



Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας
Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων

Ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD σε άνδρες αιμοδότες
G-6-PD deficiency in men blood donors

Επιμέλεια εργασίας: Χρήστου Ευάγγελος

Εισηγητής: Κριεμπάρδης Αναστάσιος

Αθήνα, Μάιος 2015



Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας
Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD σε άνδρες αιμοδότες

G-6-PD deficiency in men blood donors

Επιμέλεια εργασίας: Χρήστου Ευάγγελος

AM 10148

Εισηγητής: Κριεμπάρδης Αναστάσιος

Αθήνα, Μάιος 2015

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Ευάγγελος Χρήστου, 2015

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου, Κριεμπάρδη Αναστάσιο, για την καθοδήγηση και βοήθεια που μου παρείχε για τη διεκπεραίωση της πτυχιακής μου εργασίας. Την οικογένειά μου για την αγάπη, την στήριξη και το κίνητρο που μου δίνουν καθημερινά να γίνω καλύτερος και να επιτύχω τους στόχους μου. Τέλος, την Ψάλτα Άννα για την έμπρακτη βοήθεια και στήριξη στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	iii
Κατάλογος Εικόνων	vi
Κατάλογος Πινάκων	vii
Κατάλογος Διαγραμμάτων	viii
Περίληψη	ix
Abstract.....	x
Εισαγωγή	1
A1. Ιστορία της νόσου.....	2
A2. Καταγραφή της νόσου παγκοσμίως.....	3
A3. Χαρακτηριστικά της νόσου.....	5
A3.1 Οξεία αιμολυτική αναιμία που προκαλείται από χορήγηση φαρμάκων.....	5
A3.2 Φαβισμός	7
A3.3 Νεογνικός ίκτερος.....	8
A3.4 Κληρονομική ασφαιροκυτταρική αναιμία	9
A4. Θεραπευτικά μέσα	10
A5. Κλινικά στοιχεία κατά την εμφάνιση της νόσου	11
A6. Διάγνωση της νόσου.....	13
A7. Τρόπος κληρονομικότητας νόσου.....	15
A8. Ενζυμοπάθεια.....	17
A9. Γονίδιο G-6-PD	18
A10. Τύποι της νόσου	21
A11. Απομάκρυνση του ερυθρού αιμοσφαιρίου	23
A12. Μεταβολισμός ερυθρού	25
A13. Αναερόβια οδός embden-meyerothof	28
A14. Οδός των εξοζών - φωσφορικής πεντόζης (PPP) - μονοσφωρικής εξόζης	30
A15. Οδός Rapoport-luebering	32
A16. Οξειδωτικό στρες στα ερυθρά αιμοσφαίρια	32
A17. Μετάγγιση-Αποθήκευση ερυθρών αιμοσφαιρίων	34
B1. Σχεδιασμός μελέτης.....	38

B2. Πρωτόκολλα	46
B2.1. Επίχρισμα αίματος	46
B2.2. Κυτταρομετρία ροής	46
B2.3. Ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος.....	48
B2.4. Κυστιδίων υπολειπόμενου πλάσματος εντός του ασκού αιμοδοσίας	48
B3. Υλικά και μέθοδοι.....	49
B3.1. Συσκευές και Όργανα	49
B3.2. Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα	50
Γ. Αποτελέσματα.....	51
Γ1. Έκφραση φωσφατιδिलοσερίνης (PS) στα ερυθρά αιμοσφαίρια	51
Γ2. Ελευθέρα κυστίδια υπολειπόμενου πλάσματος.....	55
Γ3. Μορφολογία αποθηκευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων	57
Γ4. Ενεργότητα G-6-PD ενζύμου στους δότες.....	57
Δ. Συζήτηση	58
Δ1. Η έκφραση της φωσφατιδिलοσερίνης (PS) στα αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια.	58
Δ2. Ύπαρξη κυστιδίων ερυθροκυτταρικής προέλευσης στο υπολειπόμενο πλάσμα εντός του ασκού.....	60
Δ3. Ενεργότητα G-6-PD κατά την αποθήκευση.....	61
Δ4. Μετασχηματισμός της μορφολογίας του ερυθρού αιμοσφαιρίου.	62
E. Συμπεράσματα	63
Βιβλιογραφία.....	66

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD στον παγκόσμιο χάρτη.	4
Εικόνα 2. Κύαμος (κουκί), (<i>Faba vulgaris</i>), που προκαλεί αιμόλυση σε άτομα με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD.....	7
Εικόνα 3. Αριστερά υγιές νεογνό, δεξιά νεογνό που έχει υποστεί ίκτερο.....	8
Εικόνα 4. Νεογνό με ίκτερο και επιπτώσεις.....	9
Εικόνα 5. Ασφαιροκυτταρική αιμολυτική αναιμία και υποχρωμία.	10
Εικόνα 6. ερυθρά αιμοσφαίρια με σωματία Heinz και κατακρήμνιση της αιμοσφαιρίνης.	12
Εικόνα 7. Τρόπος κληρονομικότητας της ανεπάρκειας του ενζύμου G-6-PD με μητέρα φορέα.	15
Εικόνα 8. Τρόπος κληρονομικότητας της ανεπάρκειας του ενζύμου G-6-PD όπου ο πατέρας νοσεί. (.....	16
Εικόνα 9. Το γονίδιο που εκφράζει το ένζυμο G-6-PD.	19
Εικόνα 10. Το μεταλλαγμένο γονίδιο που εκφράζει το ένζυμο G-6-PD.	20
Εικόνα 11. Μοντέλο ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, διακρίνεται το μακροσύμπλοκο της ζώνης 3.....	24
Εικόνα 12. Παραγωγή ATP από γλυκόζη εντός των ερυθρών αιμοσφαιρίων.	26
Εικόνα 13. Η οδός των πεντοζών (PPP – Pentose-Phosphate-Pathway) ή αλλιώς μονοφωσφορικής εξόζης.....	27
Εικόνων 14. Προστασία του ερυθρού αιμοσφαιρίου από το οξειδωτικό στρες (NADP – NADPH).	29
Εικόνα 15. Οδός Embden-Meyerhof.	31
Εικόνα 16. Οδός Rapoport-luebering.	32
Εικόνα 17. Ερυθρά αιμοσφαίρια και τα στάδια γήρανσής τους κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ασκό αιμοδοσίας (Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο). 36	
Εικόνα 18. Ερυθρά αιμοσφαίρια θετικά σε PS (Αριστερά με πράσινο θετικά, δεξιά με πορτοκαλί θετικά).	43
Εικόνα 19. Ερυθρά αιμοσφαίρια τα οποία δεν εκφράζουν PS.....	43
Εικόνα 20. Διπλός πληθυσμός ερυθρών αιμοσφαιρίων. Αριστερά έκφραση, δεξιά όχι.	44
Εικόνα 21. Διαχωρισμός μικροκυστιδίων από τα υπόλοιπα στοιχεία του δείγματος με βάση το μέγεθος (Όσα βρίσκονται εντός gate = Αποδεκτά ως κυστίδια).....	44
Εικόνα 22. Trucounts-Beads τα οποία βρίσκονται στα ειδικά σωληνάρια για κυτταρομετρία (Εντός των gates).....	45

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Στοιχεία δοτών.	40
Πίνακας 2. Πιπέτες που χρησιμοποιήθηκαν.....	50
Πίνακας 3. Συσκευές – Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.	50
Πίνακας 4. Αντιδραστήρια - αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν.	50
Πίνακας 5. Αποτελέσματα μετρήσεων (PS+ total=συνολικός αριθμός κυστιδίων τα οποία εκφράζουν PS, R=κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης, R+=κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης τα οποία εκφράζουν PS).....	51
Πίνακας 6. Τιμές του δότη-μάρτυρα.	51
Πίνακας 7. Ελεύθερα κυστίδια πλάσματος ερυθροκυτταρικής προέλευσης με έκφραση PS.	55
Πίνακας 8. Τιμές του δότη-μάρτυρα.	55

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Σύγκριση τιμών των κυστιδίων ερυθροκυτταρικής προέλευσης(R total) του μάρτυρα με τον μέσο όρο τιμών των υπολοίπων δοτών με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD.....	52
Διάγραμμα 2. Σύγκριση τιμών των κυστιδίων ερυθροκυτταρικής προέλευσης τα οποία εκφράζουν PS(R+) του μάρτυρα, με τον μέσο όρο τιμών των υπολοίπων δοτών με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD.....	53
Διάγραμμα 3. Ερυθρά αιμοσφαίρια (CD 235+) τα οποία εκφράζουν PS.	54
Διάγραμμα 4. Ελεύθερα κυστίδια του υπολειπόμενου πλάσματος εντός του ασκού τα οποία εκφράζουν PS.	56
Διάγραμμα 5. Κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης (R+) τα οποία εκφράζουν PS στο υπολειπόμενο ποσό πλάσματος.....	56
Διάγραμμα 6. Ενεργότητα του ενζύμου G-6-PD μετά την πάροδο 42 ημερών αποθήκευσης.....	58

Περίληψη

Η ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD είναι η πιο κοινή ανεπάρκεια ενζύμου στον ανθρώπινο οργανισμό παγκοσμίως. Ο ρόλος του ενζύμου είναι ζωτικής σημασίας για το ερυθρό αιμοσφαίριο, καθώς με την συμμετοχή του στις μεταβολικές οδούς του κυττάρου, προστατεύει το κύτταρο από το οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες είναι ένα στάδιο, με το οποίο το ερυθρό αιμοσφαίριο, φυσιολογικό ή μη, θα βρεθεί αντιμέτωπο κατά την διάρκεια αποθήκευσής του στον σε ασκό της αιμοδοσίας. Στην συγκεκριμένη έρευνα, μελετήθηκαν μονάδες αίματος συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων (6) ανδρών δοτών με G-6-PD ανεπάρκεια, σε σύγκριση με μια φυσιολογική μονάδα αίματος δότη - μάρτυρα, σε όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης τους. Μετρήθηκαν τα επίπεδα φωσφατοδιλοσερίνης (PS) των ερυθρών αιμοσφαιρίων καθώς και τα κυστίδια που προήλθαν από αυτά, στο υπολειπόμενο πλάσμα εντός του ασκού με κυτταρομετρία ροής. Τα επίπεδα της PS όπως και των κυστιδίων ερυθροκυτταρικής προέλευσης ήταν υψηλά σε όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης. Η δομή των ερυθρών αιμοσφαιρίων μετά και το τέλος της τελευταίας ημέρας αποθήκευσης είχε υποστεί παραμορφώσεις και μεταβολές, οι οποίες κατά μεγάλο ποσοστό είναι μη αναστρέψιμες κατά την μετάγγιση. Η έκφραση PS στα ερυθρά αιμοσφαίρια και στα κυστίδια σηματοδοτεί την φαγοκυττάρωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Περισσότερες μελέτες κρίνονται απαραίτητες για να διαπιστωθεί εάν οι αιμοδοτές με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD μπορούν να χαρακτηριστούν ως “ανεπαρκείς” αιμοδοτές.

Abstract

The deficiency of the enzyme G-6-PD is the most common enzyme deficiency in humans worldwide. The role of the enzyme is vital for red blood cell, and the participation in the metabolic pathways of the cell, protecting the cell from oxidative stress. Oxidative stress is a stage, in which every red blood cell, normal or not, will have to face during its storage in a bag of donations. In this specific research, 6 units of blood coming from male donors with deficiency of the enzyme G-6-PD were studied, in comparison with a normal unit of blood (control) during the entire time of storage. The levels of PS and vesicles coming from the red blood cells were countered with flow cytometry. The levels both of PS and vesicles that were countered, were high during the entire time of storage. The structure of the red blood cells, after the end of the last day of storage had undergone deformations and changes are irreversible upon transfusion. Both the PS expression in erythrocytes and the vesicles signal phagocytosis of red blood cells. More studies are required in order to establish whether donors with a deficiency of the enzyme G-6-PD can be characterized as "insufficient" donors.

Εισαγωγή

Η ανεπάρκεια του ενζύμου γλυκοζο-6-φωσφορικής αφυδρογονάσης ή όπως είναι ευρέως γνωστό G-6-PD, είναι η συχνότερη πάθηση έλλειψης ενζύμου στον άνθρωπο και θεωρείται ότι νοσούν περισσότερα από 400 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως. Είναι μια κληρονομική νόσος, της οποίας χαρακτηριστικό είναι η αιμολυτική αναιμία που εκδηλώνεται στον ανθρώπινο οργανισμό που πάσχει από την συγκεκριμένη ενζυμική έλλειψη, συνήθως μετά από κάποια μόλυνση, χορήγηση φαρμάκων ή κατανάλωση συγκεκριμένων τροφών. ^{[1], [2], [5]}

Ο ρόλος του ενζύμου G-6-PD είναι καταλυτικός στο αρχικό στάδιο του PPP (pentose phosphate pathway), καθώς παράγει την αναχθείσα μορφή του NADP(νικοτιναμιδο-αδενινο φωσφορικό δινουκλεοτίδιο) το NADPH. Το NADPH είναι απαραίτητο για την προστασία του ερυθρού κυττάρου από το οξειδωτικό στρες, καθώς και τις αναγωγικές μεταβολικές οδούς που πραγματοποιούνται σε αυτό. ^{[4], [5], [7], [12]}

Κατά το PPP η γλυκόζη, που είναι απαραίτητη για το ερυθρό αιμοσφαίριο όντας η μοναδική πηγή ενέργειας για τις μεταβολικές του λειτουργίες, μετατρέπεται σε 5-φωσφορική ριβόζη (ribose-5-phosphate) που λειτουργεί ως πρόδρομος μορφή, δηλαδή αρχικό συστατικό στην βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων του RNA, DNA και του ATP για το κύτταρο. ^{[4], [5], [7], [12]}

Υψηλά ποσοστά της νόσου εμφανίζονται σε περιοχές του κόσμου όπου ενδημεί η μαλάρια ή ελονοσία, της οποίας υπεύθυνο είναι το παράσιτο *Plasmodium falciparum*. Τα φάρμακα που αντιμετωπίζουν την μαλάρια δεν χορηγούνται στα άτομα που πάσχουν από την ανεπάρκεια του G-6-PD ενζύμου, καθώς προκαλούν αιμόλυση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα παράσιτα να βρίσκουν ένα ασφαλές περιβάλλον επιβίωσης και αναπαραγωγής σε ξενιστές που πάσχουν από την ενζυμική έλλειψη. ^[1]

Η μόλυνση από κάποιον μικροοργανισμό, όπως φαίνεται παρακάτω, είναι η κυρίως αιτία που ένας ασθενής με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD θα

εμφανίσει αιμόλυση. Σε ποσοστό 20% , ασθενείς με την ενζυμική αυτή έλλειψη, έχοντας προσβληθεί από πνευμονία, παρουσίασαν απότομη πτώση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης παρουσιάζοντας αναιμία και αυξημένα ποσοστά χολερυθρίνης που προήλθαν από την αιμόλυση. Έχουν καταγραφεί περιστατικά με μολύνσεις από *Escherichia coli*, τύφο (*Rickettsia typhi*), τον ιό της ηπατίτιδας, *Salmonella*, β-αιμολυτικούς στρεπτόκοκκους ακόμα και σε προβλήματα στην στοματική υγιεινή τα άτομα με ανεπάρκεια G-6-PD παρουσίασαν αιμόλυση. [2], [5], [9]

A1. Ιστορία της νόσου

Η νόσος ανακαλύφθηκε και εδραιώθηκε από τον Carson et al. το 1956. Η ιστορία αναφέρει ότι στην περιοχή του Παναμά το 1926, μετά από χορήγηση φαρμάκου 8-αμινοκινολίνης, που ειδικεύεται εναντίον της μαλάριας, σε 72 εργάτες σκουρόχρωμου δέρματος, εμφανίστηκαν κρούσματα οξείας αιμολυτικής αναιμίας. Στην συνέχεια ακολούθησαν και άλλα περιστατικά σε διάφορες περιοχές του πλανήτη και συνοδεύονταν από αναφορές που είχαν να κάνουν με αιμόλυση, κυαμισμό και μεθαιμοσφαιριναιμία. Τα περιστατικά πάντα εμφανίζονταν μετά από την χορήγηση του φαρμάκου 8-αμινοκινολίνης και άλλων συγγενών φαρμάκων, για την καταπολέμηση της μαλάριας. [1], [4], [7], [20]

Μετά από έρευνες ο Dern et al. 1954 ανακάλυψε ότι οι αιμολύσεις που προκαλούνταν από την προιμακίνη (primaquine-PQ), που χρησιμοποιούταν για την καταπολέμηση της μαλάριας, οφείλονταν λόγω κάποιας εγγενούς ανωμαλίας των ερυθρών αιμοσφαιρίων των συγκεκριμένων ατόμων. Μετά από χρόνια παρουσιάστηκε μια έρευνα που ανέφερε ότι υπήρχαν δυο τύποι πληθυσμών ερυθρών κυττάρων, αυτά που είχαν ευαισθησία στην προιμακίνη και αυτά που ήταν ανθεκτικά. [20]

Η έρευνα του Beutler et al. 1954 ήρθε να συμπληρώσει την προηγούμενη αναφορά με δυο σημαντικές παρατηρήσεις. Η πρώτη ήταν ότι τα γηραιότερα και πιο ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια είχαν μικρότερη αντοχή στο φάρμακο, από αυτή που είχαν τα νέα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η δεύτερη ήταν ότι

τα ευαίσθητα στο φάρμακο ερυθρά αιμοσφαίρια είχαν χαμηλά τα επίπεδα GSH και αυτός ήταν ο λόγος για τον οποίο δεν μπορούσαν να προστατευτούν από τις οξειδώσεις. ^[25]

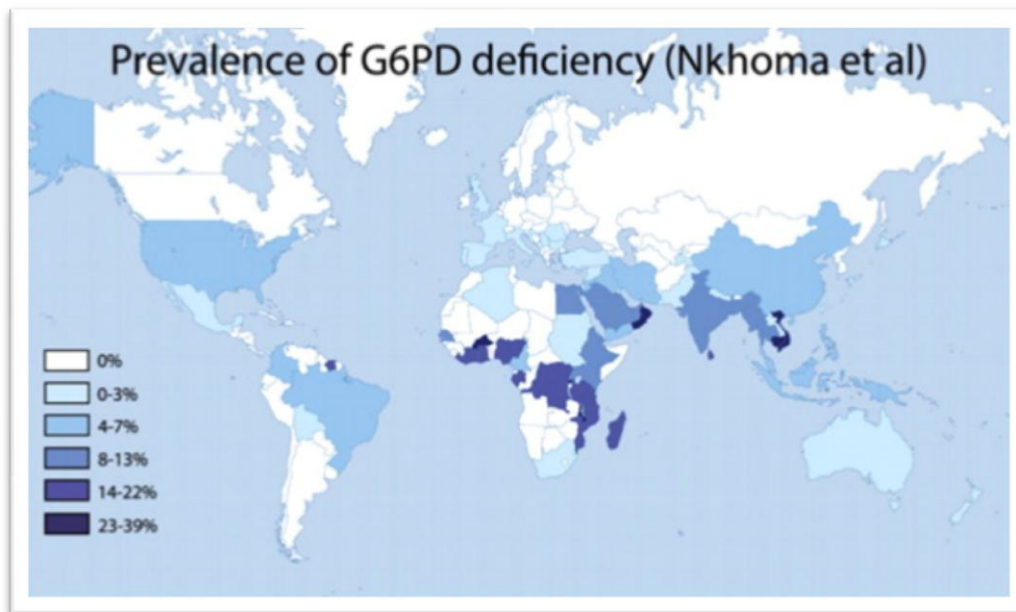
Το 1956 ο Carson et al. εδραίωσε και εξήγησε με την έρευνά του το φαινόμενο. Όλα τα κύτταρα που ήταν ευαίσθητα στην προιμακίνη και άλλα συγγενή φάρμακα, είχαν ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD, κάποια από αυτά ολική ενώ άλλα μερική. Περιέγραψε την μεγάλη ευαισθησία και στη συνέχεια αιμόλυση, που παρουσίαζαν τα ερυθρά αιμοσφαίρια ασθενών με ανεπάρκεια του ενζύμου στα συγκεκριμένα φάρμακα. Επισήμανε τον άμεσο αντίκτυπο της ανεπάρκειάς του ενζύμου στο μονοπάτι Embden-Meyerhof, ειδικότερα στον κύκλο φωσφορικών πεντοζών, που είναι υπεύθυνος για την παραγωγή ενέργειας για την λειτουργία του ερυθρού αιμοσφαιρίου, την προστασία του από οξειδωτικούς παράγοντες, καθώς και την κυτταροσκελετική δομή του κυττάρου. ^[7]

A2. Καταγραφή της νόσου παγκοσμίως

Στην Ελλάδα το ποσοστό των κατοίκων που νοσούν υπολογίζεται 0,7-3% ενώ σε συγκεκριμένες περιοχές οι τιμές ανέρχονται σε 20-30%. Ένα παράδειγμα που μπορεί να αναφερθεί για το συγκεκριμένο φαινόμενο των υψηλών ποσοστών στον παγκόσμιο χάρτη είναι περιοχές της Αφρικής. Σε κάποιες συγκεκριμένες περιοχές τα επίπεδα της ενζυμικής αυτής έλλειψης αγγίζουν το 35% και συνοδεύονται από ανεβασμένα ποσοστά ατόμων που έχουν προσβληθεί από μαλάρια. Η συγκεκριμένη ενζυματική νόσος εμφανίζεται σε μεγάλα ποσοστά σε άτομα στην περιοχή της Αφρικής, Ασίας, στην Μεσόγειο, στη Μέση Ανατολή, Βόρεια και Νότια Αμερική αλλά και σε μικρότερα ποσοστά είναι διαδεδομένη σε ολόκληρο τον κόσμο λόγω της μεταναστευτικής έξαρσης. ^{[3], [5], [15], [46]}

Υπάρχει μια τεράστια ποικιλομορφία σε σχέση με τα κλινικά χαρακτηριστικά που εκδηλώνεται η νόσος. Για παράδειγμα οι Αμερικάνοι με αφρικάνικη καταγωγή (σκουρόχρωμοι), δεν παρουσιάζουν καμία μορφή αναιμίας και αιμόλυσης παρά μόνο μετά από χορήγηση ορισμένων

φαρμάκων. Στην Μεσόγειο, σε μεγαλύτερο ποσοστό οι ασθενείς παρουσιάζουν αιμολυτικές αναιμίες σε όλη την διάρκεια της ζωής τους. Εκτιμάται ότι με την συγκεκριμένη ενζυμική έλλειψη νοσεί το 12% των Αμερικάνων Αφρικανικής καταγωγής, το 20% των κατοίκων της νοτίου Αφρικής και το 5,5% των Κινέζων. [3], [5], [16]



Εικόνα 1. Ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD στον παγκόσμιο χάρτη. (Ανατύπωση από: <http://www.kidsnewtocanada.ca/conditions/g6pd>)

Τα υψηλά ποσοστά σε συγκεκριμένες περιοχές, συνήθως χωριά στα οποία κατοικούν κατά κύριο λόγο άτομα με κάποιου είδους συγγένεια μεταξύ τους, οφείλονται στον τρόπο που κληρονομείται η συγκεκριμένη έλλειψη. Όπως αναφέρθηκε και ανώτερα η νόσος είναι κληρονομική, καθώς βασίζεται σε μετάλλαξη του γονιδίου που εκφράζει το συγκεκριμένο ένζυμο, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα X. Σε χωριά, όπου τα ποσοστά συγγένειας μεταξύ των οικογενειών είναι υψηλά, έχουμε μεγαλύτερες πιθανότητες να μεταβιβαστεί το γονίδιο στην επόμενη γενιά και να γίνουν διασταυρώσεις των μεταλλαγμένων γονιδίων με περισσότερη ευκολία. Λόγω της κλειστής κοινωνίας, ο π.χ. γάμος μακρινών ξαδελφιών που έχουν το μεταλλαγμένο γονίδιο σίγουρα θα αποφέρει τέκνο με την νόσο, ή τουλάχιστον την ετεροζυγωτία της και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα αυξημένα ποσοστά της νόσου σε κάποιες περιοχές. [16]

A3. Χαρακτηριστικά της νόσου

Κάθε φορέας υγείας πρέπει να είναι πολύ προσεκτικός κατά την διαχείριση του ασθενούς με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD. Σε περιπτώσεις όπου ο ασθενής έχει εκτεθεί σε έναν οξειδωτικό παράγοντα και έχει προκληθεί οξεία αιμολυτική αναιμία, αν αυτή δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα μπορεί να προκληθεί μη αναστρέψιμη νευρολογική βλάβη, ακόμα και θάνατο. [12], [23], [43]

Η συγκεκριμένη νόσος εμφανίζει μια ποικιλία από κλινικά χαρακτηριστικά. Χαρακτηριστικό της νόσου είναι η αιμόλυση που υπόκεινται τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από την λήψη ορισμένων φαρμάκων, όπως η προιμακίνη για την καταπολέμηση της μαλάριας, από συγκεκριμένες τροφές, όπως η κατανάλωση φάβας (φαβισμός), μολύνσεις, μεταβολικές διεργασίες του οργανισμού και περιβαλλοντικές καταστάσεις που έρχεται αντιμέτωπος ο οργανισμός αλλά και τα ερυθρά αιμοσφαίρια μέσα σε αυτόν. [6], [9], [12], [23]

Τα κυρίως κλινικά χαρακτηριστικά που εμφανίζονται είναι:

- 1) Οξεία αιμολυτική αναιμία, που προκαλείται μετά από χορήγηση φαρμάκων
- 2) Φαβισμός
- 3) Νεογνικός ίκτερος
- 4) Κληρονομική ασφαιροκυτταρική αναιμία. [1], [3]

A3.1 Οξεία αιμολυτική αναιμία που προκαλείται από χορήγηση φαρμάκων

Πρόκειται για την πιο κοινή κατάσταση που αντιμετωπίζει όποιος έχει την συγκεκριμένη ενζυμική ανεπάρκεια και την πιο επικίνδυνη απειλή για την ζωή του. Σε περίπτωση που χορηγηθεί φάρμακο που προκαλεί οξειδώσεις, σε ασθενή με την ανεπάρκεια του G-6-PD ενζύμου, παρουσιάζεται οξεία

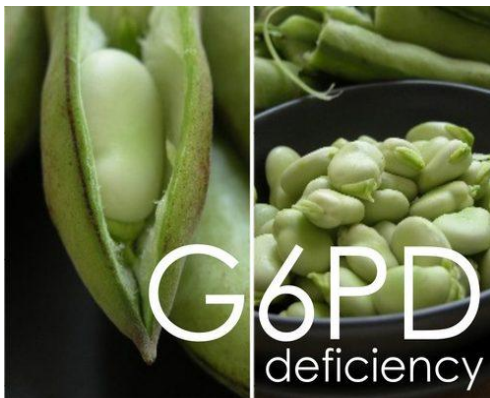
αιμόλυση. Τα συγκεκριμένα φάρμακα επιδρούν στην αιμοσφαιρίνη και κατά συνέπεια στην οξυγόνωση του οργανισμού. Στο εσωτερικό της κυκλοφορίας του σώματος αυξάνονται τα επίπεδα H_2O_2 και άλλων οξειδωτικών ριζών. Όλα τα προηγούμενα συσσωρεύονται εντός των κυττάρων που είναι G-6-PD ανεπαρκή και προκαλούν οξείδωση των πρωτεϊνών του κυττάρου και ιδιαίτερα της αιμοσφαιρίνης μετατρέποντας την σε μεθαιμοσφαιρίνη. Το κύτταρο με την έλλειψη των αντιοξειδωτικών ενζύμων δεν μπορεί να προστατευτεί και κατά συνέπεια χάνει την λειτουργικότητά του και επέρχεται η διάσπασή του ή η μη λειτουργικότητά του με αποτέλεσμα την απομάκρυνσή του από την κυκλοφορία.

Χάρη στην αιμόλυση που παρουσίαζαν οι ασθενείς με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD κατά την χορήγηση φαρμάκων, συγκεκριμένα της προιμακίνης, ανακαλύφθηκε η νόσος για πρώτη φορά. Ήταν ένα πολύ σημαντικό εύρημα, καθώς στη συνέχεια μια λίστα φαρμάκων μελετήθηκαν για να αποφεύγουν τα συγκεκριμένα άτομα την έκθεση στον κίνδυνο της οξείας αιμόλυσης και συνεπώς την απειλή για την ζωή τους. ^{[3], [12], [16], [44]}

Ο Altikat et al.2002 μελέτησε τις επιδράσεις και των αναισθητικών παραγόντων κατά τις χειρουργικές επεμβάσεις σε ασθενείς με ανεπάρκεια G-6-PD. Η αλοθάνη (halothane), το ισοφλουράνιο (isoflurane), η κεταμίνη (ketamine), το σεβοφλουράνιο (sevoflurane), η πριλοκαΐνη (prilocaine), η διαζεπάμη (diazepam) και τέλος η μιδαζολάμη (midazolam) μελετήθηκαν κατά την έρευνα. Ανασταλτική επίδραση στην λειτουργικότητα του ενζύμου εμφάνισαν τα αναισθητικά ισοφλουράνιο, σεβοφλουράνιο, διαζεπάμη και η μιδαζολάμη. Αντίθετα τα υπόλοιπα αναισθητικά που μελετήθηκαν δεν επηρέασαν καθόλου την δραστηριότητα του ενζύμου. Ακόμα όμως γίνονται μελέτες και για άλλα αναισθητικά καθώς υπάρχουν περιστατικά οξείας αιμόλυσης σε χειρουργεία με ασθενείς που πάσχουν από την συγκεκριμένη ανεπάρκεια και η χρήση των αναισθητικών μπορεί να είναι ένας παράγοντας που να την προκαλεί. ^{[5], [21], [63]}

A3.2 Φαβισμός

Σε άτομα που έχουν την συγκεκριμένη ενζυμική ανεπάρκεια κατά την κατάποση, και ιδιαίτερα κατά την χώνεψη των φασολιών από τα οποία δημιουργείται το φαγητό φάβα, προκαλείται οξεία αιμόλυση. Περιστατικά φαβισμού έχουν παρουσιαστεί σε όλο τον κόσμο, αλλά σε συντριπτικό ποσοστό τα περισσότερα περιστατικά φαβισμού εμφανίζονται στην περιοχή της Μεσογείου και της Μ. Ανατολής. Σπάνια περιστατικά έχουν αναφερθεί στην περιοχή της Αμερικής και Βρετανίας, και όσα έχουν αναφερθεί στην πλειονότητά τους αφορούσαν άτομα που είχαν καταγωγή από περιοχή της Μεσογείου. Τα συμπτώματα του φαβισμού εμφανίζονται μερικές ώρες μετά την χώνεψη της φάβας. Τα συχνότερα είναι η ναυτία, εμετός, εμφάνιση



μελανιών, και λιποθυμικές τάσεις. Μετά τα συμπτώματα ακολουθεί οξεία αιμόλυση και ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων μειώνεται κάτω από $1,1 \times 10^{12}$ /L. Εμφανίζονται σωματία Heinz στα περισσότερα από τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά την παρατήρηση επιχρίσματος ολικού αίματος.

Εικόνα 2. Κύαμος (κουκί), (*Faba vulgaris*), που προκαλεί αιμόλυση σε άτομα με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD.

(https://pbs.twimg.com/profile_images/141171513/g6pdd.jpg)

Ο ασθενής παρουσιάζει αιμοσφαιρινουρία και αιμοσφαιριναιμία. Τα συμπτώματα γενικά υποχωρούν μετά από 2-6 ημέρες. Πλέον είναι γνωστό ότι ο φαβισμός στην Μεσόγειο οφείλεται στην ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD τύπου-B, αν και στους υπόλοιπους τύπους της ενζυμικής ανεπάρκειας μπορεί και έχει εμφανιστεί σε μικρό ποσοστό. Μόνο στον τύπο-A της G-6-PD ενζυμικής ανεπάρκειας δεν έχει καταγραφεί ποτέ περιστατικό φαβισμού. ^{[3], [47]}

A3.3 Νεογνικός ίκτερος

Οι ασθενείς που πάσχουν από την ανεπάρκεια G-6-PD τις περισσότερες φορές έχουν μια φυσιολογική ζωή και δεν εμφανίζονται συμπτώματα, όπως αιμόλυση, κατά την διάρκεια της ζωής τους. Στην αρχή της ζωής τους όμως και συγκεκριμένα από την πρώτη ημέρα που έρχονται στον κόσμο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 48,5% θα εμφανίσουν νεογνικό ίκτερο. Ο νεογνικός ίκτερος μπορεί να εμφανιστεί και σε νεογνά που είναι απολύτως φυσιολογικά και δεν πάσχουν από οποιαδήποτε ασθένεια.

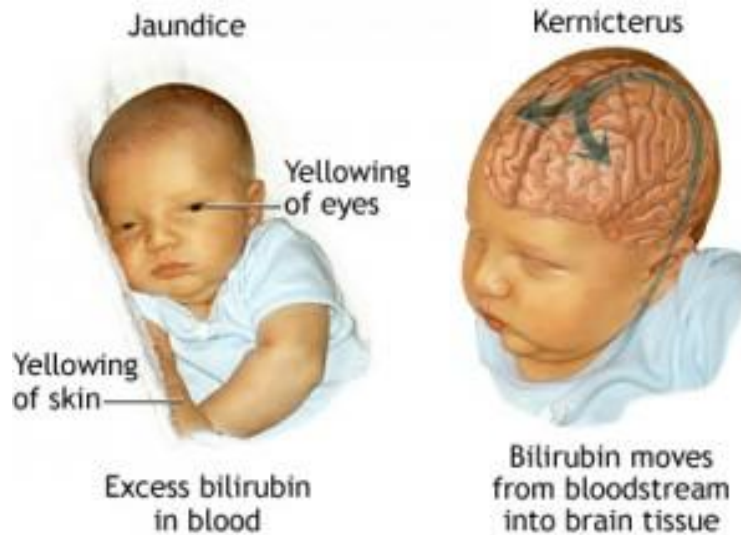


Εικόνα 3. Αριστερά υγιές νεογνό, δεξιά νεογνό που έχει υποστεί ίκτερο.

(Ανατύπωση από: <http://image.slidesharecdn.com/jaundice-141222050638-conversion-gate01/95/neonatal-jaundice-23-638.jpg?cb=1419246479>)

Σε νεογνά όμως που πάσχουν από ανεπάρκεια του G-6-PD ενζύμου ένα στα δύο θα εμφανίσουν νεογνικό ίκτερο. Από το 48,5% των νεογνών που θα εμφανίσουν νεογνικό ίκτερο μόνο από το 5-15% των συγκεκριμένων νεογνών θα διαγνωστεί ότι η αιτία του ίκτερου ήταν η ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD. Ελάχιστα περιστατικά νεογνικού ίκτερου έχουν καταλήξει σε θάνατο, ενώ σε ορισμένα χρειάστηκε σαν αντιμετώπιση η μετάγγιση αίματος. Στην πληθώρα των περιστατικών, με την φροντίδα και την αγωγή των ιατρών, τα νεογνά ισορροπούν και έχουν μια φυσιολογική ζωή χωρίς επιπλοκές. Μέχρι

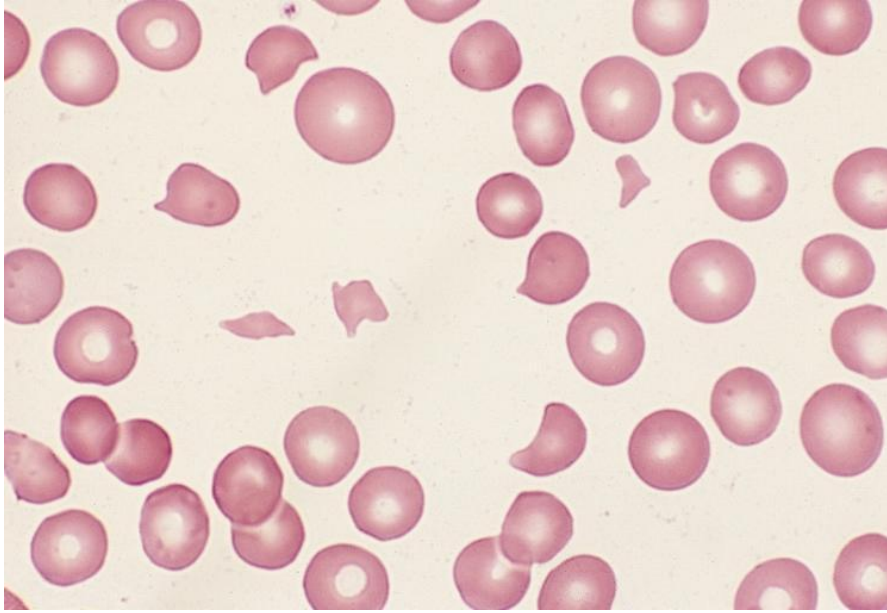
σήμερα δεν έχει παρουσιαστεί επίσημη μελέτη που να αποδώσει την ακριβή αιτία για τον νεογνικό ίκτερο και ειδικά σε νεογνά με την ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD. [2], [3], [6], [22]



Εικόνα 4. Νεογνό με ίκτερο και επιπτώσεις. (Ανατύπωση από: <http://g6pddeficiency.org/wp/2014/01/13/kernicterus-g6pd-deficiency/>)

A3.4 Κληρονομική ασφαιροκυτταρική αναιμία

Η πρώτη περίπτωση κληρονομικής ασφαιροκυτταρικής αναιμίας περιγράφηκε από τον Newton και Bass το 1958. Το νεογέννητο είχε ίκτερο από την πρώτη μέρα που γεννήθηκε, στο 4 χρόνο της ζωής του παρουσίασε οξεία αιμόλυση μετά από χορήγηση σουλφοναμίδης (sulfonamides). Πολλές περιπτώσεις αιμολυτικής αναιμίας ανά τον κόσμο έχουν συνδεθεί με κάποιο τύπο ανεπάρκειας του ενζύμου G-6-PD. Οι γνώμες είναι αμφιλεγόμενες σχετικά την σχέση που έχει η ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD με την κληρονομική ασφαιροκυτταρική αναιμία. Στις περισσότερες περιπτώσεις όπου ο συνδυασμός των δυο παραπάνω περιπτώσεων εμφανιζόταν, συνήθως ακολουθούσαν από σπληνομεγαλία, μόνιμη αναιμία με ανάγκη για μεταγγίσεις, δικτυοερυθροκυττάρωση και ίκτερο. Ένα φαινόμενο που συνοδεύει τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι κάποια λίθος στην χολή αλλά σε ποιο σπάνιες περιπτώσεις. Το ποιο σύνθηες κλινικό χαρακτηριστικό σε όλες τις καταγραφές είναι τα χαμηλά επίπεδα της αιμοσφαιρίνης.



Εικόνα 5. Ασφαιροκυτταρική αιμολυτική αναιμία και υποχρωμία. (Ανατύπωση από: http://static.wikidoc.org/1/15/Bone_marrow_hemolytic_anemia.jpg)

Τα συμπτώματα εμφανίζονται σχεδόν πάντα μετά την γέννα. Το νεογέννητο εμφανίζει ίκτερο και αναιμία, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις το παιδί είναι ασυμπτωματικό για μερικά χρόνια. Κάποια μόλυνση ή η χορήγηση φαρμάκου θα προκαλέσει αιμόλυση στο παιδί και τότε θα το αντιληφτεί ο θεράπων ιατρός. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο οι οποίες είναι υπεύθυνες για την κληρονομική ασφαιροκυτταρική αναιμία βρίσκονται στο καρβοξυλικό άκρο του ενζύμου, στη περιοχή μεταξύ 362 και 446 της αλληλουχίας των αμινοξέων. ^{[6], [16], [22]}

A4. Θεραπευτικά μέσα

Σε γενικές γραμμές η καλύτερη θεραπεία είναι η πρόληψη. Οι ασθενείς με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD πρέπει να αποφεύγουν τους οξειδωτικούς παράγοντες, συγκεκριμένες τροφές όπως τα κουκιά-φάβα, την έντονη φυσική άσκηση, τα ακραία υψόμετρα και φυσικά καταστάσεις στην καθημερινότητά τους που να τους προκαλούν στρες. Τα ακραία αιμολυτικά φαινόμενα που θα χρειαστούν μετάγγιση αίματος για να σωθεί ο ασθενής είναι σχετικά σπάνιο φαινόμενο. Η σπληνεκτομία δεν συνιστάται κατά κύριο λόγο, αλλά μπορεί να

χρησιμοποιηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις ως θεραπευτικό μέσο. Η χορήγηση φυλλικού οξέος και σιδήρου συνιστάται κατά την αιμόλυση καθώς βοηθούν τον οργανισμό του ασθενούς να ισορροπήσει, αν και στις περισσότερες περιπτώσεις αιμόλυσης ο οργανισμός την αντιμετωπίζει και από μόνος του και δεν εμφανίζονται συμπτώματα. Αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη E και σελήνιο δεν έχουν αποδειχτεί ότι βοηθούν σε ικανοποιητικό βαθμό τον οργανισμό όταν χορηγηθούν.

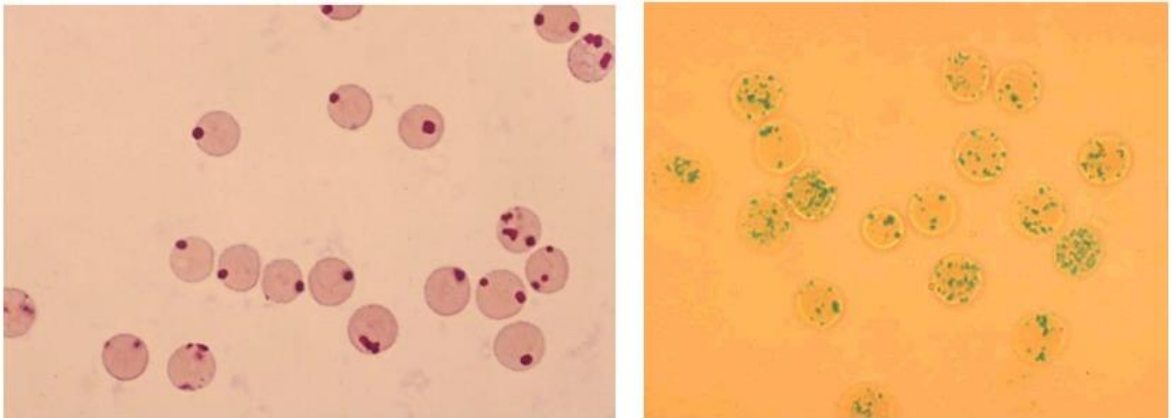
Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις για να σταματήσει η αιμόλυση πλήρως, πρέπει να απομακρυνθεί από τον οργανισμό εντελώς ο παράγοντας που την προκάλεσε. Αυτή είναι η σημαντικότερη προτεραιότητα για το ιατρικό προσωπικό και το πλήρες και λεπτομερές ιστορικό του ασθενούς πριν την πρόκληση της αιμόλυσης, είναι ζωτικής σημασίας για την θεραπευτική γραμμή που θα ακολουθήσουν οι θεράποντες. ^{[3], [38]}

A5. Κλινικά στοιχεία κατά την εμφάνιση της νόσου

Τα κλινικά στοιχεία τα οποία εμφανίζονται κατά την παρουσία της νόσου είναι η αυξημένη ελεύθερη χολερυθρίνη, λόγω της αιμόλυσης, τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος το οποίο αποβάλλεται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια στο κυτταρόπλασμα από την στιγμή που είναι ανίκανα να το μεταβολίσουν, τα δικτυοερυθροκύτταρα που λόγω της αιμόλυσης και κατά επέκταση της αναιμίας αυξάνεται ο αριθμός τους για να ισορροπήσει η λειτουργία και η οξυγόνωση του οργανισμού, καθώς και τα σωματία Heinz κατά την παρατήρηση επιστρωμένου πλακιδίου στο μικροσκόπιο. Η διόγκωση του σπλήνα είναι ένα συχνό φαινόμενο από την στιγμή που μεγάλος αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων απομακρύνονται από την κυκλοφορία ως ακατάλληλα και μη λειτουργικά και καταστρέφονται στο σπλήνα. ^{[5], [40], [45], [49]}

Η αιμοσφαιρίνη κατέχει, κατά κύριο λόγο, τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο χώρο του κυτταροπλάσματος του ερυθρού αιμοσφαιρίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οτιδήποτε αλλαγή προκληθεί στο εσωτερικό περιβάλλον να επηρεάζει άμεσα την αιμοσφαιρίνη και κατά συνέπεια το κύτταρο. Η εμφάνιση οξειδωτικών παραγόντων και η ανικανότητα του κυττάρου να προστατευτεί

από αυτούς, από τη στιγμή που έχει την συγκεκριμένη ενζυμική ανεπάρκεια, επηρεάζει την διαλυτότητα της αιμοσφαιρίνης με αποτέλεσμα να εμφανίζονται τα σωμάτια Heinz από την κατακρήμνισή της στην περιφέρεια του κυττάρου. Τα σωμάτια Heinz από την στιγμή που θα εγκατασταθούν περιφερικά της κυτταρικής μεμβράνης θα αυξήσουν την διαπερατότητα των κατιόντων της μεμβράνης, άρα διαταράξουν την ιοντική ισορροπία του κυττάρου, θα αυξήσουν την οσμωτική ευθραυστότητα και την ακαμψία της κυτταρικής μεμβράνης.



Εικόνα 6. ερυθρά αιμοσφαίρια με σωμάτια Heinz και κατακρήμνιση της αιμοσφαιρίνης. (Ανατύπωση από:

https://classconnection.s3.amazonaws.com/823/flashcards/1106823/jpg/heinz_bodies_in_crystal_violet_stain-141B3BD967E30E7B15C.jpg,

https://classconnection.s3.amazonaws.com/890/flashcards/648890/png/heinz_bodies_1314380540566.png)

Το φυσιολογικό ερυθρό κύτταρο παράγει ικανοποιητικές ποσότητες γλουταθειόνης (GSH) το οποίο αποτρέπει το σχηματισμό σωματιδίων Heinz. Το ανεπαρκές κύτταρο που υπολειτουργεί, δεν παράγει ικανοποιητική ποσότητα GSH με αποτέλεσμα να μην προστατεύεται από τις οξειδώσεις, να υπολειτουργεί η αντλία καλίου-νατρίου και εμφανίζονται πολλαπλά προβλήματα. Το ανεπαρκές ερυθρό αιμοσφαίριο, ως προς την λειτουργία του ενζύμου G-6-PD, σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες, αν είναι ανίκανο να τις αντιμετωπίσει, συνήθως οδηγείται σε αιμόλυση ή ο ίδιος ο οργανισμός με τους μηχανισμούς του το απομακρύνει από την κυκλοφορία, όπως αναφέρθηκε ανώτερα. ^{[5], [42], [49]}

Κατά την μόλυνση από κυτταρομεγαλοϊό CMV έχουν παρατηρηθεί ισχυρά επεισόδια οξείας αιμολυτικής αναιμίας σε άτομα με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο ιός προτιμά τα δικτυοερυθροκύτταρα για την εξάπλωση του, και κατά την ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD ο οργανισμός του ασθενούς έχει αυξημένο αριθμό ΔΕΚ ώστε να καλύψει την απώλεια των ανεπαρκών και μη λειτουργικών ώριμων ερυθρών. Ο ιός βρίσκει ένα ιδανικό περιβάλλον για την επιβίωση και αναπαραγωγή του και επιβαρύνει περαιτέρω τον ασθενή με την ανεπάρκεια με επεισόδια οξείας αιμόλυσης. Ο συνδυασμός των ανωτέρω προκαλεί σημαντική μείωση του αιματοκρίτη και μια χρόνια αιμολυτική νόσο. Η λύση είναι συνήθως μια σειρά από μεταγγίσεις μέχρι να βελτιωθούν τα επίπεδα του αιματοκρίτη και φυσικά η καταπολέμηση του ιού για να σταματήσουν τα αιμολυτικά επεισόδια. ^{[41], [42]}

A6. Διάγνωση της νόσου

Για να διαπιστωθεί αν κάποιος έχει ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD, ή το μέγεθος της ανεπάρκειας του, υπάρχουν κάποιοι εργαστηριακοί έλεγχοι για να αξιολογηθεί η δραστικότητα του ενζύμου, η πρωτεϊνική έκφραση του κυττάρου και φυσικά ο γονότυπος του ασθενούς. ^{[1], [3], [48]}

Κατά τις εξετάσεις ρουτίνας στο εργαστήριο, η ενζυμική επάρκεια και λειτουργικότητα καθορίζεται από την ποσοτική μέτρηση του NADPH. Το NADP με την βοήθεια του ενζύμου G-6-PD ανάγεται σε NADPH. Άρα όσο μεγαλύτερα τα ποσοστά του NADPH τόσο πιο δραστικό είναι το ένζυμο G-6-PD που ανάγει το NADP. Αναλυτικότερα, λύουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια (το μίγμα του λυμένου κυττάρου περιέχει το ένζυμο G-6-PD) και το εκχύνουν σε ένα άλλο μίγμα που περιέχει NADP. Στη συνέχεια φασματοφωτομετρικά στα 340 nm μετράμε ποσοτικά τα επίπεδα του NADPH που έχουν αναχθεί από το NADP με την βοήθεια του G-6-PD. ^{[3], [7], [11]}

Επίσης υπάρχουν οι ποιοτικές – ημι-ποσοτικές μέθοδοι μέτρησης της δραστικότητας του ενζύμου. Σε αυτές τις μεθόδους χρησιμοποιούνται οι δοκιμασίες ανοσοφθορισμού, ή η δοκιμασία κηλίδας του Beutler. Σε ένα μίγμα

υπάρχει μια ποσότητα NADP και ενζύμου G-6-PD, καθώς και χρωστική ανοσοφθορισμού για το NADP και μια διαφορετική για το NADPH. Το μίγμα γίνεται παρουσία του G-6-PD, οπότε όσο περισσότερο φθορίσει το χρώμα του NADPH και υπερσχύσει του NADP τόσο είναι μεγαλύτερη η δραστικότητα του ενζύμου G-6-PD. Με βάση τη παραπάνω διαδικασία έχουν δημιουργηθεί και άλλες δοκιμασίες μέτρησης του NADPH. [3], [7], [11]

Υπάρχουν όμως και διαδικασίες που απλά υποδεικνύουν την νόσο όπως μέτρηση των σωματιδίων Heinz σε επίχρισμα ολικού αίματος, που εμφανίζονται κατά την G-6-PD ανεπάρκεια, όπως και τα επίπεδα του GSH, που θα είναι αρκετά χαμηλά και παρέχουν μια ενδεικτική εικόνα για την δραστικότητα του ενζύμου G-6-PD. Η διάγνωση σε αυτή την περίπτωση είναι πολύ δύσκολη, καθώς κατά την συγκεκριμένη ενζυμοπάθεια υπάρχουν υψηλά ποσοστά ΔΕΚ στην κυκλοφορία, τα οποία περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό ενζύμων από τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια και αυτό μπορεί να προκαλέσει ψευδή αποτελέσματα. [7], [11]

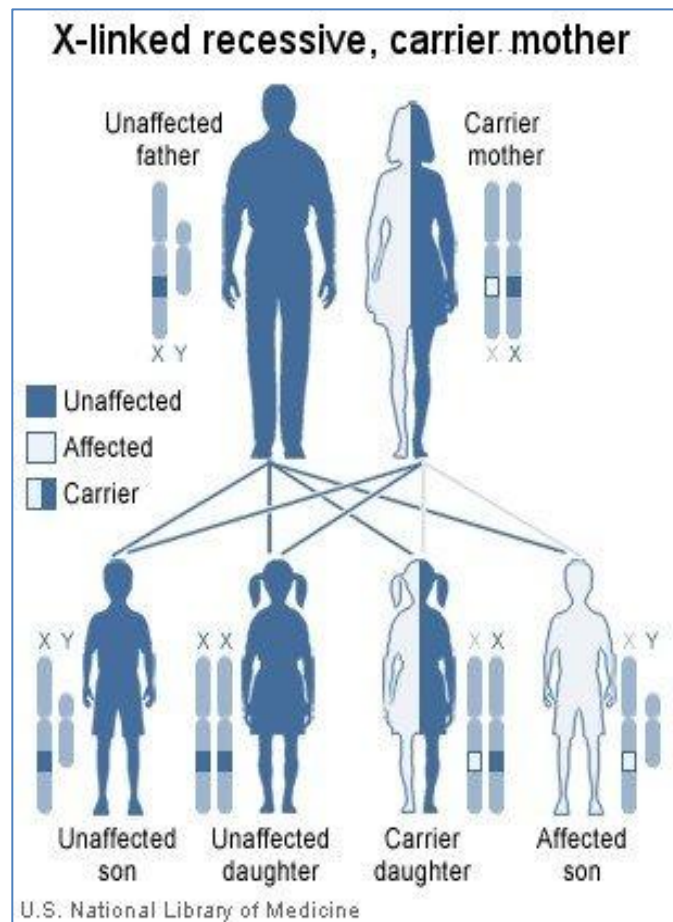
Όλες οι ποιοτικές δοκιμασίες προτιμούνται από τις ποσοτικές καθώς είναι ευκολότερες και οικονομικότερες. Είναι πολύ δύσκολο βέβαια να διαγνώσουν τις ετερόζυγες για το μεταλλαγμένο γονίδιο γυναίκες, καθώς η εικόνα τους δεν συμβαδίζει πάντα με αυτή του ασθενή που πάσχει από την ενζυμική αυτή ανεπάρκεια. Οι ποσοτικές μετρήσεις σε αυτές τις περιπτώσεις είναι απαραίτητες για την διάγνωση της ανεπάρκειας.

Για την επιβεβαίωση της ανεπάρκειας του ενζύμου G-6-PD πρέπει να πραγματοποιηθούν γενετικές εξετάσεις. Με τη μέθοδο της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) μπορούν να διαπιστωθούν μεταλλάξεις πολύ μικρού μεγέθους και αυτό καθιστά την εξέταση ιδανική για προγεννητικό έλεγχο, μελέτη της νόσου όσο αναφορά το οικογενειακό δένδρο και μελέτη των πληθυσμών. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την έκφραση του ενζύμου θα μελετηθεί και θα διαπιστωθεί αν κάποια μετάλλαξη έχει προκαλέσει μείωση της λειτουργικότητας του ενζύμου και σε ποιο βαθμό. Το κόστος της συγκεκριμένης εξέτασης είναι υψηλότερο από τις άλλες αλλά σαφώς πιο ακριβής και έγκυρη. [3], [49]

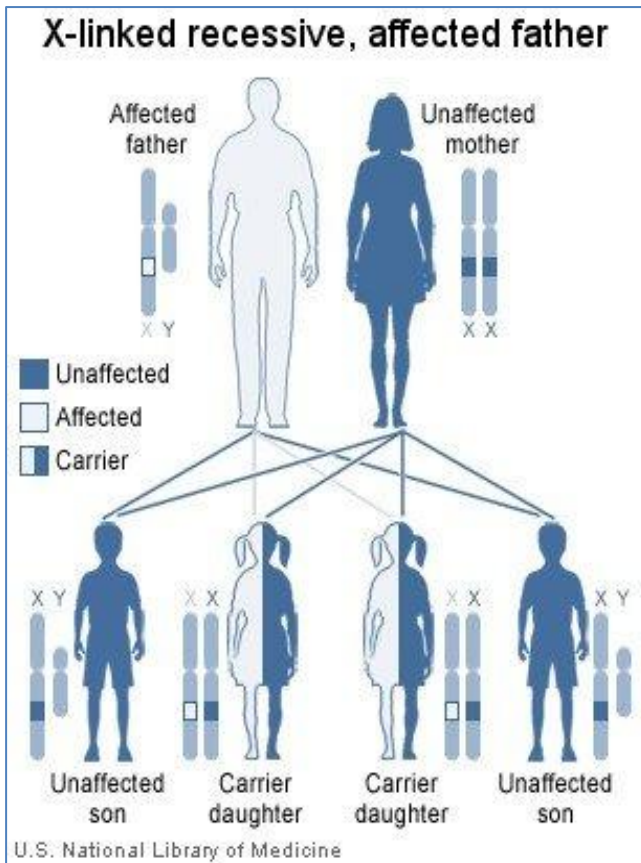
A7. Τρόπος κληρονομικότητας νόσου

Η κληρονομικότητα της νόσου είναι φυλοσύνθετη και το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την έκφραση του ενζύμου G-6-PD βρίσκεται στο χρωμόσωμα X. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η ασθένεια εμφανίζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά στους άνδρες και σε μικρότερο βαθμό στις γυναίκες. Οι γυναίκες (XX) μπορεί να είναι ομόζυγες ή ετερόζυγες, ως προς το μεταλλαγμένο γονίδιο, ενώ οι άντρες (XY) ημίζυγοι, καθώς έχουν μόνο ένα χρωμόσωμα X. ^[1]

Στην περίπτωση που η γυναίκα είναι ετερόζυγη ως προς το μεταλλαγμένο γονίδιο, η εικόνα του πληθυσμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων της θα ποικίλει, και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι πάντα ένα από τα δύο χρωμοσώματα είναι ενεργό και εκφράζεται σε κάθε κύτταρο, ενώ το άλλο παραμένει ανενεργό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχουν και φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια, εφόσον εκφράζεται το φυσιολογικό χρωμόσωμα, αλλά και κύτταρα που έχουν την έλλειψη του ενζύμου από την στιγμή που εκφράζεται και το χρωμόσωμα με τις μεταλλάξεις. ^{[1], [11]}



Εικόνα 7. Τρόπος κληρονομικότητας της ανεπάρκειας του ενζύμου G-6-PD με μητέρα φορέα. (Ανατύπωση από: <http://imgarcade.com/1/g6pd-deficiency-genetics/>)



Στους άνδρες από την στιγμή που υπάρχει μόνο ένα χρωμόσωμα X, αν αυτό έχει υποστεί τις μεταλλάξεις και έχει κληρονομηθεί από την μητέρα στον αρσενικό απόγονο, τότε εκφράζονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια με την έλλειψη του ενζύμου G-6-PD . Αποτέλεσμα της παραπάνω έκφρασης του γονιδίου είναι η σαφέστερη εικόνα του κυτταρικού του πληθυσμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων ως προς την έλλειψη του ενζύμου.^[11]

Εικόνα 8. Τρόπος κληρονομικότητας της ανεπάρκειας του ενζύμου G-6-PD όπου ο πατέρας νοσεί. (Ανατύπωση από: <http://imgarcade.com/1/g6pdc-deficiency-genetics/>)

Σε ετεροζυγώτες, η νόσος είναι κατά κύριο λόγο ασυμπτωματική αλλά δεν αποκλείεται το γεγονός να υπάρξουν και περιστατικά που να εμφανιστούν συμπτώματα, βέβαια σε ήπιο βαθμό στην πληθώρα των περιπτώσεων. Σε ομοζυγώτες όμως, συνήθως τα περιστατικά αποτελούνται από ακραία συμπτώματα όπως οξείες αιμολυτικές αναιμίες, σωματική εξάντληση, σωματικός πόνος με επίκεντρο την μέση, αλλά και ίκτερο σε μεγάλο βαθμό. Η ουσία ή ο παράγοντας που προκάλεσε την έξαρση των συμπτωμάτων πρέπει να απομακρυνθεί πλήρως από τον οργανισμό του ασθενούς για να ισορροπήσει η κατάσταση της υγείας του. Η μετάγγιση σε ακραία αιμολυτικά φαινόμενα είναι μια λύση που χρησιμοποιούν οι θεράποντες ιατροί όπως επίσης και τα ισχυρά αντιοξειδωτικά. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Σικελία το 1985, αποδείχτηκε ότι η ανεπάρκεια G-6-PD ενζύμου, είτε αφορά ετερόζυγες γυναίκες ή ημίζυγους άνδρες,

αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα κινδύνου να εμφανίσουν καταρράκτη σε κάποια στιγμή της ζωής τους. ^{[1], [10], [11]}

A8. Ενζυμοπάθεια

Τα ένζυμα και η λειτουργική τους ικανότητα είναι ζωτικής σημασίας για το ερυθρό αιμοσφαίριο. Η έλλειψη ή η μειωμένη δραστηριότητά τους έχει αντίκτυπο σχεδόν πάντα στο κύτταρο και το αποτέλεσμα είναι η μείωση του χρόνου ζωής του κυττάρου και σαφώς η μεγαλύτερη ευαισθησία, σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια, με τελικό αποτέλεσμα την αιμόλυση. Η μειωμένη δραστηριότητα των ενζύμων μπορεί να οφείλεται στο γήρας του ενζύμου, καθώς όσο αυξάνει ο χρόνος ζωής του ενζύμου τόσο μειώνεται σταδιακά και η δραστηριότητά του, αλλά και σε λάθος κατά την έκφρασή του, δηλαδή κάποια γενετική ανωμαλία. Η πλήρης έλλειψη του ενζύμου, δηλαδή η μη έκφρασή του από τον οργανισμό, οφείλεται καθαρά σε γενετική ανωμαλία. ^{[11], [19], [34], [37], [39]}

Κατά τις ενζυμικές ελλείψεις και συγκεκριμένα κατά την έλλειψη του ενζύμου G-6-PD, το αιμολυτικό φαινόμενο είναι χρόνιο, παρουσιάζοντας αιμολυτικές κρίσεις (μέτριου – σοβαρού βαθμού) που συχνά οφείλονται στην έκθεση του ασθενούς σε παράγοντες όπως, φάρμακα, οξειδωτικές ουσίες ή τροφές, καταστάσεις στρες π.χ. εγκυμοσύνη και κατά την διάρκεια κάποιας λοίμωξης. ^{[33], [35], [37], [38]}

Το ερυθρό αιμοσφαίριο εξαρτάται αποκλειστικά από τον αναερόβιο μεταβολισμό της γλυκόζης στην οδό Embden-Meyerhof, για την παραγωγή φωσφατάσης υψηλής ενεργειακής περιεκτικότητας. Για την συγκεκριμένη διαδικασία υπεύθυνα είναι τα ένζυμα που περιέχει το ερυθρό κύτταρο και έναν από τους πιο σημαντικούς ρόλους έχει το ένζυμο G-6-PD. Οι παραπάνω μεταβολικές διεργασίες του κυττάρου διατηρούν σταθερό το αμφίκυκλο σχήμα του ερυθρού, τις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις κατιόντων, διατηρούν τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης σε λειτουργική μορφή, δηλαδή τον σίδηρο δισθενή, μια ομάδα σουλφιδρυλικών ενζύμων, τα επίπεδα της GSH και των συντελεστών της μεμβράνης. ^{[11], [34], [35], [37]}

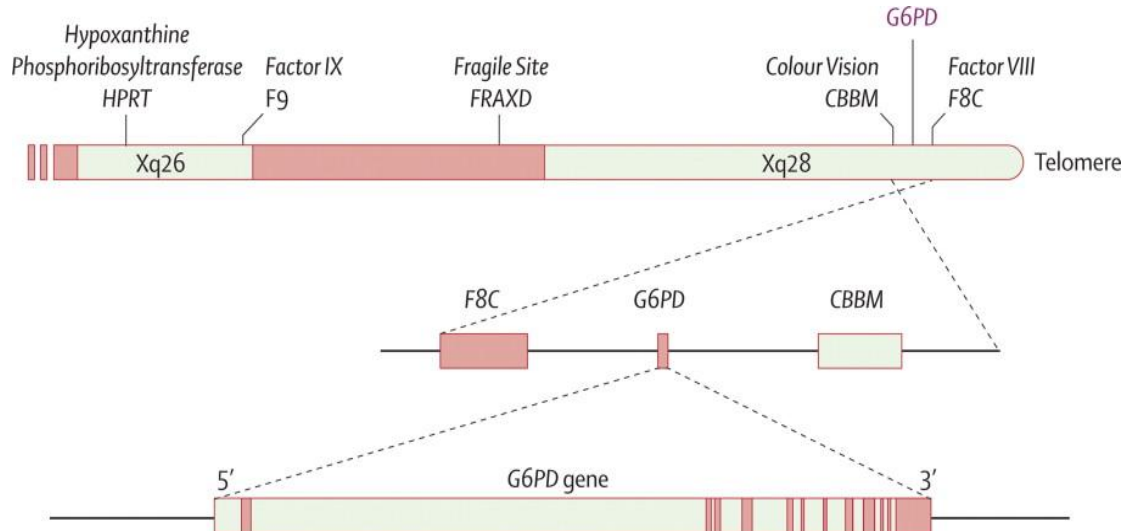
Αν οποιαδήποτε ανεπάρκεια ενζύμου, κατά την μεταβολική αυτή οδό, επηρεάσει τα επίπεδα ATP, NADPH που παράγονται, προκαλούνται μη αντιστρεπτές βλάβες στην μεμβράνη του κυττάρου και κατά επέκταση στο σχήμα του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του κυττάρου από την κυκλοφορία του οργανισμού. Μεταβολικές δραστηριότητες στο ερυθρό αιμοσφαίριο πραγματοποιούνται στο PPP (phosphate pentose pathway), στον κύκλο της γλουταθειόνης (GSH), στον μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων και την αναγωγή της μεθαιμοσφαιρίνης. Σε όλες τις παραπάνω μεταβολικές δραστηριότητες υπάρχουν ένζυμα που είναι υπεύθυνα εκτέλεσης κομβικών λειτουργιών για το αποτέλεσμα της μεταβολικής οδού. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις έχει καταγραφεί κάποια ανεπάρκεια ενζύμου, με την πιο κοινή να είναι η ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD. [33], [34], [37], [38]

Το κατά πόσο μια ενζυμοπάθεια επηρεάζει τον οργανισμό και τις λειτουργίες του εξαρτάται από ένα σύνολο παραγόντων. Την σημαντικότητα του ενζύμου που έχει υποστεί την βλάβη, στην συγκεκριμένη περίπτωση το ένζυμο G-6-PD είναι υψίστης σημασίας για το ερυθρό αιμοσφαίριο, τον βαθμό-ποσοστό έκφρασής του, τη σταθερότητα του μεταλλαγμένου αυτού ενζύμου ως προς την πρωτεολυτική αποικοδόμηση και την λειτουργικότητά του στις μεταβολικές οδούς που συμμετέχει, την ικανότητα να αντισταθμίσει την υπολειτουργία του με υπερέκφραση ενός άλλου ισοενζύμου, ή ακόμα και την χρήση μιας διαφορετικής μεταβολικής οδού που θα αποφέρει ίδιο ή τουλάχιστον παρόμοιο προϊόν. Στην προκειμένη περίπτωση δεν υπάρχει κάποιο άλλο ένζυμο που να μπορεί να αντικαταστήσει τις λειτουργίες του G-6PD ενζύμου και αυτό το καθιστά υψίστης σημασίας για το κύτταρο. [35], [36], [37], [39]

A9. Γονίδιο G-6-PD

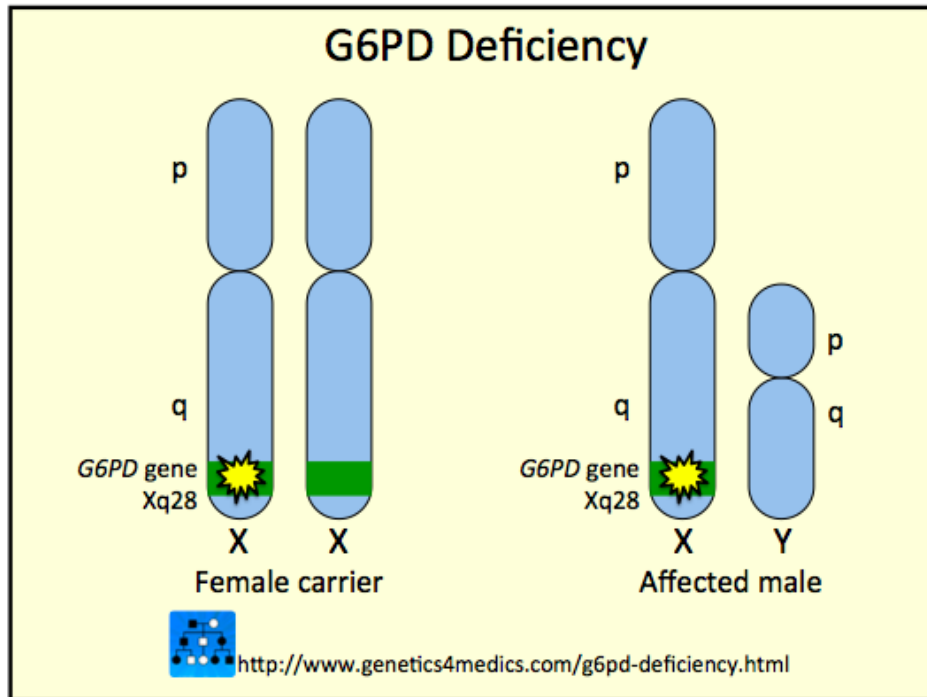
Το γονίδιο που κωδικοποιεί την παραγωγή του ενζύμου G-6-PD, όπως αναφέρθηκε και ανώτερα, βρίσκεται στο χρωμόσωμα X και αποτελείται από ένα σύμπλεγμα γονιδίων στο άνω μακρό άκρο του χρωμοσώματος στην περιοχή q28. Τα γονίδια που οφείλεται η έγχρωμη όραση (Filosa et al. 1993),

η αιμορροφιλία Α (Boyer and Graham 1965) και το σύνδρομο του ευθραύστου χρωμοσώματος X ή όπως είναι γνωστό σύνδρομο Martin Bell (Oberje et al. 1987) είναι επίσης στην ίδια περιοχή. [1], [2], [24]



Εικόνα 9. Το γονίδιο που εκφράζει το ένζυμο G-6-PD. (Ανατύπωση από: <http://www.download.thelancet.com/cms/attachment/2000991326/2003656842/gr3.jpg>)

Το γονίδιο του ενζύμου G-6-PD περιέχει 13 εξώνια και 12 εσώνια, όπου το μέγεθός τους ποικίλει από 12 bp έως και 236 bp και κωδικοποιεί ένα μονομερές που αποτελείται από 515 αμινοξέα (Martini et al. 1986). Η λειτουργική μορφή του ενζύμου που κωδικοποιείται, αποτελείται από μονομερή (homo-dimers) και τετραμερή. Η ακολουθία ολόκληρου του γονιδίου είναι γνωστή (Chen et al. 1991) και έχουν αναφερθεί περισσότερες από 450 παραλλαγές στο συγκεκριμένο γονίδιο G-6-PD οι οποίες έχουν διαφοροποιηθεί και κατηγοριοποιηθεί ανάλογα την κινητικότητα του ενζύμου που παρουσιάζουν, την φυσικό-χημική τους ιδιότητα και χαρακτηριστικά, καθώς και άλλες παραμέτρους (Luzzatto and Battistuzzi 1985; Chen et al. 1991). Σχεδόν 300 από αυτές τις παραλλαγές έχουν αναγνωριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization- WHO). [1], [4], [11], [24], [25], [28], [31]



Εικόνα 10. Το μεταλλαγμένο γονίδιο που εκφράζει το ένζυμο G-6-PD.

(Ανατύπωση από:

http://genetics4medics.com/uploads/3/0/8/0/3080157/952650_orig.png)

Στην ακολουθία του DNA του γονιδίου έχουν ανακαλυφθεί και αναγνωρισθεί 140 μεταλλάξεις (Beutler and Vulliamy 2002). Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις αποτελούν μικρές διαγραφές τμημάτων της αλυσίδας αμινοξέων που κωδικοποιούνται στο γονίδιο, και κάποια συγκεκριμένα αμινοξέα που αλλάζουν (point mutation). Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν αντίκτυπο στην δομή του ενζύμου και κατά συνέπεια την λειτουργικότητά του. Μεγαλύτερες διαγραφές τμημάτων, σαν μετάλλαξη, που θα είχε σαν αποτέλεσμα την ολική έλλειψη του ενζύμου δεν έχουν καταγραφεί, και αυτό αποδεικνύει ότι η ολική έλλειψη του ενζύμου είναι θανατηφόρα. Για αυτό το λόγο οι περισσότερες αναφορές κάνουν λόγο για χαμηλή-ολική έλλειψη λειτουργικότητας (ανεπάρκεια) και όχι ολικής έλλειψης ενζύμου. [1], [2], [14], [24], [25], [31]

A10. Τύποι της νόσου

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχει ταξινομήσει την συγκεκριμένη νόσο με τους παρακάτω τύπους. ^{[5]. [24]}

Ένα φυσιολογικό ένζυμο έχει δυο τύπους, GdA+ GdB+, όπου σταδιακά χάνεται η ενζυμική τους δραστηριότητα στο 50% μετά από 60 ημέρες ζωής του ερυθρού αιμοσφαιρίου. Αυτή η σταδιακή μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου δεν έχει επιπτώσεις για το κύτταρο αφού τα επίπεδα της αναθείσας γλουταθειόνης παραμένουν σε ικανοποιητικά επίπεδα και προστατεύεται το κύτταρο από κάθε μορφή οξειδωτικού παράγοντα. ^{[1]. [7]}

Οι παρακάτω τύποι αφορούν σε παθολογικές καταστάσεις του ενζύμου, όπου η δραστηριότητα και η σταθερότητά του μειώνεται ταχύτατα.

- Τύπος I, μιας σπάνιας μορφής ανεπάρκεια όπου η λειτουργικότητα των ενζύμων στον οργανισμό είναι περίπου 1-3 %.
- Τύπος II, μια σοβαρή ανεπάρκεια της λειτουργικότητας του ενζύμων <10% όπου η αιμόλυση εμφανίζεται κατά διαστήματα στην ζωή του ασθενούς. Περιλαμβάνει την Μεσογειακή μορφή GdM (Mediterranean variant) της G-6-PD όπου ο συγκεκριμένος τύπος στην ηλεκτροφόρηση έχει ίδια κινητικότητα με τον τύπο GdB.
- Τύπος III, μια μέτρια ενζυμική ανεπάρκεια της λειτουργικότητας των ενζύμων 10-60% όπου και σε αυτό τον τύπο οι αιμολύσεις εμφανίζονται κατά την διάρκεια της ζωής του ατόμου, αλλά σε ήπιο βαθμό και συνήθως μετά από κάποια λοίμωξη ή χορήγηση ορισμένων φαρμάκων, συνήθως προιμακίνης. Σε αυτόν τον τύπο ανήκει η GdA-μορφή του ενζύμου η οποία συναντάται στο 12-15% του πληθυσμού των Αμερικανών Αφρικανικής προέλευσης. ^{[8]. [27]}
- Τύπος IV, όπου η λειτουργικότητα των ενζύμων είναι σχεδόν φυσιολογική και δεν εμφανίζεται αιμόλυση κατά την διάρκεια ζωής του ατόμου.
- Τύπος V, όπου η λειτουργικότητα των ενζύμων είναι $\geq 100\%$.

Κατά τους τύπους IV,V δεν συναντούμε συνήθως κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, εκτός από κάποια ακραία έκθεση σε οξειδωτικούς παράγοντες. Στον τελευταίο τύπο της νόσου όπου λέγεται και άγριος τύπος (wild type), πρέπει να εξετάζονται όλοι οι ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη καθώς εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα συγκεκριμένα άτομα. ^{[1], [4], [50]}

Η παραλλαγή του τύπου της ανεπάρκειας του G-6-PD καθορίζει και την εμφάνιση της αιμόλυσης. Αν η παραλλαγή αφορά σε κάποιο μέτριο ποσοστό ανεπάρκειας του ενζύμου, η αιμόλυση θα είναι σπάνιο φαινόμενο στην ζωή του ατόμου, οξεία και συνήθως μετά από έκθεση σε κάποιον λοιμογόνο παράγοντα, φάρμακα, χημικές ουσίες που προκαλούν οξείδωση. ^[24]

Σε παραλλαγή όπου έχει προκληθεί σοβαρή ανεπάρκεια του ενζύμου, η αιμόλυση είναι φαινόμενο που παρουσιάζεται τακτικά στην ζωή του ατόμου και η έκθεση στους παραπάνω παράγοντες απλά επιβαρύνει την αιμόλυση. ^[24]

Σε τύπους με ήπια ανεπάρκεια της λειτουργικότητας των ενζύμων, η αιμόλυση είναι βραχείας διάρκειας και αντιμετωπίζεται τις περισσότερες φορές από τον ίδιο τον οργανισμό. ^{[24], [26]}

Σε σοβαρές μορφές ανεπάρκειας, όπως κατά τον τύπο της Μεσογειακής ανεπάρκειας GdM, η αιμόλυση που έχει προκληθεί δεν αντιμετωπίζεται από τον οργανισμό παρά μόνο όταν η ουσία-τροφή-μικροοργανισμός που προκάλεσε την αιμόλυση απομακρυνθεί πλήρως από τον οργανισμό. ^[24]

Λόγω της μεγάλης ανάπτυξης και προόδου που έχει γνωρίσει ο τομέας της Γενετικής Ιατρικής, σε θεωρητικό αλλά και εργαστηριακό επίπεδο με τις σύγχρονες μεθόδους που ακολουθούνται την τελευταία δεκαπενταετία, η διερεύνηση του γονιδίου, που οφείλεται αυτή η ενζυμική έλλειψη, είναι άκρως εφικτή και πολύ χρήσιμη δεδομένου την συχνότητα που εμφανίζεται σε κλινικές επιπλοκές και περιστατικά. ^[29]

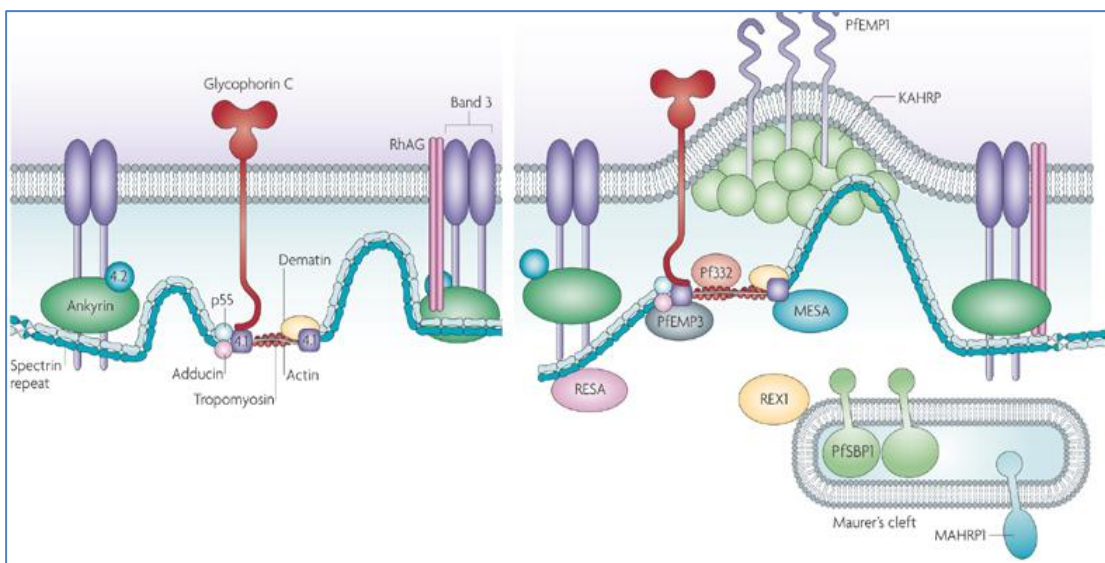
A11. Απομάκρυνση του ερυθρού αιμοσφαιρίου

Το ώριμο ερυθρό αιμοσφαίριο δεν περιέχει πυρήνα, ούτε τα υπόλοιπα οργανίδια που διαθέτουν τα κύτταρα του οργανισμού στους διάφορους ιστούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον συγκεκριμένο χρόνο ζωής του ερυθρού κυττάρου, ο οποίος είναι κατά προσέγγιση 120 μέρες. Χωρίς πυρήνα, συνεπώς χωρίς DNA και RNA, το κύτταρο δεν μπορεί να ανανεωθεί και να ανασυνθέσει πρωτεΐνες και λιπίδια που δεν λειτουργούν μετά από το πέρασμα του χρόνου, ώστε να προστατευτεί και να επιβιώσει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. ^{[11], [53]}

Το ερυθρό αιμοσφαίριο στις περίπου 120 ημέρες που διαρκεί η ζωή του, βρίσκεται αντιμέτωπο με οξειδωτικές καταστάσεις, οι οποίες του προκαλούν συνεχείς βιοχημικές, δομικές και ανοσολογικές αλλαγές. Αυτές οι αλλαγές μετά από ορισμένα σημεία καθιστούν το κύτταρο ανίκανο να εκπληρώσει την κύρια λειτουργία του, που είναι να μεταφέρει οξυγόνο στους ιστούς. Ο οργανισμός αυτόματα με συγκεκριμένους μηχανισμούς που διαθέτει αναγνωρίζει τα κύτταρα που υπολειπόμενα και τα απομακρύνει από την κυκλοφορία με το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα. Το σύστημα περιλαμβάνει τα μονοπύρηννα μακροφάγα, τα οποία βρίσκονται σε όργανα όπως σπλήνα και σε μικρότερο ποσοστό σε ήπαρ και λεμφαδένες. ^{[11], [53], [72]}

Ο σχηματισμός φυσαλίδων (κυστιδίων) στην κυτταρική μεμβράνη του ώριμου ερυθρού, είναι μια διαδικασία που ρυθμίζεται από το ίδιο το ερυθρό και επιταχύνεται προς το τέλος της ζωής του. Με την παραπάνω διαδικασία το κύτταρο αυξάνει την πυκνότητά του, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ικανότητα παραμόρφωσής του και ευελιξίας του. Το ερυθρό αιμοσφαίριο τελικά χάνει το σχήμα του αμφίκοιλου δίσκου που του έδινε την δυνατότητα να μεταφέρει οξυγόνο ακόμα και στα πιο λεπτά τριχοειδή αγγεία του σώματος, με αποτέλεσμα την απομάκρυνσή του από την κυκλοφορία. Το τελικό σχήμα του κυττάρου έχει αποδειχτεί ότι φέρει στην επιφάνειά του, σε υψηλά ποσοστά, φωσφατιδυλοσερίνη (PS), IgG, και αντιγόνα που προκαλούν φαγοκυττάρωση και προέρχονται από την ζώνη 3 της κυτταρικής μεμβράνης-σκελετού και στην ουσία είναι αυτά που ενεργοποιούν την διαδικασία της απομάκρυνσης του

ερυθρού από την κυκλοφορία. Συγκεκριμένα για την PS αναφέρεται ότι λειτουργεί ως προσκόλληση για τα μακροφάγα και τα κύτταρα του ενδοθηλίου και την διευκόλυνσή τους. [52], [53], [70], [71], [72]



Εικόνα 11. Μοντέλο ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, διακρίνεται το μακροσύμπλοκο της ζώνης 3. (Ανατύπωση από: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n5/fig_tab/nrmicro2110_F3.html)

Η ζώνη 3 πρωτεΐνη της μεμβράνης του ερυθρού αιμοσφαιρίου είναι η κύρια διαμεμβρανική πρωτεΐνη του κυττάρου. Οι λειτουργίες για τις οποίες είναι υπεύθυνη, είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο. Είναι υπεύθυνη για την ανταλλαγή ανιόντων-κατιόντων μεταξύ κυττάρου και πλάσματος, είναι σύνδεσμος μεταξύ της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού διατηρώντας το σχήμα του ερυθρού αιμοσφαιρίου και τέλος παρέχει επικοινωνία μεταξύ των πρωτεϊνών του κυτοσολίου και αυτών της μεμβράνης, μέσω των αμινοτελικών προεξοχών του κυτοσολίου. [51], [52], [67], [71]

Στην περιοχή της ζώνης 3 προσδένονται επίσης η αιμοσφαιρίνη του κυττάρου καθώς και τα γλυκολυτικά ένζυμα του. Οι αλλαγές οι οποίες μπορεί να υποστεί η αιμοσφαιρίνη (Hb) κατά την πρόσδεσή της στην ζώνη 3 μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην οξυγόνωση της Hb, άρα και στην διαδικασία της γλυκόλυσης δηλαδή την παραγωγή ATP. Η ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD έχει άμεσο αντίκτυπο στην αιμοσφαιρίνη και κατά συνέπεια και στην κυτταρική μεμβράνη από την στιγμή που είναι συνδεδεμένες. [51], [52], [67], [71], [78]

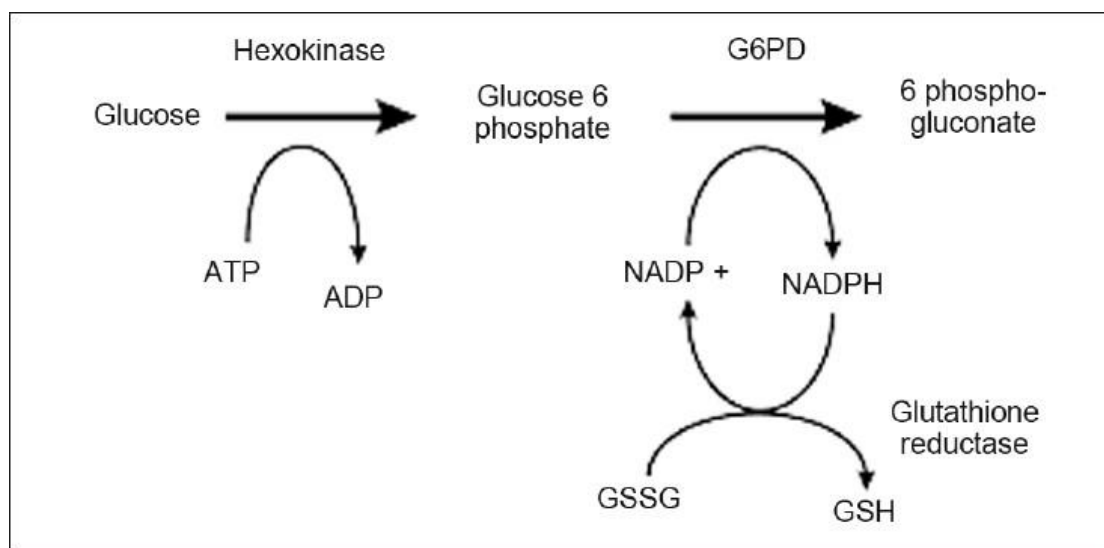
A12. Μεταβολισμός ερυθρού

Έρευνες έχουν αναφέρει ότι το ερυθρό αιμοσφαίριο ίσως μετατράπηκε σε κύτταρο χαμηλού ενεργειακού τύπου λόγω των παρασίτων. Τα παράσιτα θεωρούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια ιδανικό ξενιστή, γιατί αν εισέλθουν σε αυτά δεν αντιμετωπίζονται τις περισσότερες περιπτώσεις από ανοσολογικό σύστημα του ξενιστή και φυσικά λόγω της θερμοκρασίας του σώματος του ανθρώπου. Έτσι λοιπόν σύμφωνα με αυτές τις αναφορές, κατά την εξέλιξη των ειδών τα ερυθρά αιμοσφαίρια μείωσαν το ενεργειακό τους φορτίο για να αντιμετωπίσουν τις παρασιτώσεις. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι μόνο τα θηλαστικά, με θερμοκρασία σώματος παρόμοια με την δικιά μας, που είναι ιδανική για τα παράσιτα, έχουν αναπτύξει αυτού του χαμηλού επιπέδου-τύπου παραγωγής ενέργειας κυττάρων για να μην ευνοούν τις παρασιτώσεις. Τα αμφίβια και τα ψάρια και γενικά οι οργανισμοί με θερμοκρασία σώματος χαμηλότερη από αυτή που προτιμούν τα παράσιτα, έχουν υψηλότερα επίπεδα ATP από αυτά των θηλαστικών στα ερυθρά τους αιμοσφαίρια. Αυτός είναι ο λόγος που οι μεταβολικές οδοί που έχει αναπτύξει ο άνθρωπος δεν χρησιμοποιούνται πουθενά αλλού στην φύση. Για να προστατευτεί από τις παρασιτώσεις έπρεπε να δημιουργήσει κύτταρα με μη ευνοϊκές συνθήκες για αυτά και η μείωση παραγωγής ενέργειας από τα ερυθρά αιμοσφαίρια ήταν η λύση με την απομάκρυνση των οργανιδίων και κυρίως των μιτοχονδρίων. ^[18]
[32]

Η κύρια πηγή ενέργειας για τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι ο μεταβολισμός της γλυκόζης. Το ερυθρό αιμοσφαίριο όπως είναι γνωστό δεν περιέχει μιτοχόνδρια, που σημαίνει ότι δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σε αυτό η οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παραγωγή ενέργειας. Δεν έχει κυτταρικά οργανίδια και δεν μπορεί να εκτελέσει και τον κύκλο του Krebs. Δεν μπορεί να συνθέσει λιπίδια και πρωτεΐνες για τις λειτουργίες που θέλει να εκτελέσει και την επιβίωσή του. Ο μόνος τρόπος παραγωγής ATP, δηλαδή ο μόνος τρόπος παραγωγής ενέργειας για το ερυθρό κύτταρο, είναι ο μεταβολισμός της γλυκόζης. Οι μεταβολικές οδοί που χρησιμοποιεί το ερυθρό αιμοσφαίριο είναι τρεις και συνδέονται μεταξύ τους. Το μεγαλύτερο ποσοστό

της γλυκόζης (90-95%) καταβολίζεται από την αναερόβια οδό Embden-Meyerhof. ^{[11], [66]}

Το ATP είναι το κύριο προϊόν της γλυκόλυσης και η οδός Embden-Meyerhof η μοναδική πηγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Το ποσοτικό επίπεδο ATP στα ερυθρά αιμοσφαίρια, σε σχέση με άλλα κύτταρα των ιστών, είναι το χαμηλότερο. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη των μιτοχονδρίων όπως αναφέρθηκε ανώτερα, καθώς η οξειδωτική φωσφολυρίωση είναι η κύρια μορφή μαζικής παραγωγής ATP για τον ανθρώπινο οργανισμό και δεν πραγματοποιείται στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Για κάθε μόριο γλυκόζης που μεταβολίζεται παράγονται δυο μόρια ATP που στη συνέχεια μετασχηματίζονται σε ADP. Κατά την διάρκεια όμως της μεταβολικής διεργασίας και μέχρι το τελικό προϊόν, που είναι το γαλακτικό οξύ, αναπαράγονται τέσσερα μόρια ATP, που σημαίνει κέρδος 2 μορίων ATP. ^{[11], [19], [66]}



Εικόνα 12. Παραγωγή ATP από γλυκόζη εντός των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

(Ανατύπωση από:

http://www.annals.in/viewimage.asp?img=AnnCardAnaesth_2012_15_1_50_91483_u3.jpg)

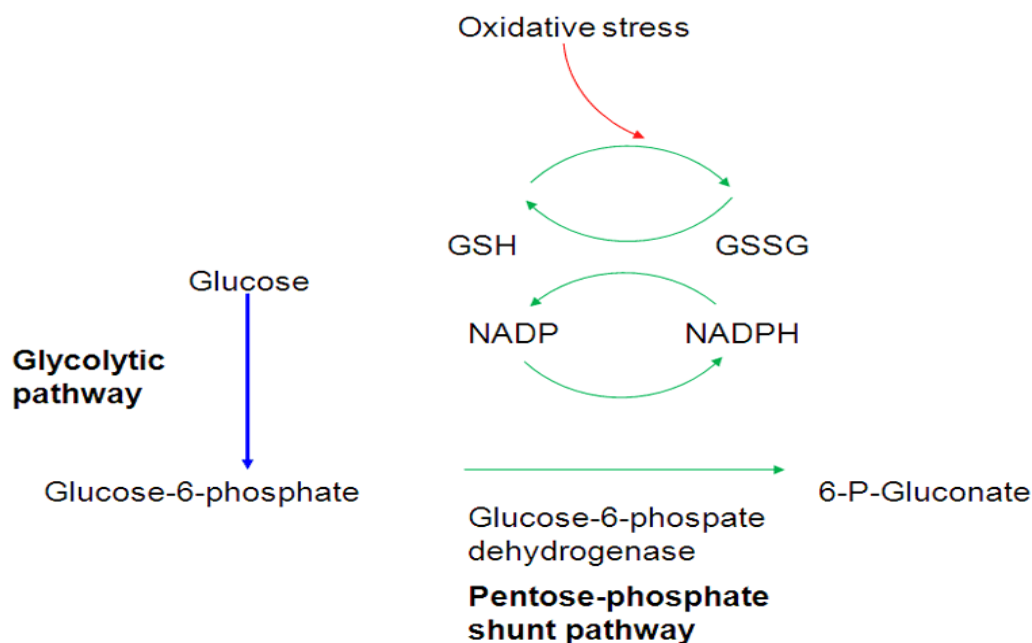
Άλλο σημαντικό προϊόν της οδού Embden-Meyerhof είναι το αναχθέν νικοτινο-αδενο-δινουκλεοτιδίο (NADPH), που δρα ως αναγωγάση της αιμοσφαιρίνης, διατηρώντας τον σίδηρο στην λειτουργική του μορφή, δηλαδή Fe^{2+} . Αν τυχόν το NADPH οξειδωθεί κατά την αναγωγή της μεθαιμοσφαιρίνης

τότε το τελικό προϊόν της οδού αντί για γαλακτικό οξύ θα είναι πυροσταφυλικό οξύ. [4], [57]

Μια άλλη οδός που επικοινωνεί με την οδό Embden-Meyerhof είναι η οδός Rapaport-Luebering. Από την συγκεκριμένη οδό παράγεται το 2,3 BGP το οποίο έχει επιπτώσεις στην συγγένεια του οξυγόνου με την αιμοσφαιρίνη.

Κατά την αναερόβια οδό Embden-Meyerhof ένα από τα προϊόντα που σχηματίζεται είναι η 6-φοσφορική γλυκόζη, η χρήση της οποίας είναι να λειτουργεί ως υπόστρωμα για την δράση του ενζύμου G-6-PD, το οποίο ένζυμο είναι κομβικής σημασίας για την οδό των πεντοζών (PPP – Pentose-Phosphate-Pathway) ή αλλιώς μονοφοσφορικής εξόζης. [58], [67], [73]

Η συγκεκριμένη οδός PPP είναι αερόβια και στόχος της είναι η αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH σε GSSG), που είναι η κυριότερη αντιοξειδωτική ουσία για το ερυθρό αιμοσφαίριο. Η συγκεκριμένη οδός είναι πολύ σημαντική για το κύτταρο καθώς το προστατεύει από οξειδωτικούς παράγοντες. [56], [73], [96]



Εικόνα 13. Η οδός των πεντοζών (PPP – Pentose-Phosphate-Pathway) ή αλλιώς μονοφοσφορικής εξόζης. (Ανατύπωση από: <http://bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/704/basics/pathophysiology.html>)

A13. Αναερόβια οδός embden-meyerhof

Η διαφορά μεταξύ της αερόβιας και αναερόβιας οδού αφορά την περεταίρω χρήση του πυροσταφυλικού οξέος. Στην αναερόβια οδό, δηλαδή στην οδό που ακολουθεί το ερυθρό αιμοσφαίριο κατά βάση, το πυροσταφυλικό οξύ διαβιβάζεται στους μύες και ανάγεται με την βοήθεια της γαλακτικής αφυδρογονάσης σε γαλακτικό, με κέρδος 2 μόρια ATP ανά μόριο γλυκόζης. ^[66]

Στην αερόβια οδό το πυροσταφυλικό οξύ οδηγείται στα μιτοχόνδρια όπου εκεί μετατρέπεται σε Α-ακέτυλο-συνένζυμο και τροφοδοτεί το κύκλο του Krebs. ^[66]

Βασική λειτουργία της οδού είναι η μετατροπή της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ. Και οι δύο ουσίες έχουν την δυνατότητα να εισέρχονται και να εξέρχονται από το κύτταρο και το σημαντικότερο είναι ότι δεν απαιτείται καθόλου ενέργεια για αυτή τη διακίνηση.

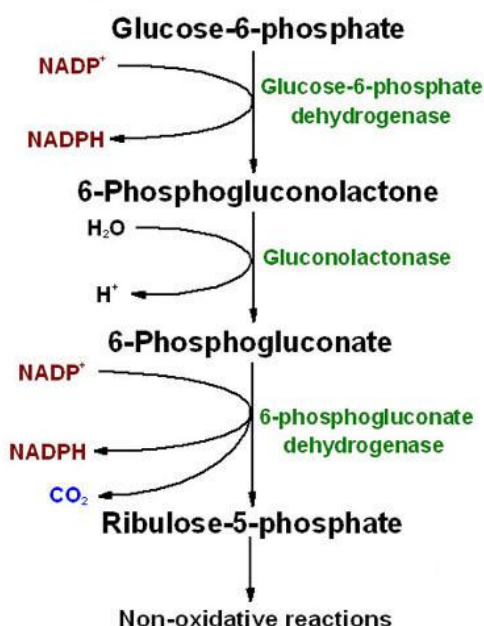
Στα αρχικό στάδιο της οδού Hembden-Meyerhof σχηματίζεται γλυκοζο-6-φωσφορικό οξύ ενώ στο δεύτερο στάδιο σχηματίζονται 2 μόρια G-3-P (γλυκεραλδέυδο-3-φωσφορικό οξύ) από 1,3 διφώσφορο-γλυκερινικό οξύ παρουσία του ενζύμου γλυκεραλδέυδο-3-φωσφορική αφυδρογονάση. Για να λειτουργήσει σωστά το τελευταίο ένζυμο απαιτείται η παρουσία του NADP συνενζύμου, το οποίο ανάγεται σε NADPH και ανακυκλώνεται συνεχώς. Η συγκεκριμένη οδός για το σχηματισμό του 6-φωσφογλυκονικού οξέος χρησιμοποιεί ξανά γλυκοζο-6-φωσφορικό οξύ με την παρουσία του ενζύμου γλυκοζο-6-φωσφορικής αφυδρογονάσης (G-6-PD). Για να λειτουργήσει το ένζυμο G-6-PD χρειάζεται την παρουσία του συνενζύμου NADP, το οποίο στη συνέχεια θα αναχθεί σε NADPH. ^{[57], [73]}

Τα παραπάνω συνένζυμα, NADP και NADPH, υπάρχουν σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις εντός των ερυθρών αιμοσφαιρίων και έχουν την λειτουργία του αναγωγικού συστήματος για το κύτταρο. Παρά την σχετικά χαμηλή συγκέντρωσή τους μέσα στο κύτταρο, η χρησιμότητά τους είναι τεράστια, για τον συγκεκριμένο λόγο τα δυο αυτά συνένζυμα ανακυκλώνονται

συνεχώς από το κύτταρο για να παραμένει η συγκέντρωσή τους σταθερή. Για την παραπάνω ανακύκλωση των δύο ενζύμων είναι υπεύθυνη η ρεδοκτάση του γλουταθείου. Το συγκεκριμένο ένζυμο, χρησιμοποιεί το H^+ του NADPH μετατρέποντας το γλουτάθειο που οξειδώθηκε σε αναχθείσα μορφή. Με την παραπάνω διαδικασία παραμένει σταθερή η σχέση οξειδωθείσας και αναχθείσας μορφής του γλουταθείου. [54], [55], [57]

Υπό την επίδραση έντονων οξειδωτικών παραγόντων, η συγκεκριμένη αυτή οδός αυξάνει την δραστηριότητά της χρησιμοποιώντας >50% της διαθέσιμης γλυκόζης. Η NADP είναι υπεύθυνη για την συγκεκριμένη διέγερση ενώ η NADPH είναι υπεύθυνη για την αναστολή της. Έτσι σε περίπτωση που το ερυθρό αιμοσφαίριο απειλείται από κάποιο οξειδωτικό παράγοντα, τα επίπεδα της NADP αυξάνονται για να προστατευτεί το ερυθρό κύτταρο. [4], [57], [58]

Oxidative Stage of Pentose Phosphate Pathway



Εικότων 14. Προστασία του ερυθρού αιμοσφαιρίου από το οξειδωτικό στρες (NADP – NADPH). (Ανατύπωση από: http://dxline.info/img/new_ail/glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficiency_3.jpg)

Τα κύτταρα των υπολοίπων ιστών του σώματος διαθέτουν εναλλακτικούς τρόπους παραγωγής NADPH. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια όμως δεν διαθέτουν αυτούς τους εναλλακτικούς τρόπους παραγωγής της NADPH.

Για τον συγκεκριμένο λόγω οι άνθρωποι που πάσχουν από ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD είναι επικίνδυνα ευάλωτοι σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες και ιδιαίτερα όταν εκδηλώνεται αιμολυτική αναιμία. [57], [73]

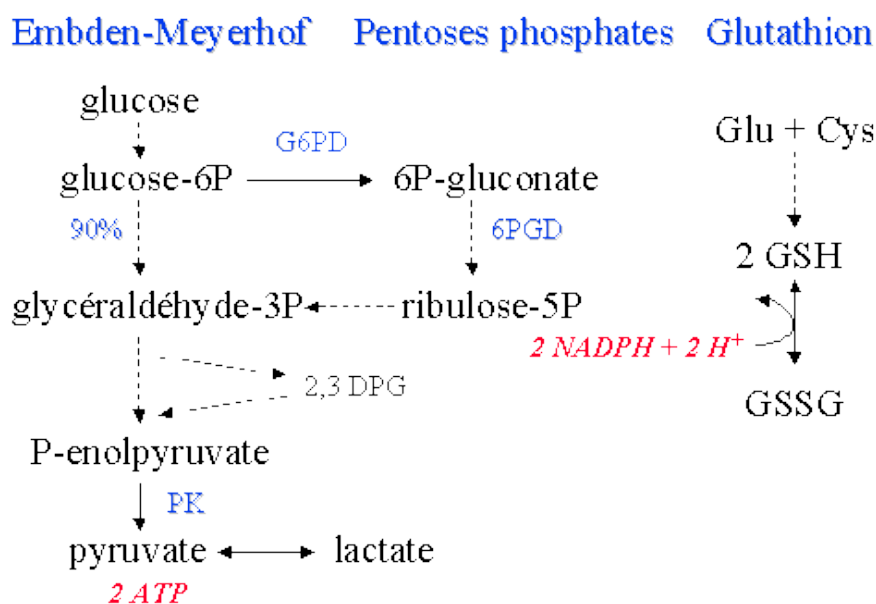
Με την μεταβολική αυτή οδό εξασφαλίζεται το 90-95% των ενεργειακών αναγκών του ερυθρού αιμοσφαιρίου. Στο ενδιάμεσο της γλυκολυτικής αυτής οδού παρεμβαίνουν δυο άλλες μεταβολικές οδοί (παρακάμψεις) η οδός των εξοζών και η οδός Raparport-Luebering.

A14. Οδός των εξοζών - φωσφορικής πεντόζης (PPP) - μονοσφωρικής εξόζης

Η οδός της μονοσφωρικής εξόζης μεταβολίζει το 5-10% της γλυκόζης και κύριος στόχος της είναι η προστασία του κυττάρου από οξειδωτικούς παράγοντες. Από την συγκεκριμένη οδό παράγεται το NADPH, το οποίο είναι συμπαράγοντας για τον μεταβολισμό του γλουτάθειου (GSH). Τα ερυθρά αιμοσφαίρια περιέχουν μεγάλη συγκέντρωση αναγωγικού GSH (GSSG), το οποίο προστατεύει το κύτταρο από το οξειδωτικό στρες. Πολλά φάρμακα και μικροοργανισμοί παράγουν οξειδωτικά όπως η O_2^- και H_2O_2 τα οποία είναι ικανά να καταστρέψουν το ερυθρό κύτταρο. Το GSSG σε συνδυασμό με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης το διατηρούν συνεχώς σε αναχθείσα μορφή, μειώνουν τα επίπεδα αυτών των οξειδωτικών ανιόντων με ταχείς ρυθμούς και προστατεύουν την κυτταρική μεμβράνη. [55], [57], [59], [62]

Σκοπός της συγκεκριμένης οδού είναι η προστασία του ερυθρού αιμοσφαιρίου από τους οξειδωτικούς παράγοντες. Η προστασία του κυττάρου επιτυγχάνεται με την γλουταθειόνη (GSH) η οποία μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η οξείδωση της αιμοσφαιρίνης (Fe^{2+}) σε μεθαιμοσφαιρίνη (Fe^{3+}). Το αποτέλεσμα της παραπάνω δράσης είναι η οξείδωση της GSH σε GSSG (οξειδωμένη-αναχθείσα γλουταθειόνη) και δημιουργείται η ανάγκη για συνεχή αναγωγή της. Τον ρόλο της συνεχής αναγωγής της GSH έχει αναλάβει το ένζυμο αναγωγάση της γλουταθειόνης (glutathione reductase) παρουσία του συνενζύμου NADPH, αναχθείσα μορφή

του NADP (nicotinamide adenine dinucleotid phosphate). Η συνεχής αναγωγή του NADP προϋποθέτει την παρουσία του ενζύμου G-6-PD. Επομένως η GSSG (άμεσα), η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) και το ένζυμο G-6-PD (έμμεσα) είναι ρυθμιστικοί παράγοντες, που προστατεύουν την αιμοσφαιρίνη και τις πρωτεΐνες της μεμβράνης από οξειδωτικούς παράγοντες και κατά συνέπεια προστατεύουν το ερυθρό κύτταρο. [55], [57], [59], [61]



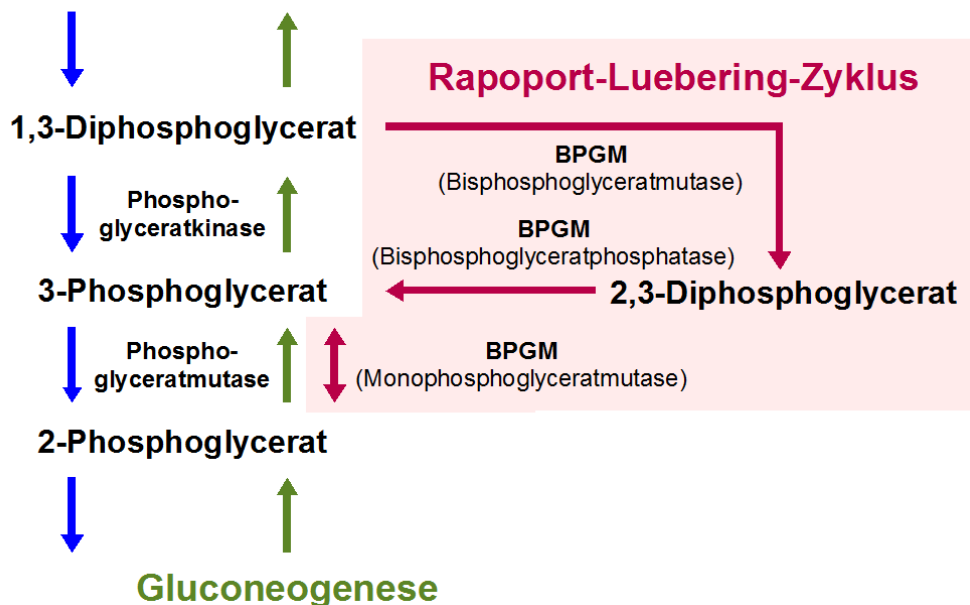
Εικόνα 15. Οδός Embden-Meyerhof. (Ανατύπωση από: http://erasmeinfo.ulb.ac.be/globule/images/cycle_enz.gif)

Μεγάλος αριθμός ενζύμων συμμετέχουν στο μονοπάτι μεταβολισμού της γλυκόζης η οποία χωρίζεται σε δυο φάσεις, μια οξειδωτική και μια μη οξειδωτική. Στην οξειδωτική φάση η 6-φωσφορική γλυκόζη οξειδώνεται σε 5-φωσφορική ριβουλόζη, CO₂ και NADPH. Η 5-φωσφορική ριβουλόζη, η οποία είναι μια πεντόζη, μετατρέπεται σε 5-φωσφορική ριβόζη και χρησιμοποιείται για την βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων, το CO₂ αποβάλλεται ενώ το NADPH χρησιμοποιείται από το κύτταρο για την προστασία του από τους οξειδωτικούς παράγοντες. [62]

A15. Οδός Rapoport-luebering

Κατά αυτή την οδό παράγεται το 2,3 DPG το οποίο είναι υπεύθυνο για κάποιες από τις λειτουργίες της αιμοσφαιρίνης. Όποια από την ποσότητα του 2,3 DPG δεν χρησιμοποιείται από το κύτταρο μετατρέπεται σε 3-PG (3-φοσφωρογλυκερινικό οξύ) ^[96]

Glykolyse



Εικόνα 16. Οδός Rapoport-luebering. (Ανατύπωση από:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/91/Schema_Rapoport-Luebering-Zyklus.png)

A16. Οξειδωτικό στρες στα ερυθρά αιμοσφαίρια

Το ερυθρό αιμοσφαίριο έχει στην διάθεσή του αρκετούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες όπως το ένζυμο υπερεδοξείνη (peroxidoxin), τη δεσμουτάση του υπεροξειδίου (superoxide dismutase), καταλάση, γλουταθειόνη (GSH), αναγωγάση της μεθαιμοσφαιρίνης και τη βιταμίνη E. Το NADPH λειτουργεί ως η κύρια πηγή αναγωγικών ισοδύναμων και το ένζυμο G-6-PD δρα στην γλυκοζο-6-φωσφατάση για να παραχθεί NADPH και η 6-

φωσφογλυκονολακτόνη που στην συνέχεια μετατρέπεται σε 6-φωσφογλυκονικό (6-PG). [53], [59], [60]

Στα ερυθρά αιμοσφαίρια το ένζυμο G-6-PD είναι απαραίτητο για την παραγωγή του NADPH, που χρησιμοποιείται από την αναγωγή της γλουταθειόνης για να διατηρεί το GSH σε λειτουργική μορφή για το κύτταρο. Το NADPH επίσης διατηρεί την καταλάση σε ενεργή κατάσταση επιτρέποντας την αντίδραση που μετατρέπει το H_2O_2 σε $H_2O + O_2$. Άλλη μια λειτουργία του NADPH είναι μετατροπή της μεθαιμοσφαιρίνης σε αιμοσφαιρίνη δηλαδή τον Fe^{3+} σε Fe^{2+} όπου είναι και η λειτουργική του μορφή, επιτρέποντας έτσι την μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς. Η σημαντικότητα λοιπόν του G-6-PD ενζύμου είναι δεδομένη για το ερυθρό αιμοσφαίριο και την προστασία του από τους οξειδωτικούς παράγοντες από την στιγμή που ανάγει το NADP σε NADPH και πραγματοποιούνται όλες οι παραπάνω μεταβολικές διεργασίες. [4], [54], [59], [60], [64]

Ο στόχος του ερυθρού αιμοσφαιρίου είναι η μεταφορά O_2 και αποβολή του CO_2 μέσω της πρόσδεσής τους με την αιμοσφαιρίνη, που είναι υπεύθυνη για της ανταλλαγή του O_2 με CO_2 από τους πνεύμονες σε όλους τους ιστούς του οργανισμού. Η αιμοσφαιρίνη, που βρίσκεται εντός του ερυθρού, όταν αυτά περνούν από τις κυψελίδες του πνεύμονα δεσμεύουν το οξυγόνο και στην συνέχεια το οδηγούν σε όλους τους ιστούς του οργανισμού. Όταν φτάσουν στον εκάστοτε ιστό, απελευθερώνουν το οξυγόνο και δεσμεύουν το CO_2 , το οποίο με την κυκλοφορία οδηγείται και πάλι στους πνεύμονες για αποβολή στο περιβάλλον με την αναπνοή. Οποιαδήποτε λοιπόν κατάσταση επηρεάσει την λειτουργία της αιμοσφαιρίνης έχει αντίκτυπο στην οξυγόνωση του οργανισμού. Για το λόγω αυτό όλες οι μεταβολικές του διεργασίες έχουν ως στόχο όχι μόνο τη παραγωγή ATP αλλά και την προστασία της αιμοσφαιρίνης από οξειδωτικούς παράγοντες και την μη μετατροπή της σε μεθαιμοσφαιρίνη. [60], [61], [65], [68]

Ο λόγος για τον οποίο τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν υψηλή μεταβολική δραστηριότητα, είναι:

1) Η παραγωγή ενέργειας για την λειτουργία της αντλίας νατρίου-καλίου, καθώς και την διατήρηση της ικανότητας του ερυθρού να αλλάζει συνεχώς το σχήμα του, για να μεταφέρει το O₂ ακόμα και στα πιο λεπτά τριχοειδή αγγεία του σώματός μας. [65], [68]

2) Η παραγωγή αναγωγικού δυναμικού, καθώς η αιμοσφαιρίνη που είναι η βασική πρωτεΐνη στα ερυθρά αιμοσφαίρια, είναι υπεύθυνη για την διατήρηση ισότητας της οσμωτικής πίεσης μεταξύ ερυθρού αιμοσφαιρίου και πλάσματος. Η διατήρηση και προστασία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι υψίστης σημασίας για το κύτταρο, καθώς δεν μπορεί να συνθέσει από μόνο του μια καινούργια σε περίπτωση βλάβης. Κύρια απειλή για την συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι η οξειδωσή της. [65], [68]

3) Η διατήρηση κατάλληλων συνθηκών PH. Η ρύθμιση του PH έχει άμεση σχέση με την ικανότητα δέσμευσης O₂ από την αιμοσφαιρίνη καθώς τελευταίες μελέτες αποδεικνύουν ότι ο μεταβολισμός του ερυθρού αιμοσφαιρίου σχετίζεται άμεσα την καμπύλη αποδόσεως οξυγόνου. [65], [68], [69]

A17. Μετάγγιση-Αποθήκευση ερυθρών αιμοσφαιρίων

Στην εθελοντική αιμοδοσία, ο αιμοδότης δεν ελέγχεται για την επάρκεια της G-6-PD λειτουργίας των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ο εθελοντής αιμοδότης αν γνωρίζει για την ανεπάρκειά του ενημερώνει το προσωπικό, αλλά και πάλι δεν υπάρχει κάποιο πρωτόκολλο για το αν θα πρέπει να απορριφθεί καθώς είναι στην κρίση του επιτελείου της ομάδας αιμοδοσίας. Σε περίπτωση που ο δότης δεν γνωρίζει για την ανεπάρκειά του και γίνει εθελοντής, το αίμα του αποθηκεύεται κανονικά όπως οποιοδήποτε φυσιολογικό. [7], [74], [75], [78]

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια, ακόμα και τα εντελώς φυσιολογικά, υπόκεινται σε αλλοιώσεις κατά την αποθήκευσή τους στον ασκό της αιμοδοσίας. Οι αλλοιώσεις έχουν βιοχημική αλλά και δομική μορφή κατά την διατήρηση του ασκού στο ψυγείο για συντήρηση. Τα επίπεδα του pH μειώνονται, έχουμε εξάντληση των αποθεμάτων ATP και 2,3 φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης, αύξηση του καλίου αλλά και του γαλακτικού οξέος εξωκυτάρια, καθώς

αποβάλλεται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια μέσα στον ασκό, μείωση της ελαστικότητας και δυνατότητας παραμόρφωσης του σχήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αύξηση ευθραυστότητας και τέλος συσσώρευση μικρόκυστιδίων. Τα παραπάνω οδηγούν κατά κύριο λόγο τα κύτταρα σε αιμόλυση μέσα στον ασκό, αλλά και μέσα στον οργανισμό αν δημιουργηθούν οι συγκεκριμένες καταστάσεις. [7], [69], [74], [75], [78]

Κατά την αποθήκευση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο ψυγείο, το κύτταρο λαμβάνει όλη την διαδικασία σαν να υπόκεινται σε οξειδωτικό στρες, όπως αποδεικνύεται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που εμφανίζονται κατά την διάρκεια της αποθήκευσης, όπως και η συσσώρευση οξειδωτικών βιοδεικτών όπου μια από αυτές είναι η μαλονδιαλδεϋδης (MDA) και προϊόντων οξείδωσης της ανθρώπινης λευκωματίνης ορού αλλά και της σπεκτρίνης, της δομικής αυτής πρωτεΐνης της μεμβράνης που οξειδώνεται όπως και οι υπόλοιπες. [53], [54], [74], [75]

Πολλαπλά στοιχεία που εμπλέκουν το οξειδωτικό στρες στην δυσμενή αυτή αποθήκευση των κυττάρων ανάγκασαν του επιστήμονες να θέτουν ως στόχο την βελτίωση της αποθηκευτικής βλάβης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, την επιβίωσή και λειτουργικότητά τους μετά από μια μετάγγιση σε ζωντανό οργανισμό, την επεξεργασία των πρωτεϊνών πριν την εισαγωγή τους στον ασκό για αποθήκευση, την αποθήκευση των ασκών υπό αναερόβιες συνθήκες, την χορήγηση αντιοξειδωτικών σε δότες πριν την χορήγηση του αίματος και τέλος την αποθήκευση του αίματος παρουσία αντιοξειδωτικών. [74], [76], [77]

Αρκετές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για το αν μειώνεται η αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Όπως είναι γνωστό η λειτουργικότητα του G-6-PD ενζύμου μειώνεται όσο το ερυθρό αιμοσφαίριο ωριμάζει, αλλά δεν συμβαίνει το ίδιο και κατά την αποθήκευσή του στο ψυγείο. Η λειτουργικότητα του παραμένει σχεδόν σταθερή με περιστατικά να καταγράφουν μείωση της μέχρι 35%. Σε φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια μπορεί αυτή η μείωση να μην είναι

σημαντική αλλά σε ασκό που αποτελείται από κύτταρα με ανεπάρκεια G-6-PD ίσως αποτελεί σημαντικό πρόβλημα μια τέτοιας τάξεως μείωση. [74], [75], [76]

Όσο αναφορά τα υπόλοιπα στοιχεία του αντιοξειδωτικού συστήματος του κυτάρου, το γλουτάθειο (GSH) μειώνεται όπως επίσης και η διέγερση του PPP δηλαδή της παραγωγής ATP για το κύτταρο. Τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι υπάρχουν μεταβολές κατά την αποθήκευση στο αντιοξειδωτικό σύστημα του κυτάρου και σε περίπτωση που το περιεχόμενο του ασκού έρθει αντιμέτωπο με κάποιον οξειδωτικό παράγοντα υπάρχουν μη αναστρέψιμες βλάβες για το κύτταρο. [74], [76], [78]



Εικόνα 17. Ερυθρά αιμοσφαίρια και τα στάδια γήρανσής τους κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ασκό αιμοδοσίας (Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο). (Ανατύπωση από: http://si.wsj.net/public/resources/images/PJAS600_HEARTB_D_20091130200139.jpg)

Αν δεν γίνουν με τον κατάλληλο και ασφαλή τρόπο οι αιμοληψίες και υπάρχει κάποια επιμόλυνση από κάποιο μικροοργανισμό τότε το δείγμα κατά την αποθήκευση θα υποστεί σημαντικές αλλοιώσεις. Δεν έχει σημασία αν ο ασκός περιέχει υγιή ερυθρά αιμοσφαίρια είτε ερυθρά με έλλειψη του ενζύμου G-6-PD, καθώς θα πρέπει να απορριφθεί. [79], [82]

Η προσωπική ζωή του δότη έχει άμεσο αντίκτυπο στην ποιοτική κατάσταση του δείγματος. Τα δείγματα που προέρχονται από δότες με μια φυσιολογική ζωή, δηλαδή δεν είναι καπνιστές, απέχουν από το αλκοόλ, τρέφονται υγιεινά και γυμνάζονται βρίσκονται σε καλύτερη κατάσταση από τα υπόλοιπα. Κατά την αποθήκευση των ερυθρών αιμοσφαιρίων τα δείγματα που προέρχονται από τους παραπάνω δότες υπόκεινται και αυτά σε αλλοιώσεις, αλλά όχι σε τέτοιο βαθμό όσο τα υπόλοιπα από δότες με μη υγιεινή ζωή. Το ίδιο ακριβώς ισχύει και με τα δείγματα των δοτών με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD. [76], [81], [82], [84]

Στον κλάδο της αιμοδοσίας υπάρχουν πολλά ερωτήματα σχετικά με δότες που πάσχουν από ανεπάρκεια του G-6-PD ενζύμου και αν είναι αποδεκτό να χρησιμοποιείται το αίμα τους για μεταγγίσεις. Σε κάποιες χώρες όπως στη Μαλαισία, στο Χονγκ Κονγκ, στις Φιλιππίνες και στην Ταϊβάν πραγματοποιούν ελέγχους στους ασκούς της αιμοδοσίας πριν γίνουν οι μεταγγίσεις σε νεογνά για την ενζυμική αυτή ανεπάρκεια. Οι συγκεκριμένες χώρες ακολουθούν τις οδηγίες του WHO για τις μεταγγίσεις, ο οποίος αναφέρει ότι σε χώρες με υψηλά ποσοστά ενζυμικών ανεπαρειών πρέπει να πραγματοποιούνται έλεγχοι στους ασκούς πριν χορηγηθούν για μετάγγιση και ειδικότερα σε νεογνά. Οι συγκεκριμένες οδηγίες αναφέρουν ότι για να θεωρηθεί ένας ασκός αίματος αποδεκτός, πρέπει να ελεγχθεί ότι σε ασκούς με ανεπάρκεια G-6-PD ενζύμου ή οποιαδήποτε άλλη κληρονομική πάθηση της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, δεν έχει εμφανιστεί κανένα ίχνος αιμόλυσης. Στις παραπάνω χώρες οι συγκεκριμένοι ασκοί απορρίπτονται για μεταγγίσεις σε νεογνά, ενδομήτριες μεταγγίσεις και δεν χορηγούνται σε άλλους ασθενείς με ανεπάρκεια του G-6-PD ενζύμου. Υπάρχουν εικασίες ότι οι ασκοί που περιέχουν αίμα από δότη με ανεπάρκεια του G-6-PD ενζύμου, όταν χορηγηθούν στους δέκτες και ιδιαίτερα σε νεογνά θα υποστούν αιμόλυση. Με την συγκεκριμένη έρευνα που πραγματοποιήσαμε, προσπαθήσαμε να μελετήσουμε τις αλλοιώσεις που υπόκεινται τα ερυθρά αιμοσφαίρια από δότες που πάσχουν από G-6-PD ανεπάρκεια μέσα στον ασκό. [81], [82], [83], [84], [85]

B1. Σχεδιασμός μελέτης

Για την διεκπεραίωση της ερευνητικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν επτά (7) σε αριθμό δείγματα από αιμοδότες με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD, καθώς και ένας (1) μάρτυρας.

Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε στο ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΝΙΚΑΙΑΣ-ΠΕΙΡΑΙΑ «"ΑΓΙΟΣ ΠΑΝΤΕΛΕΗΜΩΝ"» και ακολουθήθηκαν όλες οι απαιτούμενες ενέργειες για καλύτερη δυνατή λήψη των δειγμάτων τόσο από τους δότες όσο και από το ιατρικό προσωπικό. Αξίζει να αναφερθεί ότι δεν παρουσιάστηκε κάποιο πρόβλημα κατά την διάρκεια όλων των σταδίων της λήψης των δειγμάτων.

Στους δότες πριν την αιμοδοσία δόθηκαν εκτός από ερωτηματολόγιο/ιστορικό της αιμοδοσίας, έγγραφο συγκατάθεσης συμμετοχής στην έρευνα και ένα ερωτηματολόγιο με ερωτήσεις σχετικά με την καθημερινότητά τους και τον τρόπο ζωής τους.

Πραγματοποιήθηκαν αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις στους δότες, έλεγχος για την ενεργότητα G-6-PD, καθώς και μέτρηση του επιπέδου του αιματοκρίτη για να δοθεί η έγκριση για την εκκίνηση της αιμοδοσίας. Η ομάδα αίματος των δοτών καθώς και η ποσοτική μέτρηση της επάρκειας του ενζύμου G-6-PD καταγράφηκαν επίσης αναλυτικά. Ο συμβολισμός των δειγμάτων ήταν ο εξής: 7031(G1), 7035 (G2), 7038 (G3), 7044 (G4), 7047 (G5), 7050 (G6), 7052 (G7).

Αναλυτικά όσον αναφορά το κάθε δείγμα ξεχωριστά :

7031: Η αιμοληψία για το συγκεκριμένο δείγμα πραγματοποιήθηκε στις 9.35 το πρωί. Η ηλικία του δότη ήταν 31 ετών και ο τύπος κατά ABO της ομάδας αίματος είναι A₁. Αναλυτικότερα τα αντιγόνα του Rhesus της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι CcDēē. Επίσης το αντιγόνο Kell ήταν αρνητικό (-). Συνοπτικά ο τύπος της αντιγονικότητας της κυτταρικής μεμβράνης ήταν A₁ CcDēē K(-). Η συστολική πίεση του δότη μετρήθηκε στα

105 mmHg ενώ η διαστολική στα 70mmHg. Η τιμή της αιμοσφαιρίνης (Hb) ήταν 16.0 mg/dL.

7035: Η αιμοληψία για το συγκεκριμένο δείγμα πραγματοποιήθηκε στις 10.35 το πρωί. Η ηλικία του δότη ήταν 34 ετών και ο τύπος κατά ABO της ομάδας αίματος είναι B. Αναλυτικότερα τα αντιγόνα του Rhesus της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι CCDēē. Επίσης το αντιγόνο Kell ήταν αρνητικό (-). Συνοπτικά ο τύπος της αντιγονικότητας της κυτταρικής μεμβράνης ήταν B CCDēē K(-). Η συστολική πίεση του δότη μετρήθηκε στα 115 mmHg ενώ η διαστολική στα 55mmHg. Η τιμή της αιμοσφαιρίνης (Hb) ήταν 15.7 mg/dL.

7038: Η αιμοληψία για το συγκεκριμένο δείγμα πραγματοποιήθηκε στις 11.20 το πρωί. Η ηλικία του δότη ήταν 33 ετών και ο τύπος κατά ABO της ομάδας αίματος είναι A₁. Αναλυτικότερα τα αντιγόνα του Rhesus της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι ccdēē. Επίσης το αντιγόνο Kell ήταν αρνητικό (-). Συνοπτικά ο τύπος της αντιγονικότητας της κυτταρικής μεμβράνης ήταν A₁ ccdēē K(-). Η συστολική πίεση του δότη μετρήθηκε στα 130 mmHg ενώ η διαστολική στα 75mmHg. Η τιμή της αιμοσφαιρίνης (Hb) ήταν 15.9 mg/dL.

7044: Η αιμοληψία για το συγκεκριμένο δείγμα πραγματοποιήθηκε στις 12.20 το πρωί. Η ηλικία του δότη ήταν 36 ετών και ο τύπος κατά ABO της ομάδας αίματος είναι A₂. Αναλυτικότερα τα αντιγόνα του Rhesus της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι ccdēē. Επίσης το αντιγόνο Kell ήταν αρνητικό (-). Συνοπτικά ο τύπος της αντιγονικότητας της κυτταρικής μεμβράνης ήταν A₂ ccdēē K(-). Η συστολική πίεση του δότη μετρήθηκε στα 130 mmHg ενώ η διαστολική στα 85mmHg. Η τιμή της αιμοσφαιρίνης (Hb) ήταν 15.1 mg/dL.

7047: Η αιμοληψία για το συγκεκριμένο δείγμα πραγματοποιήθηκε στις 12.35 το πρωί. Η ηλικία του δότη ήταν 44 ετών και ο τύπος κατά ABO της ομάδας αίματος είναι A₁. Αναλυτικότερα τα αντιγόνα του Rhesus της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι CcDēē. Επίσης το αντιγόνο Kell ήταν αρνητικό (-). Συνοπτικά ο τύπος της αντιγονικότητας της κυτταρικής

μεμβράνης ήταν A₁ CcDēē K(-). Η συστολική πίεση του δότη μετρήθηκε στα 115 mmHg ενώ η διαστολική στα 80mmHg. Η τιμή της αιμοσφαιρίνης (Hb) ήταν 15.1 mg/dL.

7050: Η αιμοληψία για το συγκεκριμένο δείγμα πραγματοποιήθηκε στις 12.50 το πρωί. Η ηλικία του δότη ήταν 34 ετών και ο τύπος κατά ABO της ομάδας αίματος είναι O. Αναλυτικότερα τα αντιγόνα του Rhesus της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι ccdēē. Επίσης το αντιγόνο Kell ήταν αρνητικό (-). Συνοπτικά ο τύπος της αντιγονικότητας της κυτταρικής μεμβράνης ήταν O ccdēē K(-). Η συστολική πίεση του δότη μετρήθηκε στα 125 mmHg ενώ η διαστολική στα 80mmHg. Η τιμή της αιμοσφαιρίνης (Hb) ήταν 15.9 mg/dL.

7052: Η αιμοληψία για το συγκεκριμένο δείγμα πραγματοποιήθηκε στις 13.45 το πρωί. Η ηλικία του δότη ήταν 34 ετών και ο τύπος κατά ABO της ομάδας αίματος είναι O. Αναλυτικότερα τα αντιγόνα του Rhesus της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι ccDEē. Επίσης το αντιγόνο Kell ήταν αρνητικό (-). Συνοπτικά ο τύπος της αντιγονικότητας της κυτταρικής μεμβράνης ήταν O ccDEē K(-). Η συστολική πίεση του δότη μετρήθηκε στα 110 mmHg ενώ η διαστολική στα 80mmHg. Η τιμή της αιμοσφαιρίνης (Hb) ήταν 15.8 mg/dL.

Πίνακας 1. Στοιχεία δοτών.

	7031 (G1)	7035 (G2)	7038 (G3)	7044 (G4)	7047 (G5)	7050 (G6)	7052 (G7)
Ηλικία	31	34	33	36	44	34	34
Ώρα αιμοληψίας	9:35	10:35	11:20	12:20	12:35	12:50	13:45
ABO	A ₁	B	A ₁	A ₂	A ₁	0	0
Αντιγόνα Rhesus	CcDēē	CCDēē	ccdēē	ccdēē	CcDēē	ccdēē	ccDEē
Kell	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Συστολική πίεση (mmHg)	105	115	130	130	115	125	110
Διαστολική πίεση (mmHg)	70	55	75	85	80	80	80
Αιμοσφαιρίνη (Hb) (mg/Dl)	16.0	15.7	15.9	15.1	15.1	15.9	15.8

Τα δείγματα μετά την λήψη τους, σε σωληνάρια (tubes) σε αντιπηκτικό EDTA και κιτρικών οξέων (in vino), οδηγήθηκαν στο εργαστήριο. Από τους

ασκούς παρασκευάστηκαν συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια (pRBC's) και φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα (FFP). Το φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα αποθηκεύτηκε στους -20°C και τα συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια στους $+4^{\circ}\text{C}$.

Τα σωληνάρια που περιείχαν αντιπηκτικό διαχωρίστηκαν σε δυο κατηγορίες την A και την Z και στόχος ήταν η μελέτη των δειγμάτων σε καταστάσεις in vivo.

Στην κατηγορία A, όπου το αντιπηκτικό ήταν το EDTA, τα δείγματα επεξεργάστηκαν για τη τυποποίηση των κυστιδίων. Φυγοκεντρήθηκαν δυο φορές στις 4730 στροφές για δεκαπέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια λήφθηκε όλη η ποσότητα του υπερκείμενου (πλάσμα) και τοποθετήθηκε σε erpendorf. Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε για όλα τα δείγματα. Η ονομασία των δειγμάτων ήταν η ακόλουθη A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν περίπου 3-4 erpendorf ανάλογα με την ποσότητα του υπερκείμενου.

Για την δεύτερη κατηγορία Z, χρησιμοποιήθηκε για αντιπηκτικό κιτρικό οξύ και τα σωληνάρια είχαν προορισμό για μελλοντική χρήση zymufen. Φυγοκεντρήθηκαν πρώτα στις 3660 στροφές για δεκαπέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια στις 10800 στροφές για δυο λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια λήφθηκε όλη η ποσότητα του υπερκείμενου από κάθε δείγμα και τοποθετήθηκε σε erpendorf με την ακόλουθη ονομασία Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6, Z7. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν περίπου 3-4 erpendorf ανάλογα με την ποσότητα του υπερκείμενου. Τα δείγματα και των δυο κατηγοριών αποθηκεύτηκαν στους -80°C έως ότου πραγματοποιηθεί η πειραματική τους επεξεργασία.

Όσον αναφορά την επεξεργασία των δειγμάτων εντός των ασκών (ex vivo) αυτή διήρκεσε για 42 ημέρες, όσο και η τελευταία ημέρα συντήρησης του ασκού. Στόχος της έρευνας ήταν η παρατήρηση των αλλοιώσεων που είχαν υποστεί τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά την αποθήκευσή τους εντός των ασκών στους $+4^{\circ}\text{C}$. Τα δείγματα ήταν γνωστό ότι προέρχονταν από δότες με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD και μελετήθηκε αν μετά από την

αποθήκευσή τους παραμένουν λειτουργικά παρά τις όποιες αλλοιώσεις έχουν υποστεί.

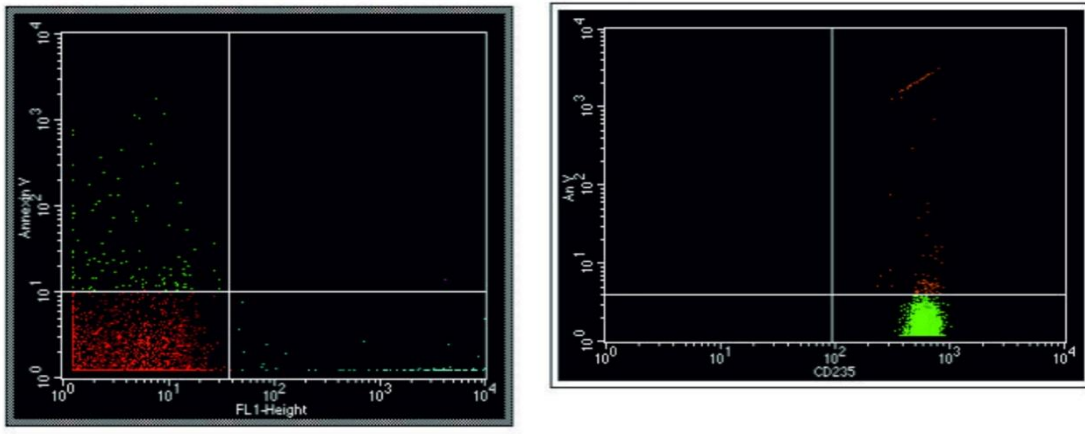
Η παρατήρηση τυχόν αιμόλυσης εντός του ασκού ήταν κομβικής σημασίας καθώς η εμφάνισή της σε σημαντικό αριθμό δειγμάτων θα σήμαινε τον τερματισμό την ερευνητικής διαδικασίας, καθώς δεν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για μεταγγίσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι στα επτά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη έρευνα δεν εμφανίστηκε αιμόλυση σε οποιοδήποτε από αυτά.

Η μελέτη και παρατήρηση των δειγμάτων πραγματοποιούνταν με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής και των επιχρισμάτων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια με τα οποία πραγματοποιήθηκαν τα επιχρίσματα, προέρχονταν από τους ασκούς και βοηθούν στην περεταίρω μορφολογική παρατήρηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

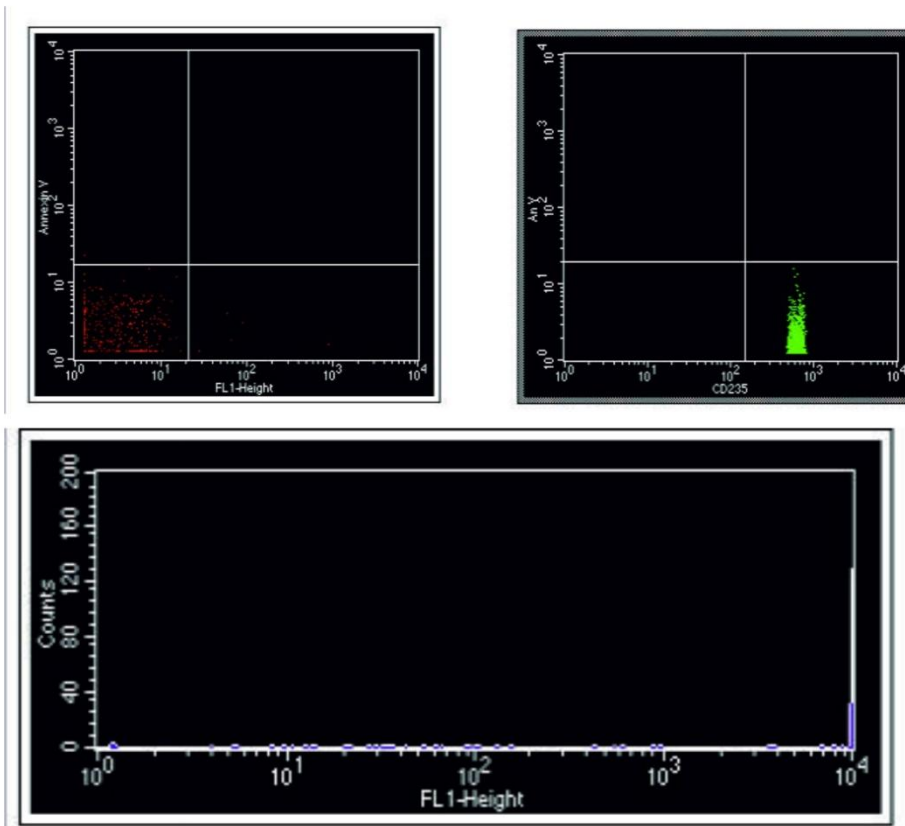
Με την κυτταρομετρία ροής παρατηρήθηκε το μέγεθος των κυττάρων καθώς και το ποσοστό έκφρασης της PS που σχετίζεται με την απόπτωση του κυττάρου εντός των ασκού. Με συγκεκριμένο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει και προσδένεται σε επίτοπους ανεξίνης στην εξωτερική μεριά της κυτταρικής μεμβράνης παρατηρήθηκε το ποσοστό των ερυθρών αιμοσφαιρίων που είχαν περάσει στη φάση της απόπτωσης. Φυσιολογικά η ανεξίνη βρίσκεται εντός της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά όταν το κύτταρο περνάει στην φάση της απόπτωσης επανατοποθετείται στην εξωτερική της πλευρά και δίνει σήμα στα λευκά αιμοσφαίρια για να απομακρύνουν το συγκεκριμένο κύτταρο από την κυκλοφορία. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιούνταν ανά οκτώ ημέρες.

Τα δείγματα προετοιμάζονταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο για την κυτταρομετρία ροής και στην συνέχεια οδηγούταν στον κυτταρομετρητή για ανάλυση. Ακολουθούσε καταγραφή των δεδομένων στον Η/Υ και στη συνέχεια μελέτη και επεξεργασία των αποτελεσμάτων, τα οποία θα αναφερθούν σε επόμενο κεφάλαιο.

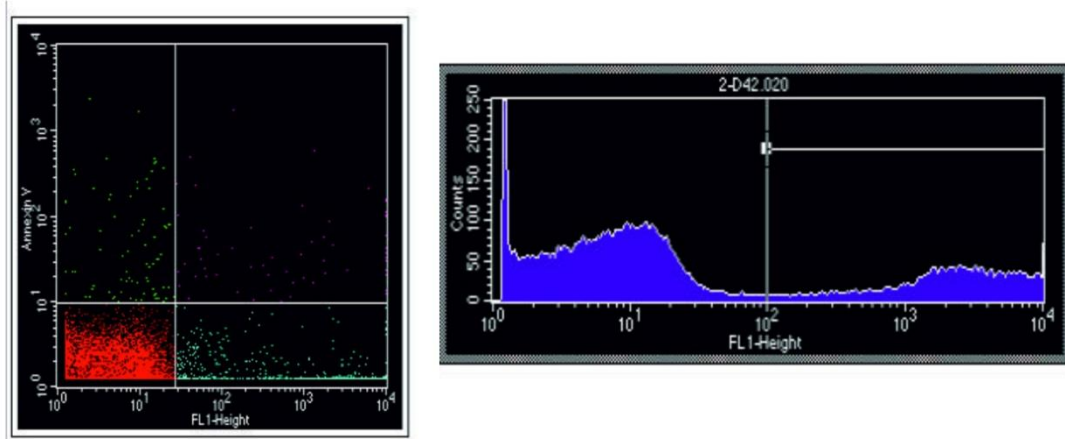
Οι παρακάτω εικόνες αφορούν την επεξεργασία των αποτελεσμάτων που προήλθαν από την ανάλυση των δειγμάτων με την βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής.



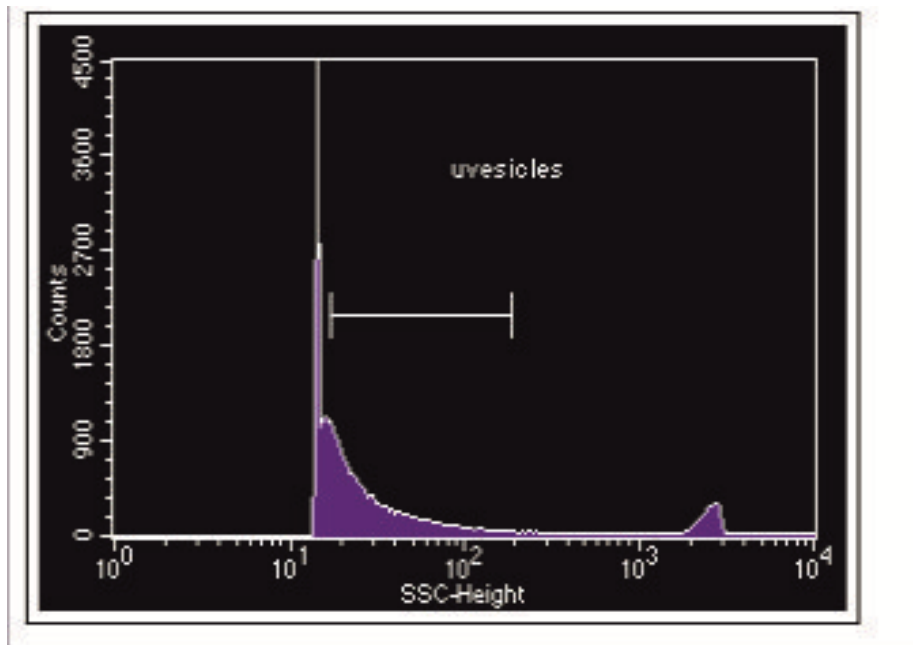
Εικόνα 18. Ερυθρά αιμοσφαίρια θετικά σε PS (Αριστερά με πράσινο θετικά, δεξιά με πορτοκαλί θετικά).



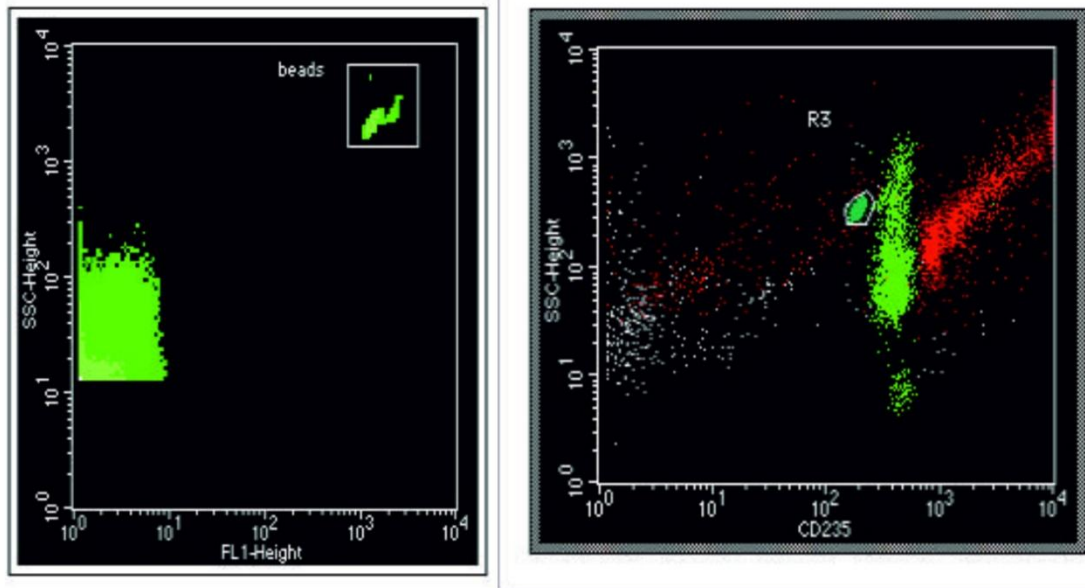
Εικόνα 19. Ερυθρά αιμοσφαίρια τα οποία δεν εκφράζουν PS.



Εικόνα 20. Διπλός πληθυσμός ερυθρών αιμοσφαιρίων. Αριστερά έκφραση, δεξιά όχι.



Εικόνα 21. Διαχωρισμός μικροκυστιδίων από τα υπόλοιπα στοιχεία του δείγματος με βάση το μέγεθος (Όσα βρίσκονται εντός gate = Αποδεκτά ως κυστίδια).



Εικόνα 22. Trucounts-Beads τα οποία βρίσκονται στα ειδικά σωληνάρια για κυτταρομετρία (Εντός των gates).

Σημαντική παρατήρηση ήταν επίσης και η μέτρηση των ελεύθερων μικρό-κυστιδίων στο πλάσμα των δειγμάτων. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι τα περισσότερα σε αριθμό κύτταρα του ανθρωπίνου οργανισμού στο αίμα. Περιέχουν σίδηρο και αίμη, τα οποία δυο στοιχεία σε συνδυασμό σχηματίζουν την αιμοσφαιρίνη και υπό προϋποθέσεις αποτελούν τοξικό παράγοντα για τον οργανισμό. Είναι σημαντική η εύρεση του αριθμού των συγκεκριμένου αριθμού των μικρό-κυστιδίων ερυθροκυτταρικής προέλευσης στο πλάσμα των δειγμάτων και πραγματοποιείται με συγκεκριμένα αντισώματα που αναγνωρίζουν τους επιτόπους ανεξίνης στην επιφάνεια των μικρό-κυστιδίων και διαφοροποιούν αυτά της ερυθροκυτταρικής προέλευσης.

B2. Πρωτόκολλα

B2.1. Επίχρισμα αίματος

Για την περαιτέρω μελέτη και μορφολογική παρατήρηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκαν επιχρίσματα ολικού αίματος σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Μια μικρή σταγόνα αίματος τοποθετήθηκε στην πρώτη αντικειμενοφόρο πλάκα, με την βοήθεια τριχοειδούς. Στην συνέχεια με μια δεύτερη αντικειμενοφόρο πλάκα ολοκληρώθηκε η επίστρωση με την δημιουργία μιας λεπτής στοιβάδας αίματος. Τα επιχρίσματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσουν ικανοποιητικά και να είναι κατάλληλα για μικροσκόπηση. Για πραγματοποιηθεί η μικροσκόπηση τα επιχρίσματα πρέπει να υποστούν χρώση. Για την συγκεκριμένη μικροσκόπηση χρησιμοποιήθηκε η χρώση May-Grünwald-Giemsa, για την οποία ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Μονιμοποίηση σε μεθανόλη για πέντε λεπτά.
- Προσθήκη της χρωστικής May-Grünwald-Giemsa για πέντε λεπτά.
- Ξέπλυμα με άφθονη ποσότητα νερού.
- Προσθήκη της χρωστικής Giemsa για δεκαπέντε λεπτά.
- Ξέπλυμα με άφθονη ποσότητα νερού.

Μετά την ολοκλήρωση της χρώσης τα παρασκευάσματα αφήνονται να στεγνώσουν πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί η μικροσκόπηση. Η μικροσκόπηση πραγματοποιήθηκε με χρήση ξηρού φακού 10x και στη συνέχεια με καταδυτικό φακό 100x με την προσθήκη κεδρελαίου.

B2.2. Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής βασίζεται σε ένα συνδυασμό μεθόδων όπως η σχέση αντιγόνου- αντισώματος, φθορισμός και απορρόφηση αυτού με χρήση ακτινών Laser και μια σειρά μηχανικών τεχνασμάτων για την αρμονική λειτουργία όλων των παραπάνω και ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των επιπέδων ανεξίνης στην κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Φυσιολογικά η ανεξίνη βρίσκεται εντός του κυττάρου, αλλά κατά την διάρκεια της αποπτωτικής διαδικασίας συνδέεται με τη φωσφατιδυλοσερίνη στο εξωτερικό τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης. Χρησιμοποιώντας το αντίσωμα PE Anexin V, το οποίο προσδένεται σε όλα τα ερυθρά αιμοσφαίρια που έχουν ανεξίνη εξωτερικά της κυτταρικής τους μεμβράνης, αναγνωρίζονται όλα τα ερυθρά αιμοσφαίρια που έχουν περάσει στο στάδιο της απόπτωσης. Είναι μια διαδικασία η οποία επιτρέπει διαπίστωση της κατάστασης της οποίας βρίσκεται το δείγμα μας και πόσο καταστροφικές είναι οι αλλοιώσεις που έχει υποστεί κατά την αποθήκευσή του.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε με μικρές παραλλαγές για την διεξαγωγή της κυτταρομετρίας ροής ήταν το ακόλουθο: D. Robert Sutherland et al., *Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry*, Cytometry B Clin Cytom. 2012.

- Πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:500 του ολικού αίματος σε ρυθμιστικό διάλυμα ανεξίνης (buffer PS) και προστέθηκε 3,5% BSA.
- Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση του διαλύματος για τριάντα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Με το τέλος της επώασης προστέθηκαν 50μL του αραιωμένου αίματος σε ειδικό σωληνάριο για τον κυτταρομετρητή ροής.
- Παράλληλα προστέθηκαν και τα αντισώματα CD235 και Anexin V από 0,7μL το καθένα.
- Μετά την προσθήκη των αντισωμάτων τα σωληνάρια οδηγήθηκαν για επώαση είκοσι λεπτών απουσία φωτός, ώστε να μην εξασθενίσουν τα φθορίζοντα αντισώματα.
- Με το πέρας του χρόνου επώασης, προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ανεξίνης ποσότητας 500 μL ώστε να σταματήσει η αντίδραση.
- Τέλος, τα δείγματα μετρήθηκαν στον κυτταρομετρητή ροής, με βάση τους μάρτυρες (controls).

Οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραπάνω μελέτη ήταν τρεις. Ο πρώτος θεωρήθηκε θετικός μάρτυρας για το CD235 και δεν προστέθηκε ποσότητα ανεξίνης. Ο δεύτερος ήταν θετικός μάρτυρας ανεξίνης και δεν προστέθηκε ποσότητα CD235 αντισώματος. Τέλος ο τρίτος δεν περιείχε καθόλου ποσότητα ανεξίνης και CD235 αλλά μόνο τα φθορίζοντα χρώματα FITC και PE.

B2.3. Ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος

Για να μετρηθεί η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη του πλάσματος χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Drapkin. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας Sigma πραγματοποιώντας μικρές τροποποιήσεις.

- Όλα τα δείγματα μετά της έξοδό τους από το υδατόλουτρο οδηγήθηκαν στην ειδική φυγόκεντρο (ειδικά κατασκευασμένη για σωληνάρια erpendorf) και φυγοκεντρήθηκαν για δέκα λεπτά στις τρεις χιλιάδες στροφές.
- Από το υπερκείμενο (πλάσμα) λήφθηκαν 20μL και προστέθηκαν σε αυτά 2,5mL του αντιδραστηρίου Drapkin.
- Ακολούθησε ήπια ανάδευση με προσοχή στο μηχάνημα Vortex.
- Επώαση των δειγμάτων για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τα δείγματα μετρήθηκαν στα 540nm.
- Ο υπολογισμός της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος μέσω μαθηματικού τύπου, που προκύπτει μετά από πρότυπη καμπύλη.

B2.4. Κυστιδίων υπολειπόμενου πλάσματος εντός του ασκού αιμοδοσίας

Για την μέτρηση των ελεύθερων κυστιδίων ερυθροκυτταρικής προέλευσης στο πλάσμα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής. Χρησιμοποιήθηκε ποσότητα πλάσματος από κάθε δείγμα και των πέντε ημερών που πραγματοποιούνταν οι μετρήσεις (NS, 2, 13, 29, 42). Για την κυτταρομετρία ροής επιλέχθηκαν δυο αντισώματα PE και FITC, τα οποία

αναγνωρίζουν και προσδένονται στην ανεξίτη και σε ερυθροκυτταρικής προέλευσης αντιγόνα αντίστοιχα.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ποσοτική μέτρηση των ελευθέρων κυστιδίων του πλάσματος είναι το εξής:

- Πραγματοποιήθηκε αραίωση του πλάσματος 1:20 και συγκεκριμένα 10μL πλάσματος και 190μL Buffer PS για κάθε δείγμα ξεχωριστά.
- Από τη παραπάνω αραίωση αφαιρέθηκαν 20μL και προστέθηκαν σε αυτά άλλα 80μL Buffer PS για κάθε δείγμα στα ειδικά σωληνάρια για την κυτταρομετρία ροής.
- Στη συνέχεια προστέθηκαν τα αντισώματα PE Annexin V και FITC CD235 σε ποσότητα 2μL το κάθε αντίσωμα.
- Τα ειδικά σωληνάρια BD Trucount™ Tubes οδηγήθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο για επώαση 15 λεπτών.
- Μετά το πέρας της επώασης και για το τερματισμό της αντίδρασης προστέθηκαν 400μL Buffer PS και τα δείγματα οδηγήθηκαν για κυτταρομέτρηση.

B3. Υλικά και μέθοδοι

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο, αναφέρονται οι συσκευές, τα όργανα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της ερευνητικής εργασίας. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αιματολογίας - Αιμοδόσιας, στο Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων, στο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθηνών.

B3.1. Συσκευές και Όργανα

Πίνακας 2. Πιπέτες που χρησιμοποιήθηκαν.

ΠΙΠΕΤΕΣ	
1) NICHIRYO, Autoclavable Nichipet EX II	Volume 100-1000μL
2) NICHIRYO, Autoclavable Nichipet EX II	Volume 20-200μL
3) NICHIRYO, Autoclavable Nichipet EX Plus	Volume 2-20μL
4) HIRSCHMANN LABORGERÄTE, Labopette	Volume 0,1-2,5μL

Πίνακας 3. Συσκευές – Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.

Αναδευτήρας (Vortex)	VELP SCIENTIFICA
Φυγόκεντροι	1) HETTICH ZENTRIFUGEN, Mikro 22 R
	2) BACACOS SCIENTIFIC, Econospin Sorvall Instruments DU PONT
Κυτταρομετρητής	BECTON DICKINSON, FACScan
Αναλυτές αίματος	NIHON KOHDEN, Cell Tac E
	MINDRAY, BC-3000 Plus, Auto Hematology Analyzer
Μικροσκόπιο	NIKON, Eclipse E 400

B3.2. Αντιδραστήρια – Αναλώσιμα

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια - αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν.

Κυτταρομετρία	BD Trucount™ Tubes, For determining absolute counts of leucocytes in blood
	BD FACSTFlow™ 20 Liters
	BD FACS Clean 5 Liters
	BD FACS Rinse 5 Liters
Αντισώματα (Κυτταρομετρία)	BD Pharmigen™, FITC Mouse Anti-Human CD41a, 2 mL
	BD Pharmigen™, PE Anexin V, 0.5 MI
	BD Pharmigen™, FITC Mouse Anti-Human CD 235a, 0.2 mL
Αναλυτές αίματος	MEDICON, Medilyse™ 5P, 0.5 Liters για NIHON KOHDEN, Cell Tac E
	NeoMedica, Neo-Rinse&HGB Ref, 20 Liters για MINDRAY, BC-3000 Plus, Auto Hematology Analyzer
Αντικειμενοφόροι πλάκες	FEM, Microscope Slides, 50 pcs
Χρωστικές	GIEMSA STAIN, RR88, 2.5L, MOLECULA, BIOSTAIN
	May Grunwald
Γάντια	SENSA, Latex powdered examination gloves

Γ. Αποτελέσματα

Γ1. Έκφραση φωσφατοδιλοσερίνης (PS) στα ερυθρά αιμοσφαίρια

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5) καταγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων κατόπιν επεξεργασίας.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα μετρήσεων (PS+ total=συνολικός αριθμός κυστιδίων τα οποία εκφράζουν PS, R=κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης, R+=κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης τα οποία εκφράζουν PS).

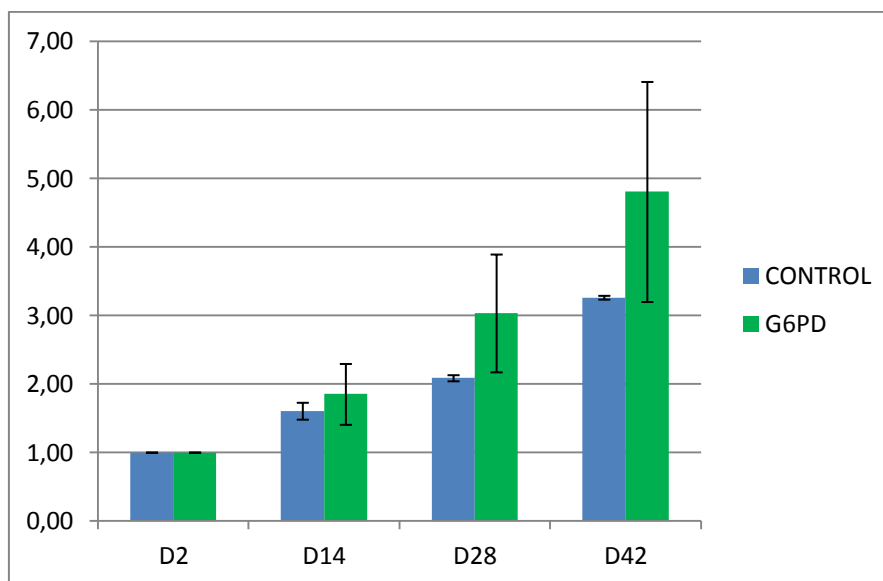
SAMPLES		<u>DAY-NS</u>	<u>DAY-2</u>	<u>DAY-13</u>	<u>DAY-29</u>	<u>DAY-42</u>
G1	PS+ total	35269	19537	29329	50838	80080
	R total	14284	17071	26239	48784	74276
	R+	11810	16573	26058	46307	71161
G3	PS+ total	37263	24433	44793	64026	84012
	R total	18847	20906	40407	60577	77810
	R+	18605	20517	39095	57960	75808
G4	PS+ total	20486	24288	35845	46466	72768
	R total	14917	22397	31235	42552	62632
	R+	14329	19828	30305	41279	59318
G5	PS+ total	33162	14948	33856	44653	86837
	R total	11378	9831	20873	39133	72628
	R+	10279	9440	17434	37695	70663
G6	PS+ total	34357	20513	41866	65712	49801
	R total	15890	14902	36968	57911	82675
	R+	16097	13647	36793	56821	78397
G7	PS+ total	38764	23468	31470	49801	79896
	R total	13518	16874	25254	38649	75209
	R+	12474	16038	24959	37435	73976

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6) φαίνονται οι αντίστοιχες τιμές του δεύτερου δότη (2), ο οποίος λειτουργεί ως δότης - μάρτυρας.

Πίνακας 6. Τιμές του δότη-μάρτυρα.

	DAY				
donor 2 CONTROL	NS	2	13	29	42
PS+ total	38349	13703	22084	29277	42695
R total	10500	12268	21736	25636	41171
R+	9459	12027	20609	25252	40128

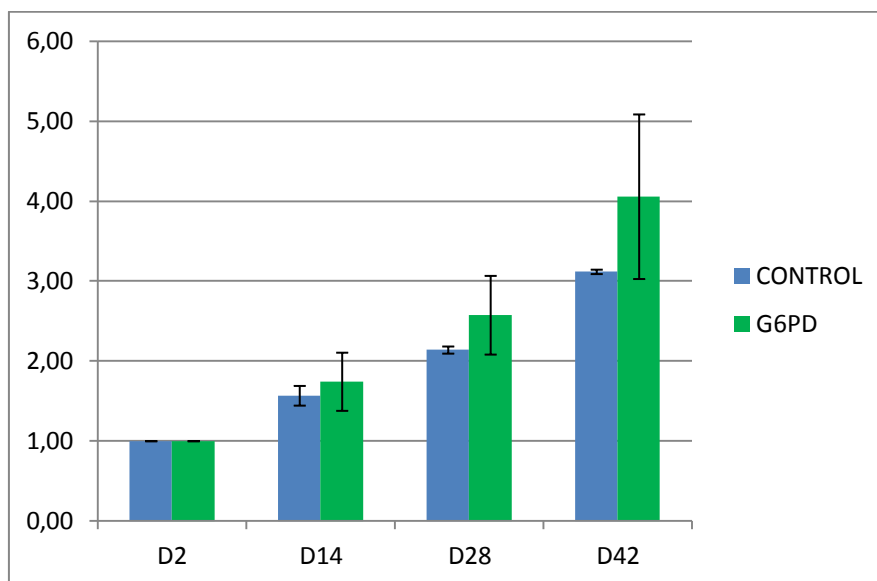
Με βάση τα δεδομένα των παραπάνω πινάκων δημιουργήθηκαν τα εξής διαγράμματα.



Διάγραμμα 1. Σύγκριση τιμών των κυστιδίων ερυθροκυτταρικής προέλευσης (R total) του μάρτυρα με τον μέσο όρο τιμών των υπολοίπων δοτών με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD.

Στο συγκεκριμένο διάγραμμα, παρατηρούμε ότι την κατά την πρώτη ημέρα, την οποία δεν έχει προηγηθεί αποθήκευση των δειγμάτων (DAY-NS-in vino), οι τιμές κυμαίνονται στο ίδιο επίπεδο. Κατά την δέκατη τέταρτη (14) ημέρα διακρίνεται μια διαφορά των τιμών 2% ($\pm 3\%$). Η διαφορά των τιμών είναι 9% κατά την εικοστή όγδοη (28) ημέρα αποθήκευσης ($\pm 10\%$) για να φτάσει στην μεγαλύτερη τιμή της την τεσσαρακοστή δεύτερη ημέρα αποθήκευσης 16% ($\pm 12\%$).

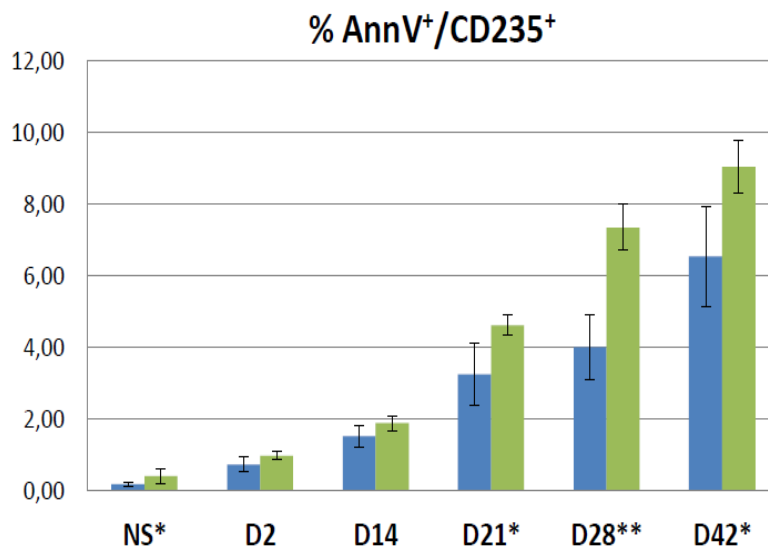
Στο επόμενο διάγραμμα συγκρίνονται οι τιμές του μάρτυρα με τον μέσο όρο τιμών των υπολοίπων δοτών όσον αφορά τα κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης που εκφράζουν PS.



Διάγραμμα 2. Σύγκριση τιμών των κυστιδίων ερυθροκυτταρικής προέλευσης τα οποία εκφράζουν PS(R+) του μάρτυρα, με τον μέσο όρο τιμών των υπολοίπων δοτών με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD.

Στο συγκεκριμένο διάγραμμα παρατηρούμε ότι οι τιμές την δεύτερη ημέρα αποθήκευσης κυμαίνονται στο ίδιο επίπεδο. Στα ίδια επίπεδα διατηρήθηκε και κατά την δέκατη τέταρτη (14) ημέρα με μια μικρή διαφορά 1% ($\pm 2\%$). Η διαφορά των τιμών διευρύνθηκε κατά την εικοστή όγδοη (28) ημέρα 4% ($\pm 5\%$), ενώ έφτασε στην μεγαλύτερη τιμή της 10% ($\pm 10\%$) κατά την τελευταία ημέρα αποθήκευσης την τεσσαρακοστή δεύτερη (42).

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται δεδομένα που σχετίζονται με το ποσοστό ερυθρών αιμοσφαιρίων τα οποία εκφράζουν PS. Οι τιμές του μάρτυρα συγκρίνονται με τον μέσο όρο τιμών των υπολοίπων δοτών.



Διάγραμμα 3. Ερυθρά αιμοσφαίρια (CD 235+) τα οποία εκφράζουν PS.

Στο συγκεκριμένο διάγραμμα παρατηρήθηκε ότι κατά την διάρκεια όλων των μετρήσεων οι τιμές του μάρτυρα σχετικά με την έκφραση ανεξίνης είναι χαμηλότερες σε σύγκριση με τον μέσο όρο τιμών των δοτών με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD. Κατά τις πρώτες τρεις μετρήσεις, την ημέρα που κατέφθασαν τα δείγματα, την δεύτερη (2) και την δέκατη τέταρτη(14) ημέρα αποθήκευσης (DAY-NS,2,14), η διαφορά κυμαίνεται σε μικρά επίπεδα 1-3%. Την εικοστή πρώτη (21) ημέρα αποθήκευσης παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά 8% μεταξύ των τιμών. Η διαφορά αυξάνεται στο υψηλότερο επίπεδο της 17% ($\pm 10\%$) κατά την εικοστή όγδοη (28) ημέρα αποθήκευσης, ενώ η διαφορά μειώνεται στο 12% ($\pm 8\%$) την τελευταία ημέρα της αποθήκευσης την τεσσαρακοστή δεύτερη ημέρα (42).

Γ2. Ελευθέρια κυστίδια υπολειπόμενου πλάσματος

Σύμφωνα με τις μετρήσεις προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Ελεύθερα κυστίδια πλάσματος ερυθροκυτταρικής προέλευσης με έκφραση PS.

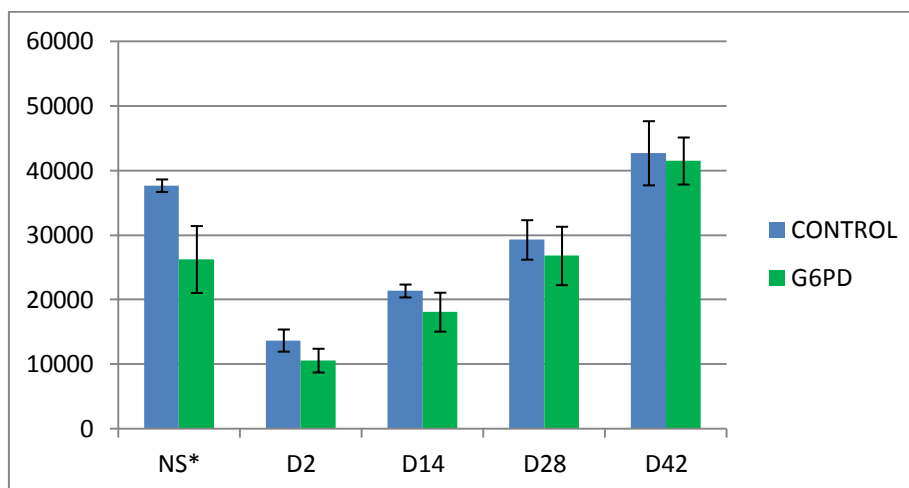
G6PD	DAY→	NS	2	13	29	42
G1	PS+ total	27863	9768	14665	25419	40040
G3	PS+ total	29438	12216	22397	32013	42006
G4	PS+ total	16184	12144	17922	23233	36384
G5	PS+ total	26198	7474	16928	22327	43419
G6	PS+ total	27142	10257	20933	32856	47120
G7	PS+ total	30624	11734	15735	24901	39948
G1	R+	5905	8287	13029	23154	35581
G3	R+	9302	10258	19548	28980	37904
G4	R+	7165	9914	15152	20639	29659
G5	R+	5140	4720	8717	18848	35331
G6	R+	8049	6824	18396	28411	39198
G7	R+	6237	8019	12479	18718	36988

Οι αντίστοιχες τιμές του δεύτερου (2) δότη-μάρτυρα είναι οι ακόλουθες.

Πίνακας 8. Τιμές του δότη-μάρτυρα.

CONTROLS	DAY→	NS	2	13	29	42
G2	PS+ total	38349	14912	22077	31431	46193
DV2	PS+ total	36981	12490	20666	27112	39177
G2	R+	9459	14279	20609	26084	45624
DV2	R+	8932	10409	18394	24419	34632

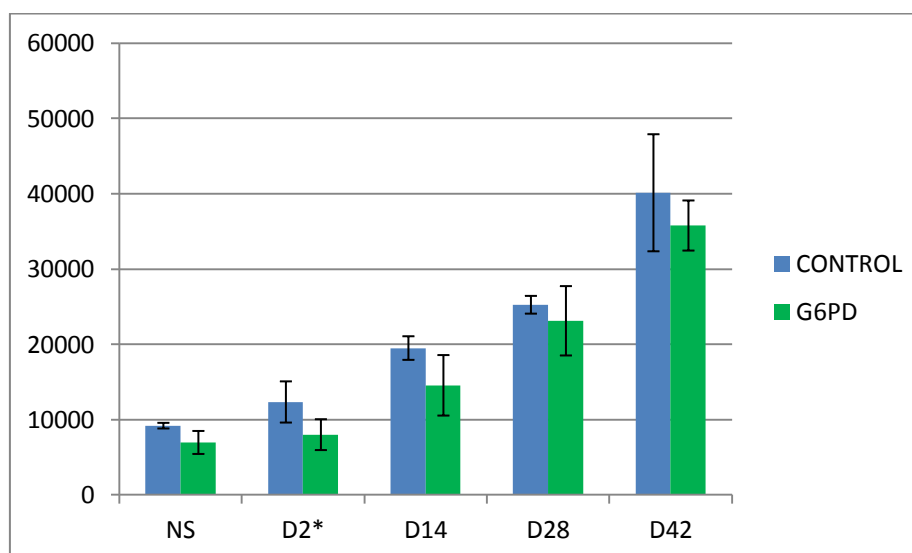
Από τις τιμές του πίνακα, όσον αναφορά τον συνολικό αριθμό των ελεύθερων κυστιδίων του πλάσματος τα οποία εκφράζουν PS (PS+ total) προκύπτει το ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 4. Ελεύθερα κυστίδια του υπολειπόμενου πλάσματος εντός του ασκού τα οποία εκφράζουν PS.

Σύμφωνα με το διάγραμμα οι τιμές του δότη-μάρτυρα είναι υψηλότερες σε όλες τις μετρήσεις σε σχέση με τον μέσο όρο τιμών των υπολοίπων δοτών. Συγκεκριμένα κατά την DAY-NS (in vivo) η διαφορά μεταξύ των τιμών είναι 17% ($\pm 5\%$). Στις επόμενες μετρήσεις οι τιμές μεταξύ δότη-μάρτυρα και μέσο όρο δοτών κυμαίνεται στα ίδια περίπου επίπεδα σημειώνοντας μικρές διαφορές (1-3%).

Όσον αναφορά τα κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης (R+) τα οποία εκφράζουν PS προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 5. Κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης (R+) τα οποία εκφράζουν PS στο υπολειπόμενο ποσό πλάσματος.

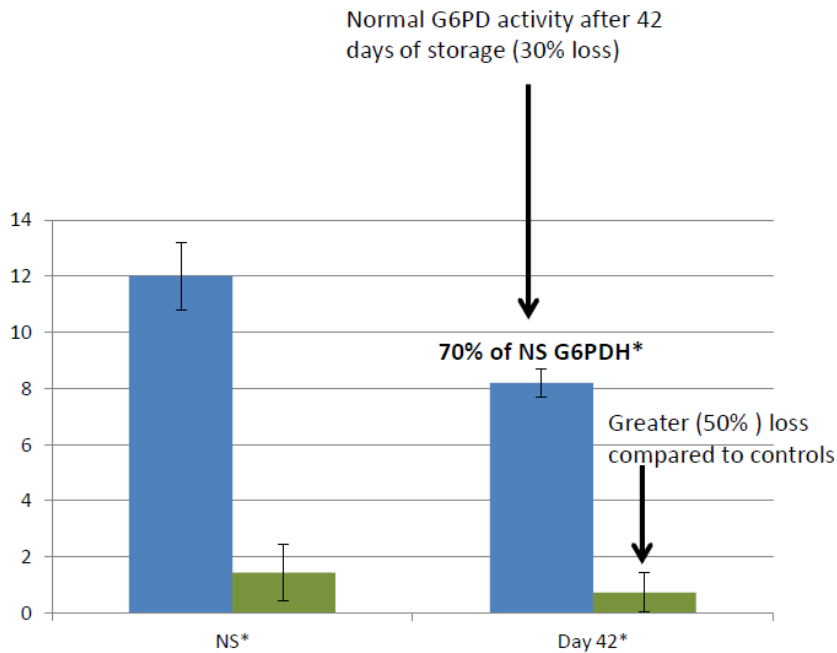
Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι οι τιμές μεταξύ του δότη-μάρτυρα και του μέσο όρο τιμών των δοτών κυμαίνονται στο ίδιο επίπεδο τη DAY-NS (in vivo). Την δεύτερη (2) ημέρα αποθήκευσης παρατηρείται διαφορά μεταξύ των τιμών κατά 5% ($\pm 5\%$). Κατά τη δέκατη τέταρτη (14) και εικοστή όγδοη (28) ημέρα αποθήκευσης οι τιμές κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα με μικρές αποκλίσεις 1-3%, ενώ κατά την τελευταία ημέρα αποθήκευσης την τεσσαρακοστή δεύτερη (42), η διαφορά μεταξύ των τιμών είναι 5%.

Γ3. Μορφολογία αποθηκευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων

Παράλληλα με τις μετρήσεις των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε και παρατήρηση της μορφολογίας των ερυθρών αιμοσφαιρίων με την χρήση μικροσκοπίου, ύστερα από επίστρωση, μονιμοποίηση και χρώση. Τα ευρήματα από την παρατήρηση των δειγμάτων ήταν παρόμοια σε όλες τις μικροσκοπίσεις και η μόνη διαφορά ήταν ο αριθμός εμφάνισης των παραμορφωμένων κυττάρων, ο οποίος αυξανόταν με την πάροδο των ημερών αποθήκευσης. Κατά την μικροσκόπηση των δειγμάτων παρατηρήθηκαν εχινόκύτταρα, ακανθοκύτταρα, δακρυοκύτταρα καθώς και υποχρωμία στα περισσότερα ερυθρά αιμοσφαίρια. Κατά την ημέρα που κατέφθασαν τα δείγματα και πριν οδηγηθούν πρώτη φορά για αποθήκευση την DAY-NS (in vivo), ο αριθμός των παραμορφωμένων κυττάρων ήταν 10-12 κ.ο.π. ενώ την τελευταία ημέρα αποθήκευσης την DAY-42, ο αριθμός αυτός αυξήθηκε σε 30-35 κ.ο.π.

Γ4. Ενεργότητα G-6-PD ενζύμου στους δότες.

Το παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζει δεδομένα σχετικά με την ενεργότητα του ενζύμου G-6-PD κατά την διάρκεια αποθήκευσης των δειγμάτων.



Διάγραμμα 6. Ενεργότητα του ενζύμου G-6-PD μετά την πάροδο 42 ημερών αποθήκευσης.

Το συγκεκριμένο διάγραμμα απεικονίζεται η ενεργότητα του ενζύμου G-6-PD μετά την πάροδο 42 ημερών αποθήκευσης. Σε σύγκριση με την πρώτη μέτρηση που πραγματοποιήθηκε την DAY-NS (in vivo), όπου τα δείγματα δεν είχαν υποστεί την διαδικασία της αποθήκευσης, βλέπουμε μια πτώση 50% στη ενεργότητα του ενζύμου για τα δείγματα με ανεπάρκεια του συγκεκριμένου ενζύμου, σε αντίθεση με το δείγμα μάρτυρα του οποίου η πτώση ήταν 30%.

Δ. Συζήτηση

Δ1.Η έκφραση της φωσφατιδιλοσερίνης (PS) στα αποθηκευμένα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής γήρανσης και με αυξημένο οξειδωτικό στρες, ένας από τους μηχανισμούς τους οποίους διαθέτουν είναι να εκθέτουν στην επιφάνειά τους φωσφατιδιλοσερίνη (PS) και να αποσύρονται από την κυκλοφορία μέσω φαγοκυττάρωσης. Αυτό έχει ως

αποτέλεσμα να απομακρύνονται από την κυκλοφορία (in vivo). Δηλαδή το ερυθρό αιμοσφαίριο περνά σε φάση απόπτωσης και δίνει σήμα στα λευκά αιμοσφαίρια ότι δεν διαθέτει πια την ίδια λειτουργική ικανότητα. ^{[90], [95]}

Εντός του ασκού τα ερυθρά αιμοσφαίρια υπόκεινται σε οξειδωτικό στρες ή γερνούν οπότε εκθέτουν εξωτερικά της επιφάνειάς τους PS.. επειδή όμως ο ασκός έχει υποστεί αφαίρεση λευκών αιμοσφαιρίων και περιέχει μόνο συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια, έχει ως αποτέλεσμα τα ερυθρά αιμοσφαίρια να μην απομακρύνονται με φαγοκυττάρωση και να παραμένουν εντός του ασκού επειδή δεν μπορούν να αποσυρθούν. Η έκθεση PS πρακτικά είναι μια συνεχής διαδικασία λόγω αναδιάταξης της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Το ερώτημα που τίθεται, είναι σε περίπτωση που χορηγηθεί το περιεχόμενο ενός συγκεκριμένου ασκού μέσω μετάγγισης, αν τα λευκά αιμοσφαίρια του δέκτη θα απομακρύνουν από την κυκλοφορία τα συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια με φαγοκυττάρωση. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η τιμή της PS ήταν γραμμικά ανάλογη του χρόνου αποθήκευσης με έντονη αύξησή την τελευταία ημέρα της. ^{[89], [93], [96]}

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η PS in vivo από τους εθελοντές αιμοδότες ήταν σχετικά υψηλές. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια υφίστανται κάποιου είδους μεταβατικού στρες-σοκ μετά την έξοδό τους από την κυκλοφορία του σώματος ή/και την είσοδό τους σε ασκούς αιμοδοσίας ή ειδικών σωληναρίων με τα απαραίτητα αντιπηκτικά συστατικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τις πρώτες ώρες μετά την έξοδό τους από την κυκλοφορία να περνούν σε κάποιο αρχικό στάδιο απόπτωσης, το οποίο και συντελεί σε αυτό το αυξημένο ποσοστό στα επίπεδα της PS. Γενικά δε μπορεί να συγκριθεί η τιμή της PS in vivo και ex vivo γιατί τα αντιπηκτικά ήταν διαφορετικά.

Όταν πραγματοποιήθηκε η δεύτερη μέτρηση την δεύτερη (2) ημέρα αποθήκευσης για όλα τα δείγματα η τιμή της εκτεθειμένης PS ήταν αυξημένη. Εξαιρέση για την συγκεκριμένη αύξηση της τιμής αποτελούν οι δότες νούμερο πέντε (5) και έξι (6) καθώς τα επίπεδα PS που εμφανίζονται στα ερυθρά αιμοσφαίρια των συγκεκριμένων δοτών είχαν μειωθεί σε μικρό ποσοστό. Αυτό οφείλεται πιθανά σε κάποια ιδιαιτερότητα των κυττάρων των συγκεκριμένων

δοτών που ενδείκνυται να έχουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από τα ερυθρά αιμοσφαίρια των υπολοίπων δοτών και αντιμετωπίζουν την έξοδό τους από την κυκλοφορία αποκτώντας ξανά την κανονική λειτουργία τους. Το συγκεκριμένο φαινόμενο δεν επαναλαμβάνεται στις υπόλοιπες μετρήσεις καθώς κατά τις επόμενες ημέρες αποθήκευσης των δειγμάτων, ο αριθμός της εκτεθειμένης προς το εξωκυττάριο μέρος PS αυξάνεται στα ίδια επίπεδα όπως των υπολοίπων δοτών. Στους υπόλοιπους δότες η αύξηση των ποσοστών PS οφείλεται στο γεγονός ότι όλο και περισσότερα κύτταρα κατά την αποθήκευση εντός του ασκού περνάνε στην φάση της απόπτωσης και υπόκεινται σε οξειδωτικό στρες εκφράζοντας στην επιφάνειά τους υψηλότερα ποσοστά PS.

Δ2. Ύπαρξη κυστιδίων ερυθροκυτταρικής προέλευσης στο υπολειπόμενο πλάσμα εντός του ασκού.

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά την γήρανσή τους ή και κατά την αποθηκευτική βλάβη σε ασκούς που προορίζονται για μετάγγιση υφίστανται μια σειρά από αλλαγές μεταβολικού αλλά και μορφολογικού περιεχομένου. Μια από αυτές τις αλλαγές είναι ο σχηματισμός κυστιδίων στην κυτταρική τους μεμβράνη, τα οποία κυστίδια στην συνέχεια απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο. Ο σχηματισμός των μικροκυστιδίων είναι ένα φαινόμενο το οποίο συναντάται σε συχνότερο βαθμό όσο το ερυθρό αιμοσφαίριο ωριμάζει, γερνάει ή οξειδώνεται. Η βιολογική σημασία των κυστιδίων, είναι ότι βοηθά στην επιβίωση του ερυθρού αιμοσφαιρίου μέσω της απομάκρυνσης κυρίως πρωτεϊνών αλλά και διαφόρων άλλων ουσιών, οι οποίες δεν είναι πια χρήσιμες ή λειτουργικές για το κύτταρο. Όταν η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται in vivo ο οργανισμός απομακρύνει τα μικροκυστίδια για να μην υπάρχει περεταίρω επίπτωση σε άλλα κύτταρα.

Εντός του ασκού, in vitro, λαμβάνει χώρα το ίδιο φαινόμενο και όλες οι ουσίες οι οποίες δεν είναι επιθυμητές από τα ερυθρά αιμοσφαίρια απομακρύνονται με τη διαδικασία της εξωκυττάρωσης, αλλά παραμένουν στο στενά κοντινό περιβάλλοντα χώρο των κυττάρων. Αυτό έχει σοβαρό αντίκτυπο στην φυσιολογική κατάσταση και λειτουργικότητα των ερυθρών

αιμοσφαιρίων εντός του ασκού. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια, στην προκειμένη περίπτωση τα οποία έχουν ανεπάρκεια του G-6-PD ενζύμου, επιβαρύνονται σε μεγαλύτερο βαθμό από τα φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια χάνοντας περισσότερη επιφάνεια μέσω της κυστιδιοποίησης. Αποτέλεσμα είναι να οδηγούνται σε γήρανση σε ταχύτερο βαθμό από το φυσιολογικό και να απελευθερώνουν μεγαλύτερο αριθμό κυστιδίων εντός του ασκού. Το συγκεκριμένο φαινόμενο προκαλεί αμφιβολίες για την κατάσταση των συγκεκριμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων εντός του ασκού και την δυνατότητα μετάγγισής τους, αλλά και το πώς θα αντιμετωπίσει ο οργανισμός του δέκτη αυτή την μεγάλη ποσότητα κυστιδίων που εισέρχεται σε αυτόν, με ουσίες και πρωτεΐνες που στην ουσία είναι «απόβλητα» των ίδιων των κυττάρων και κάποιες πιθανά να είναι τοξικές.^[91]

Στη παρούσα μελέτη εντοπίστηκε αυξημένος αριθμός κυστιδίων ερυθροκυτταρικής προέλευσης στο υπολειπόμενο πλάσμα του ασκού, με την τιμή του φυσιολογικού δείγματος-μάρτυρα να είναι υψηλότερη από αυτή του μέσου όρου των δειγμάτων με την ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD για την συγκεκριμένη κατηγορία. Αντίθετα τα δείγματα με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD είχαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με τις τιμές του δείγματος-μάρτυρα όσον αναφορά την εκφρασμένη PS στην επιφάνεια των κυστιδίων. Ο βαθμός της κυστιδιοποίησης στα δείγματα μελέτης πιθανά να επηρεάζει τον δέκτη ιδίως εάν είναι ανοσοκατασταλαμένος ή βρίσκεται σε μονάδα εντατικής θεραπείας.

Δ3. Ενεργότητα G-6-PD κατά την αποθήκευση.

Είναι γνωστό ότι όσο το κύτταρο ωριμάζει και φτάνει προς την γήρανση τόσο μειώνεται και η ενζυμική ενεργότητα του επειδή δεν έχουν την ικανότητα αυτά τα κύτταρα να δημιουργήσουν νέα ένζυμα απουσία οργανιδίων και πυρήνα. Τα δύκτιοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ) όταν εισέλθουν στην κυκλοφορία έχουν την υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου G-6-PD και καθώς ωριμάζουν σε ερυθρά αιμοσφαίρια σταδιακά μειώνεται η ενεργότητα τους. Όσον αφορά τα ερυθρά αιμοσφαίρια με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD, ισχύει η ίδια πορεία με τα φυσιολογικά, με διαφορά ότι η ενεργότητα του G-6-PD είναι εξ

αρχής σημαντικά μειωμένη ή μηδενική και κατά την πορεία της γήρανσης ελαττώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό από τα φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια.

Όπως παρατηρήθηκε και από τη συγκεκριμένη έρευνα που επαληθεύει τα παραπάνω, η ενζυμική ενεργότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων με ανεπάρκεια G-6-PD, μειώθηκε σε ποσοστό 50% μέχρι την τελευταία ημέρα αποθήκευσης, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια των οποίων το αντίστοιχο ποσοστό 30%. Η σημαντική παρατήρηση όμως ήταν η αρχική ενεργότητα του ενζύμου των φυσιολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων σε σύγκριση με αυτή των ανεπαρκών. Τα φυσιολογικά κύτταρα παρά την μείωση που υπέστησαν, η τελική ενζυμική ενεργότητα ήταν απολύτως επαρκή μετά από σαράντα δυο ημέρες αποθήκευσης, χάρη στην αρχική υψηλή τους τιμή. Σε αντίθεση στα G-6-PD ανεπαρκή ερυθρά αιμοσφαίρια, η μείωση 50% που υπέστησαν μετά από σαράντα δυο (42) ημέρες αποθήκευσης, σε συνδυασμό με το ήδη χαμηλό ποσοστό ενεργότητας τους που μετρήθηκε την ημέρα πριν την πρώτη αποθήκευση (DAY-non stored), θεωρείται ανεπαρκής για την λειτουργία των ερυθρών αιμοσφαιρίων και την προστασία τους από οξειδωτικούς παράγοντες. Τα συγκεκριμένα κύτταρα σε περίπτωση μετάγγισης, δεν θα μπορούν να προστατευτούν στον οργανισμό του δέκτη από τις οξειδωτικές καταστάσεις που θα δημιουργούνται και πιθανώς θα οδηγηθούν σε αιμόλυση ή εκκαθάριση, δημιουργώντας σημαντικά προβλήματα στον δέκτη.^{[92], [95]}

Δ4. Μετασχηματισμός της μορφολογίας του ερυθρού αιμοσφαιρίου.

Όλα τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά την αποθήκευση τους εντός του ασκού, υπόκεινται σε μεταβολικές και μορφολογικές αλλαγές. Όπως είναι φυσιολογικό τα ερυθρά αιμοσφαίρια τα οποία είναι G-6-PD ανεπαρκή, βιώνουν αυτές τις μεταβολές σε μεγαλύτερο βαθμό, από την στιγμή που δεν μπορούν να προστατευτούν το ίδιο αποτελεσματικά στις συγκεκριμένες μεταβολές, όπως τα φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια. Μια από τις σημαντικότερες επιπτώσεις που υπόκεινται τα ερυθρά αιμοσφαίρια εντός του ασκού από τις μεταβολές αφορά την πρωτεΐνη ζώνη-3. Η ζώνη-3 είναι ένα

σύμπλεγμα πρωτεϊνών το οποίο κατά κύριο λόγο είναι υπεύθυνο για την δομή του ερυθρού αιμοσφαιρίου και την πρόσδεση της αιμοσφαιρίνης (Hb) σε αυτή.

Οποιαδήποτε αλλαγή στην δομή της έχει άμεσο αντίκτυπο για τη μορφολογία του κυττάρου και φυσικά την λειτουργική του ικανότητα. Ένα ερυθρό αιμοσφαίριο το οποίο είναι G-6-PD ανεπαρκές είναι ευκολότερο να υποστεί αυτές τις μεταβολές από την στιγμή που δεν προστατεύεται από το οξειδωτικό στρες σε ικανοποιητικό βαθμό. Εντός του ασκού η αιμοσφαιρίνη που είναι προσδεμένη στην Ζώνη-3 δεν προστατεύεται από το οξειδωτικό στρες και μετατρέπεται σε μεθαιμοσφαιρίνη δηλαδή μη λειτουργική και τοξική για το κύτταρο και σχηματίζονται περιμετρικά της κυτταρικής μεμβράνης τα λεγόμενα σωμάτια Heinz λόγω της κατακερμάτησής της. Επιπροσθέτως εντός του ασκού και λόγω της μεταβολής της Ζώνης-3 η μορφολογία του κυττάρου αλλάζει. Το ερυθρό αιμοσφαίριο χάνει σε μεγάλο την ευκαμψία και την δυνατότητα μεταβολής του σχήματός του. Η κυτταρική του μεμβράνη μετατρέπεται και το ερυθρό αιμοσφαίριο παίρνει σχήμα ακανθοκυττάρου, εχινοκυττάρου, δακρυοκυττάρου. Οι συγκεκριμένες μορφές του κυττάρου όταν πραγματοποιηθεί η μετάγγιση και εισέλθουν στο δέκτη, σε μεγάλο ποσοστό δεν επανέρχονται σε φυσιολογικό σχήμα καθώς οι αλλαγές είναι μη αναστρέψιμες, πράγμα που τα καθιστά μη λειτουργικά για το δέκτη με αποτέλεσμα ο οργανισμός του να τα απομακρύνει από την κυκλοφορία. [90], [92], [94], [95]

Ε. Συμπεράσματα

Όλες οι αιμοδοσίες παγκοσμίως δεν πραγματοποιούν ελέγχους για την ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD στους δότες πριν την πραγματοποίηση της αιμοληψίας. Τα δείγματα που περιέχουν αίμα από δότες με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD, δεν προτιμούνται να δοθούν για μετάγγισή αλλά δεν υπάρχει και απαγορευτική εντολή που να απορρίπτονται οι συγκεκριμένοι αιμοδότες. Η παραπάνω αβεβαιότητα προκύπτει από το γεγονός, ότι δεν μπορεί να γίνει πρόβλεψη σχετικά με τις επιπτώσεις που θα έχει ο οργανισμός του δέκτη, μετά την μετάγγισή μιας τέτοιας μονάδας αίματος.

Περισσότερο εμπειριστατωμένες έρευνες δεν έχουν υπάρξει για να δοθεί ένα τελικό αποτέλεσμα επί του θέματος καθώς δεν νοείται να γίνουν πειράματα σε ανθρώπους με απρόβλεπτες επιπτώσεις για την υγεία τους. Οι ευπαθείς ομάδες και τα νεογέννητα απορρίπτονται από δέκτες, καθώς δεν επιτρέπεται λόγω της κατάστασης της υγείας τους να τους δοθούν οι συγκεκριμένες μονάδες αίματος με πιθανές απρόβλεπτες για αυτούς επιπτώσεις. Σύμφωνα με την παρούσα έρευνα η οποία αφορά δείγματα ανδρών δοτών, αλλά με βάση και άλλες έρευνες που είχαν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν σχετικά με αντίστοιχο περιεχόμενο, προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα, με την βεβαιότητα ότι πρέπει να προκύψουν νέες έρευνες με μεγαλύτερο όγκο δειγμάτων για μεγαλύτερη ποικιλομορφία και πιο σαφή αποτελέσματα.

- 1) Οι δότες με ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD θα πρέπει να θεωρούνται ανεπαρκείς ή φτωχοί ως δότες. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που προέρχονται από τους συγκεκριμένους δότες υπόκεινται σε μεγάλες, σε υψηλό ποσοστό μη αναστρέψιμες, μεταβολές εντός του ασκού που πιθανόν να οδηγήσει σε απρόβλεπτες και κυρίως αρνητικές επιδράσεις στον οργανισμό του δέκτη. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια εντός του ασκού μπορεί να μην οδηγήθηκαν σε αιμόλυση όμως έχασαν επιφάνεια μέσω κυστιδίων στον εξωκυττάριο χώρο εντός του ασκού με ουσίες και πρωτεΐνες οι οποίες είναι βλαπτικές για τα κύτταρα και θεωρούνται κυτταρικά «απόβλητα». Το σχήμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων έχει παραμορφωθεί ανεπανόρθωτα, λόγω μετασχηματισμού του κυττάρου κατά την διάρκεια της αποθήκευσης εντός των ασκών. Η συγκεκριμένη μεταβολή καθιστά το ερυθρό αιμοσφαίριο μη λειτουργικό καθώς το σχήμα του πλέον δεν του επιτρέπει να μεταβεί σε όλα τα σημεία της κυκλοφορίας του σώματος.
- 2) Τα υψηλά ποσοστά έκθεσης PS στην εξωτερική κυτταρική επιφάνεια, καθώς και ο σχηματισμός και η απελευθέρωση μικροκυστιδίων από τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά την διάρκεια της αποθήκευσης εντός των ασκών, πυροδοτεί από τον οργανισμό του δέκτη την διαδικασία της απομάκρυνσης των συγκεκριμένων κυττάρων με φαγοκυττάρωση. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια του δότη μόλις ενταχθούν στην κυκλοφορία του δέκτη με το συγκεκριμένο υψηλό ποσοστό PS θα απομακρυνθούν από

τα λευκά αιμοσφαίρια. Το ποσοστό των ερυθρών αιμοσφαιρίων που δεν θα απομακρυνθεί από την κυκλοφορία του δέκτη δεν μπορεί να υπολογιστεί, αλλά ταυτόχρονα δεν θα είναι επαρκές για την φυσιολογική λειτουργία και την επάνοδό της αιματολογικής κυκλοφορίας του δέκτη.

Σίγουρα περαιτέρω μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν για την ανεύρεση αποτελεσμάτων και κυρίως λύσεων για ένα θέμα που ίσως διευρύνει τον κύκλο εύρεσης αποδεκτών δοτών, πράγμα που αποτελεί τον μόνιμο αγώνα παγκοσμίως για την Αιμοδοσία. Από την συγκεκριμένη έρευνα, παρά τον μικρό αριθμό δειγμάτων, ο έλεγχος για ανεπάρκεια του ενζύμου G-6-PD πρέπει να συνιστάται πριν από κάθε αιμοληψία καθώς και οι μονάδες με το συγκεκριμένο τύπο αίματος να απορρίπτονται. Οι μονάδες θεωρούνται ανεπαρκείς και οι επιπτώσεις στην υγεία του δέκτη μετά από χορήγησή μια τέτοιας μονάδας αίματος, σύμφωνα με τις υψηλές τιμές των μετρήσεων που παρατηρήθηκαν στην έρευνα, μπορεί να είναι αρνητικές.

Βιβλιογραφία

- 1) Anna L. Peters and Cornelis J.F. Van Noorden, *Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency and Malaria: Cytochemical Detection of Heterozygous G6PD Deficiency in Women*, Journal of Histochemistry and Cytochemistry (JCH), Nov 2009; 57(11): 1003–1011.
- 2) Hung-Yao Ho, Mei-Ling Cheng, Daniel Tsun-Yee Chiu, *G6PD - An Old Bottle with New Wine*, Chang Gung Med J. 2005 Sep;28(9):606-12.
- 3) JENNIFER E. FRANK, MAJ, MC, *Diagnosis and management of G6PD deficiency*, Martin Army Community Hospital, Fort Benning, Georgia Am Fam Physician. USA, 2005 Oct 1; 72(7):1277-1282.
- 4) Robert C. Stanton, *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival*, IUBMB Life. May 2012; 64(5): 362–369. Published online Mar 20, 2012.
- 5) Cpt Ali R Elyassi and Maj Henry H Rowshan, *Perioperative Management of the Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficient Patient: A Review of Literature*, Anesthesia Progress- A Journal for Pain and Anxiety control in Dentistry, Anesth Prog. 2009 Fall; 56(3): 86–91.
- 6) Sedano II, Röthlisberger B, Huber AR, *Hereditary enzyme defects of erythrocytes: glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and pyruvate kinase deficiency*, Ther Umsch. 2006 Jan; 63(1):47-56.
- 7) Richard O. Francis, Jeffrey S. Jhang, Huy P. Pham, Eldad A. Hod, James C. Zimring, Steven L. Spitalnik, *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase-Deficiency in Transfusion Medicine: The Unknown Risks*, Vox Sang. Nov 2013; 105(4): 271–282. Published online Jul 2, 2013.
- 8) Sirugo G, Predazzi IM, Bartlett J, Tacconelli A, Walther M, Williams SM, *G6PD A- deficiency and severe malaria in The Gambia: heterozygote advantage and possible homozygote disadvantage*, American Journal of Tropical Medicine Hygiene, 2014 May;90(5):856-9.
- 9) Hsieh YT, Lin MH, Ho HY, Chen LC, Chen CC, Shu JC, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient epithelial cells are less tolerant to infection by Staphylococcus aureus*, PLoS One. 2013 Nov 4; 8(11):e79566.

- 10) Moro F, Gorgone G, Li Volti S, Cavallaro N, Faro S, Curreri R, Mollica F, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and incidence of cataract in Sicily*, Ophthalmic Paediatr Genet. 1985 Apr; 5(3):197-200.
- 11) *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. WHO Working Group, Bull World Health Organ. 1989; 67(6): 601–611.
- 12) Manganelli G, Masullo U, Passarelli S, Filosa S, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: disadvantages and possible benefits*, Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2013 Mar 1; 13(1):73-82.
- 13) Manganelli G, Fico A, Martini G, Filosa S, *Discussion on pharmacogenetic interaction in G6PD deficiency and methods to identify potential hemolytic drugs*, Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2010 Jun; 10(2):143-50.
- 14) Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F, *G6PD deficiency: the genotype-phenotype association*, Blood Rev. 2007 Sep;21(5):267-83. Epub 2007 Jul 3.
- 15) Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E, *The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis*, Blood Cells Mol Dis. 2009 May-Jun;42(3):267-78, Epub 2009 Feb 23.
- 16) Sodeinde O., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*, Baillieres Clin Haematol. 1992 Apr; 5(2):367-82.
- 17) Zhang C, Zhang Z, Zhu Y, Qin S, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a biomarker and potential therapeutic target for cancer*, Anticancer Agents Med Chem. 2014 Feb;14(2):280-9.
- 18) Wajcman H, Galactéros F, *Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: a protection against malaria and a risk for hemolytic accidents*, C R Biol. 2004 Aug;327(8):711-20.
- 19) Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress*, FASEB J. 1994 Feb;8(2):174-81.
- 20) Lucio Luzzatto and Elisa Seneca, *G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications*, Br J Haematol. Feb 2014; 164(4): 469–480, Published online Apr 16, 2014.
- 21) Altikat S, Ciftci M, Buyukokuroglu M.E., *In vitro effects of some anesthetic drugs on enzymatic activity of human red blood cell glucose-6-phosphate dehydrogenase*, Polish J Pharmacol. 2002; 54: 67–71.
- 22) Wuelton M Monteiro, Gabriel P Franca, Gisely C Melo, Amanda LM Queiroz, Marcelo Brito, Henry M Peixoto, Maria Regina F Oliveira, Gustavo

- AS Romero, Quique Bassat, Marcus VG Lacerda, *Clinical complications of G6PD deficiency in Latin American and Caribbean populations: systematic review and implications for malaria elimination programmes*, Malar J. 2014; 13: 70, Published online Feb 25, 2014.
- 23) Peter A. Hecker, Jane A. Leopold, Sachin A. Gupte, Fabio A. Recchia, William C. Stanley, *Impact of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the pathophysiology of cardiovascular disease*, Am J Physiol Heart Circ Physiol. Feb 15, 2013; 304(4): H491–H500, Published online Dec 15, 2012.
- 24) *glucose-6-phosphate dehydrogenase* provided by HGNC, HGNC: HGNC:4057, Gene ID: 2539, updated on 7-Dec-2014.
- 25) Beutler E, Westwood B, Melemed A, Dal Borgo P, Margolis D., *Three new exon 10 glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations*, Blood Cells Mol Dis. 1995;21(1):64-72.
- 26) Fujii H, Miwa S, *Recent progress in the molecular genetic analysis of erythroenzymopathy*, Am J Hematol. 1990 Aug; 34(4):301-10.
- 27) Mehdi Nouraie, Noel S. Reading, Andrew Campbell, Caterina P. Minniti, Sohail R Rana, Lori Luchtman-Jones, Gregory J Kato, Mark Gladwin, Oswaldo L Castro, Josef T. Prchal, Victor R. Gordeuk, *Association of G6PD^{202A,376G} with lower haemoglobin concentration but not increased haemolysis in patients with sickle cell anaemia*, Br J Haematol. Jul 2010; 150(2): 218–225. Published online May 9, 2010.
- 28) Fujii H, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase*, Nihon Rinsho. 1995 May; 53(5):1221-5.
- 29) Muntoni S, Muntoni S., *Gene-nutrient interactions in G6PD-deficient subjects--implications for cardiovascular disease susceptibility*, J Nutrigenet Nutrigenomics. 2008; 1(1-2):49-54.
- 30) Au SW, Gover S, Lam VM, Adams MJ, *Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency*, Structure. 2000 Mar 15; 8(3):293-303.
- 31) Beutler E, Kuhl W, Gelbart T, Forman L, *DNA sequence abnormalities of human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants*, J Biol Chem. 1991 Mar 5;266(7):4145-50.

- 32) van Wijk R, van Solinge WW, *The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis*, Blood. 2005 Dec 15;106(13):4034-42. Epub 2005 Jul 28.
- 33) Valentine WN, Tanaka KR, Paglia DE, *Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies*, Ann Intern Med. 1985 Aug;103(2):245-57.
- 34) T A Pranker, *Enzyme assays in diseases of erythrocytes*, J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol). 1970; 4: 71–74.
- 35) W N Valentine, *Hereditary hemolytic anemias associated with specific erythrocyte enzymopathies*, Calif Med. Apr 1968; 108(4): 280–294.
- 36) Jacobasch G, Rapoport SM, *Hemolytic anemias due to erythrocyte enzyme deficiencies*, Mol Aspects Med. 1996 Apr;17(2):143-70.
- 37) Paul A. Marks, Anne B. Johnson, Erich Hirschberg, *EFFECT OF AGE ON THE ENZYME ACTIVITY IN ERYTHROCYTES*, Proc Natl Acad Sci U S A. Jun 1958; 44(6): 529–536.
- 38) Sedano II, Röthlisberger B, Huber AR, *Hereditary enzyme defects of erythrocytes: glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and pyruvate kinase deficiency*, Ther Umsch. 2006 Jan;63(1):47-56.
- 39) Koralkova P, van Solinge WW, van Wijk R, *Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia - pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis*, Int J Lab Hematol. 2014 Jun;36(3):388-97.
- 40) OMIM[®], *ANEMIA, NONSPHEROCYTIC HEMOLYTIC, DUE TO G6PD DEFICIENCY*
- 41) A M Ferraris, G Broccia, T Meloni, G Forteleoni, and G F Gaetani, *Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and incidence of hematologic malignancy*, Am J Hum Genet. Mar 1988; 42(3): 516–520.
- 42) Youngster I, Arcavi L, Schechmaster R, Akayzen Y, Popliski H, Shimonov J, Beig S, Berkovitch M, *Medications and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: an evidence-based review*, Drug Saf. 2010 Sep 1;33(9):713-26.
- 43) Cappellini MD, Fiorelli G, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*, Lancet. 2008 Jan 5;371(9606):64-74.
- 44) Hundsdoerfer P, Vetter B, Kulozik AE, *Chronic haemolytic anaemia and glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency. Case report and review of the literature*, Acta Haematol. 2002;108(2):102-5.

- 45) Salati LM, Amir-Ahmady B, *Dietary regulation of expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase*, Annu Rev. Nutr. 2001;21:121-40.
- 46) Valaes T, *Severe neonatal jaundice associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: pathogenesis and global epidemiology*, Acta Paediatr Suppl. 1994 Mar;394:58-76.
- 47) Schuurman M, van Waardenburg D, Da Costa J, Niemarkt H, Leroy P, *Severe hemolysis and methemoglobinemia following fava beans ingestion in glucose-6-phosphatase dehydrogenase deficiency: case report and literature review*, Eur J Pediatr. 2009 Jul;168(7):779-82, Epub 2009 Mar 5.
- 48) Minucci A, Giardina B, Zuppi C, Capoluongo E, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay: How, when, and why?*, IUBMB Life. 2009 Jan;61(1):27-34.
- 49) Chhabra A, Raj D, Choudhary PN, Grover A, *Interesting case of G6PD deficiency anemia with severe hemolysis*, Asian J Transfus Sci. 2013 Jul;7(2):147-8.
- 50) Lisker R, *Overview of erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency*, Rev Invest Clin. 1992 Apr-Jun;44(2):277-82.
- 51) Joseph M. Rifkind and Erika Nagababu, *Hemoglobin Redox Reactions and Red Blood Cell Aging*, Antioxid Redox Signal. Jun 10, 2013; 18(17): 2274–2283.
- 52) Erwin Weiss, David Charles Rees, John Stanley Gibson, *Role of Calcium in Phosphatidylserine Externalisation in Red Blood Cells from Sickle Cell Patients*, Anemia. 2011; 2011: 379894. Published online Sep 26, 2010.
- 53) Kanti Bhooshan Pandey, Syed Ibrahim Rizvi, *Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans*, Oxid Med Cell Longev. 2010 Jan-Feb; 3(1): 2–12.
- 54) Saghi Ghaffari, *Oxidative Stress in the Regulation of Normal and Neoplastic Hematopoiesis*, Antioxid Redox Signal. Nov 2008; 10(11): 1923–1940.
- 55) Zachara BA, Gromadzińska J, Wasowicz W, Zbróg Z, *Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review*, Acta Biochim Pol. 2006;53(4):663-77. Epub 2006 Dec 11.
- 56) Kimberly D. Jacob, Nicole Noren Hooten, Andrzej R. Trzeciak, Michele K. Evans, *Markers of Oxidant Stress that are Clinically Relevant in Aging and*

Age-related Disease, Mech Ageing Dev. Mar 2013; 134(0): 139–157. Published online Feb 18, 2013.

57) Sergey Dikalov, *Crosstalk between mitochondria and NADPH oxidases*, Free Radic Biol Med. Oct 1, 2011; 51(7): 1289–1301. Published online Jul 6, 2011.

58) Grant R. Drummond, Stavros Selemidis, Kathy K. Griendling, Christopher G. Sobey, *Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets*, Published in final edited form as: Nat Rev Drug Discov. Jun 2011; 10(6): 453–471.

59) Nicolas Demaurex and Gábor L Petheö, *Electron and proton transport by NADPH oxidases*, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. Dec 29, 2005; 360(1464): 2315–2325. Published online Nov 4, 2005.

60) Yvonne Groemping and Katrin Rittinger, *Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective*, Biochem J. Mar 15, 2005; 386(Pt 3): 401–416. Published online Mar 8, 2005. Prepublished online Dec 10, 2004.

61) Wolin MS, Ahmad M, Gupte SA, *Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts, current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH*, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005 Aug;289(2):L159-73.

62) S Piomelli, *Chemical toxicity of red cells*, Environ Health Perspect. Jun 1981; 39: 65–70.

63) Fibach E, Rachmilewitz E, *The role of oxidative stress in hemolytic anemia*, Curr Mol Med. 2008 Nov;8(7):609-19.

64) Spolarics Z, *Endotoxemia, pentose cycle, and the oxidant/antioxidant balance in the hepatic sinusoid*, J Leukoc Biol. 1998 May;63(5):534-41.

65) Randy S. Sprague and Mary L. Ellsworth, *Erythrocyte-derived ATP and perfusion distribution: Role of intracellular and intercellular communication*, Microcirculation. Jul 2012; 19(5): 430–439.

66) Alexander W. Lohman, Marie Billaud, Brant E. Isakson, *Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall*, Cardiovasc Res. Aug 1, 2012; 95(3): 269–280. Published online Jun 7, 2012.

67) Massimo Castagnola, Irene Messina, Maria Teresa Sanna, Bruno Giardina, *Oxygen-linked modulation of erythrocyte metabolism: state of the art*, Blood Transfus. Jun 2010; 8(Suppl 3): s53–s58.

- 68) Robert C. Stanton, *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival*, IUBMB Life. May 2012; 64(5): 362–369. Published online Mar 20, 2012.
- 69) Brenda E. Ryman, *The glycogen storage diseases*, J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol). 1974; 8: 106–121.
- 70) Ganesan S, Chaurasiya ND, Sahu R, Walker LA, Tekwani BL, *Understanding the mechanisms for metabolism-linked hemolytic toxicity of primaquine against glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes: evaluation of eryptotic pathway*, Toxicology. 2012 Mar 29;294(1):54-60, Epub 2012 Feb 6.
- 71) Rifkind JM, Nagababu E, *Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging*, Antioxid Redox Signal. 2013 Jun 10;18(17):2274-83.
- 72) Matthew Dodson, Victor Darley-Usmar, Jianhua Zhang, *Cellular Metabolic and Autophagic Pathways: Traffic Control by Redox Signaling*, Free Radic Biol Med. Oct 2013; 63: 207–221. Published online May 20, 2013.
- 73) Perl A, Hanczko R, Telarico T, Oaks Z, Landas S, *Oxidative stress, inflammation and carcinogenesis are controlled through the pentose phosphate pathway by transaldolase*, Trends Mol Med. 2011 Jul;17(7):395-403.
- 74) Marianna H. Antonelou, Anastasios G. Kriebardis, Issidora S. Papassideri, *Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice*, Blood Transfus. Jun 2010; 8(Suppl 3): s39–s47.
- 75) Allan Doctor, Phil Spinella, *Effect of Processing and Storage on RBC function in vivo*, Semin Perinatol. Aug 2012; 36(4): 248–259.
- 76) Pampee P. Young, Bryan A. Cotton, Lawrence T. Goodnough, *Massive Transfusion Protocols for Patients With Substantial Hemorrhage*, Transfus Med Rev. Oct 2011; 25(4): 293–303. Published online Jun 12, 2011.
- 77) Tatsuro Yoshida, Sergey S. Shevkoplyas, *Anaerobic storage of red blood cells*, Blood Transfus. Oct 2010; 8(4): 220–236.
- 78) Massimo Castagnola, Irene Messana, Maria Teresa Sanna, Bruno Giardina, *Oxygen-linked modulation of erythrocyte metabolism: state of the art*, Blood Transfus. Jun 2010; 8(Suppl 3): s53–s58.
- 79) Renzaho AM, Husser E, Polonsky M, *Should blood donors be routinely screened for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency? A systematic review of clinical studies focusing on patients transfused with glucose-6-*

- phosphate dehydrogenase-deficient red cells*, Transfus Med Rev. 2014 Jan;28(1):7-17.
- 80) Maffi D¹, Pasquino MT, Mandarino L, Tortora P, Girelli G, Meo D, Grazzini G, Caprari P, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Italian blood donors: prevalence and molecular defect characterization*, Vox Sang. 2014 Apr;106(3):227-33, Epub 2013 Oct 18.
- 81) Francis RO, Jhang JS, Pham HP, Hod EA, Zimring JC, Spitalnik SL, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in transfusion medicine: the unknown risks*, Vox Sang. 2013 Nov;105(4):271-82.
- 82) Emamghorashi F, Hoshmand F, Mohtashamifar A, *Screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in blood donors*, Hematology. 2010 Apr;15(2):122-4.
- 83) Zekavat OR¹, Karimi M, Rahmanian F, *Is red cell from an otherwise healthy G6PD-deficient donor efficient for transfusion to favism patients?*, Indian J Hematol Blood Transfus. 2009 Mar;25(1):23-6, Epub 2009 Apr 6.
- 84) Omid Reza Zekavat, Mehran Karimi, Fatemeh Rahmanian, *Is red cell from an otherwise healthy G6PD-deficient donor efficient for transfusion to favism patients?*, Indian J Hematol Blood Transfus. Mar 2009; 25(1): 23–26. Published online Apr 6, 2009.
- 85) Nabavizadeh SH, Anushiravani A, *The prevalence of G6PD deficiency in blood transfusion recipients*, Hematology. 2007 Feb;12(1):85-8.
- 86) Mohammed K. Alabdulaali, Khaled M. Alayed, Abdulaziz F. Alshaikh, Shihab A. Almashhadani, *Prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle cell trait among blood donors in Riyadh*, Asian J Transfus Sci. Jan 2010; 4(1): 31–33.
- 87) Flatt JF, Bawazir WM, Bruce LJ, *The involvement of cation leaks in the storage lesion of red blood cells*, Front Physiol. 2014 Jun 17;5:214, eCollection 2014.
- 88) Beutler E, Vulliamy TJ. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. Blood Cells Mol Dis 2002;28:93-103.
- 89) D. Maffi, M. T. Pasquino, L. Mandarino, P. Tortora, G. Girelli, D. Meo, G. Grazzini, P. Carpari, *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Italian blood donors: prevalence and molecular defect characterization*, The international Journal of Transfusion Medicine. 2014;106:227-233
- 90) Angelo D'Alessandro, Anastasios G. Kriebardis, Sara Rinalducci, Marianna H. Antonelou, Kirc C. Hansen, Issidora S. Papassideri, and Lello

Zolla, *An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies*, *Transfusion*.2015;55:205-219

91) A. Kriebardis, M. Antonelou, K. Stamoulis, I. Papassideri, *Cell-derived microparticles in stored blood products: innocent-bystanders or effective mediators of post-transfusion reactions?*, *Blood transfusion*.2012:s25-38

92) M. Antonelou, A. Kriebardis, K. Stamoulis, Issidora S. Papassideri, V. Tzounakas, A. Velentzas, *Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: A time-course evaluation from shape to proteome*. *Journal of Proteomics* 76.2012.:220-238.

93) A. Kriebardis, M. Antonelou, , K. Stamoulis, Issidora S. Papassideri, E. Economou-Petersen, L. Margaritis, *RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components*. *Transfusion*.2008;48:1943-1953

94) M. Antonelou, A. Kriebardis Issidora, S. Papassideri, *Aging and death signaling in mature red cells: from basic science to transfusion practice*. *Blood Transfusion*.2010;8suppl3:s39-s47.

95) Πάγκαλης Γ., *Αιματολογία στην κλινική πράξη*, Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, Αθήνα, 2008

96) D. Robert Sutherland et al., *Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry*, *Cytometry B Clin Cytom*. 2012 Jul;82(4):195-208