

## ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΠΡΟΤΑΣΗΣ

**Επιστημονική Περιοχή:** Εργαστηριακή Αιματολογία, Βιοχημεία

**Λέξεις Κλειδιά:** Δρεπανοκυτταρική Αναιμία, γλουταμίνη, NAD, οξειδωτικό στρες, ετεροζυγωτία β-θαλασσαιμίας/δρεπανοκυτταρικής νόσου

**Πανεπιστήμιο/Τμήμα/Τομέας/Εργαστήριο:** Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Εργαστήριο Αξιολογίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία (HemQcR)

Γλώσσα: Ελληνική

**ΤΙΤΛΟΣ ΠΡΟΤΙΝΟΜΕΝΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:** Παθοφυσιολογικές Μεταβολές Ερυθροκυττάρων σε ασθενείς με διπλή ετεροζυγωτία β θαλασσαιμίας/δρεπανοκυτταρικής νόσου υπό θεραπεία Γλουταμίνης

### A. Αναλυτική περιγραφή ερευνητικής πρότασης

#### A. ΓΕΝΙΚΑ ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

##### 1. Η ΔΡΕΠΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ

Η Δρεπανοκυτταρική Αναιμία (ΔΑ), αναφέρθηκε ως η «πρώτη μοριακή νόσος», πριν την επανάσταση της Μοριακής Βιολογίας το 1949<sup>1</sup>. Η ΔΑ είναι γενετική διαταραχή που οφείλεται σε μία σημειακή μετάλλαξη η οποία οδηγεί σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος στη β αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης και μετασχηματισμό των ερυθροκυττάρων από αμφίκυβητα δισκοειδή κύτταρα σε δρεπανοκύτταρα. Τα δρεπανοκύτταρα έχουν την τάση να προσκολλώνται μεταξύ τους, διαταράσσοντας τη μικροκυκλοφορία του αίματος<sup>2</sup>. Το χαρακτηριστικό εργαστηριακό εύρημα της ΔΑ είναι η απουσία της αιμοσφαιρίνης Α και η παρουσία της παθολογικής αιμοσφαιρίνης S. Η αιμοσφαιρίνη S παράγεται μετά από αντικατάσταση του δεύτερου νουκλεοτίδιου στο έκτο κωδικόνιο του γονιδίου της β-σφαιρίνης, οδηγώντας σε αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος από βαλίνη<sup>3</sup>.

Ο όρος «Δρεπανοκυτταρική Αναιμία», αναφέρεται τόσο στην ομόζυγη μορφή της νόσου (HbSS), όσο και στη συνύπαρξη της HbS με άλλες αιμοσφαιρινοπάθειες επί διπλής ετεροζυγωτίας, όπως η συνύπαρξη με ετεροζυγωτία β ή α-θαλασσαιμίας). Ιδιαίτερη σημασία κατά τα τελευταία χρόνια έχει η συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου με τις κλινικές εκδηλώσεις και τη γεωγραφική κατανομή<sup>4</sup>. Στον Ελλαδικό χώρο, το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με αιμοσφαιρινοπάθειες πάσχει από Δρεπανοκυτταρική νόσο (διπλή ετεροζυγωτία HbS/Hbβ).

##### 2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η γονιδιακή μετάλλαξη που απαντάται στη ΔΑ, οδηγεί σε πολλαπλές παθοφυσιολογικές μεταβολές, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τις ποικίλες εκδηλώσεις της ασθένειας. Πλέον, η ΔΑ αναγνωρίζεται ως μία χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση, η οποία δε χαρακτηρίζεται μόνο από απόφραξη των αγγείων, αιμόλυση και αναιμία, αλλά και μεγάλου βαθμού ενεργοποίηση μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, φλεγμονή, θρόμβωση, αυξημένο οξειδωτικό στρες και νεοαγγείωση<sup>5</sup>. Ως συνέπεια, η ΔΑ είναι μία μικροαγγειοπάθεια, η οποία σε συνδυασμό με την χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση, εμφανίζεται με δυσμενή κλινική εικόνα στον ασθενή<sup>6</sup>.

Στην αποζυγονωμένη μορφή της αιμοσφαιρίνης S, η αλληλεπίδραση μεταξύ του κατάλοιπου Glu6→Val και συμπληρωματικών περιοχών γειτονικών μορίων οδηγεί στο σχηματισμό αδιάλυτων πολυμερών. Τα αδιάλυτα πολυμερή συσσωρεύονται και αλλοιώνουν το σχήμα των ερυθροκυττάρων, μετατρέποντάς τα σε εύθραυστα δρεπανοκύτταρα. Η ταχύτητα και η έκταση του πολυμερισμού εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης S, τον κορεσμό του αίματος σε οξυγόνο, το pH, τη θερμοκρασία, τα επίπεδα του 2,3 διφωσφογλυκερικού οξέος (2,3-DPG) και την παρουσία άλλων αιμοσφαιρινών εκτός της HbS<sup>8</sup>.

Επιπλέον, τα δρεπανοκύτταρα έχουν μειωμένη ικανότητα να διατηρούν το ενδοκυττάριο κάλιο και αφυδατώνονται, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης ενδοκυττάρια και να ευνοείται η δρεπάνωση<sup>9</sup>. Η δημιουργία δρεπανοκυττάρων οδηγεί σε αιμόλυση και παράλληλα παρεμπόδιση της αιματικής ροής στη μικροκυκλοφορία<sup>10</sup>. Ως αποτέλεσμα, ευνοείται η ιστική υποξία, η φλεγμονώδης αντίδραση, οι βλάβες και η νέκρωση<sup>11</sup>. Οι δείκτες φλεγμονής (ποικίλες φλεγμονώδεις

κυτοκίνες, όπως οι IL-10, IL-4, IL-1β, MIP-1a και TNF-α) ανευρίσκονται αυξημένοι, ακόμα και σε σταθερή κατάσταση<sup>12</sup>. Όλες αυτές οι αλλαγές, δείχνουν ότι η δρεπανοκυτταρική νόσος είναι το αποτέλεσμα ενός πολύπλοκου παθοφυσιολογικού μηχανισμού, γεγονός που δυσχεραίνει τη θεραπευτική προσέγγιση.

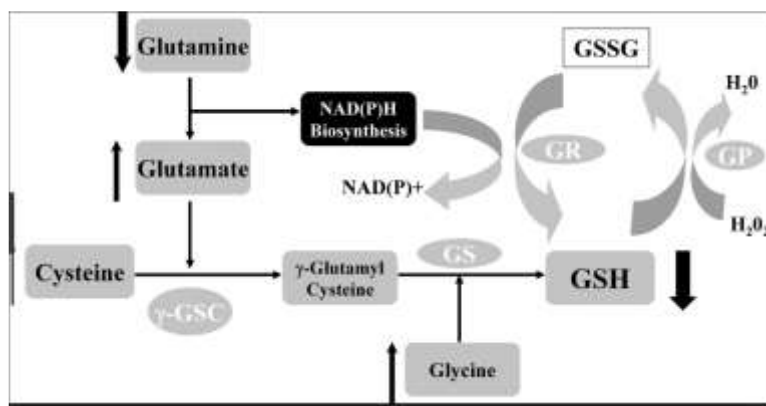
### 3. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Η μοναδική θεραπεία για τη ΔΑ είναι η μεταμόσχευση αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων. Η μεταμόσχευση ενδείκνυται σε παιδιατρικούς ασθενείς με συμβατό HLA δότη λόγω του κινδύνου ανάπτυξης νόσου μοσχεύματος κατά ξενιστή<sup>13</sup>. Η πιθανότητα εύρεσης πιθανού δότη είναι 16-20%<sup>14-15</sup>. Καθώς λοιπόν η μεταμόσχευση προσφέρεται σε περιορισμένο αριθμό ασθενών, οι ελπίδες για μεγαλύτερο αριθμό θεραπευμένων ατόμων, έχουν εστιάσει στη γονιδιακή θεραπεία, η οποία όμως βρίσκεται ακόμα σε πειραματικό στάδιο<sup>16</sup>. Η θεραπεία εκλογής που χρησιμοποιείται, εδώ και δεκαετίες, υπό την μορφή συστηματικών μεταγγίσεων ή αφαιμαξομεταγγίσεων, ενέχει πάντα τον κίνδυνο ανάπτυξης δευτεροπαθών επιπλοκών (δευτεροπαθής αιμοσιδήρωση, αλλοανοσοποίηση, αντιδράσεις, μετάδοση μολύνσεων κτλ.)<sup>17</sup>.

Η παρατήρηση που έγινε στα μέσα της δεκαετίας του 1980 ότι η υδροξυουρία επάγει την παραγωγή εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης HbF, η οποία μειώνει τον πολυμερισμό της HbS και συνεπώς τη δρεπάνωση, αποτέλεσε επανάσταση και καινοτομία στην θεραπευτική αντιμετώπιση της δρεπανοκυτταρικής νόσου<sup>18-20</sup>. Επιπλέον, εδώ και σχεδόν τρεις δεκαετίες δεν υπήρχε καμία εξέλιξη στην έγκριση νέων φαρμάκων για την ασθένεια. Το 2017 ο Οργανισμός Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων (FDA) εγκρίνει την υδροξυουρία για παιδιά από δύο (2) ετών και άνω<sup>21</sup> και την έγκριση της L-γλουταμίνης για ενήλικες και παιδιά άνω των πέντε (5) ετών<sup>22</sup> παρόλο που δεν υπάρχουν πολλά ερευνητικά και κλινικά δεδομένα σχετικά με τη θεραπεία της ΔΑ με L-γλουταμίνη. Η αξιοποίηση της L-γλουταμίνης ως φάρμακο, οφείλεται στις πολυετείς έρευνες του ερευνητή Yutaka Nihara και των συνεργατών του στο Πανεπιστήμιο ULCA των Ηνωμένων Πολιτειών<sup>29-30, 33-34</sup>.

### 4. L-ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΗ ΚΑΙ ΔΡΕΠΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ

Η γλουταμίνη είναι ένα από τα πιο άφθονα αμινοξέα στον ανθρώπινο οργανισμό<sup>23</sup>. Συμμετέχει στην μεταφορά του αζώτου, τη ρύθμιση της ομοιόστασης των οξέων και των καταβολικών σημάτων. Αποτελεί συστατικό της γλυκονογένεσης σε συγκεκριμένους ιστούς και είναι απαραίτητο για τη σύνθεση άλλων αμινοξέων, νουκλεϊκών οξέων, νουκλεοτιδίων και πρωτεϊνών<sup>24</sup>. Το γεγονός ότι είναι πρόδρομο προϊόν της γλουταθειόνης (GSH), του αντιοξειδωτικού διουκλεοτιδίου νικοτιναμιδίου-αδενίνης (NAD) και της αργινίνης, τα οποία προστατεύουν το ερυθροκύτταρο από οξειδωτικές βλάβες, προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον τομέα της Αιματολογίας<sup>25</sup>.



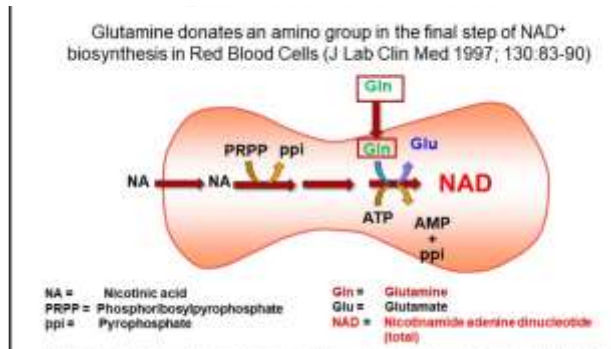
Εικόνα 1: Ο κύκλος της γλουταμίνης. (Ανατύπωση από Morris et al., 2008).

Το δρεπανοκύτταρο, εξαιτίας της οξειδοαναγωγικής του ανισορροπίας, είναι πιο επιρρεπές στο οξειδωτικό στρες και τις επαγόμενες από αυτό βλάβες, σε σχέση με τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα. Επομένως, απορροφά και χρησιμοποιεί την L-γλουταμίνη σε βαθμό που υπερβαίνει κατά πολύ τα επίπεδα που παράγει<sup>26</sup>. Έτσι, η χορήγηση L-γλουταμίνης, οδηγεί σε βελτιωμένη μεταφορά και χρησιμοποίηση της γλουταμίνης και σε αύξηση των οξειδοαναγωγικών παραγόντων NAD και NADH. Ως αποτέλεσμα, βελτιώνεται η κυτταρική άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες<sup>27</sup>.

Τα μειωμένα επίπεδα L-γλουταμίνης φαίνεται ότι οδηγούν σε μειωμένη ικανότητα παραγωγής NAD, μη ομαλή ερυθροκυτταρική ακεραιότητα, αυξημένη αιμόλυση και μειωμένα επίπεδα NO. Έτσι, η ελάττωση της γλουταμίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αιμόλυσης<sup>28</sup>.

## 5. ΟΙ ΕΡΕΥΝΕΣ ΣΤΗ ΔΡΕΠΑΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ

Το γεγονός ότι τα δρεπανοκύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες, οδήγησε την ομάδα του Nihara και των συνεργατών του στη διερεύνηση αντιοξειδωτικών παραγόντων, που μπορεί να έχουν θεραπευτική αξία. Κατέληξαν λοιπόν στη διερεύνηση του NAD<sup>+</sup>, το οποίο ανευρίσκεται σε σχετικά υψηλή συγκέντρωση στα δρεπανοκύτταρα. Το 1997 ανέφεραν ότι τα δρεπανοκύτταρα έχουν υψηλό επίπεδο ενεργής μεταφοράς και αξιοποίησης της γλουταμίνης, αμινοξύ απαραίτητο για τη σύνθεση του NAD<sup>+</sup>(<sup>29</sup>). Σε επόμενες μελέτες αναφέρθηκε ότι η L-γλουταμίνη αυξάνει τα επίπεδα του NAD<sup>+</sup> στα δρεπανοκύτταρα, αλλά κυρίως, αυξάνει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, και τη σχετική αναλογία NADH προς NAD<sup>+</sup>(<sup>30</sup>). Αυτή η αλλαγή φαίνεται ότι μειώνει έμμεσα την επιδεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες. Η L-γλουταμίνη έχει επιπλέον οφέλη στην πρωτεϊνική σύνθεση και στη σύνθεση της γλουταθειόνης<sup>31</sup>. Η L-γλουταμίνη καταβολίζεται από το ένζυμο γλουταμινάση σε L-γλουταμινικό οξύ. Η αμμωνία (NH<sub>3</sub>) που απελευθερώνεται, χρησιμοποιείται από το ένζυμο NAD συνθετάση, ώστε να συνθέσει NAD από διουκυλοτιδίο νικοτικού οξέος-αδενίνης (NaAD )<sup>32</sup>.



Εικόνα 2: Ο μεταβολισμός της γλουταμίνης. (Ανατύπωση από Nihara et al., 1997)

Αυτές οι κλινικές έρευνες, αλλά και έρευνες προηγούμενων ετών, οδήγησαν στη παραγωγή του φαρμάκου Endari (L-γλουταμίνη σε σκόνη). Δεν αποτελεί φάρμακο που θεραπεύει τη νόσο, αλλά η φάση III της κλινικής δοκιμής, έδειξε ότι οι ασθενείς που έπαιρναν συχνά το φάρμακο, εμφάνισαν μείωση της συχνότητας των δρεπανοκυτταρικών κρίσεων και των παρενεργειών της νόσου<sup>33</sup>. Επιπλέον έρευνα από το εργαστήριο του Nihara και των συνεργατών του, έδειξε ότι η χορήγηση L-γλουταμίνης μειώνει την προσκόλληση των δρεπανοκυττάρων στο ενδοθήλιο<sup>34</sup>.

Απουσία άλλης θεραπευτικής λύσης, ο FDA ενέκρινε το φάρμακο<sup>35</sup>. Αποτελεί το πρώτο βήμα για περαιτέρω διερεύνηση για τη θεραπεία αυτής της καταστροφικής νόσου. Κατά την κλινική δοκιμή με γλουταμίνη, οι παρενέργειες ήταν αμελητέες. Αναφέρθηκαν συνήθη συμπτώματα, όπως ναυτία, πονοκέφαλος, τάση για εμετό και πόνο στην κοιλιακή χώρα<sup>36</sup>. Αξίζει να

αναφερθεί ότι ασθενείς με ηπατική και πνευμονική ανεπάρκεια εμφάνισαν αυξημένη θνησιμότητα μετά τη χορήγηση γλουταμίνης, γεγονός που προτείνει ιδιαίτερη προσοχή στη χορήγησή της<sup>37</sup>.

## **B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Η παθοφυσιολογία του ερυθροκυττάρου και του πλάσματος ασθενών με διπλή ετεροζυγωτία BS/B ύστερα από την θεραπευτική παρέμβαση με χορήγηση γλουταμίνης ή υδροξουρίας χωρίς να λαμβάνουν ως θεραπευτική παρέμβαση μετάγγιση συμπτυκνωμένων ερυθροκυττάρων. Τα συμπεράσματα πιθανά να βοηθήσουν στην ποιότητα ζωής του ασθενή (μείωση των κρίσεων).

## **Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΕΡΓΟΥ**

Για τη μελέτη θα συγκεντρωθούν δείγματα από N=45 ενήλικες ασθενείς με διπλή ετεροζυγωτία BS/B άνω των 18 ετών με δρεπανοκυτταρική νόσο και N=20 μάρτυρες. Οι μάρτυρες θα είναι φορείς ετερόζυγης β-MA (β/β<sup>0</sup> ή β/β<sup>+</sup>β<sup>++</sup>) και ετερόζυγης ΔΑ όπως φαίνεται στον κάτωθι Πίνακα:

<b>α/α</b>	<b>Ομάδα</b>		<b>Χαρακτηριστικά</b>	<b>Μεταγγίσεις</b>	<b>Θεραπεία</b>	<b>Αριθμός</b>
1.	A	Ομάδα μελέτης	Διπλή ετεροζυγωτία BS/B	Όχι	Όχι	15
2.	B	Ομάδα μελέτης	Διπλή ετεροζυγωτία BS/B	Όχι	Υδροξουρία	15
3.	Γ	Ομάδα μελέτης	Διπλή ετεροζυγωτία BS/B	Όχι	Γλουταμίνη	15
4.	Δ	Μάρτυρες	Ετερόζυγη β-MA (β/β <sup>0</sup> ή β/β <sup>+</sup> β <sup>++</sup> )	Όχι	Όχι	10
5.	E	Μάρτυρες	Ετερόζυγη ΔΑ	Όχι	Όχι	10

### Σχεδιασμός μελέτης:

1<sup>η</sup> προσέγγιση:

- Τυχοποίηση ασθενών βάσει του ιστορικού τους και της αγωγής που ήδη λαμβάνουν.
- Αιμοληψία.

2<sup>η</sup> προσέγγιση (μετά από έξι μήνες):

- Αιμοληψία.
- Καταγραφή πιθανών κρίσεων.

3<sup>η</sup> προσέγγιση (σε ένα χρόνο):

- Αιμοληψία.
- Καταγραφή πιθανών κρίσεων.

Τα δείγματα ασθενών και των μαρτύρων, θα συλλεχθούν σε αντιπηκτικό EDTA (2 σωληνάκια) για κλασικό αιματολογικό έλεγχο, μέτρηση γλουταμίνης και απομόνωση των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών. Επίσης, θα ληφθούν δείγματα χωρίς αντιπηκτικό για βιοχημικό έλεγχο και τέλος, θα ληφθούν δείγματα με κιτρικό νάτριο για τη μέτρηση των δεικτών της αιμόστασης και άλλων δεικτών.

## **Δ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ**

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων θα χρησιμοποιηθεί το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences, έκδοση 22) με παραμετρικές και μη παραμετρικές στατιστικές μεθόδους στις οποίες ως στατιστικά σημαντικό θα θεωρηθεί το  $p > 0.05$ .

## Β. Καινοτομία της διδακτορικής διατριβής

Η παρούσα μελέτη θα δώσει σημαντικές πληροφορίες για την κλινικοεργαστηριακή έκβαση των ασθενών με διπλή ετεροζυγωτία BS/B (δρεπανοκυτταρική νόσο) ύστερα από την χορήγηση γλουταμίνης ή/και υδροξυουρίας.

## Γ. Χρονοδιάγραμμα και ρεαλιστικότητα του χρονοδιαγράμματος

Η μελέτη αναμένεται να ολοκληρωθεί σε διάστημα τριών ετών ως εξής:

### 1<sup>ο</sup> έτος:

- **Σημείο 0 [0-6 μήνες]:**

**α/α Ομάδα**

1.	A	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP
2.	B	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP
3.	Γ	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP
4.	Δ	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP
5.	E	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP

**Gh:** Απομόνωση ghosts (ερυθροκυτταρικών μεμβανών)

**KYT:** Απομόνωση κυτοσολίου

**ΩΑ:** Έλεγχος οσμωτικής αντίστασης

**BX:** Βιοχημικός έλεγχος (και δείκτες φλεγμονής)

**ΓΑ:** Γενική αίματος και μικροσκοπική παρατήρηση αιματολογικού επιχρίσματος

**ΔΑ:** Δοκιμασία δρεπάνωσης

**AM:** Εργαστηριακός έλεγχος αιμόστασης

**ΓΛ:** Μέτρηση γλουταμίνης με υγρή χρωματογραφία (HPLC) ή τυποποιημένου kit με τη μέθοδο Eliza.

**GSH:** Μέτρηση γλουταθειόνης

**ROS:** Μέτρηση επιπέδων ενδοκυττάρων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS)

**NAD:** Μέτρηση NAD/NADP/NADH

**FRAP:** Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος (ικανότητα αναγωγής του Fe<sup>+++</sup> σε Fe<sup>++</sup>) στο πλάσμα (μέθοδος FRAP).

- **Σημείο 6 [6-12 μήνες]:**

**α/α Ομάδα**

1.	A	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP
2.	B	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP
3.	Γ	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP
4.	Δ	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP
5.	E	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP

- **Σημείο 12 [12-18 μήνες]:**

**α/α Ομάδα**

1.	A	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP
2.	B	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP
3.	Γ	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP
4.	Δ	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP
5.	E	Αιμοληψία	Gh	ΩΑ	KYT	BX	ΓΑ	ΔΑ	AM	ΓΛ	GSH	ROS	NAD	FRAP

### 2<sup>ο</sup> έτος:

- Ανοσοαποτυπώματα (Western Blot Analysis) ερυθροκυτταρικών πρωτεϊνών.
- Ανάλυση δομικών μεταβολών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης.

- Καρβονυλίωση των πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης με τη μέθοδο Oxyblot.

### **3<sup>ο</sup> έτος:**

- Στατιστική επεξεργασία
- Συγγραφή άρθρων

### **ΣΥΝΕΡΓΑΖΟΜΕΝΑ ΤΜΗΜΑΤΑ**

1. Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας και Δρεπανοκυτταρικής Νόσου Ιπποκρατείου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών, Διευθύντρια κα Ντελίκου Σοφία.
2. Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας και Δρεπανοκυτταρικής Νόσου Γενικού Νοσοκομείου Ευαγγελισμός, κα Λουκία Ευλιάτη.
3. Εργαστήριο Αξιολογίας και Ποιοτικού ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αναπληρωτής Καθηγητής Κριεμπάρδης Αναστάσιος.
4. Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθήνας, Επίκουρη Καθηγήτρια Μαριάννα Αντωνέλου.

### **I. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science*. 1949;110(2865):543-548.
2. Paul R, Ortiz de Montellano. A New Step in the Treatment of Sickle Cell Disease. *Biochemistry* 2018, 57, 470?471.
3. Steinberg Martin. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. Volume 27, Issue 4, P204-210. April 01, 2006.
4. Bender MA. Sickle cell Disease. *Gene Reviews*. September 15, 2003.
5. Hyacinth HI, Gee BE, Hibbert JM. The role of nutrition in sickle cell disease. *Nutr Metab Insights*. 2010 Jan 1;3:57- 67.
6. Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of sickle cell disease. *Annu Rev Pathol*. 2019 Jan 24;14:263-292.
7. Brittenham GM, Schechter AN, Noguchi CT. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood*. 1985 Jan;65(1):183-189.
8. Poillon WN, Kim BC, Castro O. Intracellular hemoglobin S polymerization and the clinical severity of sickle cell anemia. *Blood* 91(5):1777-83 . March 1998.
9. Brugnara C. Sickle cell dehydration. *Pathophysiology and therapeutic applications*. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018;68(2-3):187-204.
10. Odièvre MH, Verger E, Silva-Pinto AC, Elion J. Pathophysiological insights in sickle cell disease. *Indian J Med Res*. 2011 Oct;134:532-537
11. Potoka KP, Gladwin MT. Vasculopathy and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Feb 15;308(4):L314-L324. doi: 10.1152/ajplung.00252.2014.
12. Pathare A, Kindi SA, Daar S, Dennison D. Cytokines in sickle cell disease. *Hematology*. 2003 Oct;8(5):329-337.
13. Nickel RS, Hendrickson JE, Haight AE. The ethics of a proposed study of hematopoietic stem cell transplant for children with “less severe” sickle cell disease. *Blood*. 2014 Aug 7;124(6):861866. doi: 10.1182/blood-2014-05-575209.
14. Chakravorty S, Williams TN. Sickle cell disease: a neglected chronic disease of increasing global health importance. *Arch Dis Child*. 2015 Jan;100(1):48-53. doi: 10.1136/archdischild-2013-303773.
15. Data & statistics on sickle cell disease. Centers for Disease Control and Prevention. [www.cdc.gov/ncbddd/sicklecell/data.html](http://www.cdc.gov/ncbddd/sicklecell/data.html). Updated August 9, 2017. Accessed July 7, 2018.
16. Ribeil JA, Hacein-Bey-Abina S, Payen E, et al. Gene therapy in a patient with sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2017 Mar 2;376(9):848-855. doi: 10.1056/NEJMoa1609677.
17. Fasano RM, Meyer EK, Branscomb J, White MS, Gibson RW, Eckman JR. Impact of Red Blood Cell Antigen Matching on Alloimmunization and Transfusion Complications in Patients with Sickle Cell Disease: A Systematic Review. *Transfus Med Rev*. 2019 Jan;33(1):12-23.
18. Veith R, Galanello R, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G. Stimulation of F-cell production in patients with sickle-cell anemia treated with cytarabine or hydroxyurea. *N Engl J Med*. 1985 Dec 19;313(25):1571-1575.
19. Charache S, Dover GJ, Moyer MA, Moore JW. Hydroxyurea-induced augmentation of fetal hemoglobin production in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 1987 Jan;69(1):109-116.
20. Agrawal RK, Patel RK, Shah V, Nainiwal L, Trivedi B. Hydroxyurea in sickle cell disease: drug review. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2014 Jun;30(2):91-96. doi: 10.1007/s12288-013-0261-4.
21. FDA approves new treatment for sickle cell disease. U.S. Food & Drug Administration. <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm590096.htm>

22. FDA approves new treatment for sickle cell disease. U.S. Food & Drug Administration. [www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm566084.htm](http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm566084.htm). Published July 7, 2017. Accessed October 18, 2018.
23. Mok E, Hankard R. Glutamine supplementation in sick children: is it beneficial? *J Nutr Metab.* 2011;2011:617597.
24. Morris CR, Hamilton-Reeves J, Martindale RG, SaravM, OchoaGautier JB. Acquired amino acid deficiencies: a focus on arginine and glutamine. *Nutr Clin Pract.* 2017;32(1\_suppl):30S-47S.
25. Quinn Charles. L-glutamine for sickle-cell anemia. More questions than answers. *Blood.* 2018;132(7):689-693.
26. Morris CR, Suh JH, Hagar W, et al. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood.* 2008;111(1):402-410.
27. Gardner Renee. Sickle Cell Disease. *Advances in Treatment. Ochsner Journal* 18:377–389, 2018.
28. Morris C et al. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*, 1 January 2008#VOLUME 111, Number 1.
29. Niihara, Y., Zerez, C. R., Akiyama, D. S., and Tanaka, K. R. (1997) Increased red cell glutamine availability in sickle cell anemia: Demonstration of increased active transport, affinity, and increased glutamate level in intact red cells. *J. Lab. Clin. Med.* 130, 83-90.
30. Niihara, Y., Zerez, C. R., Akiyama, D. S., and Tanaka, K. R. (1998) Oral L-glutamine therapy for sickle cell anemia: I. Subjective clinical improvement and favorable change in red cell NAD redox potential. *Am. J. Hematol.* 58, 117-121.
31. Ortiz Paul R. A new step in the treatment of sickle cell disease. *Biochemistry* 2018, 57, 470-471.
32. De Ingeniis, J., Kazanov, M. D., Shatalin, K., Gelfand, M. S., Osterman, A. L., and Sorci, L. (2012) Glutamine versus ammonia utilization in the NAD synthetase family. *PLoS One* 7 (6), e39115.
33. Nihara Y, Smith WR, Stark. A phase-3 Trial of oral L-glutamine in sickle cell disease. *N Engl J Med* 2018; 379:1879-1880.
34. Nihara Y et al., L-Glutamine therapy reduces endothelial adhesion of sickle red blood cells to human umbilical vein endothelial cells. *BMC Blood Disorders* 2005, 5:4.
35. Karon A. A new drug and more on the way for sickle cell disease. *American College of Physicians.* [www.acponline.org/membership/medical-students/acp-impact/archive/february-2018/a-new-drug-and-more-on-the-way-for-sickle-cell-disease](http://www.acponline.org/membership/medical-students/acp-impact/archive/february-2018/a-new-drug-and-more-on-the-way-for-sickle-cell-disease). Published December 2017. Accessed October 18, 2018.
36. Package Insert - Endari. [accessdata.fda.gov](http://accessdata.fda.gov). 2017.
37. Heyland D, Muscedere J, Wischmeyer PE, et al; Canadian Critical Care Trials Group. A randomized trial of glutamine and antioxidants in critically ill patients [published correction appears in *N Engl J Med.* 2013; 368(19):1853]. *N Engl J Med.* 2013;368(16): 1489-1497.

EIKONEΣ:

1. Morris et al. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood* 2008 111:402-410.  
Nihara Y et al. Increased red cell glutamine availability in sickle cell anemia: demonstration of increased active transport, affinity, and increased glutamate level in intact red cells. 1997 Jul;130(1):83-90.