



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών

Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων

**Μελέτη του οξειδοαναγωγικού δυναμικού ερυθρών αιμοσφαιρίων-
πλάσματος σε ασθενείς με διπλή ετεροζυγωτία β -
θαλασσαιμίας/δρεπανοκυτταρικής νόσου**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ

Τάτου Χριστίνας

A. M. 62116017

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Κριεμπάρδης Αναστάσιος

ΑΙΓΑΛΕΩ

2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
1.Αίμα.....	6
1.1 Πλάσμα.....	6
1.2 Ερυθρά αιμοσφαίρια.....	6
1.3 Λευκά αιμοσφαίρια.....	7
1.4 Αιμοπετάλια.....	8
2. Μembrάνη ερυθρών αιμοσφαιρίων.....	8
2.1 Πρωτεΐνες μεμβράνης ερυθρών αιμοσφαιρίων.....	9
2.1.1 Πρωτεΐνη Ζώνη - 3	9
2.1.2 Πρωτεΐνη 4.1 R.....	10
2.1.3 Ακτίνη.....	11
2.1.4 Σπεκτρίνη.....	11
2.1.5 Αγκυρίνη.....	12
2.2 Λιπίδια μεμβράνης ερυθρών αιμοσφαιρίων.....	12
3.Αιμοσφαιρίνη.....	13
4.Οξειδωτικό στρες.....	15
4.1 Δραστικές ρίζες οξυγόνου.....	16
4.2 Οξείδωση πρωτεϊνών	17
4.3 Οξείδωση λιπιδίων.....	18

5. Παθοφυσιολογία β - θαλασσαιμίας.....	19
5.1 Επιδημιολογία β - θαλασσαιμίας	19
5.2 Μοριακή βάση β - θαλασσαιμίας.....	20
5.3 Η αιμοσφαιρίνη στη β - θαλασσαιμία.....	22
5.4 β - θαλασσαιμία και μεταβολές στη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων.....	23
5.5 Το οξειδωτικό στρες στην β - θαλασσαιμία.....	23
6. Παθοφυσιολογία δρεπανοκυτταρικής αναιμίας.....	24
6.1 Επιδημιολογία δρεπανοκυτταρικής αναιμίας.....	24
6.2 Μοριακή βάση δρεπανοκυτταρικής αναιμίας.....	25
6.3 Η αιμοσφαιρίνη στη δρεπανοκυτταρική αναιμία.....	26
6.4 Δρεπανοκυτταρική αναιμία και μεταβολές στην μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων.....	26
6.5 Το οξειδωτικό στρες στη δρεπανοκυτταρική αναιμία.....	27
7. Ασθενείς με διπλή ετεροζυγωτία β - θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής αναιμίας.....	28
8. Ενδοκυττάρια οξειδωτικά γεγονότα.....	29
8.1 Φωσφολιπιδιακή ασυμμετρία, έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης και ερυθρόπτωση.....	29
8.2 Σχηματισμός αιμοχρωμάτων, οξείδωση Ζώνης - 3 και γήρανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.....	31

8.3 Οξειδωτικό στρες και επιπτώσεις στον κυτταροσκελετό των ερυθρών αιμοσφαιρίων.....	32
8.4 Η δράση των δραστικών ριζών οξυγόνου ως μόρια σηματοδότησης και η συμμετοχή τους στην αιμόλυση.....	32
8.5 Οξειδωτικό στρες και μη αποτελεσματική ερυθροποίηση.....	33
8.6 Επίδραση των δραστικών ριζών οξυγόνου στον πολλαπλασιασμό των ερυθροειδικών κυττάρων και επιταχυνόμενη διαφοροποίηση.....	34
9. Εξωκυττάρια οξειδωτικά γεγονότα.....	35
10. Προστατευτικά μόρια και αντιοξειδωτικά ένζυμα στα ερυθρά αιμοσφαίρια.....	36
11. Εξωγενής αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες στα ερυθρά αιμοσφαίρια.....	37
Βιβλιογραφία.....	38

Περίληψη

Τόσο η β - θαλασσαιμία όσο και η δρεπανοκυτταρική αναιμία αποτελούν τις πιο συνηθισμένες αιματολογικές ασθένειες, ειδικά στις Μεσογειακές χώρες. Οι ομόζυγοι εμφανίζουν σοβαρή αναιμία και χρειάζονται συχνές μεταγγίσεις, ενώ οι ετερόζυγοι ή φορείς των ασθενειών είναι ασυμπτωματικοί ή εμφανίζουν ελαφριά αιμόλυση σε συνθήκες στρες. Αρκετά μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού εμφανίζουν διπλή ετεροζυγωτία β - θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, με τα συμπτώματα της ασθένειας να κυμαίνονται από ήπια έως πολύ σοβαρά. Μία από τις πιο συνηθισμένες επιπλοκές της ασθένειας είναι το οξειδωτικό στρες και η παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου. Αυτό οφείλεται όχι μόνο στις πολλαπλές μεταγγίσεις που μπορεί να χρειάζονται ορισμένοι ασθενείς με σοβαρά συμπτώματα, αλλά και λόγω της αυξημένης αιμόλυσης και της αυτοοξειδωσης της αιμοσφαιρίνης. Αυτά τα φαινόμενα είναι πολύ έντονα στους ασθενείς, καθώς η διατάραξη της φυσιολογικής δομής της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού των ερυθρών αιμοσφαιρίων, έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ευθραυστότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων και την καταστροφή τους. Πρόκειται για έναν φαύλο κύκλο, καθώς η καταστροφή των ερυθρών προκαλεί οξειδωτικό στρες και παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου, οι οποίες προκαλούν περαιτέρω καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι ικανές να προκαλούν τόσο ενδοκυττάρειες, όσο και εξωκυττάρειες βλάβες. Εκτός από την καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων μπορούν να αντιδρούν και να οξειδώνουν διάφορα βιομόρια, όπως είναι τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA, προκαλώντας βλάβες στα κύτταρα, τους ιστούς και τα όργανα του οργανισμού. Οι φυσικοί μηχανισμοί προστασίας από το οξειδωτικό στρες των ερυθρών αιμοσφαιρίων, καθώς και τα ένζυμα που περιέχουν δεν αρκούν να εξουδετερώσουν τις δραστικές ρίζες οξυγόνου. Για αυτό τον λόγο έγιναν έρευνες και παρατηρήθηκε πως η χορήγηση φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως για παράδειγμα η κουρκουμίνη, μείωσαν το επίπεδο των δραστικών ριζών οξυγόνου και τις επιβλαβείς επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό.

1. Αίμα

Το αίμα αποτελεί μία εξειδικευμένη μορφή συνδετικού ιστού, ο οποίος συντίθενται από κύτταρα και πλάσμα. Τα κύτταρα του αίματος, τα οποία αιωρούνται στο πλάσμα είναι τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια (κοκκιοκύτταρα, μονοπύρρηνα, λεμφοκύτταρα) και τα αιμοπετάλια. Το φυσιολογικό pH του αίματος είναι 7.35 – 7.45 και ο μέσος όγκος του 5 λίτρα σε ενήλικο άτομο και προωθείται συνεχώς με ρυθμικές συσπάσεις της καρδιάς και μονόδρομη κίνηση μέσα στο κλειστό κυκλοφορικό σύστημα. Η κύρια λειτουργία του αίματος είναι η μεταφορά O₂, CO₂, μεσολαβητών, ορμονών καθώς και άλλων διάφορων ουσιών στα κύτταρα και τους ιστούς όλου του σώματος. Επίσης, έχει σημαντικό ρόλο στην αποβολή υπολειμμάτων του μεταβολισμού μέσω των απεκκριτικών οργάνων, στη ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος και στην διατήρηση της οξεοβασικής και ωσμωτικής ισορροπίας του σώματος.

1.1 Πλάσμα

Το πλάσμα είναι ένα υδατικό διάλυμα που περιέχει διάφορες ουσίες με μεγάλο ή μικρό μοριακό βάρος. Αυτές οι ουσίες είναι κυρίως πρωτεΐνες, αναπνευστικά αέρια, νιτρώδη προϊόντα, ορμόνες και ηλεκτρολύτες. Οι κύριες πρωτεΐνες του πλάσματος είναι: η λευκωματίνη, οι α- / β- και γ-σφαιρίνες, το ινωδογόνο, οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος και οι λιποπρωτεΐνες υψηλής και χαμηλής πυκνότητας. Στο πλάσμα βρίσκονται τα κύτταρα του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια), γεγονός που το καθιστά την εξωκυττάρια μήτρα των κυττάρων αυτών. Αποτελεί περίπου το 55% του συνολικού όγκου αίματος του σώματος και έχει σημαντικό ρόλο καθώς διατηρεί τους ηλεκτρολύτες του σώματος σε ισορροπία λόγω της ενδοαγγειακής οσμωτικής δράσης του, αλλά και προστατεύει από διάφορες λοιμώξεις (1). Λόγω της μεγάλης ποσότητας του η σύνθεση του είναι συνήθως ένας δείκτης της μέσης σύνθεσης των εξωκυττάρων υγρών των ιστών.

1.2 Ερυθρά αιμοσφαίρια

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι ο μεγαλύτερος πληθυσμός κυττάρων του αίματος και αποτελούν το 25% του συνολικού αριθμού των κυττάρων ενός οργανισμού. Οι φυσιολογικές τιμές τους είναι 4.6 – 6.2 εκατομμύρια/mm³ στους άνδρες και 4.2 – 5.4 εκατομμύρια/mm³ στις γυναίκες. Τα ερυθρά

αιμοσφαίρια είναι κύτταρα στο τελευταίο στάδιο διαφοροποίησης, είναι απύρνα και στο κυτταρόπλασμα τους βρίσκεται σε διαλυτή μορφή η αιμοσφαιρίνη, η πρωτεΐνη μεταφορέας του O₂. Έχουν σχήμα αμφίκυκλου δίσκου, διευκολύνοντας την μεταφορά οξυγόνου λόγω αύξησης της αναλογίας του εμβαδού της επιφάνειας σε σχέση με τον όγκο, και είναι εύκαμπτα γεγονός που τους επιτρέπει να προσαρμόζονται στο ανώμαλο σχήμα και στη μικρή διάμετρο των τριχοειδών. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια παράγονται στον μυελό των οστών με την διαδικασία της ερυθροποίησης από τα προγονικά βλαστικά κύτταρα (stem cells). Τα ώριμα ερυθροκύτταρα ζούν και κυκλοφορούν στον ανθρώπινο οργανισμό για περίπου 100 - 120 ημέρες και στην συνέχεια απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω της φαγοκυττάρωσης από τα μακροφάγα του σπλήνα και του ήπατος.

1.3 Λευκά αιμοσφαίρια

Τα λευκά αιμοσφαίρια αποτελούν το 1% του αίματος. Παράγονται στο μυελό των οστών και έχουν διάρκεια ζωής στην κυκλοφορία περίπου 1 - 3 ημέρες. Η φυσιολογική τιμή τους είναι 4.000 - 10.000/μλ. Τα λευκά αιμοσφαίρια μεταναστεύουν στους ιστούς, όπου επιτελούν πολλές λειτουργίες σχετιζόμενες με την ανοσία, την άμυνα έναντι των μικροοργανισμών που εισέρχονται στον οργανισμό και την αποκατάσταση των τραυματισμένων ιστών. Επίσης, σχετίζονται με την δημιουργία φλεγμονών, αλλά και την εκδήλωση αλλεργικών αντιδράσεων. Τα λευκά αιμοσφαίρια διακρίνονται στα κοκκιοκύτταρα που περιέχουν πρωτογενή και ειδικά ή δευτερογενή κοκκία (ηωσινόφιλα, βασεόφιλα, ουδετερόφιλα) και στα άκοκκα κύτταρα που περιέχουν μόνο πρωτογενή κοκκία (μονοπύρνα, λεμφοκύτταρα).

Τα ουδετερόφιλα αποτελούν το 50 - 60% των λευκοκυττάρων, έχουν λεπτά κοκκία τα οποία δεν χρωματίζονται με τις συνήθεις χρωστικές, ο πυρήνας τους έχει 2 - 5 λοβούς και αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στην εισβολή ξένων μικροοργανισμών (φαγοκυτταρική δράση). Τα ηωσινόφιλα αποτελούν το 1 - 4% του λευκοκυτταρικού τύπου, έχουν πυκνά κοκκία τα οποία χρωματίζονται κόκκινα και αντιπροσωπεύουν λυσοσώματα. Ο πυρήνας τους είναι δίλοβος και στο κυτταρόπλασμά τους υπάρχουν κοκκία που περιέχουν ισταμίνη. Αυξάνονται σε παρασιτώσεις και αλλεργικές αντιδράσεις, είναι ενεργά στην φαγοκυττάρωση συμπλέγματος αντιγόνου - αντισώματος, αλλά όχι στη φαγοκυττάρωση βακτηρίων ή άλλων ξένων σωματιδίων. Τα βασεόφιλα αποτελούν το 0 - 1% του λευκοκυττάρων, έχουν πυκνά κοκκία τα οποία βάφονται κυανά και περιέχουν ισταμίνη και ηπαρίνη. Ο πυρήνας τους έχει σχήμα S και η λειτουργική αποστολή τους δεν είναι ξεκάθαρη, αλλά φαίνεται ότι σχετίζεται με την φαγοκυττάρωση μικροβίων.

Τα λεμφοκύτταρα αποτελούν το 20 - 50% των λευκών αιμοσφαιρίων, έχουν μεγάλο πυρήνα ο οποίος καταλαμβάνει σχεδόν ολόκληρο το κυτταρόπλασμα και δεν έχουν κοκκία. Διακρίνονται σε 3 τύπους: Τα Β - λεμφοκύτταρα που συμμετέχουν στην χυμική ανοσία (έκκριση αντισωμάτων), στα Τ - λεμφοκύτταρα που συμμετέχουν στην κυτταρική ανοσία (φαγοκυττάρωση) και στα ΝΚ κύτταρα φυσικοί φονείς. Τέλος τα μονοκύτταρα αποτελούν το 2 - 10% των λευκών αιμοσφαιρίων και μετά από σύντομη παραμονή τους στην κυκλοφορία μεταναστεύουν στους ιστούς, όπου χαρακτηρίζονται ως μακροφάγα και ανήκουν στα φαγοκύτταρα.

1.4 Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια προέρχονται από τον μυελό των οστών και αποτελούν κυτταροπλασματικά θραύσματα των μεγακαρυοκυττάρων. Έχουν διάρκεια ζωής 5 - 8 ημέρες και αποτελούν πηγή αυξητικών παραγόντων που βοηθούν στην επιδιόρθωση μικρών χασμάτων και ρωγμών στο τοίχωμα των μικρών αιμοφόρων αγγείων. Επίσης, συμμετέχουν στην πρωτογενή αιμόσταση δημιουργώντας θρόμβους και εμποδίζοντας έτσι την απώλεια αίματος.

2. Μembrάνη ερυθρών αιμοσφαιρίων

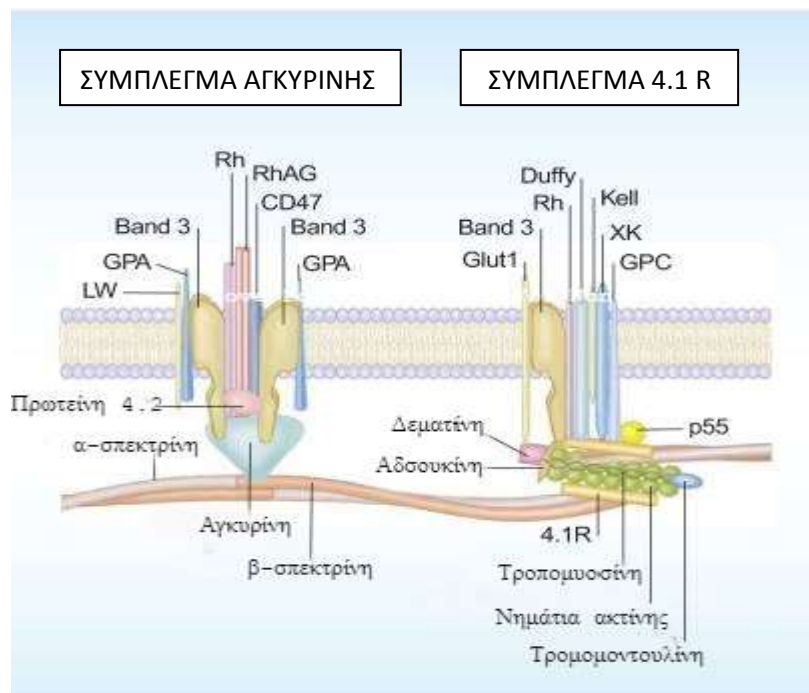
Η μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελείται από 40% λιπίδια, 10% υδατάνθρακες και 50% πρωτεΐνες. Τα φωσφολιπίδια οργανώνονται σε δύο στιβάδες (διπλοστιβάδα), γεγονός που αυξάνει την σταθερότητα της μεμβράνης, και ανάμεσα τους εισχωρούν μόρια χοληστερόλης. Η εξωτερική στιβάδα έχει περισσότερη φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη, ενώ η εσωτερική έχει περισσότερη φωσφατιδυλοσερίνη και φωσφατιδυλαιθονολαμίνη (2). Οι περισσότερες πρωτεΐνες των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι διαμεμβρανικές, όπως οι διάλυτοι ιόντων, ο μεταφορέας των ανιόντων ή πρωτεΐνη Ζώνης - 3, η γλυκοφορίνη Α κ.α. (3). Υπάρχουν, επίσης, περιφερικές πρωτεΐνες που συνδέονται με την εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, όπως η σπεκτρίνη. Τα διμερή της σπεκτρίνης σχηματίζουν ένα δίκτυο και ενώνονται με τα υποκείμενα ινίδια ακτίνης καθώς και με την ανκυρίνη, η οποία στη συνέχεια προσδένει αυτό το δίκτυο στις γλυκοφορίνες και πρωτεΐνες της Ζώνης - 3 (4). Αυτό το υπομεμβρανώδες πλέγμα, αλλά και οι δεσμοί και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης προσδίδουν στα ερυθρά

αιμοσφαίρια την ικανότητα της συνεχούς παραμόρφωσης καθώς διέρχονται μέσα από τα μικρά αιμοφόρα αγγεία και τα όργανα του σώματος (5) (Εικόνα 1).

2.1 Πρωτεΐνες μεμβράνης ερυθρών αιμοσφαιρίων

2.1.1 Πρωτεΐνη Ζώνη - 3

Πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων και αποτελεί μέλος της οικογένειας των διττανθρακικών μεταφορέων πρωτεϊνών ανταλλαγής ανιόντων. Αποτελεί την πιο άφθονη πρωτεΐνη της μεμβράνης με 106 αντίγραφα ανά ερυθρό αιμοσφαίριο. Η Ζώνη - 3 είναι απαραίτητη για πολλές φυσιολογικές λειτουργίες των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όπως η μεταφορά CO₂ στο αίμα, η διατήρηση των μηχανικών και δομικών ιδιοτήτων των ερυθρών, καθώς και του ενδοκυττάριου pH και η έκκριση των ισοδύναμων βάσεων και οξέων (6). Αποτελείται από 911 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 100 kDa και κωδικοποιείται από το γονίδιο SLC4A1. Η Ζώνη - 3 έχει περιορισμένη έκφραση, και συναντάται μόνο στα ερυθρά αιμοσφαίρια και στα α - παρεμβαλλόμενα κύτταρα του νεφρού.



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ανατύπωση από (3).

Στην πρωτεΐνη αυτή διακρίνονται τρεις περιοχές, η N-τερματική κυτταροπλασματική περιοχή(αμινοξέα 1-359) που δεσμεύει περιφερικές πρωτεΐνες της μεμβράνης και είναι θέση «αγκυροβόλησης» της μεμβράνης για τον κυτταροσκελετό των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Αυτή η περιοχή δεσμεύει, επίσης την αγκυρίνη, την πρωτεΐνη 4.1, την πρωτεΐνη 4.2, καθώς και αποτελεί τη θέση για ανταγωνιστική σύνδεση δεοξυαιμοσφαιρίνης και αρκετών γλυκολυτικών ενζύμων. Το υπόλοιπο C-τερματικό πεδίο (αμινοξέα 360-911) πραγματοποιεί ανταλλαγή ανιόντων και περιλαμβάνει 12-14 διαμεμβρανικά τμήματα με μικρή (33 αμινοξέα) κυτταροπλασματική ουρά. Η C-τερματική ουρά φιλοξενεί μια θέση δέσμευσης για την ανθρακική ανυδράση II (7). Η πρωτεΐνη Ζώνη - 3 αλληλεπιδρά με αρκετές πρωτεΐνες της μεμβράνης των ώριμων ερυθρών αιμοσφαιρίων, όπως η γλυκοφορίνη A (GPA) και το αντιγόνο Rh (8).

2.1.2 Πρωτεΐνη 4.1 R

Η πρωτεΐνη 4.1 R είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών 4.1 των θηλαστικών, η οποία περιλαμβάνει και τις 4.1 N, 4.1 G, 4.1 B που εκφράζονται σε πολλούς τύπους κυττάρων αλλά όχι στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Αποτελεί συστατικό του κυτταροσκελετού της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και είναι απαραίτητη για το φυσιολογικό σχήμα, αλλά και για την ακεραιότητα της μεμβράνης. Η κλασική λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής είναι να συμβάλλει στις μηχανικές και χημικές ιδιότητες της μεμβράνης, προάγοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ σπεκτρίνης και ακτίνης. Επίσης, η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για τη σταθερή συσσώρευση ενός αριθμού πρωτεϊνών της μεμβράνης, στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων (9).



Εικόνα 2. Δομή του πεπτιδίου των 80 kDa της πρωτεΐνης 4.1 R που βρίσκεται στα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια των θηλαστικών. Στην εικόνα φαίνονται: η περιοχή FERM, η περιοχή FA, η περιοχή SAB και η τερματική περιοχή CTD. Ανατύπωση από (9).

Η πρωτεΐνη 4.1 R αποτελείται από τέσσερις λειτουργικές περιοχές: την N-τερματική περιοχή 30 kDa, η οποία αναφέρεται και ως FERM (F για την πρωτεΐνη 4.1R, E για την εζρίνη, R για την ακτιζίνη

και M για τη μεζίνη), την περιοχή 16 kDa (FA), την περιοχή δέσμευσης σπεκτρίνης - ακτίνης 10 kDa (SAB) και την C - τερματική περιοχή 24 kDa (CTD) (10). Αναλυτικά στην περιοχή FERM συνδέονται πολλές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως η Ζώνη - 3 και η γλυκοφορίνη C, η φωσφατιδυλοσερίνη, η πρωτεΐνη p55, η 4,5 - δισφωφορική φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (PIP2) και η καλμοδουλίνη. Η περιοχή FA αποτελεί θέση φωσφορυλίωσης από έναν αριθμό πρωτεϊνικών κινασών, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεϊνικής κινάσης C (η φωσφορυλίωση ρυθμίζει εδώ τις αλληλεπιδράσεις τόσο των FERM όσο και των SAB περιοχών) (11). Η περιοχή SAB που βοηθά τη σύνδεση της σπεκτρίνης με την ακτίνη (12) και την τερματική περιοχή CTD, η οποία όπως και η SAB, είναι μοναδική στις 4.1 πρωτεΐνες (13) (Εικόνα 2).

2.1.3 Ακτίνη

Η ακτίνη είναι μία σφαιρική πρωτεΐνη που επιτελεί διάφορες λειτουργίες. Έχει κεντρικό ρόλο στις μηχανικές και σηματοδοτικές λειτουργίες των κυττάρων, αλλά και στην σωστή οργάνωση τους (14). Λόγω αυτών των σημαντικών λειτουργιών της ακτίνης ο κατάλληλος πολυμερισμός, αλλά και η οργάνωση της είναι υψίστης σημασίας, τόσο για τη διατήρηση της αντοχής όσο και για την ικανότητα παραμόρφωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ο σχηματισμός νηματίων ακτίνης (F - ακτίνη), ρυθμίζεται από το ρυθμιστικό σύμπλεγμα ακτίνης ARP 2/3, το οποίο διεγείρει την μονομερή σφαιρική ακτίνη (G - ακτίνη) να πολυμεριστεί. Τα νεοσυσταθέντα νημάτια ακτίνης σταθεροποιούνται από διάφορες πρωτεΐνες που την καλύπτουν, όπως η τροπομυοσίνη, η τροπομοντουλίνη, η δεματίνη, η capZ, η p55 και η πρωτεΐνη 4.1R, οι οποίες ενεργούν για να αποτρέψουν τη σύνδεση ή την αποσύνδεση των μονομερών της ακτίνης (15).

2.1.4 Σπεκτρίνη

Η σπεκτρίνη είναι μια μεγάλη, εύκαμπτη κυτταροσκελετική πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο υπομονάδες (α- και β- σπεκτρίνη), οι οποίες διατάσσονται αντιπαράλληλα, ώστε να σχηματιστούν τα ετεροδιμερή της. Οι μεμονωμένες υπομονάδες σπεκτρίνης αποτελούνται κυρίως από επαναλαμβανόμενες τριπλές έλικες που ονομάζονται «τομείς επανάληψης σπεκτρίνης». Η α-σπεκτρίνη περιέχει 22 τέτοιες επαναλήψεις, ενώ η β-σπεκτρίνη περιέχει 17 επαναλήψεις. Το ένα άκρο ή «κεφαλή» σχετίζεται με τη μορφή διμερούς-τετραμερούς σπεκτρίνης, αλλά και για την πρόσδεση με την αγκυρίνη. Το άλλο άκρο ή «ουρά» σχετίζεται με την σύνδεση με τις πρωτεΐνες 4.1R, 4.2 και τα νημάτια ακτίνης (F - ακτίνη). Ο ρόλος της σπεκτρίνης είναι ζωτικής σημασίας για

τη διατήρηση της σταθερότητας και της δομής της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς και του σχήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων (16).

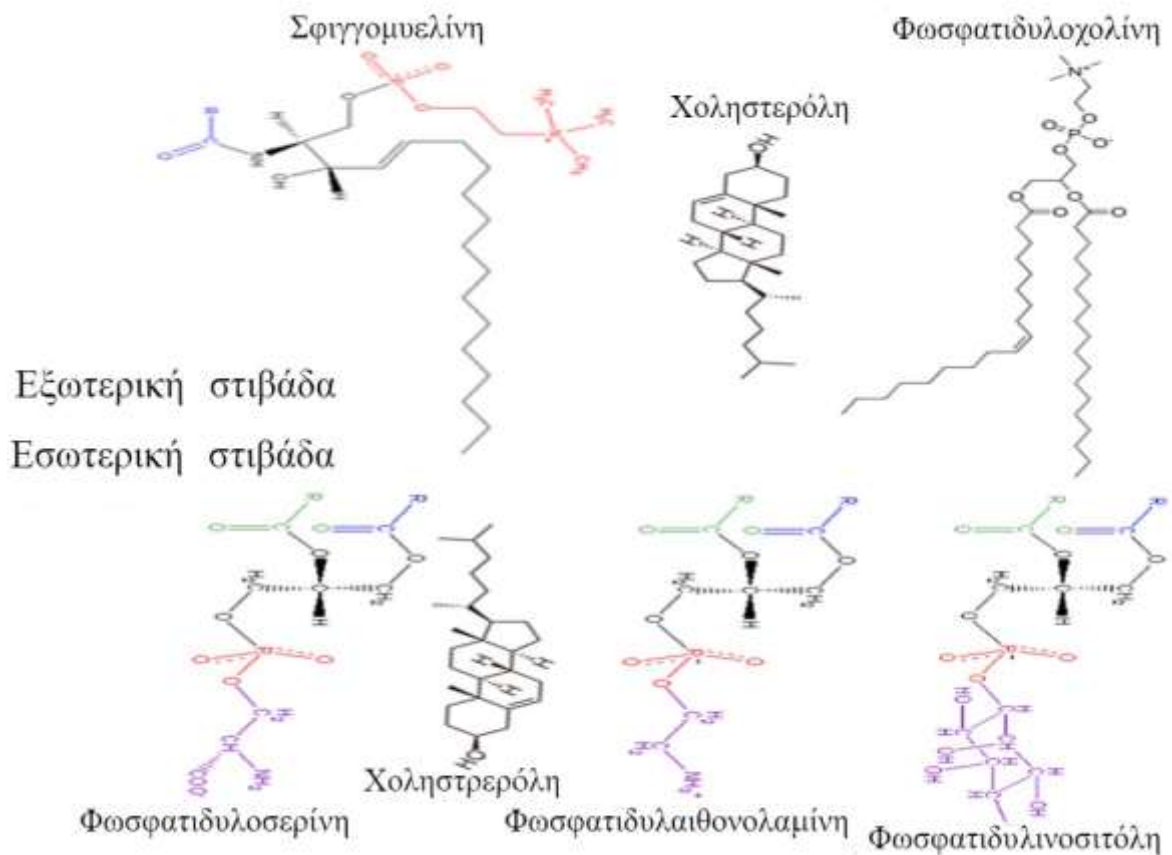
2.1.5 Αγκυρίνη

Η αγκυρίνη είναι μία σκελετική πρωτεΐνη της μεμβράνης, η οποία συμβάλλει στην μηχανική υποστήριξη της πλασματικής μεμβράνης και στην οργάνωση των πρωτεϊνών που βρίσκονται κατά μήκος της μεμβράνης. Η αγκυρίνη χωρίζεται σε 3 περιοχές: την αμινοτελική, η οποία συνδέεται με την πρωτεΐνη Ζώνη - 3, την κεντρική περιοχή που περιέχει την περιοχή σύνδεσης με την β-σπεκτρίνη και την λειτουργική περιοχή που είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση της αλληλεπίδρασης της αγκυρίνης με την σπεκτρίνη και την Ζώνη - 3 (17). Το σύμπλεγμα της αγκυρίνης που βρίσκεται στην μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελείται από τα τετραμερή της Ζώνης-3, το αντιγόνο Rh της ομάδας αίματος (RhAg), τον υποδοχέα θρομβοσπονδίνης (CD47), τη γλυκοφορίνη A (GPA) και το αντιγόνο Lansteiner Wiener (LW) (18).

2.2 Λιπίδια μεμβράνης ερυθρών αιμοσφαιρίων

Η μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελείται κατά 40% από λιπίδια. Τα φωσφολιπίδια οργανώνονται σε δύο στιβάδες (διπλοστιβάδα), γεγονός που αυξάνει την σταθερότητα της μεμβράνης, και ανάμεσα τους εισχωρούν μόρια χοληστερόλης. Η εξωτερική στιβάδα έχει περισσότερη φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη, ενώ η εσωτερική έχει περισσότερη φωσφατιδυλοσερίνη και φωσφατιδυλαιθονολαμίνη (19) (Εικόνα 3).

Η φωσφατιδυλοχολίνη είναι το πιο άφθονο φωσφολιπίδιο της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων των θηλαστικών. Συγκεκριμένα στα ερυθρά αιμοσφαίρια, η φωσφατιδυλοχολίνη αποτελεί περίπου το 30% των συνολικών φωσφολιπιδίων (20). Η σφιγγομυελίνη συνδέεται με την χοληστερόλη και δημιουργούν λιπιδικές σχεδίες, οι οποίες κατέχουν σημαντικό ρόλο κατά τη μεταγωγή σημάτων από και προς τα ερυθρά αιμοσφαίρια καθώς και στην ικανότητα πρόσληψης συγκεκριμένων πρωτεϊνών από τα κύτταρα (21). Η φωσφατιδυλοσερίνη αποτελεί σήμα απόπτωσης και γήρανσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και όταν εκτίθεται στην επιφάνεια τους φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα του σπλήνα και έτσι αποσύρονται από την κυκλοφορία (22).

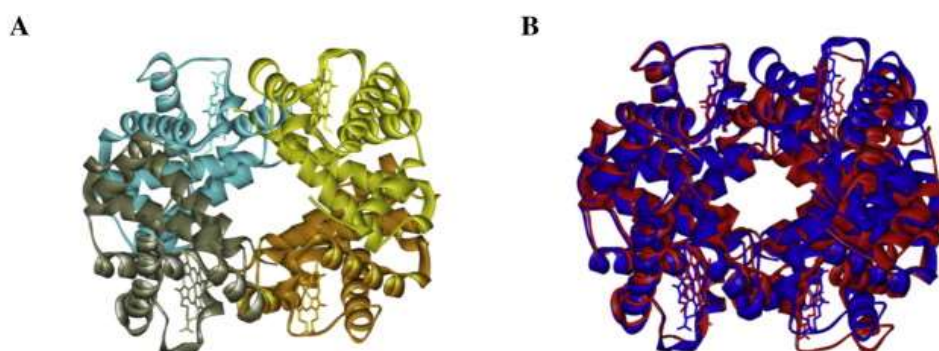


Εικόνα 3. Δομή λιπιδίων της μεμβράνης του ερυθρού αιμοσφαιρίου. (Πηγή: www.wikiwand.com/el/Ερυθροκύτταρο).

3. Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη αποτελεί το κύριο συστατικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων και ανήκει στις μεταλοπορφυρικές χρωστικές. Η κύρια λειτουργία της είναι η δέσμευση και η μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς. Αυτή η λειτουργία της στηρίζεται στην ισορροπία μεταξύ δύο καταστάσεων: α) τη τεταμένη (T) κατάσταση (μη συνδεδεμένη Hb), στην οποία η αιμοσφαιρίνη εμφανίζει χαμηλή συγγένεια με το O₂, και β) τη χαλαρή (R) κατάσταση (δεσμευμένη Hb), στην οποία η αιμοσφαιρίνη εμφανίζει υψηλή συγγένεια με το O₂, παρέχοντας έτσι μία δομική βάση

που διευκολύνει την αποτελεσματική πρόσληψη και την απελευθέρωση του O_2 *in vivo* (Εικόνα 4). Η ισορροπία μεταξύ των καταστάσεων T και R επηρεάζεται από διάφορους ενδογενείς ετεροτροπικούς συνδέτες, όπως το 2,3-διφωσφογλυκερικό οξύ (2,3 - BGP), τα πρωτόνια (H^+), το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), το χλώριο (Cl^-) ή ακόμη και από συνθετικούς αλλοστερικούς τελεστές που ρυθμίζουν την συγγένεια μεταξύ αιμοσφαιρίνης και οξυγόνου, είτε με σταθεροποίηση της R κατάστασης της αιμοσφαιρίνης είτε με σταθεροποίηση της T κατάστασης της αιμοσφαιρίνης (23).



Εικόνα 4. Η δομή της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης. (A) Δομή αδέσμευτης αιμοσφαιρίνης (κατάσταση T), στην οποία φαίνεται η α_1 -υπομονάδα (κυανό), η α_2 -υπομονάδα (καφέ), η β_1 -υπομονάδα (γκρι) και η β_2 -υπομονάδα (κίτρινη). (B) Δομή αιμοσφαιρίνης δεσμευμένης με οξυγόνο (κατάσταση R) - κόκκινο χρώμα, τοποθετημένη πάνω στην αδέσμευτη δομή της αιμοσφαιρίνης (κατάσταση T) - μπλε χρώμα. Ανατύπωση από (23).

Η αιμοσφαιρίνη αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες ανά δύο όμοιες και κάθε μία φέρει ένα μόριο αίμης και μία θέση δέσμευσης οξυγόνου. Κάθε μόριο αίμης αποτελείται από ένα μόριο πρωτοπορφυρίνης στο κέντρο του οποίου υπάρχει συνδεδεμένο ένα άτομο δισθενή σιδήρου. Ο δισθενής σίδηρος είναι δυνατόν να οξειδωθεί και να γίνει τρισθενής. Όταν ο σίδηρος έχει την δισθενή μορφή του η αιμοσφαιρίνη ονομάζεται σιδηροαιμοσφαιρίνη, ενώ όταν βρίσκεται με την τρισθενή μορφή του ονομάζεται σιδηραιμοσφαιρίνη ή μεθαιμοσφαιρίνη. Η σιδηροαιμοσφαιρίνη είναι αυτή που μπορεί να δεσμεύει το οξυγόνο.

Η κύρια αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων είναι η A ($\alpha_2\beta_2$), σε ποσοστό 97%, το τετραμερές της οποίας αποτελείται από δύο πανομοιότυπα διμερή ($\alpha\beta$). Στα ενήλικα άτομα υπάρχει επίσης η

αιμοσφαιρίνη A₂ (α₂δ₂), σε ποσοστό 2-3%, και η εμβρυική αιμοσφαιρίνη F (α₂γ₂), σε ποσοστό <1% (19).

Οι δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες σε κάθε διμερές, συγκρατούνται με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες φέρνουν κοντά τις υπομονάδες των δύο διμερών. Ανάμεσα στα μέλη του διμερούς αναπτύσσονται ιοντικοί δεσμοί και δεσμοί υδρογόνου. Ωστόσο τα δυο διμερή έχουν την ικανότητα να κινούνται το ένα σε σχέση με το άλλο, καθώς συγκρατούνται μεταξύ τους κυρίως με πολικούς δεσμούς (24).

4. Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται η αυξημένη παραγωγή ή/και η μειωμένη εξάλειψη δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), τα οποία επηρεάζουν τα κύρια συστατικά των κυττάρων όπως το DNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Η ισορροπία μεταξύ της εξάλειψης και της παραγωγής ROS ορίζεται ως «κατάσταση οξειδοαναγωγής». Σε φυσιολογικές συνθήκες τα οξειδωτικά μόρια που παράγονται κατέχουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες οδούς σηματοδότησης, ρυθμίζοντας έτσι την μετανάστευση, την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επιπλέον οι δραστικές ρίζες οξυγόνου σε χαμηλά επίπεδα θεωρούνται ωφέλιμες για τον οργανισμό, καθώς χρησιμεύουν στην αναστολή του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων, ιών και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. Ωστόσο, όταν παράγονται σε περίσσεια μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στα κύτταρα, καθώς η διέλευση μη ζευγαρωμένων ηλεκτρονίων προκαλεί οξείδωση διαφόρων μορίων και κυτταρικών συστατικών. Γενικά, οι δραστικές ρίζες μπορούν να ταξινομηθούν: σε δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), σε δραστικές ρίζες αζώτου (RNS) και δραστικές ρίζες χλωρίου (RCS). Τα ROS παράγονται σε διάφορα διαμερίσματα όπως το κυτταρόπλασμα, τα εξωκυττάρια υγρά (π.χ. πλάσμα), τα μιτοχόνδρια, τα ενδοσώματα, τα υπεροξυσώματα, τα φαγοσώματα και τα εξωσώματα (25).

Το οξειδωτικό στρες πιστεύεται ότι επιδεινώνει τα συμπτώματα πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των αιμολυτικών αναιμιών, και παρότι δεν είναι η κύρια αιτιολογία αυτών των ασθενειών, η οξειδωτική βλάβη στα ερυθρά αιμοσφαίρια έχει σημαντικό ρόλο στην αιμόλυση λόγω της μη αποτελεσματικής ερυθροποίησης στο μυελό των οστών αλλά και της βραχείας επιβίωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην κυκλοφορία (26).

4.1 Δραστικές ρίζες οξυγόνου

Υπάρχουν διάφορες πηγές παραγωγής δραστικών ριζών μέσα στο κύτταρο. Μία σημαντική πηγή ROS είναι μία οικογένεια ενζύμων που είναι συνδεδεμένα με την μεμβράνη και για την λειτουργία τους χρειάζονται NADPH. Η μόνη σαφής λειτουργία αυτών των εξαρτώμενων από το NADPH οξειδασών είναι η ρυθμιζόμενη παραγωγή ROS. Μία άλλη πηγή ενδοκυττάρων οξειδωτικών ουσιών αποτελούν τα μιτοχόνδρια. Τα περισσότερα μιτοχονδριακά οξειδωτικά μόρια παράγονται κυρίως στο σύμπλοκο I ή III της αλυσίδας του κυτοχρώματος, όταν ηλεκτρόνια προερχόμενα από το NADH ή FADH₂ μπορούν να αντιδράσουν με το οξυγόνο και να παράγουν έτσι ανιόντα σουπεροξειδίου. Επίσης, άλλες ενδοκυττάρειες πηγές παραγωγής ROS είναι διάφορα ενδοκυττάρια ένζυμα όπως η οξειδάση της ξανθίνης, οι κυκλοοξυγενάσες, ένζυμα του κυτοχρώματος p450 και οι λιποξυγενάσες που παράγουν οξειδωτικά μόρια ως μέρος της φυσιολογικής ενζυματικής λειτουργίας τους (5).

Στα ερυθρά αιμοσφαίρια η κύρια πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου είναι η αιμοσφαιρίνη, λόγω της αυτοοξειδωσής της. Αν και η οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη [Hb(FeII)O₂] είναι ένα αρκετά σταθερό μόριο φυσιολογικά μπορεί να αυτοοξειδωθεί σε μεθαιμοσφαιρίνη [Hb(FeIII) + O₂⁻]. Ωστόσο η αυτοοξειδωση της είναι πολύ πιο έντονη σε υποξικές συνθήκες (πχ. στην μικροκυκλοφορία), αλλά και για ασταθείς αιμοσφαιρίνες όπως η αιμοσφαιρίνη S (HbS) στην δρεπανοκυτταρική αναιμία ή για ελεύθερες α - αλυσίδες σφαιρίνης που υπάρχουν στην β - θαλασσαιμία. Τα ανιόντα σουπεροξειδίου (O₂⁻) που παράγονται από την αυτοοξειδωση της αιμοσφαιρίνης μετατρέπονται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου είτε αυθόρμητα είτε με την μεσολάβηση του ενζύμου υπεροξείδιο της δισμουτάσης. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, στη συνέχεια μπορεί να αντιδράσει τόσο με την μεθαιμοσφαιρίνη και να παράγει σιδηροαιμοσφαιρίνη, όσο και με την οξυαιμοσφαιρίνη και να παράγει οξυσιδηροαιμοσφαιρίνη.

Τέλος, ένας άλλος οξειδωτικός παράγοντας στα ερυθρά αποτελεί ο σίδηρος, είτε βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή είτε δεσμευμένος από την αίμη στην αιμοσφαιρίνη. Ο σίδηρος έχει την ικανότητα να συμμετέχει στον κύκλο Haber - Weiss ως αντιδραστήριο Fenton, παράγοντας τις εξαιρετικά δραστικές ρίζες υδροξυλίου (OH[•]), οι οποίες σε αντίθεση με τα ανιόντα του υπεροξειδίου δεν μπορούν να εξαλειφθούν ενζυματικά και, ως εκ τούτου να προκαλούν εκτεταμένες οξειδωτικές βλάβες στα κύτταρα (27).

Όλοι οι τύποι δραστικών ριζών, συμπεριλαμβανομένων του ανιόντος του υπεροξειδίου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός μονήρους ηλεκτρονίου στην εξωτερική τους στιβάδα και ασταθείς δεσμούς. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν και αντιδρούν με διάφορα μόρια, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και νουκλεϊκά οξέα, προκαλώντας έτσι μη αναστρέψιμες λειτουργικές αλλοιώσεις ή ακόμη και πλήρη καταστροφή αυτών (4).

4.2 Οξείδωση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες αποτελούν ένα από τους κύριους στόχους των ROS. Αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην παρουσία των ευαίσθητων στην οξείδωση πλευρικών ομάδων των αμινοξέων που υπάρχουν στις πρωτεΐνες. Οι πιο συχνές οξειδωτικές τροποποιήσεις παρατηρούνται στα αμινοξέα κυστεΐνη και μεθειονίνη, διότι παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά αντίδρασης με ρίζες υδροξυλίου. Εκτός από τις, ως επί το πλείστον, αναστρέψιμες αντιδράσεις οξείδωσης θειόλης και μεθειονίνης, που χρησιμοποιούνται συχνά για την εκ νέου ρύθμιση της πρωτεϊνικής δραστηριότητας, οι πρωτεΐνες τείνουν να υποβάλλονται σε μια σειρά μη αναστρέψιμων τροποποιήσεων της πλευρικής ομάδας τους, όπως διαδικασία της καρβονυλίωσης. Αυτές οι μη αναστρέψιμες οξειδωτικές τροποποιήσεις της πλευρικής ομάδας, είναι ικανές να προκαλέσουν το ξετύλιγμα των πρωτεϊνών ή ακόμη και τη μη αναστρέψιμη συσσωμάτωσή τους, ανωμαλίες που μπορούν να προκαλέσουν τον κυτταρικό θάνατο. Οι αλλοιωμένες πρωτεΐνες επηρεάζουν τα ενδοκυττάρια βιοχημικά μονοπάτια με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφόρων διαταραχών και νοσημάτων. Η εκτίμηση της οξειδωτικής βλάβης των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη μέτρηση της νιτροτυροσίνης, ενός παραγώγου του αμινοξέος τυροσίνης (28).

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών αποτελεί μια μη αναστρέψιμη οξειδωτική διαδικασία. Συνίσταται στον σχηματισμό αντιδραστικών καταλοίπων αλδεΐδης ή κετόνης σε πρωτεΐνες, οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν με 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH) σχηματίζοντας υδραζόνες. Υπάρχουν δύο τρόποι καρβονυλίωσης πρωτεϊνών: α) Η «πρωταρχική καρβονυλίωση πρωτεΐνης», που οφείλεται στην μεσολαβούμενη από μέταλλο οξείδωση των πλευρικών αλυσίδων λυσίνης (Lys), αργινίνης (Arg), προλίνης (Pro) και θρεονίνης (Thr). Τα κύρια προϊόντα αυτής της αντίδρασης είναι η γλουταμική ημιαλδεΐδη (προϊόν οξείδωσης της Arg), η αμινοαδιπτική ημιαλδεΐδη (προϊόν της οξείδωσης Lys), 2-πυρρολιδίνη (προϊόν οξείδωσης His) και 2-αμινο-3-κετοβουτυρικού οξύ (προϊόν οξείδωσης Thr). β) Η «δευτερογενής καρβονυλίωση πρωτεΐνης» που προκαλείται από την προσθήκη αλδεΐδων. Οι αλδεΐδες σχηματίζονται κυρίως από την διαδικασία της υπεροξειδωσης

των λιπιδίων και είναι η μηλονική αλδεΐδη (MDA), η προπανική, η εξανική και η 4-υδροξυ-2-νονενάλη (4-HNE), αλλά μπορεί επίσης να είναι και υποπροϊόντα της γλυκόλυσης και της διαδικασίας γλυκοζυλίωσης, όπως η μεθυλογλυοξάλη και η γλυοξάλη (29).

4.3 Οξείδωση λιπιδίων

Η υπεροξείδωση των λιπιδίων αποτελεί μια διαδικασία κατά την οποία οξειδωτικά μόρια, όπως ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προσβάλλουν λιπίδια που περιέχουν διπλούς δεσμούς άνθρακα - άνθρακα, ειδικά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs). Κατά την διαδικασία αυτή παρατηρείται η αφαίρεση υδρογόνων από τους άνθρακες των λιπιδίων και η εισαγωγή οξυγόνου σε ρίζες υπεροξυλίων και υδροϋπεροξειδίων. Τα γλυκολιπίδια, τα φωσφολιπίδια (PLs) και η χοληστερόλη (Ch) είναι συχνοί στόχοι των οξειδωτικών μορίων. Τα λιπίδια μπορούν επίσης να οξειδωθούν από ένζυμα όπως λιποξυγενάσες, κυκλοοξυγενάσες και το κυτόχρωμα P450. Η διαδικασία υπεροξείδωσης των λιπιδίων περιλαμβάνει 3 στάδια: α) Το στάδιο της έναρξης, κατά το οποίο οποιαδήποτε δραστική ρίζα αφαιρεί ένα άτομο υδρογόνου από μία μεθυλομάδα, το οποίο έχει ως συνέπεια την δημιουργία μίας νέας ελεύθερης ρίζας στο αντίστοιχο άτομο άνθρακα. β) Το στάδιο του πολλαπλασιασμού, κατά το οποίο επειδή η ρίζα του λιπαρού οξέος που δημιουργείται είναι πολύ ασταθής παίρνει ηλεκτρόνια από τους διπλανούς διπλούς δεσμούς με αποτέλεσμα τόσο τον σχηματισμό δισθενών διενίων, όσο και την παραγωγή μίας νέας ελεύθερης ρίζας στο αντίστοιχο άτομο άνθρακα του διπλού δεσμού. Η νέα ελεύθερη ρίζα αντιδρά με οξυγόνο, δημιουργώντας μια ρίζα υπεροξειδίου η οποία με τη σειρά της έχει την δυνατότητα να αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ, δημιουργώντας μ' αυτόν τον τρόπο μια νέα ελεύθερη ρίζα και ένα υπεροξείδιο του λιπαρού οξέος. γ) Στη φάση του τερματισμού, τα υπεροξείδια των λιπαρών οξέων που συσσωρεύονται διασπώνται με διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (π.χ. με την βοήθεια της βιταμίνης E), σχηματίζοντας μια ποικιλία προϊόντων και συντελώντας στην περαιτέρω επέκταση των αλυσιδωτών αντιδράσεων, οι οποίες εάν δεν τερματιστούν θα έχουν καταστρεπτικές συνέπειες, προκαλώντας ακόμη και την ολική οξείδωση των μεμβρανών και τον κυτταρικό θάνατο.

Η υπεροξείδωση των λιπιδίων παράγει μια μεγάλη ποικιλία προϊόντων. Τα κύρια προϊόντα είναι τα υδροϋπεροξείδια των λιπιδίων (LOOH), ενώ στα δευτερεύοντα ανήκουν διάφορες αλδεΐδες, όπως η μηλονική αλδεΐδη (MDA), η προπανική, η εξανική και η 4-υδροξυ-2-νονενάλη (4-HNE) αλδεΐδη. Η MDA φαίνεται να είναι το πιο μεταλλαξιογόνο προϊόν της υπεροξείδωσης των λιπιδίων και έχει χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την υπεροξείδωση των ωμέγα-3 και ωμέγα-6 λιπαρών

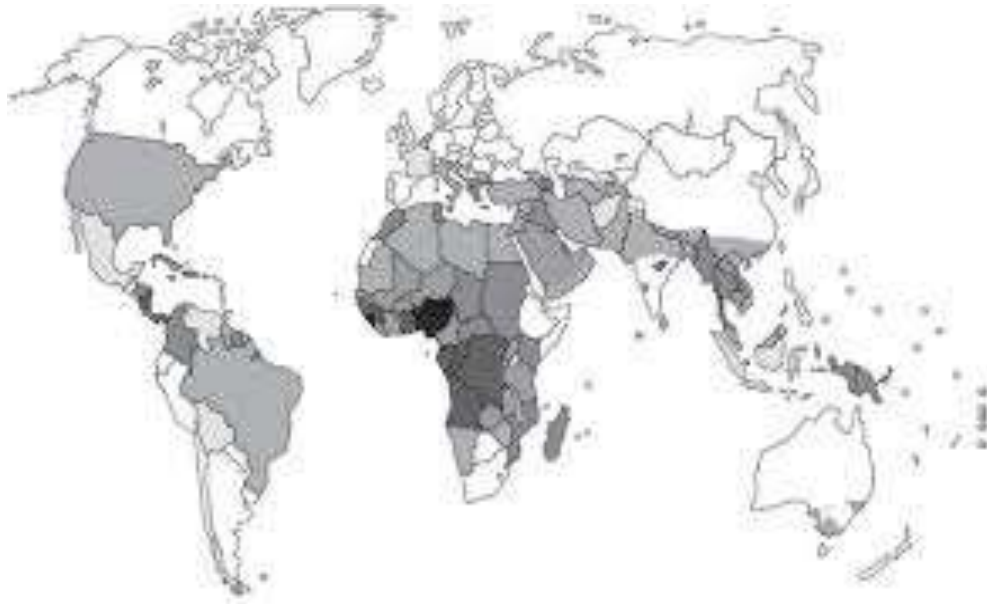
οξέων λόγω της εύκολης αντίδρασης του με θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA). Η 4-HNE είναι ένα από τα πιο σημαντικά και τοξικά προϊόντα που παράγονται από υπεροξειδία λιπιδίων. Η υψηλή τοξικότητα εξηγείται από τις ταχείες αντιδράσεις της με θειόλες και αμινομάδες. Επίσης, έχει την ικανότητα να δρα τόσο ως σηματοδοτικό μόριο, όσο και ως κυτταροτοξικό προϊόν που προκαλεί μακροχρόνιες βιολογικές συνέπειες (30, 31).

5. Παθοφυσιολογία β - θαλασσαιμίας

Η θαλασσαιμία ανήκει στην κατηγορία των αιμολυτικών αναιμιών και οφείλεται στην ελάττωση ή στην απουσία σύνθεσης μίας ή περισσοτέρων αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης. Πρόκειται για μια γενετική διαταραχή και το ενοχοποιούμενο γονίδιο είναι αυτοσωμικό. Όταν η διαταραχή αφορά την μειωμένη παραγωγή των β - αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης προκύπτει η β - θαλασσαιμία, ενώ όταν αφορά την μειωμένη παραγωγή των α - αλυσίδων τότε προκύπτει η α - θαλασσαιμία.

5.1 Επιδημιολογία β - θαλασσαιμίας

Η β - θαλασσαιμία αποτελεί μια από τις πιο συχνές υπολειπόμενες διαταραχές παγκοσμίως. Συγκεκριμένα σε πληθυσμούς της Μεσογείου, της Μέσης Ανατολής, του Υπερκαυκάσου (ή Νότιος Καύκασος), της Κεντρικής Ασίας, της Ινδικής υποήπειρου και της Άπω Ανατολής παρατηρείται υψηλός επιπολασμός της νόσου. Επίσης συναντάται συχνά και σε πληθυσμούς αφρικανικής καταγωγής. Τα υψηλότερα ποσοστά αναφέρονται στην Κύπρο (14%), στη Σαρδηνία (12%) και στη Νοτιοανατολική Ασία (Εικόνα 5).



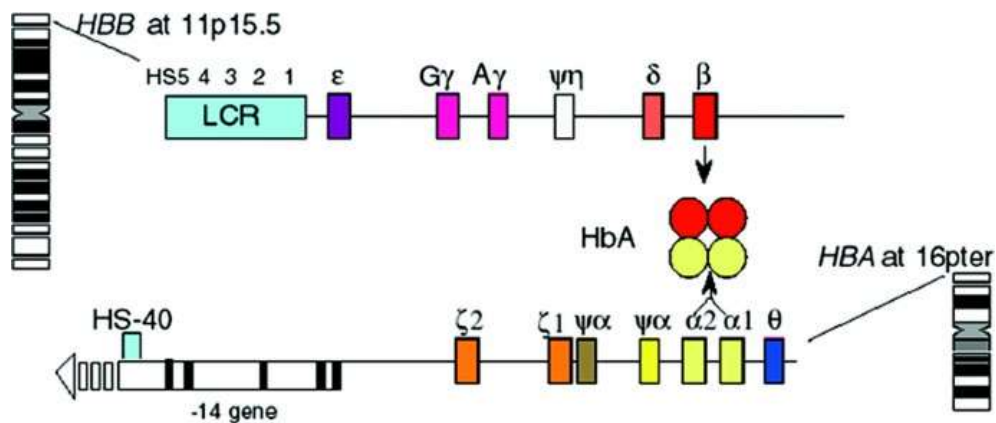
Εικόνα 5. Κατανομή της β - θαλασσαιμίας στον παγκόσμιο πληθυσμό. (Πηγή: <http://www.socped.gr/uploads/editorfiles/files/Zachaki%281%29.pdf>).

Η υψηλή γονιδιακή συχνότητα της β - θαλασσαιμίας σε αυτές τις περιοχές πιθανότατα σχετίζεται με την κατανομή της ελονοσίας από το *Plasmodium falciparum*. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι φορείς της β-θαλασσαιμίας προστατεύονται από την ελονοσία. Ωστόσο, λόγω της μετανάστευσης του πληθυσμού, αλλά και σε μικρότερο βαθμό του δουλεμπορίου, η β - θαλασσαιμία πλέον συναντάται και σε περιοχές που δεν ενδημεί η ελονοσία, όπως η Βόρεια Ευρώπη, η Βόρεια και η Νότια Αμερική, η Καραϊβική και η Αυστραλία (32).

5.2 Μοριακή βάση β - θαλασσαιμίας

Το γονίδιο της βήτα σφαιρίνης (HBB) χαρτογραφείται στον βραχίονα του χρωμοσώματος 11 σε μια περιοχή που περιέχει επίσης το γονίδιο της δέλτα σφαιρίνης, το εμβρυϊκό γονίδιο έψιλον τα εμβρυϊκά γονίδια Α-γάμμα και Γ-γάμμα, και ένα ψευδογονίδιο (ψB1) (Εικόνα 6). Τα πέντε λειτουργικά γονίδια της σφαιρίνης βρίσκονται διατεταγμένα με τη σειρά της αναπτυξιακής τους έκφρασης. Το γονίδιο HBB, το οποίο εκτείνεται 1,6 Kb, περιέχει τρία εξώνια και αμφότερες τις 5'

και 3' αμετάφραστες περιοχές (UTRs). Το HBB ρυθμίζεται από έναν γειτονικό εκκινητή που βρίσκεται στο 5' άκρο και στον οποίο βρίσκονται οι αλληλουχίες TATA, CAAT και διπλή η CACCC. Μια άλλη σημαντική ρυθμιστική περιοχή, που περιέχει επίσης έναν ισχυρό ενισχυτή, χαρτογραφείται περίπου 50 Kb από το γονίδιο της βήτα σφαιρίνης. Αυτή η περιοχή ονομάζεται περιοχή ελέγχου τόπου (LCR) και περιέχει τέσσερις (HS-1 έως HS-4) ειδικές υπερευαίσθητες στην DNAάση θέσεις (HS), οι οποίες αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα της αλληλεπίδρασης DNA - πρωτεΐνης. Η σημασία του LCR για τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου της β - σφαιρίνης ανακαλύφθηκε ύστερα από την μελέτη μια σειρά φυσικών διαγραφών που αφορούν πλήρως ή εν μέρει τις θέσεις HS, με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του γονιδίου της β - σφαιρίνης.



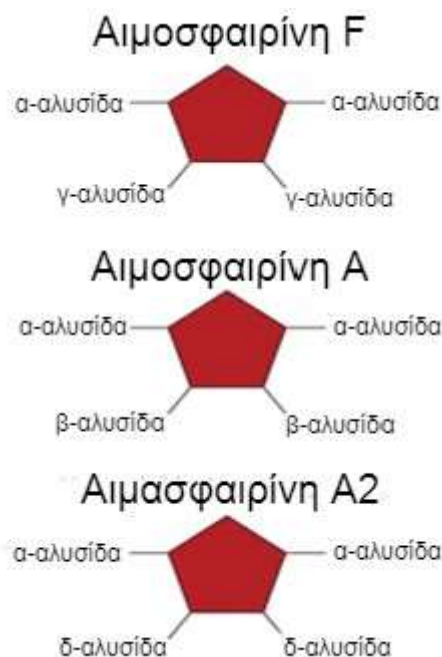
Εικόνα 6. Η δομή και η σειρά των γονιδίων της α - και β - σφαιρίνης στα χρωμοσώματα. Ανατύπωση από (33).

Η β - θαλασαιμία αποτελεί μία νόσο με μεγάλη ετερογένεια σε μοριακό επίπεδο. Συγκεκριμένα έχουν εντοπιστεί περισσότερες από 200 μεταλλάξεις, η πλειονότητα των οποίων αφορούν απλές νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις ή απαλοιφές ή παρεμβολές ολιγονουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα την μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης. Η β - θαλασαιμία σπάνια προκύπτει από την διαγραφή των γονιδίων. Οι σημειακές μεταλλάξεις που επηρεάζουν την έκφραση της β - σφαιρίνης ανήκουν σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες: α) Σε μεταλλάξεις που οδηγούν στην ελαττωματική μεταγραφή του β - γονιδίου της σφαιρίνης (μετάλλαξη στον εκκινητή ή στην 5' UTR του γονιδίου), β) Σε μεταλλάξεις που επηρεάζουν την επεξεργασία του αγγελιαφόρου RNA (mRNA) (μετάλλαξη στην 3'

UTR, λάθη κατά την πολυαδενυλίωση κ.α.) και γ) Σε μεταλλάξεις που οδηγούν σε μία μη φυσιολογική μετάφραση του mRNA (μετάλλαξη του κωδικονίου έναρξης, μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης, διαγραφή κωδικονίου λήξης κ.α.) (33).

5.3 Η αιμοσφαιρίνη στη β - θαλασσαιμία

Φυσιολογικά η αιμοσφαιρίνη αποτελείται από έναν δακτύλιο αίμης που περιέχει σίδηρο και συνδέεται με τέσσερις σφαιρίνες, δύο άλφα και δύο βήτα. Ο συνδυασμός των τεσσάρων αλυσίδων σφαιρίνης εξαρτάται από τον τύπο της κάθε αιμοσφαιρίνης. Συγκεκριμένα η εμβρυική αιμοσφαιρίνη F (HbF) αποτελείται από δύο άλφα και δύο γάμμα αλυσίδες ($\alpha_2\gamma_2$), η αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων A (HbA) αποτελείται από δύο άλφα και δύο βήτα αλυσίδες ($\alpha_2\beta_2$), ενώ η αιμοσφαιρίνη A_2 (Hb A_2) έχει δύο άλφα και δύο δέλτα αλυσίδες ($\alpha_2\delta_2$) (Εικόνα 7). Κατά την γέννηση η αιμοσφαιρίνη F αποτελεί την κύρια αιμοσφαιρίνη, σε ποσοστό 80%, ενώ η A μόλις το 20%. Ωστόσο ήδη από την ηλικία των 6 μηνών η αιμοσφαιρίνη A αρχίζει να καταλαμβάνει μεγαλύτερο ποσοστό έως ότου γίνεται η κύρια αιμοσφαιρίνη των ατόμων, με μικρή ποσότητα της A_2 και αμελητέα της F να ανιχνεύονται και στα ενήλικα άτομα (34).



Εικόνα 7. Φυσιολογική δομή των αιμοσφαιρινών F, A, A₂. Ανατύπωση από (34).

Η β - θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται από την μειωμένη έως και την παντελή έλλειψη σύνθεσης αλυσίδων β - σφαιρίνης, γεγονός που την κατατάσσει σε τρεις κατηγορίες: α) στην μείζονα ή ομόζυγη β-θαλασσαιμία, που αναφέρεται επίσης και ως «αναιμία του Cooley» ή «Μεσογειακή αναιμία», β) στην ενδιάμεση β - θαλασσαιμία και γ) στην δευτεροπαθή ή ελάσσονα ή ετερόζυγη β - θαλασσαιμία η «στίγμα». Τα άτομα που πάσχουν από β - θαλασσαιμία φέρουν ένα γονίδιο β - σφαιρίνης, το οποίο δεν έχει επηρεαστεί, επομένως είναι ικανά να παράγουν επαρκή ποσότητα αιμοσφαιρίνης για να καλύψουν τις απαιτήσεις του οργανισμού τους. Επιπλέον, το έλλειμμα της αιμοσφαιρίνης αντισταθμίζεται από την αύξηση των άλλων μορφών αιμοσφαιρίνης, συνήθως της A₂. Οι φορείς της ετερόζυγης β - θαλασσαιμίας συνήθως είναι κλινικά ασυμπτωματικοί, αλλά μερικές φορές παρατηρείται ήπια αναιμία και μικροκυττάρωση, ως αποτέλεσμα της μειωμένης σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης A (35).

5.4 β - θαλασσαιμία και μεταβολές στη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων

Στην β - θαλασσαιμία παρατηρούνται μεταβολές στην μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων τόσο στα λιπίδια όσο και στις πρωτεΐνες της. Συγκεκριμένα παρατηρείται αλλαγή της περιεκτικότητας των φωσφολιπιδίων και της χοληστερόλης, αλλά και ποσοτικές αύξηση της άλφα και της βήτα - σπεκτρίνης. Επίσης, παρατηρείται αύξηση των κλασμάτων 2.1 και 2.3 της αγκυρίνης, καθώς και μείωση της πρωτεΐνης Ζώνης - 3 και της πρωτεΐνης 4.1 Η περιεκτικότητα άλλων κλασμάτων πρωτεϊνών, όπως η α-ακτινίνη, η τουμπουλίνη και η τροπομυοσίνη παραμένει αμετάβλητη. Αυτές οι αλλαγές στην μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων έχουν συσχετιστεί με τη σοβαρότητα της κλινικής εκδήλωσης της νόσου (36).

5.5 Το οξειδωτικό στρες στη β - θαλασσαιμία

Αν και η οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη είναι ένα σταθερό μόριο, μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να παραχθεί η μεθαιμοσφαιρίνη. Αυτή η διαδικασία που συμβαίνει φυσιολογικά με ρυθμό 0,5 - 3% ανά ημέρα, μπορεί να αυξηθεί σε συνθήκες υποξίας ή λόγω της ύπαρξης ελεύθερων α - αλυσίδων

σφαιρίνης σε άτομα που πάσχουν από β - θαλασσαιμία. Η αυτοοξειδωση της αιμοσφαιρίνης αποτελεί σχεδόν την κύρια πηγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα ερυθρά αιμοσφαίρια (27).

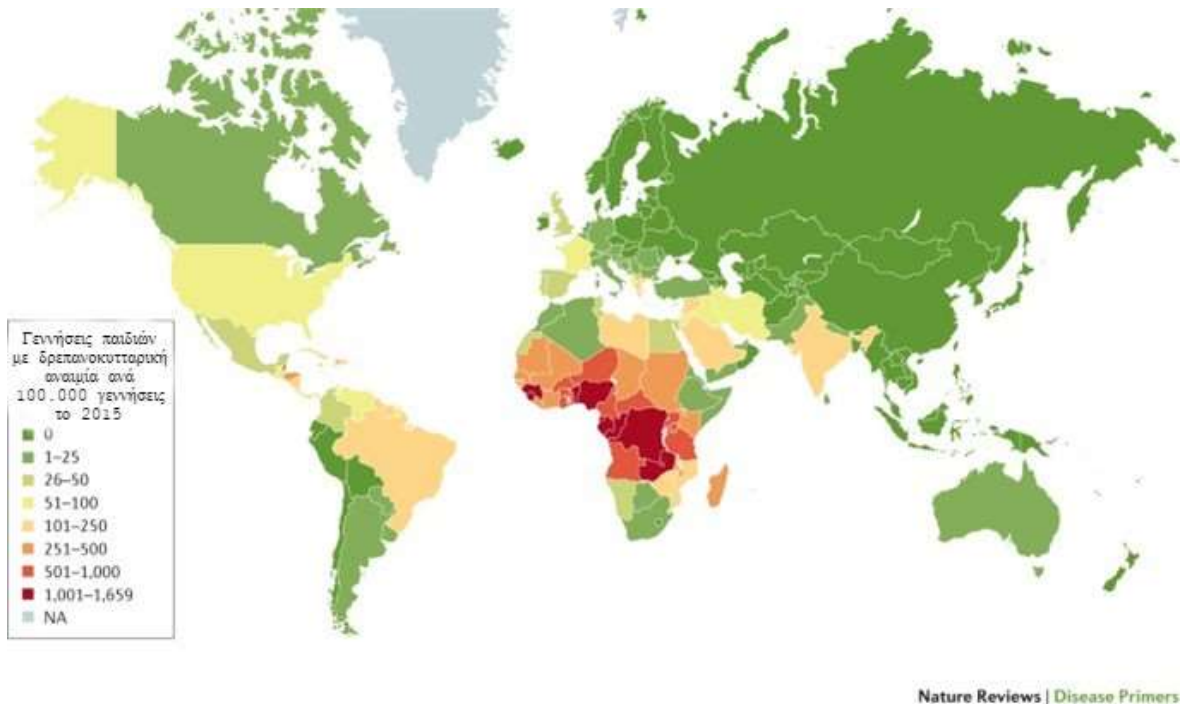
Ένας άλλος παράγοντας παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου αποτελεί ο σίδηρος και η αίμη. Συγκεκριμένα ο σίδηρος είτε ελεύθερος είτε δεσμευμένος με την αίμη και την αιμοσφαιρίνη μπορεί να δράσει σαν αντιδραστήριο Fenton στον κύκλο Haber - Weiss κατά τον οποίο παράγονται εξαιρετικά δραστικές ρίζες υδροξυλίου. Επίσης η αίμη αλληλεπιδρά με λιπίδια και πρωτεΐνες της μεμβράνης των ερυθρών που προάγουν αντιδράσεις οξειδωσης (37).

6. Παθοφυσιολογία δρεπανοκυτταρικής αναιμίας

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι μία γενετική νόσος που οφείλεται σε μία ποιοτική διαταραχή στην σύνθεση της β - αλυσίδα σφαιρίνης, λόγω μετάλλαξης του γονιδίου που την κωδικοποιεί. Λόγω αυτής της μεταλλαγής προκύπτει μια άλλη αιμοσφαιρίνη, η οποία καλείται αιμοσφαιρίνη S. Η δρεπανοκυτταρική αναιμία εμφανίζεται σε ομόζυγη και ετερόζυγη μορφή.

6.1 Επιδημιολογία δρεπανοκυτταρικής αναιμίας

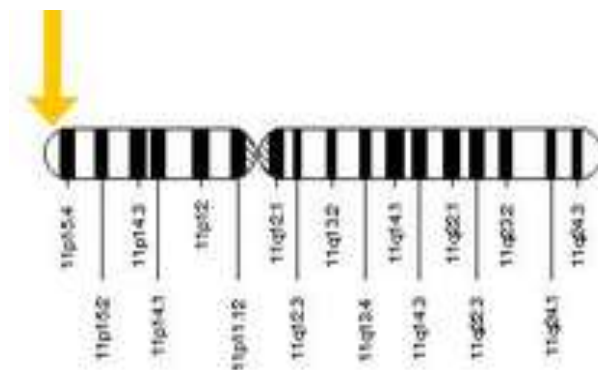
Η δρεπανοκυτταρική αναιμία αποτελεί μία από τις πιο κοινές κληρονομικές ασθένειες. Συγκεκριμένα στην Υποσαχάρια Αφρική και στις περιοχές του Ισημερινού παρατηρείται υψηλός επιπολασμός της νόσου, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην αντίσταση που παρέχει στην ελονοσία από το *Plasmodium falciparum*, στην ετερόζυγη κατάσταση. Λόγω της μετανάστευσης, η δρεπανοκυτταρική αναιμία αποτελεί πλέον την πιο σημαντική γενετική διαταραχή στη Γαλλία (επηρεάζει 1/2.400 γεννήσεις), ενώ και στις Ηνωμένες Πολιτείες (κυρίως Κεντρική και Νότιος Αμερική) παρατηρούνται όλα και περισσότερα κρούσματα. Άλλες χώρες που παρουσιάζουν υψηλό επιπολασμό της νόσου είναι παραδοσιακά οι χώρες της Μεσογείου (Ιταλία, Ελλάδα, Τουρκία) και χώρες της Μέσης Ανατολής (38) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Στον χάρτη φαίνεται ο εκτιμώμενος αριθμός γεννήσεων με δρεπανοκυτταρική αναιμία ανά 100.000 γεννήσεις ανά χώρα το 2015. (Πηγή: <https://pergamos.lib.uoa.gr/uoa/dl/frontend/file/lib/default/data/2895150/theFile/2895151>).

6.2 Μοριακή βάση δρεπανοκυτταρικής αναιμίας

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία οφείλεται σε μία γενετική μετάλλαξη, κατά την οποία υπάρχει αντικατάσταση ενός μόνο νουκλεοτιδίου (A προς T) στο 6ο κωδικόνιο της β - αλυσίδα της σφαιρίνης. Η μεταλλαγή μετατρέπει το κωδικόνιο που κωδικοποιεί το αμινοξύ του γλουταμικού οξέος (GAG) στο κωδικόνιο που κωδικοποιεί το αμινοξύ βαλίνη (GTG). Η αιμοσφαιρίνη που προκύπτει ονομάζεται S (HbS). Το αλληλόμορφο γονίδιο, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη δρεπανοκυτταρική αναιμία, βρίσκεται στον βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος 11 και συγκεκριμένα στο 11p15.5 (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Το χρωμόσωμα 11, στο οποίο φαίνεται επισημασμένο το υπεύθυνο γονίδιο για την δρεπανοκυτταρική αναιμία. (Πηγή: <https://www.ijser.org/paper/New-Approach-for-Analysis-and-Prediction-of-Genetic-Beta.html>).

6.3 Η αιμοσφαιρίνη στη δρεπανοκυτταρική αναιμία

Η αιμοσφαιρίνη S έχει μειωμένη συγγένεια οξυγόνου σε σχέση με την αιμοσφαιρίνη A. Επίσης, η βαλίνη ανήκει στα υδρόφοβα αμινοξέα, γεγονός που προκαλεί την προσέλκυση και άλλων υδρόφοβων περιοχών από τις γειτονικές β - αλυσίδες σφαιρίνης, κατά την διαδικασία αποξυγόνωσης της αιμοσφαιρίνης. Αυτά τα γεγονότα έχουν σαν αποτέλεσμα τον πολυμερισμό της HbS, ο οποίος με τη σειρά του μειώνει περαιτέρω τη συγγένεια οξυγόνου - HbS. Επιπλέον, σε συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου η δευτεροταγής, η τριτοταγής και η τεταρτοταγής δομή της αιμοσφαιρίνης δεν επηρεάζονται, ενώ σε συνθήκες έλλειψης πολυμερίζεται και παράγονται ινώδη ιζήματα (39).

6.4 Δρεπανοκυτταρική αναιμία και μεταβολές στη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων

Ο πολυμερισμός της αιμοσφαιρίνης S επηρεάζει άμεσα ή έμμεσα τόσο την διπλοστιβάδα λιπιδίων, όσο και τις πρωτεΐνες της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Συγκεκριμένα οδηγεί σε μειωμένη κυτταρική ενυδάτωση, αυξημένη αιμόλυση, μη φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις με τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος, καθώς και συμβάλλει στην πρόωπη απόπτωση των ερυθρών

αιμοσφαιρίων. Έχει παρατηρηθεί ότι ένας υποπληθυσμός δρεπανοκυττάρων εκθέτουν στην επιφάνεια τους φωσφατιδυλοσερίνη, η οποία συνήθως περιορίζεται στο εσωτερικό στρώμα της μεμβράνης. Τα κυκλοφορούντα αυτά ερυθρά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα παθοφυσιολογικά γεγονότα, όπως είναι η αυξημένη αιμόλυση, η ενδοθηλιακή ενεργοποίηση, η αλληλεπίδραση μεταξύ ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων και η ενεργοποίηση των οδών πήξης (40).

Τόσο ο πολυμερισμός όσο και η οξειδωση της αιμοσφαιρίνης S επηρεάζουν τις πρωτεΐνες της μεμβράνης οι οποίες έχουν δομικό ρόλο. Μία από τις κύριες πρωτεΐνες που επηρεάζονται είναι η Ζώνη - 3 ή πρωτεΐνη μεταφοράς ανιόντων, γεγονός που οδηγεί στην μικροσυσσωμάτωση της μεμβράνης τους και στην απελευθέρωση ερυθροκυτταρικών μικροσωματιδίων (41). Άλλες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες που επηρεάζονται από τις ανώμαλες αλυσίδες σφαιρίνης που συσσωρεύονται κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης είναι η αγκυρίνη και η σπεκτρίνη. Αυτές οι μεταβολές έχουν σαν αποτέλεσμα την διαταραχή της οργάνωσης του κυτταροσκελετού, της μεταφοράς ανιόντων διαμέσου της μεμβράνης, της ρύθμισης του όγκου των ερυθρών αιμοσφαιρίων και της απομάκρυνσης του CO₂ (39).

6.5 Το οξειδωτικό στρες στη δρεπανοκυτταρική αναιμία

Η αιμόλυση αποτελεί τόσο την αιτία όσο και το αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες. Τα υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες στα δρεπανοκύτταρα ενισχύουν την αυτοοξειδωση της HbS, η οποία τελικά προκαλεί βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη, πρόωρη γήρανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμόλυση. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου προκύπτουν όχι μόνο από την αυτοοξειδωση της αιμοσφαιρίνης S, αλλά και από την αυξημένη έκφραση της αφυδρογονάσης και της οξειδάσης της ξανθίνης, την μειωμένη έκφραση της οξειδάσης NADPH, την εξωκυττάρια αίμη και την αιμοσφαιρίνη που υπάρχει στο πλάσμα. Οι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες και τα λιπίδια της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων οξειδώνονται επίσης. Αυτό το χρόνια οξειδωτικό στρες στα δρεπανοκύτταρα μειώνει τα επίπεδα των καταλυτικών αντιοξειδωτικών, όπως το σουπεροξειδίου της δισμουτάσης, η υπερóxυδροξίνη 2 και 4 και εξαντλεί την ενδογενή αναγωγική γλουταθειόνη (42).

7. Ασθενείς με διπλή ετεροζυγωτία β - θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής αναιμίας

Η διπλή ετεροζυγωτία β - θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής αναιμίας (βS) είναι μια δρεπανοκυτταρική διαταραχή ποικίλης σοβαρότητας, η οποία προκύπτει από την ένωση του χαρακτηριστικού της ετεροζυγωτικότητας της β - θαλασσαιμίας και της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Η μετάλλαξη βS είναι μία από τις πιο κοινές μεταλλάξεις ενός γονιδίου στον άνθρωπο και έχει μια ευρεία γεωγραφική κατανομή, με τους περισσότερους φορείς να βρίσκονται στην Αφρική, στη Μέση Ανατολή, στην Ινδία και σε διάφορες περιοχές της Μεσογείου.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου HbS — β - θαλασσαιμίας είναι εξαιρετικά μεταβλητά και κυμαίνονται από μια εντελώς ασυμπτωματική κατάσταση έως μια σοβαρή διαταραχή, με ανεπάρκεια οργάνων και αυξημένη θνησιμότητα, κλινική εικόνα δηλαδή παρόμοια με την ομόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία. Αυτή η ετερογένεια στα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου πιθανότατα οφείλεται στην παρουσία διαφορετικών αλληλόμορφων για τη β - θαλασσαιμία ή ακόμη και λόγω της αλληλεπίδρασης με διάφορους γενετικούς τροποποιητικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα η ύπαρξη ενός γονιδίου που σχετίζεται με την αυξημένη παραγωγή αιμοσφαιρίνης F (πολυμορφισμός XmnI) (43, 44).

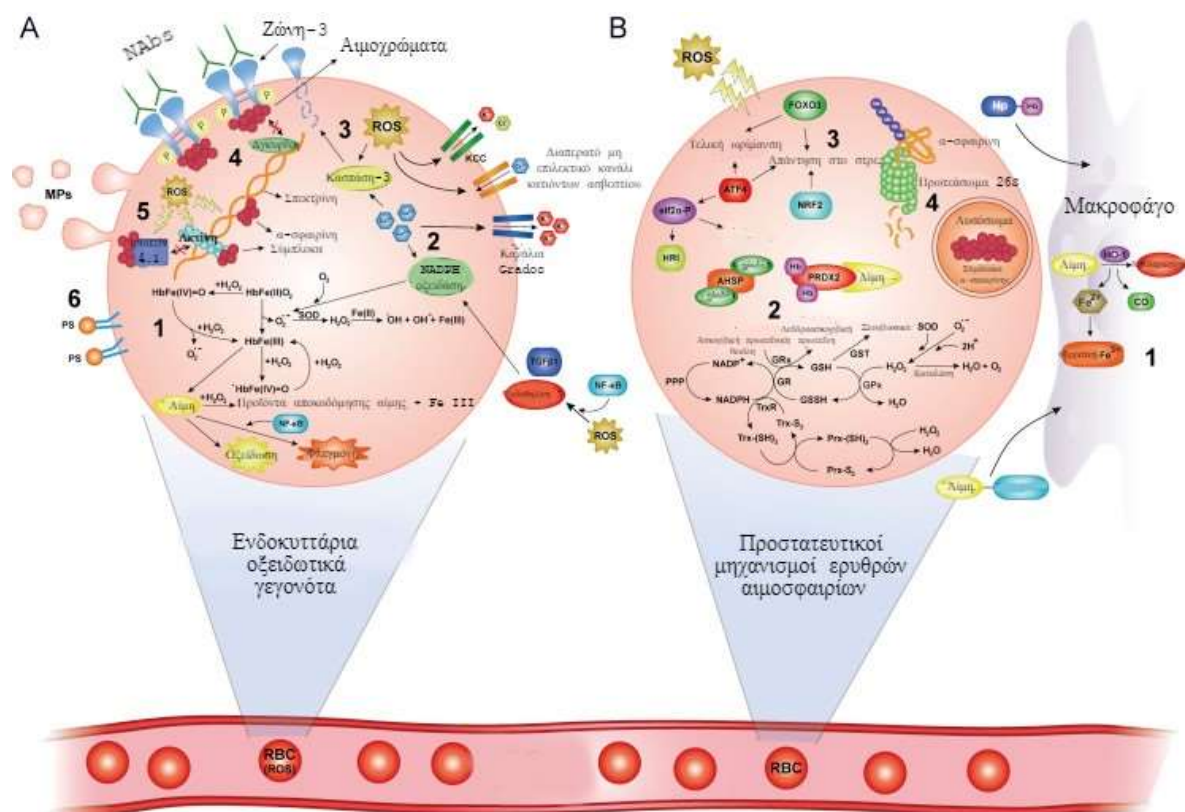
Η πλειονότητα των ασθενών με HbS — β - θαλασσαιμία έχουν λάβει επανειλημμένες μεταγγίσεις αίματος έως την ενηλικίωση τους. Μια ανισορροπία μεταξύ της χρόνιας φλεγμονής που αυξάνει την έκφραση της εψιδίνης, της χρόνιας αιμόλυσης, της συσσώρευσης σιδήρου λόγω των επανειλημμένων μεταγγίσεων και της αυξημένης απορρόφησης σιδήρου λόγω της μη αποτελεσματικής ερυθροποίησης, οδηγεί σε διακοπή του μεταβολισμού του σιδήρου και πιθανώς σε υπερφόρτωση σιδήρου σε αρκετούς ασθενείς (45).

Οι ετερόζυγοι αυτοί ασθενείς εμφανίζουν υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες, το οποίο οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Συγκεκριμένα, η υπερφόρτωση σιδήρου αποτελεί την κύρια πηγή οξειδωτικού στρες στους ασθενείς που μεταγγίζονται συχνά. Ωστόσο, στις περιπτώσεις που τα συμπτώματα της αναιμίας είναι ήπια και οι ασθενείς δεν χρήζουν μετάγγισης υπάρχουν κι άλλες πηγές οξειδωτικών μορίων που τους επηρεάζουν. Για παράδειγμα, η περίσσεια μη ζευγαρωμένων αλυσίδων α - σφαιρίνης που μετουσιώνονται και αυτοοξειδώνονται, καθώς και η αιμοσφαιρίνη S που συνδέεται με τη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων και δρα ως αντιδραστήριο Fenton, αυξάνουν την παραγωγή δραστικών ριζών όπως το υπεροξείδιο και η ρίζα υδροξυλίου. Αυτά τα γεγονότα έχουν ποικίλες ενδοκυττάριας αλλά και εξωκυττάριας επιπτώσεις στους ασθενείς (46).

8. Ενδοκυττάρια οξειδωτικά γεγονότα

8.1 Φωσφολιπιδιακή ασυμμετρία, έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης και ερυθρόπτωση

Η μερική οξυγόνωση της αιμοσφαιρίνης στη μικροκυκλοφορία έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στην διαμόρφωση της, οι οποίες ευθύνονται όχι μόνο για την αυξημένη αυτοοξειδωση της, αλλά και για την αυξημένη συγγένεια της με την πλασματική μεμβράνη, γεγονός που την καθιστά υπεύθυνη για την πλειονότητα των δραστικών ριζών που δημιουργούνται στη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Επειδή, οι δραστικές ρίζες οξυγόνου που δημιουργούνται στην πλασματική μεμβράνη δεν είναι εύκολα προσβάσιμες από το κυτταροπλασματικό αντιοξειδωτικό σύστημα, μπορούν εύκολα να οξειδώσουν τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες της μεμβράνης, προκαλώντας κατά αυτόν τον τρόπο εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη. Ειδικά σε διπλούς ετεροζυγώτες β - θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής αναιμίας που παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου, λόγω του μεγάλου βαθμού αυτοοξειδωσης της αιμοσφαιρίνης, τα περιορισμένα αντιοξειδωτικά της μεμβράνης (π.χ. βιταμίνες E και C, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης κ.α.) καταναλώνονται γρήγορα (47).



Εικόνα 10. Α) Ενδοκυτταρικά οξειδωτικά γεγονότα. (1) Οξείδωση αιμοσφαιρίνης με αποτέλεσμα την παραγωγή ROS, ελεύθερης αίμης και σιδήρου. (2) Ενζυματική παραγωγή υπεροξειδίου από την NADPH οξειδάση. (3) Ενεργοποίηση της κασπάση-3 από τα αυξημένα επίπεδα ROS, γεγονός που επηρεάζει την αλληλεπίδραση της Ζώνης - 3 με τον κυτταροσκελετό. Τα ROS και τα αυξημένα επίπεδα Ca^{2+} ενεργοποιούν επίσης τα κανάλια KCC και Gardos αντίστοιχα, με αποτέλεσμα την αυξημένη έξοδο του K^+ από το κύτταρο. (4) Η αιμοχρωμάτωση μεσολαβεί στην οξειδωτική διασταύρωση και στη φωσφορυλίωση της Ζώνης - 3, οδηγώντας στη συσσωμάτωση και το διαχωρισμό της από τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. (5) Τα ROS προάγουν την οξείδωση της πρωτεΐνης 4.1, της ακτίνης και της σπεκτρίνης με αποτέλεσμα την εξασθενημένη αλληλεπίδραση τους. (6) Η έκθεση PS προκύπτει από τη διαταραχή της φυσιολογικής δομής της μεμβράνης, λόγω της παρουσίας των ROS. Β) Προστατευτικοί μηχανισμοί των ερυθρών αιμοσφαιρίων. (1) Τα σύμπλοκα αιμοσφαιρίνης/Hb και αιμοπεξίνης/αίμης φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα. Η αίμη στη συνέχεια αποικοδομείται και απελευθερώνεται χολοπρασίνη, CO και σίδηρος. (2) Αντιοξειδωτικά ένζυμα και μόρια των ερυθρών αιμοσφαιρίων. (3) Μηχανισμοί απόκρισης των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο οξειδωτικό στρες, μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων των αντιοξειδωτικών ενζύμων. (4) Οδοί ποιοτικού ελέγχου πρωτεϊνών. (Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/corecgi/tileshop/tileshop.fcgi?p=PMC3&id=609836&s=53&r=1&c=3>)

Η υπεροξείδωση των λιπιδίων και η οξείδωση των πρωτεϊνών έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της οργάνωσης των λιπιδίων της μεμβράνης και της κυτταρικής παραμόρφωσης. Η κυτταρική παραμόρφωση είναι πολύ σημαντική για τη σωστή λειτουργία των ερυθρών αιμοσφαιρίων, καθώς αυτή τους επιτρέπει να συμπιέζονται και να διέρχονται μέσω των τριχοειδών αγγείων στη μικροκυκλοφορία για την αποτελεσματική μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς. Επιπλέον, η διακοπή της φυσιολογικής ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων προκαλεί την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην εξωτερική στοιβάδα της μεμβράνης (Εικόνα 10Α). Η PS αποτελεί σήμα για την απομάκρυνση των κυττάρων, το οποίο αναγνωρίζεται από τα μακροφάγα και έτσι φαγοκυτταρώνουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια που την εκθέτουν στην επιφάνεια τους (48).

Η έκθεση της PS και η επακόλουθη φαγοκυττάρωση τους από τα μακροφάγα είναι ο μηχανισμός της αφαίρεσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά την ερυθρόπτωση. Η ερυθρόπτωση είναι ο μηχανισμός απόπτωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ο οποίος συμβαίνει πριν από τη γήρανση και μετά από τραυματισμό τους. Χαρακτηρίζεται από την συρρίκνωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και

την απώλεια της οργάνωσης της μεμβράνης τους. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να διεγερθεί από το οξειδωτικό στρες, την εξάντληση της ενέργειας, την αυξημένη συγκέντρωση Ca^{2+} , από τις κασπάσες και τη διαταραγμένη δραστηριότητα αρκετών κινασών (π.χ. PKC και p38 MAPK), παράγοντες που παρατηρούνται στη δρεπανοκυτταρική αναιμία και στη β-θαλασσαιμία (49).

8.2 Σχηματισμός αιμοχρωμάτων, οξείδωση Ζώνης - 3 και γήρανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων

Τροποποιήσεις στη δομή και τη λειτουργία των συστατικών της μεμβράνης προκαλούνται επίσης από την άμεση καταβύθιση μετουσιωμένων αιμοσφαιρινών ή αλυσίδων σφαιρίνης. Η δρεπανοκυτταρική αναιμία και η β - θαλασσαιμία χαρακτηρίζονται από ασταθή μόρια αιμοσφαιρίνης. Στην β - θαλασσαιμία η αστάθεια αποδίδεται στην μη ισορροπημένη παραγωγή αλυσίδων σφαιρίνης με αποτέλεσμα την υπερβολική ελεύθερη α - σφαιρίνη, ενώ στη δρεπανοκυτταρική αναιμία η μετάλλαξη επηρεάζει την τριτογενή και τεταρτοταγή δομή της αιμοσφαιρίνης S και έτσι την καθιστά εύκολα μετουσιωμένη. Η ασταθής αυτή αιμοσφαιρίνη αλλά και οι αλυσίδες σφαιρίνης τείνουν να αυτοοξειδώνονται, να μετουσιώνονται και να καθιζάνουν ως αιμοχρώματα (50). Τα αιμοχρώματα είναι δομές που αποτελούνται από όλα τα ενδιάμεσα προϊόντα της οξειδωτικής μετουσίωσης της αιμοσφαιρίνης, ξεκινώντας από την μεθαιμοσφαιρίνη έως την πλήρη διάσπαση και απελευθέρωση της αίμης και του σιδήρου (51).

Τα αιμοχρώματα έχουν υψηλή συγγένεια για τον κυτταροπλασματικό τομέα της Ζώνης - 3 και μεσολαβούν στην οξειδωτική διασταύρωση μέσω δισουλφιδικών δεσμών (Εικόνα 10A). Η οξείδωση της Ζώνης - 3 από την κινάση της τυροσίνης, γίνεται μέσω της φωσφορυλίωσης της κυτταροπλασματικής περιοχής της, λόγω του οξειδωτικού στρες. Αυτό έχει σαν συνέπεια την ομαδοποίηση και τον διαχωρισμό της Ζώνης - 3 από τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, μέσω διακοπής της δέσμωσης της αγκυρίνης (50, 52).

Μια από τις λειτουργίες της Ζώνης - 3 είναι η σύνδεση των γλυκολυτικών ενζύμων και η οργάνωση τους στη μεμβράνη, ρυθμίζοντας έτσι τη ροή της γλυκόζης μεταξύ της γλυκόλυσης και της οδού των φωσφορικών πεντοζών (PPP). Επομένως, η αποσύνθεση των γλυκολυτικών ενζύμων από την οξειδωμένη Ζώνη - 3, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της γλυκόλυσης και την μείωση της παραγωγής NADPH από τη PPP (53). Το NADPH είναι ένας σημαντικός αναγωγικός παράγοντας της γλουταθειόνης και της υπεροξειρεδοξίνης, προσφέροντας έτσι προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες. Κατά συνέπεια, η μείωση των επιπέδων του μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων και επιδεινώνει περαιτέρω το οξειδωτικό στρες (54).

Επιπλέον, τα φυσικά αντισώματα έναντι της Ζώνης - 3 (NAbs) έχουν υψηλή συγγένεια για τα συμπλέγματα Ζώνης - 3 / αιμοχρώματος. Με τη δέσμευση του στα συμπλέγματα ενεργοποιούν το συμπλήρωμα και κατά συνέπεια την εκκαθάριση των ερυθρών αιμοσφαιρίων από τα μακροφάγα (Εικόνα 10Α). Η δέσμευση των φυσικών αυτοαντισωμάτων στην Ζώνη - 3 και η ενεργοποίηση του συμπληρώματος εμπλέκονται στην απομάκρυνση των γηρασμένων ερυθρών και παρατηρείται σε μεγάλο βαθμό σε αιμολυτικές διαταραχές όπως η διπλή ετεροζυγωτία β - θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής αναιμίας (55).

8.3 Οξειδωτικό στρες και επιπτώσεις στον κυτταροσκελετό των ερυθρών αιμοσφαιρίων

Το οξειδωτικό στρες έχει επίδραση τόσο στις μεμβρανικές όσο και στις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Η σπεκτρίνη είναι ένας κύριος στόχος των δραστικών ριζών οξυγόνου και η οξείδωση της οδηγεί σε διακοπή της αλληλεπίδρασής της με άλλες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες όπως είναι η ακτίνη ή με πρωτεΐνες που συνδέουν τη μεμβράνη και τον κυτταροσκελετό όπως η πρωτεΐνη 4.1 (Εικόνα 10Α) (56). Αυτό οδηγεί σε μειωμένη σταθερότητα στην αλληλεπίδραση μεταξύ μεμβράνης και κυτταροσκελετού και έτσι αυξάνει την ευθραυστότητα των ερυθρών.

8.4 Η δράση των δραστικών ριζών οξυγόνου ως μόρια σηματοδότησης και η συμμετοχή τους στην αιμόλυση

Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου δεν λειτουργούν μόνο ως οξειδωτικά μόρια αλλά είναι ικανές να ρυθμίσουν τη δραστηριότητα παραγόντων μεταγραφής, μεμβρανικών διαύλων και μεταβολικών ενζύμων και έτσι να ενσωματωθούν σε οδούς σηματοδότησης, πιθανώς μέσω οξείδωσης πρωτεϊνικών θειολών (57).

Η ενεργοποίηση της κασπάσης - 3 έχει συνδεθεί με αυξημένη παραγωγή δραστικών ριζών στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η κασπάση-3 παράγεται φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης και διασπά τους GATA-1, Tal-1 αλλά και διάφορες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ακεραιότητα του κυτταροσκελετού και του DNA, ξεκινώντας την διεργασία του κυτταρικού θανάτου όταν τα επίπεδα της ερυθροποιητίνης (EPO) είναι χαμηλά. Η ενεργοποίηση της λόγω των υψηλών επιπέδων οξειδωτικού στρες, οδηγεί σε μερική αποικοδόμηση της Ζώνης - 3, επηρεάζοντας τόσο την αλληλεπίδρασή της με κυτοσολικές πρωτεΐνες όσο και τον κυτταροσκελετό (58) (Εικόνα 10Α).

Η προκύπτουσα βλάβη στη δομή της μεμβράνης μπορεί να οδηγήσει σε έκθεση PS στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί στην αναστολή της αντλίας Ca^{2+} - ATPάσης στα ερυθρά αιμοσφαίρια και στην ενεργοποίηση των διαπερατών από Ca^{2+} μη επιλεκτικών καναλιών κατιόντων με επακόλουθη αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} (Εικόνα 10A). Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση της καλπαΐνης, της τρανσγλουταμινάσης-2 και των κασπασών, οι οποίες μπορούν να αποικοδομήσουν τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες και να μειώσουν τη σταθερότητα των κυττάρων (59). Επιπλέον, η αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{2+} έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη φωσφατάση της φωσφοτυροσίνης αυξάνοντας έτσι τη φωσφορυλίωση της Ζώνης - 3, και επίσης μειώνει τη δραστηριότητα της φλιπάσης που οδηγεί στην αποδιοργάνωση της μεμβράνης και στην έκθεση PS (60). Ένα άλλο αποτέλεσμα της αυξημένης συγκέντρωσης Ca^{2+} εντός των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η ενεργοποίηση του καναλιού Gardos, με επακόλουθη έξοδο του K^+ (Εικόνα 10A). Αυτές οι αλλαγές στην ομοιόσταση των κατιόντων οδηγούν στην έξοδο νερού από τα ερυθρά και συνεπώς στη συρρίκνωση τους, η οποία είναι ένα χαρακτηριστικό της απόπτωσης (61,62).

Το οξειδωτικό στρες έχει επίσης βρεθεί ότι επηρεάζει τη λειτουργία του συν-μεταφορέα K - Cl (KCC) σε ερυθρά αιμοσφαίρια που παρουσιάζουν μεταβολές λόγω της β - θαλασσαιμίας (Εικόνα 10A). Η αυξημένη δραστηριότητα του KCC οδηγεί σε αυξημένη έξοδο K^+ από τα ερυθρά, γεγονός που μπορεί να διαλύσει την κλίση K^+ κατά μήκος της μεμβράνης και να οδηγήσει στην αποπόλωση της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την είσοδο Cl^- και νερού στα ερυθρά λόγω του φαινομένου της ώσμωσης και επακόλουθο οίδημα των κυττάρων, διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης και αιμόλυση (63).

8.5 Οξειδωτικό στρες και μη αποτελεσματική ερυθροποίηση

Η μη αποτελεσματική ερυθροποίηση που παρατηρείται οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία ελευθέρων αλυσίδων α - σφαιρίνης. Οι μη ζευγαρωμένες αυτές αλυσίδες έχουν την τάση να καθιζάνουν και να αυτοοξειδώνονται παράγοντας υψηλές ποσότητες ελεύθερης αίμης, σιδήρου και δραστικών ριζών οξυγόνου (64). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αυτά τα μόρια μπορούν να προωθήσουν την οξείδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών της μεμβράνης με αποτέλεσμα τη συσσωμάτωση της Ζώνης - 3 και την έκθεση PS στην επιφάνεια των ερυθρών, τα οποία είναι σημάδια γήρανσης και απόπτωσης τους και οδηγούν στην απομάκρυνση τους από τα μακροφάγα.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει αυξημένος αριθμός ενεργοποιημένων μακροφάγων στον μυελό των οστών σε ασθενείς με συμπτώματα β - θαλασσαιμίας, είναι ενδεικτικό της αυξημένης γήρανσης και απόπτωσης των προδρόμων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ειδικά, λόγω της παρουσίας ιζημάτων αλυσίδων α-σφαιρίνης στα κύτταρα στο στάδιο της ωρίμανσης των πολυχρωματόφιλων ερυθροβλαστών, το οποίο είναι το στάδιο της αυξημένης αιμοσφαιρίωσης (65).

Η μη αποτελεσματική ερυθροποίηση οφείλεται και στα συμπτώματα και τις αλλαγές που προκαλεί η δρεπανοκυτταρική αναιμία. Έχει αποδειχθεί ότι οι πολυχρωματόφιλοι νορμοβλάστες παρουσιάζουν αλλοιωμένη μορφολογία και αυξημένο κατακερματισμό, που οφείλεται στον αυξημένο πολυμερισμό της αιμοσφαιρίνης S και σχετίζεται με την ενισχυμένη αυτοοξειδωση της και την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (66).

8.6 Επίδραση των δραστικών ριζών οξυγόνου στον πολλαπλασιασμό των ερυθροειδικών κυττάρων και επιταχυνόμενη διαφοροποίηση

Η μη αποτελεσματική ερυθροποίηση και η αιμόλυση που παρατηρούνται στην ασθένεια προκαλούν χρόνια αναιμία, η οποία οδηγεί σε υποξία ιστού και επακόλουθη αύξηση στην παραγωγή ερυθροποιητίνης (EPO). Αυτό με τη σειρά του οδηγεί σε αυξημένη ερυθροποίηση τόσο στον μυελό των οστών όσο και εξωμυελικά, η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση του πολλαπλασιασμού των ερυθροειδικών κυττάρων και επιταχυνόμενη διαφοροποίηση (67).

Οι Leecharoenkiat και συν. (68) πρότειναν ένα μοντέλο κατά το οποίο η αύξηση της αερόβιας αναπνοής θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων ATP. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στην αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{2+} , πιθανώς μέσω της ενεργοποίησης των αντλιών Ca^{2+} . Τα υψηλά επίπεδα Ca^{2+} διεγείρουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση με αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση του ATP. Το ATP μπορεί άμεσα ή έμμεσα, μέσω cAMP ή Ca^{2+} , να ενεργοποιήσει πολλά μόρια ERK 1 / 2 (εξωκυττάριας κινάσης ρυθμιζόμενες από σήμα), όπως PKA (πρωτεϊνική κινάση A), PKB (πρωτεϊνική κινάση B) και PKC (πρωτεϊνική κινάση C). Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου αποτελούν υποπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού, είναι επίσης ικανές να ενεργοποιήσουν αυτά τα μόρια, τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να αυξήσουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση τόσο άμεσα όσο και έμμεσα μέσω φωσφορυλίωσης των ERK 1/2. Ο αυξημένος πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των ερυθροειδικών κυττάρων οδηγεί σε αυξημένους ρυθμούς μεταβολισμού δημιουργώντας ένα βρόχο ανατροφοδότησης. Επομένως, ακόμη και μια μικρή αρχική ανισορροπία στα επίπεδα των δραστικών ριζών οξυγόνου θα μπορούσε γρήγορα να

οδηγήσει σε ένα σημαντικό αρνητικό αποτέλεσμα. Αυτή η ανισορροπία μπορεί να οφείλεται είτε στην αυξημένη αυτοοξειδωση της ασταθούς αιμοσφαιρίνης είτε στα αυξημένα επίπεδα σιδήρου (68). Επιπλέον, λόγω των συμπτωμάτων της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, η αυξημένη επέκταση των ερυθροειδικών κυττάρων καθιστά τον σπλήνα το κύριο ερυθροποιητικό όργανο(69).

9. Εξωκυττάρια οξειδωτικά γεγονότα

Οι διπλοί ετεροζυγώτες με β - θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία εμφανίζουν αυξημένη αιμόλυση, γεγονός που προκαλεί την απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα, με αποτέλεσμα την πρόκληση οξειδωτικών αντιδράσεων που οδηγούν στην παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου και την απελευθέρωση σιδήρου και αίμης (64, 70). Αυτά τα τοξικά μόρια μπορούν να παρεμβάλλονται σε κυτταρικές μεμβράνες και να προάγουν οξειδωτική βλάβη στο ενδοθήλιο, τα αιμοποιητικά κύτταρα, ακόμη και σε διάφορα όργανα (71, 72). Επίσης, σημάδια οξειδωτικού στρες μπορούν να παρατηρηθούν όχι μόνο στα ερυθρά αιμοσφαίρια αλλά και στα λευκοκύτταρα, τα αιμοπετάλια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και αρκετούς άλλους ιστούς (73).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, λόγω της λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων υπάρχει απελευθέρωση αιμοσφαιρίνης και αίμης, καθώς και οξειδάσης της ξανθίνης από το ήπαρ η οποία συσχετίζεται με το ενδοθήλιο και το οξειδωτικό περιβάλλον στον αυλό των αγγείων. Η ελεύθερη αίμη έχει υψηλό οξειδωτικό δυναμικό μετατρέποντας το H_2O_2 σε μια πολύ ισχυρή ρίζα υδροξυλίου (OH^\cdot), το οποίο σε συνδυασμό με τα μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών στο πλάσμα όπως το υπεροξείδιο της δισμουτάσης, η καταλάση, η γλουταθειόνη κ.α. συμβάλουν σε μια διαδικασία χρόνιας φλεγμονώδους και αγγειακής νόσου που οδηγεί σε διάχυτη αγγειοπάθεια, ισχαιμία και τελικά μέχρι και δυσλειτουργία τελικού οργάνου (74, 75). Επιπλέον, η αίμη μπορεί να δεσμεύσει πρωτεΐνες πλάσματος, όπως είναι η αλβουμίνη και η λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) (76). Ενώ ο ελεύθερος σίδηρος στο πλάσμα έχει συνδεθεί με την καρβονυλίωση των πρωτεϊνών του πλάσματος, γεγονός που αποτελεί ένδειξη της αυξημένης οξείδωσης πρωτεϊνών (77).

10. Προστατευτικά μόρια και αντιοξειδωτικά ένζυμα στα ερυθρά αιμοσφαίρια

Η παραγωγή ενέργειας στα ερυθρά αιμοσφαίρια εξαρτάται από την αναερόβια αποδόμηση της γλυκόζης μέσω της γλυκολυτικής οδού και την επακόλουθη παραγωγή γαλακτικού οξέος, καθώς τα ερυθρά αιμοσφαίρια στερούνται μιτοχονδρίων (54). Το NADH που παράγεται κατά την γλυκόλυση είναι ο κύριος αναγωγικός παράγοντας της μεθαιμοσφαιρίνης, διατηρώντας την αιμοσφαιρίνη συνδεδεμένη με τον σίδηρο. Η αντίδραση καταλύεται από το NADH - εξαρτώμενο ένζυμο αναγωγάση b5 του κυτοχρώματος (78). Η αυξημένη παραγωγή μεθαιμοσφαιρίνης στους ασθενείς με διπλή ετεροζυγωτία β - θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη γλυκόλυση λόγω της αυξημένης ζήτησης NADH (79).

Η 6 - φωσφορική γλυκόζη χρησιμοποιείται όχι μόνο κατά τη διάρκεια της γλυκόλυσης αλλά και στην οδό της φωσφορικής πεντόζης (PPP) για τη μείωση του NADP⁺ σε NADPH (Εικόνα 10B) (54). Το NADPH είναι ο αναγωγικός παράγοντας που χρησιμοποιείται από την αναγωγάση της γλουταθειόνης για τη μείωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε δύο μόρια γλουταθειόνης (GSH). Η GSH είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό μόριο του κύκλου γλουταθειόνης και χρησιμοποιείται από πολλά ένζυμα ως αναγωγικός παράγοντας (Εικόνα 10B). Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η υπεροξειρεδοξίνη παράγουν GSSG, κατά την αναγωγή των υπεροξειδίων (π.χ. H₂O₂), καθώς και οργανικά υδροϋπεροξείδια (ROOH), ενώ η γλουταρεδοξίνη χρησιμοποιεί γλουταθειόνη ως συμπαραγόνα για τη μείωση της οξείδωσης των πρωτεϊνών και του ασκορβικού. Τέλος, η γλουταθειόνη - S τρανσφεράση χρησιμοποιεί το GSH για την αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών (80).

Η θειορεδοξίνη είναι ένα άλλο αντιοξειδωτικό ένζυμο των ερυθρών αιμοσφαιρίων, το οποίο μειώνει τις οξειδωμένες πρωτεΐνες και δρα ως δότης ηλεκτρονίων στην υπεροξειρεδοξίνη (Εικόνα 10B). Αυτό διατηρείται στην ανηγμένη μορφή του από το ένζυμο αναγωγάση της θειορεδοξίνης, η οποία χρησιμοποιεί το NADPH ως αναγωγικό παράγοντα. Το υπεροξείδιο της δισμουτάσης είναι το ένζυμο που μετατρέπει το O₂⁻ σε H₂O₂, και στη συνέχεια η καταλάση το εξουδετερώνει παράγοντας τελικά νερό και οξυγόνο (Εικόνα 10B) (80). Επιπροσθέτως, τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι ικανά να προσλάβουν μεγάλες ποσότητες βιταμινών C και E, καθώς αυτές βοηθούν στην προστασία της πλασματικής μεμβράνης τους από την οξειδωτική βλάβη (72, 81).

Στους διπλά ετερόζυγους ασθενείς β - θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής αναιμίας τα αντιοξειδωτικά ένζυμα και μόρια μειώνονται σημαντικά, αν και δεν έχει αποδειχθεί η ύπαρξη προβλημάτων τόσο στην έκφραση όσο και στον μεταβολισμό τους. Αυτή η μείωση τους οφείλεται

στην αυξημένη και συνεχή παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου, οι οποίες κατακλύζουν πολύ γρήγορα τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού (82).

11. Εξωγενής αντιμετώπιση τους οξειδωτικού στρες των ασθενών

Όπως ήδη αναφέρθηκε οι διπλά ετερόζυγοι ασθενείς με β - θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία εμφανίζουν υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες και αιμόλυσης, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη φλεγμονωδών αντιδράσεων. Επειδή τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού τους δεν επαρκούν να εξισορροπήσουν αυτές τις αντιδράσεις χρειάζονται εξωγενή στήριξη. Για τον σκοπό αυτό μπορούν να χορηγηθούν στα άτομα αυτά διάφορα φυσικά αντιοξειδωτικά.

Ένα από αυτά αποτελεί τα αντιοξειδωτικά που μπορούν να χορηγηθούν είναι η ζυμωμένη παπάγια η οποία μειώνει αποτελεσματικά τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στους ασθενείς αυτούς (83). Ένα άλλο φυσικό αντιοξειδωτικό είναι η κουρκουμίνη, η οποία φαίνεται ότι περιορίζει την υπεροξείδωση των λιπιδίων, καθώς και της πρωτεΐνης Ζώνης - 3 των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Πρόσφατα παρατηρήθηκε πως η προσθήκη κουρκουμίνης ή βιταμίνης Ε σε αντιοξειδωτικά κοκτέιλ που περιέχουν Ν - ακετυλοκυστεΐνη και το χηλικποιητή σιδήρου, δεφεριπρόνη και η χορήγηση τους σε ασθενείς είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης στα ερυθρά με σημαντικά μειωμένο φορτίο σιδήρου, μειωμένο οξειδωτικό στρες και μειωμένη βλάβη της μεμβράνης των ερυθρών, λιγότερη παραμόρφωση τους, αυξημένη σταθερότητα της μεμβράνης και αναστολή της εξωτερίκευσης της φωσφατιδυλοσερίνης (84).

Βιβλιογραφία

- 1) Varchanis S, Dimakopoulos Y, Wagner C, Tsamopoulos J. How viscoelastic is human blood plasma?, *Soft Matter*, 2018, 14(21): p. 4238-4251.
- 2) Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiological implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells., *Blood*, 1997, vol. 89 p. 1121-1132.
- 3) Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: Past, Present, and future. *Blood*, 2008, 112(10): p. 3939-48.

- 4) Djinovic-Carugo K, Gautel M, Ylanne J, Young P. The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies., *FEBS Lett*, 2002, vol. 513 p. 119-123.
- 5) Mohandas N, Evans E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Ann Rev Bioph Biom*, 1994, 23(1):p.787–818.
- 6) M.F Romero, C. M. Fulton, W. F. Boron. The SLC family of HCO⁻ transporters, *Pflugers Arch*, 447 (2004), p. 495-509.
- 7) D. Zhang, A. Kivatkin, P. S. Low. Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3, *Blood*, 2000, p. 2925-2933.
- 8) L. J. Bruce, R. Beckmann, M. L. Ribeiro, L. L. Peters, D. J. Anstee, M. J. Tanner. A band 3 based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane, *Blood*, 2003 (101), p. 4180-4188.
- 9) Baines A. J., Bennett P. M., Carter E. W., Terracciano C.. Protein 4.1 and the control of ion channels, *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 2009, 42(3): p. 211-5.
- 10) Conboy J., Kan Y. W., Shohet S. B., Mohandas N.. Molecular cloning of protein 4.1, a major structural element of the human erythrocyte membrane skeleton. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(24): p. 9512-6.
- 11) A. J. Baines. A FERM-adjacent (FA) region defines a subset of the 4.1 superfamily and is a potential regulator of FERM domain function, *BMC Genomics*, 7 (2006), p. 85.
- 12) I. Correas, T. L. Leto, D. W. Speicher, V. T. Marchesil. Identification of the functional site of erythrocyte protein 4.1 involved in spectrin - actin associations, *J. Biol. Chem.*, 261 (1986), p.3310-3315.
- 13) C. Scott, G. W. Philips, A. J. Baines. Properties of the C - terminal domain of 4.1 proteins, *Eur. J. Biochem*, 268 (2001), p. 3709-3717.
- 14) Qian Xu, Huff L.P., Masakazu F., Griendling K. K.. Redox regulation of the actin cytoskeleton and its role in the vascular system, *Free Radical Bio Med*, 2017, 109: 84-107.
- 15) Fowler V. M.. Regulation of actin filament length in erythrocytes and striated muscle. *Curr Opin Cell Biol.*, 1996, 8(1): p. 86-96.
- 16) Samuel E. Lux, IV. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions, *Blood*, 2016, 127 (2): p. 187–199.

- 17) Yiquin & Junfan, Erythrocyte membrane proteins and membrane skeleton. *Frontiers of Biology in China* Volume 2, Issue 3, p. 247–255.
- 18) Da Costa L., Galimand J., Fenneteau O., Mohandas N.. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders, *Blood Rev.*, 2013, 27(4): p.167-178.
- 19) Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiological implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells., *Blood*, 1997, vol. 89 p. 1121-1132.
- 20) K. Leidl, G. Liebisch, D. Richter, G. Schmitz. Mass spectrometric analysis of lipid species of human circulating blood cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1781 (2008), pp. 655-664.
- 21) M. Muratea, T. Kobayashi. Revisiting transbilayer distribution of lipids in the plasma membrane, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2016, Volume 194, p. 58-71.
- 22) Freikman I, Fibach E. Distribution and shedding of the membrane phosphatidylserine during maturation and aging of erythroid cells, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2011, p. 2773–80.
- 23) Safo M.K., Ahmed M.H., Ghatge M. S., Boyiri T.. Hemoglobin-ligand binding: understanding Hb function and allostery on atomic level, *Biochim. Biophys. Acta*, 2011. 1814(6): p. 797-809.
- 24) Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: Past, Present, and future. *Blood*, 2008, 112(10): p.3939- 48.
- 25) Bissinger R., Bhuyan A.A.M., Qadri S.M., Lang F.. Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases, *FEBS J*, 2019, 286(5): p. 826-854.
- 26) Fibach E., Rachmilewitz E.. The role of oxidative stress in hemolytic anemia, *Curr. Mol. Med.*, 2008, 8(7): p. 609-619.
- 27) Rifkind J.M., Mohanty J.G., Nagababu E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions, *Front. Physiol.*, 2014, (5): p.500.
- 28) D. Reichmann, W. Voth, U. Jakob. Maintaining a Healthy Proteome During Oxidative Stress. *Mol Cell*, 2018, 69(2):203-213.
- 29) Suzuki Y.J., Canni M. Butterfield D.A.. Protein carbonylation, *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(3): p. 323-325.
- 30) Yin H., Xu L., Porter N.A.. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis, *Chem. Rev.*, 2011, 111(10): p. 5944-5972.

- 31) Antonio Ayala, Mario F Muñoz , Sandro Argüelles. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014:360438.
- 32) Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB . The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol*, 1993, (6): p. 215–262.
- 33) Cao ., Galanello R.. Beta - thalassemia, *Genet. Med.*, 2010, 12(2): p. 61-76.
- 34) Herbert L. ,James S.. Alpha and Beta Thalassemia, *Am Fam Physician.*, 2009, 15;80(4): p. 339 - 344.
- 35) Origa R.. β -Thalassemia, 2017, *Genetics in Medicine* (19): p.609 – 619.
- 36) G. Alekperova, A. Orudzhev, S. Javadov. Analysis of erythrocyte and platelet membrane proteins in various forms of beta-thalassemia, *Biochemistry (Mosc)*, 2004, 69(7): p.748-753.
- 37) Sadrzadeh S.M., Graf E., Panter S.S., Hallaway P.E., Eaton J.W. Hemoglobin. A biologic fenton reagent. *J. Biol. Chem.*, 1984, (259): p.14354–14356.
- 38) E. Elguero, L. M. Délicat-Loembet, F. Renaud, F. Prugnotte. Malaria continues to select for sickle cell trait in Central Africa,2015, *Proc Natl Acad Sci* 112(22): p. 7051–7054.
- 39) A. Piccin, C. Murphy, O. P. Smith. Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment, 2019, *Eur. J. Haematol* 102(4): p. 319-330.
- 40) Kuypers, F. A. & de Jong, K. The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes,2004, *Cell. Mol. Biol.* 50, p. 147–158.
- 41) Westerman, M. et al. Microvesicles in haemoglobinopathies offer insights into mechanisms of hypercoagulability, haemolysis and the effects of therapy, 2008, *Br. J. Haematol.* 142, p. 126–135.
- 42) Rogers, S. C. et al. Sickle hemoglobin disturbs normal coupling among erythrocyte O₂ content, glycolysis, and antioxidant capacity, 2013, *Blood* 121, p. 1651–1662.
- 43) Serjeant GR. Sickle cell- β thalassemia. In: Serjeant GR, editor. *Sickle Cell Disease*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2001.
- 44) Malay B. Mukherjee, Anita H. Nadkarni, Ajit C. Gorakshakar, Kanjaksha Ghosh, Dipika Mohanty, and Roshan B. Colah. Clinical, hematologic and molecular variability of sickle cell- β thalassemia in western India,*Indian J Hum Genet*, 2010, 16(3): p. 154–158.

- 45) Ersi Voskaridou, Eleni Plata, Maria Dimopoulou, Evangelos Terpos. Deferasirox effectively decreases iron burden in patients with double heterozygous HbS/ β thalassemia, 2011, *Annals of Hematology* volume 90, p.11–15.
- 46) Patrick B. Walter, Ellen B. Fung, Elliott Vichinsky, Paul Hartz. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with β -thalassaemia or sickle cell disease, 2006, *Br J Haematol.*, 135(2): p. 254–263.
- 47) Mohanty J.G., Nagababu E., Rifkind J.M. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front. Physiol.*, 2014, (5): p.84.
- 48) Ibrahim H.A., Fouda M.I., Yahya R.S., Abousamra N.K., Abd Elazim R.A. Erythrocyte phosphatidylserine exposure in beta-thalassemia. *Lab. Hematol.*, 2014, (20): p.9–14.
- 49) Lang E., Lang F. Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2015, (39): p.35–42.
- 50) Pantaleo A., Giribaldi G., Mannu F., Arese P., Turrini F. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Autoimmun. Rev.*, 2008, (7): p. 457–462.
- 51) Rachmilewitz E.A., Weizer-Stern O., Adamsky K., Amariglio N., Rechavi G., Breda L., Rivella S., Cabantchik Z.I. Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia: Can it be prevented by inhibition of absorption and by antioxidants? *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2005, (1054): p. 118–123.
- 52) Ferru E., Giger K., Pantaleo A., Campanella E., Grey J., Ritchie K., Vono R., Turrini F., Low P.S. Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. *Blood.*, 2011, (117): p. 5998–6006.
- 53) Harrison M.L., Rathinavelu P., Arese P., Geahlen R.L., Low P.S. Role of band 3 tyrosine phosphorylation in the regulation of erythrocyte glycolysis. *J. Biol. Chem.*, 1991, (266): p. 4106–4111.
- 54) Beutler E. Red cell metabolism. A. Defects not causing hemolytic disease. B. Environmental modification. *Biochimie.*, 1972, (54): p. 759–764.
- 55) Mannu F., Arese P., Cappellini M.D., Fiorelli G., Cappadoro M., Giribaldi G., Turrini F. Role of hemichrome binding to erythrocyte membrane in the generation of band-3 alterations in beta-thalassemia intermedia erythrocytes. *Blood.*, 1995, (86): p. 2014–2020.

- 56) Shinar E., Rachmilewitz E.A., Lux S.E. Differing erythrocyte membrane skeletal protein defects in alpha and beta thalassemia. *J. Clin. Investig.*, 1989, (83): p. 404-410.
- 57) Omura T. Heme-thiolate proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, (338): p. 404– 409.
- 58) Mandal D., Baudin-Creuzat V., Bhattacharyya A., Pathak S., Delaunay J., Kundu M., Basu J. Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3) *J. Biol. Chem.*, 2003, (278): p. 52551–52558.
- 59) Redding G.S., Record D.M., Raess B.U. Calcium-stressed erythrocyte membrane structure and function for assessing glipizide effects on transglutaminase activation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1991, (196): p. 76–82.
- 60) Burger P., Kostova E., Bloem E., Hilarius-Stokman P., Meijer A.B., van den Berg T.K., Verhoeven A.J., de Korte D., van Bruggen R. Potassium leakage primes stored erythrocytes for phosphatidylserine exposure and shedding of pro-coagulant vesicles. *Br. J. Haematol.*, 2013, (160): p. 377–386.
- 61) Ney P.A., Christopher M.M., Heibel R.P. Synergistic effects of oxidation and deformation on erythrocyte monovalent cation leak. *Blood.*, 1990, (75): p. 1192–1198.
- 62) Willekens F.L., Werre J.M., Groenen-Dopp Y.A., Roerdinkholder-Stoelwinder B., de Pauw B., Bosman G.J. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Br. J. Haematol.*, 2008, (141): p. 549–556.
- 63) Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.*, 1998, p. 78:247–306.
- 64) Rifkind J.M., Mohanty J.G., Nagababu E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. *Front. Physiol.*, 2014, (5): p. 500.
- 65) Wickramasinghe S.N., Bush V. Observations on the ultrastructure of erythropoietic cells and reticulum cells in the bone marrow of patients with homozygous beta-thalassaemia. *Br. J. Haematol.*, 1975, (30): p. 395–399.
- 66) Blouin M.J., De Paepe M.E., Trudel M. Altered hematopoiesis in murine sickle cell disease. *Blood.*, 1999, (94): p. 1451–1459.

- 67) Mathias L.A., Fisher T.C., Zeng L., Meiselman H.J., Weinberg K.I., Hiti A.L., Malik P. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia major is due to apoptosis at the polychromatophilic normoblast stage. *Exp. Hematol.*, 2000, (28): p. 1343–1353.
- 68) Leecharoenkiat A., Wannatung T., Lithanatudom P., Svasti S., Fucharoen S., Chokchaichamnankit D., Srisomsap C., Smith D.R. Increased oxidative metabolism is associated with erythroid precursor expansion in beta⁰-thalassaemia/Hb E disease. *Blood Cells, Mol. Dis.*, 2011, (47): p. 143–157.
- 69) Kean L.S., Brown L.E., Nichols J.W., Mohandas N., Archer D.R., Hsu L.L. Comparison of mechanisms of anemia in mice with sickle cell disease and beta-thalassemia: peripheral destruction, ineffective erythropoiesis, and phospholipid scramblase-mediated phosphatidylserine exposure. *Exp. Hematol.*, 2002, (30): p. 394–402.
- 70) Kanas T., Acker J.P. Biopreservation of red blood cells – the struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS J.*, 2010, (277): p. 343–356.
- 71) Ferrali M., Signorini C., Ciccoli L., Comporti M. Iron released from an erythrocyte lysate by oxidative stress is diffusible and in redox active form. *FEBS Lett.*, 1993, (319): p. 40–44.
- 72) Balla J., Jacob H.S., Balla G., Nath K., Eaton J.W., Vercellotti G.M. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1993, (90): p. 9285–9289.
- 73) Amer J., Ghoti H., Rachmilewitz E., Koren A., Levin C., Fibach E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *Br. J. Haematol.*, 2006, (132): p. 108–113.
- 74) Biswal S., Rizwan H., Pal S., Sabnam S., Parida P., Pal A.. Oxidative stress, antioxidant capacity, biomolecule damage, and inflammation symptoms of sickle cell disease in children. *Hematology*. 2019, 24(1): p. 1-9.
- 75) Detterich J.A., Liu H., Suriyany S., Oh J.Y., Patel R.P., Forman H.J.. Erythrocyte and plasma oxidative stress appears to be compensated in patients with sickle cell disease during a period of relative health, despite the presence of known oxidative agents. *Free Radic Biol Med.*, 2019, (141): p. 408-415.
- 76) Miller Y.I., Shaklai N. Kinetics of hemin distribution in plasma reveals its role in lipoprotein oxidation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1999, (1454): p. 153–164.

- 77) Comporti M., Signorini C., Buonocore G., Ciccoli L. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Rad. Biol. Med.*, 2002, (32): p. 568–576.
- 78) Percy M.J., Lappin T.R. Recessive congenital methaemoglobinaemia: cytochrome b(5) reductase deficiency. *Br. J. Haematol.*, 2008, (141): p. 298–308.
- 79) Ogasawara Y., Funakoshi M., Ishii K. Glucose metabolism is accelerated by exposure to tbutylhydroperoxide during NADH consumption in human erythrocytes. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2008, (41): p. 237–243.
- 80) van Zwieten R., Verhoeven A.J., Roos D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. *Free Rad. Biol. Med.*, 2014, (67): p. 377–386.
- 81) May J.M. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. *Front. Biosc.: J. Virtual Libr.*, 1998, (3): p.1–10.
- 82) Ren H., Ghebremeskel K., Okpala I., Lee A., Ibegbulam O., Crawford M. Patients with sickle cell disease have reduced blood antioxidant protection. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 2008, (78): p. 139–147.
- 83) Fibach E., Tan E.S., Jamuar S., Ng I., Amer J., Rachmilewitz E.A.. Amelioration of oxidative stress in red blood cells from patients with beta-thalassemia major and intermedia and Ebeta-thalassemia following administration of a fermented papaya preparation. *Phytother Res.*, 2010, 24(9): p. 1334-1338.
- 84) Orn-uma Yanpanitch, Suneerat Hatairaktham, , Ruchaneekorn W. Kalpravidh. Treatment of β -Thalassemia/Hemoglobin E with Antioxidant Cocktails Results in Decreased Oxidative Stress, Increased Hemoglobin Concentration, and Improvement of the Hypercoagulable State. *Oxid Med Cell Longev.*, 2015, 2015:537954.