



ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Ο ρόλος των αιματολογικών διαταραχών στην
αιμοσυμβατότητα με νανοφορείς δημητρίου.

Πτυχιακή εργασία

Καρκαβίτσα Μυρτώ

Επιβλέπων: Δρ. Τσαμεσίδης Ιωάννης

Συνεπιβλέπουσα: Δρ. Γιαννάκου Ουρανία

2022

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	4
Πρόλογος.....	5
Περίληψη.....	6
Abstract	7
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
1. Το αίμα	8
1.1. Ερυθρά αιμοσφαίρια.....	8
1.1.1. Αιμοσφαιρίνη.....	8
1.2. Ερυθροποίηση	9
1.2.1. Ερυθροποιητίνη	9
2. Αιματολογικές διαταραχές.....	11
2.1. Β-Θαλασσαιμία	11
2.1.1. Ιστορικά στοιχεία.....	11
2.1.2. Επιδημιολογία.....	12
2.1.3. Παθοφυσιολογία της β-θαλασσαιμίας.....	13
2.1.3.1. Ομόζυγη β-θαλασσαιμία.....	13
2.1.3.2. Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	14
2.2. Έλλειψη ενζύμου G6PD	14
2.2.1. Ιστορικά στοιχεία.....	15
2.2.2. Επιδημιολογία.....	16
2.2.3. Παθοφυσιολογία ανεπάρκειας G6PD	16
2.2.4. Συμπτωματολογία	18
2.3. Δρεπανοκυτταρική αναιμία	18
2.3.1. Ιστορικά στοιχεία	19
2.3.2. Επιδημιολογία.....	20
2.3.3. Παθοφυσιολογία Δρεπανοκυτταρικής αναιμίας.....	20
3. Νανοςωματίδια	22
3.1. Είδη νανοςωματιδίων	22
3.1.1. Νανοςωματίδια πυριτίου.....	23
3.1.2. Νανοςωματίδια πυριτίου με ιόντα δημητρίου (Ce)	23
3.2. Τα νανοςωματίδια πυριτίου στην ιατρική και τις βιοϊατρικές επιστήμες	24
3.3. Σύνθεση νανοςωματιδίων	24
3.3.1. Σύνθεση νανοςωματιδίων με την μέθοδο κolloειδούς γέλης (sol-gel).....	25

4. Αιμοσυμβατότητα	26
4.1. Η σημαντικότητα της αιμοσυμβατότητας	26
4.2. Μέθοδοι ελέγχου αιμοσυμβατότητας	26
4.2.1. Μέθοδος αιμοσυμβατότητας με την μέτρηση της αιμόλυσης	27
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	28
1. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας.....	28
2. Υλικά και μέθοδοι.....	29
2.1. Δείγματα αίματος.....	29
2.2. Υλικό νανοσωματιδίων	29
2.3. Μεθοδολογία αιμοσυμβατότητας	29
3. Αποτελέσματα.....	33
4. Συζήτηση	38
5. Συμπεράσματα	41
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42

Ευχαριστίες

Η πρόταση για αυτή την ερευνητική εργασία ήρθε κάπως απροσδόκητα μια μέρα που σκεφτόμουν ότι δεν έχω βρει κάτι να με μαγέψει σε αυτό που σπουδάζω και μάλλον είχα κάνει λάθος επιλογή σπουδών. Δέχθηκα λοιπόν ένα email από τον καθηγητή μου που μου πρότεινε να γίνω μέρος ενός ερευνητικού project που είχε ξεκινήσει, απάντησε σε όλες τις ερωτήσεις μου και με βοήθησε να αφήσω στην άκρη τους προβληματισμούς και τους φόβους μου και να δοκιμάσω κι εγώ πως είναι αυτό το ταξίδι της Έρευνας, το οποίο εν τέλει έμαθα πως δεν είναι εύκολο και ανώδυνο. Είναι όμως πολύ ενδιαφέρον, κατακτάς νέες γνώσεις και δεξιότητες, μαθαίνεις να συνεργάζεσαι καλύτερα και κυρίως να σκέφτεσαι πιο αποδοτικά. Εφόδια που σίγουρα είναι πολύ χρήσιμα για διάφορους τομείς της ζωής.

Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω τον κ. Τσαμεσίδα Ιωάννη για αυτή την ευκαιρία που μου έδωσε, που με στήριξε και με υπομονή με καθοδήγησε σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας, που μου έμαθε καινούριες δεξιότητες και που με βοήθησε τελικά να βρω κάτι που με μαγεύει στις σπουδές μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και την συνεπιβλέπουσα καθηγήτρια κα. Γιαννάκου Ουρανία που με στήριξε στην εκπόνηση μιας εργασίας με ένα θέμα που δεν σχετίζεται άμεσα με το αντικείμενο της, αλλά ήταν πολύ δεκτική και πρόθυμη να βοηθήσει.

Η εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο προσθετικής της Οδοντιατρικής σχολής του ΑΠΘ. Έτσι θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη του εργαστηρίου κα. Κοντονασάκη Ελεάνα που με δέχθηκε εκεί και μου επέτρεψε να χρησιμοποιήσω τον εξοπλισμό τους και ένα μέρος των νανοϋλικών του εργαστηρίου, καθώς και τα υπόλοιπα άτομα του εργαστηρίου που με βοήθησαν να προσαρμοστώ.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους υπεύθυνους του Αιμοδοτικού Κέντρου Νάουσας και της μονάδας πρόληψης μεσογειακής αναιμίας του Ιπποκράτειου Γ.Ν. Θεσσαλονίκης για την παροχή των δειγμάτων αίματος καθώς και όλους τους εθελοντές δότες για την προσφορά τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την βοηθό μου στο εργαστήριο, αλλά και εκτός, Σίμογλου Μαρία που μου προσέφερε ανεκτίμητη βοήθεια στις εργαστηριακές πρακτικές και τηνανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος, όπως επίσης και τηνοικογένειά μουγιατηνστήριξη κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Πρόλογος

Η εκτέλεση των πειραμάτων, για την παρούσα ερευνητική εργασία, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Προσθητικής του τμήματος Οδοντιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης σε συνεργασία με το Αιμοδοτικό Κέντρο Νάουσας και την μονάδα πρόληψης μεσογειακής αναιμίας του Ιπποκράτειου Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης, που μας παρέιχαν τα δείγματα αίματος.

Μέσω της εργασίας ο στόχος ήταν η εξοικείωση με τις εργαστηριακές τεχνικές, την επεξεργασία δειγμάτων αίματος (διαχωρισμός, καθαρισμός, συντήρηση, φυγοκέντριση), την εξοικείωση με τις τεχνικές του ελέγχου της αιμοσυμβατότητας και πιο συγκεκριμένα τον έλεγχο της αιμόλυσης, την εξοικείωση με πρακτικές για την στατιστική ανάλυση και την ανάλυση, επεξεργασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Επίσης σε πιο θεωρητικό επίπεδο στόχος της εργασίας ήταν η εξοικείωση με την βιβλιογραφική έρευνα και την αξιολόγηση των πηγών και των ευρημάτων, η συγγραφή μιας εργασίας αλλά και ο εμπλουτισμός γνώσεων σχετικών με τις διάφορες αιματολογικές διαταραχές που θα αναλυθούν στην παρούσα εργασία, με την αιμοσυμβατότητα και τα νανοϋλικά.

Τέλος, συμπληρωματικά με τα ανωτέρω, επιτεύχθηκε η καλύτερη κατανόηση για τον τρόπο λειτουργίας μιας ερευνητικής ομάδας, έγινε αντιληπτή η αναγκαιότητα του ομαδικού πνεύματος και της συνεργασίας στην ομάδα και η λήψη αποφάσεων και ανάληψης της ευθύνης για τα αποτελέσματα κάθε πράξης.

Περίληψη

Το αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του αίματος, των διάφορων αιματολογικών διαταραχών και η συμβατότητα των ανωτέρω με νανοϋλικά. Επομένως πιο αναλυτικά στα ακόλουθα κεφάλαια περιγράφονται : το αίμα, η δομή, η λειτουργία του και η διαδικασία παραγωγής του, αιματολογικές διαταραχές όπως η β-Θαλασσαιμία (Μεσογειακή αναιμία), η δρεπανοκυτταρική αναιμία και η ανεπάρκεια του ενζύμου G6PD. Για κάθε μια από αυτές γίνεται μια περιγραφή της διαταραχής και της νόσου που προκαλούν, μια ιστορική αναδρομή της ανακάλυψης και των τεχνικών διάγνωσης και θεραπείας τους καθώς και μια επιδημιολογική μελέτη, δηλαδή σε ποιες περιοχές ή πληθυσμούς απαντώνται συχνότερα και πως τους επηρεάζουν.

Ένα ακόμα αντικείμενο μελέτης είναι τα νανοσωματίδια για τα οποία γίνεται μια γενική περιγραφή των ειδών, της χρησιμότητας τους, της παρασκευής τους και επικεντρώνεται κυρίως στα νανοσωματίδια πυριτίου με ιόντα δημητρίου καθώς αυτά είναι και το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη. Τελευταίο μέρος του θεωρητικού τμήματος της εργασίας αποτελεί η αιμοσυμβατότητα για την οποία δίνεται ένας ορισμός, επεξηγείται η αναγκαιότητα της στις ερευνητικές πρακτικές και αναλύονται οι διάφοροι τρόποι μέσω των οποίων ελέγχεται η αιμοσυμβατότητα.

Τα ανωτέρω περιγράφονται στο θεωρητικό τμήμα και ακολουθεί το πειραματικό στο οποίο αναφέρεται ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας, αναλύεται όλη η πειραματική διαδικασία και ακολουθεί ανάλυση και συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Abstract

Blood disorder diseases (BDDs) are very common all over the world, owing to hematopoietic system malfunction. Among non-treated BDDs, thalassemia, sickle cell anemia and G6P-d deficiency are most widely known as pro-oxidant mutations and possess elevated oxidative stress micro-environments.

The potential of medicines in nanoscale raises many hopes to address unmet medical needs, as defined recently by the WHO in its report. The object of this graduation thesis is the study of blood, various hematological disorders and compatibility with cerium doped nanoparticles. Nanomedicine employs various combinations of nanomaterials and molecules towards their application for the therapy of different disorders. Previous studies have developed and applied ceria-based materials for biomedical applications indicating cerium based nanoparticles as potent redox modulators and drug delivery agents. Considering, Ce-NPs as promising candidates for biomedical applications, the blood compatibility of such materials was investigated in various BDDs, where Reactive Oxygen Species (ROS) imbalances contribute to disease progression.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Το αίμα

Το αίμα κατατάσσεται στους συνδετικούς ιστούς. Αποτελείται από το πλάσμα, ένα υδατικό διάλυμα στο οποίο είναι διαλυμένες οργανικές και ανόργανες ενώσεις και τα έμμορφα στοιχεία του αίματος που αποτελούνται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια, τα οποία επίσης αιωρούνται μέσα σε αυτό. Έχει ελαφρώς αλκαλικό pH (7,35-7,45) και αποτελεί το 7-8% του σωματικού βάρους. Ο ρόλος του είναι να μεταφέρει O₂ και θρεπτικά συστατικά σε όλους τους ιστούς και να απομακρύνει το CO₂ και άχρηστες ουσίες από τους ιστούς. Μεταφέρει επίσης ορμόνες, ρυθμίζει τη θερμοκρασία του σώματος και προστατεύει σε περίπτωση τραυματισμού από την αιμορραγία (με τα αιμοπετάλια) και από μολύνσεις (με τα λευκά αιμοσφαίρια). [1-4]

1.1. Ερυθρά αιμοσφαίρια

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι τα πολυπληθέστερα κύτταρα του σώματος με τις φυσιολογικές τιμές τους να κυμαίνονται χονδρικά από 4- 6 εκατομμύρια/ mm³. Είναι απύρνηνα, με αμφίκοιλο δισκοειδές σχήμα και η μέση διάμετρος τους είναι 8μm. Το κυριότερο συστατικό τους είναι μια χρωμοπρωτεΐνη, στην οποία οφείλεται και το κόκκινο χρώμα τους, η αιμοσφαιρίνη. [1-4]



Εικόνα 1: Φυσιολογικό ερυθρό αιμοσφαίριο [Πηγή: BioRender Illustrations]

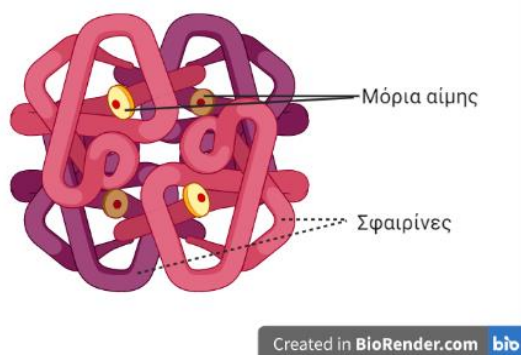
1.1.1. Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη παράγεται από το γονίδιο της αιμοσφαιρίνης (HBB) που βρίσκεται στον βραχύ βραχίονα (p-arm) του 11^{ου} χρωμοσώματος.



Εικόνα 2: Η θέση του γονιδίου HBB στο χρωμόσωμα 11. [Πηγή εικόνας: genome-euro.ucsc.edu]

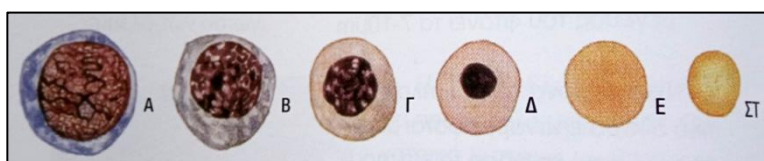
Αποτελείται από τέσσερις πρωτεΐνες, τις σφαιρίνες, που είναι συνδεδεμένες με ένα μόριο αίμης. Οι σφαιρίνες αυτές είναι ανά δύο όμοιες και σχηματίζουν δύο ζεύγη πρωτεϊνών. Στον ενήλικα συνηθέστερη είναι η HbA, σε ποσοστό >95%, που αποτελείται από δύο α και δύο β σφαιρίνες και συνοπτικά γράφεται ως α₂β₂. Συνυπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες και η HbA₂ (α₂δ₂), σε ποσοστό <3,5% και η εμβρυική αιμοσφαιρίνη HbF (α₂γ₂), σε ένα ποσοστό 1-2%. [1-5]



Εικόνα 3: Δομή αιμοσφαιρίνης
Πηγή: BioRender Illustrations]

1.2. Ερυθροποίηση

Η ερυθροποίηση είναι η διαδικασία παραγωγής των ερυθροκυττάρων. Έναυσμα για την έναρξη της ερυθροποίησης είναι η ιστική υποξία, δηλαδή η έλλειψη O₂ από τους ιστούς. Όταν γίνουν αντιληπτά τα χαμηλά επίπεδα O₂ στο αίμα από τους νεφρούς, εκκρίνουν την ερυθροποιητίνη η οποία διεγείρει την παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων στον μυελό των οστών. Για την παραγωγή και ωρίμανση ενός ερυθροκυττάρου, για να γίνει δηλαδή από προερυθροβλάστη ώριμο ερυθροκύτταρο απαιτείται μια εβδομάδα περίπου. [1-5]



Εικόνα 4: Ωρίμανση ερυθρών αιμοσφαιρίων.
[Πηγή: Εργαστηριακή προσέγγιση στη γενική αίματος, Ε. Παντζιαρέλα, Εκδ. Αθανασίου Αλτιντζή, σελ.: 88]

Υπόμνημα εικόνας 4:
Α: Προερυθροβλάστη
Β: Βασεόφιλη ερυθροβλάστη
Γ: Πολυχρωματόφιλη ερυθροβλάστη
Δ: Οξύφιλη ερυθροβλάστη
Ε: Δικτιοερυθροκύτταρο
Στ: Ερυθροκύτταρο

1.2.1. Ερυθροποιητίνη

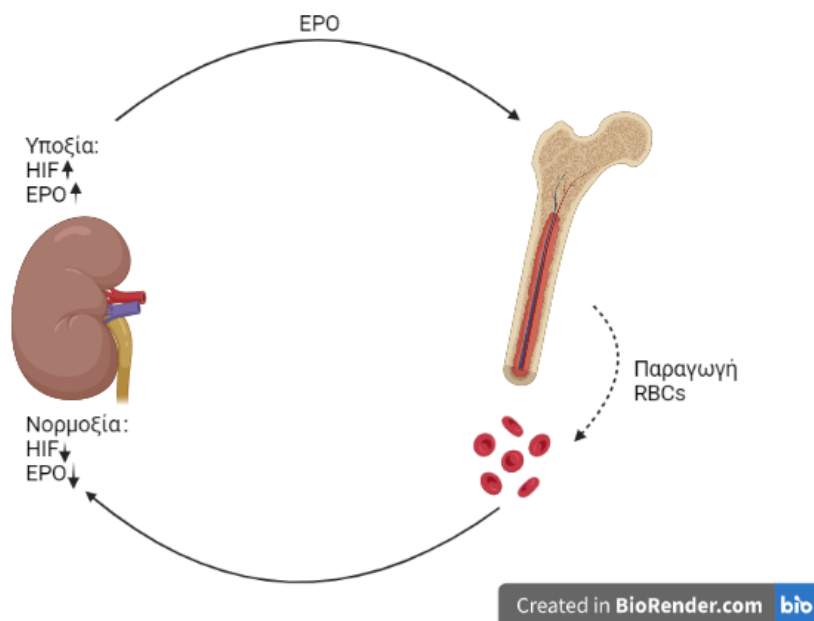
Η ερυθροποιητίνη είναι μια πολυπεπτιδική αλυσίδα που παράγεται από το γονίδιο της ερυθροποιητίνης (EPO) που βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα (q- arm) του 7^{ου} χρωμοσώματος. Γενικά χαμηλά επίπεδα ερυθροποιητίνης εκκρίνονται καθημερινά για

να αντισταθμίσουν την απώλεια ερυθρών αιμοσφαιρίων λόγω της φυσιολογικής απόπτωσης.



Εικόνα 5: Η θέση του γονιδίου EPO στο χρωμόσωμα 7
[Πηγή εικόνας: genome-euro.ucsc.edu]

Όταν τα επίπεδα O_2 μειωθούν σημαντικά παρατηρείται αύξηση των HIF (hypoxia-inducible factors/ παράγοντες επαγόμενοι από την υποξία) και επάγεται η σύνθεση της ερυθροποιητίνης, η οποία παράγεται κυρίως στα περι-σωληναριακά νεφρικά κύτταρα. Η EPO μεταφέρεται και ενεργοποιεί τον μυελό των οστών, ο οποίος διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των προγονικών ερυθροκυττάρων και συμβάλει στη διαφοροποίησή τους σε ώριμα ερυθροκύτταρα. Μόλις ο αριθμός των ερυθροκυττάρων φτάσει σε έναν βαθμό ικανό να διατηρεί την οξυγόνωση των ιστών και τα επίπεδα του O_2 επανέλθουν στις φυσιολογικές τιμές, οι HIF μειώνονται, και η σύνθεση της EPO αναστέλλεται. [1-6]



Εικόνα 6: Μηχανισμός δράσης της ερυθροποιητίνης
[Πηγή: Δημιουργία στο BioRender.com με βάση την εικόνα Α από Bunn, H. (2013). Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. doi: <https://doi.org/10.1101%2Fcshperspect.a011619>]

2. Αιματολογικές διαταραχές

Οι αιματολογικές διαταραχές είναι μια γενική κατηγορία διαταραχών που επηρεάζουν τα έμμορφα στοιχεία του αίματος (ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια) ή/και τα αιμοποιητικά όργανα. Τις κατατάσσουμε ανάλογα με την αιτία πρόκλησης τους σε γενετικές (που οφείλονται σε γονίδια) και επίκτητες (που οφείλονται σε εξωτερικούς παράγοντες όπως φάρμακα ή διατροφικές ανεπάρκειες κ.α.) ενώ ανάλογα την εκδήλωση των συμπτωμάτων τους χωρίζονται σε οξείες (με ξαφνική και έντονη εκδήλωση συμπτωμάτων) και χρόνιες (με πιο αργή εξέλιξη και μεγαλύτερη διάρκεια).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι διαταραχών των ερυθρών αιμοσφαιρίων όπως η αναιμία (μείωση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των τιμών αιματοκρίτη και αιμοσφαιρίνης), ανεπάρκεια ενζύμων των ερυθρών αιμοσφαιρίων (π.χ. G6PD), αιμοσφαιρινοπάθειες (δρεπανοκυτταρική αναιμία, θαλασσαιμίες), αιμολυτική αναιμία, διατροφικές αναιμίες (σιδηροπενική αναιμία), νεοπλασία αίματος (ιδιοπαθής ερυθραιμία) και δευτερογενείς ερυθροκυτταρώσεις. [1, 7-8.]

2.1. Β-Θαλασσαιμία

Η β- θαλασσαιμία είναι μία αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσος που οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου της β- σφαιρίνης, το οποίο εντοπίζεται στον βραχύ βραχίονα (p- arm) του 11^{ου} χρωμοσώματος (chr 11, p15.4), και έχουν ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή σύνθεση της β- σφαιρίνης. Ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης καθορίζεται και η παραγωγή της β- σφαιρίνης η οποία μπορεί να είναι από ελαττωμένη, με την μετάλλαξη να χαρακτηρίζεται ως β⁺, έως απύσση, με την μετάλλαξη να χαρακτηρίζεται ως β⁰. Έχουν παρατηρηθεί πάνω από 200 μεταλλάξεις του γονιδίου της β- σφαιρίνης, επομένως προκύπτουν διαφορετικοί γονότυποι και φαινότυποι με ποικίλη συμπτωματολογία η οποία θα αναλυθεί παρακάτω. [9-13]

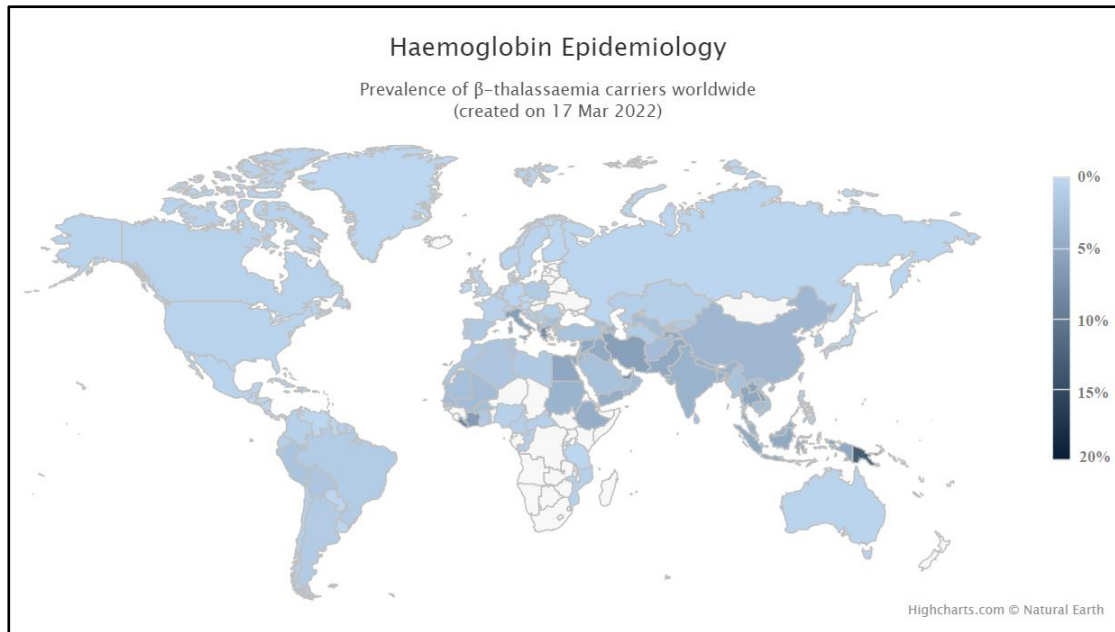
2.1.1. Ιστορικά στοιχεία

Η Θαλασσαιμία ή Μεσογειακή αναιμία ως ξεχωριστή νόσος περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Dr. Cooley (Detroit, 1925) με τον όρο “αναιμία Cooley”

(Cooley's anemia) μετά από μελέτη ατόμων με αναιμία που κατάγονταν από την Μεσόγειο. Αργότερα καθιερώθηκε ο όρος “ θαλασσαιμία ” από τους G.H. Whipple και W.L. Bradford (Rochester, 1936) ως σύνθετη λέξη από τις ελληνικές λέξεις “θάλασσα” και “αίμα” καθώς πρώτα παρατηρήθηκε σε περιοχές γύρω από τη Μεσόγειο θάλασσα. Το 1959 ο M. Perutz προσδιόρισε τη μοριακή δομή της αιμοσφαιρίνης με κρυσταλλογραφία ακτινών -X. Την ίδια περίοδο ο V.M. Ingram διαπίστωσε ότι η αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων αποτελείται από δύο ζεύγη όμοιων αλυσίδων, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν α- και β- αλυσίδες, μια διαπίστωση που συμφωνούσε με το τρισδιάστατο μοντέλο του Perutz. Η έννοια της αναποτελεσματικής ερυθροποίησης στην Θαλασσαιμία περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Hufstetler (California, 1950) με την χρήση σιδηροκινητικών παραμέτρων (ferrokinetic parameters). Στα επόμενα χρόνια η τεχνολογία εξελίχθηκε με αποτέλεσμα στα τέλη της δεκαετίας του 1970 να είναι διαθέσιμες τεχνικές για την άμεση ανάλυση της αιμοσφαιρίνης και στις αρχές της δεκαετίας του 1980 να επιτευχθεί η αλληλούχιση των γονιδίων της αιμοσφαιρίνης και η αναγνώριση μιας σημειακής μετάλλαξης ως αιτία της β- θαλασσαιμίας (Spritzel, 1981) [9,14-18]

2.1.2. Επιδημιολογία

Η β- θαλασσαιμία αρχικά παρατηρήθηκε σε χώρες της Μεσογείου, της Μέσης Ανατολής, της Νοτιοανατολικής Ασίας και της Βορειοανατολικής Αφρικής, σε περιοχές με ζεστό και υγρό κλίμα που ευνοούσαν την ανάπτυξη παρασιτικών λοιμώξεων και ιδιαίτερα τα ελονοσίας στην οποία φαίνεται να είναι ανθεκτικοί οι θαλασσαιμικοί πιθανότατα ως απόρροια της φυσικής επιλογής. Στις μέρες μας βέβαια λόγω της ανταλλαγής πληθυσμών η β- θαλασσαιμία εντοπίζεται επίσης σε περιοχές της Βόρειας και Νότιας Αμερικής, της Βόρειας Ευρώπης καθώς και της Ωκεανίας. Υπολογίζεται ότι το 1,5% του παγκόσμιου πληθυσμού είναι φορείς της νόσου. [9-12, 19-21]



Εικόνα 7: Το στίγμα της β-θαλασσαιμίας σε παγκόσμιο χάρτη.
 [ο χάρτης δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα Ithonet, www.ithonet.eu]

2.1.3. Παθοφυσιολογία της β-θαλασσαιμίας

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, φυσιολογικά οι αιμοσφαιρίνες των ενήλικων ατόμων αποτελούνται κυρίως από την HbA (α₂β₂) και τις HbA₂ (α₂δ₂) και HbF (α₂γ₂) σε μικρό ποσοστό. Στην β-θαλασσαιμία όμως όταν η ποσότητα των β-σφαιρινών δεν επαρκεί, οι πλεονάζουσες α-σφαιρίνες είτε συνδέονται με τις δ- και γ-προκαλώντας την αύξηση των HbA₂ και HbF αιμοσφαιρινών είτε καθιζάνουν εντός των ερυθρών αιμοσφαιρίων προκαλώντας την καταστροφή τους. Το κύριο επακόλουθο των μεταλλάξεων είναι η αναποτελεσματική ερυθροποίηση. [9-13,18]

2.1.3.1. Ομόζυγη β-θαλασσαιμία

Στην ομόζυγη β-θαλασσαιμία (β-thalassemia Major) υπάρχουν μεταλλάξεις και στα δύο γονίδια της β-σφαιρίνης και ο γονότυπος που προκύπτει χαρακτηρίζεται ως β⁺/β⁺, β⁺/β⁰ ή β⁰/β⁰ ανάλογα τα γονίδια που έχει κληρονομήσει. Αυτός ο τύπος χαρακτηρίζεται από ελαττωμένη σύνθεση (β⁺/β⁺, β⁺/β⁰) ή απουσία σύνθεσης (β⁰/β⁰) της β-σφαιρίνης, οι α-αλυσίδες καθιζάνουν στο ερυθροκύτταρο, προκαλείται αιμόλυση με αποτέλεσμα την χρόνια και σοβαρή αιμολυτική αναιμία. Επίσης παρατηρείται εξωμυελική αιμοποίηση, ηπατοσπληνομεγαλία, σκελετικές παραμορφώσεις όπως ανωμαλίες μακρών οστών και κρανιοπροσωπικές

παραμορφώσεις λόγω της επέκτασης του μυελού των οστών. Λόγω της αναιμίας οι ασθενείς παρουσιάζουν ωχρότητα, δύσπνοια και κόπωση ενώ για την αντιμετώπιση της υπόκεινται συχνά σε μεταγγίσεις αίματος και θεραπείες αποσιδήρωσης. [9-13,18]

2.1.3.2. Ετερόζυγη β- θαλασσαιμία

Υπάρχουν τρεις τύποι της ετερόζυγης β- θαλασσαιμίας. Ο πρώτος είναι ο σιωπηλός φορέας (β- thalassemiasilentcarrier) με γονότυπο $\beta^{\text{Silent}}/\beta$, στον οποίο δεν εντοπίζονται παθολογικά ευρήματα και οι τιμές της αιμοσφαιρίνης είναι φυσιολογικές ή σχεδόν φυσιολογικές. Ο δεύτερος τύπος είναι η ελάχιστη β-θαλασσαιμία (β-thalassaemia Minor) με γονότυπο β^0/β ή β^+/β , στον οποίο παράγεται επαρκής ποσότητα αιμοσφαιρίνης οι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί ή έχουν αναιμία ήπιας μορφής όμως μπορεί να εκδηλώσουν συμπτώματα σε κατάσταση στρες. Τέλος, ο τρίτος τύπος είναι η ενδιάμεση β- θαλασσαιμία (β-Thalassaemia Intermedia) με γονότυπο $\beta^{\text{Silent}}/\beta^{\text{Silent}}$, $\beta^+/\beta^{\text{Silent}}$ ή $\beta^0/\beta^{\text{Silent}}$, στον οποίο τα συμπτώματα μπορεί να ποικίλουν και οι ασθενείς να είναι από ασυμπτωματικοί μέχρι να έχουν μια αναιμία πιο σοβαρή από την ελάχιστη αλλά να μην είναι απαραίτητες οι μεταγγίσεις αίματος. [9-13,18]

2.2. Έλλειψη ενζύμου G6PD

Η ανεπάρκεια της Αφυδρογονάσης της 6-Φωσφορικής Γλυκόζης (G6PD) είναι μια φυλοσύνδετη νόσος που οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου G6PD το οποίο εντοπίζεται στον μακρύ βραχίονα (q- arm) του χρωμοσώματος X (chrX, q 28) και έχουν ως αποτέλεσμα την ελαττωματική, ανεπαρκή ή την μη παραγωγή του ενζύμου, ενώ υπάρχει και μια μετάλλαξη που προκαλεί υπερέκκριση του ενζύμου, χωρίς κλινικές συνέπειες. Έχουν παρατηρηθεί πάνω από 300 παραλλαγές του γονιδίου οι οποίες οδηγούν σε διαφορετικούς φαινότυπους με ποικίλη συμπτωματολογία.

Το ένζυμο της Αφυδρογονάσης της 6-Φωσφορικής Γλυκόζης συμμετέχει στον καταβολισμό της γλυκόζης, στον φωσφογλυκονικό δρόμο, και είναι πολύ σημαντικό γιατί συμμετέχει στην πρώτη αντίδραση. Η σωστή λειτουργία του φωσφογλυκονικού δρόμου είναι υψίστης σημασίας για την επιβίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων καθώς είναι ο μοναδικός τρόπος κάλυψης των ενεργειακών αναγκών τους. Επομένως

διαταραχές που προκύπτουν κατά τη διαδικασία του καταβολισμού της γλυκόζης λόγω έλλειψης του ενζύμου προκαλούν αιμόλυση και κατά συνέπεια αιμολυτική αναιμία ή αιμολυτικά επεισόδια στους ασθενείς. [22-26]



Εικόνα 8: Η θέση του γονιδίου G6PD στο χρωμόσωμα X.

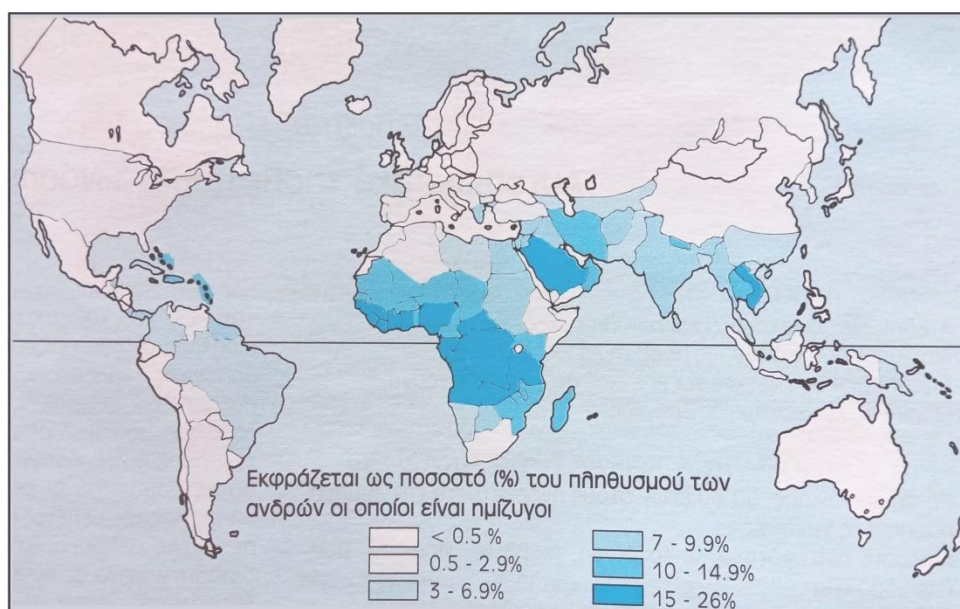
[Πηγή εικόνας: genome-euro.ucsc.edu]

2.2.1. Ιστορικά στοιχεία

Η ανεπάρκεια G6PD ανακαλύφθηκε το 1926 από τον W. Cordes (Boston, 1926) ως αποτέλεσμα μελέτης ασθενών με οξεία αιμολυτική αναιμία που προκλήθηκε από την 6-μεθοξυ-8-αμινοκινολίνη, ένα φάρμακο για την ελονοσία, αλλά χρειάστηκαν μερικές δεκαετίες για να κατανοηθεί ως νόσος. Κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου και του Πολέμου της Κορέας δημιουργήθηκε ανάγκη για νέα συνθετικά φάρμακα για την καταπολέμηση της ελονοσίας. Διεξήχθησαν πειραματικές μελέτες σε υγιείς εθελοντές χορηγώντας τους 30 mg Πριμακίνης καθημερινά και σε λίγους από αυτούς παρατηρήθηκε οξεία αιμολυτική αναιμία ενώ στους περισσότερους όχι, έτσι προέκυψε το ερώτημα αν αυτοί μεταβολίζουν διαφορετικά τα φάρμακα ή τα ερυθροκύτταρά τους είναι διαφορετικά. Το 1956 η ομάδα του PaulCarson (Chicago,1956) ανακάλυψε ότι η αιτία πρόκλησης αιμολυτικής αναιμίας στους Αφροαμερικάνους στρατιώτες που ακολουθούσαν θεραπεία με ανθελονοσιακά φάρμακα με πριμακίνη ήταν η ανεπάρκεια του ενζύμου G6PD και ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια των ατόμων που ήταν ευαίσθητα στην πριμακίνη είχαν 15% μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου G6PD σε σχέση με τους φυσιολογικούς και το 1958 η ομάδα του GennaroSansone (Genoa,1958) παρατήρησε την ίδια ανεπάρκεια σε παιδιά με ιστορικό κυανισμού. Το 1991 επιτεύχθηκε η αλληλούχιση του G6PD και αργότερα οι T. Vulliamyetal (California, 1993) S. MiwaH. Fujii (Tokyo, 1996) άρχισαν να καταγράφουν τις μεταλλάξεις που ήταν υπεύθυνες για τα αλληλόμορφα του γονιδίου. [23,25,27-31]

2.2.2. Επιδημιολογία

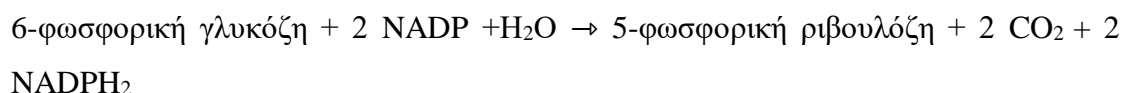
Όπως και η β-θαλασσαιμία έτσι και η έλλειψη του ενζύμου G6PD φαίνεται να παρουσιάζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ενδημικές για την ελονοσία περιοχές (5-25%) αλλά παρατηρείται και σε μη ενδημικές (0,5-2,9 %) καθώς οι ασθενείς με την έλλειψη φαίνεται να είναι ανθεκτικότεροι στην ελονοσία άρα να έχουν και μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης. Έτσι ανεπάρκεια του ενζύμου παρατηρείται συχνότερα σε περιοχές της Μεσογείου, την Νότια και Νοτιοανατολική Ασία, την Νότια Αμερική και την Αφρική. Υπολογίζεται δε, ότι οι φορείς κάποιου μεταλλαγμένου αλληλομόρφου του γονιδίου ανέρχονται σε παγκόσμιο επίπεδο στους 400.000.000 δηλαδή κοντά στο 5,3% του παγκόσμιου πληθυσμού.[25-27,29-32]



Εικόνα 9: Παγκόσμια κατανομή G6PD ανεπάρκειας.
[Πηγή εικόνας: Βιβλιογραφική αναφορά Νο. 25,26]

2.2.3. Παθοφυσιολογία ανεπάρκειας G6PD

Το ένζυμο G6PD όπως αναφέρθηκε προηγουμένως συμμετέχει στην πρώτη αντίδραση του φωσφογλυκονικού δρόμου και συγκεκριμένα στον μεταβολισμό της 6-φωσφορικής γλυκόζης με συνένζυμο το NADP με παραγωγή 5-φωσφορικής ριβουλόζης NADPH₂ που συνοπτικά περιγράφονται στην ακόλουθη αντίδραση:



Η μετατροπή του NADP σε NADPH είναι απαραίτητη για την παραγωγή της γλουταθειόνης σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση: $\text{NADPH} + \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+ + \text{OH}^-$, όπου το NADPH αντιδρά με το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης για να παραχθεί τελικά η γλουταθειόνη, η οποία είναι ένα αντιοξειδωτικό απαραίτητο για την προστασία των ερυθροκυττάρων από το οξειδωτικό στρες. Η γλουταθειόνη αντιδρά με τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μετατρέποντας το σε νερό προστατεύοντας έτσι την μεμβράνη των ερυθροκυττάρων από βλάβες λόγω του H_2O_2 που θα οδηγούσαν σε αιμόλυση.

Στην ανεπάρκεια του G6PD η παραπάνω διαδικασία δεν εκτελείται επαρκώς με αποτέλεσμα το υπεροξείδιο του υδρογόνου να μην μετατρέπεται σε νερό και να επέρχεται αιμόλυση που μπορεί να οδηγήσει σε αιμολυτικά επεισόδια ή χρόνια αιμολυτική αναιμία. Τα συμπτώματα αυτά μπορούν να εκδηλωθούν όταν ο οργανισμός έρθει σε επαφή με ουσίες, τρόφιμα και φάρμακα που πυροδοτούν την παραγωγή ROS. Παραδείγματα τέτοιων ουσιών μπορούν να αποτελούν τα κουκιά, το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, η κινίνη και άλλα ανθελονοσιακά φάρμακα, αναλγητικά φάρμακα που περιέχουν ακετυλανίδη ή φαιναζοπυριδίνη, μερικά αντιβιοτικά όπως η ισονιαζίδη και η νιτροφουραντοΐνη, η ναφθαλίνη, η υπερβολική δόση ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C) καθώς και το στρες που θα προκληθεί στον οργανισμό μετά από κάποια βακτηριακή ή ιογενή λοίμωξη.

Ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης του γονιδίου προκύπτουν διαφορετικοί φαινότυποι οι οποίοι έχουν κατηγοριοποιηθεί στους ακόλουθους τύπους:

Τύπος 1

Οξεία ανεπάρκεια του ενζύμου (<10% δραστηριότητα του ενζύμου). Είναι συσχετισμένος με την χρόνια μη-σφαιροκυτταρική αιμολυτική αναιμία.

Τύπος 2 (Μεσογειακός τύπος)

Οξεία ανεπάρκεια του ενζύμου (1-10% δραστηριότητα του ενζύμου). Συσχετίζεται με την οξεία αιμολυτική αναιμία

Τύπος 3(A-)

Μέτρια ανεπάρκεια του ενζύμου (10-60% δραστηριότητα του ενζύμου). Συσχετίζεται με αιμολυτικά επεισόδια μετά από έκθεση σε κάποια από τις προαναφερθείσες ουσίες

Τύπος 4 (A+/B)

Ήπια ανεπάρκεια έως φυσιολογική δραστικότητα ενζύμου (60-150%). Χωρίς κλινικές εκδηλώσεις.

Τύπος 5 (A+/B)

Αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου (>150%). Χωρίς κλινικές εκδηλώσεις.

[23-27,29-30,32-33]

2.2.4. Συμπτωματολογία

Τα συμπτώματα που μπορούν να εκδηλωθούν σε ασθενείς με ανεπάρκεια του ενζύμου είναι:

- Αναιμία, λόγω της καταστροφής των ερυθροκυττάρων (αιμόλυση)
- Ίκτερος, λόγω συσσώρευσης της ασύζευκτης χολερυθρίνης (πρόβλημα στον μεταβολισμό της)
- Σπληνομεγαλία, λόγω αυξημένης καταστροφής ερυθρών αιμοσφαιρίων στον σπλήνα
- Αιμοσφαιρινουρία, λόγω της αιμόλυσης μέρος της αιμοσφαιρίνης μπορεί να αποβληθεί με τα ούρα
- Νεογνικός ίκτερος και νεογνική υπερχολερυθριναϊμία.

Η ένταση των συμπτωμάτων εξαρτάται από την εκάστοτε μετάλλαξη και τον τύπο της νόσου που αναλύθηκε προηγουμένως. [23-27,29-30,32-33]

2.3. Δρεπανοκυτταρική αναιμία

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία ή αλλιώς δρεπανοκυτταρική νόσος είναι αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσος που οφείλεται και αυτή, όπως και στη β-θαλασσαιμία, σε μετάλλαξη του γονιδίου της β-σφαιρίνης (chr 11, p15.4). Η μετάλλαξη αυτή (Glu6Val) προκαλεί την αντικατάσταση του 6^{ου} αμινοξέος που φυσιολογικά είναι το Γλουταμινικό οξύ (Glu) από τη Βαλίνη (Val) και οδηγεί στη σύνθεση μιας μεταλλαγμένης αιμοσφαιρίνης (HbS) της οποίας οι αλυσίδες δημιουργούν

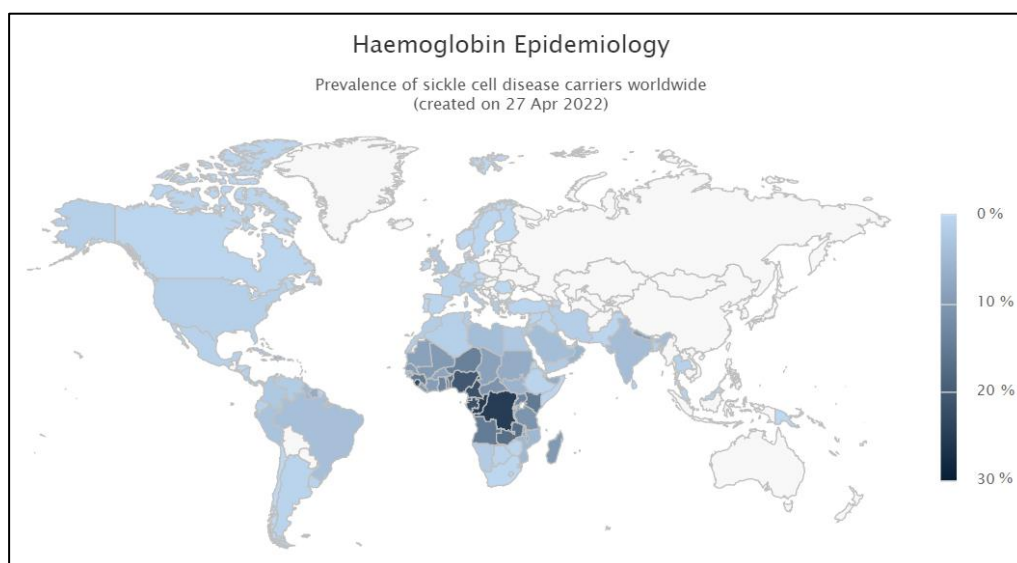
συσσωματώματα, στη μη οξυγονωμένη μορφή τους, και κατά συνέπεια προκαλείται παραμόρφωση των ερυθροκυττάρων. Το σχήμα των ερυθροκυττάρων που προκύπτουν είναι δρεπανοειδές/ σε σχήμα μισοφέγγαρου, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η μεταφορά τους στα αιμοφόρα αγγεία και να προκαλούνται έμφρακτα σε αγγεία ή/και όργανα τα οποία οδηγούν σε ανεπαρκή οξυγόνωση και θρέψη και τοπική ισχαιμία. [33-38]

2.3.1. Ιστορικά στοιχεία

Το 1910 οι JamesHerrick και ErnestIrons παρατήρησαν σε έναν 20χρονο με αναιμία “περίεργα επιμήκη ερυθροκύτταρα σε σχήμα δρεπανιού” όπως πολύ χαρακτηριστικά τα ανέφεραν(Herrick, 1910) και μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1920 είχαν μελετηθεί αρκετά άτομα με αναιμία για να μπορέσουν οι ερευνητές να καταλάβουν την κληρονομικότητα της νόσου. Το 1927 οι Hanh και Gillespie (Hanh και Gillespie, 1927) παρατήρησαν ότι το σχήμα των ερυθροκυττάρων μεταβάλλεται σε δρεπανοειδές απουσία οξυγόνου. Το 1949 ο LinusPauling με τον συνεργάτη του DrHarveyItano παρατήρησε διαφορές στην δομή της αιμοσφαιρίνης των ατόμων με δρεπανοκυτταρική νόσο και το 1957 ο DrVernonIngram ανακάλυψε ότι η αλλαγή στο σχήμα των ερυθροκυττάρων οφείλεται στην αλλαγή ενός αμινοξέος. Την δεκαετία του 1970 πλέον η τεχνολογία έχει εξελιχθεί με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η εύρεση της μετάλλαξης σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, στην τριπλέτα που κωδικοποιεί το 6^ο αμινοξύ μια Αδενίνη (A) αντικαταστάθηκε από μια Θυμίνη (T) και το αμινοξύ που εκφράζεται είναι η Βαλίνη ενώ φυσιολογικά είναι το Γλουταμινικό οξύ. Από το 1995 μέχρι και σήμερα γίνονται μελέτες για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση και θεραπεία της νόσου με πρακτικές να περιλαμβάνουν τις μεταγγίσεις αίματος, τη χορήγηση υδροξυουρίας και ερυθροποιητίνης, την μεταμόσχευση μυελού των οστών η οποία είναι ριψοκίνδυνη και δεν εφαρμόζεται τόσο συχνά, ενώ το μέλλον της θεραπείας φαίνεται να είναι η γονιδιακή θεραπεία μετά την πρώτη πετυχημένη απόπειρα θεραπείας της δρεπανοκυτταρικής νόσου σε ποντίκια (Marshall, 2001). [39-47]

2.3.2. Επιδημιολογία

Όπως και στην β-θαλασσαιμία, έτσι και στην δρεπανοκυτταρική αναιμία τα περιστατικά συναντώνται συχνότερα στην Υποσαχάρια Αφρική, την Μέση Ανατολή και περιοχές της Μεσογείου που ευνοούν τις παρασιτικές λοιμώξεις και παρατηρείται όμοια ανθεκτικότητα στην ελονοσία. Επομένως και η δρεπανοκυτταρική αναιμία καθιστά ανθεκτικότερους τους ετεροζυγώτες. Το 2015 υπολογίστηκε ότι περίπου 43 εκατομμύρια άνθρωποι είναι φορείς του γονιδίου, δηλαδή περίπου το 0,6% του παγκόσμιου πληθυσμού (Vos et al., 2016) [45,47-48]



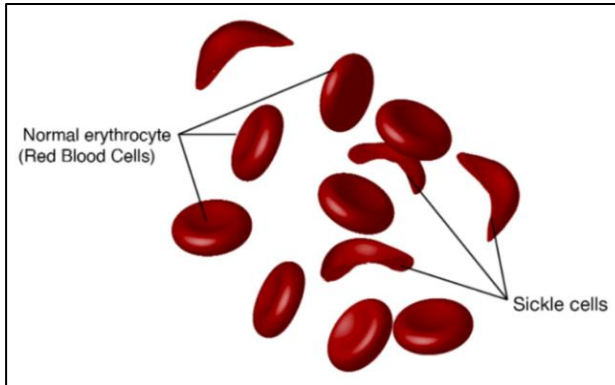
Εικόνα 10: Το στίγμα της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας σε παγκόσμιο χάρτη. [ο χάρτης δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα Ithanel, www.ithanel.eu]

2.3.3. Παθοφυσιολογία Δρεπανοκυτταρικής αναιμίας

Όπως ήδη έχει αναφερθεί στην δρεπανοκυτταρική νόσο η μεταλλαγμένη αιμοσφαιρίνη οδηγεί στην παραγωγή ερυθροκυττάρων σε σχήμα δρεπάνου. Αυτό το σχήμα ερυθροκυττάρου υστερεί κατά πολύ συγκριτικά με το αμφίκυκλο δισκοειδές σχήμα των φυσιολογικών καθώς δεν διέρχονται με την ευκολία από τα αγγεία με αποτέλεσμα τη δημιουργία αγγειακών εμφράκτων καθώς και αιμόλυσης λόγω της πίεσης που ασκείται στα δρεπανοκύτταρα. [34,36,45-46,49-51]

Κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής ενός παιδιού παρατηρείται αναιμία, μειωμένο σωματικό βάρος και σπληνομεγαλία, ενώ πολύ συχνές είναι και οι λοιμώξεις και για αυτό συχνά χορηγείται Πενικιλίνη προληπτικά (Gaston et al., 1986). Στα επόμενα

χρόνια της ζωής εμφανίζεται και το Οξύ Θωρακικό Σύνδρομο (ACS) λόγω εμφράκτων στην πνευμονική αγγείωση, Εγκεφαλικά επεισόδια λόγω εμφράκτων στα αγγεία του εγκεφάλου, καρδιακά εμφράγματα, απώλεια όρασης, πόνος στα κόκαλα και αιμολυτική αναιμία. [34,36,45-46,49-52]



Εικόνα 11: Απεικόνιση δρεπανοκυττάρων και φυσιολογικών ερυθροκυττάρων
[Πηγή:National Human Genome Research Institute. 2022. *Sickle Cell Disease*. [online]
Available at: <<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Sickle-Cell-Disease>>
[Accessed 28 April 2022].

3. Νανοσωματίδια

Ως νανοσωματίδια ορίζονται τα σωματίδια ύλης που τουλάχιστον η μία τους διάσταση έχει διάμετρο από 1-100 nm. Η λέξη είναι σύνθετη και προκύπτει από το ‘νάνος’ που σημαίνει πολύ μικρός και το ‘σωματίδιο’. Λόγω του μικρού τους μεγέθους καθίστανται ορατά μόνο με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ή με μικροσκόπιο με λέιζερ.

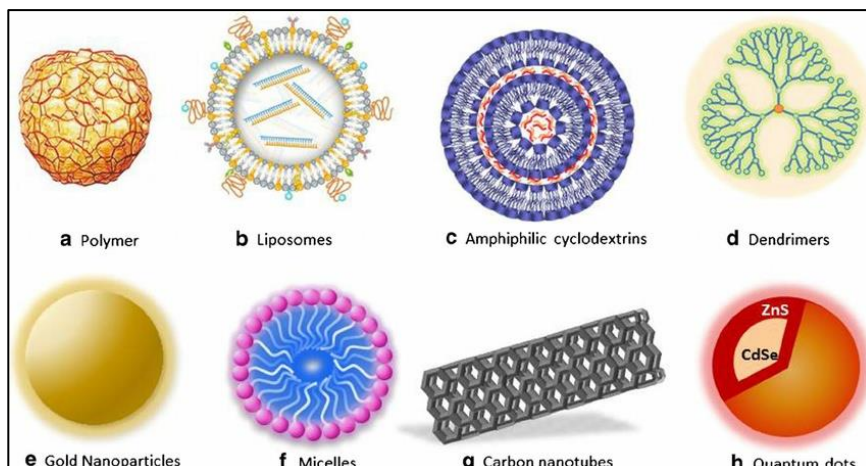
Το 1857 ο M. Faraday περιέγραψε για πρώτη φορά τις οπτικές ιδιότητες των μετάλλων σε κλίμακα νανομέτρων στην έρευνά του (X. The Bakerian Lecture. — Experimental relations of gold (and other metals) to light, 1857) αλλά τα νανοσωματίδια παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά κατά την πρώτη δεκαετία του 20^{ου} αιώνα όταν ο Richard Adolf Zsigmondy χρησιμοποίησε ένα υπερμικροσκόπιο το οποίο ήταν ικανό να κάνει ορατά τόσο μικρά σωματίδια και ήταν και ο πρώτος που χρησιμοποίησε τον όρο ‘νανόμετρο’. Στην ιατρική εντάχθηκε η χρήση των νανοσωματιδίων από τους Metchnikov and Ehrlich (που κέρδισαν Νόμπελ Ιατρικής το 1908), ενώ από το 1970-2000 η χρήση τους στην ιατρική εξελίχθηκε και περιελάμβανε σύμπλοκα DNA- φαρμάκων, σύμπλοκα πολυμερών- φαρμάκων, σύμπλοκα πολυμερών- πρωτεϊνών και νανοκάψουλες πολυμερών. [53-56]

3.1. Είδη νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα την προέλευση τους (φυσικά/ τεχνητά), τη σύσταση, το μέγεθος και την μορφολογία τους ή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους. Έτσι μπορούμε να τα χωρίσουμε σε οργανικά στα οποία ανήκουν τα μικκύλια, τα δενδριμερή, τα λιποσώματα, τα υβριδικά και τα συμπαγή νανοσωματίδια και ανόργανα στα οποία ανήκουν τα φουλερένια, οι κβαντικές τελείες και τα νανοσωματίδια πυριτίου και μετάλλων. Ενώ με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες τα κατατάσσουμε σε:

- Νανοσωματίδια με βάση τον άνθρακα
- Κεραμικά νανοσωματίδια
- Νανοσωματίδια μετάλλων
- Νανοσωματίδια ημιαγωγών
- Πολυμερή νανοσωματίδια και

- Νανοσωματίδια με βάση τα λιπίδια [55-57]



Υπόμνημα εικόνας 12:

a: Πολυμερή
 b: Λιπώματα
 c: Νανοσωματίδιο
 αμφίφιλης
 κυκλοδεξτρίνη
 d: Δενδριμερή
 e: Νανοσωματίδια
 χρυσού
 f: Μικκύλια
 g: Νανοσωλήνες
 άνθρακα
 h: Κβαντικές τελείες

Εικόνα 12: Είδη νανοσωματιδίων που χρησιμοποιούνται συνήθως στην ιατρική και τις βιοϊατρικές επιστήμες

[Πηγή: Mc Carthy, D., Malhotra, M., O'Mahony, A., Cryan, J. and O'Driscoll, C., 2014. *Nanoparticles and the Blood-Brain Barrier: Advancing from In-Vitro Models Towards Therapeutic Significance.*]

3.1.1. Νανοσωματίδια πυριτίου

Τα Μεσοπορώδη νανοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου (MSNs) συντέθηκαν πρώτη φορά το 1992 (Kresge et al., 1992) και προορίζονταν ως φορείς φαρμάκων (Vallet-Regi et al., 2001) και χρήση σε πεδία της νανοϊατρικής και της βιοτεχνολογίας.

Είναι συχνά χρησιμοποιούμενα διότι διαθέτουν χαρακτηριστικά που τα κάνουν πολύτιμα για την χρήση τους σε έμβια όντα. Στην πλειονότητά τους είναι βιοσυμβατά, δηλαδή δεν είναι επιβλαβή για ζωντανούς ιστούς, μη τοξικά, οικονομικά, η επιφάνειά τους μπορεί να τροποποιηθεί εύκολα ανάλογα τις ανάγκες και τέλος χαρακτηρίζονται από θερμική σταθερότητα, δηλαδή έχουν την ικανότητα να αντιστέκονται την επίδραση της θερμοκρασίας και να διατηρούν τις ιδιότητες τους. [58-62]

3.1.2. Νανοσωματίδια πυριτίου με ιόντα δημητρίου (Ce)

In vitro και in vivo δοκιμές (Hoppe, Guldaland Boccaccin, 2011) έδειξαν ότι όταν τα νανοσωματίδια του πυριτίου συνδυαστούν με κάποια ιόντα, συνήθως ιχνοστοιχεία που βρίσκονται στον ανθρώπινο οργανισμό όπως Ca, Mg και Cu, μπορούν να επιδράσουν ευεργετικά στην λειτουργία τους και να επηρεάσουν θετικά τον οργανισμό. Αντίστοιχα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα ιόντα του δημητρίου τα

οποία έδειξαν σε έρευνες των Liu et al.(2020) και Rzigalinski, Giovinco και Cheatham (2020) ότι έχουν προστατευτική δράση στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων και γενικά των ερυθρών αιμοσφαιρίων παρατείνοντας τον χρόνο ζωής τους και αποτρέποντας την αιμόλυση και το οξειδωτικό στρες για ένα εύλογο χρονικό διάστημα.[63-67]

3.2. Τα νανοσωματίδια πυριτίου στην ιατρική και τις βιοϊατρικές επιστήμες

Τα νανοσωματίδια πυριτίου λόγω του μικρού μεγέθους, του χαμηλού κόστους, της συμβατότητας τους με τους ιστούς και της θερμικής σταθερότητας τους, όπως και άλλα νανοσωματίδια, χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική και στις βιοϊατρικές επιστήμες. Η πρώτη εφαρμογή τους σαν φορείς φαρμάκων έγινε στα μέσα τις δεκαετίας του 1960 (Bangham, Standish and Weissmann, 1965) όταν χρησιμοποιήθηκαν λιποσώματα για μεταφορά στεροειδών φαρμάκων. Έπειτα η εφαρμογή τους στη μεταφορά φαρμάκων εξελίχθηκε, αλλά εξελίχθηκαν κι άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούν τα νανοσωματίδια. Παραδείγματα τέτοιων εφαρμογών είναι η χρήση τους στην μαγνητική τομογραφία/ MRI (Weissleder et al., 1990) ως σκιαγραφικό, ο έλεγχος της δομής του DNA (Mahtab, Rogers and Murphy, 1995) με τη χρήση κβαντικών τελειών, η καταστροφή όγκων με υπερθερμία (Yanase et al., 1997), η σήμανση μορίων με φθορίζουσες χρωστικές που περιείχαν νανοκρυστάλλους (Bruchez et al., 1998), η ανίχνευση παθογόνων παραγόντων (Edelstein et al., 2000) και η ανίχνευση πρωτεϊνών (Nam, Thaxton and Mirkin, 2003).[68-76]

3.3. Σύνθεση νανοσωματιδίων

Η σύνθεση των νανοσωματιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί με χημικές και βιολογικές μεθόδους. Στις χημικές μεθόδους η σύνθεση γίνεται σε υγρό μέσο στο οποίο έχουν προστεθεί χημικές ουσίες όπως η μεθοξυπολυαιθυλενογλυκόλη, η υδραζίνη και το βοριοϋδρίδιο του νατρίου, (Thakkaretal., 2010) αλλά αυτού του είδους οι μέθοδοι μπορεί να επιβαρύνουν με τοξικά χημικά την επιφάνεια των νανοσωματιδίων και να επηρεαστεί η συμβατότητα τους. Οι βιολογικές μέθοδοι

αντίθετα είναι πιο φιλικές καθώς γίνεται χρήση μικροοργανισμών, ενζύμων και φυτών (Saba, 2015). [77-79]

3.3.1. Σύνθεση νανοσωματιδίων με την μέθοδο κολλοειδούς γέλης (sol-gel)

Παρότι υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την σύνθεση των νανοσωματιδίων πυριτίου η πιο διαδεδομένη και συχνά χρησιμοποιούμενη είναι η μέθοδος κολλοειδούς γέλης (sol-gel).. Τα στάδια που περιλαμβάνει αυτή η μέθοδος είναι: η υδρόλυση και συμπύκνωση οργανομεταλλικών πρόδρομων ουσιών, με τη χρήση οξέων ή βάσεων για τον αρχικό σχηματισμό μορίων SiO_2 , η χρήση κατιονικών επιφανιοδραστικών ουσιών όπως το βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο (CTAB) για την απόκτηση μεσοπορώδους δομής και τέλος η ξήρανση του υλικού- gel που έχει προκύψει για την παραλαβή των νανοσωματιδίων (Yang, Chen, & Shi, 2019). Ανάλογα με τον τρόπο ξήρανσης που θα επιλεγεί θα προκύψουν διαφορετικοί τύποι υλικού (Aerogel, Xerogel, Cryogel). Τροποποιώντας τις παραμέτρους της διαδικασίας (π.χ. pH, θερμοκρασίες και πρώτες ύλες) μπορούν να προκύψουν διαφορετικές μορφολογίες, δομές και διαστάσεις. (Wu, Mou, & Lin, 2013)[80-85]

4. Αιμοσυμβατότητα

Η λέξη αιμοσυμβατότητα είναι σύνθετη λέξη που προέρχεται από τις λέξεις ‘αίμα’ και ‘συμβατότητα’ και αναφέρεται στο κατά πόσο κάποια υλικά είναι συμβατά, δηλαδή δεν προκαλούν αλλοιώσεις, δεν είναι τοξικά ή επιβλαβή, για τα συστατικά του αίματος και κατ’ επέκταση για τον ίδιο τον οργανισμό. [86]

4.1. Η σημαντικότητα της αιμοσυμβατότητας

Όταν τα συστατικά του αίματος έρθουν σε επαφή με διάφορα υλικά (π.χ. ενδοφλέβιοι καθετήρες, αγγειακά μοσχεύματα, νανοσωματίδια) αλληλεπιδρούν με αυτά και μπορεί να υπάρξουν αντιδράσεις, όπως αιμόλυση, θρόμβωση, ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, των λευκών αιμοσφαιρίων ή του συμπληρώματος, που θα επηρεάσουν τον οργανισμό, άμεσα ή σε βάθος χρόνου. Για να αποφευχθούν τέτοιες αντιδράσεις είναι πολύ σημαντικό να γίνεται ο έλεγχος της αιμοσυμβατότητας με τα υλικά *in vitro*, πριν έρθουν σε επαφή με τον υπόλοιπο οργανισμό. [87-88,90-95]

Ο έλεγχος της αιμοσυμβατότητας είναι τυποποιημένος και πιστοποιείται από τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης (International Organization for Standardization) με το πρότυπο *ISO 10993-4: 2017* ο οποίος καθορίζει τις γενικές απαιτήσεις για την αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων των ιατροτεχνολογικών προϊόντων με το αίμα.[89]

4.2. Μέθοδοι ελέγχου αιμοσυμβατότητας

Οι μέθοδοι ελέγχου της αιμοσυμβατότητας χωρίζονται σε *in vitro*, που περιλαμβάνουν δοκιμασίες πήξης (προσδιορισμός χρόνου προθρομβίνης και προσδιορισμός μερικής θρομβοπλαστίνης), έλεγχο αιμόλυσης, έλεγχο ενεργοποίησης συμπληρώματος, έλεγχο ενεργοποίησης λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων και *in vivo* με την πιο συχνή μέθοδο να είναι ο έλεγχος θρομβογένεσης, αλλά χρησιμοποιούνται με μικροσκοπική και μακροσκοπική παρατήρηση για να ελεγχθούν μορφολογικές αλλοιώσεις. [87-88,90-95]

4.2.1. Μέθοδος αιμοσυμβατότητας με την μέτρηση της αιμόλυσης

Ως αιμόλυση ορίζεται η καταστροφή των ερυθροκυττάρων και η απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης στο περιβάλλον. (Ετυμολογικά προέρχεται από τις λέξεις ‘αίμα’ και ‘λύσις’ δηλαδή λύση, απελευθέρωση). Η αιμόλυση συντελείται εντός του οργανισμού λόγω ανωμαλιών ή παθήσεων (π.χ. αιμολυτική αναιμία) αλλά και *in vitro* ως μέθοδος ελέγχου την αιμοσυμβατότητας.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα υλικά που έρχονται σε άμεση επαφή με τον οργανισμό, στην προκειμένη με το αίμα, δε θα πρέπει να είναι επιβλαβή για αυτόν ή να τον επηρεάζουν. Επομένως δε θα πρέπει να καταστρέφουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, να προκαλούν δηλαδή αιμόλυση. Για να εγκριθεί η συμβατότητα ενός υλικού περνάει από δοκιμές μεταξύ των οποίων μπορεί να είναι και ο έλεγχος της αιμόλυσης. Σε αυτή τη μέθοδο μετράται η απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης (στα 540 nm) μετά από την επώαση του υλικού με τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε συγκεκριμένες συνθήκες και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Οι πιο συχνές πειραματικές συνθήκες είναι η επώαση στους 37°C (φυσιολογική θερμοκρασία του ανθρώπου) και στους 40°C (θερμοκρασία πυρετού) ενώ οι χρόνοι επώασης κυμαίνονται μεταξύ 60 λεπτών έως 48 ή 96 ωρών, καθώς μετά από αυτό το χρονικό διάστημα τα ερυθροκύτταρα εισέρχονται στη φάση της ερύπτωσης, δηλαδή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου λόγω γήρατος, οξείδωσης, ενεργειακού ελλείμματος κ.α.. Στις παραπάνω συνθήκες μπορεί να προστεθεί και η μηχανική καταπόνηση, δηλαδή η επώαση να γίνει σε μηχάνημα που διατηρεί την επιθυμητή θερμοκρασία με ταυτόχρονη ανακίνηση των δειγμάτων (π.χ. thermoblock). [96-100]

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Σε κάθε πειραματική διαδικασία στην οποία έρχονται σε επαφή υλικά με τμήματα ενός οργανισμού, όπως για παράδειγμα κύτταρα ή ερυθρά αιμοσφαίρια, ένα από τα κύρια ζητήματα προς διερεύνηση είναι αν τα υλικά αυτά είναι συμβατά με τον οργανισμό. Σε μερικές περιπτώσεις όπως σε αιματολογικές διαταραχές που αναφέρθηκαν προηγουμένως η διερεύνηση της συμβατότητας των υλικών είναι ακόμα πιο κρίσιμη για την πορεία του πειράματος και για την άδεια χρήσης τελικά των υλικών σε ζωντανούς οργανισμούς καθώς ένας ήδη καταπονημένος οργανισμός, όπως για παράδειγμα ένας οργανισμός που παρουσιάζει αιμολυτική αναιμία, είναι πιο επιρρεπής σε αντιδράσεις με τα υλικά που θα επιδεινώσουν κατά πολύ την κατάσταση του ή ακόμα και θα οδηγήσουν σε καταστάσεις ασύμβατες με τη ζωή. Σκοπός λοιπόν αυτής της ερευνητικής εργασίας ήταν να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις των νανοφορέων δημητρίου με ερυθρά αιμοσφαίρια προερχόμενα από διαφορετικές αιματολογικές διαταραχές καθώς και φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια. Τα αποτελέσματα της έρευνας έχουν ως στόχο την καλύτερη κατανόηση της δράσης του δημητρίου στα ερυθρά, την συμβολή με ερευνητικά δεδομένα παρόμοιες μελέτες καθώς και την αναβάθμιση της καθημερινότητας των ατόμων που πάσχουν από αιματολογικές διαταραχές, όπου αυτό είναι δυνατό.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Δείγματα αίματος

Συλλέχθηκε φλεβικό αίμα σε σωληνάρια αιμοληψίας με EDTA από εθελοντές (και των δύο φύλων) χωρίς κάποια αιματολογική διαταραχή (3 άτομα), εθελοντές με ετερόζυγη ελάσσονα β-θαλασσαιμία (2 άτομα), με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία (2 άτομα), δρεπανοκυτταρική αναιμία (3 άτομα) και από εθελοντές με έλλειψη του ενζύμου G6PD (2 άτομα).

Τα συνολικά 12 δείγματα, τα προμηθευτήκαμε από το Αιμοδοτικό Κέντρο Νάουσας και την μονάδα πρόληψης μεσογειακής αναιμίας του Ιπποκράτειου Γ.Ν. Θεσσαλονίκης με την συγκατάθεση των εθελοντών.

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια διαχωρίστηκαν από το πλάσμα και τα υπόλοιπα στοιχεία με φυγοκέντρηση στις 2.000 στροφές/λεπτό για 7 λεπτά και ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις με προσθήκη 20 mlPBS (Phosphatebuffersaline 1x), και φυγοκέντρηση στις 2.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά σε κάθε κύκλο, για να απομακρυνθούν τυχόν ουσίες που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα του πειράματός μας (αντιγόνα, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, χημικές ουσίες).

2.2. Υλικό νανοσωματιδίων

Το υλικό των νανοσωματιδίων συντέθηκε με την μέθοδο sol-gel και αποτελείται από μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτίου με προσμίξεις ιόντων δημητρίου (Ce-NPs05g). Παραχωρήθηκε από το τμήμα Προσθετικής της Οδοντιατρικής σχολής του ΑΠΘ.

2.3. Μεθοδολογία αιμοσυμβατότητας

Για τον έλεγχο της αιμοσυμβατότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων με τα Ce-NPs (αρχικό διάλυμα: 5mg/mL), παρασκευάστηκε εναιώρημα με τα πλυμένα ερυθρά και PBS 1x με τελική συγκέντρωση ερυθρών 5%. Μέρος του εναιωρήματος επώαστηκε με διαφορετικές συγκεντρώσεις Ce-NPs (1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL) (Πίνακας 1) για 24 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C σε επωαστικό κλίβανο. Παρασκευάστηκαν ο θετικός μάρτυρας (1mL εναιωρήματος ερυθρών αιμοσφαιρίων 5% που φυγοκεντρήθηκε, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε νερό για την λύση των κυττάρων) και ο

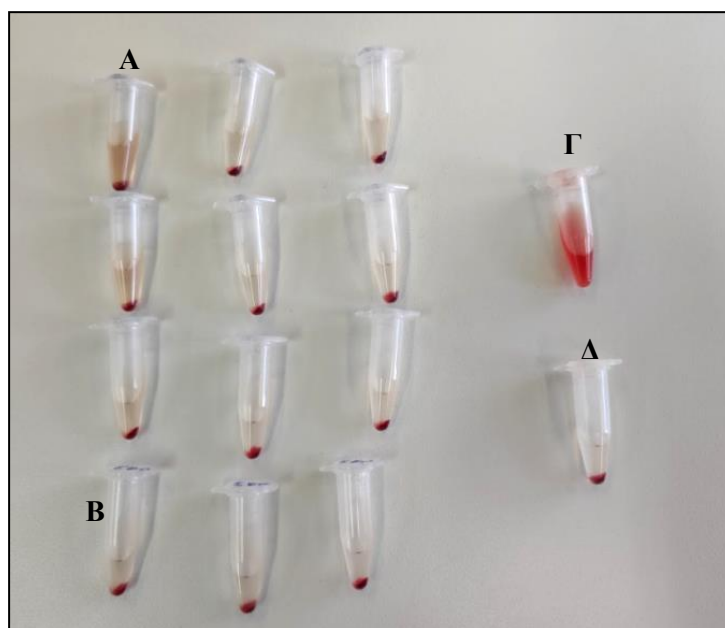
αρνητικός μάρτυρας (1mL εναιωρήματος ερυθρών αιμοσφαιρίων 5%). Όλα τα δείγματα μετά την επώαση φυγοκεντρίθηκαν στις 1.600 στροφές/ λεπτό για 5 λεπτά και το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 βοθρίων και μετρήθηκε φωτομετρικά σε φωτόμετρο στα 540 nm.

Το ποσοστό της αιμόλυσης υπολογίστηκε με τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Αιμόλυση \%} = \frac{\text{Απορρόφηση δείγματος} - \text{απορρόφηση αρνητικού μάρτυρα}}{\text{Απορρόφηση θετικού} - \text{απορρόφηση αρνητικού μάρτυρα}} \times 100 \%$$

Συγκέντρωση τελικού διαλύματος	Ποσότητα εναιωρήματος ερυθροκυττάρων 5%	Ποσότητα από το αρχικό δ/μα 5mg/ml νανοσωματιδίων
1 mg/ml	800μl	200 μl
0.5 mg/ml	900 μl	100 μl
0.25 mg/ml	950 μl	50 μl
0.125 mg/ml	975μl	25 μl

Πίνακας 1: Παρουσιάζονται οι ακριβείς ποσότητες των δύο επί μέρους διαλυμάτων για την παρασκευή του κοινού διαλύματος ερυθρών αιμοσφαιρίων – Ce-NPs.



Υπόμνημα εικόνας 13:

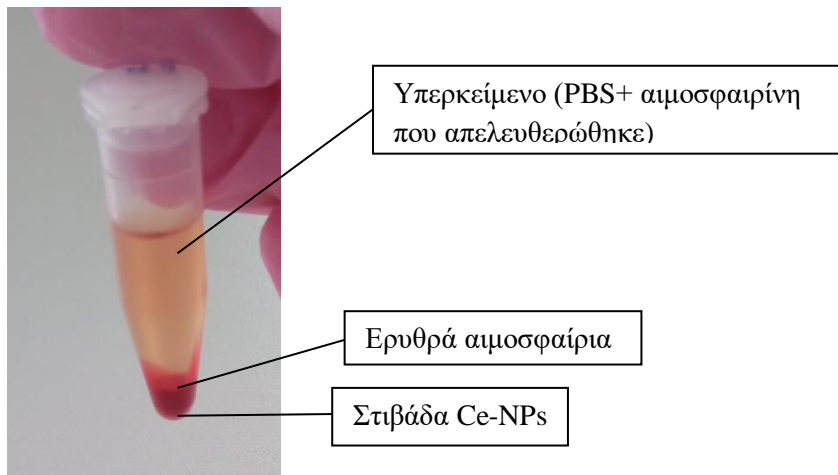
A: Δείγμα που παρουσιάζει αιμόλυση

B: Δείγμα που δεν παρουσιάζει αιμόλυση

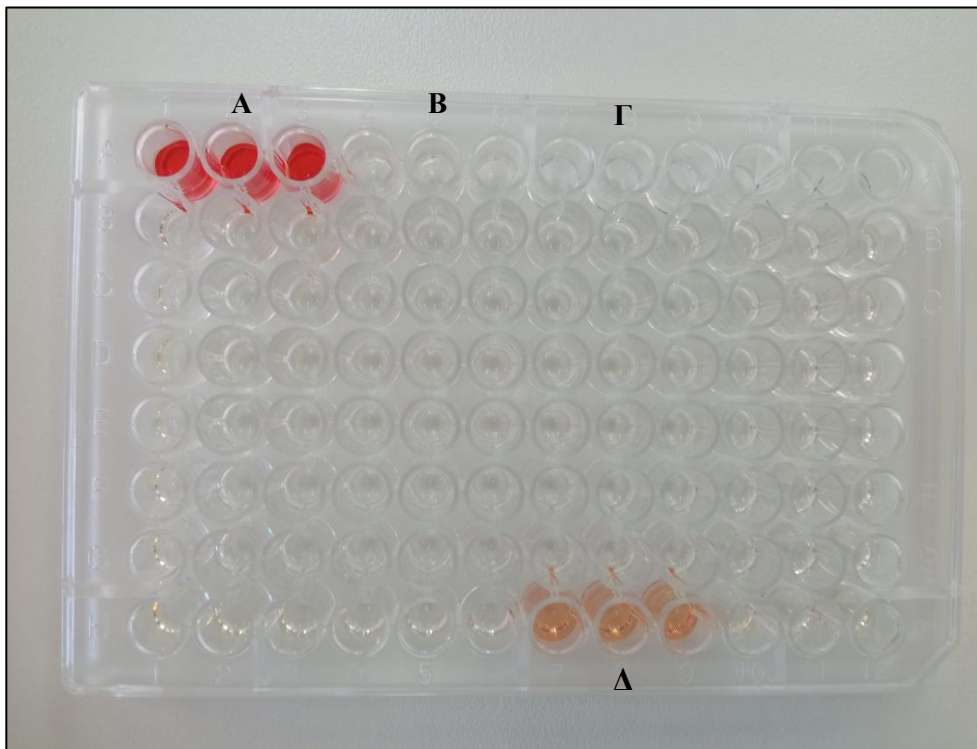
Γ: Θετικός μάρτυρας

Δ: Αρνητικός μάρτυρας

Εικόνα 13: Διάλυμα ερυθρών αιμοσφαιρίων – Ce-NPs σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Εικόνα 14: Δείγμα που παρουσιάζει αιμόλυση μετά από επώαση 24 ωρών με Ce-NPs.



Εικόνα 15: Πλάκα μικροτιτλοδότησης με υπερκείμενο των δειγμάτων πριν την φωτομέτρηση

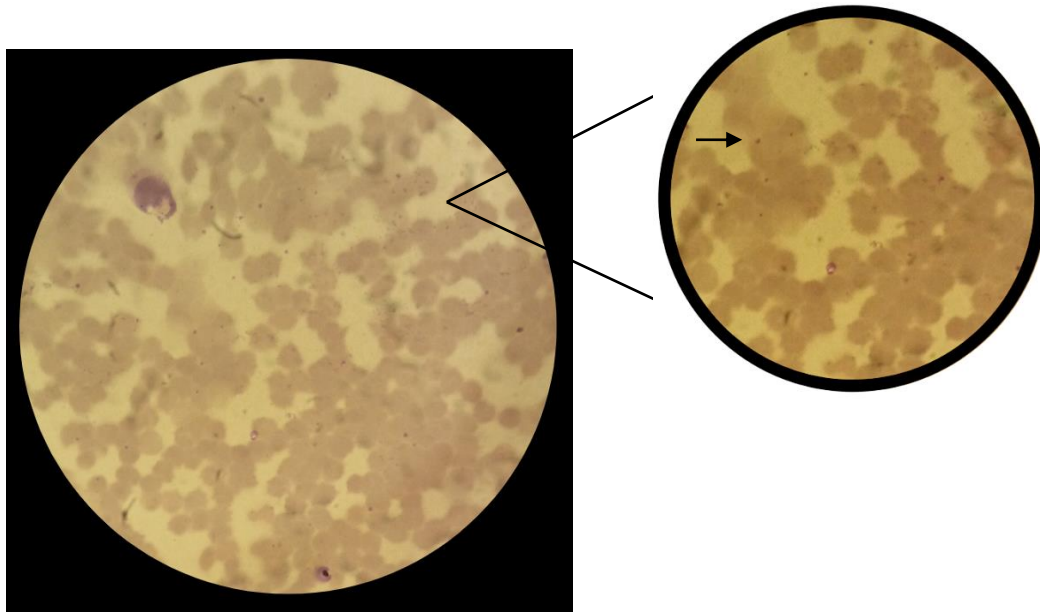
Υπόμνημα εικόνας 15:

A: Θετικός μάρτυρας

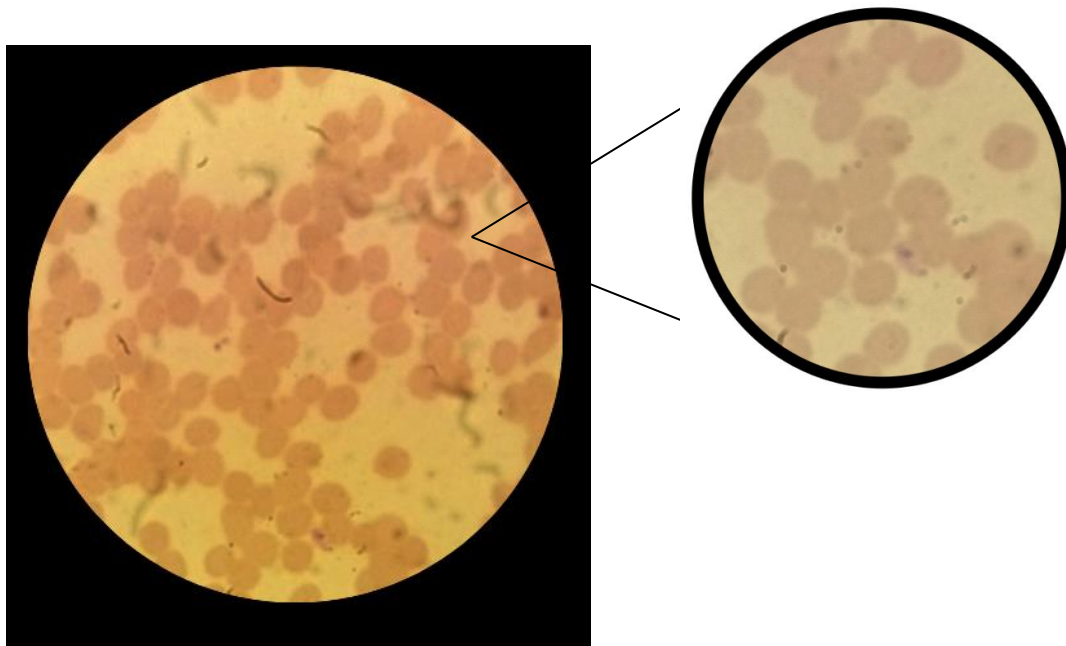
B: Αρνητικός μάρτυρας

Γ: Δείγμα που δεν παρουσιάζει αιμόλυση

Δ: Δείγμα που παρουσιάζει αιμόλυση



Εικόνα 16: Επίχρισμα φυσιολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων με Ce-NPs.
(Τα Ce-NPs σημαίνονται με βελάκι)



Εικόνα 17: Επίχρισμα φυσιολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων με Ca-NPs.
(Τα Ca-NPs σημαίνονται με βελάκι)

3. Αποτελέσματα

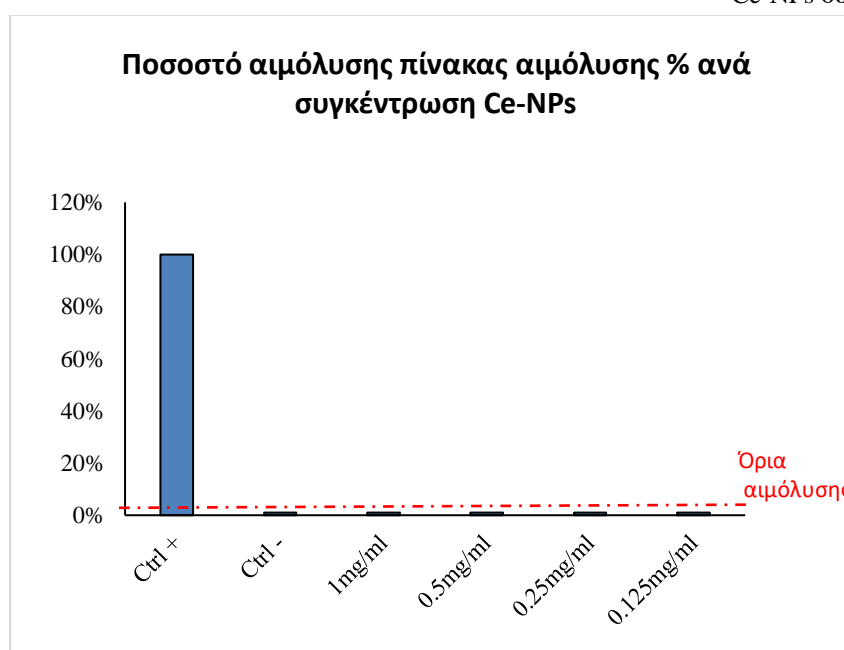
Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων και την δημιουργία των διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Microsoft Office Excel. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, δηλαδή κατά πόσο η αιμόλυση που παρουσιάστηκε είναι σημαντική χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο ASTM F 756-08 (ASTMF-756, 2009), σύμφωνα με το οποίο αιμόλυση < 2% δεν λαμβάνεται υπόψη και το υλικό χαρακτηρίζεται μη αιμολυτικό, υλικό που προκαλεί αιμόλυση μεταξύ 2%-5% χαρακτηρίζεται μετρίως αιμολυτικό και για αιμόλυση >5% χαρακτηρίζεται αιμολυτικό. [61,101-102]

Εκτελέστηκε μια σειρά διαφόρων πειραμάτων από τα οποία αντλήθηκαν χρήσιμες πληροφορίες και εξετάστηκε η επαναληψιμότητα για να αποφευχθούν παραπλανητικά αποτελέσματα λόγω τεχνικών λαθών. Ακολουθεί παράθεση των αποτελεσμάτων.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση των Ce-NPs σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1, 0.5,0.25,0.125 mg/mL) σε φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια. Στον πίνακα 2 αναγράφεται συνολικά το ποσοστό της αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση Ce-NPs σε σύγκριση με τον θετικό και τον αρνητικό μάρτυρα και ακολουθεί το γράφημα 1 με την σχηματική αναπαράσταση.

Συγκέντρωση	Αιμόλυση %
Ctrl +	100%
Ctrl -	1%
1mg/ml	1%
0.5mg/ml	1%
0.25mg/ml	1%
0.125mg/ml	1%

Πίνακας 2: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση Ce-NPs σε φυσιολογικά RBCs

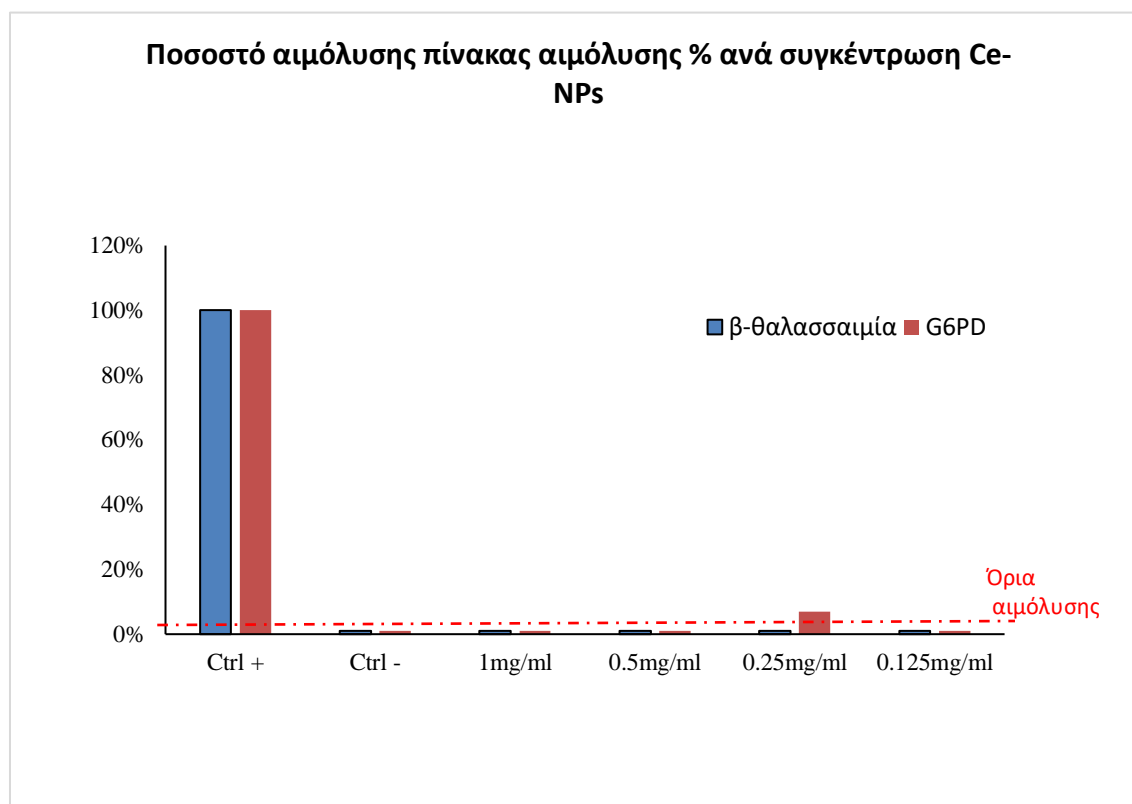


Γράφημα 1: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση Ce-NPs σε φυσιολογικά RBCs

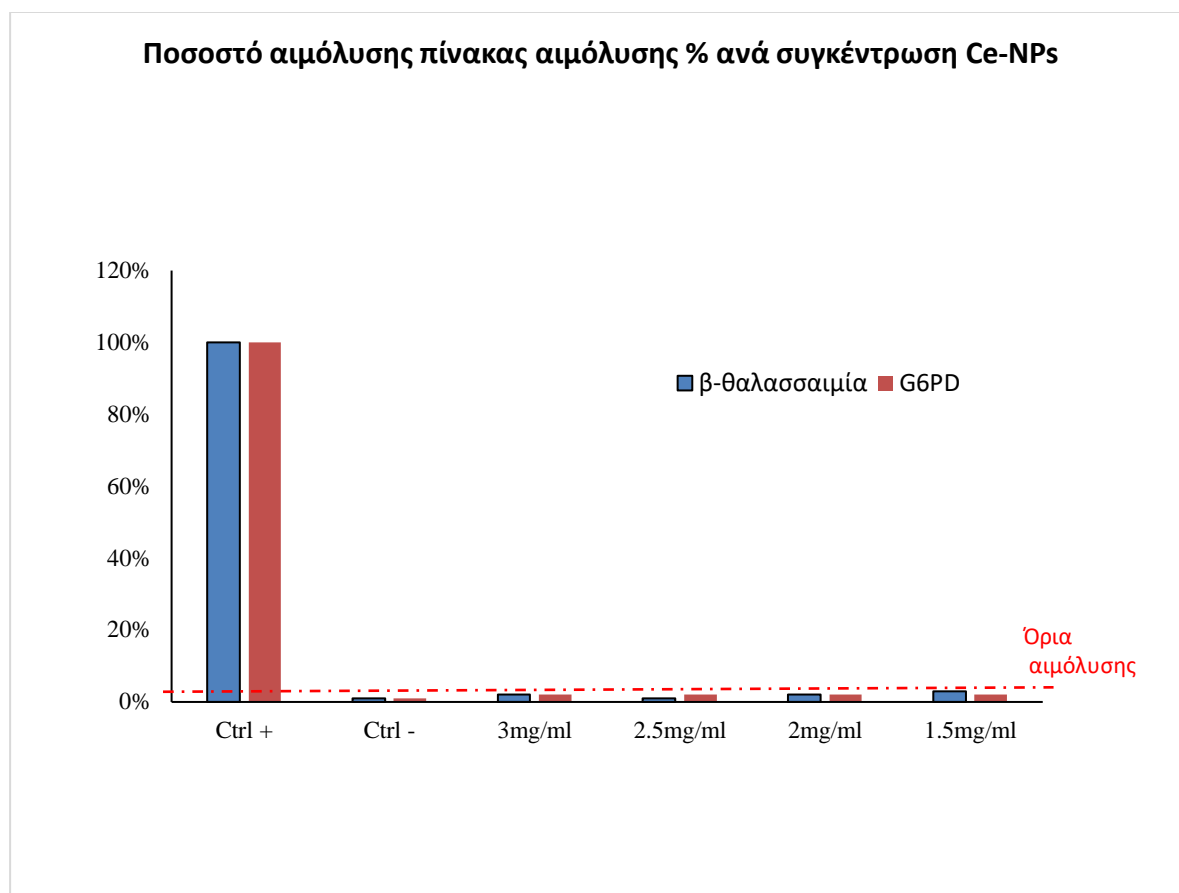
Ακολούθησαν δύο κύκλοι πειραμάτων με Ce-NPs σε συγκεντρώσεις 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL και 3, 2.5, 2, 1.5 mg/mL και ερυθρά αιμοσφαίρια από άτομα με ελάσσονα β-θαλασσαιμία και άτομα με ανεπάρκεια G6PD, για να εξετάσουμε αν παρουσιάζεται αιμόλυση και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στους πίνακες 3 και 4 και στα γραφήματα 2 και 3.

Δείγμα	Ctrl +	Ctrl -	1mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml	0.125mg/ml
Ελ. β-θαλασσαιμία	100%	1%	1%	1%	1%	1%
G6PD	100%	1%	1%	1%	7%	1%

Πίνακας 3: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση Ce-NPs σε RBCs ελάσσονος β-θαλασσαιμίας και ανεπάρκειας G6PD



Γράφημα 2: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση Ce-NPs σε RBCs ελάσσονος β-θαλασσαιμίας και ανεπάρκειας G6PD



Γράφημα3: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση Ce-NPs σε RBCs ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας και ανεπάρκειας G6PD

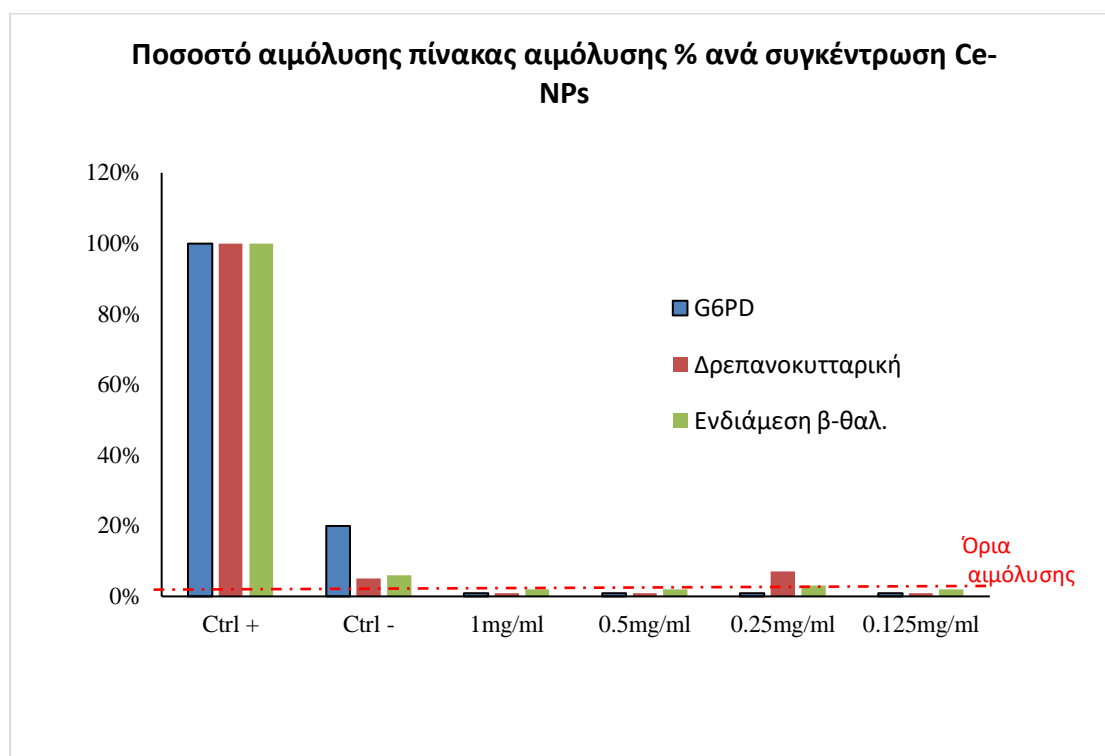
Δείγμα	Ctrl +	Ctrl -	3mg/ml	2.5mg/ml	2mg/ml	1.5mg/ml
Ελ. β-θαλασσαιμία	100%	1%	2%	1%	2%	3%
G6PD	100%	1%	2%	2%	2%	2%

Πίνακας 4: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση Ce-NPs σε RBCs ελάσσονος β-θαλασσαιμίας και ανεπάρκειας G6PD

Στη συνέχεια διεξήχθησαν πειράματα για τον έλεγχο της συμβατότητας των Ce-NPs σε συγκεντρώσεις 1, 0.5,0.25,0.125 mg/mL με δρεπανοκύτταρα, ερυθρά αιμοσφαίρια ενδιάμεσης β- θαλασσαιμίας και με ένα δείγμα από άτομο με ανεπάρκεια G6PD το οποίο είχε συντηρηθεί στους 4°C για 5 μέρες. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 5 και στο γράφημα 4.

Δείγμα	Ctrl +	Ctrl -	1mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml	0.125mg/ml
G6PD	100%	20%	1%	1%	1%	1%
Δρεπανοκυτταρική	100%	5%	1%	1%	7%	1%
Ενδιάμεση β-θαλ.	100%	6%	2%	2%	3%	2%

Πίνακας 5: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση Ce-NPs σε RBCs ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας, ανεπάρκειας G6PD και δρεπανοκύτταρα.



Γράφημα 4: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση Ce-NPs σε RBCs ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας, ανεπάρκειας G6PD και δρεπανοκύτταρα.

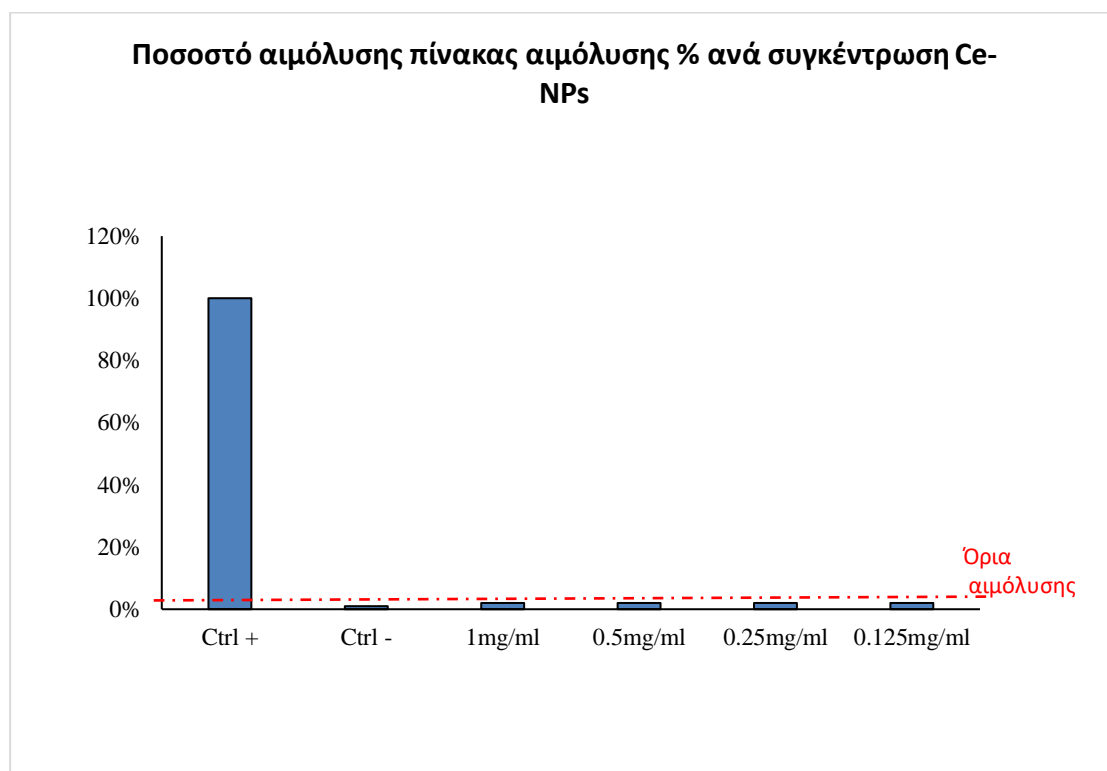
Σημαντική σημείωση: ειδικά σε αυτό το πείραμα παρατηρήθηκε έντονα η συντήρηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων ατόμων με ανεπάρκεια G6PD καθώς ο αρνητικός μάρτυρας, χωρίς Ce-NPs, παρουσίασε αιμόλυση της τάξης του 20% ενώ σε όλες τις

άλλες συγκεντρώσεις Ce-NPs το ποσοστό αιμόλυσης ήταν 1% που όπως αναφέρθηκε προηγουμένως δεν χαρακτηρίζεται ως αιμόλυση.

Τέλος έγιναν μερικά ακόμα πειράματα μόνο με αίμα από ασθενείς με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία και Ce-NPs σε συγκεντρώσεις 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL τα αποτελέσματα των οποίων αναγράφονται στον πίνακα 6 και γράφημα 5.

Δείγμα	Αιμόλυση %
Ctrl +	100%
Ctrl -	1%
1mg/ml	2%
0.5mg/ml	2%
0.25mg/ml	2%
0.125mg/ml	2%

Πίνακας 6: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση Ce-NPs σε RBCs ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας



Γράφημα 5: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση Ce-NPs σε RBCs ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας

4. Συζήτηση

Παρόμοιες μελέτες έγιναν και από άλλες ερευνητικές ομάδες ανά τον κόσμο, παρουσιάζοντας ενδιαφέροντα αποτελέσματα.

Για παράδειγμα σε μια έρευνα το 2021 μελετήθηκε κατά πόσο είναι αιμοσυμβατά μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτίου (Si-NP), μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτίου με ιόντα ασβεστίου (SiCa-NP) και μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτίου με ιόντα ασβεστίου και δημητρίου (SiCaCe-NP) σε συγκεντρώσεις 12.5, 30, 60, 125, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$ μετά από επώαση στους 37°C για 3, 15, 45, 60 λεπτά και 24 ώρες.

Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν ότι τα Si-NP παρουσίασαν αιμολυτική δράση σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή ίσες των 60 $\mu\text{g/mL}$, τα SiCa-NP παρουσίασαν αιμολυτική δράση σε συγκεντρώσεις 250 $\mu\text{g/mL}$, ενώ τα SiCaCe-NP δεν παρουσίασαν αιμολυτική δράση σε καμία από τις συγκεντρώσεις.

Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα νανοσωματίδια με ιόντα δημητρίου είναι πιο φιλικά προς τα κύτταρα και παρουσιάζουν μεγάλη συμβατότητα με το αίμα ακόμα και σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις (250 $\mu\text{g/mL}$) καθώς και πιθανή αντιοξειδωτική δράση. [103]

Αντίστοιχα στην έρευνα τους οι Del Turco et al., το 2019 εξέτασαν μεταξύ άλλων την αιμολυτική δράση νανοσωματιδίων οξειδίου του δημητρίου (nanocerium [NC]) σε συγκεντρώσεις 10–25–50 $\mu\text{g/mL}$ μετά από επώαση 1 και 4 ωρών στους 37°C.

Στα αποτελέσματά τους αναφέρουν ότι δεν παρουσιάστηκε αιμολυτική δράση σε αυτές τις συγκεντρώσεις και λαμβάνοντας υπόψη και τα αποτελέσματα των υπόλοιπων πρακτικών που χρησιμοποίησαν (δοκιμασία πήξης, συσσώρευση αιμοπεταλίων) τα χαρακτήρισαν συμβατά. Παρατήρησαν δε, ότι παρουσιάζεται πιθανή αντιοξειδωτική δράση.

Τα αποτελέσματα των ανωτέρω ερευνών παρουσιάζουν ομοιότητα, καθώς και οι δύο ερευνητικές ομάδες χαρακτηρίζουν τα νανοσωματίδια με ιόντα δημητρίου συμβατά και πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό εργαλείο για συνθήκες σχετιζόμενες με το οξειδωτικό στρες. [104]

Μια άλλη ερευνητική ομάδα το 2020 στην προσπάθεια να βρει έναν τρόπο να συντηρούνται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και σε καλύτερη κατάσταση μονάδες αίματος που θα χρησιμοποιούνταν από τον αμερικανικό στρατό παρατήρησε ότι νανοσωματίδια με δημήτριο (CeONPs) που χρησιμοποίησε ανταποκρίνονταν στις προσδοκίες τους. Συγκεκριμένα χρησιμοποίησαν CeONPs σε συγκεντρώσεις 10 και 100 nM, τα οποία προστέθηκαν σε δείγματα αίματος 24 ώρες μετά την λήψη τους και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 4°C. Μετρούσαν σε εβδομαδιαία βάση τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης που απελευθερωνόταν λόγω αιμόλυσης, καθώς και το μέγεθος, το σχήμα και την μορφολογία των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Για την άντληση αποτελεσμάτων χρησιμοποίησαν δεδομένα από την 14^η, 28^η και 42^η ημέρα αποθήκευσης των δειγμάτων αίματος.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι την 42^η μέρα, το δείγμα αίματος χωρίς τα CeONPs είχαν μειωμένο αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά 82%, τα δείγματα με CeONPs 10 nM είχαν μειωμένο αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά 65%, ενώ αυτά με CeONPs 100 nM είχαν μειωμένο αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά 53%. Τα αποτελέσματα δε, της αποθήκευσης φάνηκαν από την 14^η κιάλας μέρα καθώς το δείγμα αίματος χωρίς CeONPs παρουσίαζε μείωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά 19% ενώ και τα δύο δείγματα με CeONPs παρουσίαζαν σημαντικά μικρότερη μείωση, χωρίς να αναφέρεται ακριβές ποσοστό.

Αντίστοιχα αποτελέσματα είχαν και για την μορφολογική παρατήρηση των ερυθροκυττάρων με τα ερυθροκύτταρα που δεν είχαν αποθηκευτεί παρουσία CeONPs να εμφανίζουν έντονες μορφολογικές αλλαγές ενώ αυτά που αποθηκεύτηκαν παρουσία CeONPs εμφάνιζαν ηπιότερες μορφολογικές αλλαγές. Ομοίως και στην μέτρηση της απελευθερούμενης αιμοσφαιρίνης, τα δείγματα χωρίς CeONPs παρουσίαζαν αιμόλυση σε μεγάλο βαθμό και τα δείγματα με τις δύο συγκεντρώσεις CeONPs παρουσίαζαν σημαντικά λιγότερη αιμόλυση.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της έρευνας τους κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία του δημητρίου κατά την αποθήκευση του αίματος συνέβαλλε σημαντικά στην συντήρηση των ερυθροκυττάρων σε καλύτερη κατάσταση και για μεγάλο χρονικό διάστημα προστατεύοντας τα από το οξειδωτικό στρες και της

μορφολογικές αλλοιώσεις. Ενώ κλείνοντας, εκφράζουν την άποψη ότι τα CeONPs μπορεί να έχουν μέλλον στην αποθήκευση αίματός και παραγώγων του αίματος. [67]

Τέλος, οι Liu et al., το 2020 ασχολήθηκαν με την επίδραση που θα μπορούσαν να έχουν τα νανοσωματίδια δημητρίου (CNPs) σε καταστάσεις υπερθερμίας που ως γνωστών συμβάλουν στην παραγωγή αντιδραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), υπεύθυνες για το οξειδωτικό στρες και τον φυσιολογικό κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Χρησιμοποίησαν CNPs σε συγκεντρώσεις 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ που επωάστηκαν με δείγματα αίματος υγιών δοτών στους 37°C και 42°C για 10 λεπτά. Στις ίδιες συνθήκες (θερμοκρασίες και χρόνος) επωάστηκαν και δείγματα αίματος χωρίς CNPs και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βραχεία έκθεση σε αυξημένη θερμοκρασία (42°C) προκαλεί μείωση του όγκου των ερυθρών αιμοσφαιρίων (συρρίκνωση) και μορφολογικές αλλοιώσεις στις μεμβράνες, καθώς και επίσπευση του γήρατός τους. Αντιθέτως, στα δείγματα που επωάστηκαν παρουσία CNPs, ο ρυθμός απόπτωσης ήταν μικρότερος, η παραγωγή ROS ήταν μικρότερη (στην συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ δεν παρατηρήθηκε καθόλου παραγωγή ROS) και δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στις μεμβράνες.

Κατέληξαν έτσι στο συμπέρασμα ότι τα CNPs σε μικρές συγκεντρώσεις μπορούν να δρουν προστατευτικά για τα ερυθρά αιμοσφαίρια, παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση και ίσως θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν με κάποιο τρόπο σε καταστάσεις υπερθερμίας για την προστασία των ερυθροκυττάρων. [66]

Συνολικά, αξιοποιώντας αποτελέσματα από όλες τις παραπάνω έρευνες, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το δημήτριο δρα ευεργετικά και προστατευτικά για τα ερυθρά αιμοσφαίρια και ίσως να είναι ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό και προληπτικό μέσο για αιματολογικές διαταραχές και διαταραχές σχετιζόμενες με το οξειδωτικό στρες.

5. Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα ανωτέρω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι οι νανοφορείς δημητρίου είναι κατά βάση αιμοσυμβατοί τόσο με φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια όσο και με ερυθρά αιμοσφαίρια προερχόμενα από διάφορες αιματολογικές διαταραχές.

Πιο συγκεκριμένα τα φυσιολογικά αιμοσφαίρια και αυτά της ελάσσονος β-θαλασσαιμίας δεν παρουσίασαν αιμόλυση σε καμία από τις συγκεντρώσεις Ce-NPs που χρησιμοποιήθηκαν. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια της G6PD ανεπάρκειας και δρεπανοκυτταρικής αναιμίας παρουσίασαν έντονη αιμόλυση (7%) μόνο στην συγκέντρωση 0,25 mg/mL και τα ερυθρά αιμοσφαίρια της ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας παρουσίασαν ελαφριά αιμόλυση (3%) στην συγκέντρωση αυτή.

Ενδιαφέρον παρουσίασε η παρατήρηση ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια της β-θαλασσαιμίας και της G6PD ανεπάρκειας που ήρθαν σε επαφή με Ce-NPs συντηρήθηκαν σε καλή κατάσταση και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τα άλλα που με την πάροδο των ημερών παρουσίαζαν αυξημένη αιμόλυση λόγω της ερύπτωσης που συνέβαινε φυσιολογικά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Λουκόπουλος, Δ. και Πολίτου, Μ., 2015. *Μαθήματα αιματολογίας, Κλινική αιματολογία, Αιμόσταση, Μετάγγιση αίματος*. Αθήνα: ΣΕΑΒ, pp.24-42.
2. Βαγδατλή, Ε., 2014. *Έμμορφα στοιχεία του αίματος*. 2nd ed. Θεσσαλονίκη: Εκδ. Αθανασίου Αλτιντζή, pp.27-58.
3. Παντζιαρέλα, Ε., 2016. *Εργαστηριακή προσέγγιση στην γενική αίματος*. Θεσσαλονίκη: Εκδ. Αθανασίου Αλτιντζή, pp.59-61,84-85,111-117.
4. Αλμπάνη, Μ., Βενετικού, Μ., Παπαλιάγκας, Β. and Σπάνδου, Ε., 2020. *Φυσιολογία ανθρώπινου σώματος*. 1st ed. Θεσσαλονίκη: University studio press, pp.201-211.
5. Hoggatt, J. and Pelus, L., 2013. Hematopoiesis. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, pp.418-421.
6. Bunn, H. (2013). Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. doi: <https://doi.org/10.1101%2Fcshperspect.a011619>
7. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. *Hematologic Diseases / NIDDK*. [online] Available at: <https://www.niddk.nih.gov/about-niddk/research-areas/hematologic-diseases> [Accessed 19 April 2022].
8. Childrenshospital.org. n.d. *Red Blood Cell Disorders / Boston Children's Hospital*. [online] Available at: <https://www.childrenshospital.org/conditions/red-blood-cell-disorders> [Accessed 19 April 2022].
9. Khan, I. and Shaikh, H., 2022. *Cooley Anemia*. [online] Ncbi.nlm.nih.gov. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557522/> [Accessed 16 March 2022].
10. Nussbaum, R., McInnes, R., Willard, H., Moschonas, N., Saraphidou, T. and Phragkoulē, A., 2011. *Thompson & Thompson*. Athēna: Ekdoseis P. Ch. Paschalidēs, pp.368-369,398-399.
11. To, M. and Villatoro, V., 2018. *Clinical Hematology (ebook)*. 1st ed. University of Alberta: Edmonton, pp.113-116.
12. Origa, R., 2017. β-Thalassemia. *Genetics in Medicine*, 19(6), pp.609-619.
13. Needs T, Gonzalez-Mosquera LF, Lynch DT. Beta Thalassemia. 2021 Oct 17. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 30285376.

14. Weatherall, D., 2004. Thalassaemia: the long road from bedside to genome. *Nature Reviews Genetics*, 5(8), pp.625-631.
15. PERUTZ, M., ROSSMANN, M., CULLIS, A., MUIRHEAD, H., WILL, G. and NORTH, A., 1960. Structure of Hæmoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 5.5-Å. Resolution, Obtained by X-Ray Analysis. *Nature*, 185(4711), pp.416-422.
16. Whipple, G. and Bradford, W., 1936. Mediterranean disease-thalassaemia (Erythroblastic anemia of Cooley). *The Journal of Pediatrics*, 9(3), pp.279-311.
17. Rivella, S., 2009. Ineffective erythropoiesis and thalassemy. *Current Opinion in Hematology*, 16(3), pp.187-194.
18. Spritz, R., Jagadeeswaran, P., Choudary, P., Biro, P., Elder, J., deRiel, J., Manley, J., Gefer, M., Forget, B. and Weissman, S., 1981. Base substitution in an intervening sequence of a beta⁺-thalassemic human globin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(4), pp.2455-2459.
19. Muncie, H., 2022. *Beta Thalassaemia - NORD (National Organization for Rare Disorders)*. [online] NORD (National Organization for Rare Disorders). Available at: <<https://rarediseases.org/rare-diseases/thalassaemia-major/>> [Accessed 17 March 2022].
20. Kattamis, A., Forni, G., Aydinok, Y. and Viprakasit, V., 2020. Changing patterns in the epidemiology of β -thalassaemia. *European Journal of Haematology*, 105(6), pp.692-703.
21. De Sanctis, V., Kattamis, C., Canatan, D., Soliman, A., Elsedfy, H., Karimi, M., Daar, S., Wali, Y., Yassin, M., Soliman, N., Sobti, P., Al Jaouni, S., El Kholy, M., Fiscina, B. and Angastiniotis, M., 2017. β -thalassaemia distribution in the old world: a historical standpoint of an ancient disease. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 9(1), p.e2017018.
22. Medlineplus.gov. 2022. *G6PD gene: MedlinePlus Genetics*. [online] Available at: <<https://medlineplus.gov/genetics/gene/g6pd/>> [Accessed 18 March 2022].
23. Cappellini, M. and Fiorelli, G., 2008. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The Lancet*, 371(9606), pp.64-74.
24. Ελευθερίου, Φ. και Πέτρου, Χ., 2007. *Βιοχημεία*. 1st ed. Θεσσαλονίκη: University Studio Press, pp.138-140.

25. Nussbaum, R., McInnes, R., Willard, H., Moschonas, N., Saraphidou, T. and Phragkoulē, A., 2011. *Thompson & Thompson*. Athēna: Ekdoseis P. Ch. Paschalidēs, pp.318-319,593.
26. Beutler, D., Gaetani, D., der Kaloustian, D., Luzzatto, D., Niwa, D., Pannich, D. and Sodeinde, D., 1989. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bulletin of the World Health Organization*, 67(6), pp.601-611.
27. Luzzatto, L., Nannelli, C. and Notaro, R., 2016. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 30(2), pp.373-393.
28. Beutler, E., 2008. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood*, 111(1), pp.16-24.
29. Harcke, S., Rizzolo, D. and Harcke, H., 2019. G6PD deficiency. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 32(11), pp.21-26.
30. Bocchini, C., 2013. *OMIM Entry - * 305900 - GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE; G6PD*. [online] Omim.org. Available at: <<https://www.omim.org/entry/305900?search=g6pd&highlight=g6pd>> [Accessed 18 March 2022].
31. Carson, P., Flanagan, C., Ickes, C. and Alving, A., 1956. Enzymatic Deficiency in Primaquine-Sensitive Erythrocytes. *Science*, 124(3220), pp.484-485.
32. Nagel, R. and Roth, E., 1989. Malaria and red cell genetic defects (Review article). *Blood*, 74(4), pp.1213-1221.
33. Klowak, J. and Wong, E., 2020. *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency | McMaster Pathophysiology Review*. [online] Pathophys.org. Available at: <<http://www.pathophys.org/g6pd/>> [Accessed 22 March 2022].
34. Nussbaum, R., McInnes, R., Willard, H., Moschonas, N., Saraphidou, T. and Phragkoulē, A., 2011. *Thompson & Thompson*. Athēna: Ekdoseis P. Ch. Paschalidēs, pp.364-365,385-386,391-392.
35. Pecker, L. and Lanzkron, S., 2021. Sickle Cell Disease. *Annals of Internal Medicine*, 174(1), pp.ITC1-ITC16.
36. Hopkinsmedicine.org. *Sickle Cell Disease*. [online] Available at: <<https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/sickle-cell-disease>> [Accessed 25 April 2022].

37. To, M. and Villatoro, V., 2018. *Clinical Hematology (ebook)*. 1st ed. University of Alberta: Edmonton, pp.68-69.
38. Λουκόπουλος, Δ. και Πολίτου, Μ., 2015. *Μαθήματα αιματολογίας, Κλινική αιματολογία, Αιμόσταση, Μετάγγιση αίματος*. Αθήνα: ΣΕΑΒ, pp.75-78
39. Savitt, T., 1989. Herrick's 1910 Case Report of Sickle Cell Anemia. *JAMA*, 261(2), p.266.
40. Serjeant, G., 2010. One hundred years of sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, 151(5), pp.425-429.
41. HERRICK, J., 1910. PECULIAR ELONGATED AND SICKLE-SHAPED RED BLOOD CORPUSCLES IN A CASE OF SEVERE ANEMIA. *Archives of Internal Medicine*, VI(5), p.517.
42. Winter, W., *A Brief History of Sickle Cell Disease | Sickle Cell Center | Howard University*. [online] Howard University Health Care. Available at: <<http://huhealthcare.com/healthcare/hospital/specialty-services/sickle-cell-disease-center/disease-information/breif-history>> [Accessed 27 April 2022].
43. Hanh, E. and Gillespie, E., 1927. Sickle cell anemia: Report of a case greatly improved by splenectomy. Experimental study of sickle cell formation. *Arch Intern Med (Chic)*, 39(2), pp.233-254.
44. Marshall, E., 2001. Sickle Cell Disease and Gene Therapy. *Science*, 294(5550), pp.2245a-2245.
45. Serjeant, G., 2013. The Natural History of Sickle Cell Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(10), pp.a011783-a011783.
46. Hematology.org. 2008. *Milestones in Sickle Cell Disease - Hematology.org*. [online] Available at: <<https://www.hematology.org/about/history/50-years/milestones-sickle-cell-disease>> [Accessed 27 April 2022].
47. Lopez, M., 2021. *History of Sickle Cell Disease*. [online] Rare Disease Advisor. Available at: <<https://www.rarediseaseadvisor.com/hcp-resource/history-of-sickle-cell-disease/>> [Accessed 27 April 2022].
48. Wastnedge, E., Waters, D., Patel, S., Morrison, K., Goh, M., Adeloje, D. and Rudan, I., 2018. The global burden of sickle cell disease in children under five years of age: a systematic review and meta-analysis. *J Glob Health.*, 8(2).
49. Herman, M. and Chaudhry, S., *Sickle cell disease (SCD) | McMaster Pathophysiology Review*. [online] Pathophys.org. Available at: <<http://www.pathophys.org/scd/>> [Accessed 28 April 2022].

50. Serjeant, G., 2013. The Natural History of Sickle Cell Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(10), pp.a011783-a011783.
51. Steinberg, M., 1998. Pathophysiology of sickle cell disease. *Baillieres Clin Haematol*, 11(1), pp.163-184.
52. Gaston, M., Verter, J., Woods, G., Pegelow, C., Kelleher, J., Presbury, G., Zarkowsky, H., Vichinsky, E., Iyer, R., Lobel, J., Diamond, S., Holbrook, C., Gill, F., Ritchey, K. and Falletta, J., 1986. Prophylaxis with Oral Penicillin in Children with Sickle Cell Anemia. *New England Journal of Medicine*, 314(25), pp.1593-1599.
53. MG, K., V, K. and F, H., 2015. History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and Nanotechnological Progress. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 06(06).
54. Astruc D. Introduction to Nanomedicine. *Molecules*. 2015, 22;21(1):E4. doi: 10.3390/molecules21010004.
55. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*. 2019. 27;25(1):112. doi: 10.3390/molecules25010112.
56. Nanowerk.com. *Nanoparticles types, properties and uses*. [online] Available at: <https://www.nanowerk.com/what_are_synthetic_nanoparticles.php> [Accessed 31 March 2022].
57. Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y., Dufresne, A. and Danquah, M., 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9, pp.1050-1074.
58. Ray, U., 2018. *What are the Different Types of Nanoparticles?*. [online] AZoNano.com. Available at: <<https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=4938>> [Accessed 31 March 2022].
59. Hoppe, A., Güldal, N. and Boccaccin, A., 2011. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, 32(11), pp.2757-2774.
60. Jeelani, P., Mulay, P., Venkat, R. and Ramalingam, C., 2019. Multifaceted Application of Silica Nanoparticles. A Review. *Silicon*, 12(6), pp.1337-1354.

61. Tsamesidis, I., Pouroutzidou, G., Lymperaki, E., Kazeli, K., Lioutas, C., Christodoulou, E., Perio, P., Reybier, K., Pantaleo, A. and Kontonasaki, E., 2020. Effect of ion doping in silica-based nanoparticles on the hemolytic and oxidative activity in contact with human erythrocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 318, p.108974.
62. Pouroutzidou, G., Liverani, L., Theocharidou, A., Tsamesidis, I., Lazaridou, M., Christodoulou, E., Beketova, A., Pappa, C., Triantafyllidis, K., Anastasiou, A., Papadopoulou, L., Bikiaris, D., Boccaccini, A. and Kontonasaki, E., 2021. Synthesis and Characterization of Mesoporous Mg- and Sr-Doped Nanoparticles for Moxifloxacin Drug Delivery in Promising Tissue Engineering Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), p.577.
63. Tang, F., Li, L. and Chen, D., 2012. Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery. *Advanced Materials*, 24(12), pp.1504-1534.
64. Douroumis, D., Onyesom, I., Maniruzzaman, M. and Mitchell, J., 2012. Mesoporous silica nanoparticles in nanotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(3), pp.229-245.
65. Hosseinpour, S., Walsh, L. and Xu, C., 2020. Biomedical application of mesoporous silica nanoparticles as delivery systems: a biological safety perspective. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(43), pp.9863-9876.
66. Liu, T., Han, S., Pang, M., Li, J., Wang, J., Luo, X., Wang, Y., Liu, Z., Yang, X. and Ye, Z., 2020. Cerium oxide nanoparticles protect red blood cells from hyperthermia-induced damages. *Journal of Biomaterials Applications*, 36(1), pp.36-44.
67. Rzigalinski, B., Giovinco, H. and Cheatham, B., 2020. Cerium Oxide Nanoparticles Improve Lifespan of Stored Blood. *Military Medicine*, 185(Supplement_1), pp.103-109.
68. Salata, O., 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine (Review). *Journal of Nanobiotechnology*, 2(3).
69. Bangham, A., Standish, M. and Weissmann, G., 1965. The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), pp.253-IN28.

70. Gisbert-Garzarán, M., Manzano, M. and Vallet-Regí, M., 2020. Mesoporous Silica Nanoparticles for the Treatment of Complex Bone Diseases: Bone Cancer, Bone Infection and Osteoporosis. *Pharmaceutics*, 12(1), p.83.
71. Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S. and Alivisatos, A., 1998. Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels. *Science*, 281(5385), pp.2013-2016.
72. Edelstein, R., Tamanaha, C., Sheehan, P., Miller, M., Baselt, D., Whitman, L. and Colton, R., 2000. The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents. *Biosensors and Bioelectronics*, 14(10-11), pp.805-813.
73. Murthy, S., 2007. Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. *Murthy SK. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. Int J Nanomedicine. 2007;2(2):129-141.*, 2(2), pp.129-141.
74. Mohamed Isa, E., Ahmad, H., Abdul Rahman, M. and Gill, M., 2021. Progress in Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Agents for Cancer Treatment. *Pharmaceutics*, 13(2), p.152.
75. Bitar, A., Ahmad, N., Fessi, H. and Elaissari, A., 2012. Silica-based nanoparticles for biomedical applications. *Drug Discovery Today*, 17(19-20), pp.1147-1154.
76. Zhang, L., Gu, F., Chan, J., Wang, A., Langer, R. and Farokhzad, O., 2007. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83(5), pp.761-769.
77. Saba, H., 2015. *A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types*. [online] Available at: <https://www.researchgate.net/publication/273203342_A_Review_on_Nanoparticles_Their_Synthesis_and_Types> [Accessed 6 September 2022].
78. Thakkar, K., Mhatre, S. and Parikh, R., 2010. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), pp.257-262.
79. Jun B.H., Crusio, W., Dong, H., Radeke, H., Rezaei, N., Steinlein, O. and Xiao, J., 2021. Nanotechnology for Bioapplications. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1309, pp.42-49.

80. Wu, S., Mou, C., & Lin, H. (2013). Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. *Chemical Society Reviews*,42(9), 3862. doi:10.1039/c3cs35405a
81. Yang, B., Chen, Y., & Shi, J. (2019). Mesoporous silica/organosilica nanoparticles: Synthesis, biological effect and biomedical application. *Materials Science and Engineering: R: Reports*,137, 66-105. doi:10.1016/j.mser.2019.01.001
82. Gonçalves, M. C. (2018). Sol-gel silica nanoparticles in medicine: A natural choice. design, synthesis and products. *Molecules*,23(8), 2021. doi:10.3390/molecules23082021
83. Pouroutzidou, G. K., Liverani, L., Theocharidou, A., Tsamesidis, I., Lazaridou, M., Christodoulou, E., . . . Kontonasaki, E. (2021). Synthesis and characterization of mesoporous MG- and SR-doped nanoparticles for moxifloxacin drug delivery in promising tissue engineering applications. *International Journal of Molecular Sciences*,22(2), 577. doi:10.3390/ijms22020577
84. Tang, F., Li, L., & Chen, D. (2012). Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Advanced Materials*,24(12), 1504-1534. doi:10.1002/adma.201104763
85. Vazquez, N. I., Gonzalez, Z., Ferrari, B., & Castro, Y. (2017). Synthesis of mesoporous silica nanoparticles by sol-gel as nanocontainer for future drug delivery applications. *Boletín De La Sociedad Española De Cerámica Y Vidrio*,56(3), 139-145. doi:10.1016/j.bsecv.2017.03.002
86. Wordnik.com. *hemocompatibility — definition, examples, related words and more at Wordnik.* [online] Available at: <https://www.wordnik.com/words/hemocompatibility>
87. Sperling, C., Maitz, M. and Werner, C., 2018. Test methods for hemocompatibility of biomaterials. *Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications*, pp.77-104.
88. Weber, M., Steinle, H., Golombek, S., Hann, L., Schlensak, C., Wendel, H. and Avci-Adali, M., 2018. Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6(99).

89. ISO. 2017. *ISO 10993-4:2017*. [online] Available at: <https://www.iso.org/standard/63448.html>
90. Gawlikowski, M., El Fray, M., Janiczak, K., Zawidlak-Węgrzyńska, B. and Kustos, R., 2020. In-Vitro Biocompatibility and Hemocompatibility Study of New PET Copolyesters Intended for Heart Assist Devices. *Polymers*, 12(12), p.2857.
91. Pacific BioLabs. *Biocompatibility Test Methods - Pacific BioLabs*. [online] Available at: <https://pacificbiolabs.com/biocompatibility-test-methods#Hemocompatibility>.
92. Blok, S., Engels, G. and van Oeveren, W., 2016. In vitro hemocompatibility testing: The importance of fresh blood. *Biointerphases*, 11(2), p.029802.
93. Nelson Labs. *Hemocompatibility Testing | Nelson Labs*. [online] Available at: <https://www.nelsonlabs.com/testing/hemocompatibility/>.
94. Fröhlich, E., 2017. Hemocompatibility of inhaled environmental nanoparticles: Potential use of in vitro testing. *Journal of Hazardous Materials*, 336, pp.158-167.
95. Nalezinková, M., 2020. In vitro hemocompatibility testing of medical devices. *Thrombosis Research*, 195, pp.146-150.
96. Dobrovolskaia, M., Clogston, J., Neun, B., Hall, J., Patri, A. and McNeil, S., 2008. Method for Analysis of Nanoparticle Hemolytic Properties in Vitro. *Nano Letters*, 8(8), pp.2180-2187.
97. Neun, B., Ilinskaya, A. and Dobrovolskaia, M., 2017. Updated Method for In Vitro Analysis of Nanoparticle Hemolytic Properties. *Methods in Molecular Biology*, pp.91-102.
98. Lang, F., Lang, K., Lang, P., Huber, S. and Wieder, T., 2006. Mechanisms and Significance of Eryptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(7-8), pp.1183-1192.
99. Medical Dictionary Online. Eryptosis - Medical Dictionary online-medical-dictionary.org. [online] Available at: <https://www.online-medical-dictionary.org/definitions-e/eryptosis.html> [Accessed 18 April 2022].
100. Blok, S., Engels, G. and van Oeveren, W., 2016. *In vitro* hemocompatibility testing: The importance of fresh blood. *Biointerphases*, 11(2), p.029802.

101. Dobrovolskaia, M. A., & McNeil, S. E. (2013). Understanding the correlation between in vitro and in vivo immunotoxicity tests for nanomedicines. *Journal of Controlled Release*, 172(2), 456-466. doi:10.1016/j.jconrel.2013.05.025
102. Dobrovolskaia, M. A., Clogston, J. D., Neun, B. W., Hall, J. B., Patri, A. K., & McNeil, S. E. (2008). Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Nano Letters*, 8(8), 2180-2187. doi:10.1021/nl0805615
103. Tsamesidis, I., Gkiliopoulos, D., Pouroutzidou, G. K., Lymperaki, E., Papoulia, C., Reybier, K., . . . Theocharidou, A. (2021, August 26). Effect of artemisinin-loaded mesoporous cerium-doped calcium silicate nanopowder on cell proliferation of human periodontal ligament fibroblasts. *Nanomaterials*, 11(9), 2189. doi:10.3390/nano11092189
104. Del Turco, S., Ciofani, G., Cappello, V., Parlanti, P., Gemmi, M., Caselli, C., . . . Mattoli, V. (2019). Effects of cerium oxide nanoparticles on hemostasis: Coagulation, platelets, and vascular endothelial cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(7), 1551-1562. doi:10.1002/jbm.a.36669