



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

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΑΙΜΟΛΥΣΗΣ ΣΕ**  
**ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ**  
**(MDS)**

**ΠΑΝΟΥΤΣΟΥ ΑΝΔΡΙΑΝΑ (ΑΜ:18678247)**

Επιβλέπων: Κριεμπάρδης Αναστάσιος

Αθήνα, Μάρτιος 2023



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

**DIPLOMA THESIS**

**LABORATORY STUDY OF HEMOLYSIS MARKERS IN**  
**PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROMES**  
**(MDS)**

**PANOUSOU ANDRIANA (CANDIDATE NUMBER:18678247)**

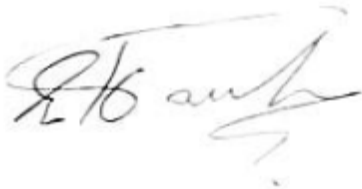
Supervisor: Kriempardis Anastasios

Athens, March 2023



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

**Επιτροπή εξέτασης συμπεριλαμβανομένου και του εισηγητή**

<b>ΑΞΙΟΛΟΓΗΤΗΣ</b>	<b>ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ	
ΠΑΥΛΟΥ ΕΥΘΥΜΙΑ	
ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΦΟΡΤΗΣ	



## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Πανούτσου Ανδριάννα, με αριθμό μητρώου 18678247 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Διοικητικών, Οικονομικών και Κοινωνικών Επιστημών του Τμήματος Αρχειονομίας, Βιβλιοθηκονομίας και Συστημάτων Πληροφόρησης, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα



<b>Συντομογραφίες</b>	8
<b>Περίληψη</b>	10
<b>A. Εισαγωγή</b>	14
<b>A1. Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα</b>	14
<b>A1.1 Διάγνωση Μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων</b>	16
<b>A1.2 Θεραπευτική προσέγγιση Μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων</b>	19
<b>A1.2.1 Θεραπεία χηλίωσης σιδήρου</b>	21
<b>A2. Αναιμία</b>	22
<b>A2.1 Μικροκυτταρική αναιμία</b>	22
<b>A2.2 Σιδηροπενική αναιμία</b>	22
<b>A2.3 Θαλασσαιμία</b>	23
<b>A2.4 Νορμοκυτταρική αναιμία</b>	23
<b>A2.5 Αναιμία χρόνιας νόσου</b>	23
<b>A3. G6PD</b>	24
<b>A3.1 Ο ρόλος του G6PD στην κυτταρική ανάπτυξη</b>	24
<b>A3.2 Ανεπάρκεια G6PD</b>	25
<b>A4. Αιμοσφαιρίνη</b>	26
<b>A5. Κύτταρα του αίματος</b>	28
<b>A5.1 Φυσιολογία του αίματος</b>	28
<b>A5.2 Ερυθρά αιμοσφαίρια</b>	28
<b>A5.2.1 Αιμοποίηση</b>	29
<b>A5.3 Αιμοπετάλια</b>	31
<b>A5.4 Λευκά αιμοσφαίρια</b>	31
<b>A6. Μηχανική αιμόλυση</b>	33
<b>A6.1 Μηχανική ευθραυστότητα ερυθρών αιμοσφαιρίων</b>	33
<b>B. Υλικά και μέθοδοι</b>	35
<b>B1. Υλικά</b>	35
<b>B1.2 Εμπορικά διαθέσιμα κιτ αντιδράσεων</b>	35
<b>B1.3 Αναλώσιμα</b>	35
<b>B1.4 Όργανα-Συσκευές</b>	35
<b>B2. Μέθοδοι</b>	36
<b>B2.1 Ασθενείς και Μάρτυρες</b>	36
<b>B2.2 Υπολογισμός ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος</b>	36
<b>B2.3 Μηχανική αιμόλυση</b>	37
<b>B2.4 Υπολογισμός G6PD</b>	38

<b>Γ. Αποτελέσματα</b>	39
<b>Γ1. Ασθενείς</b>	39
<b>Γ2. Αιματολογικός έλεγχος</b>	39
<b>Γ3. Εργαστηριακός έλεγχος</b>	42
<b>Δ. Συζήτηση</b>	46
<b>Ε. Βιβλιογραφία</b>	49

## Συντομογραφίες

<b>MDS</b>	Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (Myelodysplastic Syndrome)	<b>PPP</b>	Οδός φωσφορικής πεντόζης (Pentose phosphate pathway)
<b>PB</b>	Περιφερικό αίμα (Peripheral blood)	<b>ROS</b>	Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive oxygen species)
<b>BM</b>	Μυελός των οστών (bone marrow)	<b>RSN</b>	Δραστικές ρίζες αζώτου
<b>AML</b>	Οξεία μυελογενής λευχαιμία (Acute Myeloid Leukemia)	<b>NADPH</b>	Φωσφορικό δινουκλεοτίδιο αδενίνης νικοτιναμιδίου (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
<b>Hb</b>	Αιμοσφαιρίνη (Hemoglobin)	<b>O<sub>2</sub></b>	Οξυγόνο (Oxygen)
<b>ΠΟΥ</b>	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO)	<b>RBCs</b>	Ερυθρά αιμοσφαίρια (Red Blood Cells)
<b>ASCT</b>	Αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (Allogeneic stem cell transplantation)	<b>WBCs</b>	Λευκά αιμοσφαίρια (White Blood Cells)
<b>G6PD</b>	Αφυδρογονάση-6-φωσφορικής γλυκόζης (Glucose-6-phosphate dehydrogenase)	<b>PBS</b>	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (Phosphate buffered saline)
<b>FHb</b>	Ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος (Plasma Free Hemoglobin)	<b>PLTs</b>	Αιμοπετάλια (Platelets)
<b>rpm</b>	Στροφές ανά λεπτό (Revolutions per minute)	<b>NEUTs</b>	Ουδετερόφιλα (Neutrophils)
<b>FHb-MECH</b>	Ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος ύστερα από μηχανική καταπόνηση (Mechanical plasma free)	<b>controls</b>	ομάδα ελέγχου



	hemoglobin)		
<b>MCV</b>	Μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων (mean capsular volume)	<b>RDW</b>	Δείκτης του βαθμού της ανισοκυττάρωσης (red cell distribution width)
<b>MCH</b>	Μέση αιμοσφαιρίνη ερυθροκυττάρων (mean capsular hemoglobin)	<b>PDW</b>	Εύρος κατανομής μεγέθους αιμοπεταλίων (platelet distribution width)
<b>MCHC</b>	Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ερυθροκυττάρων (mean capsular hemoglobin concentration)	<b>MPV</b>	Μέσος όγκος αιμοπεταλίων (mean platelet volume)

## Περίληψη

Τα Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (MDS) αποτελούν μια ετερογενή ομάδα νοσημάτων η οποία χαρακτηρίζεται από μη αποτελεσματική αιμοποίηση του μυελού των οστών, κυτταροπενίες στο αίμα και κίνδυνο εξέλιξης σε λευχαιμία. Πιο συγκεκριμένα, χαρακτηρίζονται από ανεπάρκεια του μυελού των οστών που έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της ωρίμανσης μιας ή περισσότερων κυτταρικών σειρών, κυτταροπενίες του περιφερικού αίματος όπως αναιμία, θρομβοπενία, λευκοπενία, κυτταροβρίθεια του μυελού των οστών και παρουσία αυξημένων βλαστών. Κυρίως εμφανίζονται σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (>70 έτη), μπορεί όμως να νοσήσουν και νεότεροι. Η διάγνωση του MDS βασίζεται στην παρουσία κυτταροπενίας, τη δυσπλασία του μυελού των οστών, την περίσσεια βλαστών ή την τυπική κυτταρογενετική ανωμαλία. Η αναιμία είναι μια κατάσταση στην οποία ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων ή η ικανότητά τους να μεταφέρουν οξυγόνο στους ιστούς, δεν επαρκούν για να ανταπεξέλθουν στις φυσιολογικές απαιτήσεις και επηρεάζει πολλούς ανθρώπους παγκοσμίως. Η αιμοσφαιρίνη είναι πρωτεΐνη που περιέχεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια του αίματος και η κύρια λειτουργία της είναι η μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς. Συχνά παρατηρείται αιμόλυση του αίματος, η οποία αναγνωρίζεται με την παρουσία αιμοσφαιρίνης που απελευθερώνεται στο πλάσμα από τα παθολογικά ερυθροκύτταρα. Η μηχανική ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων υπολογίζεται μέσω μιας διαδικασίας στην οποία μετράται η ποσότητα της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης ύστερα από μηχανική καταπόνηση που υφίσταται το αίμα από σφαιρίδια για συγκεκριμένο χρόνο και κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Η ανεπάρκεια G6PD είναι η πιο συνηθισμένη ενζυμοπάθεια και χαρακτηρίζεται από διαταραχές των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ίκτερο και αιμολυτική αναιμία.

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε δείγματα ασθενών με μυελοδυσπλαστικά νοσήματα τα οποία είχαν ως στόχο την εργαστηριακή μελέτη των δεικτών αιμόλυσης των ασθενών. Στην έρευνα συμπεριλήφθηκαν είκοσι ασθενείς με MDS και δεκατρείς υγιείς μάρτυρες. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού αίματος και υπολογίστηκε η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος, η μηχανική αιμόλυση και η ενεργότητα του G6PD. Η αξιολόγηση του αιματολογικού προφίλ των ασθενών έδειξε τα αναμενόμενα αποτελέσματα ασθενών με MDS με την εμφάνιση αναιμίας, λευκοπενίας, θρομβοπενίας καθώς και στατιστικά σημαντικά αυξημένη αιμόλυση. Οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες του δείγματος των υγιών και των ασθενών είχαν διαφοροποιήσεις που συνέβαλαν στο

συμπέρασμα της έρευνας. Ιδιαίτερα αυξημένος παρατηρήθηκε ο δείκτης που καθορίζει το εύρος κατανομής μεγέθους των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RDW). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε συσχέτιση της αυξημένης ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος των ασθενών, με την αναιμία που παρουσίασαν. Τέλος, εκτός από την αύξηση στην τιμή της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος, εντοπίστηκε και αύξηση της ενεργότητας του G6PD των ασθενών.

## **Abstract**

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of diseases characterized by inefficient hematopoiesis of the bone marrow, cytopenias in the blood and risk of progression to leukemia. More specifically, they are characterized by bone marrow failure resulting in impaired maturation of one or more cell lineages, peripheral blood cytopenias such as anemia, thrombocytopenia, leukopenia, bone marrow cellularity, and the presence of increased blasts. They mainly appear in older people (>70 years), but younger people can also get sick. The diagnosis of MDS is based on the presence of cytopenia, bone marrow dysplasia, excess blasts, or typical cytogenetic abnormality. Anemia is a condition in which the number of red blood cells, or their ability to carry oxygen to tissues, is insufficient to cope with physiological demands and affects many people worldwide. Hemoglobin is a protein contained in red blood cells and its main function is to transport oxygen from the lungs to the tissues. Hemolysis of the blood is often observed, which is recognized by the presence of hemoglobin released into the plasma from the pathological erythrocytes. The mechanical fragility of erythrocytes is calculated through a procedure in which the amount of free hemoglobin is measured after mechanical stress to the blood from beads for a specified time and under specified conditions. G6PD deficiency is the most common enzyme disease and is characterized by red blood cell abnormalities, jaundice and hemolytic anemia. In the present study, experiments were carried out on samples of patients with myelodysplastic syndromes which aimed at the study of the hemolysis indices of the patients. Twenty MDS patients and thirteen healthy controls were included in the study. Whole blood samples were used and plasma free hemoglobin, mechanical hemolysis and G6PD activity were estimated. The evaluation of the hematological profile of the patients showed the expected results of patients with MDS with the appearance of anemia, leukopenia, thrombocytopenia as well as statistically significantly increased hemolysis. The erythrocyte markers of the controls and patient samples had differences that contributed to the conclusion of the research. The index that determines the size distribution range of red blood cells (RDW) was particularly elevated. In addition, a correlation was observed

between the patients' elevated plasma free hemoglobin and the anemia they presented. In addition to the increase in the plasma free hemoglobin value, an increase in the G6PD activity of the patients was also detected.

## A. Εισαγωγή

### A1. Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (MDS) είναι ετερογενείς ομάδες κλωνικών μυελοειδών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από ανεξήγητη επίμονη κυτταροπενία του περιφερικού αίματος (PB) μιας ή περισσότερων από τις αιμοποιητικές γενιές ή από μορφολογική δυσπλασία του μυελού των οστών (BM) σε αιμοποιητικά κύτταρα, και αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML). (Francisco et al, 2022)

Τα δευτερεύοντα αίτια της κυτταροπενίας του περιφερικού αίματος εμφανίζονται πολύ πιο συχνά από τα πρωτογενή νεοπλάσματα του μυελού των οστών. Διάφορες μη κλωνικές διαταραχές που επηρεάζουν τον μυελό των οστών, συμπεριλαμβανομένων ιογενών (ιδίως ρετροϊού, παρβοϊού, ιού ηπατίτιδας), βακτηριακών και παρασιτικών λοιμώξεων, αυτοάνοσων διαταραχών (όπως νεανική ρευματοειδής αρθρίτιδα, οζώδης πολυαρθρίτιδα, συστηματικός ερυθματώδης λύκος, ανοσοθρομβοπενική διατροφική ανεπάρκεια), διατροφική ανεπάρκεια (όπως υποσιτισμός, σιδηροπενική αναιμία, μεγαλοβλαστική αναιμία λόγω ανεπάρκειας βιταμίνης B12 και φυλλικού οξέος, ανεπάρκεια βιταμίνης D, ανεπάρκεια χαλκού που προκαλείται από ψευδάργυρο, υπερβιταμίνωση A), έκθεση σε φάρμακα και τοξίνες (όπως κατάχρηση αλκοόλ, ψευδάργυρος, αρσενικό, χρώμιο, κάδμιο), οι χρόνιες παθήσεις των νεφρών και του ήπατος και οι ενδοκρινοπάθειες, πρέπει να αποκλειστούν προτού να γίνει διάγνωση MDS καθώς η διαγνωστική ακρίβεια έχει πρακτικές συνέπειες. (Olcay et al, 2016)

Το συνιστώμενο όριο κυτταροπενίας σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ορίζεται από το Διεθνές Σύστημα Προγνωστικής Βαθμολογίας (IPSS), περιλαμβάνει αιμοσφαιρίνη <10 g/dL, αριθμό αιμοπεταλίων <100 × 10<sup>9</sup>/L και απόλυτο αριθμό ουδετερόφιλων < 1,8 × 10<sup>9</sup>/L. (Greenberg et al, 1997) Ωστόσο, το MDS μπορεί επίσης να διαγνωστεί με ηπιότερου βαθμού κυτταροπενία (αιμοσφαιρίνη <13 g/dL στους άνδρες ή <12 g/dL στις γυναίκες ή αριθμός αιμοπεταλίων <150 × 10<sup>9</sup>/L), εάν είναι σαφής η μορφολογική δυσπλασία και/ ή υπάρχουν κυτταρογενετικές ανωμαλίες. (Swerdlow et al, 2017)

Εκτός από αυτούς, υπάρχουν αρκετοί κοινωνικοί παράγοντες, όπως η εθνικότητα, η ηλικία, οι διαφορές που σχετίζονται με το φύλο και το υψόμετρο, που θα πρέπει να ληφθούν υπόψη στη διάγνωση. (Greenberg et al, 2016)

Η μορφολογική ταξινόμηση του MDS εξαρτάται από διάφορες διαγνωστικές προσεγγίσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν την παρουσία αυξημένου αριθμού βλαστών τόσο στο BM όσο και στο PB, την αξιολόγηση κυτταρολογικών ανωμαλιών και δυσπλαστικών αλλαγών μεταξύ των αιμοποιητικών στοιχείων, την αξιολόγηση της κυτταρικής τοπογραφίας και κυτταρικότητας και την παρουσία ή απουσία ίνωσης. (Francisco et al, 2022)

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) ορίζει τις κατηγορίες MDS ανάλογα με το ποσοστό έκρηξης στο PB και το BM, έχοντας ως υποχρεωτικό όριο ένα όριο μικρότερο από 20%. Η παρουσία αυξημένου πληθυσμού βλαστών 2-4% στο PB ή 5-9% στο BM κατηγοριοποιείται ως MDS με περίσσεια έκρηξης 1 (MDS-EB-1), ενώ η παρουσία υψηλότερου αριθμού βλαστών, με 5-19% στο PB ή 10-19% στο BM, ή η παρουσία σαφών ράβδων Auer με μορφολογική εξέταση κατηγοριοποιούνται ως MDS με περίσσεια βλαστών 2 (MDS-EB-2). (Swerdlow et al, 2017) Ωστόσο, ο ΠΟΥ δήλωσε ότι το ποσοστό έκρηξης βλαστών 20% δεν αποτελεί εντολή για τη θεραπεία του ασθενούς ως πάσχοντος από ΟΜΛ ή βλαστική μεταμόρφωση και ότι οι θεραπευτικές αποφάσεις πρέπει πάντα να βασίζονται στην κλινική κατάσταση, έχοντας λάβει υπόψη όλες τις πληροφορίες. Για το λόγο αυτό, προτείνεται ένας αριθμός βλαστών 10–30% για την εγγραφή σε κλινικές δοκιμές είτε για MDS είτε για AML. (Estey et al, 2022)

Η κυτταρογενετική αποτελεί σημαντική και απαραίτητη παράμετρο στη διάγνωση του MDS. Εκτός από την εγκαθίδρυση μιας κλωνικής διαδικασίας σε ασθενείς με κυτταροπενία περιφερικού αίματος, η κυτταρογενετική παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση, στην κλινική-μορφολογική συσχέτιση, στις θεραπευτικές στρατηγικές και στην πρόβλεψη της πιθανότητας εξέλιξης σε ΟΜΛ. Σε αντίθεση με άλλες μυελοειδείς κακοήθειες, στις οποίες η διάγνωση ορίζεται από ένα μόνο κυτταρογενετικό συμβάν (όπως η χρόνια μυελογενή λευχαιμία και η οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία), υπάρχει ένα τεράστιο φάσμα κυτταρογενετικών βλαβών στο MDS, καθιστώντας τη διάγνωση πολύ δύσκολη. Ωστόσο, περίπου το 50% του MDS έχει φυσιολογική κυτταρογενετική. Οι περιπτώσεις με οριακή δυσπλασία και φυσιολογική κυτταρογενετική αποτελούν διαγνωστικές προκλήσεις. Διάφοροι συνδυασμοί χρωμοσωμικών βλαβών συμβάλλουν στο μεγάλο φάσμα κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών του MDS. Η κυτταρογενετική ανάλυση, δηλαδή ο έλεγχος χρωμοσωμάτων του μυελού είναι επίσης πολύ σημαντική διότι μπορεί να αποκαλύψει στο 50% των περιπτώσεων διαταραχές που είναι ειδικές για τα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα όπως μονοσωμία 5, μονοσωμία 7, έλλειψη του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 5 ή του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 7, ισοχρωμόσωμα

17q, έλλειψη του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος 12, έλλειψη του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 11, μονοσωμία 13 ή έλλειψη του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 13, σύνθετες κυτταρογενετικές ανωμαλίες και άλλες σπανιότερες. Οι διαταραχές αυτές, εκτός του ότι μπορεί να βοηθήσουν την διάγνωση είναι εξίσου σημαντικές διότι καθορίζουν την πρόγνωση. (Swerdlow et al, 2017)

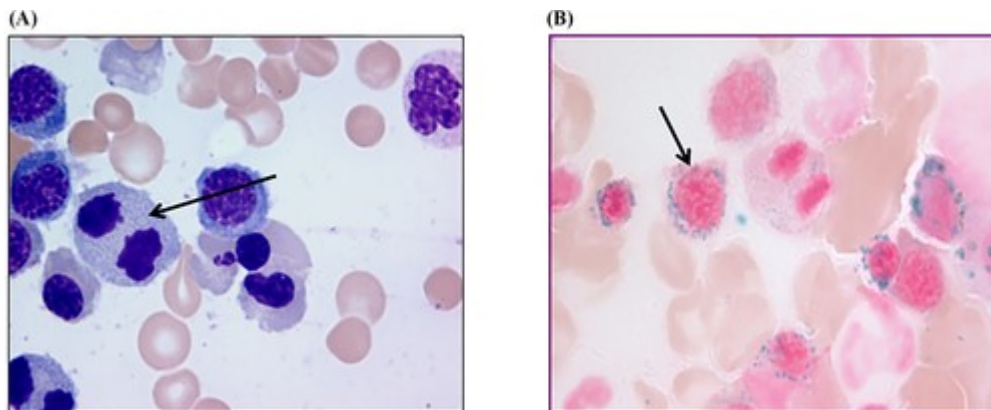
### **A1.1 Διάγνωση Μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων**

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (MDS) παραμένουν μέχρι και σήμερα από τα πιο δύσκολα μυελοειδή νεοπλάσματα όσον αφορά τη διάγνωση και την ταξινόμησή τους, πόσο μάλλον σε περιπτώσεις στις οποίες το ποσοστό έκρηξης δεν είναι αυξημένο στο περιφερικό αίμα (PB) ή στον μυελό των οστών (BM). Σε καταστάσεις στις οποίες τα κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία υποδηλώνουν την ύπαρξη MDS, ενώ τα μορφολογικά ευρήματα παραμένουν ασαφή, μπορεί να προκύψουν διαγνωστικά προβλήματα. Επίσης, προβλήματα δημιουργούνται όταν υπάρχει δευτερογενής δυσπλασία η οποία προκαλείται από διατροφικές ελλείψεις, φάρμακα, τοξίνες, θεραπεία αυξητικού παράγοντα, φλεγμονή ή λοίμωξη ή ακόμα και όταν η υποκυτταρικότητα του μυελού των οστών ή η μυελοϊνωση συγκαλύπτει την εξέλιξη της υποκείμενης νόσου. (Vardiman, 2006) Η διάγνωση του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου υποψιάζεται σε ηλικιωμένο ασθενή που εμφανίζει κυτταροπενία περιφερικού αίματος ασαφούς αιτιολογίας. Η περιβαλλοντική έκθεση σε χημικές ουσίες όπως είναι το βενζόλιο, τα εντομοκτόνα και τα φυτοφάρμακα μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη MDS. Σε ασθενείς με MDS που υπόκεινται σε θεραπεία, μπορεί να προκληθεί γενετική βλάβη από προηγούμενη έκθεση σε ακτινοβολία ή και χημειοθεραπεία. Επιπλέον, σε ασθενείς με MDS που είναι μικρότεροι από 40 ετών, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η γενετική προδιάθεση μέσω συγγενούς συνδρόμου όπως είναι η αναιμία Fanconi (Butturini et al, 1994), η συγγενής δυσκεράτωση (Dokal, 2000), το σύνδρομο Down (Yvas et al, 2006) και οι οικογενείς διαταραχές των αιμοπεταλίων (μεταλλάξεις RUNX1/GATA2). (Preudhomme et al, 2009) Η διάγνωση MDS στηρίζεται α) στην παρουσία κυτταροπενίας διάρκειας μεγαλύτερης των έξι μηνών, αιμοσφαιρίνης < 10 g/dL, απόλυτος αριθμός ουδετερόφιλων < 1,8 x 10<sup>9</sup>/L, αριθμός αιμοπεταλίων < 100 x 10<sup>9</sup>/L, β) στη δυσπλασία του μυελού των οστών ή την περίσσεια βλαστών ή την τυπική



κυτταρογενετική ανωμαλία και γ) στον αποκλεισμό άλλων διαφορικών διαγνώσεων. (Bennett et al, 2009)

Τα κοινά ευρήματα του περιφερικού αίματος περιλαμβάνουν την μακροκυτταρική αναιμία, την δικτυοκυτταροπενία, την ουδετεροπενία με ψευδοτμηματικά ουδετερόφιλα, την κυκλοφορία ανώριμων μυελοειδών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των μυελοβλαστών και την θρομβοπενία. Ωστόσο η διάγνωση των MDS δεν είναι εύκολη υπόθεση καθώς ευρήματα όπως οι κυτταροπενίες, η παρουσία δυσπλασίας, οι σιδηροβλάστες του δακτυλίου του μυελού των οστών (εικόνα 1), οι αυξημένοι μυελοβλάστες και οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, δεν είναι ειδικά και απόλυτα για τα MDS, καθώς παρατηρούνται τόσο σε υγιή άτομα όσο και σε άτομα με καλοήθειες καταστάσεις όπως είναι η ανεπάρκεια βιταμίνης B12. (Font et al, 2008) Επομένως, συνιστάται η λήψη λεπτομερούς ιστορικού και φυσικής εξέτασης ώστε να αποκλειστούν καταστάσεις που ομοιάζουν το MDS.



**Εικόνα 1. Σιδηροβλάστες του δακτυλίου του μυελού των οστών.** Εύρημα αναρρόφησης μυελού των οστών σε ασθενή με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο με σιδηροβλάστες δακτυλίου και δυσπλασία μονής γραμμής (MDS-RS-SLD). Στην εικόνα A) έχει γίνει χρώση με Wright Giemsa (200 X) και το βέλος δείχνει την δυσερυθροποίηση, στην εικόνα B) έχει γίνει χρώση με Prussian blue (200 X) και το βέλος δείχνει τους σιδηροβλάστες του δακτυλίου.

Σε έναν ασθενή που εμφανίζει κλινικά και άλλα εργαστηριακά χαρακτηριστικά συμβατά με MDS, αλλά έχει ασαφή μορφολογικά χαρακτηριστικά, μπορεί να γίνει πιθανή διάγνωση MDS, εφόσον παρουσιάζει μια συγκεκριμένη κλωνική χρωμοσωμική ανωμαλία από αυτές που παρατίθενται στον πίνακα 1.

**Πίνακας 1.** Η επαναλαμβανόμενη παρουσία χρωμοσωμικών ανωμαλιών θεωρείται ως ένδειξη MDS στο πλαίσιο εμφάνισης επίμονης κυτταροπενίας απροσδιόριστης αιτίας και προέλευσης, αλλά απουσία οριστικών και καθοριστικών μορφολογικών χαρακτηριστικών του MDS. (Gupta et al, 2006)

Μη ισορροπημένες ανωμαλίες	Ισορροπημένες ανωμαλίες
-7 or del(7q)	t(11;16)(q23;p13.3)
-5 or del(5q)	t(3;21)(q26.2;q22.1)
i(17q) or t(17p)	t(1;3)(p36.3;q21.1)
-13 or del(13q)	t(2;11)(p21;q23)
del(11q)	inv(3)(q21q26.2)
del(12p) or t(12p)	t(6;9)(p23;q34)
del(9q)	
idic(X)(q13)	

Να σημειωθεί ότι επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές ανωμαλίες που παρατηρούνται στο MDS, όπως είναι τα del(20q), +8 και -Y, δεν περιλαμβάνονται στην παραπάνω λίστα καθώς αυτές οι ανωμαλίες εμφανίζονται σε ορισμένους ασθενείς με απλαστική αναιμία ή άλλα κυτταροπενικά σύνδρομα που παρουσιάζουν καλή ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία και/ή που δεν εμφανίζουν μορφολογικά στοιχεία MDS ύστερα από παρατεταμένη παρακολούθηση. (Gupta et al, 2006) Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η παρουσία του χρωμοσώματος Y σε αιμοποιητικά κύτταρα αποτελεί ένα φαινόμενο που σχετίζεται με τη γήρανση. (Pierre et al, 1972)

Ωστόσο, δεν έχει γίνει σαφές ότι αυτές οι ανωμαλίες είναι απόλυτα ενδεικτικές του MDS όταν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά δεν είναι οριστικά. Εάν παρατηρείται μόνο μονογραμμική δυσπλασία στο BM, αλλά δεν υπάρχει κάποια από τις επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές ανωμαλίες που αναφέρονται στον πίνακα 1, δεν υπάρχει αύξηση των βλαστών στο PB ή το BM και η ποσότητα των σιδηροβλαστών του δακτυλίου είναι μικρότερη από το 15% των ερυθροβλαστών,

προτείνεται περίοδος παρακολούθησης έξι μηνών και στη συνέχεια επανάληψη της εξέτασης του μυελού των οστών, προτού γίνει διάγνωση του MDS. Με τη διαδικασία αυτή θα εξασφαλιστεί ότι τα κλινικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά υφίσταται πραγματικά και δεν αποτελούν δευτερεύοντα χαρακτηριστικά σε κάποια άλλη διαταραχή που συνυπάρχει τη συγκεκριμένη περίοδο. (Vardiman et al, 2009)

Επιπλέον, προτείνεται ότι εάν βρεθούν τρεις ή περισσότερες φαινοτυπικές ανωμαλίες που αφορούν μία ή περισσότερες από τις μυελοειδείς γενιές, τα ευρήματα αυτά μπορούν να θεωρηθούν ενδεικτικά MDS. Ωστόσο απουσία οριστικών μορφολογικών ή/και κυτταρογενετικών χαρακτηριστικών, οι ανωμαλίες της κυτταρομετρίας ροής αποκλειστικά, δεν αποτελούν διαγνωστικό παράγοντα για MDS. Τέλος, οι ασθενείς που παρουσιάζουν ανώμαλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στα κύτταρά τους, τα οποία υποδηλώνουν MDS, είναι απαραίτητο να παρακολουθούνται στενά ώστε να τεκμηριωθεί η διάγνωση μέσω των μορφολογικών χαρακτηριστικών. (Vardiman et al, 2009)

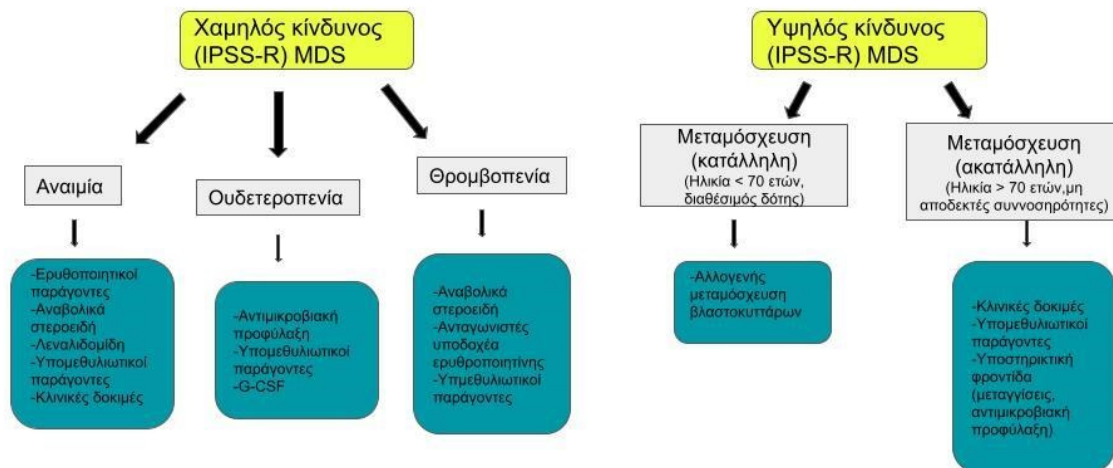
Στις περιπτώσεις όπου οι ασθενείς εξακολουθούν και έχουν επίμονη κυτταροπενία, χωρίς να συνοδεύεται από επαρκή μορφολογικά ή κυτταρογενετικά στοιχεία για να προκύψει η διάγνωση του MDS, έχει προταθεί ο όρος “ιδιοπαθής κυτταροπενία απροσδιόριστης σημασίας” (ICUS). (Wimazal et al, 2007) Και αυτοί οι ασθενείς θα πρέπει να παρακολουθούνται για την εμφάνιση στοιχείων αποδεικτικών για MDS.

Σύμφωνα με μελέτες, παιδιά με MDS και βλάστες από 2% έως 19% στο PB και/ή βλάστες από 5% έως 19% στο BM, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τα ίδια κριτήρια όπως αυτά που αφορούν τους ενήλικες, με MDS. Σε αντίθεση όμως με τους ενήλικες, μεμονωμένη ανθεκτική αναιμία που συνήθως σχετίζεται αρχικά με θρομβοπενία ή/και ουδετεροπενία, και συχνά συνοδεύεται από υποκυτταρικό BM, δεν είναι κοινή στα παιδιά με MDS.

## **A1.2 Θεραπευτική προσέγγιση Μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων**

Συχνά κατά τη θεραπεία των ασθενών με MDS αντιμετωπίζονται κλινικά προβλήματα. Τέτοια προβλήματα είναι η αναιμία που προκύπτει ως αποτέλεσμα της μετάγγισης, η υπερφόρτωση σιδήρου (αιμοσιδήρωση) λόγω μετάγγισης, η

αλλοανοσοποίηση με ανθεκτικότητα στη μετάγγιση, η θρομβοπενία και άλλες ποιοτικές διαταραχές των αιμοπεταλίων. Ακόμα, παρουσιάζονται ποσοτικές και ποιοτικές διαταραχές των ουδετερόφιλων που οδηγούν σε υποτροπιάζουσες λοιμώξεις και υπάρχει και η περίπτωση κατά την οποία η νόσος εξελίσσεται σε λευχαιμική παραμόρφωση. Η θεραπεία με αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (ASCT) μπορεί δυνητικά να συμβάλει στην αντιμετώπιση του MDS, ωστόσο ενέχει σοβαρούς κινδύνους νοσηρότητας και θνησιμότητας, οι οποίοι σχετίζονται με λοιμώξεις, τη νόσο του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή και την υποτροπή της νόσου. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με MDS ηλικίας άνω των 70 ετών, δεν ενδείκνυται για μεταμόσχευση, σε αντίθεση με τους ασθενείς ηλικίας μικρότερης των 70 ετών, οι οποίοι μπορούν να ληφθούν υπόψη για μεταμόσχευση αν και εφόσον υπάρχει διαθέσιμος δότης, και ο δείκτης αιμοποιητικής συννοσηρότητας είναι αποδεκτός. (Εικόνα 2) Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας έρευνας που μελέτησε την κατάλληλη περίοδο μεταμόσχευσης, οι ασθενείς χαμηλού κινδύνου που υπέστη καθυστερημένη μεταμόσχευση εμφάνισαν πλεονέκτημα επιβίωσης σε αντίθεση με τους ασθενείς υψηλού κινδύνου που είχαν μεγαλύτερο όφελος επιβίωσης λαμβάνοντας πρώιμη μεταμόσχευση κατά τη διάγνωση. (Cutler et al, 2004)



**Εικόνα 2. Θεραπευτική προσέγγιση.** Παρουσίαση της προσαρμοσμένης στον κίνδυνο θεραπευτικής προσέγγισης για την διαχείριση των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (MDS). (Ανατύπωση από Naseema et al, 2016)

### **A1.2.1 Θεραπεία χηλίωσης σιδήρου**

Η φύση του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου με σιδηροβλάστες δακτυλίου (MDS-RS) σε συνδυασμό με την μολυσματική ερυθροποίηση και την εξαρτώμενη μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC-TD), μπορεί να προκαλέσει υπερφόρτωση σιδήρου. (Valent et al, 2008) Τα επίπεδα σιδήρου μπορούν να παρακολουθούνται με μη επεμβατικό τρόπο μέσω του υπολογισμού των επιπέδων φερριτίνης ορού, του κορεσμού τρανσφερίνης και με την χρήση μαγνητικής τομογραφίας. (Valent et al, 2008, Greenberg et al, 2009) Τα αυξημένα επίπεδα φερριτίνης ορού στο MDS, μπορούν να είναι δευτερογενή για την εξαρτώμενη μετάγγιση, τη φλεγμονή που σχετίζεται με καρκίνο και την ηπατική νόσο. Κάθε μία από αυτές τις συννοσηρότητες είναι προγνωστικά επιζήμια, αλλά δεν έχει γίνει σαφές ότι η υπερφόρτωση σιδήρου ή τα αυξημένα επίπεδα φερριτίνης, συμβάλλουν από μόνα τους στη θνησιμότητα και τη νοσηρότητα.

## **A2. Αναιμία**

Η αναιμία είναι μια αιματολογική ανωμαλία που επηρεάζει 1,6 δισεκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως. (De Benoist B et al, 2008) Στους ηλικιωμένους ασθενείς η εμφάνιση αναιμίας είναι πιο συχνή, με τον επιπολασμό στα άτομα άνω των 85 ετών να ξεπερνά το 20%. (Goodnough et al, 2014) Η διάγνωσή της βασίζεται στη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης του ασθενούς, χωρίς αυτό να καθορίζει την αιτιολογική παθολογία της. Η παθολογία της αναιμίας χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες: την μειωμένη παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, την αυξημένη καταστροφή ερυθρών αιμοσφαιρίων ή την απώλεια μέσω αιμορραγίας ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ωστόσο, συχνά μπορεί να είναι πολυπαραγοντική και εμφανίζεται με την εκδήλωση υποκείμενης νόσου. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), η αναιμία ορίζεται ως η κατάσταση στην οποία ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων ή η ικανότητά τους να μεταφέρουν οξυγόνο δεν επαρκούν για τις φυσιολογικές απαιτήσεις. (D.A Newhall et al, 2020)

### **A2.1 Μικροκυτταρική αναιμία**

Ως μικροκυτταρική αναιμία, ορίζεται η αναιμία με MCV <80 fL με συχνότερη αιτία της, την έλλειψη σιδήρου που αποτελεί την πιο κοινή αιτία αναιμίας παγκοσμίως. Άλλες αιτίες εμφάνισης μικροκυτταρικής αναιμίας αποτελούν η αναιμία χρόνιας νόσου, οι αιμοσφαιρινοπάθειες και η σιδηροβλαστική αναιμία. (WHO 2015)

### **A2.2 Σιδηροπενική αναιμία**

Η σιδηροπενική αναιμία προκαλείται κυρίως από χρόνια απώλεια αίματος συνήθως του γαστρεντερικού σωλήνα ή της μήτρας. Σπάνια η κακή διατροφή αποτελεί την κύρια αιτία εμφάνισης της σιδηροπενικής αναιμίας, ωστόσο η έλλειψη σιδήρου που σχετίζεται με την διατροφή αποτελεί σημαντικό παράγοντα. Η διαχείριση της σιδηροπενικής αναιμίας βασίζεται στην αναγνώριση και θεραπεία της υποκείμενης αιτίας που προκαλεί την ανεπάρκεια σιδήρου και αντικατάσταση της έλλειψης με χορήγηση σιδήρου από του στόματος ή ενδοφλέβια. (Stoffel NU et al, 2017) Προκειμένου να εντοπιστεί η πρόοδος, γίνεται επανέλεγχος της αιμοσφαιρίνης ύστερα από 2-4 εβδομάδες χορήγησης συμπληρωμάτων σιδήρου. Μια αύξηση της τάξης των 20 g/L σε διάρκεια 3-4 εβδομάδων, αποτελεί καλό σημάδι ανταπόκρισης και δείχνει ότι οι

δείκτες της αιμοσφαιρίνης ομαλοποιούνται. Ωστόσο η θεραπεία θα πρέπει να συνεχιστεί για τουλάχιστον τρεις μήνες. Σε περίπτωση ελλιπούς γαστρεντερικής απορρόφησης, συνιστάται ενδοφλέβια χορήγηση. (Chertow GM et al, 2006)

### **A2.3 Θαλασσαιμία**

Η θαλασσαιμία συνδέεται με οικογενειακό ιστορικό και θα πρέπει να διαγιγνώσκεται σε ασθενείς με μικροκυτταρική αναιμία και φυσιολογικές τιμές σιδήρου. Ο φαινότυπος των θαλασσαιμικών ατόμων ποικίλλει μεταξύ ασυμπτωματικών ασθενών και ασθενών που εξαρτώνται από μετάγγιση αίματος. (Mentzer WC Jr., 1973)

### **A2.4 Νορμοκυτταρική αναιμία**

Η νορμοκυτταρική αναιμία συνήθως εμφανίζεται σε νοσηλεύμενους ασθενείς και είναι αποτέλεσμα οξείας απώλειας αίματος. Συχνά αποτελεί εκδήλωση υποκείμενης συστηματικής νόσου, είτε όπως ορίζεται ως αναιμία χρόνιας νόσου είτε να προέρχεται από άλλη διαταραχή όπως νεφρική ανεπάρκεια, υποθυρεοειδισμός ή πολλαπλό μυέλωμα. Η αξιολόγηση των ασθενών θα πρέπει να στηρίζεται στην αξιολόγηση του ιστορικού και την εξέταση. (D.A Newhall et al, 2020)

### **A2.5 Αναιμία χρόνιας νόσου**

Η αναιμία χρόνιας νόσου αποτελεί διάγνωση αποκλεισμού και την χαρακτηρίζει η λειτουργική ανεπάρκεια σιδήρου. Συνδέεται με πληθώρα φλεγμονωδών, μολυσματικών και κακοήθων ασθενειών. Οι χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις οδηγούν σε εμφάνιση αναιμίας εξαιτίας των παρακάτω παθοφυσιολογικών μηχανισμών: μεταβολή της ομοιόστασης του σιδήρου λόγω περίσσειας επιδίνης (Sharma et al, 2008), μειωμένη παραγωγή ερυθροποιητίνης (Miller et al, 1990) και χαμηλή επιβίωση ερυθρών αιμοσφαιρίων (Mitlyng et al, 2006). Σε ασθενείς με φυσιολογική ή αυξημένη φερριτίνη, χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση, χαμηλή αιμοσφαιρίνη και φυσιολογική μέση κυτταρική αιμοσφαιρίνη θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη η αναιμία χρόνιας νόσου.

### **A3. G6PD**

Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) έχει τους εξής δύο κεντρικούς ρόλους, την παραγωγή ριβόζης και την παραγωγή του φωσφορικού διουκλεοτιδίου αδενίνης νικοτιναμιδίου (NADPH) μέσω της οδού φωσφορικής πεντόζης (PPP). Και τα δύο προϊόντα είναι ζωτικής σημασίας για τη σύνθεση πολλών βιολογικών δομικών στοιχείων, όπως τα νουκλεϊκά και τα λιπαρά οξέα. Είναι γνωστό ότι το NADPH έχει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής άμυνας. (Yang et al, 2016) Το NADPH χρησιμεύει επίσης ως προοξειδωτικό για τη δημιουργία ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και δραστικών ριζών αζώτου (RNS) ως μόρια σήματος για την προώθηση κυτταρικών διεργασιών, όπως η κυτταρική ανάπτυξη. Κλινικά, η ανεπάρκεια G6PD είναι η πιο συνηθισμένη ενζυμοπάθεια. Τα άτομα με έλλειψη G6PD τείνουν να υποφέρουν από διαταραχές των ερυθρών αιμοσφαιρίων, συμπεριλαμβανομένου του ίκτερου και της αιμολυτικής αναιμίας που προκαλείται από φάρμακα ή λοίμωξη. Αυτές οι διαταραχές οφείλονται κυρίως σε σημειακή μετάλλαξη στο G6PD. (Beutler et al, 1994)

#### **A3.1 Ο ρόλος του G6PD στην κυτταρική ανάπτυξη**

Το G6PD αποτελεί αρχετυπικό ένζυμο που σχετίζεται με την ανάπτυξη, επομένως η μειωμένη δραστηριότητα του ή η δυσλειτουργία του PPP δυσχεραίνει τον φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθώς και την εμβρυική και οργανική ανάπτυξη του οργανισμού. (Yang et al, 2013) Αντίθετα, η ανώμαλη ενεργοποίηση του G6PD ή του PPP οδηγεί σε ογκογένεση. (Hu et al, 2015, Wu et al, 2018)

Τα ταχέως αναπτυσσόμενα καρκινικά κύτταρα έχουν δημιουργήσει αμέτρητους μηχανισμούς που προάγουν την ενεργοποίηση του G6PD για την υποστήριξη των κυτταρικών απαιτήσεων, για την παραγωγή NADPH και για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και νουκλεϊκών οξέων. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση των προογκογονιδίων ενισχύει την δραστηριότητα του G6PD. (Cai et al, 2015)



### A3.2 Ανεπάρκεια G6PD

Η ανεπάρκεια του G6PD κάνει τα ερυθροκύτταρα πιο ευπαθή στο οξειδωτικό στρες. Οι κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου περιλαμβάνουν την οξεία αιμολυτική αναιμία, τη χρόνια αιμολυτική αναιμία, τη νεογνική υπερχολερυθριναιμία και δεν παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα. Επίσης η ασθένεια είναι σπάνια θανατηφόρα. Η κωδικοποίηση του G6PD επηρεάζεται από τις γονιδιακές μεταλλάξεις που βρίσκονται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος X. Έχουν εντοπιστεί πάνω από 400 μεταλλάξεις, ωστόσο οι περισσότερες από αυτές αποτελούν λανθασμένες μεταλλάξεις. (Beutler, 1994)

Η διάγνωση της ανεπάρκειας του G6PD γίνεται είτε με ποσοτική φασματοφωτομετρική ανάλυση, είτε συχνότερα, με την ταχεία δοκιμή φθορισμού κηλίδων με την οποία ανιχνεύεται η δημιουργία NADPH από το NADP. (Gregg et al, 2000) Η δοκιμή παρουσιάζει θετικό αποτέλεσμα όταν η κηλίδα αίματος δε φθορίζει κάτω από το υπεριώδες φως. Επιπλέον, υπάρχουν δοκιμές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ανιχνεύουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις, για αυτό και χρησιμοποιούνται για προσυμπτωματικό έλεγχο πληθυσμού, οικογενειακές μελέτες ή προγεννητική διάγνωση. (Beutler, 1994)

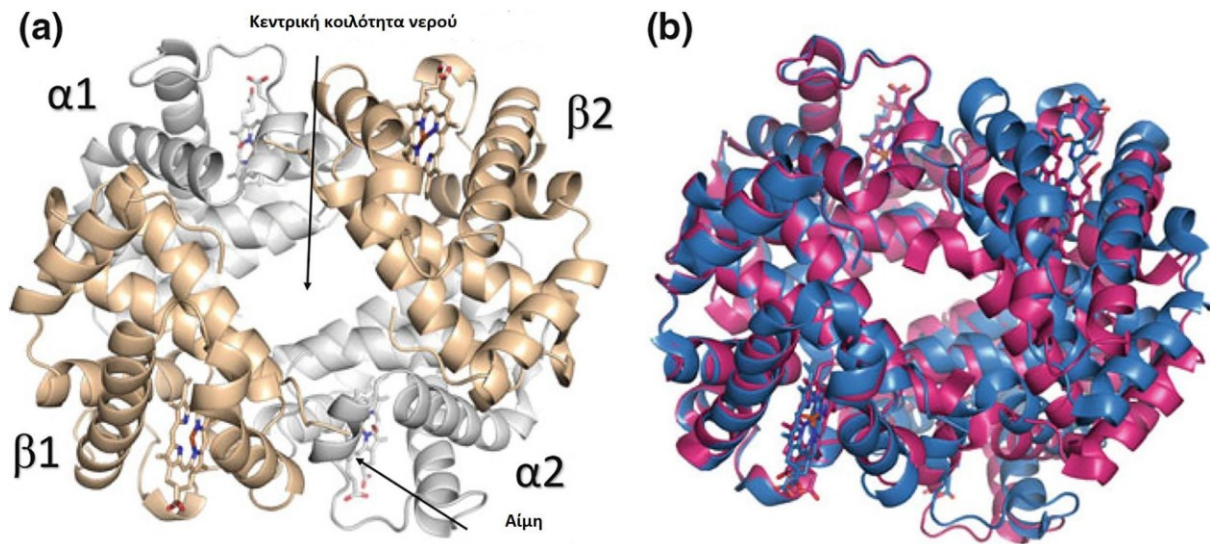
Σε ασθενείς που πάσχουν από οξεία αιμόλυση, ενδέχεται ο έλεγχος για ανεπάρκεια G6PD να έχει ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα. Αυτό συμβαίνει διότι τα παλαιότερα ερυθροκύτταρα με υψηλή ενζυμική ανεπάρκεια, έχουν αιμολυθεί. Τα νεαρά ερυθροκύτταρα και τα δικτυοερυθροκύτταρα παρουσιάζουν φυσιολογική ή σχεδόν φυσιολογική δραστηριότητα. (Ainoon et al, 2003, Reclos et al, 2000)

Η διάγνωση της ανεπάρκειας G6PD θα πρέπει να εξετάζεται σε παιδιά με οικογενειακό ιστορικό ίκτερου, αναιμίας, σπληνομεγαλίας ή χολολιθίασης, ιδιαίτερα όταν έχουν μεσογειακή ή αφρικανική καταγωγή. (Hermiston et al, 2002) Εξίσου σημαντικό είναι να εξετάζεται σε άτομα με οξεία αιμολυτική αντίδραση η οποία είναι αποτέλεσμα μόλυνσης, έκθεσης σε γνωστό οξειδωτικό φάρμακο ή κατανάλωση φάβας. (Jennifer E Frank, 2005)

## A4. Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη (Hb) είναι πρωτεΐνη που περιέχεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια του αίματος και η κύρια λειτουργία της είναι να μεταφέρει το οξυγόνο ( $O_2$ ) που εισπνέεται από τους πνεύμονες στους ιστούς. Αποτελεί σχετικά μεγάλο μόριο που παράγεται στον μυελό των οστών από δύο συστατικά, την αίμη και την σφαιρίνη. Η αίμη είναι δακτυλιοειδής χημική ένωση που περιέχει ένα ιόν σιδήρου δεσμευμένο στο κέντρο ενός ετεροκυκλικού πορφυρινικού δακτυλίου. Η σφαιρίνη είναι πρωτεΐνη του πλάσματος και σχηματίζεται κυρίως στο ήπαρ αλλά και στο λεμφικό και δικτυοενδοθηλιακό σύστημα. Η Hb είναι ένα τετραμερές αποτελούμενο από δύο  $\alpha$ -υπομονάδες ( $\alpha 1$  και  $\alpha 2$ ) και δύο  $\beta$ -υπομονάδες ( $\beta 1$  και  $\beta 2$ ), δομικά παρόμοιες και περίπου ισομεγέθεις. Κάθε μία πολυπεπτιδική αλυσίδα περιλαμβάνει μία ομάδα αίμης. Πρόκειται για μια αλλοστερική πρωτεΐνη, οι ιδιότητες της οποίας δημιουργούνται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων  $\alpha$  και  $\beta$ . Η ποσότητα της Hb μετριέται σε γραμμάρια ανά 100 κυβικά εκατοστά αίματος και κυμαίνεται από 12 έως 16 γραμμάρια ανά 100 ml αίματος στις γυναίκες, από 14 έως 18 γραμμάρια ανά 100 ml αίματος στους άνδρες και η έλλειψή της προκαλεί αναιμία. (Paoli et al, 1996)

Η αιμοσφαιρίνη εμφανίζεται με δύο καταστάσεις ισορροπίας, την τεταμένη κατάσταση (T), (μη δεσμευμένη αιμοσφαιρίνη) η οποία παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια με το  $O_2$  και την χαλαρή κατάσταση (R), (συνδεδεμένη αιμοσφαιρίνη) η οποία παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με το  $O_2$ . Η υψηλή αυτή συγγένεια, διευκολύνει την συνεργατική δραστηριότητα και συνεισφέρει στην πρόσληψη και απελευθέρωση του  $O_2$  in vivo. Τα δύο διμερή  $\alpha\beta$  ( $\alpha 1\beta 1$  και  $\alpha 2\beta 2$  αντίστοιχα) διατάσσονται γύρω από έναν διπλό άξονα συμμετρίας και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας μεγάλης κεντρικής κοιλότητας νερού στη T μορφή και μια στενότερη στη R μορφή. (Safo et al, 2011) (Εικόνα 3)



**Εικόνα 3. Απεικόνιση του μορίου της αιμοσφαιρίνης.** Η κρυσταλλική δομή της αιμοσφαιρίνης. a) Η συνολική τεταρτοταγής δομή της αιμοσφαιρίνης με τις δύο  $\alpha$  και δύο  $\beta$  αλυσίδες με γκρι και καφέ χρώμα αντίστοιχα. b) Η συνδεδεμένη αιμοσφαιρίνη (μορφή R) με μωβ χρώμα, τοποθετημένη πάνω στη μη συνδεδεμένη αιμοσφαιρίνη (T μορφή) με μπλε χρώμα, όπου φαίνεται και η μεγαλύτερη κοιλότητα νερού της δομής T. (Αναδιατύπωση από Mostafa et al, 2020)

## **A5. Κύτταρα του αίματος**

### **A5.1 Φυσιολογία του αίματος**

Το αίμα αποτελεί ιδιαίτερο τύπο συνδετικού ιστού και περιλαμβάνει τρεις τύπους κυττάρων, τα ερυθρά αιμοσφαίρια υπεύθυνα για τη μεταφορά οξυγόνου, τα λευκά αιμοσφαίρια που ενεργούν στην άμυνα του οργανισμού και τα αιμοπετάλια που συμβάλλουν στην πήξη του αίματος. Το κύριο συστατικό του αίματος είναι το πλάσμα, το οποίο καταλαμβάνει το 55% του όγκου του. Το pH του αίματος κυμαίνεται μεταξύ 7,35 και 7,45. Το αίμα αποτελεί περίπου το 8% του συνολικού βάρους του ατόμου και ο μέσος όγκος για τους άνδρες είναι 5-6 L και για τις γυναίκες 4-5 L.

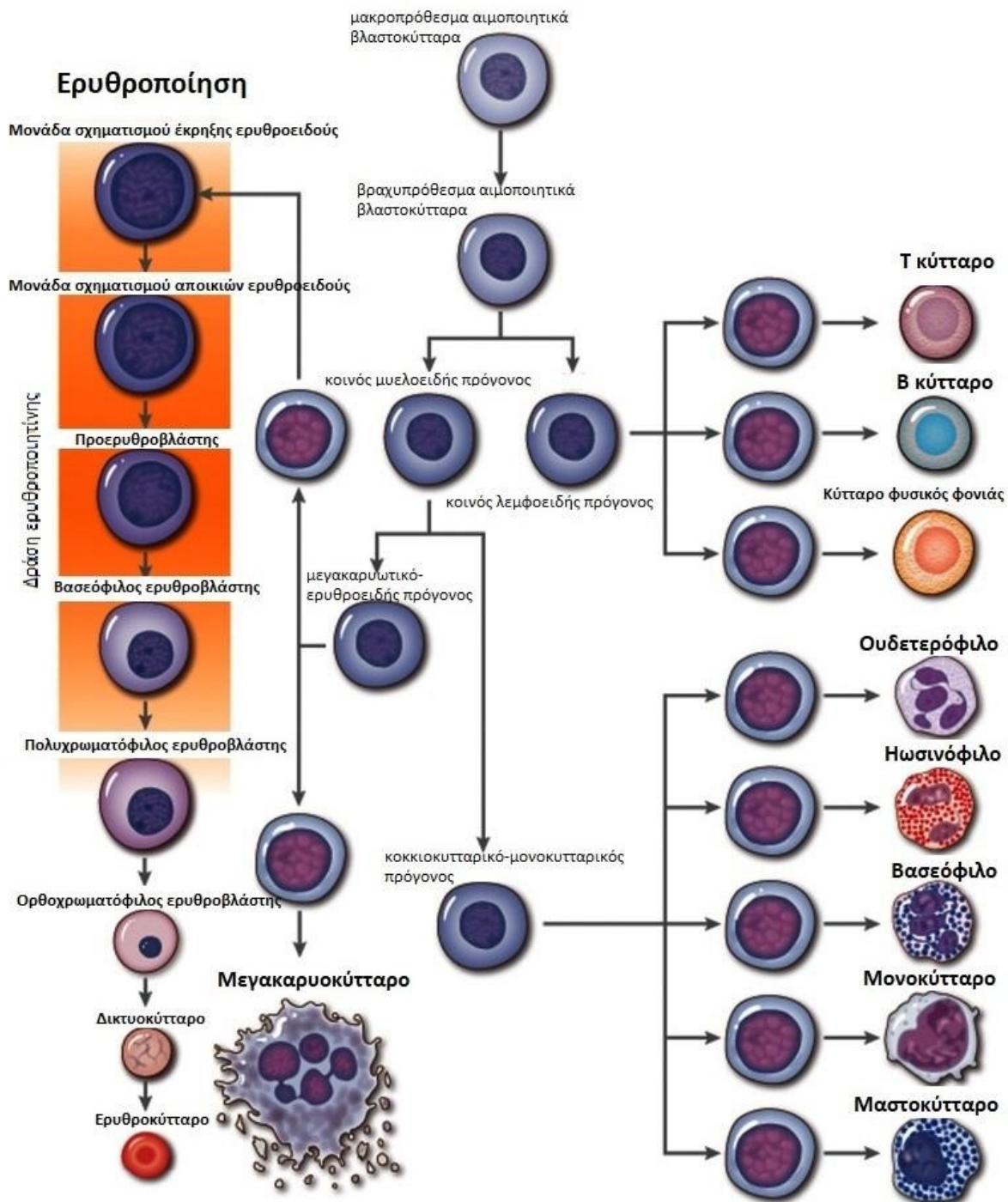
### **A5.2 Ερυθρά αιμοσφαίρια**

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια, που ονομάζονται επίσης ερυθροκύτταρα (RBCs), είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς και στα όργανα του σώματος και επίσης βοηθούν στην απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα από αυτά. Παράγονται στο μυελό των οστών και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος μόλις ωριμάσουν. Έχουν σχήμα αμφίκυκλου δίσκου, διάμετρο 7-8  $\mu\text{m}$ , είναι απύρνητα και περιέχουν αιμοσφαιρίνη που τους προσδίδει έντονο ερυθρό χρώμα. Η διάρκεια ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι περίπου 120 ημέρες και μόλις ολοκληρωθεί, απομακρύνονται από την κυκλοφορία και αντικαθίστανται από νέα. Στους άνδρες ο πληθυσμός τους κυμαίνεται μεταξύ 4.5 και 6.3 εκατομμύρια RBCs/ $\text{mm}^3$  και στις γυναίκες 4.2-5.5 εκατομμύρια RBCs/ $\text{mm}^3$ . Όταν ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο σώμα είναι μειωμένος, επικρατεί η κατάσταση αναιμίας και προκαλείται αδυναμία, κόπωση και άλλα προβλήματα υγείας. (Ogawa 1994) Τα ερυθροκύτταρα υπόκεινται σε υψηλό βαθμό διαφοροποίησης μέχρι να πάρουν την τελική τους μορφή. Η διαδικασία με την οποία ωριμάζουν και αποκτούν τα τελικά μορφολογικά και κατ' επέκταση λειτουργικά τους χαρακτηριστικά ονομάζεται ερυθροποίηση και αποτελεί μέρος του πολύπλοκου φαινομένου της αιμοποίησης. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαφοροποίησης τα RBCs χάνουν βασικά οργανίδια καθώς και ενδοκυττάρια ουσίες. (Pretini et al ,2019)

### A5.2.1 Αιμοποίηση

Τα πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα υφίστανται διαφοροποίηση για να περιοριστεί το αναπτυξιακό δυναμικό. (Εικόνα 4) Η πρώτη αναγνωρίσιμη μορφή είναι η “μονάδα ερυθροειδούς σχηματισμού έκρηξης” (BFU-E) που χαρακτηρίζεται από την ικανότητα να δημιουργεί μεγάλες αποικίες με διάσπαρτες ομάδες ερυθροβλαστών σε ημίρευστο μέσο. Από αυτό προκύπτει η “μονάδα σχηματισμού αποικιών ερυθροειδών” (CFU-E), υπεύθυνη για τη δημιουργία μικρότερων αποικιών με περίπου 50 κύτταρα. Οι προερυθροβλάστες αποτελούν την πρώτη αναγνωρίσιμη μορφή πρόδρομων ερυθροειδών και υποβάλλονται σε περαιτέρω στάδια ωρίμανσης, τα οποία περιλαμβάνουν ειδικές κυτταρικές διαιρέσεις, μείωση του κυτταρικού μεγέθους, απώλεια οργανιδίων, ανάπτυξη εξειδικευμένης κυτταρικής μεμβράνης μέσω της οποίας διευκολύνεται η μικροκυκλοφορία και η συσσώρευση της αιμοσφαιρίνης για τη μεταφορά του οξυγόνου. (Moras et al, 2017, Dzierzak et al, 2013) Τα ερυθροειδή ωριμάζουν τελικά σε ερυθροβλαστικά νησίδια του μυελού των οστών που απαρτίζονται από πρόδρομα ερυθροειδή τα οποία περιβάλλουν ένα κεντρικό μακροφάγο. (Lee et al, 1988) Παρόλο που πολλές κυτοκίνες συμβάλλουν στην ερυθροποίηση, η ερυθροποιητίνη (EPO) αποτελεί τον βασικό φυσιολογικό ρυθμιστή της. (Lodish et al, 2010) Η απώλειά της ή οι διαταραχές στη σηματοδότησή της οδηγούν σε αναιμία. (Parganas et al, 1998) Αντίθετα, η υπερβολική παραγωγή ερυθροποιητίνης ή η σηματοδότηση του συγγενούς υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (EPOR) ή ο συνδυασμός και των δύο, μπορούν να προκαλέσουν την παθολογική αύξηση ερυθρών αιμοσφαιρίων. (Hammond et al, 1974, Gross et al, 2014, Huang et al, 2010) Η ερυθροποιητίνη δρα κυρίως στους προγονικούς παράγοντες CFU-E και στους προερυθροβλάστες ώστε να διατηρήσουν την επιβίωσή τους αλλά και να διευκολύνει την τελική ωρίμανση. (Liu et al, 2006) Ακόμα, η EPO έχει την ικανότητα να διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. (Grover et al, 2014)

# Αιμοποίηση



**Εικόνα 4. Διαγραμματική απεικόνιση της αιμοποίησης.** Ιεραρχία της αιμοποίησης με τα στάδια ανάπτυξης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) και τη δραστηριότητα της ερυθροποιητίνης (EPO) κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης. Σύμφωνα με μελέτες, η EPO χρειάζεται για την ανάπτυξη της μονάδας σχηματισμού αποικιών των ερυθροειδών (CFU-E) σε ερυθροβλάστες τελικού σταδίου. Η ερυθροποίηση ξεκινά από τη μονάδα σχηματισμού έκρηξης ερυθροειδούς (BFU-E) και για να φτάσει στο ερυθροκύτταρο (RBC) μεσολαβούν η μονάδα σχηματισμού αποικιών ερυθροειδούς (CFU-E), ο προερυθροβλάστης (ProE), ο βασεόφιλος ερυθροβλάστης (BasoE), ο πολυχρωματόφιλος ερυθροβλάστης (PolyE), ο

ορθοχρωματόφιλος ερυθροβλάστης (OrthoE) και το δικτυοκύτταρο (Retic). Από τα μακροπρόθεσμα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (LT-HSC) προκύπτουν τα βραχυπρόθεσμα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (ST-HSC) και από αυτά ο κοινός μυελοειδής (CMP) και λεμφοειδής (CLP) πρόγονος. Από τον κοινό μυελοειδή πρόγονο δημιουργείται ο κοκκιοκυτταρικός-μονοκυτταρικός πρόγονος (GMP) και ο μεγακαρυωτικός ερυθροειδής πρόγονος (MEP) που μετατρέπεται σε μεγακαρυοκύτταρο (Megakaryocyte). Ο CLP περιλαμβάνει τα T-κύτταρα, τα B-κύτταρα και τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK). Τέλος, ο κοκκιοκυτταρικό-μονοκυτταρικός πρόγονος οδηγεί στη δημιουργία του ουδετεροφίλου (Neutrophil), του ηωσινοφίλου (Eosinophil), του βασεοφίλου (Basophil), του μονοκυττάρου (Monocyte) και του μαστοκυττάρου (Mast cell). (Ανατύπωση από Palis J., 2014)

### **A5.3 Αιμοπετάλια**

Τα αιμοπετάλια αποτελούν μικρούς, ερυθρούς, απύρηνους δίσκους, τμήματα του πρωτοπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων με διάμετρο 2-4 μm και έχουν ως βασική αποστολή την αιμόσταση. Η διάρκεια ζωής τους περιορίζεται σε 5 έως 7 ημέρες μετά τον σχηματισμό και τον διαχωρισμό τους από τα μεγακαρυοκύτταρα και ο αριθμός τους κυμαίνεται μεταξύ 150000-400000/μL. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται σε συνθήκες αγγειακής προσβολής ή τραυματισμού και προσκολλώνται στην εκτιθέμενη εξωκυτταρική μήτρα, η οποία βρίσκεται κάτω από το ενδοθήλιο, σχηματίζοντας ένα “συσσωμάτωμα” αιμοπεταλίων και έναν θρόμβο που περιέχει πυρήνα και κέλυφος. Τα αιμοπετάλια συμβάλλουν στο σχηματισμό αποφρακτικού θρόμβου σε παθολογικές καταστάσεις, επομένως είναι σημαντικά στην πρόληψη του σχηματισμού αρτηριακού θρόμβου. Τέλος, εκτός από τον πρωταρχικό ρόλο ως ρυθμιστές της αιμόστασης και της θρόμβωσης στα αγγεία, σημαντική είναι η συμβολή τους στην έμφυτη ανοσία και στη ρύθμιση της ανάπτυξης όγκων και εξαγγειώσεων στα αγγεία. (Holinstat, 2017) Μόλις ολοκληρωθεί η λειτουργία τους, απομακρύνονται από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα και μεταφέρονται στον σπλήνα απ’ όπου και απομακρύνονται από το σώμα. (Schwartz et al, 2010)

### **A5.4 Λευκά αιμοσφαίρια**

Τα λευκά αιμοσφαίρια είναι τα μοναδικά εμπύρηννα κύτταρα του αίματος, προστατεύουν τον οργανισμό από βλαπτικές ουσίες και διαχωρίζονται στα μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα, βασεόφιλα και ηωσινόφιλα. Είναι απαραίτητα για την άμυνα και επιβίωση του οργανισμού, καταπολεμώντας φλεγμονές, λοιμώξεις και αναγνωρίζοντας βλαβερές ουσίες που εισέρχονται στον οργανισμό, με σκοπό τη δημιουργία αντισωμάτων για την αντιμετώπισή

τους. Παράγονται στο μυελό των οστών και κυκλοφορούν στο αίμα και τους λεμφικούς ιστούς.



## **A6. Μηχανική αιμόλυση**

Πολλές έρευνες έχουν μελετήσει τις βλάβες που προκαλούνται στο αίμα, προκειμένου να κατανοήσουν, να ελαττώσουν ή ακόμα και να εξαλείψουν τις επιπλοκές που προκύπτουν και αφορούν τις ξένες επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με το αίμα και τις μη φυσιολογικές συνθήκες ροής. Η πιο κοινή βλάβη του αίματος είναι η αιμόλυση, η οποία αναγνωρίζεται με την παρουσία της αιμοσφαιρίνης η οποία απελευθερώνεται από τεμαχισμένα, υπερθερμασμένα ή πρόωρα γερασμένα ερυθροκύτταρα ή και συνδυασμό αυτών. (Whitson et al, 2014) Οι συσκευές υποβοήθησης της καρδιάς φαίνεται να προκαλούν σε κάποιο βαθμό βλάβη στο αίμα. Η παρατεταμένη επαφή και σύγκρουση που προκαλείται μεταξύ των ξένων επιφανειών και των κυττάρων του αίματος, οι αναταράξεις, η σπηλαίωση και η υπερβολική έκθεση σε υψηλές τάσεις υγρών μπορούν να προκαλέσουν μηχανική καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η μηχανική αιμόλυση κλινικά εκδηλώνεται με την εμφάνιση αναιμίας, κόπωσης, ίκτερου, αιματουρίας και νεφρικής ανεπάρκειας. (Shapira et al, 2001) Ακόμα, η μηχανική αιμόλυση μπορεί να προκαλέσει αιμορραγία, θρομβοεμβολή, νευρολογική δυσλειτουργία και υπερπηκτικότητα. (Blackshear et al, 1972) Η αιμοσφαιρίνη που απελευθερώνεται από τα υπερτεταμένα ερυθρά αιμοσφαίρια στο πλάσμα, μπορεί να επιδράσει τοξικά στο καρδιαγγειακό σύστημα λόγω της ικανότητάς του να δεσμεύσει το μονοξείδιο του αζώτου, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει αγγειοσυστολή, υπέρταση, νεφρική βλάβη καθώς και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. (Minneci et al, 2005)

### **A6.1 Μηχανική ευθραυστότητα ερυθρών αιμοσφαιρίων**

Μια μέθοδος αξιολόγησης της μηχανικής ευθραυστότητας (MF) των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η δοκιμή MF με τη χρήση σφαιριδίων. Ο δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας (MFI) υπολογίζεται μετρώντας την ποσότητα της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης ύστερα από την μηχανική καταπόνηση που υφίσταται το αίμα από τα σφαιρίδια για συγκεκριμένη χρονική διάρκεια και κάτω από καθορισμένες συνθήκες. (Gu et al, 2005) Η τεχνική MF με τα σφαιρίδια, αποτελεί εύκολο και πρακτικό τρόπο προσδιορισμού των αλλαγών στην ευαισθησία των RBCs ύστερα από μηχανική καταπόνηση η οποία σχετίζεται με τη γήρανση, την υπερβολική έκθεση στο μηχανικό στρες ή σε καταστάσεις ασθένειας. Μάλιστα βρέθηκε ότι η ευθραυστότητα στα νεογνά είναι υψηλότερη από αυτή των

ενηλίκων. (Böhler et al, 1992) Επίσης, αυτή η τεχνική απέδειξε ότι το αίμα από προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες παρουσίασε μικρότερη αιμόλυση ύστερα από μηχανική καταπόνηση σε σχέση με αυτό των ανδρών αντίστοιχης ηλικίας. (Kameneva et al, 1999)

## **B. Υλικά και μέθοδοι**

### **B1. Υλικά**

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος pH 7.4 (PBS) 10X 310 mOsm, Gibco

### **B1.2 Εμπορικά διαθέσιμα κιτ αντιδράσεων**

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), BEN S.r.l

### **B1.3 Αναλώσιμα**

Ακροφύσια για πιπέτες

Eppendorfs 1,5 mL

Δοκιμαστικοί σωλήνες

Κυβέτες

Σωληνάρια αιμοληψίας

Falcon

Μπίλιες

### **B1.4 Όργανα-Συσκευές**

Πιπέτες

Φυγόκεντρος, Thermo Scientific

Αναδευτήρας

Πλάκα ανάδευσης

Vortex

Φωτόμετρο

Υδατόλουτρο

## **B2. Μέθοδοι**

### **B2.1 Ασθενείς και Μάρτυρες**

Στη μελέτη συμμετείχαν είκοσι (20) ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά νοσήματα (MDS) και δεκατρία (13) υγιή άτομα (μάρτυρες ή controls) αντίστοιχης ηλικίας και φύλου με τους πάσχοντες, με μέσο όρο ηλικίας τα 76,5 έτη. Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος ηλικίας για τους ασθενείς ήταν τα 76.5 έτη και για τους υγιείς τα 76.7 έτη, εκ των οποίων 9/20 και 4/13 αντίστοιχα, ήταν άρρενες ( $p>0.05$ ). Δεδομένου ότι τα μυελοδυσπλαστικά νοσήματα εμφανίζονται κυρίως σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, η ηλικία των ασθενών κυμάνθηκε μεταξύ εξηντατεσσάρων (64) και ενενήντα έξι ετών (96).

### **B2.2 Υπολογισμός ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος**

Για τον υπολογισμό της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης (FHb) του πλάσματος, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Harboe. Αρχικά, διαχωρίστηκε το πλάσμα από τα ερυθροκύτταρα ύστερα από φυγοκέντρηση του ολικού αίματος για 10' στις 3000 rpm. Στη συνέχεια, ακολούθησε αραίωση 1:10 του πλάσματος σε νερό. Μόλις ολοκληρώθηκε αυτή η διαδικασία, έγινε γρήγορη ανάδευση του διαλύματος και επώαση αυτού για 30' σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Με το πέρας της επώασης, μετρήθηκε η απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο. Η μέθοδος κατά Harboe βασίζεται στη μέτρηση της οξυαιμοσφαιρίνης, η οποία έχει μέγιστο απορρόφησης τα 415 nm. Ωστόσο, στο ίδιο μήκος κύματος απορροφούν κι άλλες ουσίες όπως είναι η χολερυθρίνη και η λευκωματίνη. Επομένως, για να προκύψει σωστό αποτέλεσμα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης σε δύο ακόμα μήκη κύματος, τα 380 nm και τα 450 nm. Για να μετατραπεί η τιμή των απορροφήσεων στα τρία μήκη κύματος, σε συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος τύπος

(διόρθωση κατά Allen) :  $Hb \text{ (mg/100mL)} = [(167,2 \times A_{415}) - (83,6 \times A_{380}) - (83,6 \times A_{450})] \times 1/1000 \times \text{αραίωση (σε dH}_2\text{O)} \times 100$  , όπου  $A_{415}$  ,  $A_{380}$  και  $A_{450}$  οι τιμές των απορροφήσεων που υπολογίστηκαν στα αντίστοιχα μήκη κύματος.

### B2.3 Μηχανική αιμόλυση

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν μπίλιες, οι οποίες ασκούν μηχανικό στρες στα ερυθροκύτταρα όταν προστεθούν σε ποσότητα αίματος και κατά την ανάδευσή τους σε κατάλληλο αναδευτήρα. Η μηχανική ευθραυστότητα είναι δείκτης της ικανότητας των ερυθροκυττάρων να αντέχουν στο μηχανικό στρες. Η διαδικασία της μηχανικής αιμόλυσης ξεκινά με τη φυγοκέντρηση 1 mL του ολικού αίματος για 10' στις 3000 rpm. Μόλις ολοκληρώθηκε η φυγοκέντρηση, αφαιρέθηκε όσο το δυνατόν περισσότερο πλάσμα προκειμένου να απομείνουν τα ερυθροκύτταρα που υπολογίζεται ότι με την διαδικασία αυτή έχουν περίπου 80% αιματοκρίτη (Hct). Έπειτα, ακολούθησε μια σειρά βημάτων ώστε να μετατοπιστεί ο αιματοκρίτης περίπου στο 20%. Για τον σκοπό αυτό χρειάστηκαν τουλάχιστον 200  $\mu$ L από τα ερυθροκύτταρα που απομονώθηκαν προηγουμένως, τα οποία αραιώθηκαν με PBS 1x. Από το διάλυμα αυτό που δημιουργήθηκε με 20% Hct, υπολογίστηκε η ενδοκυττάρια Hb, ξεκινώντας με αραιώση 1:10 σε dH<sub>2</sub>O. Το νέο αραιωμένο διάλυμα, αραιώθηκε εκ νέου με 1:250 αραιώση σε dH<sub>2</sub>O, έτσι ώστε η τελική αραιώση να είναι 1:2500. Το τελικό διάλυμα που προέκυψε, επώαστηκε για 30' σε RT. Μηδενίστηκε το φωτόμετρο με τυφλό διάλυμα dH<sub>2</sub>O και η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για κάθε μήκος κύματος. Όταν ολοκληρώθηκε η επώαση, υπολογίστηκε η απορρόφηση στα μήκη κύματος 380, 415 και 450 nm. Μια ποσότητα από το αρχικό διάλυμα που δημιουργήθηκε από την ανάμειξη των ερυθροκυττάρων με PBS 1x ώστε να φτάσει σε αιματοκρίτη 20%, χωρίστηκε σε δύο erpendorfs. Στο ένα από τα δύο erpendorfs τοποθετήθηκε μία μπίλια, η οποία προκάλεσε μηχανική αιμόλυση στο δείγμα αυτό το οποίο αποτελεί το rocked δείγμα. Το άλλο δείγμα που δεν περιείχε μπίλια και λειτούργησε ως μάρτυρας, είναι το non-rocked δείγμα. Και τα δύο αυτά, rocked και non-rocked δείγματα, αφέθηκαν για ανάδευση στην πλάκα για μία ώρα στις 300 rpm. Με αυτόν τον τρόπο το non-rocked δείγμα, απλώς αναδεύτηκε, ενώ το rocked δείγμα αναδεύτηκε και δέχτηκε την μηχανική αιμόλυση που προκλήθηκε από την μπίλια που “χτυπούσε” συνεχώς το διάλυμα. Μόλις πέρασε η μία ώρα, τα δύο δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10' στις 3000 rpm και αμέσως μετά, διαχωρίστηκε το υπερκείμενο. Παρατηρήθηκε ότι το υπερκείμενο του rocked δείγματος ήταν αιμολυμένο και είχε κοκκινωπό χρώμα σε αντίθεση με του non-rocked που είχε παραμείνει διάφανο. Στα δύο αυτά ξεχωριστά υπερκείμενα, πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:10 σε dH<sub>2</sub>O και υπολογίστηκε η ελεύθερη Hb πλάσματος, αφήνοντας τα διαλύματα για επώαση

30' σε RT και υπολογίζοντας τις απορροφήσεις στα 380, 415 και 450 nm, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

$$\text{MFI} = [(\text{PF Hb rocked} - \text{PF Hb control}) / (\text{Hb aliquot} - \text{PF Hb control})] \times 100$$

## **B2.4 Υπολογισμός G6PD**

Για τον υπολογισμό του G6PD χρησιμοποιήθηκε kit. Αρχικά προετοιμάστηκαν τα διαλύματα του kit σύμφωνα με τις οδηγίες. Πρώτα μεταφέρθηκε 1 mL διαλύματος R1 στο R2, το οποίο θα αποτελεί το διάλυμα εργασίας στο εξής, και αφέθηκε για ανάδευση στην πλάκα έως ότου ομογενοποιηθεί πλήρως. Σ'εναν δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 100  $\mu\text{L}$  R2 και 1  $\mu\text{L}$  ολικό αίμα και αφέθηκαν για 10' στους 37°C στο υδατόλουτρο για επώαση. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200  $\mu\text{L}$  R3, έγινε γρήγορη ανάδευση και αφέθηκε για 2' στους 37°C στο υδατόλουτρο για επώαση. Αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο που είναι κατάλληλο για κυψελίδες, λόγω του μικρού όγκου του διαλύματος. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τυφλό διάλυμα νερού στα 340 nm. Όταν έληξε ο χρόνος της επώασης, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κυψελίδα και φωτομετρήθηκε στα 340 nm. Σημειώθηκε η απορρόφησή του και η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε σε 5' και σημειώθηκε και πάλι η νέα τιμή της απορρόφησης.

## **Γ. Αποτελέσματα**

### **Γ1. Ασθενείς**

Στη μελέτη συμμετείχαν ασθενείς χαμηλού και ενδιάμεσου κινδύνου, οι οποίοι δεν είχαν λάβει μετάγγιση συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων τους τελευταίους τρεις μήνες και δε λάμβαναν παράγοντες που επάγουν την ερυθροποίηση ή οποιαδήποτε άλλη θεραπεία για τα μυελοδυσπλαστικά νοσήματα (MDS). Επίσης, συμμετείχαν υγιή άτομα ως ομάδα ελέγχου (controls). Από το δείγμα αποκλείστηκαν άτομα που έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη, νεφρική ή/και ηπατική ανεπάρκεια. Σε όλα τα άτομα μετρήθηκε η αιμοσφαιρίνη (Hb), ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs), των ουδετεροφίλων (Neuts), των αιμοπεταλίων (Plts) και η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος (FHb). Επιπλέον, ελέγχθηκε η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος μετά από μηχανική καταπόνηση (FHb-MECH) και η ενεργότητα του G6PD.

### **Γ2. Αιματολογικός έλεγχος**

Το αιματολογικό πρότυπο των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (MDS) έδειξε μειωμένο αριθμό, της τάξης των δύο μονάδων περίπου, τόσο των λευκών (WBCs), όσο και των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs), αλλά και των αιμοπεταλίων (PLTs), σε σχέση με τα υγιή άτομα της έρευνας. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μια σχετική αύξηση, της τάξης των τεσσάρων περίπου μονάδων, των τιμών των λεμφοκυττάρων (LY) και των μονοκυττάρων (MO) στους πάσχοντες από MDS, συγκριτικά με τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Σημαντική μείωση παρουσιάστηκε στις τιμές της αιμοσφαιρίνης (Hb) και του αιματοκρίτη (Hct) στην ομάδα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Είναι γνωστό ότι η εύρεση παθολογικής τιμής της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη των ασθενών, σε συνδυασμό με την ερυθροπενία που εμφάνισαν (χαμηλό αριθμό ερυθροκυττάρων), υποδηλώνει την ύπαρξη αναιμίας. Επίσης, εντοπίστηκαν διαφοροποιήσεις μεταξύ υγιών και ασθενών ατόμων και σε άλλους ερυθροκυτταρικούς δείκτες. Συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντική αύξηση των τιμών των ασθενών με MDS σε σχέση με τα υγιή άτομα, παρουσιάζουν οι δείκτες που εκφράζουν τον μέσο όγκο ερυθρών αιμοσφαιρίων (MCV), την μέση περιεκτικότητα του ερυθροκυττάρου σε αιμοσφαιρίνη (MCH), τη μέση

συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης κατά ερυθροκύτταρο (MCHC) και το εύρος κατανομής μεγέθους αιμοπεταλίων (PDW). Αξιοσημείωτη αύξηση που ξεπερνάει το ανώτατο φυσιολογικό όριο, παρουσιάζει ο δείκτης που καθορίζει το εύρος κατανομής μεγέθους των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RDW) όσων αφορά την τιμή των πασχόντων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τέλος, ο δείκτης που αφορά τον μέσο όγκο αιμοπεταλίων (MPV) εντοπίστηκε σχεδόν ίσος και για τις δύο ομάδες που ελέγχθηκαν στην έρευνα .



**Πίνακας 2. Αιματολογικά χαρακτηριστικά.** Στον πίνακα παρουσιάζονται τα αιματολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με MDS και των μαρτύρων που συμμετείχαν στην έρευνα, καθώς και οι φυσιολογικές τιμές των δεικτών. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση.  $p < 0.05$

	<b>Ομάδα ελέγχου (N=13)</b>	<b>Ασθενείς (N=20)</b>	<b>Φυσιολογικές τιμές (Α: άνδρες, Γ: γυναίκες)</b>
WBCs ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	7 (5.6-8.5)	5.55 (3.65-7.05)	4,5-10
Neut ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	4.37 (3.25-5.57)	2.95 (1.77-4.22)	2.4-9.2
Plt ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	230 (171-309)	186 (119-247)	150-400
LY (%)	28.6 (21.74-35.46)	32.36 (16.85-47.87)	20-45
MO (%)	11.3 (6.63-15.97)	14.19 (4.61-23.77)	2-10
RBCs ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	4.38 (3.54-5.22)	3.81 (2.93-4.69)	A: 4.6-6.2 Γ: 4.2-5.4
Hb (g/dL)	11.5 (9.8-13.2)	10.43 (8.82-12.24)	A: 13-18.8 Γ: 11.6-16.4
Hct (%)	38.1 (33.14-43.06)	33.94 (28.93- 38.95)	A: 40-52 Γ: 36-48
MCV (fl)	88.7 (75.73-101.67)	91.17 (79.75-102.52)	80-99
MCH (pg)	26.9 (22.84-30.96)	28.06 (24.02-32.04)	27-31
MCHC (g/dL)	30.2 (29.04-31.36)	30.72 (29.75-31.69)	33-37
RDW (%)	14.9 (12.69-17.11)	16.63 (11.94-21.32)	11.5-14.5
MPV (fl)	11.1 (9.8-12.4)	11.09 (9.91-12.27)	8-12
PDW (%)	14.5 (11.09-17.91)	15.28 (12.1-18.46)	12-28

### Γ3. Εργαστηριακός έλεγχος

Αρχικά παρατηρήθηκε ότι το φύλο των ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα δεν παρουσίασε στατιστική σημαντικότητα και ότι οι ασθενείς και μάρτυρες είχαν σχεδόν ίδια ηλικία. Η ομάδα των πασχόντων, εμφάνισε χαμηλότερη μέση τιμή αιμοσφαιρίνης (Hb) από αυτή των υγιών ατόμων, γεγονός που προδιαθέτει για αναιμία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το κύριο εργαστηριακό εύρημα ήταν η ιδιαίτερα αυξημένη τιμή της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης (FHb) των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά νοσήματα (MDS) σε σχέση με τα υγιή άτομα (εικόνα 5). Οι ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά (MDS) εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά αυξημένη αιμόλυση (FHb), συγκριτικά με τους υγιείς και ο βαθμός της αναιμίας συσχετίστηκε με τα επίπεδα της FHb. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση στην τιμή της ενεργότητας του G6PD των ασθενών, σε σχέση με τους μάρτυρες (εικόνα 6). Τέλος, βρέθηκε μικρή αύξηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης μετά από μηχανική καταπόνηση (FHb MECH) στους μάρτυρες σε σύγκριση με τους ασθενείς (εικόνα 7).

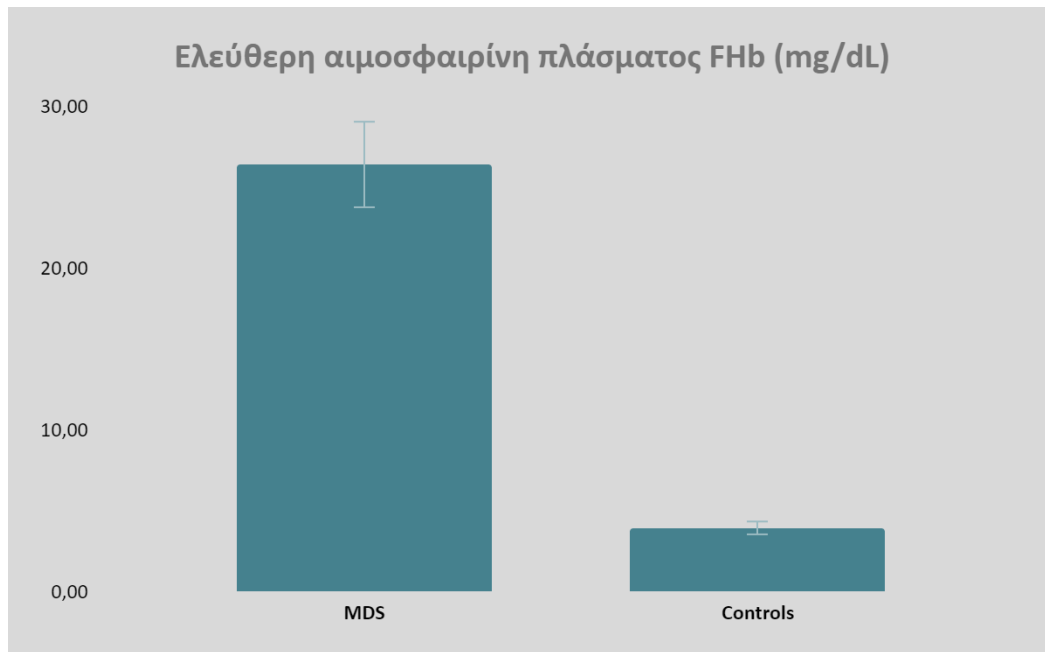
**Πίνακας 3.** Αιματολογικές παράμετροι, χαρακτηριστικά των ερυθρών αιμοσφαιρίων, FHb, FHb MECH και G6PD ενεργότητα στην ομάδα των ασθενών (MDS) και των μαρτύρων (Controls). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπική απόκλιση,  $p < 0,05$ .

	Ομάδα ελέγχου (N=13)	Ασθενείς (N=20)	p
άνδρες/γυναίκες	4/9	9/11	ns*
Μέση τιμή (σταθερή απόκλιση)			
Ηλικία (έτη)	76.7 (7.5)	76.5 (6)	ns
Διάμεση τιμή 25-75% τεταρτημόρια			
Hb (g/dL)	11.5(9.8-13.2)	10.43(8.82-12.24)	0.047
WBC (*10 <sup>3</sup> /μL)	7 (5.6-8.5)	5.55(3.65-7.05)	0.174
Neut (* 10 <sup>3</sup> /μL)	4.37 (3.25-5.57)	2.95 (1.77-4.22)	0.097
Plts (*10 <sup>3</sup> /μL)	230 (171-309)	186 (119-247)	0.168
FHb (mg/dL)	3.12 (2.43-5.55)	24.52 (20.80-33.67)	<0.01
FHb MECH (mg/dL)	1.84 (1.75-2.03)	1.72 (1.46-2.23)	0.269
G6PD	9.35 (3.26-15.44)	10.55 (7.39-13.71)	<0,05

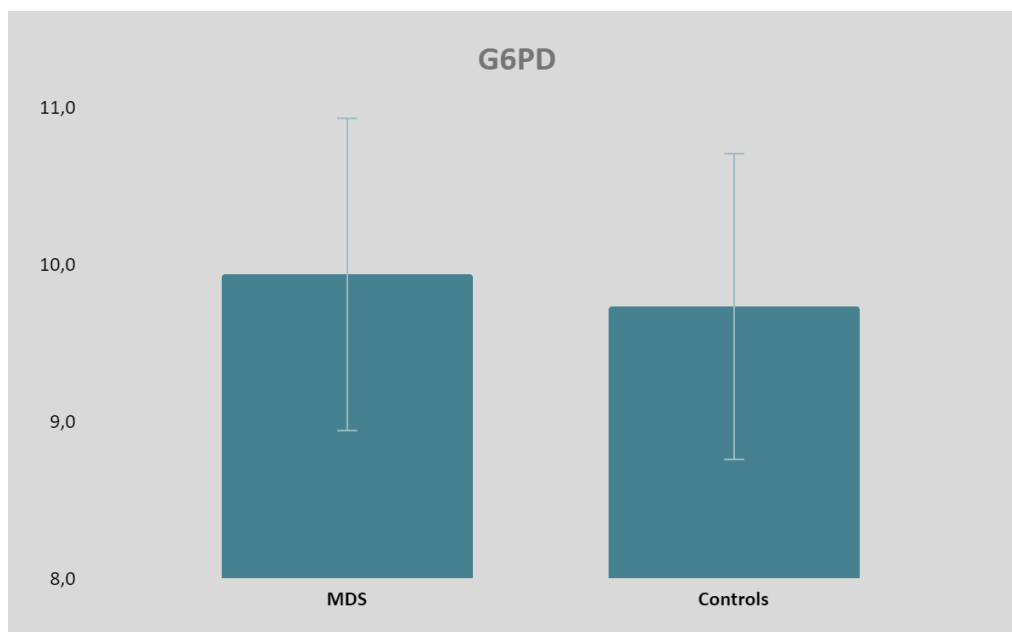
ns\* μη στατιστικά σημαντικό

**Σημαντικές συσχετίσεις στο σύνολο του δείγματος**

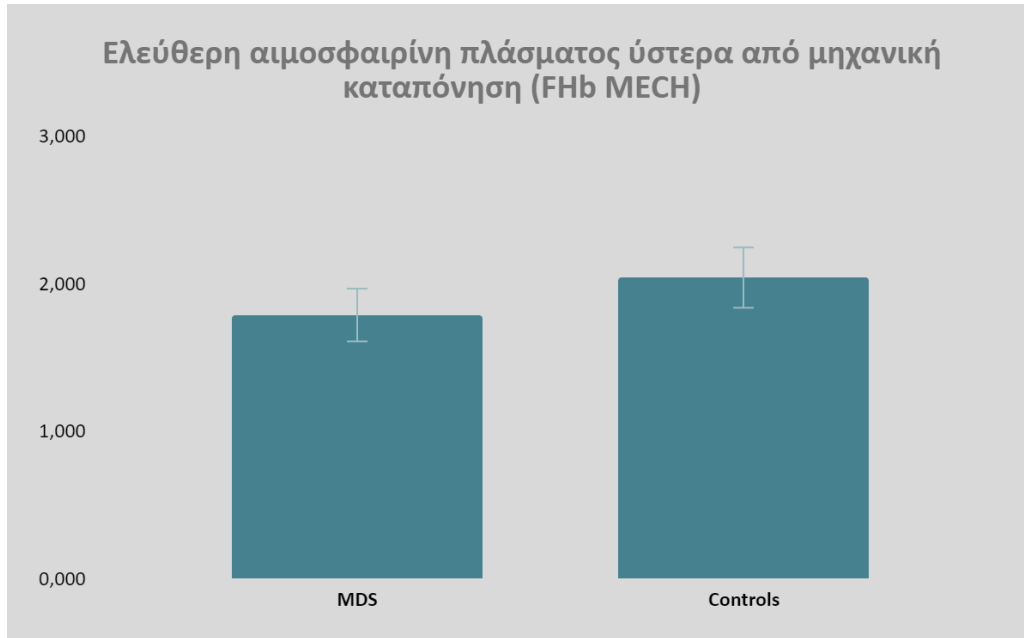
FHb ~ Hb : Spearman's R= -0.390, p=0.025
FHb ~ G6PD : Spearman's R=0.36, p=0.039



**Εικόνα 5. Διαγραμματική απεικόνιση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος (FHb).** Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η ημιποσοτική έκφραση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος (FHb), στο δείγμα των ατόμων με μυελοδυσπλαστικά νοσήματα (MDS) σε σύγκριση με τα υγιή άτομα. Παρατηρείται εμφανώς η αυξημένη τιμή της FHb των ασθενών με MDS.



**Εικόνα 6. Διαγραμματική απεικόνιση της ενεργότητας του G6PD.** Παρουσιάζεται η ενεργότητα του G6PD τόσο για τους ασθενείς με MDS, όσο και για τους υγιείς και παρατηρείται μια σχετική αύξηση στην τιμή των ασθενών.



**Εικόνα 7. Διαγραμματική απεικόνιση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος ύστερα από μηχανική καταπόνηση (FHb-MECH).** Στο διάγραμμα αυτό παρουσιάζεται η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος ύστερα από μηχανική καταπόνηση (FHb MECH), στο δείγμα των ασθενών και των μαρτύρων και φαίνεται η μικρή αύξηση της μέση τιμής των υγιών ατόμων σε σύγκριση με των ασθενών με MDS.

## Δ. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη δείχνεται αυξημένη ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος (FHb) και αυξημένη ενεργότητα G6PD σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά νοσήματα (MDS). Επιπλέον, βρέθηκε συσχέτιση της FHb πλάσματος με την αναιμία των ασθενών και τα αυξημένα επίπεδα της ενεργότητας του G6PD.

Ο τρόπος με τον οποίο το G6PD, ως μέρος της PPP, επηρεάζει τα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης και του κυτταρικού θανάτου των καρκινικών κυττάρων, δεν έχει καθοριστεί ακόμα με σαφήνεια. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι το G6PD συμβάλλει στην ανάπτυξη του όγκου, διατηρώντας την ενδοκυτταρική ομοιόσταση οξειδοαναγωγής. (Cai et al, 2015) Έχει παρατηρηθεί ότι η ενεργότητα του G6PD είναι αυξημένη σε διάφορους τύπους καρκίνων όπως ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης (Ai et al, 2016, Hu et al, 2016), του μαστού (Dong et al, 2016, Benito et al, 2017, Mele et al, 2019, Yang et al, 2018, Jahani et al, 2017), του ενδομητρίου (He et al, 2018), του οισοφάγου (Hu et al, 2015, Chen et al, 2018), του προστάτη (Tsouko et al, 2014, Nna et al, 2010), του στομάχου (Chen et al, 2019, Zhang et al, 2019, Rao et al, 2015), των νεφρών (Spencer et al, 2017, Langbein et al, 2008, Frederiks et al 2010, Lucarelli et al, 2015, Zhang et al, 2017), του ήπατος (Yin et al, 2017, Liu et al, 2015, Barajas et al, 2018), του παχέος εντέρου (Ohl et al, 2006, Massari et al, 2016, Dore et al, 2016, Van Driel et al, 1999, Fang et al, 2016), του τραχήλου της μήτρας (Cui et al, 2018, Hu et al, 2016), του πνεύμονα (Zhang et al, 2016, Wang et al, 2012) και των ωοθηκών (Debeb et al, 2016, Jiang et al, 2011, Ma et al, 2017), των γλοιοβλαστωμάτων (Kathagen et al, 2016, Wang et al, 2016), της λευχαιμίας (Xu et al, 2016, Poulain et al, 2017, Chen et al, 2016) και των γλοιωμάτων (Yang et al, 2018, Wu et al, 2018, Oronsky et al, 2016).

Η βασική λειτουργία του G6PD είναι η διατήρηση της απαιτούμενης αναγωγικής ισχύος, η υποστήριξη και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Προηγούμενη έρευνα έδειξε τον πιθανό ρόλο του G6PD στην παθολογία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (CC) που προκαλείται από λοίμωξη από τον ιο των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV). (Tao Hu et al, 2015) Έχει αναφερθεί ότι η ενεργότητα του G6PD αυξάνεται σε διάφορα καρκινικά κύτταρα. Οι Hu T et al, 2013 έδειξαν ότι η ενεργότητα του G6PD αυξήθηκε σε μολυσμένους με HPV ιστούς, με ανοσοϊστοχημεία (IHC). Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι είτε με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-

PCR) είτε με ανάλυση ανοσοαποτυπώματος (Western blot), τα επίπεδα έκφρασης του G6PD ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στους παθολογικούς ιστούς, σε σχέση με τους μάρτυρες. Επιπλέον, η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι άτομα ηλικίας 30 έως 40 ετών, με αυξημένα επίπεδα G6PD τείνουν να αναπτύξουν καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. (Wang et al, 2012)

Συσχετίζοντας την έρευνα που αφορά τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, με αυτή που μελετά τα μυελοδυσπλαστικά νοσήματα και συγκρίνοντας τα δεδομένα όσον αφορά την ενεργότητα του G6PD, προκύπτει ότι πιθανόν η έκφραση του G6PD παρουσιάζει στατιστικά σημαντικά αυξημένα επίπεδα στα παθολογικά δείγματα.

Η ενδαγγειακή αιμόλυση ευθύνεται για μεγάλο ποσοστό της καταστροφής των ερυθρών αιμοσφαιρίων που οδηγεί σε αύξηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε, αναγνωρίστηκε ότι τα επίπεδα της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα μπορεί να φτάσουν τα 25μM κατά τη διάρκεια δρεπανοκυτταρικής κρίσης, ενώ τα όρια ελεύθερης Hb στο πλάσμα είναι 5-10μM σε δρεπανοκυτταρικούς ασθενείς. (Muller-Eberhard U et al, 1968) Με αντίστοιχο τρόπο φαίνεται να λειτουργεί η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος και στην περίπτωση του MDS, καθώς σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, η τιμή της Fhb των πασχόντων από MDS ήταν αυξημένη σε σχέση με αυτή της ομάδας ελέγχου.

Έχει παρατηρηθεί αναιμία σε ασθενείς με MDS σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 90%. Η αναιμία εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της νόσου ή κατά τη διάγνωσή της. Ανάλογα με την τιμή της αιμοσφαιρίνης, κάποιοι ασθενείς χρειάζονται μετάγγιση ερυθροκυττάρων. Σε ασθενείς με MDS χαμηλότερου κινδύνου φαίνεται ότι οι παράγοντες διέγερσης της ερυθροποιητίνης (ESA) παρουσιάζουν ποσοστό ανταπόκρισης 40-50%, με μέση διάρκεια ανταπόκρισης περίπου τα δύο έτη. Μάλιστα ενδείκνυται για ασθενείς με αιμοσφαιρίνη <10 g/dL και επίπεδο ερυθροποιητίνης <500. (Santini V. , 2011)

Πράγματι, όπως αποδείχθηκε από την έρευνα, οι ασθενείς με MDS εμφάνισαν αναιμία συγκριτικά με τα υγιή άτομα που ελέγχθηκαν.

Πιθανά, η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος και η ενεργότητα του G6PD διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην παθοφυσιολογία των ασθενών με MDS. Επιπλέον έρευνες χρειάζονται σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών, για να αποδειχθεί ο ρόλος του G6PD και η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος στα MDS.





## E. Βιβλιογραφία

Ai G., Dachineni R., Kumar D.R., Alfonso L.F., Marimuthu S., Bhat G.J. Aspirin inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in HCT 116 cells through acetylation: Identification of aspirin-acetylated sites. *Mol. Med. Rep.* 2016;14:17261732. doi: 10.3892/mmr.2016.5449.

Ainoon O, Alawiyah A, Yu YH, Cheong SK, Hamidah NH, Boo NY, et al. Semiquantitative screening test for G6PD deficiency detects severe deficiency but misses a substantial proportion of partially-deficient females. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2003;34:405-14.

Barajas J.M., Reyes R., Guerrero M.J., Jacob S.T., Motiwala T., Ghoshal K. The role of miR-122 in the dysregulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) expression in hepatocellular cancer. *Sci. Rep.* 2018;8:9105. doi: 10.1038/s41598-018-27358-5.

Benito A., Polat I.H., Noe V., Ciudad C.J., Marin S., Cascante M. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and transketolase modulate breast cancer cell metabolic reprogramming and correlate with poor patient outcome. *Oncotarget.* 2017;8:106693-106706. doi: 10.18632/oncotarget.21601.

Bennett JM, Orazi A. Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: recommendations for a standardized approach. *Haematologica* 2009;94:264:268.

Beutler E. G6PD deficiency. *Blood.* 1994;84:3613:3636.

Blackshear, P. Mechanical hemolysis in flowing blood. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall; 1972. p. 501-528.

Bohler T, Leo A, Stadler A, Linderkamp O. Mechanical fragility of erythrocyte membrane in neonates and adults. *Pediatr Res.* 1992; 32(1):92-96.

Butturini A, Gale RP, Verlander PC, et al. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 1994

Cai T., Kuang Y., Zhang C., Zhang Z., Chen L., Li B., Li Y., Wang Y., Yang H., Han Q., et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADPH oxidase 4 control STAT3 activity in melanoma cells through a pathway involving reactive oxygen species, c-SRC and SHP2. *Am. J. Cancer Res.* 2015;5:1610-1620.

Chen L., Zhang Z., Hoshino A., Zheng H.D., Morley M., Arany Z., Rabinowitz J.D. NADPH production by the oxidative pentose-phosphate pathway supports folate metabolism. *Nat. Metab.* 2019;1:404-415. doi: 10.1038/s42255-019-0043-x.

Chen X., Xu Z., Zhu Z., Chen A., Fu G., Wang Y., Pan H., Jin B. Modulation of G6PD affects bladder cancer via ROS accumulation and the AKT pathway in vitro. *Int. J. Oncol.* 2018;53:1703-1712. doi: 10.3892/ijo.2018.4501.

Chen Y., Xu Q., Ji D., Wei Y., Chen H., Li T., Wan B., Yuan L., Huang R., Chen G. Inhibition of pentose phosphate pathway suppresses acute myelogenous leukemia. *Tumor Biol.* 2016;37:6027-6034. doi: 10.1007/s13277-015-4428-5.

Chertow GM, Mason PD, Vaage-Nilsen O, Ahlmen J. Update on adverse drug events associated with parenteral iron. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:378-82.

Cui J., Pan Y., Wang J., Liu Y., Wang H., Li H. MicroRNA-206 suppresses proliferation and predicts poor prognosis of HR-HPV-positive cervical cancer cells by targeting G6PD. *Oncol. Lett.* 2018;16:5946-5952. doi: 10.3892/ol.2018.9326.

Cutler CS, Lee SJ, Greenberg P, et al. A decision analysis of allogeneic bone marrow transplantation for the myelodysplastic syndromes: delayed transplantation for low-risk myelodysplasia is associated with improved outcome. *Blood* 2004;104:579?585.

D.A Newhall, R. Oliver, S. Lugthart Anaemia: A disease or symptom, 2020.

De Benoist B, et al. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005. WHO Global Database of Anaemia, World Health Organization, 2008.

Debeb B.G., Lacerda L., Larson R., Wolfe A.R., Krishnamurthy S., Reuben J.M., Ueno N.T., Gilcrease M., Woodward W.A. Histone deacetylase inhibitor-induced cancer stem cells exhibit high pentose phosphate pathway metabolism. *Oncotarget.* 2016;7:28329-28339. doi: 10.18632/oncotarget.8631.

Dokal I. Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br J Haematol* 2000;110:768?779.

Dong T., Kang X., Liu Z., Zhao S., Ma W., Xuan Q., Liu H., Wang Z., Zhang Q. Altered glycometabolism affects both clinical features and prognosis of triple-negative and neoadjuvant chemotherapy-treated breast cancer. *Tumor Biol.* 2016;37:8159-8168. doi: 10.1007/s13277-015-4729-8.

Dore M.P., Davoli A., Longo N., Marras G., Pes G.M. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and risk of colorectal cancer in Northern Sardinia: A retrospective observational study. *Medicine (Baltim.)* 2016;95:e5254. doi: 10.1097/MD.0000000000005254.

Dzierzak E, Philipsen S: Erythropoiesis: Development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013

Estey E.H., Hasserjian R.P., Dohner H. Distinguishing AML from MDS: A fixed blast percentage may no longer be optimal. *Blood.* 2022

Fang Z., Jiang C., Feng Y., Chen R., Lin X., Zhang Z., Han L., Chen X., Li H., Guo Y., et al. Effects of G6PD activity inhibition on the viability, ROS generation and mechanical properties of cervical cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016;1863:2245-2254. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.05.016.

Font P, Loscertales J, Benavente C, et al. Inter-observer variance with the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) following the 2008 WHO classification. *Ann Hematol* 2013;92:19-24.

Frederiks W.M., Bosch K.S., Hoeben K.A., van Marle J., Langbein S. Renal cell carcinoma and oxidative stress: The lack of peroxisomes. *Acta Histochem.* 2010;112:364-371. doi: 10.1016/j.acthis.2009.03.003

Goodnough LT, Schrier SL. Evaluation and management of anemia in the elderly. *Am J Hematol.* 2014;89:88-96.

Greenberg P., Cox C., LeBeau M.M., Fenaux P., Morel P., Sanz G., Sanz M., Vallespi T., Hamblin T., Oscier D., et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997;89:2079-2088. doi: 10.1182/blood.V89.6.2079.

Greenberg P.L., Tuechler H., Schanz J., Sanz G., Garcia-Manero G., Sole F., Bennett J.M., Bowen D., Fenaux P., Dreyfus F., et al. Cytopenia levels for aiding establishment of the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2016

Greenberg PL, Rigsby CK, Stone RM, et al. NCCN task force: transfusion and iron overload in patients with myelodysplastic syndromes. *J Natl Compr Canc Netw.* 2009;7(Suppl 9):S1-S16.

Gregg XT, Prchal JT. Red cell enzymopathies. In: Hoffman R, ed. *Hematology: basic principles and practice.* 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000:657-60.

Gross M, Ben-Califa N, McMullin MF, et al.: Polycythaemia-inducing mutations in the erythropoietin receptor (EPOR): Mechanism and function as elucidated by epidermal growth factor receptor-EPOR chimeras. *Br J Haematol.* 2014;165(4):519-28. 10

Grover A, Mancini E, Moore S, et al.: Erythropoietin guides multipotent hematopoietic progenitor cells toward an erythroid fate. *J Exp Med.* 2014;211(2):181-8.

Gu L, Smith WA, Chatzimavroudis GP. Mechanical fragility calibration of red blood cells. *ASAIO J.* 2005; 51(3):194-201

Gupta V, Brooker C, Tooze J, et al. Clinical relevance of cytogenetic abnormalities at diagnosis of acquired aplastic anaemia in adults. *Br J Haematol* 2006

Hammond D, Winnick S: Paraneoplastic erythrocytosis and ectopic erythropoietins. *Ann N Y Acad Sci.* 1974;230:219-27.

He C., Yang J., Ding J., Li S., Wu H., Xiong Y., Zhou F., Jiang Y., Teng L., Yang J. Downregulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase by microRNA1 inhibits the growth of pituitary tumor cells. *Oncol. Rep.* 2018;40:3533-3542. doi: 10.3892/or.2018.6755.

Hermiston ML, Mentzer WC. A practical approach to the evaluation of the anemic child. *Pediatr Clin North Am.* 2002;49:877-91.

Holinstat M. Normal platelet function, 2017

Hu T, Zhang C, Tang Q, Su Y, Li B, Chen L, Zhang Z, Cai T, Zhu Y. Variant G6PD levels promote tumor cell proliferation or apoptosis via the STAT3/5 pathway in the human melanoma xenograft mouse model. *BMC Cancer* 2013; 13: 251-251.

Hu T., Chang Y.F., Xiao Z., Mao R., Tong J., Chen B., Liu G.C., Hong Y., Chen H.L., Kong S.Y., et al. miR-1 inhibits progression of high-risk papillomavirus-associated human cervical cancer by targeting G6PD. *Oncotarget*. 2016;7:86103-86116. doi: 10.18632/oncotarget.13344.

Hu T., Li Y.S., Chen B., Chang Y.F., Liu G.C., Hong Y., Chen H.L., Xiyang Y.B. Elevated glucose-6-phosphate dehydrogenase expression in the cervical cancer cases is associated with the cancerigenic event of high-risk human papillomaviruses. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 2015

Hu T., Li Y.S., Chen B., Chang Y.F., Liu G.C., Hong Y., Chen H.L., Xiyang Y.B. Elevated glucose-6-phosphate dehydrogenase expression in the cervical cancer cases is associated with the cancerigenic event of high-risk human papillomaviruses. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 2015;240:1287-1297. doi: 10.1177/1535370214565971.

Hu, T.; Li, Y.S.; Chen, B.; Chang, Y.F.; Liu, G.C.; Hong, Y.; Chen, H.L.; Xiyang, Y.B. Elevated glucose-6-phosphate dehydrogenase expression in the cervical cancer cases is associated with the cancerigenic event of high-risk human papillomaviruses. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 2015, 240, 1287-1297.

Huang LJ, Shen YM, Bulut GB: Advances in understanding the pathogenesis of primary familial and congenital polycythaemia. *Br J Haematol*. 2010;148(6):844-52.

Jahani M., Azadbakht M., Norooznejhad F., Mansouri K. l-arginine alters the effect of 5-fluorouracil on breast cancer cells in favor of apoptosis. *Biomed. Pharm.* 2017;88:114-123. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.047.

Jennifer E Frank, *Diagnosis and management of G6PD deficiency*, 2005.

Jiang P., Du W., Wang X., Mancuso A., Gao X., Wu M., Yang X. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat. Cell Biol.* 2011;13:310-316. doi: 10.1038/ncb2172.

Kameneva MV, Watach MJ, Borovetz HS. Gender difference in rheologic properties of blood and risk of cardiovascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc.* 1999; 21(3-4):357-363.

Kathagen-Buhmann A., Schulte A., Weller J., Holz M., Herold-Mende C., Glass R., Lamszus K. Glycolysis and the pentose phosphate pathway are differentially associated with the dichotomous regulation of glioblastoma cell migration versus proliferation. *Neuro Oncol.* 2016;18:1219-1229. doi: 10.1093/neuonc/now024.

Langbein S., Frederiks W.M., zur Hausen A., Popa J., Lehmann J., Weiss C., Alken P., Coy J.F. Metastasis is promoted by a bioenergetic switch: New targets for progressive renal cell cancer. *Int. J. Cancer.* 2008;122:2422-2428. doi: 10.1002/ijc.23403.

Lee SH, Crocker PR, Westaby S, et al.: Isolation and immunocytochemical characterization of human bone marrow stromal macrophages in hemopoietic clusters. 1988

Liu B., Fang M., He Z., Cui D., Jia S., Lin X., Xu X., Zhou T., Liu W. Hepatitis B virus stimulates G6PD expression through HBx-mediated Nrf2 activation. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1980. doi: 10.1038/cddis.2015.322

Liu Y, Pop R, Sadegh C, et al.: Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood*. 2006;108(1):123-33.

Lodish H, Flygare J, Chou S: From stem cell to erythroblast: Regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones. *IUBMB Life*. 2010;62(7):492-6.

Lucarelli G., Galleggiante V., Rutigliano M., Sanguedolce F., Cagiano S., Bufo P., Lastilla G., Maiorano E., Ribatti D., Giglio A., et al. Metabolomic profile of glycolysis and the pentose phosphate pathway identifies the central role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in clear cell-renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6:13371-13386. doi: 10.18632/oncotarget.3823.

Ma X., Wang L., Huang D., Li Y., Yang D., Li T., Li F., Sun L., Wei H., He K., et al. Polo-like kinase 1 coordinates biosynthesis during cell cycle progression by directly activating pentose phosphate pathway. *Nat. Commun*. 2017;8:1506. doi: 10.1038/s41467-017-01647-5

Massari F., Ciccarese C., Santoni M., Iacovelli R., Mazzucchelli R., Piva F., Scarpelli M., Berardi R., Tortora G., Lopez-Beltran A., et al. Metabolic phenotype of bladder cancer. *Cancer Treat. Rev*. 2016;45:4657. doi: 10.1016/j.ctrv.2016.03.005.

Mele L., la Noce M., Paino F., Regad T., Wagner S., Liccardo D., Papaccio G., Lombardi A., Caraglia M., Tirino V., et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase blockade potentiates tyrosine kinase inhibitor effect on breast cancer cells through autophagy perturbation. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2019;38:160. doi: 10.1186/s13046-019-1164-5.

Mentzer WC Jr. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet*. 1973;1:882.

Miller CB, Jones RJ, Piantados S, Abeloff MD, Spivak JL. Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. *N Engl J Med*. 1990;322:1689-92.

Minnecci PC, Deans KJ, Zhi H, et al. Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J Clin Invest*. 2005; 115(12):3409-3417.

Mitlyng BL, Singh JA, Furne JK, Ruddy J, Levitt MD. Use of breath carbon monoxide measurements to assess erythrocyte survival in subjects with chronic diseases. *Am J Hematol*. 2006;81:432-8.

Moras M, Lefevre SD, Ostuni MA: From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals. *Front Physiol*. 2017

Mostafa H Ahmed, Mohini S Ghatge, Martin K Safo (2020) Hemoglobin: Structure, Function and Allostery

Muller-Eberhard U, Javid J, Liem HH, Hanstein A, Hanna M. Concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. *Blood*. 1968;32(5):811-815.

Myelodysplastic Syndrome: Diagnosis and Screening Francisco P. Tria, IV, Daphne C. Ang and Guang Fan., 2022.

Naseema Gangat, Mrinal M Patnaik, Ayalew Tefferi Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. 2016

Nna E., Tothill I.E., Ludeman L., Bailey T. Endogenous control genes in prostate cells: Evaluation of gene expression using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Med. Princ. Pract.* 2010;19:433-439. doi: 10.1159/000320300.

Ogawa M. Hematopoiesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994;94:645-65

Ohl F., Jung M., Radonic A., Sachs M., Loening S.A., Jung K. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer. *J. Urol.* 2006;175:1915-1920. doi: 10.1016/S0022-5347(05)00919-5.

Olcay L., Yetgin S. Disorders Mimicking Myelodysplastic Syndrome and Difficulties in Its Diagnosis. IntechOpen; London, UK: 2016.

Oronsky B., Scicinski J., Reid T., Oronsky A., Carter C., Oronsky N., Cabrales P. RRx-001, a novel clinical-stage chemosensitizer, radiosensitizer, and immunosensitizer, inhibits glucose 6-phosphate dehydrogenase in human tumor cells. *Discov. Med.* 2016;21:251-265.

Palis J: Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front Physiol.* 2014;5:3.

Paoli M, Liddington R, Tame J et al. (1996) Crystal structure of T state hemoglobin with oxygen bound at all four haems.

Parganas E, Wang D, Stravopodis D, et al.: Jak2 Is Essential for Signaling through a Variety of Cytokine Receptors. *Cell.* 1998;93(3):385-95.

Pierre R.V, Hoagland H, Age-associated aneuploidy: loss of Y chromosome from human bone marrow cells with aging. *Cancer* 1972

Poulain L., Sujobert P., Zylbersztejn F., Barreau S., Stuani L., Lambert M., Palama T.L., Chesnais V., Birsén R., Vergez F., et al. High mTORC1 activity drives glycolysis addiction and sensitivity to G6PD inhibition in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia.* 2017;31:2326-2335. doi: 10.1038/leu.2017.81.

Pretini, V., Koenen, M. H., Kaestner, L., Fens, M., Schiffelers, R. M., Bartels, M., & Van Wijk, R. (2019). Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Frontiers in physiology*, 10, 945

Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, et al. High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood* 2009;113:5583-5587.

Rao X., Duan X., Mao W., Li X., Li Z., Li Q., Zheng Z., Xu H., Chen M., Wang P.G., et al. O-GlcNAcylation of G6PD promotes the pentose phosphate pathway and tumor growth. *Nat. Commun.* 2015;6:8468. doi: 10.1038/ncomms9468.

Reclos GJ, Hatzidakis CJ, Schulpis KH. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency neonatal screening: preliminary evidence that a high percentage of partially deficient female neonates are missed during routine screening. *J Med Screen.* 2000;7:46-51.

Safo MK, Ahmed MH, Ghatge MS, Boyiri T (2011) Hemoglobin-ligand binding: understanding Hb function and allostery on atomic level.

Santini V. Clinical use of erythropoietic stimulating agents in myelodysplastic syndromes. *Oncologist* 2011;16:35-42.

Schwartz H, Koster S, Kahr WH, Michetti N, Kraemer BF, Weitz DA, et al. Anucleate platelets generate progeny. *Blood*. 2010;115(18):3801-3809

Shapira Y, Bairey O, Vatury M, Magen-Nativ H, Prokocimer M, Sagie A. Erythropoietin can obviate the need for repeated heart valve replacement in high-risk patients with severe mechanical hemolytic anemia: case reports and literature review. *J Heart Valve Dis*. 2001

Sharma S, Nemeth E, Chen YH, et al. Involvement of hepcidin in the anemia of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2008;14:3262-7.

Spencer N.Y., Stanton R.C. Glucose 6-phosphate dehydrogenase and the kidney. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*. 2017;26:43-49.

Stoffel NU, Cercamondi CI, Brittenham G, et al. Iron absorption from oral iron supplements given on consecutive versus alternate days and as single morning doses versus twice-daily split dosing in iron-depleted women: two open-label, randomized controlled trials. *Lancet Haematol*. 2017;4:e524-e53.

Swerdlow S., Campo E., Harris N., Jaffe E., Pileri S., Stein H., Thiele J., Arber D., Hasserjian R., Le Beau M., et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. WHO Press; Geneva, Switzerland: 2017.

Tsouko E., Khan A.S., White M.A., Han J.J., Shi Y., Merchant F.A., Sharpe M.A., Xin L., Frigo D.E. Regulation of the pentose phosphate pathway by an androgen receptor-mTOR-mediated mechanism and its role in prostate cancer cell growth. *Oncogenesis*. 2014;3:e103.

Valent P, Krieger O, Stauder R, et al. Iron overload in myelodysplastic syndromes (MDS) - diagnosis, management, and response criteria: a proposal of the Austrian MDS platform. *Eur J Clin Invest*. 2008;38(3):143-149.

Van Driel B.E., Valet G.K., Lyon H., Hansen U., Song J.Y., Van Noorden C.J. Prognostic estimation of survival of colorectal cancer patients with the quantitative histochemical assay of G6PDH activity and the multiparameter classification program CLASSIF1. *Cytometry*. 1999;38:176-183.

Vardiman J W, Hematopathological concepts and controversies in the diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006

Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., Harris, N. L., Le Beau, M. M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A., & Bloomfield, C. D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), 937-951.

Vyas P, Roberts I. Down myeloid disorders: a paradigm for childhood preleukaemia and leukaemia and insights into normal megakaryopoiesis. *Early Hum Dev* 2006;82:767-773.

Wang J, Yuan W, Chen Z, Wu S, Chen J, Ge J. Overexpression of G6PD is associated with poor clinical outcome in gastric cancer. *Tumor Biol* 2012; 33: 95-101.

Wang J., Duan Z., Nugent Z., Zou J.X., Borowsky A.D., Zhang Y., Tepper C.G., Li J.J., Fiehn O., Xu J., et al. Reprogramming metabolism by histone methyltransferase NSD2 drives endocrine resistance via coordinated activation of pentose phosphate pathway enzymes. *Cancer Lett.* 2016;378:69-79.

Wang J., Yuan W., Chen Z., Wu S., Chen J., Ge J., Hou F., Chen Z. Overexpression of G6PD is associated with poor clinical outcome in gastric cancer. *Tumor Biol.* 2012;33:95-101.

Whitson BA, Eckman P, Kamdar F, et al. Hemolysis, pump thrombus, and neurologic events in continuous-flow left ventricular assist device recipients. *Ann Thorac Surg.* 2014

WHO (2015) The global prevalence of anemia in 2011. World Health Organization

Wimazal F, Fonatsch C, Thalhammer R et al Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) versus low risk MDS: the diagnostic interface. *Leuk Res* 2007

Wu S., Wang H., Li Y., Xie Y., Huang C., Zhao H., Miyagishi M., Kasim V. Transcription Factor YY1 Promotes Cell Proliferation by Directly Activating the Pentose Phosphate Pathway. *Cancer Res.* 2018

Wu S., Wang H., Li Y., Xie Y., Huang C., Zhao H., Miyagishi M., Kasim V. Transcription Factor YY1 Promotes Cell Proliferation by Directly Activating the Pentose Phosphate Pathway. *Cancer Res.* 2018;78:4549-4562.

Xu S.N., Wang T.S., Li X., Wang Y.P. SIRT2 activates G6PD to enhance NADPH production and promote leukaemia cell proliferation. *Sci. Rep.* 2016;6:32734.

Yang C.A., Huang H.Y., Lin C.L., Chang J.G. G6PD as a predictive marker for glioma risk, prognosis and chemosensitivity. *J. Neurooncol.* 2018;139:661-670.

Yang H.C., Chen T.L., Wu Y.H., Cheng K.P., Lin Y.H., Cheng M.L., Ho H.Y., Lo S.J., Chiu D.T. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency enhances germ cell apoptosis and causes defective embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Dis.* 2013

Yang H.C., Wu Y.H., Liu H.Y., Stern A., Chiu D.T. What has passed is prolog: New cellular and physiological roles of G6PD. *Free Radic Res.* 2016;50:1047-1064.

Yang L., He Z., Yao J., Tan R., Zhu Y., Li Z., Guo Q., Wei L. Regulation of AMPK-related glycolipid metabolism imbalances redox homeostasis and inhibits anchorage independent growth in human breast cancer cells. *Redox Biol.* 2018;17:180-191.

Yin X., Tang B., Li J.H., Wang Y., Zhang L., Xie X.Y., Zhang B.H., Qiu S.J., Wu W.Z., Ren Z.G. ID1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation and confers chemoresistance to oxaliplatin by activating pentose phosphate pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2017;36:166.



Zhang H.S., Zhang Z.G., Du G.Y., Sun H.L., Liu H.Y., Zhou Z., Gou X.M., Wu X.H., Yu X.Y., Huang Y.H. Nrf2 promotes breast cancer cell migration via up-regulation of G6PD/HIF-1alpha/Notch1 axis. *J. Cell. Mol. Med.* 2019;23:3451-3463.

Zhang Q., Yi X., Yang Z., Han Q., Di X., Chen F., Wang Y., Yi Z., Kuang Y., Zhu Y. Overexpression of G6PD Represents a Potential Prognostic Factor in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Cancer.* 2017;8:665-673.

Zhang Z.Z., Lee E.E., Sudderth J., Yue Y., Zia A., Glass D., Deberardinis R.J., Wang R.C. Glutathione Depletion, Pentose Phosphate Pathway Activation, and Hemolysis in Erythrocytes Protecting Cancer Cells from Vitamin C-induced Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 2016;291:22861-22867.