ένα απορυθμισμένο μικροπεριβάλλον με αναποτελεσματική αιμοποιητική ικανότητα και εξασθενημένα γερασμένα βλαστοκύτταρα αντανakλούν απευθείας στην κλινική εικόνα των μυελοειδών νεοπλασιών .<sup>[189]</sup> Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα συνδέονται με διαταραγμένο ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών εκφρασμένο είτε με υπερευαισθησία σε φλεγμονώδεις καταστάσεις είτε με ανεπαρκή ανοσολογική απόκριση του οργανισμού σε αντίστοιχα ερεθίσματα .<sup>[183]</sup> Τα δυσπλαστικά μυελοειδή κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν ανοσολογικές αντιδράσεις ως απόκριση της αύξησης του πληθυσμού τους είτε ορισμένες φορές και το αντίστροφο και κατ' επέκταση της πυροδότηση παρατεταμένων φλεγμονωδών καταστάσεων σχετιζόμενες με την κυτταρική φθορά .<sup>[190]</sup> Παρότι πολλά από τα γνωρίσματα και τις επιπλοκές που υπάρχουν στην διαδικασία της φυσιολογικής γήρανσης εντοπίζονται και στην εξέλιξη αυτού του είδους νεοπλασιών δεν είναι ακόμη σίγουρο αν μπορεί να θεωρηθεί αποδεκτό ότι η κυτταρική εξασθένιση και γήρανση είναι προδιαθεσικοί παράμετροι της εμφάνισης μυελοειδών κακοηθειών.<sup>[183]</sup>

#### **4.6. Οξειδωτικό στρες σε ασθενείς με ΜΔΣ**

Όπως έχει ξανά αναφερθεί το οξειδωτικό στρες είναι αποτέλεσμα ανισορροπίας μεταξύ της δημιουργίας των ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού η οποία έχει ως ρόλο να διατηρεί την ομοιόσταση οξειδοαναγωγής σταθερή . Επομένως οι ROS που σχηματίζονται είναι γνωστό ότι έχουν αρνητική επίδραση και οφείλονται για την πρόκληση και την εξέλιξη νεοπλασιών του αίματος προκαλώντας μεταλλάξεις και ενεργοποιώντας τα καρκινικά κύτταρα.<sup>[191]</sup> Οι ROS μπορούν να συμβάλουν μέσω επιγενετικών μηχανισμών όπως είναι η υπερμεθυλίωση του DNA στην πρόκληση καρκίνου .<sup>[192]</sup> Στα άτομα με ΜΔΣ παρατηρείται υπερμεθυλίωση των γονιδίων που είναι βασικά για την σηματοδότηση διαδικασιών όπως ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση .<sup>[193]</sup> Παράλληλα τα γονίδια που ρυθμίζουν την διαδικασία μεθυλίωσης του DNA σε μυελοδυσπλαστικά άτομα υφίστανται μεταλλάξεις προκαλώντας προβλήματα και μη φυσιολογική μεθυλίωση του γενετικού υλικού.<sup>[193]</sup> Τα πορίσματα αυτά προέκυψαν βάση ενδοκυττάρων ριζών οξυγόνου σε κύτταρα μυελού των οστών και περιφερικού αίματος προκειμένου να

αποδείξουν την σχέση συσχέτισης του οξειδωτικού στρες και της μεθυλίωση του γενετικού υλικού σε μυελοειδείς δυσπλασίες . Παρατηρήθηκε ότι σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα στα κύτταρα του αίματος τους υπήρχαν αυξημένα επίπεδα ROS και εξασθενημένοι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. <sup>[194]</sup> Διαπιστώθηκε ότι ασθενείς με ΜΔΣ εμφανίζουν αυξημένες συγκεντρώσεις δραστικών μορφών οξυγόνου όπως υπεροξειδίο και μονοξειδίο του αζώτου και πολύ πιο χαμηλά επίπεδα παρουσίας GSH και συνολικής αντιοξειδωτικής άμυνας με συνέπεια την βλάβη στο DNA τους . <sup>[195]</sup> Ταυτόχρονα η διατάραξη της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας συμβάλει στη ανάπτυξη αντοχής σε φάρμακα και κατ' επέκταση στην αναστολή της δράση τους σε άτομα που πάσχουν από νεοπλαστικές νόσους όπως είναι τα ΜΔΣ και η οξεία μυελογενής λευχαιμία . <sup>[196]</sup> Μια από τις σημαντικές επιγενετικές αλλοιώσεις που έχουν παρατηρηθεί κατά την εξέλιξη των ΜΔΣ είναι η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου KEAP1 (Kelch Like ECH Associated Protein 1) . Το γονίδιο αυτό είναι αναστολέας της ρύθμισης της άμυνας των κυττάρων έναντι των οξειδωτικών μορίων δεσμεύοντας τον μεταγραφικό παράγοντα NFR2 , ο οποίος όταν το γονίδιο υπερμεθυλιώνεται και αναστέλλεται η δράση του , προάγει την παραγωγή ενζύμων οξειδωτικού στρες οδηγώντας τελικά σε εξέλιξη ΜΔΣ. <sup>[197]</sup> <sup>[198]</sup> Επίσης ο πυρηνικός ερυθροειδής παράγοντας 2 (NRF 2) ο οποίος βρέθηκε αυξημένος σε ασθενείς μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων , αποτελεί βασικός ρυθμιστής οξειδοαναγωγής και ταυτόχρονα αποτρέπει την καταστροφή των νεοπλασματικών κυττάρων από τις χημειοθεραπείες με αποτέλεσμα την αποτυχία τους . <sup>[199]</sup> Η επίδραση του οξειδωτικού στρες στην ερυθροποίηση είναι εξίσου σημαντική καθώς οι δραστικές ρίζες οξυγόνου επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τις πρόδρομες μορφές των ερυθροειδών κυττάρων ως προς την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση τους , αποτρέποντας την λειτουργική σύνθεση τους και προάγοντας την απόπτωση τους . <sup>[200]</sup> Τα κύτταρα των ασθενών υφίστανται οξειδωτική πίεση κατά την διάρκεια σύνθεσης και ανάπτυξης τους , καθώς διέρχονται από μονοπάτια σηματοδότησης που ρυθμίζονται από τα επίπεδα οξειδωτικού στρες που επικρατούν στον οργανισμό , συμβάλλοντας ως προδιαθεσικοί παράγοντες αναποτελεσματικής αιμοποίησης και καταστροφής των μυελοειδών κυττάρων. <sup>[201]</sup> Όσον αφορά τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς όπως είναι η ενζυμική πρωτεϊνική μορφή της γλουταθειόνης αποτελεί παράμετρο πρόγνωσης τόσο της διάγνωσης των ΜΔΣ όσο και του προσδιορισμού του προσδόκιμου ζωής των ασθενών και της πιθανότητας μεταλλαγής της νόσου σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. <sup>[194]</sup> <sup>[202]</sup> Το οξειδωτικό στρες σχετίζεται και με την ομάδα μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου που ανήκει κάθε ασθενής . Επιπρόσθετος αιτιολογικός παράγοντας για την αύξηση των ROS σε άτομα με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα έχει αναφερθεί η υπερσυσσώρευση σιδήρου λόγω μετάγγισης ερυθρών αιμοσφαιρίων ως θεραπεία της νόσου. Η αυξημένη παρουσία ελεύθερου σιδήρου υποβάλει τον δισθενή σίδηρο που κυκλοφορεί επιρρεπή

στην οξείδωση του με υπεροξειδίου του υδρογόνου και την σύνθεση τρισθενούς σιδήρου και υπεροξειδίου .<sup>[203]</sup> Η δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου προάγουν την οξείδωση μακρομορίων όπως των λιπιδίων , των πρωτεϊνών και του γενετικού υλικού και κατά επέκταση την βλάβη των κυττάρων και των ιστών και άρα στην κακή πρόγνωση των ασθενών .<sup>[204]</sup>

#### **4.7. Εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης σε ασθενείς με ΜΔΣ**

Ένα βασικό χαρακτηριστικό των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων αποτελούν οι κυτταροπενίες του περιφερικού αίματος , παρά τον νορμοκυτταρικό ή υπερκυτταρικό μυελό των οστών που εντοπίζεται κατά την διάγνωση των ασθενών .<sup>[205]</sup> Ο αυξημένος ρυθμός ενδομυελικής απόπτωσης των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων αιτιολογεί την μειωμένη παρουσία κυττάρων στο αίμα των ασθενών .<sup>[206]</sup> Ένας από τους κύριους δείκτες απόπτωσης των κυττάρων σε αρχικό ακόμη στάδιο αποτελεί η φωσφατιδυλοσερίνη.<sup>[205]</sup> Το φωσφολιπίδιο PS μετακινείται λόγω ανακατανομής της δομής του κυτταρικού περιβλήματος από την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης , προς την εξωτερική της στιβάδα , σηματοδοτώντας την έναρξη του προγραμματισμένου θανάτου των κυττάρων του μυελού . Για την κλινική μελέτη και ποσοτικοποίηση του μορίου αυτού και άρα του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων σε άτομα με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα χρησιμοποιείται η κυτταρομετρία ροής μέσω συμπλοκοποίησης της εξωτερικευμένης φωσφατιδυλοσερίνης μαζί με το μόριο της αννεξίνης 5 .<sup>[207]</sup> Η αννεξίνη προκειμένου να γίνει αντιληπτή κατά την εργαστηριακή εξέταση είναι συζευγμένη με το φθοριόχρωμα PE σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο το οποίο στην συνέχεια προσδένεται στην PS της εξωτερικής στιβάδας και είναι ικανό να προσδιορίσει τον πληθυσμό των κυττάρων που πρόκειται να αυτοκαταστραφούν .<sup>[208]</sup> Επομένως η μέτρηση του δείκτη Annexin-V ως μη επεμβατική μέθοδος σε δείγμα μυελού ασθενών με ΜΔΣ μπορεί να αποτελέσει προγνωστικός δείκτης διάγνωσης εξαιτίας αυξημένου ρυθμού καταστροφής των κυττάρων παρέχοντας την δυνατότητα απεικόνισης των συνθηκών που επικρατούν εκεί .

#### **4.8. Ενεργοποιημένη κασπάση-3 σε ασθενείς με ΜΔΣ**

Μιας και η αναποτελεσματική αιμοποίηση παρατηρείται σε μεγάλο βαθμό στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα , οι διάφοροι οδοί που προάγουν την απόπτωση των αιμοποιητικών κυττάρων ενεργοποιούν παράλληλα και μια ομάδα πρωτεολυτικών ενζύμων γνωστών ως κασπάσες .<sup>[209]</sup> Η πρώιμη μορφή των κασπασών εκφράζεται ως ανενεργή (προ ένζυμο) η οποία απαιτεί την διαδικασία της πρωτεόλυσης προκειμένου να μετατραπεί σε ενεργό ένζυμο .<sup>[210]</sup> Υπάρχουν δύο κατηγορίες των συγκεκριμένων πρωτεασών ανάλογα με την μορφολογία και την σειρά δράσης που φέρει η κάθε μια τους στην αποπτωτική οδό , οι εναρκτήριες και οι εκτελεστικές .<sup>[209]</sup> Οι πρώτες δρουν

στην αρχή της διαδικασίας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και έπειτα ενεργοποιούν την δεύτερη κατηγορία στις οποίες ανήκει και η κασπάση-3. Η μελέτη και ο προσδιορισμός του ενεργού ενζύμου σε ασθενείς με ΜΔΣ ως αποπτωτικός δείκτης έκφρασης κυττάρων αιμοποίησης, επέτρεψε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο μεγαλύτερος βαθμός απόπτωσης κυττάρων του μυελού πραγματοποιείται στις δυο πρώτες ομάδες της ανθεκτικής αναιμίας και της ανθεκτικής αναιμίας με παρουσία σιδηροβλαστών. <sup>[211]</sup> Τα αποπτωτικά κύτταρα εμφανίζονται τόσο στην μυελοειδή όσο και στην ερυθροειδή κυτταρική σειρά σε όλες τις φάσεις του κύκλου ωρίμανσης και πολλαπλασιασμού τους το οποίο εξηγεί την αναποτελεσματική παραγωγή κυττάρων του αίματος και την πανκυτταροπενία του περιφερικού.

#### **4.9. IgG αυτοαντισώματα σε ασθενείς με ΜΔΣ**

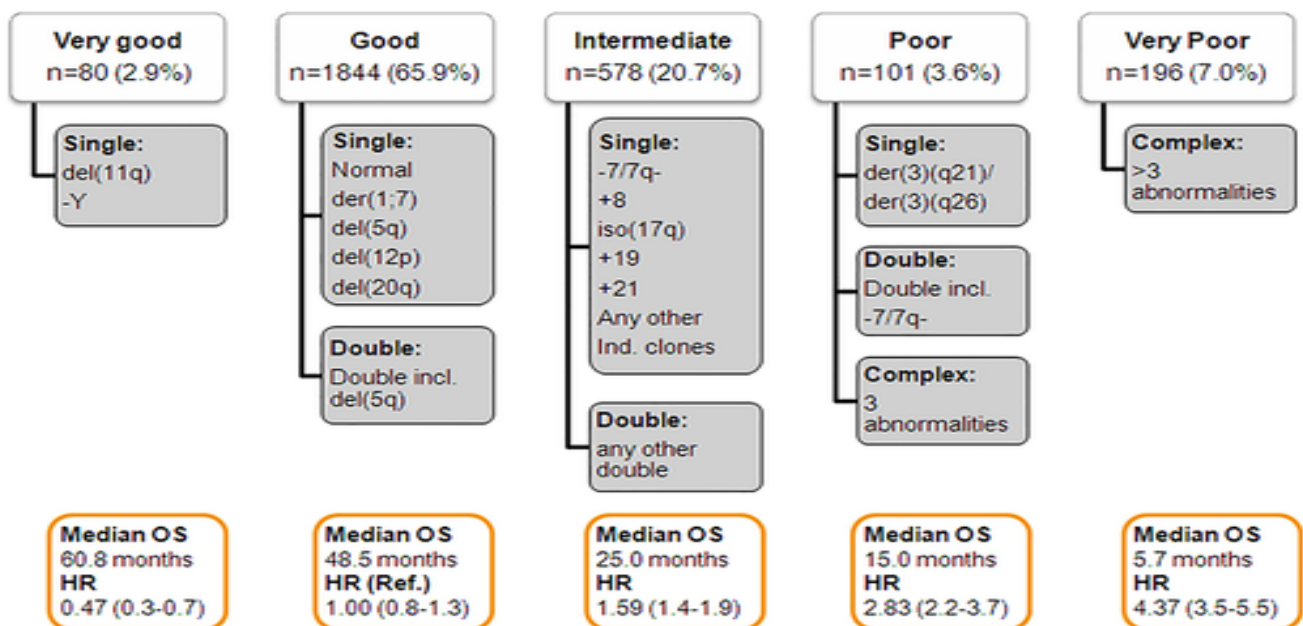
Η συσχέτιση της παρουσίας των ανοσοσφαιρινών IgG με διάφορες μεταβολές που εντοπίζονται στα ΜΔΣ ως διαγνωστικοί ή επικουρικοί δείκτες προσδιορισμού της κατάστασης του ασθενή δεν είναι απόλυτα αποδεδειγμένη και για τον λόγω αυτό υπάρχουν διαφορετικές μελέτες ως προς αυτά τα μόρια που τα συνδέουν με διάφορες κλινικές καταστάσεις. Σύμφωνα με μία έρευνα <sup>[212]</sup> ανάλογα με το στάδιο της νόσου και την ομάδα κατάταξης του ασθενή με ΜΔΣ η συχνότητα συγκέντρωσης αυτοανανοσοσφαιρινών της τάξης IgG στο πλάσμα διαφέρει. Βάση μελέτης που έχει διεξαχθεί έχει παρατηρηθεί ότι τα άτομα των πρώτων σταδίων της εξέλιξης των συνδρόμων αυτών εμφανίζουν περισσότερες ανωμαλίες και διαταραχές στην λειτουργία του ανοσοποιητικού τους συστήματος. <sup>[213]</sup> Ένας πρώτος πιθανός βιοδείκτης που προτάθηκε να συνδεθεί με τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα είναι το γονίδιο AKT3 και συγκεκριμένα η αυξημένη έκφραση του και η ανάλογη αλληλεπίδραση του με την ανοσοσφαιρίνη G. Το γονίδιο αυτό είναι συνυφασμένο με διάφορα είδη νεοπλασιών παρέχοντας έτσι την δυνατότητα εντοπισμού του όγκου σε συνδυασμό με την ανοσολογική απόκριση. <sup>[212]</sup> Σε αντίθεση ο FCGR3A υποδοχέας αντισωμάτων όπου αντιδράει αντιστρόφως ανάλογα με την συγκέντρωση του αντισώματος σχετίζεται με φλεγμονώδεις καταστάσεις και πιθανόν να μπορεί να συμβάλει στον προσδιορισμό των ομάδων ταξινόμησης των ασθενών σε συνάρτηση με την δράση των αυτοαντισωμάτων στην πρωτεΐνη αυτή. <sup>[212] [214]</sup>

#### **4.10. Μεταβολές κυτοσολικού Ca +2 σε ασθενείς με ΜΔΣ**

Η λεναλιδομίδη χρησιμοποιείται ως θεραπευτική αγωγή σε ασθενείς που υποβάλλονται σε μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά την διάρκεια της μυελοδυσπλαστικής νόσου και ανήκουν στην κατηγορία ασθενών με διαγραφή του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (del5q) ή άλλες χρωμοσωμικές βλάβες. <sup>[215]</sup> Η θεραπεία αυτή έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική σε άτομα χαμηλότερου



επιπέδου κινδύνου αναστέλλοντας λειτουργίες και πρωτεΐνες που ρυθμίζονται γονιδιακά στις θέσεις του χρωμοσώματος πέντε που απουσιάζουν λόγω χρωμοσωμικών ανωμαλιών αδρανοποιώντας το συγκεκριμένο παθολογικό κλώνο .<sup>[216]</sup> Η λεναλιδομίδη ευαισθητοποιεί παράλληλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και προάγει τις αντίστοιχες οδούς σηματοδότησης τους .<sup>[217]</sup> Η δράση της είναι πλειοτροπική ως προς τα παθολογικά αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα των ασθενών με ΜΔΣ αναστέλλοντας διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η ανάπτυξη τους , η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός τους .<sup>[218]</sup> Κατά την διάρκεια χορήγησης λεναλιδομίδη έχει εντοπιστεί υπερέκφραση ενός υποδοχέα συνδεδεμένος με μια πρωτεΐνη G , ο GPR68 , ο οποίος προάγει με την σειρά του την αύξηση συγκέντρωσης ενδοκυττάριου ασβεστίου .<sup>[219]</sup> Η συσσώρευση αυτή των ιόντων  $Ca^{+2}$  συμβάλει στην αναστολή της δράσης των μυελοδυσπλαστικών κυττάρων και ενεργοποιεί μια αποπτωτική οδό των δυσπλαστικών μυελοειδών και ερυθροειδών κυττάρων του συνδρόμου αυτού μέσω ανασταλτικής δράσης του φαρμάκου στην καλπαΐνη και στον υποδοχέα GPR68 .<sup>[218]</sup> Επομένως στην περίπτωση των ΜΔΣ έχει παρατηρηθεί μεταβολή του κυττοσολικού ασβεστίου και ενεργοποίηση του κυτταρικού θανάτου μόνο υπό τη χορήγηση θεραπείας με λεναλιδομίδη και όχι ως προγνωστικός δείκτης σηματοδότησης πρώιμων σταδίων ΜΔΣ όπως αναφέρθηκε παραπάνω για τους υπολοίπους προδιαθεσικούς παράγοντες .



(Εικόνα 6)<sup>[151]</sup> Ταξινόμηση κυτταρογενετικού κινδύνου βάση του τροποποιημένου διεθνούς συστήματος προγνωστικής βαθμολόγησης (IPSS-R) και οι αντίστοιχες χρωμοσωμικές ανωμαλίες καταταγμένες από τον καλύτερο βαθμό πρόγνωσης από τα αριστερά στον χειρότερο βαθμό πρόγνωσης στα δεξιά .

Λειτουργίες	Εμπλεκόμενα γονίδια
Μεθυλίωση DNA	<i>DNMT3A, TET2, IDH1, IDH2</i>
Τροποποίηση χρωματίνης	<i>EZH2, SUZ12, EED, JARID2, ASXL1, KMT2, KDM6A, ARID2, PHF6, ATRX</i>
Σχηματισμός κεντρομεριδίου	<i>STAG2, RAD21, SMC3, SMC1A</i>
Συναρμογή RNA	<i>SF3B1, SRSF2, U2AF1, U2AF2, ZRSR2, SF1, PRPF8, LUC7L2</i>
Μεταγραφή	<i>RUNX1, ETV6, GATA2, IRF1, CEBPA, BCOR, BCORL1, NCOR2, CUX1</i>
Υποδοχέας κυτοκίνης/ τυροσινική κινάση	<i>FLT3, KIT, JAK2, MPL, CALR, CSF3R</i>
Άλλοι οδοί σηματοδότησης	<i>GNAS, GNB1, FBWX7, PTEN</i>
Σημεία ελέγχου κυτταρικού κύκλου	<i>TP53, CDKN2A</i>
Επιδιόρθωση DNA	<i>ATM, BRCC3, FANCL</i>
Άλλα	<i>NPM1, SETBP1, DDX41</i>

(Εικόνα 7)<sup>[158]</sup> Γονιδιακές μεταλλάξεις που λαμβάνουν χώρα κατά την εξέλιξη των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων σε γονίδια (δεξιά στήλη) που συμμετέχουν σε βιολογικές αντιδράσεις (αριστερή στήλη).

BLOOD, 1 OCTOBER 2002 • VOLUME 100, NUMBER 7 MYELOID NEOPLASMS 2297

**Table 2. Ταξινόμηση βάση ΠΟΥ και κριτήρια για τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα**

Ασθένεια	Ευρήματα στο αίμα	Ευρήματα στο μυελό των οστών
Ανθεκτική αναιμία (RA)	Αναιμία Καθόλου ή σπάνια βλάστες	Ερυθροειδή δυσπλασία < 5% blasts βλάστες < 15% δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες
Ανθεκτική αναιμία με σιδηροβλάστες (RARS)	Αναιμία Καθόλου βλάστες	Ερυθροειδή δυσπλασία ≥ 15% δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες < 5% βλάστες
Ανθεκτική κυτταροπενία με μονογραμμική δυσπλασία (RCMD)	Κυτταροπενία (cytopenia or pancytopenia) Καθόλου ή σπάνια βλάστες Απουσία ραβδίων Auer < 1 × 10 <sup>9</sup> /L μονοκύτταρα	Δυσπλασία ≥ 10% των κυττάρων σε 2 ή περισσότερες μυελοειδείς κυτταρικές σειρές < 5% βλάστες μυελού Απουσία ραβδίων Auer < 15% δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες
Ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία και σιδηροβλάστες (RCMD-RS)	Κυτταροπενία (cytopenia or pancytopenia) Καθόλου ή σπάνια βλάστες Απουσία ραβδίων Auer < 1 × 10 <sup>9</sup> /L μονοκύτταρα	Δυσπλασία ≥ 10% των κυττάρων σε 2 ή περισσότερες μυελοειδείς κυτταρικές σειρές ≥ 15% δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες < 5% βλάστες Απουσία ραβδίων Auer
Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών 1-1 (RAEB-1)	Κυτταροπενία < 5% βλάστες Απουσία ραβδίων Auer < 1 × 10 <sup>9</sup> /L μονοκύτταρα	Μονογραμμική ή πολυγραμμική δυσπλασία 5% to 9% βλάστες Απουσία ραβδίων Auer
Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών 1-2 (RAEB-2)	Κυτταροπενία 5% to 19% βλάστες Παρουσία ραβδίων Auer < 1 × 10 <sup>9</sup> /L μονοκύτταρα	Μονογραμμική ή πολυγραμμική δυσπλασία 10% to 19% βλάστες Παρουσία ραβδίων Auer
Αταξινόμητο μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (MDS-U)	Κυτταροπενία Καθόλου ή σπάνια βλάστες Απουσία ραβδίων Auer	Μονογραμμική δυσπλασία σε κοκκιοκύτταρα ή μεγακαρουκύτταρα < 5% βλάστες Απουσία ραβδίων Auer
ΜΔΣ με μεμονωμένο del(5q)	Αναιμία < 5% βλάστες Αυξημένα ή φυσιολογικά αιμοπετάλια	Φυσιολογικά ή αυξημένα μεγακαρουκύτταρα με υπολοβίωση πυρήνων < 5% βλάστες Απουσία ραβδίων Auer μεμονωμένη del(5q)

(Εικόνα 8)<sup>[170]</sup> Πίνακας ταξινόμησης των τύπων μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων βάση του προγνωστικού συστήματος βαθμολόγησης του παγκόσμιου οργανισμού υγείας (Π.Ο.Υ). Αριστερά του πίνακα υπάρχει η στήλη με τις ομάδες νοσημάτων ΜΔΣ, στην ενδιάμεση στήλη απεικονίζονται τα ευρήματα που συναντώνται στο επίχρισμα περιφερικού αίματος ενώ στην δεξιά στήλη τα κλινικά χαρακτηριστικά του μυελού των οστών ως προς τον αριθμό των βλαστών, την συγκέντρωση των σιδηροβλαστών και την κατηγορία δυσπλασίας της εκάστοτε κυτταρικής σειράς.

## **B.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Σε προηγούμενες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί ως προς τους αποπτωτικούς ερυθροκυτταρικούς δείκτες ανέδειξαν ότι κατά την διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου τα κύτταρα υποβάλλονται σε φυσικοχημικές μεταβολές οι οποίες τα καθιστούν επιρρεπή στην φαγοκυττάρωση τους και στην απομάκρυνση τους από τη κυκλοφορία του αίματος . Η εκκαθάριση των κυττάρων από την κυκλοφορία του αίματος πραγματοποιείται βάση δύο οδών , είτε μια από αυτές αφορά την φυσιολογική απομάκρυνση τους λόγω φθοράς και εξάντλησης της λειτουργίας τους εξαιτίας του γήρας , είτε η δεύτερη οδό η οποία σχετίζεται με την απόπτωση τους και την σηματοδότηση της αυτοκαταστροφής λόγω ενδογενών η εξωγενών επιπλοκών ή διαφόρων νοσηρών καταστάσεων πριν την ολοκλήρωση του προσδόκιμου ζωής τους . Αντίστοιχα μελέτες που διεξάχθηκαν στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα επιδίωξαν να ανακαλύψουν και να γνωστοποιήσουν αποπτωτικούς δείκτες ως προδιαθεσικοί παράμετροι διάγνωσης και χορήγησης της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής σε ασθενείς με τα συγκεκριμένα νοσήματα .

Σκοπός της παρούσας έρευνας υπήρξε α) η ανάδειξη αποπτωτικών δεικτών (Ps, συγκέντρωση ενδοκυττάρων ιόντων  $Ca^{+2}$ , IgG, ενεργοποιημένη κασπάση-3) σε ασθενείς με ΜΔΣ οι οποίοι πιθανών να αποτελούν προδιαθεσικοί βιοδείκτες για εγκυρότερη διάγνωση , β) η επίδραση του οξειδωτικού στρες και ο σχηματισμός δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) στα ερυθροκύτταρα των ασθενών με τις συγκεκριμένες νεοπλασίες σε σύγκριση και των δύο παραμέτρων με φυσιολογικά άτομα αντίστοιχων περιβαλλοντικών συνθηκών (ηλικία) .

Για την μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία αίματος από 22 ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα σε προχωρημένη ηλικία άνω των 60 ετών και από 14 φυσιολογικά άτομα αντίστοιχων ηλικιών με τους νοσούντες , που αποτέλεσαν τους μάρτυρες του πειράματος , προκειμένου να μελετηθούν οι λειτουργικές και μορφολογικές αλλαγές που εντοπίζονται κατά την έναρξη της απόπτωσης των κυττάρων στα ερυθρά αιμοσφαίρια των ασθενών αυτών και την πιθανότητα να συσχετιστούν με την έγκαιρη και αξιόπιστη διάγνωση των συνδρόμων σε πρώιμο ακόμη στάδιο της νόσου .

## **Γ.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **1.Κυτταρομετρία ροής**

#### **1.1. Ανοσοεντόπιση εξωτερικευμένης Ps μέσω Annexin-V στα ερυθρά αιμοσφαίρια**

##### **Αρχή Μεθόδου**

Η μέθοδος αυτή έχει ως σκοπό να εντοπίσει την εξωτερικευμένη φωσφατιδυλοσερίνη των αποπτωτικών ερυθρών αιμοσφαιρίων μέσω της συμπλοκοποίησης της με την πρωτεΐνη Annexin-V η οποία με την σειρά της είναι συζευγμένη με το φθοριόχρωμα PE . Η συγκεκριμένη φθορίζουσα ουσία διεγείρεται στα 565 nm ενώ εκπέμπει στα 578 nm.

##### **Αντιδραστήρια-Υλικά**

1. Ολικό αίμα με EDTA (αραίωση 1:10 με PBS)
2. Ισότονο διάλυμα φωσφορικών PBS
3. Διάλυμα Annexin-V , BSA 3%
4. Annexin-V, PE
5. CD235-FITC (αραίωση 1:200 με PBS)
6. Eppendorf
7. Σωληνάρια 15ml
8. Σωληνάρια κυτταρομετρίας

##### **Πειραματική Διαδικασία**

- 1) Αραίωση ολικού αίματος με διάλυμα PBS 2) Προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων σε σωληνάριο κυτταρομετρίας
- 2) Επώαση του σωληναρίου σε σκοτάδι (T °C) στο συρτάρι για 20 min
- 3) Προσθήκη απαιτούμενης ποσότητας διαλύματος buffer για τερματισμό της αντίδρασης
- 4) Ανάλυση του δείγματος στο κυτταρόμετρο

## **1.2.Μέτρηση ενδοκυττάρων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) στα ερυθρά αιμοσφαίρια**

### **Αρχή Μεθόδου**

Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει την συγκέντρωση ενδοκυττάρων ROS μέσω ενός αντιδραστηρίου  $H_2DCFDA$  το οποίο διαπερνά την μεμβράνη των κυττάρων και μετατρέπεται εξαιτίας της παρουσίας εστερασών σε  $H_2DCF$ . Στην συνέχεια λόγω έκθεσης του σε ROS το μόριο αυτό υποβάλλεται σε οξείδωση και σχηματίζεται το τελικό μόριο DCF όπου είναι πλέον ικανό να φθορίσει και να διεγερθεί σε μήκος κύματος 498 nm και να εκπέμπει ακτινοβολία στα 522 nm . Τα επίπεδα ενδοκυττάρων ROS είναι ανάλογα του σήματος φθορισμού που προκύπτει κατά την ανάλυση του δείγματος στο κυτταρόμετρο.

### **Αντιδραστήρια-Υλικά**

1. Ισότονο διάλυμα φωσφορικών PBS
2. Φιλτραρισμένο διάλυμα PBS
3.  $H_2DCFDA$
4. Διάλυμα PBS με γλυκόζη
5. Eppendorf
6. Falcon 15ml
7. Σωληνάριο κυτταρομετρίας

### **Πειραματική Διαδικασία**

- 1) Αραίωση πακεταρισμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων με διάλυμα PBS
- 2) Προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων
- 3) Επώαση του σωληναρίου στο σκοτάδι (37 °C) για 1h
- 4) Προσθήκη απαιτούμενης ποσότητας διαλύματος buffer και ποσότητας δείγματος σε σωληνάριο κυτταρομετρίας
- 5) Ανάλυση του δείγματος στο κυτταρόμετρο

### **1.3.Μέτρηση επιπέδων κυτοσολικών ιόντων ασβεστίου Ca<sup>+2</sup> στα ερυθρά αιμοσφαίρια**

Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει τα επίπεδα συγκέντρωση κυτοσολικών ιόντων ασβεστίου με την βοήθεια του μορίου Fluo-4AM το οποίο διαπερνά την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και εκεί διασπάται απομακρύνοντας τον εστέρα από την φθορίζουσα ουσία Fluo-4 η οποία δεσμεύει τα κατιόντα Ca<sup>+2</sup> και έτσι παράγει σήμα φθορισμού που αντιπροσωπεύει τα επίπεδα ενδοκυττάρου ασβεστίου .

#### **Αντιδραστήρια-Υλικά**

1. Ισότονο διάλυμα PBS
2. Fluo-4AM
3. Διάλυμα Ca<sup>+2</sup>-BSA0,1%
4. Eppendorf
5. Falcon 15ml
6. Σωληνάριο κυτταρομετρίας

#### **Πειραματική Διαδικασία**

- 1) Αραίωση πακεταρισμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων με διάλυμα PBS
- 2) Προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων
- 3) Επώαση του σωληναρίου στο σκοτάδι (37 °C) για 50 min
- 4) Προσθήκη απαιτούμενης ποσότητας διαλύματος buffer και ποσότητας δείγματος σε σωληνάριο κυτταρομετρίας
- 5) Ανάλυση του δείγματος στο κυτταρόμετρο

#### **1.4.Μέτρηση επιπέδων ενεργοποιημένων κασπασών-3 στα ερυθρά αιμοσφαίρια**

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση αντισωμάτων έναντι των ενεργοποιημένων κασπασών-3 προκειμένου να συζευχθούν με αυτές και να προσδιορίσουν την συγκέντρωσή τους. Οι κασπάσες ανήκουν σε μια κατηγορία ασπαρτικών πρωτεϊνών κυστεΐνης και εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό με την διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Η κασπάση-3 είναι μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων υπό ανενεργή μορφή και ενεργοποιείται έπειτα από πρωτεόλυση κατά την διάρκεια της απόπτωσης των κυττάρων.

#### **Αντιδραστήρια-Υλικά**

1. Ισότονο διάλυμα φωσφορικών PBS
2. Γλουταριδική αλδεΐδη
3. Διάλυμα PBS-Tween 0,5%
4. Ab activated caspases-3
5. Φυγόκεντρος
6. Eppendorf
7. Falcon 15ml
8. Σωληνάρια κυτταρομετρίας

#### **Πειραματική Διαδικασία**

- 1) Αραίωση πακεταρισμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων με διάλυμα PBS
- 2) Προσθήκη γλουταριδικής αλδεΐδης
- 3) Επώαση για 10 min, RT
- 4) Προσθήκη των αντισωμάτων
- 5) Επώαση στο σκοτάδι για 20 min
- 6) Προσθήκη απαιτούμενης ποσότητας διαλύματος PBS για τερματισμό της αντίδρασης
- 7) Ανάλυση του δείγματος στο κυτταρόμετρο

### **1.5.Μέτρηση επιπέδων ανοσοσφαιρινών IgG στα ερυθρά αιμοσφαίρια**

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην χρήση αντισωμάτων έναντι των ανοσοσφαιρινών της τάξης IgG . Κατά το οξειδωτικό στρες το οποίο πυροδοτεί την απόπτωση των κυττάρων , η ζώνη-3 η οποία είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη συνδέεται με την οξειδωμένη αιμοσφαιρίνη και προκαλείται η διάσπαση αυτής και ο σχηματισμός συσσωματωμάτων της με αποτέλεσμα την έκφραση νέων αντιγονικών επιτόπων και την προσέλκυση φυσικών αντισωμάτων . Η δημιουργία αυτή συμπλόκων αντιγόνου – αντισώματος οδηγεί τα κύτταρα σε αποπτωτικό θάνατο . Η χρήση επομένως των αντι-αντισωμάτων IgG συζευγμένα με φθοριόχρωμα FITC μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε τα επίπεδα συγκέντρωσης φυσικών αντισωμάτων IgG που προσκολλώνται στα σύμπλοκα αντιγόνο-αντίσωμα των αποπτωτικών κυττάρων ανάλογα με το σήμα φθορισμού του FITC.

#### **Αντιδραστήρια-Υλικά**

1. Ολικό αίμα με EDTA (αραίωση 1:10 με PBS)
2. Ισότονο διάλυμα PBS
3. Anti-IgG -FITC
4. CD235-APC (αραίωση 1:200 με PBS)
5. Eppendorf
6. Falcon 15ml
7. Σωληνάρια κυτταρομετρίας

#### **Πειραματική Διαδικασία**

- 1) Αραίωση ολικού αίματος με διάλυμα PBS
- 2) Προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων σε σωληνάριο κυτταρομετρίας
- 3) Επώαση του σωληναρίου σε σκοτάδι για 40 min
- 4) Προσθήκη διαλύματος PBS για τερματισμό της αντίδρασης
- 5) Ανάλυση του δείγματος στο κυτταρόμετρο

Όλα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν κατάλληλα με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft excel για τον έλεγχο t-test ώστε να γίνει έλεγχος στατιστικά σημαντικών διαφορών ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και των υγιών ατόμων.



## Δ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην συγκεκριμένη μελέτη ερευνήθηκαν αποπτωτικοί και οξειδωτικοί παράμετροι σε ένα σύνολο 22 ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και σε 14 φυσιολογικά άτομα αντίστοιχων ηλικιών άνω των 60 ετών και των δύο φύλων . Συγκεκριμένα η ερέυνα αποσκοπούσε στην αναγνώριση των ειδικών δεικτών κυτταρικού θανάτου κατά την εξέλιξη της νόσου και την πιθανότητα ανίχνευσης τους ως προδιαθεσικοί παράγοντες των νεοπλασιών αυτών . Οι δείκτες περιλάμβαναν την εξωτερικευμένη φωσφατιδυλοσερίνη (PS) , τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου κατά το οξειδωτικό στρες , τα κυτοσολικά ιόντα ασβεστίου , τις ενεργοποιημένες κασπάσες-3 και τις ανοσοσφαιρίνες τύπου IgG .

### **1.1 Αποτελέσματα ερυθροκυτταρικών δεικτών από τις γενικές αίματος των ασθενών και των υγείων ατόμων**

Όπως φαίνεται από τον παρακάτω πίνακα γενικής αίματος , οι τιμές των αιματολογικών παραμέτρων που έχουν μετρηθεί αποτυπώνονται ως αποτέλεσμα μέσου όρου  $\pm$  τυπική απόκλιση των ασθενών με ΜΔΣ όσο και των υγείων εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους . Στα παθολογικά δείγματα ο αριθμός των λευκών , ερυθρών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων είναι χαμηλότερος σε σχέση των υγείων χαρακτηριστικό γνώρισμα των συγκεκριμένων συνδρόμων καθώς υπάρχει αναποτελεσματική αιμοποίηση και πανκυτταροπενία . Επίσης από τις τιμές του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης εξάγεται το συμπέρασμα αναιμίας , ακόμη ένα κλινικό εύρημα που είναι γνωστό ότι εντοπίζεται στα ΜΔΣ .Ενώ εξαιτίας μορφολογικών αλλοιώσεων που εμφανίζουν τα κύτταρα του περιφερικού αίματος στους ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα παρατηρείται αυξημένος μέσος όγκος ερυθρών MCV : Mean Cell Volume) και κατ'επέκταση αυξημένη περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (MCH : Mean Cell Haemoglobin), MCHC : Mean Cell Haemoglobin Concentration) και αντίστοιχα αυξημένες τιμές στις ίδιες παραμέτρους των αιμοπεταλίων.

#### Γενική Αίματος

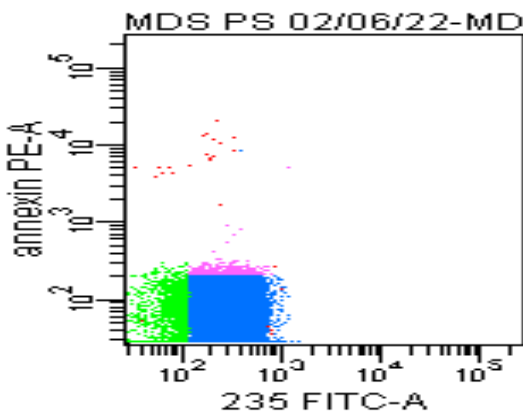
	<b>Ασθενείς n=22</b>	<b>Υγείς (controls) n=14</b>	<b>Φυσιολογικές τιμές</b>
Λευκά αιμοσφαίρια ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	5.8 $\pm$ 0.3	8.2 $\pm$ 0.6*	4.0-9.0
Ουδετερόφιλα(%)	54.1 $\pm$ 2.5	60.1 $\pm$ 4.3	42.0-85.0
Λεμφοκύτταρα(%)	31.1 $\pm$ 1.4	28.5 $\pm$ 2	11.0-49.0
Μονοκύτταρα(%)	13.7 $\pm$ 0.2	11.4 $\pm$ 0.8	2.0-9.0
Ερυθρά αιμοσφαίρια ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	3.76 $\pm$ 0.17	4.38 $\pm$ 0.31*	3.8-5.3
Αιμοσφαιρίνη(gr/dl)	10.3 $\pm$ 0.5	11.5 $\pm$ 0.8	12.0-18.0

Αιματοκρίτης(%)	33.7 ± 1.5	38 ± 3*	36.0-56.0
Μέσος όγκος ερυθρών(fl)	91.5 ± 4.2	88.3 ± 6.3	80-100
Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (pg)	28.2 ± 1.3	26.8 ± 1.9*	27.0-32.0
Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (gr/dl)	30.7 ± 1.4	30.2 ± 2.2	32.0-36.0
Εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων (%)	17.3 ± 0.8	14.9 ± 1.1*	10.0-16.5
Αιμοπετάλια (x10 <sup>3</sup> /μl)	202 ± 9	281.2 ± 20.1*	120-380
Μέσος όγκος αιμοπεταλίων (fl)	11.3 ± 0.5	10.9 ± 0.8	5.0-10.0
Εύρος κατανομής αιμοπεταλίων (%)	15.7 ± 0.7	14.5 ± 1.0	12.0-20.0

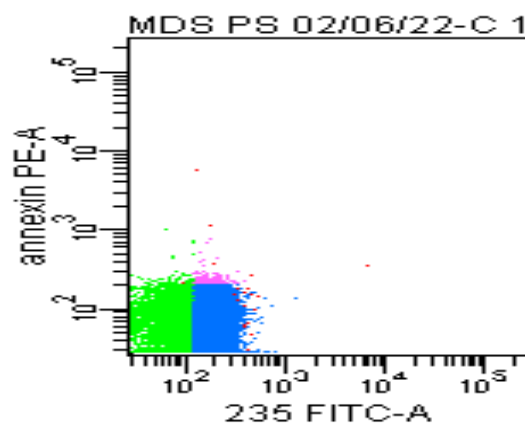
**Πίνακας:** Αιματολογικοί δείκτες από τις γενικές αίματος των ασθενών με ΜΔΣ και των υγείων εκφρασμένοι με τον μέσο όρο ± τυπική απόκλιση (M.O ± SD) . Δεξιά υπάρχουν οι φυσιολογικές τιμές των δεικτών που έχουν οριστεί από τον κατασκευαστή του αιματολογικού αναλυτή.(\*) p<0.05

## 1.2. Έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική στιβάδα της πλασματικής μεμβράνης

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων του συγκεκριμένου βιοδείκτη στα ερυθρά αιμοσφαίρια πραγματοποιήθηκε με την σύνδεση του με το μορίου αννεξίνης και του φθοριοχρώματος PE . Επομένως για τις δύο ομάδες δειγμάτων υπολογίσθηκε η τιμή του μέσου όρου ± τυπική απόκλιση του ποσοστού (x%) των RBCs θετικά στην annexin-V .Μεταξύ των ασθενών με ΜΔΣ και των υγείων ατόμων παρατηρήθηκε μικρή διαφορά ως προς τον μέσο όρο – τυπική απόκλιση(mean-SD) του ποσοστού έκφρασης της Annexin-V στα ερυθρά αιμοσφαίρια η οποία ήταν για τα ασθενή άτομα λίγο αυξημένη 1.28 - 0.46 σε σχέση με τα υγιή 1.22-0.52 , ενώ ο μέσος όρος + τυπική απόκλιση δεν εμφάνιζε κάποια σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες.



Εικόνα 9: mean-SD(1.28-0,46)



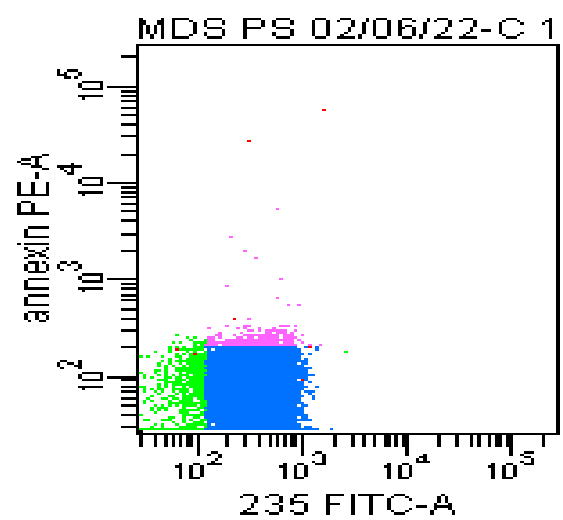
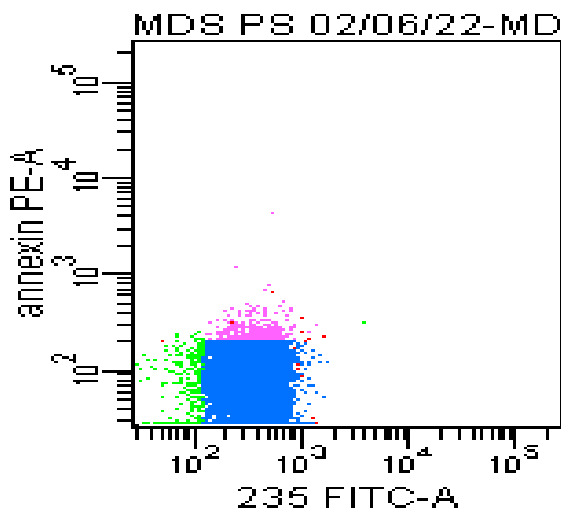
Εικόνα 10: mean-SD(1.22-0.52)

Tube: MDS 8

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,000	###	100.0
rbc	27,068	90.2	90.2
singlets	27,045	99.9	90.1
cd235	20,682	76.5	68.9
AnnV	161	0.8	0.5

Tube: C 12

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,000	###	100.0
rbc	27,243	90.8	90.8
singlets	27,091	99.4	90.3
cd235	16,518	61.0	55.1
AnnV	102	0.6	0.3



Εικόνα 11: mean+SD(1.28+0.46)

Εικόνα 12: mean+SD(1.22+0.52)

Tube: MDS 4

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,000	###	100.0
rbc	23,237	77.5	77.5
singlets	23,158	99.7	77.2
cd235	22,731	98.2	75.8
AnnV	413	1.8	1.4

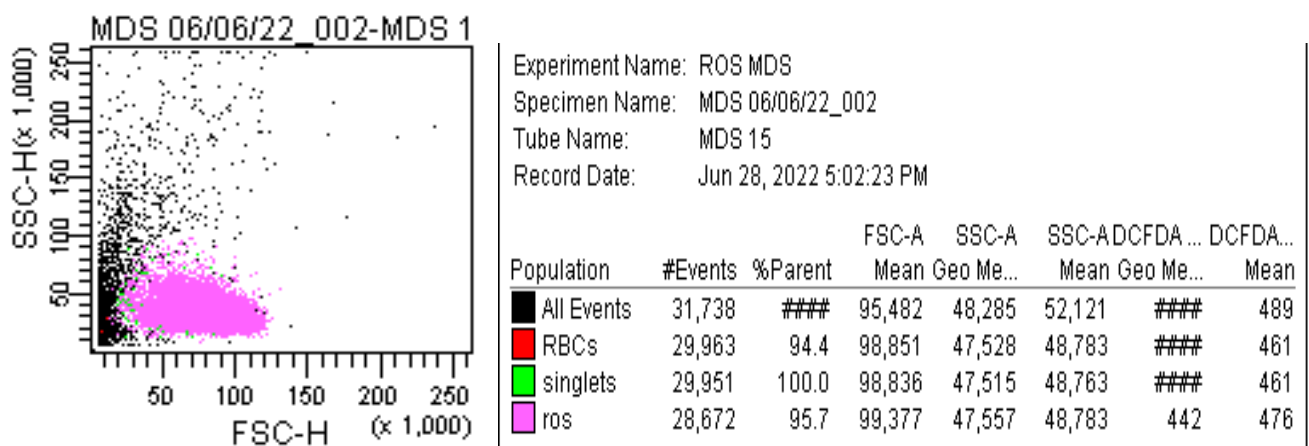
Tube: C 13

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	30,000	###	100.0
rbc	26,582	88.6	88.6
singlets	26,548	99.9	88.5
cd235	25,181	94.9	83.9
AnnV	382	1.5	1.3

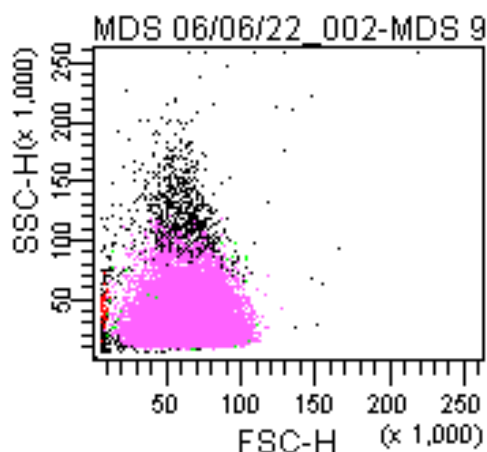
Στην αριστερή πλευρά (εικόνες 9,11) απεικονίζεται το διάγραμμα κυτταρομετρίας παθολογικού δείγματος με τους δύο άξονες να ορίζονται από τα αντίστοιχα φθοριοχρώματα που έχουν ιχνηθετηθεί τα κύτταρα του δείγματος όπου στον οριζόντιο άξονα αντιστοιχεί το FITC που έχει συζευχθεί με τον δείκτη CD235 των ερυθρών αιμοσφαιρίων και στον κάθετο άξονα όπου εντοπίζεται το PE που συνδέεται με το μόριο της αννεξίνης για τον εντοπισμό της εκφρασμένης PS . Επομένως όπως φαίνεται και από την εικόνα πάνω δεξιά τα σωματίδια(events) με ροζ χρώμα εκφράζουν θετικά και τους δυο δείκτες (FITC/PE) , άρα είναι ερυθρά αιμοσφαίρια με εκφρασμένη φωσφατιδυλοσερίνη στην εξωτερική στιβάδα της μεμβράνης. Παράλληλα στην δεξιά πλευρά (εικόνες 10,12) απεικονίζονται με τον ίδιο τρόπο τα αποτελέσματα του δείκτη PS σε υγιές δείγμα (control).

### 1.3. Ενδοκυττάρειες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Η συσσώρευση αυτών των δραστικών μορίων στα κύτταρα τα υποβάλει σε μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές με αποτέλεσμα την πρόωρη αυτοκαταστροφή τους και απομάκρυνση από το αίμα . Από την ανάλυση του πλάγιου(SSC-H) στον κάθετο άξονα και πρόσθιου (FSC-H) σκεδασμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων στον οριζόντιο άξονα ως δείκτες κυτταρικής κατανομής τόσο των ασθενών όσο κα των υγιών ατόμων προέκυψαν τα παρακάτω διαγράμματα στο κυτταρόμετρο ροής . Ο υπολογισμός του μέσου όρου της μέσης τιμής DCFDA  $\pm$  τυπική απόκλιση των ROS στα ερυθρά αιμοσφαίρια των ασθενών εμφάνισε μια στατιστικά σημαντική αύξηση  $715 \pm 263$  σε σχέση με τις τιμές έπειτα από την αντίστοιχη μελέτη στα δείγματα υγιών  $574 \pm 197$ ,  $p < 0,05$ . Αντίστοιχα από τον υπολογισμό του μέσου όρου του ποσοστού(x%)  $\pm$  τυπική απόκλιση των ROS στα κύτταρα των δύο ομάδων ήταν ελάχιστα αυξημένη στη πρώτη ομάδα τιμών αυτή των παθολογικών η τιμή 95.3-7.1 από ότι στην δεύτερη των υγιών με την τιμή 93.0-9.5 , ενώ οι τιμές μέσος όρος ποσοστού (x%) + τυπική απόκλιση δεν εμφάνιζαν ιδιαίτερες διαφορές .



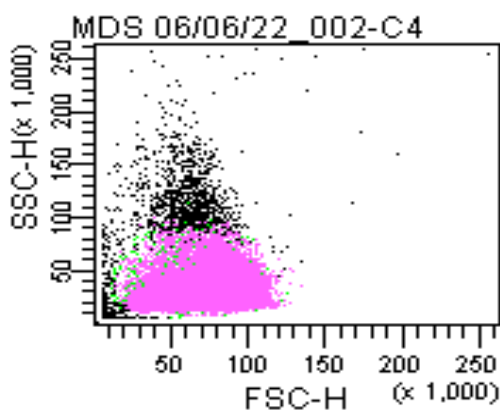
Εικόνα 12: mean-SD(715-263)



Experiment Name: ROS MDS  
 Specimen Name: MDS 06/06/22\_002  
 Tube Name: MDS 9  
 Record Date: Jun 20, 2022 4:45:45 PM

Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean Geo Me...	SSC-A Mean Geo Me...	SSC-ADCFDA ... Mean Geo Me...	DCFDA... Mean
All Events	31,826	###	83,783	38,492	45,931	###
RBCs	30,763	96.7	84,183	36,892	41,516	###
singlets	30,708	99.8	84,239	36,858	41,477	###
ros	30,148	98.2	84,202	36,856	41,444	852

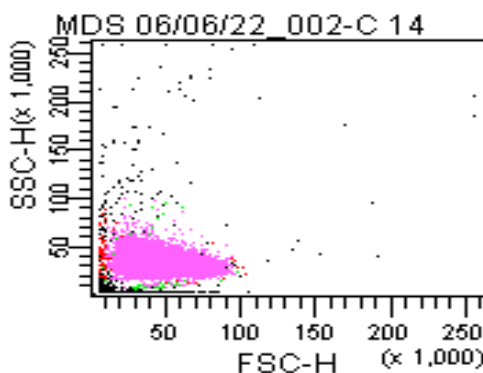
Εικόνα 13: mean+SD(715+263)



Experiment Name: ROS MDS  
 Specimen Name: MDS 06/06/22\_002  
 Tube Name: C 4  
 Record Date: Jun 15, 2022 5:10:11 PM

Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean Geo Me...	SSC-A Mean Geo Me...	SSC-ADCFDA ... Mean Geo Me...	DCFDA... Mean
All Events	37,119	###	99,713	46,508	53,667	###
RBCs	35,536	95.7	101,147	44,875	48,964	###
singlets	35,534	100.0	101,145	44,874	48,962	###
ros	29,029	81.7	102,832	45,567	49,389	314

Εικόνα 14: mean-SD(574-197)



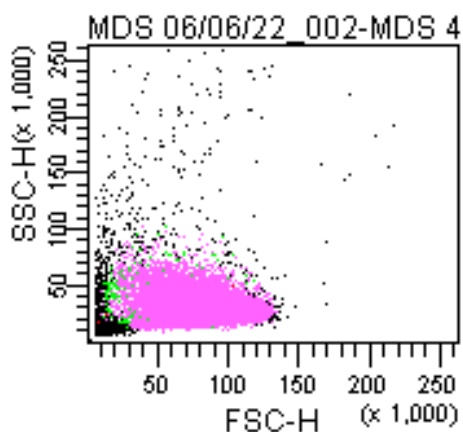
Experiment Name: ROS MDS  
 Specimen Name: MDS 06/06/22\_002  
 Tube Name: C 14  
 Record Date: Jul 6, 2022 5:40:48 PM

Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean Geo Me...	SSC-A Mean Geo Me...	SSC-ADCFDA ... Mean Geo Me...	DCFDA... Mean
All Events	59,184	###	57,931	###	23,697	###
RBCs	32,116	54.3	81,802	41,912	42,765	###
singlets	31,638	98.5	81,359	41,839	42,662	###
ros	31,291	98.9	81,482	41,909	42,687	702

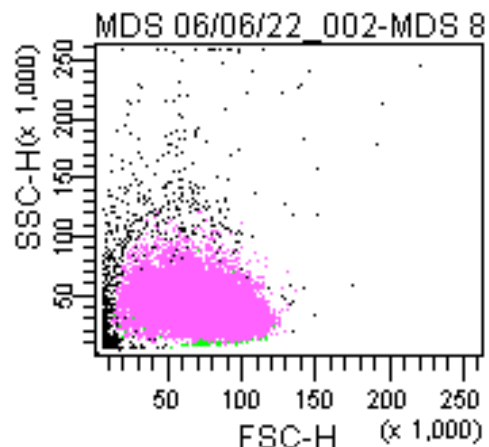
Εικόνα 15: mean+SD(574+197)

Στα δυο πρώτα διαγράμματα απεικονίζονται τα δεδομένα παθολογικού δείγματος (mean DCFDA) όπου στα αριστερά υπάρχει το διάγραμμα κυτταρομετρίας με δείκτες τον πλάγιο σκεδασμό εκφράζοντας την πολυπλοκότητα του κυττάρου και τον πρόσθιο σκεδασμό το μέγεθος. Ο ροζ πληθυσμός σωματιδίων αναπαριστά τα ερυθρά αιμοσφαίρια τα οποία

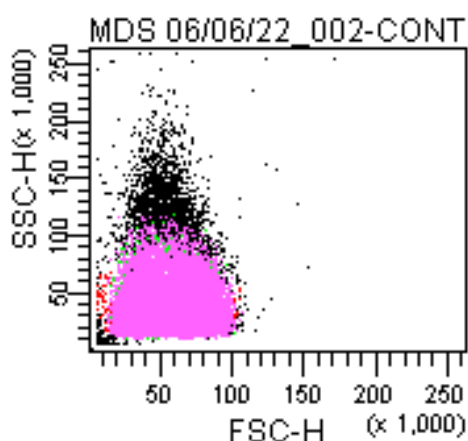
βάση της μορφολογίας τους έχουν εκφράσει θετικότητα στον δείκτη ROS . Αντίστοιχα τα δύο επόμενα που αντιστοιχούν στα controls. Τα τελευταία διαγράμματα αναφέρονται σε ίδιες μετρήσεις με τις προηγούμενες εκφρασμένες με τον ίδιο τρόπο , βασιζόμενες όμως σε διαφορετικά δεδομένα του πίνακα τα οποία είναι το ποσοστό (x%) [percent] των ερυθρών αιμοσφαιρίων θετικά στον οξειδωτικό δείκτη ROS .



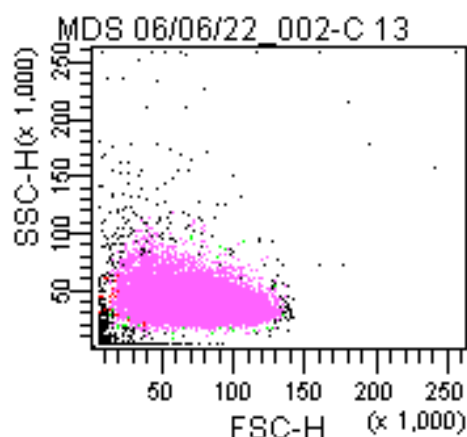
Εικόνα 16: mean-SD(95.3-7.1)



Εικόνα 17: mean+SD(95.3+7.1)



Εικόνα 18: mean-SD(93.0-9.5)

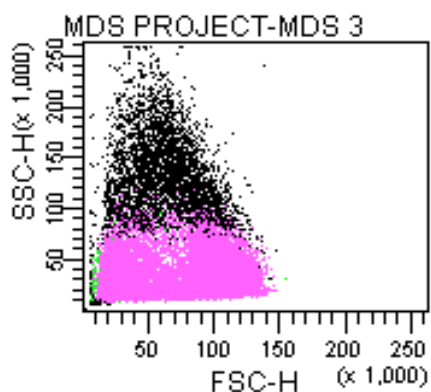


Εικόνα 19: mean+SD(93.0+9.5)

#### 1.4. Κυττασολικά κατιόντα ασβεστίου ( $Ca^{+2}$ )

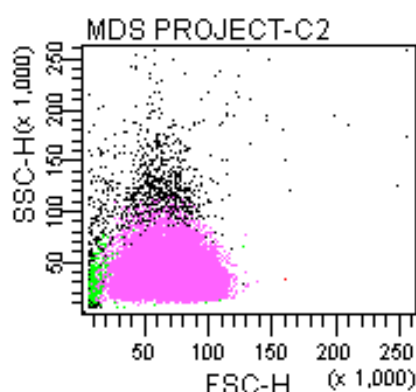
Η αύξηση του ενδοκυτταροπλασματικού ασβεστίου σηματοδοτεί την έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας των ερυθρών αιμοσφαιρίων . Η μεταβολή αυτή με την σειρά της ενεργοποιεί την διέγερση και την κινητικότητα των υπόλοιπων χημικών συστατικών του κυττάρου με αποτέλεσμα τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλοιώσεις των αποπτωτικών κυττάρων . Για να μπορέσει να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των επιπέδων του ασβεστίου κατά την ανάλυση του δείγματος στο κυτταρόμετρο χρησιμοποιήθηκε το μόριο Fluo-4AM το οποίο έπειτα από επεξεργασία απελευθερώνει φθορίζουσα ουσία και

οπτικοποιεί τα αποτελέσματα . Στην συγκεκριμένη έρευνα η παρουσία των κατιόντων στο εσωτερικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων , μέσος όρος + τυπική απόκλιση(1,041 + 266) , ήταν χαμηλότερη, χωρίς στατιστική σημαντικότητα, στα άτομα με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομά σε σύγκριση με τα φυσιολογικά όπου οι μετρήσεις ήταν 1,237 + 504 . Ενώ όσον αφορά τους υπολογισμούς του μέσου όρου – τυπική απόκλιση στα παθολογικά δείγματα παρατηρήθηκε μεγαλύτερος πληθυσμός κυττάρων θετικά στον ενδοκυτταρικό δείκτη  $Ca^{+2}$



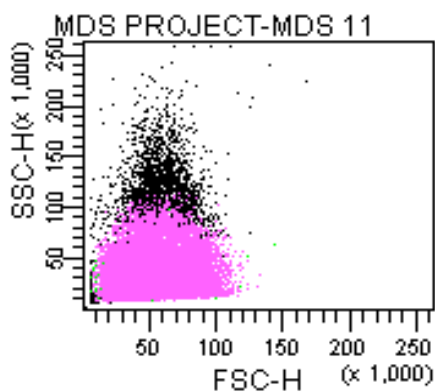
Experiment Name: iCa2+ MDS							
Specimen Name: MDS PROJECT							
Tube Name: MDS 3							
Record Date: Jun 9, 2022 4:29:06 PM							
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Geo Mean	SSC-A DCFDA FI... Mean	DCFDA FI... Geo Mean	DCFDA FI... Mean
All Events	29,321	###	109,687	49,329	71,117	###	877
RBCs	24,689	84.2	112,965	38,141	44,832	###	858
singlets	24,688	100.0	112,964	38,140	44,830	###	858
iCa2+	24,556	99.5	113,377	38,171	44,839	742	780

Εικόνα 20:mean-SD(1,041-266)



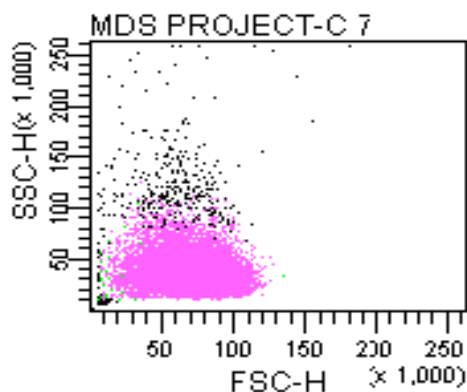
Experiment Name: iCa2+ MDS							
Specimen Name: MDS PROJECT							
Tube Name: C2							
Record Date: Jun 15, 2022 4:41:16 PM							
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Geo Mean	SSC-A DCFDA FI... Mean	DCFDA FI... Geo Mean	DCFDA FI... Mean
All Events	22,579	###	92,961	49,257	58,281	###	900
RBCs	21,294	94.3	94,060	46,367	51,188	###	869
singlets	21,290	100.0	94,040	46,364	51,184	###	860
iCa2+	20,907	98.2	95,312	46,380	51,131	784	820

Εικόνα 21:mean-SD(1,237-504)



Experiment Name: iCa2+ MDS							
Specimen Name: MDS PROJECT							
Tube Name: MDS 11							
Record Date: Jun 20, 2022 3:51:43 PM							
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Geo Mean	SSC-A DCFDA FI... Mean	DCFDA FI... Geo Mean	DCFDA FI... Mean
All Events	27,817	###	76,574	44,974	61,548	###	1,416
RBCs	25,128	90.3	76,492	38,844	47,562	###	1,410
singlets	25,118	100.0	76,464	38,830	47,541	###	1,409
iCa2+	24,996	99.5	76,581	38,855	47,556	1,189	1,295

Εικόνα 22:mean+SD(1,041+266)



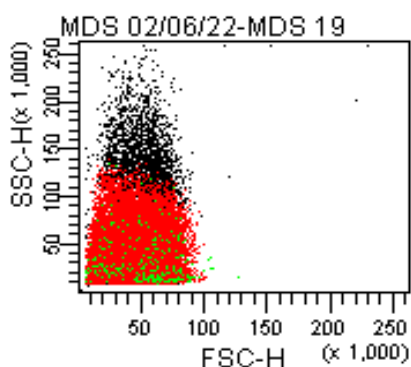
Experiment Name: iCa2+ MDS								
Specimen Name: MDS PROJECT								
Tube Name: C 7								
Record Date: Jul 4, 2022 4:29:35 PM								
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Geo Mean	SSC-A DCFDA FL... Mean	DCFDA FL... Geo Mean	DCFDA FL... Mean	
All Events	21,080	###	93,733	47,319	51,912	###	1,777	
RBCs	20,623	97.8	94,204	46,533	49,538	###	1,705	
singlets	20,620	100.0	94,189	46,529	49,532	###	1,705	
iCa2+	20,544	99.6	94,358	46,556	49,536	1,567	1,639	

Εικόνα 23: mean-SD(1,237+504)

Οι μετρήσεις και κατ'επέκταση τα διαγράμματα των κυττοσολικών ιόντων ασβεστίου προσδιορίστηκαν βάση του μέσου όρου του DCFDA FLUO-4AM από τον πίνακα δεδομένων, τόσο για τους υγιείς όσο και τους ασθενείς. Στα διαγράμματα του κυτταρόμετρου ροής ως συνιστώσες ανάλυσης των πληθυσμών των κυττάρων του δείγματος βρίσκονται στον κάθετο άξονα η πλάγια σκέδαση και στην οριζόντια η πρόσθια, ανιχνεύοντας τα κύτταρα βάση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών. Ο ροζ πληθυσμός των κυττάρων αντιπροσωπεύει τα ερυθρά αιμοσφαίρια που έχουν εκφράσει θετικότητα στην ανίχνευση ενδοκυττάρου  $Ca^{+2}$ .

### 1.5. Ενεργοποιημένη κασπάση-3

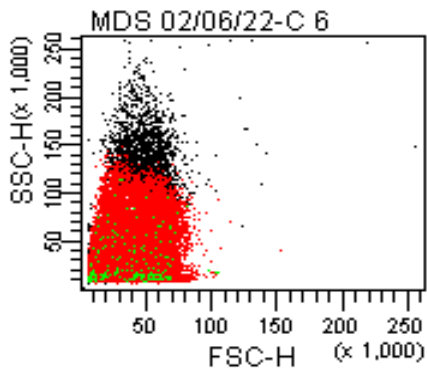
Ο προσδιορισμός των ενεργοποιημένων κασπασών-3 των αποπτωτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την σύζευξη ειδικών αντισωμάτων και το διάγραμμα του σήματος τους στο κυτταρόμετρο ροής είχε ως συνιστώσες τον πλάγιο (SSC-H) και πρόσθιο (FSC-H) σκεδασμό. Ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση του ποσοστού των ενεργοποιημένων κασπασών-3 που υπολογίστηκε στα παθολογικά δείγματα ήταν ίσος με  $5.17 \pm 4.08$  το οποίο εμφάνιζε μείωση σε σχέση με τα φυσιολογικά όπου η τιμή που αντιστοιχούσε ήταν  $8.02 \pm 7.24$ .



Experiment Name: CASPASE MDS								
Specimen Name: MDS 02/06/22								
Tube Name: MDS 19								
Record Date: Jul 4, 2022 4:52:04 PM								
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Geo Mean	SSC-A DCFDA ... Mean	DCFDA ... Geo Mean	DCFDA ... Mean	
All Events	30,000	###	58,246	32,184	52,080	###	233	
RBCs	27,364	91.21	58,114	27,882	40,022	###	189	
CASP-3	275	1.00	66,870	32,826	44,015	425	446	

Εικόνα 24: mean-SD(5.17-4.08)

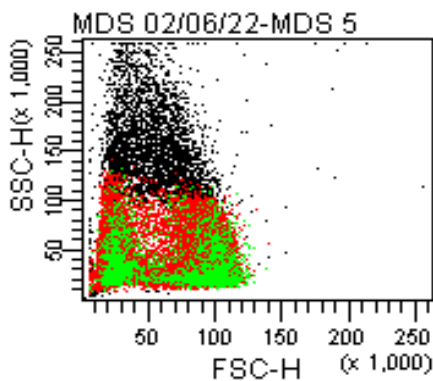




Experiment Name: CASPASE MDS  
 Specimen Name: MDS 02/06/22  
 Tube Name: C 6  
 Record Date: Jun 22, 2022 6:06:59 PM

Population	#Events	%Parent	FSC-A		SSC-A		SSC-A DCFDA ...		DCFDA ...
			Mean	Geo Mean	Mean	Geo Mean	Mean	Geo Mean	
All Events	30,000	###	52,125	31,628	52,944	###		169	
RBCS	27,706	92.35	51,709	27,230	41,006	###		164	
CASP-3	217	0.78	43,581	23,172	35,252	556		635	

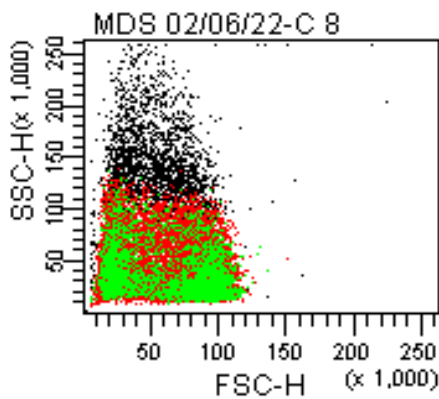
Εικόνα 25: mean-SD(8.02-7.24)



Experiment Name: CASPASE MDS  
 Specimen Name: MDS 02/06/22  
 Tube Name: MDS 5  
 Record Date: Jun 14, 2022 5:15:16 PM

Population	#Events	%Parent	FSC-A		SSC-A		SSC-A DCFDA ...		DCFDA ...
			Mean	Geo Mean	Mean	Geo Mean	Mean	Geo Mean	
All Events	30,000	###	75,849	###	69,216	###		304	
RBCS	26,016	86.72	78,000	37,568	47,325	###		242	
CASP-3	2,119	8.14	82,579	41,126	51,521	436		447	

Εικόνα 26: mean+SD(5.17+4.08)



Experiment Name: CASPASE MDS  
 Specimen Name: MDS 02/06/22  
 Tube Name: C 8  
 Record Date: Jul 4, 2022 4:56:01 PM

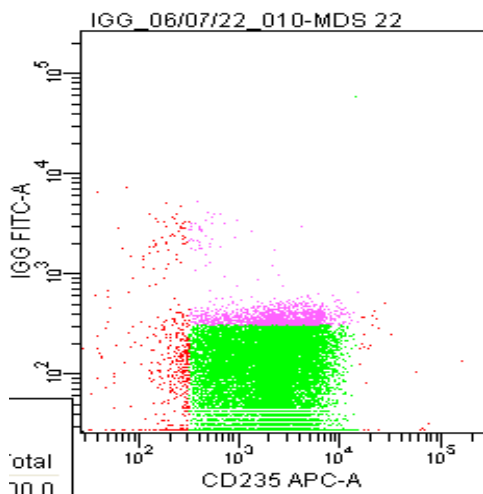
Population	#Events	%Parent	FSC-A		SSC-A		SSC-A DCFDA ...		DCFDA ...
			Mean	Geo Mean	Mean	Geo Mean	Mean	Geo Mean	
All Events	30,000	###	74,676	41,604	59,067	###		315	
RBCS	27,649	92.16	75,632	36,437	46,763	###		293	
CASP-3	3,415	12.35	76,508	40,223	50,557	410		415	

Εικόνα 27: mean+SD(8.02+7.24)

Στις παραπάνω εικόνες αποτυπώνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων μέσου όρου  $\pm$  τυπικής απόκλισης που συγκρίθηκαν μεταξύ των δύο πληθυσμών τόσο σε πίνακες από όπου και λήφθηκαν τα δεδομένα, όσο και διαγράμματα στα οποία τα σωματίδια (κύτταρα) με πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τον πληθυσμό των κυττάρων που είναι θετικά στον δείκτη που αναζητούσαμε (activated caspases-3).

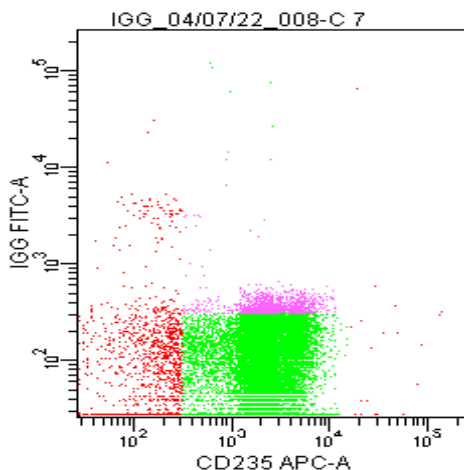
## 1.6. Μεμβρανοσυνδεδεμένες ανοσοσφαιρίνες IgG

Από το σήμα φθορισμού των αντι-αντισωμάτων IgG συζευγμένα με το φθοριόχρωμα FITC κατά την ανάλυση των δειγμάτων τόσο των ασθενών όσο και των controls στο κυτταρόμετρο προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα . Ο μέσος όρος του ποσοστού των IgG στα ερυθρά αιμοσφαίρια  $\pm$  τυπική απόκλιση , στην πρώτη ομάδα δειγμάτων ήταν αυξημένος και ίσος με  $6.50 \pm 2.26$  σε σύγκριση με τις αντίστοιχες μετρήσεις των κυττάρων των υγιών , όπου τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσίαζαν την τάση να είναι χαμηλότερα και ίσα με  $5.43 \pm 1.69$  .



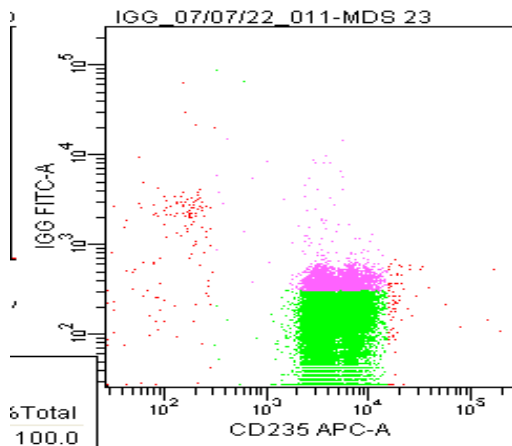
Experiment Name: MDS					
Specimen Name: IGG_06/07/22_010					
Tube Name: MDS 22					
Record Date: Jul 6, 2022 3:41:24 PM					
\$OP: Administrator					
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Mean	IGG FITC... Mean
All Events	33,041	###	98,198	69,438	87
SINGLETs	31,418	95.09	96,631	68,925	79
CD235	30,770	97.94	96,884	69,416	74
IGG	1,303	4.23	110,965	81,029	437

Εικόνα 20: mean-SD(6.5-2.26)



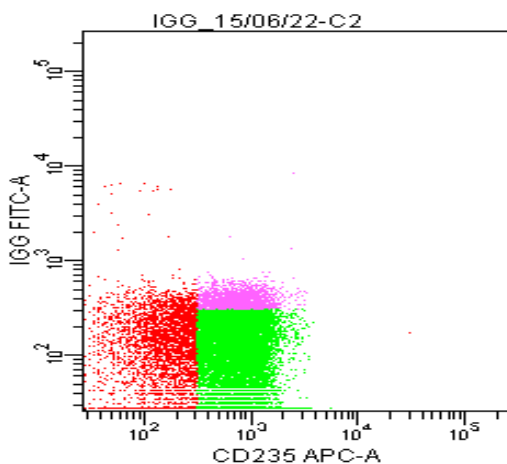
Experiment Name: MDS					
Specimen Name: IGG_04/07/22_008					
Tube Name: C 7					
Record Date: Jul 4, 2022 2:53:08 PM					
\$OP: Administrator					
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A Mean	IGG FITC... Mean
All Events	32,650	###	101,655	66,348	109
SINGLETs	32,111	98.35	102,720	67,068	91
CD235	30,333	94.46	103,688	67,965	82
IGG	1,155	3.81	121,620	80,380	415

Εικόνα 21: mean-SD(5.34-1.69)



Experiment Name: MDS					
Specimen Name: IGG_07/07/22_011					
Tube Name: MDS 23					
Record Date: Jul 7, 2022 1:53:38 PM					
\$OP: Administrator					
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A-IGG FITC... Mean	Mean
All Events	35,853	###	127,212	77,654	143
SINGLETs	32,173	89.74	116,812	72,390	117
CD235	31,931	99.25	116,872	72,116	106
IGG	2,892	9.06	130,066	84,527	430

Εικόνα 22: mean+SD(6.5+2.26)



Experiment Name: MDS					
Specimen Name: IGG_15/06/22					
Tube Name: C2					
Record Date: Jun 15, 2022 3:03:56 PM					
\$OP: Administrator					
Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	SSC-A-IGG FITC... Mean	Mean
All Events	31,095	###	99,764	58,513	78
SINGLETs	30,447	97.92	98,421	57,855	72
CD235	24,584	80.74	98,965	59,233	68
IGG	1,768	7.19	103,656	59,656	383

Εικόνα 23: mean+SD(5.34+1.69)

Στις παραπάνω εικόνες απεικονίζονται τα διαγράμματα κατανομής των κυττάρων κατά την ανάλυση τους στο κυτταρόμετρο ροής, τόσο ασθενών όσο και των υγείων, βάση της έκφρασης τους στις δυο φθορίζουσες χρωστικές ουσίες που έχουν σημειωθεί. Στον κάθετο άξονα εντοπίζεται το φθοριόχρωμα FITC που είναι συζευγμένο με τα αντι-αντισώματα IgG και στον οριζόντιο άξονα το φθοριόχρωμα APC το οποίο είναι συνδεδεμένο με τον δείκτη ερυθροκυττάρων CD235. Επομένως όπως φαίνεται και από τους αντίστοιχους πίνακες κάθε διαγράμματος ο ροζ πληθυσμός κυττάρων αντιπροσωπεύει τα κύτταρα που είναι θετικά και για τα δυο φθοριοχρώματα (FITC/APC), καθώς ο πληθυσμός αυτός βρίσκεται σε δυο νοητούς κάθετους άξονες μεταξύ τους, στο δεξιό άνω τριτημόριο το οποίο περιλαμβάνει τα ερυθρά αιμοσφαίρια με εκφρασμένα στην επιφάνεια τους αντισώματα IgG. Στα δύο πρώτα διαγράμματα (εικόνες 20,21) τα δεδομένα αντιστοιχούν στις τιμές μέσου όρου-τυπικής απόκλισης και των δύο ομάδων, ενώ στα ακριβώς επόμενα στις τιμές μέσου όρου+τυπική απόκλισης.

## **Ε.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η συγκεκριμένη μελέτη στηρίχθηκε στην ανάλυση δειγμάτων δύο ομάδων πληθυσμών παρόμοιων ηλικιών και διαφορετικών φύλων οι οποίες όμως διέφεραν ως προς την νοσηρότητα των μυελοδυσπλαστικών νοσημάτων. Η έρευνα αποσκοπούσε στην ανάλυση και μελέτη διαφόρων πιθανών μηχανισμών που μπορούν να διαδραματίζονται κατά την εξέλιξη αυτών των νεοπλασιών του μυελού των οστών και την πιθανή επίπτωση τους στην έκβαση των ασθενών και στην διάγνωση της κλινικής τους κατάστασης . Αυτού του είδους διεργασίες αφορούσαν το οξειδωτικό στρες , την ερυθρόπτωση , αιμολυτικούς δείκτες ως προς την ωσμωτική πίεση και την μηχανική πίεση , την κρυσταλλοποίηση άλλα και πιθανές διαταραχές στην πρωτεϊνική σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης .

Η παρούσα εργασία διαπραγματευόταν την κυτταροβιολογική μελέτη των ερυθρών αιμοσφαιρίων των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα , ως προς την μελέτη των δεικτών ερυθρόπτωσης και οξειδωτικού στρες. Οι προδιαθεσικοί δείκτες που ερευνήθηκαν για την σηματοδότηση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των ερυθρών αιμοσφαιρίων περιλάμβαναν την έκφραση του φωσφολιπιδίου PS στην εξωτερική στιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης , την δημιουργία δραστικών ριζών οξυγόνου ROS , τον εντοπισμό ενεργοποιημένων κασπασών-3 , την σύνδεση αντι-IgG στην επιφάνεια των κυττάρων και την διατάραξη της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού  $Ca^{+2}$  .

Πράγματι κατά την πρόωρη καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων εντοπίζονται μεταβολές στην εισροή και την απομάκρυνση χημικών μορίων , όπως η τάση αύξησης των ιόντων ασβεστίου στο κυτοσόλιο που σηματοδοτούν την απόπτωση τους .<sup>[16][17]</sup> Κατ' επέκταση ως απόρροια την ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των ιόντων , τα κύτταρα υφίστανται αλλοιώσεις του σχήματος τους λόγω διατάραξης της λιποπρωτεϊνικής δομής του κυτταρικού τους περιβλήματος και την εξωτερίκευση φωσφολιπιδίων από την εσωτερική στην εξωτερική στιβάδα .<sup>[24]</sup> Παράλληλα βάση των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί ,τα ΜΔΣ σχετίζονται κατά κύριο λόγο με διαδικασίες πρόωρης γήρανσης και αυτοκαταστροφής των κυττάρων των ασθενών .<sup>[151]</sup> Αν και οι παραπάνω δείκτες που αναφέρθηκαν προηγουμένως έχουν ερευνηθεί ως πιθανοί προδιαθεσικοί παράμετροι σχετιζόμενοι με την εξέλιξη των συνδρόμων αυτών , για ορισμένους από αυτούς δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί απόλυτα κάτι.

Είναι γνωστό ότι τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα χαρακτηρίζονται από μη λειτουργική αιμοποίηση και πανκυτταροπενία στο επίχρισμα του περιφερικού αίματος .<sup>[154]</sup> Από τις γενικές αίματος των παθολογικών δειγμάτων και των υγείων , είναι εμφανές ότι υπάρχουν διαφορές στις τιμές των αιματολογικών δεικτών οι οποίες επιβεβαιώνουν την κλινική εικόνα που έχει περιγραφεί στα ΜΔΣ. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στην εξέταση αιματολογικού επίχρισματος του περιφερικού αίματος των ασθενών εντοπίζεται μακροκυττάρωση και κυτταρική ανομοιομορφία το οποίο εξηγεί και τις αυξημένες τιμές των MCV,MCH,MCHC,RDW και αντίστοιχα των αιμοπεταλίων .<sup>[162]</sup> Από την άλλη οι χαμηλές τιμές στον πληθυσμό των κυττάρων του αίματος , δηλαδή στα λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια τεκμηριώνεται βάση της πρώτης εργαστηριακής ένδειξης που αναφέρθηκε , της κυτταροπενίας και της αυξημένης συχνότητας απόπτωσης των δυσπλαστικών κυττάρων .<sup>[173]</sup>

Από την ανάλυση των δειγμάτων της παρούσας έρευνας παρατηρήθηκε μια αύξηση στην μέτρηση και τον εντοπισμό της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των κυττάρων στο δείγμα ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα από ότι στα δείγματα των υγείων ατόμων . Όπως έχει αναφερθεί βασιζόμενο σε προηγούμενες έρευνες το συγκεκριμένο φωσφολιπίδιο αποτελεί τμήμα της εσωτερικής στιβάδας της μεμβράνης του κυττάρου μαζί με την φωσφατιδυλαιθανολαμίνη<sup>[125]</sup> , ενώ η διατάραξη της αρχιτεκτονικής δομής του κυτταρικού περιβλήματος προωθεί της έκφραση του λιπιδίου αυτού στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης ως φαγοκυτταρικός δείκτης .<sup>[24]</sup> Το αυξημένο σήμα φθορισμού της annexinV-PE που καταγράφηκε στο κυτταρόμετρο ροής από την ανάλυση των δειγμάτων αίματος των ατόμων με ΜΔΣ βάση των αναφορών που έχουν ειπωθεί για την εξωτερικευμένη PS επιβεβαιώνει την συσχέτιση της με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των δυσπλαστικών κυττάρων της συγκεκριμένης νόσου αιτιολογώντας κλινικά ευρήματα όπως οι κυτταροπενίες .<sup>[205]</sup> Η PS μπορεί να αποτελέσει προγνωστική παράμετρος για τα αποπτωτικά κύτταρα καθώς εντοπίζεται στα πρώιμα ακόμη στάδια ως αρχική ένδειξη κυτταρικών αλλοιώσεων .<sup>[205]</sup>

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια εξαιτίας της δράσης τους στον οργανισμό και των λειτουργιών που είναι υπεύθυνα να τελούν εκτίθενται σε διάφορες συνθήκες καταπόνησης είτε αποσυντονισμού της φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων με αποτέλεσμα να λαμβάνει χώρα ένα σύνολο πολυπαραγοντικών μεταβολών όπως το οξειδωτικό στρες και συνέχεια αυτού η ενεργοποίηση σηματοδοτικών δεικτών της απόπτωσης των κυττάρων .<sup>[44]</sup> Από τα δεδομένα του πίνακα των υγείων και ασθενών η συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου ROS στα παθολογικά δείγματα ήταν ιδιαίτερα αυξημένη καθώς όπως είναι

γνωστό η δράση αυτών των δραστικών μορφών συμβάλλει στην δημιουργία νεοπλασιών του αίματος όπως και στην παρεμπόδιση μονοπατιών υπεύθυνα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό <sup>[191]</sup>. Επομένως συνθήκες οξειδωτικού στρες σε κύτταρα ασθενών με μυελοδυσπλαστικά νοσήματα επηρεάζει ορατά την φυσιολογική λειτουργία και την επιβίωση τους καθώς στα σύνδρομα αυτά εντοπίζεται μειωμένος αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων όπως φαίνεται και από τις γενικές αίματος .

Όπως προαναφέρθηκε οι οδοί σηματοδότησης της κυτταρικής απόπτωσης ενεργοποιούν ταυτόχρονα μια ομάδα ενζύμων πρωτεόλυσης γνωστών ως κασπάσες <sup>[209]</sup>. Η αρχική μορφή αυτών των μορίων ονομάζεται προ-κασπάση και βρίσκεται σε αδρανή κατάσταση μέχρι να υποστεί πρωτεόλυση και να είναι τελικά ικανή να δράσει . <sup>[210]</sup> Το οξειδωτικό στρες είναι γνωστό ότι αποτελεί έναν από τους αιτιολογικούς παράγοντες πρόωρου κυτταρικού θανάτου και για τον λόγο αυτόν αιτία ενεργοποίησης των κασπασών των ερυθρών αιμοσφαιρίων , όπου αυτές με την σειρά τους δρουν πρωτεολύοντας την διαμεμβρανική πρωτεΐνη , ζώνη-3 . <sup>[28]</sup> Αντίστοιχα και σε γερασμένα κύτταρα βάση μελετών που έχουν γίνει , έχει εξίσου μελετηθεί η πιθανότητα συσχέτισης των ενεργοποιημένων κασπασών με άλλους απωπτοτικούς δείκτες που προικονομούν είτε επιβεβαιώνουν την αυτοκαταστροφή των κυττάρων . <sup>[111]</sup> Παρόλα τα ενδεχόμενα που έχουν συζητηθεί πάνω στον συγκεκριμένο δείκτη , από τα αποτελέσματα της προκειμένης έρευνας δεν επιβεβαιώθηκαν εξολοκλήρου , καθώς στην ομάδα των υγείων ατόμων το άθροισμα του μέσου όρου + τυπική απόκλιση υπερέβαινε κατά πολύ τις αντίστοιχες τιμές στα παθολογικά δείγματα . Όμως επειδή δεν υπάρχει κάτι βέβαιο δεν παύει να αποτελεί θέμα προς περαιτέρω διερεύνηση και συζήτηση.

Η συμμετοχή των ιόντων ασβεστίου με την σειρά τους έχουν αναφερθεί σε πολλές μελέτες ανάλυσης μονοπατιών προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου . Σε καταστάσεις στρες τις οποίες το ερυθρό αιμοσφαίριο αναγκάζεται να διέλθει κατά την διάρκεια της ζωής του , παρατηρείται ευαισθητοποίηση των διαύλων ασβεστίου και αύξηση των επιπέδων ενδοκυττάρων  $Ca^{+2}$  . <sup>[17][18]</sup> Αυτού του είδους η κυτταρική μεταβολή ενεργοποιεί μια σειρά άλλων μεταβολών , εισροής και εκροής χημικών στοιχείων από το κύτταρο, με ταυτόχρονα χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλοιώσεις. <sup>[10][21]</sup> Το κυτοσολικό ασβέστιο όπως παρατηρήθηκε και από την παρούσα έρευνα τείνει να αυξάνεται σε καταστάσεις απόπτωσης των κυττάρων η οποία διαδικασία είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστική στα ΜΔΣ όπου και εξηγείται η εμφανιζόμενη πανκυτταροπενία . Όμως , όπως αντίστοιχα σημειώθηκε και στις κασπάσες εν μέρη αύξηση στα παθολογικά δείγματα κατά τον υπολογισμό του μέσου όρου-τυπική απόκλιση σε σύγκριση με τους υγιείς , δεν μπορεί να εξαχθεί με απόλυτη βεβαιότητα κάποιο σχετικό συμπέρασμα .

Οι ανοσοσφαιρίνες IgG βάση μελετών της γήρανσης έχουν αναφερθεί ως δείκτες οψονινοποίησης και απομάκρυνσης από τα φαγοκύτταρα του οργανισμού .<sup>[106]</sup> Η διαδικασία με την οποία εκφράζονται στα κύτταρα που πρόκειται να καταστραφούν είναι η εξής: η πρωτεολυτική διάσπαση της ζώνης-3 και η στιβάδωση της εξαιτίας της μεταλλαγμένης αιμοσφαιρίνης στην μεμβράνη προωθεί την έκφραση αντιγονικών περιοχών στα ερυθρά αιμοσφαίρια προάγοντας την δέσμευση αντισωμάτων της τάξης IgG σε αυτές.<sup>[99]</sup> <sup>[100]</sup> Όπως παρατηρήθηκε σε προηγούμενες έρευνες τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα συνδέονται με διαδικασίες της γήρανσης και άρα πολύ πιθανόν και με την συγκεκριμένη σηματοδοτική οδό η οποία θα μπορούσε να αποτελέσει και αυτή επικουρικό παράγοντα έγκαιρης διάγνωσης των ΜΔΣ συνδυαστικά με τις υπόλοιπες . Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων κατά τον υπολογισμό των anti-IgG στα ερυθρά αιμοσφαίρια των δειγμάτων παρατηρείται συμφωνία με τις παραπάνω υποθετικές προβλέψεις ακόμη και αν δε είναι σίγουρο, απαιτεί περαιτέρω μελέτη προκειμένου να συμβάλλουν στην πρόγνωση .

## ΣΤ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Michael Föller<sup>1</sup>, Stephan M. Huber<sup>2</sup> and Florian Lang<sup>1</sup> Department of Physiology, University of Tübingen, Germany<sup>2</sup> Department of Radiation Oncology, University of Tübingen, Germany, Erythrocyte Programmed Cell Death, *IUBMB Life*, 60(10): 661–668, October 2008.
2. Palis J (2014) primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *front physiol*
3. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell stem cell*. 2012;10(2):120–36
4. Joshua T. Eggold<sup>1,2</sup> and Erinn B. Rankin<sup>1,2,3</sup>, Erythropoiesis, EPO, Macrophages, and Bone, figure F1, *Bone*. 2019 Feb; 119: 36–41, 2018 Mar 15.
5. Daugas E, Cande C and Kroemer G (2001) Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ*. 8: 1131–1133.
6. Callender, S.T., Powell, E.O. & Witts, C.J. (1945) The life-span of the red cell in man. *Journal Pathology Bacteriology*, 57, 129–139.
7. Mollison, P.L., Engelfriet, C.P. & Contreras, M. (1987) The transfusion of red cells. In: *Blood Transfusion in Clinical Medicine* (ed. by P. L. Mollison, C. P. Engelfriet & M. Contreras), pp. 95–158. Blackwell Scientific, Oxford.
8. Huisjes R., Bogdanova A., Van Solinge W.W., Schiffelers R.M., Kaestner L., Van Wijk R. Squeezing for Life—Properties of Red Blood Cell Deformability. *Front. Physiol.* 2018;9:656. doi: 10.3389/fphys.2018.00656.
9. Gallagher P. G. (2004b). Update on the clinical spectrum and genetics of red blood cell membrane disorders. *Curr. Hematol. Rep.* 3 85–91.
10. Lang K. S., Lang P. A., Bauer C., et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2005;15(5):195–202. doi: 10.1159/000086406.
11. Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, Ameisen JC: Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 2001;8:1143-1156.
12. Green DR, Reed JC: Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-1312.
13. Bortner CD, Cidlowski JA: Caspase independent/dependent regulation of K(+), cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:21953- 62.



14. Lang KS, Duranton C, Poehlmann H, Myssina S, Bauer C, Lang F, Wieder T, Huber SM: Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death and Differentiation* 2003;10(2):249-256.
15. Gulbins E, Jekle A, Ferlinz K, Grassme H, Lang F: Physiology of apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F605- F615.
16. Huber SM, Gamper N, Lang F: Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch* 2001;441:551-558.
17. Duranton C, Huber SM, Lang F: Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol* 2002;539:847-855
18. Lang PA, Kempe DS, Myssina S, Tanneur V, Birka C, Laufer S, Lang F, Wieder T, Huber SM: PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ* 2005;12:415-428.
19. Bookchin RM, Ortiz OE, Lew VL: Activation of calcium-dependent potassium channels in deoxygenated sickled red cells. *Prog Clin Biol Res* 1987;240:193-200.
20. Brugnara C, de Franceschi L, Alper SL: Inhibition of Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest* 1993;92:520-526.
21. Lang PA, Warskulat U, Heller-Stilb B, Huang DY, Grenz A, Myssina S, Duszenko M, Lang F, Haussinger D, Vallon V, Wieder T: Blunted apoptosis of erythrocytes from taurine transporter deficient mice. *Cell Physiol Biochem* 2003;13:337-346.
22. Pant HC, Virmani M, Gallant PE: Calcium-induced proteolysis of spectrin and band 3 protein in rat erythrocyte membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;117:372-377.
23. Allan D, Michell RH: Calcium ion-dependent diacylglycerol accumulation in erythrocytes is associated with microvesiculation but not with efflux of potassium ions. *Biochem J* 1977;166:495-499.
24. Daugas E, Cande C and Kroemer G (2001) Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ.* 8: 1131–1133.
25. J Savill, V Fadok, P Henson, C Haslett *Immunol Today* **3**, 131–136 (1993).
26. V A Fadok, D J Laszlo, P W Noble, L Weinstein, D W Riches, P M Henson *J Immunol* **151**, 4274–4285 (1993).
27. Allen, T., Williamson, P., and Schlegel, R. A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
28. Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death, Lisa Repsold and Anna Margaretha Joubert, *Biomed Res Int.* 2018; 2018: 9405617, Published online 2018, Jan 3. doi: 10.1155/2018/9405617.

29. Lang KS, Myssina S, Brand V, Sandu C, Lang PA, Berchtold S, Huber SM, Lang F, Wieder T: Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 2004;11:231-243.
30. Production, metabolism and effect of platelet-activating factor on the growth of the human K562 erythroid cell line, F. Dupuis a, S. Levasseur b, F. Jean-Louis c, C. Dulery a, V. Praloran a, Y. Denizot a, L. Michel c, *Biochimica et Biophysica Acta* 1359 1997 241–249.
31. Dekkers D. W., Comfurius P., Bevers E. M., and Zwaal R. F. (2002) Comparison between Ca<sup>2+</sup>-induced scrambling of various fluorescently labelled lipid analogues in red blood cells. *Biochem. J.* 362, 741–747.
32. Woon L. A., Holland J. W., Kable E. P., and Roufogalis B. D. (1999) Ca<sup>2+</sup> sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts. *Cell Calcium* 25, 313–320.
33. Larsson A, Hult A, Nilsson A, Olsson M & Oldenborg PA (2016) Red blood cells with elevated cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> are primarily taken up by splenic marginal zone macrophages and CD207+ dendritic cells. *Transfusion* 56, 1834–1844.
34. Stimulation of Eryptosis by Afatinib, Al Mamun Bhuyan A.<sup>a</sup> · Lang F.<sup>b,c</sup>, *Cell Physiol Biochem* 2018;47:1259–1273.
35. Maellaro E, Leoncini S, Moretti D, Del Bello B, Tanganelli I, De Felice C, Ciccoli L: Erythrocyte caspase-3 activation and oxidative imbalance in erythrocytes and in plasma of type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol* 2013;50: 489-495.
36. Lang F., Lang K. S., Lang P. A., Huber S. M., Wieder T. Osmotic shock-induced suicidal death of erythrocytes. *Acta Physiologica*. 2006;87(1-2):191–198. doi: 10.1111/j.1748-1716.2006.01564.x.
37. Engelmann B, Schumacher U, Duhm J: Role of ABH blood group antigens in the stimulation of a DIDS-sensitive Ca<sup>2+</sup> influx pathway in human erythrocytes by *Ulex europaeus* agglutinin I and a monoclonal anti A1 antibody. *Biochim Biophys Acta* 1991;1091:261-269.
38. Attanasio P., Shumilina E., Hermle T., et al. Stimulation of eryptosis by anti-A IgG antibodies. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2007;20(5):591–600. doi: 10.1159/000107542.
39. Lang E., Bissinger R., Gulbins E., Lang F. Ceramide in the regulation of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Apoptosis*. 2015;20(5):758–767. doi: 10.1007/s10495-015-1094-4.
40. Wassell J. Haptoglobin: Function and polymorphism. *Clin Lab* 2000;46:547–552.
41. Shih A. W. Y., McFarlane A., Verhovsek M. (2014). Haptoglobin testing in hemolysis: measurement and interpretation. *Am. J. Hematol.* 89 443–447. 10.1002/ajh.23623
42. Qian Q., Nath K. A., Wu Y., Daoud T. M., Sethi S. (2010). Hemolysis and acute kidney failure. *Am. J. Kidney Dis.* 56 780–784. 10.1053/j.ajkd.2010.03.025

43. *Aging (Albany NY)*. 2014 Oct; 6(10): 788–819. Published online 2014 Oct 30. doi: 10.18632/aging.100695
44. Rosi Bissinger<sup>1</sup>, Abdulla Al Mamun Bhuyan<sup>2</sup>, Syed M. Qadri<sup>3,4</sup> and Florian Lang<sup>2,5</sup>, *Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases, the febs journal*, 286(2019) 826–854<sup>a</sup> 2018 Federation of European Biochemical Societies
45. Mischitelli M, Jemaaa M, Fezai M, Almasry M, Lang F & Faggio C (2017) Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by adarotene. *Cell Physiol Biochem* 41, 519–529.
46. [...] Jalko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M & Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44–84.
47. Pacher P, Beckman JS & Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87, 315–424.
48. Bansal AK & Bilaspuri GS (2010) Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int* 2010.
49. Hernandez-Garcia D, Wood CD, Castro-Obregon S & Covarrubias L (2010) Reactive oxygen species: a radical role in development? *Free Radic Biol Med* 49, 130–143.
50. Poyton RO, Ball KA & Castello PR (2009) Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* 20, 332–340.
51. Today's oxidative stress markers, Marta Czerska, Karolina Mikołajewska, Marek Zieliński, Jolanta Gromadzińska, Wojciech Wąsowicz, *Medycyna pracy* 2015;66(3):393–405.
52. Lang E & Lang F (2015) Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Semin Cell Dev Biol* 39, 35–42.
53. Sheng K, Shariff M, Hebbel RP. Comparative oxidation of hemoglobins A and S. *Blood*. 1998;91(9):3467–3470
54. George A., Pushkaran S., Konstantinidis D.G., Koochaki S., Malik P., Mohandas N., Zheng Y., Joiner C.H., Kalfa T.A. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. *Blood*. 2013;121:2099–2107. doi: 10.1182/blood-2012-07-441188.
55. Chiara Lembo,<sup>1</sup> Giuseppe Buonocore,<sup>1</sup> and Serafina Perrone<sup>2,\*</sup>, Stefania Pizzimenti, Academic Editor, Giuliana Muzio, Academic Editor, and Giuseppina Barrera, Academic Editor, *Oxidative Stress in Preterm Newborns, Antioxidants (Basel)*. 2021 Nov; 10(11): 1672. Published online 2021 Oct 23. doi: 10.3390/antiox10111672.
56. Raftos JE, Whillier S & Kuchel PW (2010) Glutathione synthesis and turnover in the human erythrocyte: alignment of a model based on detailed enzyme kinetics with experimental data. *J Biol Chem* 285, 23557–23567.

57. *Zavodnik LB, Niekurzak A, Szosland K & Bryszewska M (1998) Activation of red blood cell glutathione peroxidase and morphological transformation of erythrocytes under the action of tert-butyl hydroperoxide. Biochem Mol Biol Int 44, 577–588.*
58. *Yang Y, Dieter MZ, Chen Y, Shertzer HG, Nebert DW & Dalton TP (2002) Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gclm(-/-) knockout mouse. Novel model system for a severely compromised oxidative stress response. J Biol Chem 277, 49446–49452*
59. *Foller M, Harris IS, Elia A, John R, Lang F, Kavanagh TJ & Mak TW (2013) Functional significance of glutamate-cysteine ligase modifier for erythrocyte survival in vitro and in vivo. Cell Death Differ 20, 1350–1358.*
60. *Henry Jay Forman<sup>1,2</sup> and Hongqiao Zhang<sup>2</sup>, Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy, Nat Rev Drug Discov. 2021; 20(9): 689–709.*
61. *Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989;86:6377–6381.*
62. *Hill KE, et al. Combined deficiency of vitamins E and C causes paralysis and death in guinea pigs. Am. J. Clin. Nutr. 2003;77:1484–1488.*
63. *Packer JE, Slater TF, Willson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. Nature 1979;278:737–8.*
64. *Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington, DC: National Academy Press, 2000.*
65. *Lang KS, Durant C, Poehlmann H, Myssina S, Bauer C, Lang F, Wieder T & Huber SM (2003) Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. Cell Death Differ 10, 249–256.*
66. *Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F & Huber SM (2003) Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocyte apoptosis. Am J Physiol Cell Physiol 285, C1553–C1560.*
67. *de Jong K, Rettig MP, Low PS & Kuypers FA (2002) Protein kinase C activation induces phosphatidylserine exposure on red blood cells. Biochemistry 41, 12562–12567.*
68. *Kempe DS, Lang PA, Durant C, Akel A, Lang KS, Huber SM, Wieder T & Lang F (2006) Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. Faseb J 20, 368–370.*
69. *Pinzon-Diaz CE, Calderon-Salinas JV, Rosas-Flores MM, Hernandez G, Lopez-Betancourt A & Quintanar-Escorza MA (2018) Eryptosis and oxidative damage in hypertensive and dyslipidemic patients. Mol Cell Biochem 440, 105–113.*

70. Rodrigo R, Prat H, Passalacqua W, Araya J, Guichard C & Bachler JP (2007) Relationship between oxidative stress and essential hypertension. *Hypertens Res* 30, 1159–1167.
71. Tsutsui H, Kinugawa S & Matsushima S (2011) Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H2181–H2190.
72. Attanasio P, Bissinger R, Haverkamp W, Pieske B, Wutzler A & Lang F (2015) Enhanced suicidal erythrocyte death in acute cardiac failure. *Eur J Clin Invest* 45, 1316–1324
73. Perrone S., Laschi E., Buonocore G. Biomarkers of oxidative stress in the fetus and in the newborn. *Free Radic. Biol. Med.* 2019;142:23–31. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.034.
74. Perrone S., Laschi E., Buonocore G. Oxidative stress biomarkers in the perinatal period: Diagnostic and prognostic value. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2020;25:101087. doi: 10.1016/j.siny.2020.101087.
75. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.* 2003;42:318–343. doi: 10.1016/S0163-7827(03)00014-6.
76. Poli G., Schaur J.R. 4-Hydroxynonenal in the Pathomechanisms of Oxidative Stress. *IUBMB Life.* 2001;50:315–321. doi: 10.1080/713803726.
77. Tolun AA, Zhang H, Il'yasova D, Sztaray J, Young SP, Millington DS. Allantoin in human urine quantified by UPLC-MS/MS. *Anal Biochem.* 2010;402(2):191–3, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2010.03.033>.
78. Il'yasova D, Spasojevic I, Wang F, Tolun A, Base K, Young S, et al. Urinary biomarkers of oxidative status in a clinical model of oxidative assault. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(6):1506–10, <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0211>.
79. Grootveld M, Halliwell B. Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids. A potential index of freeradical reactions in vivo? *Biochem J.* 1987;243:803–8.
80. Kand'ár R, Žáková P, Mužáková V. Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography. *Clin Chim Acta.* 2006;365:249–56, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2005.09.002>.
81. Singh R., Barden A., Mori T., Beilin L. Advanced glycation end-products: A review. *Diabetologia.* 2001;44:129–146. doi: 10.1007/s001250051591.
82. Clark MR. *Physiol Rev* 1988; 68: 503–554.
83. Minetti G, Low PS. *Curr Opin Hematol* 1997; 4: 116–121.
84. María García-Roa,<sup>1</sup> María del Carmen Vicente-Ayuso,<sup>1</sup> Alejandro M. Bobes,<sup>1</sup> Alexandra C. Pedraza,<sup>1</sup> Ataúlfo González-Fernández,<sup>1</sup> María Paz Martín,<sup>1</sup> Isabel Sáez,<sup>2</sup> Jerard Seghatchian,<sup>3</sup> and Laura Gutiérrez , Red blood cell storage time and

*transfusion: current practice, concerns and future perspectives* , *Blood Transfus.* 2017 May; 15(3): 222–231.

85. Antonelou MH, Kriebardis AG, Papassideri IS. Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood Transfus.* 2010;8:s39–47.

86. Mebius R. E., Kraal G. (2005). Structure and function of the spleen. [Review]. *Nat. Rev. Immunol.* 5 606–616. 10.1038/nri1669.

87. Perumal Thiagarajan,<sup>1,2,\*</sup> Charles J. Parker,<sup>3</sup> and Josef T. Prchal<sup>4</sup>, How Do Red Blood Cells Die?, *Front Physiol.* 2021; 12: 655393.

88. Borun E. R., Figueroa W. G., Perry S. M. (1957). The distribution of Fe<sup>59</sup> tagged human erythrocytes in centrifuged specimens as a function of cell age. *J. Clin. Invest.* 36 676–679. 10.1172/JCI103468 .

89. Bosch FH, Werre JM, Roerdinkholder-Stoelwinder B, et al. Characteristics of red blood cell populations fractionated with a combination of counterflow centrifugation and Percoll separation. *Blood.* 1992;79:254–60.

90. Fitzgibbons JF, Koles RD, Jones R T Red cell age-related changes of hemoglobins A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, and A<sub>3</sub> in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 58:820, 197.

91. Angelo D’Alessandro, Barbara Blasi, Gian Maria D’Amici, Cristina Marrocco, and Lello Zolla , Red blood cell subpopulations in freshly drawn blood: application of proteomics and metabolomics to a decades-long biological issue , *Blood Transfus.* 2013 Jan; 11(1): 75–87 .

92. Joseph M. Rifkind and Enika Nagababu , Hemoglobin Redox Reactions and Red Blood Cell Aging , *Antioxid Redox Signal.* 2013 Jun 10; 18(17): 2274–2283.

93. By S.P. Sutura, R.A. Gardner, C.W. Boylan, G.I. Carroll, K.C. Chang, J.S. Marvel, C. Kilo, B. Gonen, and J.R. Williamson , Age-Related Changes in Deformability of Human Erythrocytes , *Blood* ,1985 Feb;65(2):275-82.

94. Bartosz G. Erythrocyte aging: physical and chemical membrane changes. *Gerontology.* 1991;37:33–67.

95. Waugh RE. Narla M. Jackson CW. Mueller TJ. Suzuki T. Dale GL. Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood.* 1992;79:1351–1358.

96. Piomelli S, Seaman C: Mechanism of red blood cell aging: relationship of cell density and cell age. *Am J Hematol* 1993;42:46-52.

97. Wu, Y., Tibrewal, N. & Birge, R.B. (2006) Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends in Cell Biology*,16,189–197.

98. Willekens FL. Werre JM. Groenen-Dopp YA. Roerdinkholder-Stoelwinder B. de PB. Bosman GJ. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Br J Haematol.* 2008;141:549–556.

99. Pantaleo, A., Giribaldi, G., Mannu, F., Arese, P. & Turrini, F. (2008) Naturally occurring anti-band3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Au-toimmunity Reviews.*, 7, 457–462.
100. Kay MM. Generation of senescent cell antigen on old cells initiates IgG binding to a neoantigen. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1993;39:131–153.
101. Kay, M.M.B., Bosman, G.J.C.G.M., Shapiro, S.S., Bendich, A. & Bassel, P.S. (1986) Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 2463–2467.
102. Ando K, Kikugawa K, Beppu M: Induction of band 3 aggregation in erythrocytes results in anti-band 3 autoantibody binding to the carbohydrate epitopes of band 3. *Arch Biochem Biophys* 339:250, 1997.
103. Turrini F, Arese P, Yuan J, Low PS: Clustering of integral membrane proteins of the human erythrocyte membrane stimulates autologous IgG binding, complement deposition, and phagocytosis. *J Biol Chem* 266:23611, 1991.
104. Lutz H. U. (1981). [Elimination of old erythrocytes from the circulation: exposure of a cell-age specific antigen on aging erythrocytes]. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 111, 1507–1517.
105. Lutz H. U., Stringaro-Wipf G. (1983). Senescent red cell-bound IgG is attached to band 3 protein. *Biomed. Biochim. Acta* 42, 117–121.
106. Kay, M. (2005) Immunoregulation of cellular lifespan. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1057, 85–111.
107. Kay, M.M.B. (1984a) Localization of senescent cell antigen on band 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 5753–5757.
108. Harman D. Aging, a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298–300.
109. Low PS. Waugh SM. Zinke K. Drenckhahn D. The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science*. 1985;227:531–533 .
110. Mandal D, Baudin-Creuzat V, Bhattacharyya A, et al. Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (Band 3) *J Biol Chem*. 2003;278:52551–8.
111. Mandal D, Moitra PK, Saha S, Basu J. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett*. 2002;513:184–8.
112. Miki Y, Tazawa T, Hirano K, et al. Clearance of oxidized erythrocytes by macrophages: Involvement of caspases in the generation of clearance signal at band 3 glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;363:57–62.

113. George A., Pushkaran S., Konstantinidis D. G., Koochaki S., Malik P., Mohandas N., et al. (2013). Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. *Blood* 121, 2099–2107 10.1182/blood-2012-07-441188 .
114. Mihov D., Vogel J., Gassmann M., Bogdanova A. (2009). Erythropoietin activates nitric oxide synthase in murine erythrocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297, C378–C388 10.1152/ajpcell.00543.2008 .
115. Aoshi K. Nakajima Y. Yasui S. Tamaoki J. Nagai A. Red blood cells inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood.* 1999;93:4006–4010.
116. Kleinbongard P. Schulz R. Rassaf T. Lauer T. Dejam A. Jax T. Kumara I. Gharini P. Kabanova S. Ozuyaman B. Schnurch HG. Godecke A. Weber AA. Robenek M. Robenek H. Bloch W. Rosen P. Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood.* 2006;107:2943–2951.
117. Romero N. Radi R. Hemoglobin and red blood cells as tools for studying peroxynitrite biochemistry. *Methods Enzymol.* 2005;396:229–245.
118. Pacher P. Beckman JS. Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007;87:315–424.
119. Kiefer CR. Snyder LM. Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol.* 2000;7:113–116.
120. [...]Nagababu E. Rifkind JM. Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation. *Biochemistry.* 2000;39:12503–12511.
121. Nagababu E. Rifkind JM. Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;247:592–596.
122. Nagababu E. Rifkind JM. Heme degradation during autoxidation of oxyhemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273:839–845.
123. Nagababu E. Fabry ME. Nagel RL. Rifkind JM. Heme degradation and oxidative stress in murine models for hemoglobinopathies: thalassemia, sickle cell disease and hemoglobin C disease. *Blood Cells Mol Dis.* 2008;41:60–66.
124. Glass GA. Gershon D. Decreased enzymic protection and increased sensitivity to oxidative damage in erythrocytes as a function of cell and donor aging. *Biochem J.* 1984;218:531–537.
125. Haest CWM: Distribution and movement of membrane lipids; in Bernhardt I, Elorry JC (eds): *Red cell membrane transport in health and disease.* Berlin, Springer, 2003, pp 1-25.



126. Sebastian T. T., Baldrige R. D., Xu P., Graham T. R. (2012). Phospholipid flippases: building asymmetric membranes and transport vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1821 1068–1077. 10.1016/j.bbaliip.2011.12.007 .
127. Coleman J. A., Quazi F., Molday R. S. (2013). Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1831 555–574. 10.1016/j.bbaliip.2012.10.006 .
128. Pomorski T. G., Menon A. K. (2016). Lipid somersaults: uncovering the mechanisms of protein-mediated lipid flipping. *Prog. Lipid Res.* 64 69–84. 10.1016/j.plipres.2016.08.003.
129. Nguyen D. B., Wagner-Britz L., Maia S., Steffen P., Wagner C., Kaestner L., et al. (2011). Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 28, 847–856.
130. Bogdanova A., Makhro A., Wang J., Lipp P., Kaestner L. (2013). Calcium in red blood cells - a perilous balance. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 9848–9872.
131. Fadok V. A., Bratton D. L., Henson P. M. (2001). Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J. Clin. Invest.* 108 957–962. 10.1172/jci200114122.
132. Lew V. L., Daw N., Etzion Z., Tiffert T., Muoma A., Vanagas L., et al.. (2007). Effects of age-dependent membrane transport changes on the homeostasis of senescent human red blood cells. *Blood* 110, 1334–1342.
133. Wiley J. S., Shaller C. C. (1977). Selective loss of calcium permeability on maturation of reticulocytes. *J. Clin. Invest.* 59, 1113–1119.
134. Wesseling M. C., Wagner-Britz L., Huppert H., Hanf B., Hertz L., Nguyen D. B., et al. (2016b). Phosphatidylserine exposure in human red blood cells depending on cell age. *Cell. Physiol. Biochem.* 38, 1376–1390.
135. de Back D., Kostova E., van Kraaij M., van den Berg T., van Bruggen R. (2014). Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front. Physiol.* 5:9. 10.3389/fphys.2014.00009.
136. Boas F. E., Forman L., Beutler E. (1998). Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 3077–3081. 10.1073/pnas.95.6.3077 .
137. Gerke V., Creutz C. E. & Moss S. E. Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 449–461 (2005).
138. Steinhardt R. A., Bi G. & Alderton J. M. Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science* 263, 390–393 (1994).
139. McNeil P. L. & Kirchhausen T. An emergency response team for membrane repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 499–505 (2005).

140. Anthony Bouter,<sup>1</sup> Céline Gounou,<sup>1</sup> Rémi Bérat,<sup>1</sup> Sisareuth Tan,<sup>1</sup> Bernard Gallois,<sup>2</sup> Thierry Granier,<sup>2</sup> Béatrice Langlois d'Estaintot,<sup>2</sup> Ernst Pöschl,<sup>3</sup> Bent Brachvogel,<sup>4</sup> and Alain R. Brisson<sup>a,1</sup> , Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair , *Nat Commun.* 2011 Apr; 2: 270.
141. Moss S. E. & Morgan R. O. The annexins. *Genome Biol.* 5, 219.1–219.9 (2004).
142. Swairjo M. A. & Seaton B. A. Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 193–213 (1994).
143. Oling F., Bergsma-Schutter W. & Brisson A. Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin a5 two-dimensional crystals. *J. Struct. Biol.* 133, 55–63 (2001).
144. Vénien-Bryan C. et al. Characterization of the growth of 2D protein crystals on a lipid monolayer by ellipsometry and rigidity measurements coupled to electron microscopy. *Biophys. J.* 74, 2649–2657 (1998).
145. Yi-Chih Lin,<sup>1,2</sup> Christophe Chipot,<sup>3,4</sup> and Simon Scheuring<sup>1,2</sup> , Annexin-V stabilizes membrane defects by inducing lipid phase transition , *Nat Commun.* 2020; 11: 230.
146. McNeil PL, Vogel SS, Miyake K, Terasaki M. Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *J. Cell Sci.* 2000;113(Pt 11):1891–1902.
147. Rand J. H. & Wu X. Antibody-mediated interference with annexins in the antiphospholipid syndrome. *Thromb. Res.* 114, 383–389 (2004).
148. James P. Buerck,<sup>1</sup> Dustin K. Burke,<sup>1</sup> David W. Schmidtke,<sup>3</sup> Trevor A. Snyder,<sup>4,5</sup> Dimitrios Papavassiliou,<sup>1</sup> and Edgar A. O’Rean<sup>1,2</sup> , A Flow Induced Autoimmune Response and Accelerated Senescence of Red Blood Cells in Cardiovascular Devices , *Sci Rep.* 2019; 9: 19443.
149. Robert P. Hasserjian , Myelodysplastic Syndrome Updated , *Pathobiology* 2019;86:7–13 .
150. Van Etten RA, Shannon KM. Focus on myeloproliferative diseases and myelodysplastic syndromes., *Cancer Cell*, 2004, vol. 6 (pg. 547-552).
151. Guillermo Garcia-Manero , Kelly S. Chien , Guillermo Montalban-Bravo , Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk stratification and management , *American journal of Hematology* , 03 August 2020.
152. Gina Zini, M.D , Diagnostics and Prognostication of Myelodysplastic Syndromes , *Ann Lab Med.* 2017 Nov; 37(6): 465–474.
153. Ganan-Gomez I, Wei Y, Starczynowski DT, et al. Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2015;29(7):1458-1469.
154. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013;122(22):3616-3627; quiz 99.

155. Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007;110(13):4385-4395.
156. Schanz J, Tuchler H, Sole F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012;30(8):820-829
157. Neukirchen J., Schoonen W.M., Strupp C., Gattermann N., Aul C., Haas R., Germing U. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: Data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leuk. Res*. 2011;35:1591–1596. doi: 10.1016/j.leukres.2011.06.001.
158. Eva Hellström-Lindberg,<sup>1</sup> Magnus Tobiasson,<sup>1</sup> and Peter Greenberg<sup>2</sup> , Myelodysplastic syndromes: moving towards personalized management , *Haematologica*. 2020 Jul; 105(7): 1765–1779.
159. Greenberg PL, Stone RM, Al-Kali A, Barta SK, Bejar R, Bennett JM, et al. Myelodysplastic syndromes, Version 2.2017, NCCN Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15:60–87.
160. Orazi A. Histopathology in the diagnosis and classification of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome and myelodysplastic/myeloproliferative diseases. *Pathobiology*. 2007;74:97–114.
161. Nimer, SD: Myelodysplastic syndromes. *Blood* 111:4841-4851, 2008 .
162. Golde DW, Cline MJ. Human preleukemia: identification of a maturation defect in vitro., *N Engl J Med*, 1973, vol. 288 (pg. 1083-1086).
163. Malcovati L, Porta M, Pascutto C, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria, a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol*. 2005;23(30):7594–7603.
164. Neelam Varma<sup>1</sup>, Subhash Varma<sup>2</sup> , Proliferative indices, cytogenetics, immunophenotype and other prognostic parameters in myelodysplastic syndromes , *Indian Journal of Pathology and Microbiology* , issue 1 pg.97-101 ,2008.
165. Peter L. Greenberg,<sup>1</sup> Heinz Tuechler,<sup>2</sup> Julie Schanz,<sup>3</sup> Guillermo Sanz,<sup>4</sup> Guillermo Garcia-Manero,<sup>5</sup> Francesc Solé,<sup>6</sup> John M. Bennett,<sup>7</sup> David Bowen,<sup>8</sup> Pierre Fenaux,<sup>9</sup> Francois Dreyfus,<sup>10</sup> Hagop Kantarjian,<sup>5</sup> Andrea Kuendgen,<sup>11</sup> ..... , Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes , *Blood*. 2012 Sep 20; 120(12): 2454–2465.
166. Julie Schanz, Heinz Tüchler, Francesc Solé, Mar Mallo, Elisa Luño, José Cervera ....., New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia After MDS Derived From an International Database Merge , *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10; 30(8): 820–829.

167. Sanz G, Nomdedeu B, Such E, et al. Independent impact of iron overload and transfusion dependency on survival and leukemic evolution in patients with myelodysplastic syndrome [abstract]. *Blood*. 2008;112(11) Abstract 640.
168. Wimazal F, Sperr WR, Kundi M, et al. Prognostic value of lactate dehydrogenase activity in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2001;25(4):287–294.
169. Luca Malcovati, Matteo Giovanni Della Porta, Cristiana Pascutto, Rosangela Invernizzi, Marina Boni, Erica Travaglino, Francesco Passamonti, Luca Arcaini, Margherita Maffioli, Paolo Bernasconi, Mario Lazzarino, and Mario Cazzola , *Prognostic Factors and Life Expectancy in Myelodysplastic Syndromes Classified According to WHO Criteria: A Basis for Clinical Decision Making , Volume 23, Issue 30 ,2005*
170. James W. Vardiman, Nancy Lee Harris, and Richard D. Brunning , *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms , Blood First Edition Paper, June 21, 2002; DOI 10.1182/blood-2002-04-1199 , number 7 .*
171. Boultonwood J, Lewis S, Wainscoat JS. The 5q syndrome. *Blood*. 1994;84:3253-326075.
172. Wyllie AH: Apoptosis. *Br J Cancer* 67:205, 1993 .
173. J E Parker<sup>1</sup>, G J Mufti , *Ineffective haemopoiesis and apoptosis in myelodysplastic syndromes , British Journal of Haematology, 1998,101, 220–230 .*
174. Saskia MC Langemeijer,<sup>1,2</sup> Niccolo Mariani,<sup>1</sup> Ruth Knops,<sup>1</sup> Christian Gilissen,<sup>3</sup> Rob Woestenenk,<sup>1</sup> Theo de Witte,<sup>4</sup> Gerwin Huls,<sup>2,5</sup> Bert A van der Reijden,<sup>1</sup> and Joop H Jansen<sup>1,\*</sup> , *Apoptosis-Related Gene Expression Profiling in Hematopoietic Cell Fractions of MDS Patients , PLoS One. 2016; 11(11): e0165582.*
175. Guerenne L, Beurlet S, Said M, Gorombeï P, Le Pogam C, Guidez F, et al. GEP analysis validates high risk MDS and acute myeloid leukemia post MDS mice models and highlights novel dysregulated pathways. *Journal of hematology & oncology*. 2016;9:5.
176. Will B, Zhou L, Vogler TO, Ben-Neriah S, Schinke C, Tamari R, et al. Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations. *Blood*. 2012;120(10):2076–86. 10.1182/blood-2011-12-399683 .
177. i AJ, Calvi LM. The microenvironment in myelodysplastic syn-dromes: Niche-mediated disease initiation and progression.*ExpHematol*2017;55:3–18.
178. Abe S, Kurata M, Suzuki Set al.*Minichromosome maintenance2 bound with retroviral Gp70 is localized to cytoplasm and en-hances DNA-damage-induced apoptosis.PLoS One*2012;7:1–16.
179. Suzuki S, Kurata M, Abe Set al.*Expression of MCM2 in the bone marrow of myelodysplastic syndromes: association with apoptosis and peripheral leukocytopenia.Exp Mol Pathol*2012;92: 160–66.© 2019 The Authors.*Pathology International*published by

Japanese Society of Pathology and John Wiley & Sons Australia, Ltd Bone marrow niches in myeloid neoplasms 71.

180. Dorshkind, K., Montecino-Rodriguez E., and Signer R.A.. 2009. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat. Rev. Immunol.* 9:57–62. doi: 10.1038/nri2471.

181. Barreyro, L., Chlon T.M., and Starczynowski D.T.. 2018. Chronic immune response dysregulation in MDS pathogenesis. *Blood.* 132:1553–1560. doi: 10.1182/blood-2018-03-784116.

182. Jennifer J. Trowbridge, Daniel T. Starczynowski, Innate immune pathways and inflammation in hematopoietic aging, clonal hematopoiesis, and MDS, *J Exp Med.* 2021 Jul 5; 218(7): e20201544.

183. Sonja Heibl,<sup>1,2</sup> Reinhard Stauder,<sup>3</sup> and Michael Pfeilstöcker<sup>4</sup>, Is Myelodysplasia a Consequence of Normal Aging?, *Curr Oncol Rep.* 2021; 23(12): 142.

184. Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6(12):2853–2868. doi: 10.1371/journal.pbio.0060301.

185. Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. *Sci Adv.* 2016;2(7):e1600584. doi: 10.1126/sciadv.1600584.

186. Schratz KE, Haley L, Danoff SK, Blackford AL, DeZern AE, Gocke CD, et al. Cancer spectrum and outcomes in the Mendelian short telomere syndromes. *Blood.* 2020;135(22):1946–1956. doi: 10.1182/blood.2019003264.

187. Camaschella C, Nai A. Ineffective erythropoiesis and regulation of iron status in iron loading anaemias. *Br J Haematol.* 2016;172(4):512–523. doi: 10.1111/bjh.13820.

188. del Rey M, Benito R, Fontanillo C, Campos-Laborie FJ, Janusz K, Velasco-Hernández T, et al. Dereglulation of genes related to iron and mitochondrial metabolism in refractory anemia with ring sideroblasts. *PLoS ONE.* 2015;10(5):e0126555. doi: 10.1371/journal.pone.0126555.

189. Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 2005;106(4):1479–87. doi: 10.1182/blood-2004-11-4282.

190. Sallman DA, List A. The central role of inflammatory signaling in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2019;133(10):1039–1048. doi: 10.1182/blood-2018-10-844654.

191. Sardina J. L., López-Ruano G., Sánchez-Sánchez B., Llanillo M., Hernández-Hernández A. (2012). Reactive oxygen species: are they important for

- haematopoiesis?. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 81 257–274. doi: 10.1016/j.critrevonc.2011.03.005 .
192. Wu Q., Ni X. ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Curr. Drug Targets.* 2015;16:13–19. doi: 10.2174/1389450116666150113121054.
193. Santini V., Melnick A., Maciejewski J.P., Duprez E., Nervi C., Cocco L., Ford K.G., Mufti G. Epigenetics in focus: Pathogenesis of myelodysplastic syndromes and the role of hypomethylating agents. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2013;88:231–245. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.06.004.
194. Gonçalves A. C., Cortesão E., Oliveiros B., Alves V., Espadana A. I., Rito L., et al. (2015). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction play a role in myelodysplastic syndrome development, diagnosis, and prognosis: a pilot study. *Free Radic Res.* 49 1081–1094. doi: 10.3109/10715762.2015.1035268 .
195. Gonçalves A.C., Cortesão E., Oliveiros B., Alves V., Espadana A.I., Rito L., Magalhães E., Pereira S., Pereira A., Costa J.M., et al. Oxidative stress levels are correlated with P15 and P16 gene promoter methylation in myelodysplastic syndrome patients. *Clin. Exp. Med.* 2016;16:333–343. doi: 10.1007/s10238-015-0357-2.
196. Liu Y., Li Q., Zhou L., Xie N., Nice E. C., Zhang H., et al. (2016). Cancer drug resistance: redox resetting renders a way. *Oncotarget* 7 42740–42761. doi: 10.18632/oncotarget.8600 .
197. Ana Cristina Gonçalves<sup>1,2,3,4</sup>, Raquel Alves<sup>1,2,3,4</sup>, Inês Baldeiras,<sup>5,6</sup> Bárbara Marques,<sup>1,7</sup> Bárbara Oliveiros,<sup>2,3,5</sup> Amélia Pereira,<sup>2,3,8</sup> José Manuel Nascimento Costa,<sup>2,3,9</sup> Emília Cortesão,<sup>1,2,3,4,7</sup> Luisa Mota Vieira,<sup>10,11,12,\*</sup> and Ana Bela Sarmiento Ribeiro<sup>1,2,3,4,7,\*</sup> , DNA Methylation Is Correlated with Oxidative Stress in Myelodysplastic Syndrome—Relevance as Complementary Prognostic Biomarkers , *Cancers (Basel)*. 2021 Jul; 13(13): 3138.
198. Hanada N., Takahata T., Zhou Q., Ye X., Sun R., Itoh J., Ishiguro A., Kijima H., Mimura J., Itoh K., et al. Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2012;12:66. doi: 10.1186/1471-2407-12-66.
199. Lin P., Ren Y., Yan X., Luo Y., Zhang H., Kesarwani M., et al. (2019). The high NRF2 expression confers chemotherapy resistance partly through up-regulated DUSP1 in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 104 485–496.
200. Ana Cristina Gonçalves,<sup>1,2,3,4</sup> Raquel Alves,<sup>1,2,3,4</sup> Inês Baldeiras,<sup>5,6</sup> Joana Jorge,<sup>1,2,3,4</sup> Bárbara Marques,<sup>1,7</sup> Artur Paiva,<sup>2,3,8</sup> Bárbara Oliveiros,<sup>5</sup> Emília Cortesão,<sup>1,2,3,4,7</sup> José Manuel Nascimento Costa,<sup>2,3,9</sup> and Ana Bela Sarmiento-Ribeiro<sup>1,2,3,4,7,\*</sup> , Oxidative Stress Parameters Can Predict the Response to Erythropoiesis-Stimulating Agents in Myelodysplastic Syndrome Patients , *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 701328. \

201. Picou F., Vignon C., Debeissat C., Lachot S., Kosmider O., Gallay N., Foucault A., Estienne M.H., Ravalet N., Bene M.C., et al. Bone marrow oxidative stress and specific antioxidant signatures in myelodysplastic syndromes. *Blood Adv.* 2019;3:4271–4279.
202. Sarmiento-Ribeiro A. B., Proença M. T., Sousa I., Pereira A., Guedes F., Teixeira A., et al. (2012). A possible role for oxidation stress in lymphoid leukaemias and therapeutic failure. *Leuk. Res.* 36 1041–1048. 10.1016/j.leukres.2012.03.015.
203. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, et al: Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 2119 – 2137.
204. Hussam Ghoti,<sup>1</sup> Eitan Fibach,<sup>2</sup> Drorit Merkel,<sup>3</sup> Galit Perez-Avraham,<sup>4</sup> Sigal Grisariu,<sup>2</sup> and Eliezer A Rachmilewitz<sup>1</sup>, Changes in parameters of oxidative stress and free iron biomarkers during treatment with deferasirox in iron-overloaded patients with myelodysplastic syndromes, *Haematologica.* 2010 Aug; 95(8): 1433–1434.
205. Shakil H. Merchant, Nick J. Gonchoroff, and Robert E. Hutchison, Apoptotic Index by Annexin V Flow Cytometry: Adjunct to Morphologic and Cytogenetic Diagnosis of Myelodysplastic Syndromes, *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 46:28 – 32 (2001) ©2001 Wiley-Liss, Inc.
206. Yoshida Y. Hypothesis: apoptosis may be the mechanism responsible for the premature intramedullary cell death in the myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 1993;7:144 –146.
207. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *Immunol Methods* 1995;184:39 –51.
208. Parker JE, Mufti GJ. Ineffective hematopoiesis and apoptosis in MDS. *Br J Haematol* 1998;101:656 – 659.
209. Los M., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K., The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction. *Immunity.* 1999; 10: 629.
210. Didier Bouscary, Yan Lian Chen, Martine Guesnu, Catherine Lacombe, François Dreyfus, Activity of the caspase-3/CPP32 enzyme is increased in “early stage” myelodysplastic syndromes with excessive apoptosis, but caspase inhibition does not enhance colony formation in vitro, *Experimental hematology*, VOLUME 28, ISSUE 7, P784-791, JULY 01, 2000.
211. Lepelley P., Campergue L., Gradel N., et al., Is apoptosis a massive process in myelodysplastic syndromes?, *Br J Haematol.* 1996; 95: 368.
212. George I. Mias,<sup>1,4</sup> Rui Chen,<sup>1,4</sup> Yan Zhang,<sup>2</sup> Kunju Sridhar,<sup>3</sup> Donald Sharon,<sup>1</sup> Li Xiao,<sup>2</sup> Hogune Im,<sup>1</sup> Michael P. Snyder,<sup>b,1</sup> and Peter L. Greenberg<sup>a,3</sup> Specific Plasma Autoantibody Reactivity in Myelodysplastic Syndromes, *Sci Rep.* 2013; 3: 3311.

213. Kordasti S. Y. et al. IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* **145**, 64–72, 10.1111/j.1365-2141.2009.07593.x (2009).
214. Hogarth P. M. & Pietersz G. A. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 311–331, 10.1038/nrd2909 (2012).
215. Komrokji RS, List AF. Short-and long-term benefits of lenalidomide treatment in patients with lower-risk del (5q) myelodysplastic syndromes. *Annals of Oncology.* 2016. January 1;27(1):62–8.
216. Möllgård L, Saft L, Treppendahl MB, Dybedal I, Nørgaard JM, Astermark J, et al. Clinical effect of increasing doses of lenalidomide in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with chromosome 5 abnormalities. *Haematologica.* 2011. July 1;96(7):963–71.
217. Heise C, Carter T, Schafer P, Chopra R. Pleiotropic mechanisms of action of lenalidomide efficacy in del (5q) myelodysplastic syndromes. *Expert Review of Anticancer Therapy.* 2010. October 1;10(10):1663–72.
218. Aixia Dou and Jing Fang , Cyclosporine Broadens the Therapeutic Potential of Lenalidomide in Myeloid Malignancies , *J Cell Immunol.* 2020; 2(5): 237–244.
219. Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, Hofstetter H, Wolf RM, Seuwen K. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature.* 2003. September;425(6953):93–8.



