



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
Α' ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Επιγενετικοί μηχανισμοί στη λειτουργία  
του καρδιαγγειακού συστήματος  
σε ασθενείς με Δρεπανοκυτταρική Νόσο**

**ΙΑΚΩΒΟΣ ΑΡΜΕΝΗΣ**

**Αθήνα 2018**



## ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ  
ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ  
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ  
ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ  
ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗ;  
ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ  
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΩΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-  
ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΣΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ  
ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓ-  
ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ  
ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ  
ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-  
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.  
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ  
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΕΣΙΝ.  
ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙ-  
ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ  
ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΞΙΩΣ  
ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ  
ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΟΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ  
ΠΡΗΕΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΞΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ  
ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΑ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ-  
ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ  
ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΩΝ. ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ  
ΔΟΥΛΩΝ. Α ΔΕ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ  
ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑ-  
ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-  
ΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ  
ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ-  
ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ'  
ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ



## ΟΡΚΟΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΘΕΑΣ, ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΑΥΤΗΝ ΕΔΩ ΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ. ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΜΕΝ ΕΚΕΙΝΟΝ. Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΕΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΙΣΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΜΩ ΚΟΙΝΩΝΟΝ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ, ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΕΙΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΝ ΑΝΑΓΚΗΝ, ΚΑΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΕΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗΝ ΚΑΙ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΠΑΡΕΧΩ ΔΕ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ, ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΟΡΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΥΠΟΛΟΙΠΟΥΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΑΣ, ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΚΑΙ ΕΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΔΩΣΕΙ ΟΡΚΟΝ ΣΥΜΦΩΝΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ ΔΕ ΑΛΛΟΝ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΔΕ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΝ ΑΓΩΓΗΝ ΠΡΟΣ ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ. ΘΑ ΠΡΟΛΑΜΒΑΝΩ ΔΕ ΒΛΑΒΗΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑΝ, ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΑΝ ΜΟΥ ΖΗΤΗΘΗ, ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΟΙΑΥΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ, ΟΣΑΥΤΟΣ ΟΥΤΕ ΕΙΣ ΕΓΚΥΟΝ ΓΥΝΑΙΚΑ ΘΑ ΔΩΣΩ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΝ, ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΩ ΔΕ ΤΟΝ ΒΙΟΝ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟΝ ΑΓΝΟΝ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟΝ ΝΟΜΟΝ. ΑΚΟΜΗ ΔΕ ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΩ ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΠΕΜΠΩ ΕΙΣ ΑΝΔΡΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥΣ, ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΔΙΑ ΤΟ ΕΡΓΟΝ ΤΟΥΤΟ, ΕΙΣ ΟΣΑΣ ΔΕ ΟΙΚΙΑΣ ΜΕΤΑΒΑΙΝΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΡΧΟΜΑΙ ΠΡΟΣ ΒΟΗΘΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ, ΑΠΕΧΩΝ ΠΑΣΗΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΣ ΔΙΑΦΘΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΑΡΚΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ Η ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΝ Η ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΝ ΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΕΙΣ ΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗΝ ΤΟΥΣ ΖΩΗΝ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕΝΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΟΥΝ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ, ΘΑ ΚΡΑΤΩ ΜΥΣΤΙΚΑ, ΠΙΣΤΕΥΩΝ ΟΤΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ. ΕΦ' ΟΣΟΝ ΜΕΝ ΛΟΙΠΟΝ ΤΗΡΩ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΑΠΟΛΑΥΩ ΚΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ, ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΟΣ ΕΞΑΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ, ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΤΟΥΤΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ



## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιωάννης Ρόμπος, MD, PhD, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας Ε.Κ.Π.Α., Διευθυντής Αιματολογικής Κλινικής Θεραπευτηρίου Metropolitan (επιβλέπων)

Κωνσταντίνος Κωνσταντόπουλος, MD, DCP, PhD, Καθηγητής Αιματολογίας Ε.Κ.Π.Α., Διευθυντής Πανεπιστημιακής Αιματολογικής Κλινικής, Π.Γ.Ν.Α. Λαϊκό

Κωνσταντίνος Πάντος, MD, PhD, Καρδιολόγος, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Εργαστήριο Πειραματικής Φαρμακολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

## ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Η εκπόνηση της παρούσας διατριβής χρηματοδοτήθηκε από υποτροφία του προγράμματος “Υποτροφίες Αριστείας ΙΚΥ Μεταπτυχιακών σπουδών στην Ελλάδα - Πρόγραμμα Siemens”.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Armenis I, Kalotychou V, Tzanetea R, Kollia P, Kontogeorgiou Z, Anastasopoulou D, Mantzourani M, Samarkos M, Pantos K, Konstantopoulos K, Rombos I. Prognostic value of T786C and G894T eNOS polymorphisms in sickle cell disease. **Nitric Oxide**. 2017, 62:17-23.

Armenis I, Kalotychou V, Tzanetea R, Kollia P, Kontogeorgiou Z, Anastasopoulou D, Mantzourani M, Samarkos M, Pantos K, Konstantopoulos K, Rombos I. Data on eNOS T786 and G894T polymorphisms and peripheral blood eNOS mRNA levels in Sickle Cell Disease. **Data Brief**. 2016, 10:192-197.





## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Α΄ Παθολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, ως εκ τούτου οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Ομότιμο Καθηγητή κ. Αριστείδη Πολύζο και στον Καθηγητή κ. Γεώργιο Λ. Δαΐκο για την αποδοχή μου ως υποψηφίου διδάκτορος, τη φιλοξενία στο χώρο, τη συνεργασία και τις διευκολύνσεις που μου παρείχαν. Ευχαριστώ όλα τα μέλη ΔΕΠ της Α΄ Παθολογικής Κλινικής για τη βοήθεια που μου παρείχαν όποτε απαιτήθηκε, ιδιαίτερος τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μιχάλη Σαμάρκο και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μαρίνα Μαντζουράνη που συμμετείχαν και στην Επταμελή Εξεταστική επιτροπή. Ευχαριστώ όλο το προσωπικό του Ερευνητικού Εργαστηρίου της Α΄ Παθολογικής Κλινικής, ιδιαίτερα τις βιολόγους Ζωή Κοντογεωργίου, Δήμητρα Αναστασοπούλου και Μαίρη Σοφοτάσιου για τη βοήθειά τους στην εκτέλεση μέρους της πειραματικής διαδικασίας. Ευχαριστώ τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Θεόδωρο Παπαϊωάννου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Μαρία Αγγελοπούλου και Επίκουρο Καθηγητή κ. Θεόδωρο Βασιλακόπουλο για τα σχόλια-παρατηρήσεις τους. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Καθηγητή κ. Κώστα Κωνσταντόπουλο και Καθηγητή κ. Κώστα Πάντο, για όλη την υποστήριξη, την καθοδήγηση και τις κρίσιμες συμβουλές-παρατηρήσεις τους. Στο κλινικό μέρος, καθοριστικό ρόλο διαδραμάτισε η ιατρός Παθολόγος Ρεβέκκα Τζανετέα, την οποία και ευχαριστώ για την εν γένει συμβολή της. Πολλές ευχαριστίες οφείλω στο Διευθυντή της Καρδιολογικής Κλινικής του Π.Γ.Ν.Α. «Λαϊκό», κ. Ιωάννη Μωυσάκη, για τη βοήθειά του στην επιτέλεση των ηχοκαρδιογραφικών μελετών των ασθενών, όπως και στον καρδιολόγο κ. Δημήτρη Φαρμάκη, για την πρόσβαση που παρείχε σε μέρος του αρχείου του. Τέλος, τις μεγαλύτερες ευχαριστίες οφείλω στον Επιβλέποντα τη διατριβή, Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας κ. Ιωάννη Ρόμπο και στη Διευθύντρια του Ερευνητικού Εργαστηρίου της Α΄ Παθολογικής Κλινικής, κ. Βασιλική Καλότυχου, χωρίς την πολυεπίπεδη υποστήριξη και καθοδήγηση των οποίων ο σχεδιασμός και η εκτέλεση του κλινικού και πειραματικού πρωτοκόλλου θα ήταν απολύτως αδύνατα.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η δρεπανοκυτταρική νόσος οφείλεται σε σημειακή μετάλλαξη στο 6<sup>ο</sup> κωδικόνιο του γονιδίου της β-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης Α. Η προκύπτουσα αιμοσφαιρίνη τείνει να πολυμερίζεται υπό συνθήκες υποξίας, προκαλώντας πρόωρη καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων και φαινόμενα αγγειακής απόφραξης στους πάσχοντες. Χαρακτηρίζεται από εκδηλώσεις και επιπλοκές σε πολλά όργανα και ιστούς εκτός αιμοποιητικού συστήματος. Από το καρδιαγγειακό σύστημα, σημαντικότερη επιπλοκή της είναι η πνευμονική υπέρταση. Παράλληλα, χαρακτηρίζεται από κλινική ετερογένεια, που οφείλεται σε περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες: τα τελευταία χρόνια, γονίδια που δε σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία της αιμοποίησης έχουν συσχετισθεί με τη βαρύτητα και τις επιπλοκές της νόσου. Μέχρι σήμερα έχει ερμηνευθεί μόνο ένα πολύ μικρό μέρος αυτής της κλινικής ετερογένειας. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν γονίδια που σχετίζονται με τη λειτουργία του αγγειακού ενδοθηλίου και το οξειδωτικό stress σε επίπεδο πολυμορφισμών ή/και γονιδιακής έκφρασης σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν πολυμορφισμοί των γονιδίων *NOS3* και *MTHFR*, που κωδικοποιούν τα ένζυμα «ενδοθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου» (eNOS) και «αναγωγή του μεθυλενοτετραϋδροφυλλικού οξέος» (MTHFR) αντίστοιχα. Παράλληλα, μελετήθηκε η έκφραση σε επίπεδο mRNA των ενζύμων eNOS και SOD2 και των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1α και PGC-1α. Για τα δυο πρώτα ένζυμα, μελετήθηκε επιπλέον η κατάσταση μεθυλίωσης των νησιδίων κυτοσίνης-γουανίνης σε ρυθμιστικές περιοχές του DNA των αντίστοιχων γονιδίων. Σε ότι αφορά το σκέλος των πολυμορφισμών, ο γονότυπος CC ως προς τη θέση -786 (T→C) στον υποκινητή του *NOS3* συσχετίσθηκε με την εμφάνιση αμφιβληστροειδοπάθειας σε ασθενείς με γονότυπο S/S και β<sup>0</sup>/S, ενώ στην ίδια ομάδα ασθενών οι γονότυποι GT και TT ως προς τη θέση +894 (G→T) στο εξώνιο 7 του *NOS3* συσχετίστηκαν με υψηλότερες τιμές αιματοκρίτη-αιμοσφαιρίνης. Η μελέτη των πολυμορφισμών στις θέσεις +677 (C→T) και +1298 (A→C) στα εξώνια 4 και 7 αντίστοιχα του γονιδίου *MTHFR* δεν απέδωσε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις. Η έκφραση του *NOS3* δε διέφερε μεταξύ ασθενών και υγιών, ενώ η έκφραση των *SOD2*,

*PPARGC1A* και *HIF1A* ήταν σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Μάλιστα, οι ασθενείς με υπερηχοκαρδιογραφικές ενδείξεις πνευμονικής υπέρτασης έτειναν να εμφανίζουν μειωμένη έκφραση του *SOD2* σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς. Η μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης των ρυθμιστικών αλληλουχιών των γονιδίων *NOS3* και *SOD2* με την τεχνική MSP (αντίδραση PCR ειδική για μεθυλίωση) ανέδειξε την παρουσία τόσο μεθυλιωμένων όσο και αμεθυλιωτων ομόλογων αλληλουχιών στα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Έτσι, επιβεβαιώνεται ο δυνητικά ρυθμιστικός ρόλος της επιγενετικής αυτής τροποποίησης στην έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων. Όμως, τα ευρήματα αυτά αφορούν εξίσου τόσο τους ασθενείς, όσο και τους υγιείς μάρτυρες. Κατά συνέπεια δεν είναι μόνον αυτά επαρκή για να ερμηνεύσουν τη διαφορά στην έκφραση του *SOD2* σε επίπεδο mRNA μεταξύ ασθενών και μαρτύρων.

## ABSTRACT

Sickle Cell Disease (SCD) is the most common inherited structural disorder of human hemoglobin. It is caused by a missense mutation on the 6<sup>th</sup> codon of the beta hemoglobin gene. The resulting form of hemoglobin tends to polymerize under hypoxic conditions, causing premature red blood cell destruction and vascular obstructive episodes. Despite being a hematological disease, clinical manifestations and complications implicate most organs and systems of human body. As far as the cardiovascular system is concerned, pulmonary hypertension is its most common and devastating complication. Moreover, Sickle Cell Disease features high clinical heterogeneity, explained by both genetic and environmental parameters. In the past few years, the function of various genes not exclusively related to hemopoiesis has been related to Sickle Cell Disease clinical severity/prognosis, but only a minor part of its heterogeneity has been convincingly interpreted so far. Aim of the present thesis was to study genes related to vascular endothelial function and oxidative stress in patients suffering from Sickle Cell Disease. More specifically, single nucleotide polymorphisms of *NOS3* and *MTHFR* genes, encoding endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzymes were studied. Furthermore, expression of genes encoding eNOS and superoxide dismutase 2 (SOD-2) enzymes, as well as HIF-1a and PGC-1a transcription factors, was studied on the mRNA level. Epigenetic regulation was studied on *NOS3* and *SOD2* genes by determining the methylation status of crucial cytosine-guanine islets on regulatory domains. On the polymorphism level, CC genotype for T→C polymorphism at -786 position of *NOS3* promoter was related with sickle cell retinopathy in patients with S/S and  $\beta^0$ /S genotype, while GG and GT genotypes for G→T polymorphism at +894 position at exon 7 of the same gene was related with higher hematocrit and hemoglobin values. *MTHFR* polymorphisms on positions +677 (C→T, exon 4) και +1298 (A→C, exon 7) were not related to clinical course or laboratory values of patients in the present study. *NOS3* expression was similar between patients and controls, while *SOD2*, *PPARGC1A* and *HIF1A* expression was significantly lower in

Sickle Cell Disease patients. Of interest, patients with echocardiographic markers of pulmonary hypertension featured lower *SOD2* expression in comparison to other patients. Methylation study of *NOS3* and *SOD2* regulatory sequences by MSP (Methylation Specific PCR) revealed the presence of differentially methylated homologous sequences in both patients and controls, thus verifying their regulatory role in gene expression. However, these findings are not sufficient to interpret the difference in *SOD2* expression between patients and controls, as both groups exhibited methylated and unmethylated sequences.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>Α'. Γενικό Μέρος</b> .....	19
1.Εισαγωγή.....	21
1.1.Η Δρεπανοκυτταρική Νόσος .....	21
1.1.1.Ορισμός .....	21
1.1.2.Ιστορικά στοιχεία.....	22
1.1.3.Επιδημιολογία.....	22
1.1.4.Παθογένεια-Παθοφυσιολογία .....	22
1.1.4.1.Η δρεπανοκυτταρική νόσος και το ενδοθήλιο.....	25
1.1.4.1.1.Το αγγειακό τοίχωμα, το ενδοθήλιο και η λειτουργία του .....	25
1.1.4.1.2.Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) .....	26
1.1.4.1.3. Η ενδοθηλιακή συνθετάση του NO (eNOS).....	27
1.1.4.1.4.Η ρύθμιση της δράσης της eNOS .....	28
1.1.4.1.5. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) του γονιδίου <i>NOS3</i> .....	29
1.1.4.1.5.1.Ο πολυμορφισμός T786C, rs 2070744 .....	29
1.1.4.1.5.2.Ο πολυμορφισμός G894T, rs1799983 .....	30
1.1.4.1.6.Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου στη δρεπανοκυτταρική νόσο .....	31
1.1.4.2.Η φλεγμονή στη δρεπανοκυτταρική νόσο .....	32
1.1.4.3.Η υπερπηκτικότητα στη δρεπανοκυτταρική νόσο .....	34
1.1.4.4.Η υποξία στη δρεπανοκυτταρική νόσο .....	35
1.1.4.4.1.Υποξία.....	35
1.1.4.4.2.Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 και η υπομονάδα του HIF-1α... 35	
1.1.4.4.3.Γονίδια-στόχοι και η υποξία ως αγγειογενετικό ερέθισμα .....	37
1.1.4.4.4.Η δρεπανοκυτταρική νόσος ως κατάσταση υποξίας .....	38
1.1.4.5.Το οξειδωτικό stress στη δρεπανοκυτταρική νόσο.....	39
1.1.4.5.1. Οξειδωτικό stress.....	39
1.1.4.5.2.Οι κυριότερες ελεύθερες ρίζες και τα αντιοξειδωτικά συστήματα.....	40
1.1.4.5.3.Η υπεροξειδική δισμουτάση 2 και η ρύθμισή της .....	40
1.1.4.5.4.Ο PGC-1α και η σιρτουίνη-3 .....	43
1.1.4.5.5.Το οξειδωτικό stress στους ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο....	46
1.1.4.5.5.1.Το δρεπανοκύτταρο ως πηγή οξειδωτικού stress .....	46

1.1.4.5.5.2.Η ενδοαγγειακή αιμόλυση και οι συνέπειές της .....	47
1.1.4.5.5.3.Η ισχαιμία και η βλάβη από επαναιμάτωση .....	49
1.1.4.6.Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και η ΔN.....	50
1.1.4.7.Το φυλλικό οξύ και η δρεπανοκυτταρική νόσος .....	51
1.1.4.7.1.Το φυλλικό οξύ, ο μεταβολισμός του και ο ρόλος της MTHFR .....	51
1.1.4.7.2. Το γονίδιο της MTHFR και οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) C677T και A1298C.....	52
1.1.4.7.2.1.Το γονίδιο της MTHFR .....	52
1.1.4.7.2.2.Ο πολυμορφισμός C677T, rs1801133 .....	52
1.1.4.7.2.3.Ο πολυμορφισμός A1298C, rs1801131 .....	53
1.1.4.7.3.Το φυλλικό οξύ στη δρεπανοκυτταρική νόσο .....	54
1.1.5.Γενετικοί υπότυποι της νόσου .....	54
1.1.6.Κλινική εικόνα- Επιπλοκές .....	55
1.1.7.Εργαστηριακά ευρήματα .....	57
1.1.8.Θεραπεία .....	59
1.2.Γονιδιακή Έκφραση, Γενετική και Επιγενετική.....	59
1.2.1.Γενετική.....	59
1.2.2.Γονιδιακή έκφραση-ρύθμιση.....	60
1.2.3.Επιγενετική .....	61
1.2.4.Μεθυλίωση του DNA .....	61
1.2.5.Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών .....	62
1.2.6.Μηχανισμοί με βάση το RNA .....	63
1.3.Προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCs: Endothelial Progenitor Cells) ....	65
1.4.Σκοπός.....	66
<b>Β'. Ειδικό Μέρος.....</b>	<b>69</b>
2.Υλικά και Μέθοδος .....	71
2.1.Πληθυσμός υπό μελέτη.....	71
2.2.Κλινικές πληροφορίες .....	71
2.3.Εργαστηριακός έλεγχος .....	73
2.4.Υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη.....	73
2.5.Απομόνωση DNA από ολικό περιφερικό αίμα .....	74



2.6.Έλεγχος της ποιότητας του DNA που απομονώθηκε .....	74
2.7.Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) .....	74
2.7.1.PCR για τους πολυμορφισμούς T786C και G894T του <i>NOS3</i> .....	74
2.7.2.PCR για τους πολυμορφισμούς C677T και A1298C του <i>MTHFR</i> .....	76
2.8.Η τεχνική RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) .....	77
2.8.1.Πολυμορφισμοί <i>NOS3</i> .....	77
2.8.2.Πολυμορφισμοί <i>MTHFR</i> .....	79
2.9.Καθαρισμός προϊόντων PCR -αλληλούχιση κατά Sanger.....	80
2.9.1.Καθαρισμός προϊόντων PCR .....	80
2.9.2.Αλληλούχιση του DNA κατά Sanger.....	80
2.10.Απομόνωση μονοπύρηνων περιφερικού αίματος - καλλιέργεια προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs) .....	82
2.11.Απομόνωση RNA από περιφερικό αίμα.....	83
2.12.Σύνθεση cDNA.....	83
2.13. Quantitative reverse transcription real time PCR (RT-qPCR) Ποσοτικοποίηση του mRNA μέσω ανάστροφης μεταγραφής και PCR πραγματικού χρόνου.....	84
2.14.Μετατροπή του DNA με όξινο θειώδες νάτριο -Προσδιορισμός της μεθυλίωσης σε CpG νησίδια .....	86
2.15.Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ειδική στη μεθυλίωση (MSP) .....	86
2.16.Στατιστική επεξεργασία .....	86
3.Αποτελέσματα .....	89
3.1.Δημογραφικά -κλινικά χαρακτηριστικά .....	89
3.2.Εργαστηριακά ευρήματα .....	91
3.3.Υπερηχοκαρδιογραφικά ευρήματα.....	93
3.4.Πολυμορφισμοί <i>NOS3</i> .....	94
3.4.1.T786C .....	94
3.4.2.G894T .....	98
3.5.Πολυμορφισμοί <i>MTHFR</i> .....	102
3.5.1. C677T .....	102

3.5.2. A1298C.....	106
3.6. Καλλιέργεια προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs).....	109
3.7. Επίπεδα mRNA <i>NOS3</i> .....	110
3.8. Επίπεδα mRNA <i>SOD2</i> .....	111
3.9. Επίπεδα mRNA <i>PPARGC1A</i> .....	115
3.10. Επίπεδα mRNA <i>HIF1A</i> .....	118
3.11. Μεθυλίωση <i>NOS3</i> και <i>SOD2</i> .....	121
4. Συζήτηση .....	122
4.1. Οι πολυμορφισμοί T786C και G894T του <i>NOS3</i> , κλινικοί και εργαστηριακοί συσχετισμοί.....	122
4.2. Οι πολυμορφισμοί C677T και A1298C του <i>MTHFR</i> , κλινικοί και εργαστηριακοί συσχετισμοί.....	126
4.3. Η έκφραση της eNOS .....	130
4.4. Η έκφραση της <i>SOD2</i> .....	131
4.5. Η έκφραση του PGC-1α.....	134
4.6. Η έκφραση του HIF-1α.....	138
4.7. Η κατάσταση μεθυλίωσης των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων <i>NOS3</i> και <i>SOD2</i> .....	139
4.8. Η κοινή παθοφυσιολογία δρεπανοκυτταρικής νόσου και πνευμονικής υπέρτασης.....	141
4.8.1. Η πνευμονική υπέρταση και η παθοφυσιολογία της .....	141
4.8.2. Η συμβολή της παρούσας μελέτης στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της πνευμονικής υπέρτασης στη δρεπανοκυτταρική νόσο .....	143
5. Βιβλιογραφία .....	147
6. Παράρτημα .....	177
6.1. Συσκευές-Όργανα .....	177
6.2. Σκεύη – Αντικείμενα .....	177
6.3. Αντιδραστήρια – Διαλύματα .....	178
6.4. Γλωσσάριο – Συντομογραφίες .....	179

## **Α'. Γενικό Μέρος**



## 1.Εισαγωγή

### 1.1.Η Δρεπανοκυτταρική Νόσος

#### 1.1.1.Ορισμός

Ο όρος “Δρεπανοκυτταρική νόσος” καλύπτει ένα σύνολο νοσολογικών οντοτήτων με κοινό γενετικό-μοριακό υπόβαθρο την παρουσία τουλάχιστον ενός β-γονιδίου της αιμοσφαιρίνης στο έκτο κωδικόνιο του οποίου η αδενίνη έχει αντικατασταθεί από θυμίνη (GAG>GTG). Αποτέλεσμα της αντικατάστασης αυτής είναι η σύνθεση, σε άλλοτε άλλο ποσοστό, παθολογικής αιμοσφαιρίνης, στην έκτη θέση της β-αλυσίδας της οποίας το γλουταμικό οξύ έχει αντικατασταθεί από βαλίνη (glu>val). Η αιμοσφαιρίνη που προκύπτει από το συνδυασμό δυο φυσιολογικών α-αλυσίδων με δυο παθολογικές β-αλυσίδες που φέρουν την παραπάνω μετάλλαξη ονομάζεται δρεπανοκυτταρική αιμοσφαιρίνη S (HbS) και η παρουσία της στην ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης σε άτομα με συμβατή κλινική εικόνα θέτει τη διάγνωση. Χαρακτηριστική της ιδιότητα είναι ο πολυμερισμός και η καθίζηση σε συνθήκες υποξίας, με αποτέλεσμα τα ερυθρά αιμοσφαίρια να προσλαμβάνουν το χαρακτηριστικό δρεπανοειδές σχήμα. Η ομόζυγη κατάσταση για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη του β γονιδίου ονομάζεται δρεπανοκυτταρική αναιμία. Η παρουσία ενός μεταλλαγμένου β-γονιδίου με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη κι ενός φυσιολογικού β-γονιδίου στο ίδιο άτομο (φορεία του γονιδίου της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας) είναι ετεροζυγωτία και οδηγεί σε αβληχρή συμπτωματολογία. Αντίθετα, η διπλή ετεροζυγωτία ως προς το β-γονίδιο για τη μετάλλαξη της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας και για άλλες μεταλλάξεις που οδηγούν σε ποιοτικές ή ποσοτικές διαταραχές στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης (αιμοσφαιρινοπάθειες και θαλασσαιμίες αντίστοιχα) οδηγεί σε ποικίλης κλινικής βαρύτητας φαινοτύπους που συνιστούν το φάσμα της Δρεπανοκυτταρικής Νόσου όπως πχ η μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία.

### **1.1.2.Ιστορικά στοιχεία**

Η πρώτη περιγραφή περιστατικού δρεπανοκυτταρικής νόσου αφορά νεκροτομή ασθενούς με ατροφία σπληνός το 1846. Η συνύπαρξη της αναιμίας με το ιδιόμορφο δρεπανοειδές σχήμα των ερυθροκυττάρων περιγράφηκε στις αρχές του 20ου αιώνα. Το 1949 ο Linus Pauling περιέγραψε τις παθολογικές χημικές ιδιότητες της αιμοσφαιρίνης S (περίσσεια θετικού φορτίου στην ηλεκτροφόρηση) και ένα χρόνο αργότερα ο Vernon Ingram περιέγραψε την αιμοσφαιρίνη S σε μοριακό επίπεδο. Το 1954, με την επινόηση της ηλεκτροφόρησης αιμοσφαιρίνης, η έρευνα απέκτησε ένα σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο και έτσι έγινε δυνατή η διάκριση επιμέρους μορφών της νόσου [1]. Το 1995 δημοσιεύθηκε η πρώτη μελέτη για τη χρήση της υδροξυουρίας σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο [2].

### **1.1.3.Επιδημιολογία**

Κάθε χρόνο, μόνο στην Αφρική γεννιούνται πάνω από 200.000 παιδιά με δρεπανοκυτταρική νόσο, επί συνόλου 300.000 γεννήσεων πασχόντων από κάποια κληρονομική διαταραχή της αιμοσφαιρίνης σε όλο τον κόσμο. Σε χώρες με υψηλή συχνότητα του μεταλλαγμένου γονιδίου, όπως η Νιγηρία, 2% των γεννήσεων είναι νεογνά με δρεπανοκυτταρική νόσο. Η νόσος είναι ιδιαίτερα συχνή στην Υποσαχάρια Αφρική, την Ινδία, τη Σαουδική Αραβία και στις χώρες της Μεσογείου, τη Νότια και Κεντρική Αμερική, την Κούβα, περιοχές στις οποίες παλιότερα η ελονοσία ήταν διαδεδομένη, όπως επίσης στους Αφροαμερικανούς. Η γεωγραφική κατανομή, παρόμοια με αυτή της θαλασσαιμίας, εξηγείται από το πλεονέκτημα επιβίωσης που εμφανίζουν οι ετεροζυγώτες της νόσου, λόγω μικρότερης ευπάθειας στην ελονοσία (το βιολογικό πλεονέκτημα αφορά μόνον ετεροζυγώτες-όχι ομοζυγώτες). Στις ΗΠΑ διαβιούν περίπου 100.000 πάσχοντες από δρεπανοκυτταρική νόσο. Στην Ευρώπη, ο αριθμός των γεννήσεων πασχόντων έχει αυξηθεί τελευταία λόγω μετανάστευσης [3].

### **1.1.4.Παθογένεια - Παθοφυσιολογία**

Η HbS, όταν βρίσκεται σε περιβάλλον πλούσιο σε οξυγόνο και είναι συνδεδεμένη με αυτό, δε διαφέρει ουσιωδώς στη λειτουργία της από τη φυσιολογική αιμοσφαιρίνη A (HbA). Ωστόσο, στη μορφή της δεοξυαιμοσφαιρίνης (αιμοσφαιρίνη χωρίς οξυγόνο), η τεταρτοταγής της δομή

αλλάζει ώστε πολλά μόρια αυτής της μορφής να πολυμερίζονται, σχηματίζοντας δύσκαμπτες δομές με επτά ζεύγη ινιδίων, που στις παρυφές τους παρουσιάζουν θέσεις εμπυρήνωσης για περισσότερα μόρια δεοξυHbS. Τα ινίδια μειώνουν την ελαστικότητα και την παραμορφωσιμότητα της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όταν η ποσότητα HbS πολυμερούς ξεπεράσει μια ορισμένη τιμή. Οι ιδιότητες αυτές ωστόσο είναι θεμελιώδεις για τη διάβαση των ερυθρών αιμοσφαιρίων από τα τριχοειδή και τα μετατριχοειδικά φλεβίδια της μικροκυκλοφορίας των ιστών, καθώς η διάμετρος των αγγείων αυτών είναι μικρή και φυσιολογικά τα ερυθρά αιμοσφαίρια υφίσταται μικρο-αλλαγές στο σχήμα τους κατά τη διέλευσή τους. Έτσι, σε συνθήκες υποξίας (μικροκυκλοφορία), τα ερυθρά αιμοσφαίρια υφίστανται δομική βλάβη, μετατρέπόμενα σε δρεπανοκύτταρα. Τα τελευταία, αν καταφέρουν να διέλθουν από τα αγγεία της μικροκυκλοφορίας και να φθάσουν στους πνεύμονες, εκτίθενται σε υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου, οπότε τα πολυμερή HbS διαλύονται. Έχει υπολογιστεί ότι πάνω από τα μισά ερυθρά αιμοσφαίρια υφίστανται αντιστρεπτή δρεπάνωση σε κάθε διάβαση της μικροκυκλοφορίας [4,5]. Οι επαναλήψεις όμως αυτού του φαινομένου οδηγούν σε μη αντιστρεπτές δομικές βλάβες των ερυθροκυττάρων, με αποτέλεσμα των πρόωρη καταστροφή τους. Η τάση της HbS να σχηματίζει πολυμερή εξαρτάται τόσο από τη μερική πίεση οξυγόνου, όσο και από τη συγκέντρωσή της και τη διαλυτότητά της. Έτσι, η υποξία, η οξέωση, η αφυδάτωση, η συγκέντρωση της ελεύθερης αίμης και η υψηλή αρχική συγκέντρωση HbS προάγουν το σχηματισμό ινιδίων και την εμφάνιση κλινικών εκδηλώσεων της νόσου [6,7,8,9].

Η δομή και η λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων διαταράσσεται με πολλούς τρόπους υπό την επίδραση της HbS. Ειδικότερα, διαταράσσεται η διαπερατότητα της μεμβράνης σε ηλεκτρολύτες και νερό, με αποτέλεσμα την εκροή καλίου και νερού, με κυτταρική αφυδάτωση, διαταράσσεται ο κυτταρικός σκελετός που υπόκειται της μεμβράνης, με αποτέλεσμα απώλεια του φυσιολογικού σχήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η πολικότητα φωσφολιπιδίων της μεμβράνης και τέλος, η καταστροφή της μεμβράνης σε ορισμένα σημεία οδηγεί στο σχηματισμό μικροσωματιδίων περιβαλλόμενων από λιπίδια. Πρόκειται στην ουσία για θραύσματα της μεμβράνης, με έντονα θρομβογόνο χαρακτήρα [10].

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια, μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους δρεπάνωσης-επιαναφοράς, μετατρέπονται σε μη αντιστρεπτά δρεπανοκύτταρα. Τα τελευταία καταστρέφονται κυρίως μέσω φαγοκύτωσης από τα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, με αποτέλεσμα τη βράχυνση του μέσου χρόνου ζωής των ερυθροκυττάρων (εξωαγγειακή αιμόλυση). Η εξωαγγειακή αιμόλυση οδηγεί σε αύξηση στο αίμα/ορό των ασθενών των λεγόμενων δεικτών αιμόλυσης (δικτυοερυθροκύτταρα, γαλακτική αφυδρογονάση, έμμεση χολερυθρίνη). Ωστόσο, ποικίλο ποσοστό των δρεπανοκυττάρων καταστρέφεται ενδοαγγειακά, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση στο εσωτερικό των αγγείων αργινίνης, ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, αίμης και σιδήρου. Οι ουσίες αυτές γρήγορα προκαλούν κορεσμό στα αντιρροπιστικά συστήματα του οργανισμού (απτοσφαιρίνες, αιμοπηξίνη), με αποτέλεσμα την εμφάνιση ιδιαίτερα επιβλαβών-τοξικών δράσεων, όπως αναλύεται παρακάτω. Παράλληλα, η ενδοαγγειακή αιμόλυση συμβάλλει σε άλλοτε άλλο βαθμό στην αύξηση των τιμών των δεικτών αιμόλυσης που προαναφέρθηκαν και στη μείωση των απτοσφαιρινών [10].

Εκτός από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, πολλά άλλα κύτταρα εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κοκκιοκύτταρα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και τα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, τα αιμοπετάλια, τα δικτυοερυθροκύτταρα αλληλεπιδρούν με τα δρεπανοκύτταρα άμεσα και έμμεσα μέσω παραγωγής σηματοδοτικών μορίων, με αποτέλεσμα τη διαμόρφωση ενός προ-φλεγμονώδους και προ-θρομβωτικού περιβάλλοντος, χαρακτηριστικού της νόσου. Η αλληλεπίδραση μεταξύ ερυθρών αιμοσφαιρίων πλούσιων σε αιμοσφαιρίνη S και ενδοθηλιακών κυττάρων στα μετατριχοειδικά φλεβίδια οδηγεί σε περαιτέρω επιβράδυνση της ροής στη μικροκυκλοφορία, με συνέπεια την αύξηση της δεοξυ-αιμοσφαιρίνης S και την προαγωγή της δρεπάνωσης. Η αγγειακή απόφραξη χαρακτηρίζεται από αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε ερυθρά αιμοσφαίρια με παθολογική μεμβράνη, ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς προσκόλλησης και παράγουν κυτταροκίνες, ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα με προθρομβωτικό φαινότυπο. Τα αιμοπετάλια είναι επίσης ενεργοποιημένα στους ασθενείς με



δρεπανοκυτταρική νόσο ακόμη και σε συνθήκες ηρεμίας αλλά ο βαθμός ενεργοποίησής τους αυξάνεται στις αγγειοαποφρακτικές κρίσεις και σχηματίζουν συμπλέγματα με τα δρεπανοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα, προάγοντας την αγγειακή απόφραξη. Στη δρεπανοκυτταρική νόσο, τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης στην επιφάνειά τους (E-σελεκτίνη, ICAM-1, VCAM-1), μέσω της ενεργοποίησης της οδού του NF-κβ, υπό την επίδραση δρεπανοκυττάρων, προφλεγμονωδών κυτταροκινών που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και προϊόντων ενδοαγγειακής αιμόλυσης, όπως θα αναλυθεί παρακάτω [10,11].

#### **1.1.4.1.Η δρεπανοκυτταρική νόσος και το ενδοθήλιο**

##### **1.1.4.1.1.Το αγγειακό τοίχωμα, το ενδοθήλιο και η λειτουργία του**

Το τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων αποτελεί το φυσικό όριο ανάμεσα στο αίμα και τους ιστούς και αποτελείται από αλληπάλληλους χιτώνες, καθένας από τους οποίους έχει διαφορετική ιστολογική δομή και διαφορετική λειτουργία. Ο έξω χιτώνας έχει περισσότερο στηρικτικό ρόλο, ο μέσος αποτελείται κυρίως από λείες μυϊκές ίνες και ελέγχει τον αγγειακό τόνο μεταβάλλοντας το βαθμό σύσπασης των λείων μυϊκών ινών, ενώ ο έσω αποτελείται από το ενδοθήλιο. Το τελευταίο αποτελείται από μια κυτταρική μονοστιβάδα μεσεγγυματικής προέλευσης που αφορίζει το εσωτερικό των αγγείων από τις υποκείμενες ιστικές δομές. Προάγει την κυκλοφορία του αίματος, ευοδώνοντας τη διαστολή των αγγείων μέσω της χαλάρωσης των μυϊκών ινών του μέσου χιτώνα και αποτρέποντας την ενεργοποίηση του μηχανισμού της αιμόστασης (αιμοπετάλια και πήξη). Για την επίτευξη των λειτουργιών αυτών, παράγει σηματοδοτικά μόρια, όπως προστακυκλίνη, μονοξείδιο του αζώτου (NO) και ενδοθηλίνη, η ισορροπία ανάμεσα στα οποία εξασφαλίζει την εύρυθμη αγγειακή λειτουργία. Παράλληλα, το ενδοθήλιο δεν επιτρέπει στα έμμορφα στοιχεία του αίματος και σε πολλές πρωτεΐνες να μετακινηθούν εκτός του αγγειακού αυλού. Σε συνθήκες ελλιπούς ιστικής τροφοδοσίας σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, το ενδοθήλιο κινητοποιείται προς σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων, ενώ σε συνθήκες ιστικής βλάβης,

η φλεγμονώδης αντίδραση προκαλεί αλλαγή στη λειτουργία του ενδοθηλίου, ώστε αυτό να προσελκύει κύτταρα της φυσικής ανοσίας και να διευκολύνει τη μετάβαση των τελευταίων στους ιστούς, με αύξηση της διαβατότητας του [12,13]. Διαταραχές της ενδοθηλιακής λειτουργίας χαρακτηρίζουν τη συχνότερη αιτία θανάτου στον αναπτυσσόμενο κόσμο, την αθηρωματική νόσο των αρτηριών, και πολλές σπανιότερες νόσους-σύνδρομα, όπως η ιδιοπαθής πνευμονική υπέρταση. Σε άλλα νοσήματα, όπως η δρεπανοκυτταρική νόσος, η ενδοθηλιακή λειτουργία παραβλάπεται δευτερογενώς, αλλά ο βαθμός αυτής της βλάβης ίσως να είναι ο καθοριστικότερος προγνωστικός παράγοντας της νόσου.

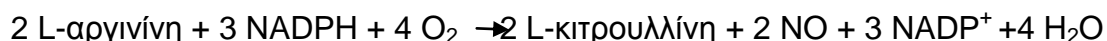
#### **1.1.4.1.2. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO)**

Το NO είναι αέριο που δρα «παρακρινώς» ως σηματοδοτικό μόριο. Αν και παράγεται από πολλά κύτταρα, υπό φυσιολογικές συνθήκες τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι η κύρια πηγή NO στα αγγεία. Διαχέεται παθητικά προς τα λεία μυϊκά και άλλα κύτταρα, στα οποία συνδέεται με το δισθενή σίδηρο της αίμης του ενζύμου γουανυλική κυκλάση (GC), ενεργοποιώντας την. Η ενεργοποιημένη γουανυλική κυκλάση παράγει κυκλικό GMP (μονοφωσφορική γουανοσίνη) από GTP (τριφωσφορική γουανοσίνη). Το κυκλικό GMP συνδέεται με την πρωτεϊνική κινάση G, ενεργοποιώντας την και πυροδοτεί μια σηματοδοτική ακολουθία με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση του ελεύθερου ενδοκυττάριου ασβεστίου και τη χάλαση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων. Ταυτόχρονα, μειώνεται η παραγωγή της αγγειοσυσπαστικής ουσίας ενδοθηλίνης-1 και αυξάνεται η έκφραση του αγγειοδιασταλτικού υποδοχέα B της ενδοθηλίνης. Παράλληλα, η αντιθρομβωτική δράση του NO περιλαμβάνει αναστολή της συσσώρευσης, ενεργοποίησης και προσκόλλησης των αιμοπεταλίων και μείωση του ιστικού παράγοντα και της γένεσης θρομβίνης. Ακόμη, το NO έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, αφού αυξάνει την έκφραση του IκΒα, του αναστολέα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ [14]. Τέλος, το NO συμβάλλει στην αγγειογένεση και είναι «εκτελεστικό» μόριο της δράσης του VEGF, συμβάλλοντας στην κινητοποίηση των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων-EPCs [15]. Πέραν όμως της δράσης του μέσω γουανυλικής

κυκλάσης, το NO σε μεγάλες συγκεντρώσεις συνδέεται χημικά με κατάλοιπα κυστεΐνης ορισμένων πρωτεϊνών προκαλώντας S-νιτροζυλίωση τους και μεταβάλλοντας με τον τρόπο αυτό τις λειτουργικές τους ιδιότητες. Άλλα ένζυμα είναι ικανά να αντιστρέψουν αυτή τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση [12,13,14,15].

#### **1.1.4.1.3. Η ενδοθηλιακή συνθετάση του NO (eNOS)**

Το NO στον άνθρωπο συντίθεται από ειδικά ένζυμα, τις συνθετάσες του NO (NOS). Αυτές διακρίνονται σε ιδιοσυστασιακές (cNOS: constitutive NOS) που περιλαμβάνουν τη νευρωνική-nNOS-NOS1 και την ενδοθηλιακή-eNOS-NOS3 και επαγόμενες (iNOS-NOS2). Τα ένζυμα αυτά κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και εκφράζονται σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, έχουν παρόμοια δομή και λειτουργία και διαφορετική ρύθμιση της δράσης τους. Η eNOS είναι η μορφή που εκφράζεται κατεξοχήν στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αν και έχει δειχθεί έκφρασή της και στα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα κοκκιοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα αιμοπετάλια, τα μυοκαρδιακά κύτταρα [15]. Είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του μεγαλύτερου μέρους του NO που δρα στο καρδιαγγειακό σύστημα υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η eNOS είναι ένα ομοδιμερές αποτελούμενο από δυο όμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες με μοριακό βάρος 133 kDaltons η καθεμία. Καταλύει το σχηματισμό NO και L-κίτρουλλίνης από L-αργινίνη, κατά την αντίδραση:



Αποτελείται από μια αμινοτελική περιοχή με δραστηριότητα οξειδάσης και μια καρβοξυτελική περιοχή με δραστηριότητα αναγωγάσης, ενώ ως συμπαράγοντες χρησιμοποιεί ανηγμένο φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινοδινουκλεοτίδιο (NADPH), φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD), φλαβινομονονουκλεοτίδιο (FMN), τετραϋδροβιοπτερίνη (BH<sub>4</sub>) και αίμη [16]. Το ένζυμο μετα-μεταφραστικά υφίσταται σύνδεση με μυριστικό οξύ στη γλυκίνη-2, με αποτέλεσμα την καθήλωσή του στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *NOS3*, που εντοπίζεται στο

χρωμόσωμα 7q35-36, έχει μήκος 21kb και αποτελείται από 26 εξώνια. Ο υποκινητής του δε διαθέτει «κουτί» TATA, έχει όμως «κουτί» CCAAT στη θέση -290 και ανάστροφο CCAAT στη θέση -631, «κουτί» CACCC, είναι πλούσιος σε CG και διαθέτει αλληλουχίες πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες Sp1, Sp3, AP-1, AP-2, E1f-1, YY1, p53 και NF-1, όπως και για παράγοντες που αναγνωρίζουν αλληλουχίες GATA [17,18]. Από αυτές η αλληλουχία για τον Sp1 είναι ιδιαίτερα σημαντική [19]. Δυο περιοχές του υποκινητή, που ονομάζονται PRD I και PRD II εντοπίζονται στις θέσεις από -104- ως-95 και από-144 ως-115 αντίστοιχα έχουν επίσης μεγάλη σημασία για τη μεταγραφή. Το γονίδιο μεταγράφεται σε μόριο mRNA μήκους 4052 νουκλεοτιδίων [17,20].

#### **1.1.4.1.4. Η ρύθμιση της δράσης της eNOS**

Η ρύθμιση της eNOS λαμβάνει χώρα σε μεταγραφικό επίπεδο, σε επίπεδο σταθερότητας mRNA (μετα-μεταγραφικά) και κυρίως σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, μέσω χημικών τροποποιήσεων και αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες. Στο μεταγραφικό επίπεδο, το τοιχωματικό stress, η αυξημένη αιματική ροή και άλλα μηχανικά ερεθίσματα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, ο TGFβ, η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, το οξειδωμένο λινολεϊκό οξύ, τα οιστρογόνα, ο VEGF, η πρωτεϊνική κινάση C και η αναστολή των αποακετυλασών των ιστονών (HDACs) αυξάνουν τη μεταγραφή του NOS3. Αντίθετα, ο TNFα (Tumor Necrosis Factor α) τη μειώνει και η οξειδωμένη LDL (Low Density Lipoprotein) και η υποξία σχετίζονται είτε με αύξηση είτε με μείωση της μεταγραφής [18]. Η υποξία επάγει την έκφραση της eNOS μέσω του HRE στη θέση από -5375 ως -5366 [21]. Επιγενετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στη ρύθμιση του γονιδίου: η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή σχετίζεται με την ιστοειδικότητα της έκφρασης της eNOS. Όπως έδειξαν οι Chan et al. (2004), η μεθυλίωση τμημάτων του υποκινητή (5' του σημείου έναρξης της μεταγραφής) διαφέρει ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε άλλους κυτταρικούς τύπους και προκαλεί διαφοροποίηση στην ενεργότητα του υποκινητή και στην ευχέρεια πρόσδεσης του συμπλέγματος μεταγραφικών παραγόντων Sp1, Sp3 και Ets1 [22]. Αντίθετα, η ρύθμιση του βαθμού έκφρασης του γονιδίου σε κύτταρα που φυσιολογικά το εκφράζουν (π.χ. ενδοθηλιακά) είναι περισσότερο συνάρτηση επιγενετικών μηχανισμών στο

επίπεδο των ιστονών: η υποξία και το τοιχωματικό stress τροποποιούν την έκφραση της eNOS μέσω επίδρασης στο λεγόμενο κώδικα των ιστονών, στο πρότυπο δηλαδή των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών συσκευασίας του DNA [23]. Σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, έχειδειχθεί ότι η αλληλεπίδραση του eNOS mRNA με μη κωδικά μόρια RNAs και νουκλεοπρωτεΐνες μεταβάλλει τη σταθερότητά του. Συγκεκριμένα, το τοιχωματικό stress, η κυτταρική ανάπτυξη, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, οι στατίνες, το οξειδωμένο λινολεϊκό οξύ και ο VEGF σταθεροποιούν το eNOS mRNA. Αντίθετα, η υποξία, ο TNFα, η οξειδωμένη LDL, η υπερχοληστερολαιμία, η θρομβίνη, οι λιποπολυσακχαρίτες των Gram (-) βακτηρίων και η GTPάση Rho το αποσταθεροποιούν [18]. Η αρνητική ρύθμιση της eNOS υπό συνθήκες φλεγμονής επιτελείται εν μέρει μέσω επαγωγής του miR-155 από τον NF-κΒ: το miR-155 συνδέεται με την 3' αμετάφραστη περιοχή του eNOS mRNA και το αποσταθεροποιεί, μειώνοντας τα επίπεδά του χωρίς να μεταβάλλει το ρυθμό μεταγραφής του [24]. Αντίστοιχα, υπό συνθήκες υποξίας, το μη κωδικό (lnc) RNA sONE, με μερικώς συμπληρωματική αλληλουχία με το eNOS mRNA, προσδένεται στο τελευταίο, μειώνοντας την έκφραση της eNOS [23]. Ωστόσο, ο πιο άμεσος μηχανισμός ρύθμισης της eNOS είναι οι μετα-μεταφραστικές χημικές τροποποιήσεις. Έχειδειχθεί ότι η φωσφορυλίωση, η S-νιτροζυλίωση και η ακετυλίωση καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό την ενεργότητά της. Εξίσου σημαντική είναι η αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Η αλληλεπίδραση με την καλμοδουλίνη (CaM) παρουσία ασβεστίου, όπως και η αλληλεπίδραση με την hsp90, ενεργοποιούν την eNOS, ενώ η σύνδεση με την καβεολίνη, τη βασική πρωτεΐνη των καβεολίων της μεμβράνης, όπως και με τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες NOSIP και NOSTRIN, έχει κατασταλτική δράση [25].

#### **1.1.4.1.5. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί**

#### **(Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) του γονιδίου NOS3**

##### **1.1.4.1.5.1.Ο πολυμορφισμός T786C, rs2070744**

Το 1999, οι Nakayama et al. περιέγραψαν την αντικατάσταση της θυμίνης από κυτοσίνη στη θέση -786 του υποκινητή του NOS3. Χρησιμοποιώντας ανάλυση του υποκινητή του γονιδίου με δείκτη έκφρασης τη λουσιφεράση, έδειξαν ότι ο γονότυπος 786CC σχετίζεται με μειωμένη έκφραση του γονιδίου σε συνθήκες

φυσιολογικής μερικής πίεσης οξυγόνου και υποξίας, ενώ η ποσοστιαία επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου σε συνθήκες υποξίας δεν επηρεάζεται [26]. Οι ίδιοι ερευνητές συνέδεσαν τον πολυμορφισμό αυτό (rs2070744) με σπασμό των στεφανιαίων αγγείων [26]. Ακολούθησε εντατική έρευνα για τις επιπτώσεις του πολυμορφισμού αυτού σε διάφορες νοσηρές καταστάσεις στις οποίες εμπλέκεται το ενδοθήλιο, όπως η στεφανιαία νόσος, τα ισχαιμικά και αιμορραγικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, η αρτηριακή υπέρταση, η περιφερική αγγειακή νόσος, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι επιπλοκές του διαβήτη και η δρεπανοκυτταρική αναιμία [26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36]. Σε ότι αφορά τις επιπτώσεις της παρουσίας του πολυμορφισμού στο mRNA της eNOS και στα επίπεδα του NO, υπάρχει διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων μεταξύ των μελετών αναλόγως πληθυσμού, κυτταρικής σειράς και τεχνικής. Οι Wang et al. (2002) επιβεβαίωσαν το αποτέλεσμα των Nakayama et al. (1999) σε HUVECs με την τεχνική γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης απουσία του ενισχυτή στο εσώνιο 4, αλλά διαπίστωσαν αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα του C αλληλομόρφου παρουσία του ενισχυτή (είτε 4a, είτε 4b) [37]. Οι Senthil et al. (2005) μελέτησαν την επίδραση του πολυμορφισμού στα επίπεδα του mRNA, της πρωτεΐνης και της παραγωγής NO σε HUVECs. Παρατήρησαν μειωμένο επίπεδο mRNA στα κύτταρα με γονότυπο 786CC, χωρίς αξιόλογη διαφοροποίηση στο επίπεδο της πρωτεΐνης ή των παραπροϊόντων της δράσης του ενζύμου [38]. Αντίθετα, οι Sim et al. (1998) δε βρήκαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση της λουσιφεράσης σε κύτταρα HepG2 με ή χωρίς τον πολυμορφισμό στον υποκινητή της eNOS [39], ενώ οι Salvi et al. (2013) βρήκαν μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή σε κύτταρα με γονότυπο 786TT σε σχέση με 786CC [28]. Όπως συνάγεται από τα παραπάνω, ο πολυμορφισμός αυτός πιθανώς μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή με τρόπο που επηρεάζεται από άλλους παράγοντες, π.χ. η παρουσία του ενισχυτή στο εσώνιο 4.

#### **1.1.4.1.5.2.Ο πολυμορφισμός G894T, rs1799983**

Το 1998 οι Yoshimura et al. περιέγραψαν την αντικατάσταση της γουανίνης από θυμίνη στη θέση +894 του γονιδίου NOS3 που αντιστοιχεί στο εξώνιο 7

(rs1799983) και οδηγεί στην αλλαγή του γλουταμικού οξέος από ασπαρτικό στη θέση 298 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, συσχετίζοντάς τη με το σπασμό των στεφανιαίων αγγείων [40]. Στη συνέχεια, ο πολυμορφισμός αυτός σχετίστηκε με τη στεφανιαία νόσο, τα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, την αρτηριακή υπέρταση, το σακχαρώδη διαβήτη και τη δρεπανοκυτταρική νόσο [27,41,42,35]. Οι λειτουργικές επιπτώσεις του πολυμορφισμού αυτού διαλευκάνθηκαν σταδιακά: αρχικά οι Tesauero et al. (2000) επισήμαναν τη δημιουργία μιας θέσης ευαίσθητης στην πρωτεόλυση ως επακόλουθο της παρουσίας του πολυμορφισμού [43], ενώ οι Joshi et al. (2008) ανέδειξαν την επίδραση του πολυμορφισμού στην αλληλεπίδραση μεταξύ eNOS και καβεολίνης-1 στα καβεόλια [44]. Πέρα από τις παραπάνω άμεσες λειτουργικές συνέπειες του πολυμορφισμού, έχει αναφερθεί συσχέτισή του με την κατάσταση μεθυλίωσης του γονιδιώματος. Πρόσφατα, οι Matsha et al. (2016) έδειξαν ότι η ολική μεθυλίωση του DNA σε διαβητικούς και μη ασθενείς αφρικανικής καταγωγής σχετίζεται με τον πολυμορφισμό G894T [45].

#### **1.1.4.1.6. Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου στη δρεπανοκυτταρική νόσο**

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου. Το ενδοθήλιο στους ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο είναι ενεργοποιημένο και δυσλειτουργεί, ιδιαίτερα στη φάση των αγγειοαποφρακτικών κρίσεων. Το αγγειακό τοίχωμα εμφανίζει παθολογοανατομικές μεταβολές, με χαρακτηριστικότερο το σχηματισμό θρόμβων αντίστοιχα προς περιοχές υπερπλασίας του έσω χιτώνα [46,47,48]. Σε λειτουργικό επίπεδο, παρατηρείται αύξηση των κυκλοφορούντων μορίων προσκόλλησης των λευκών αιμοσφαιρίων (ICAM-1, VCAM-1, E-σελεκτίνη) και αύξηση των κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών κυττάρων (Circulating Endothelial Cells, CECs) κατά τη διάρκεια των αγγειοαποφρακτικών κρίσεων [49,50]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν ενεργοποιημένο φαινότυπο, με υπερέκφραση μορίων προσκόλλησης των λευκών αιμοσφαιρίων και ιστικού παράγοντα [51,52]. Σε μοριακό επίπεδο, οι μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης των ενδοθηλιακών κυττάρων επιτελούνται μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Όπως έδειξαν οι Belcher et al. (2000), η

έκκριση κυτταροκινών από τα μονοκύτταρα πάσχόντων από δρεπανοκυτταρική νόσο επάγει την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων [53]. Λίγα χρόνια αργότερα, η ίδια ομάδα ανέδειξε την άμεση ενεργοποιητική επίδραση της αίμης μέσω του TLR-4 στα ενδοθηλιακά κύτταρα [54]. Σε λειτουργικό επίπεδο, ήδη από το 1993 οι Mosseri et al. έδειξαν ότι τα δρεπανοκύτταρα αναστέλλουν σε μεγάλο βαθμό την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο χαλάρωση του αγγειακού τοιχώματος [55]. Τα επόμενα χρόνια, αναδείχθηκε με μεγαλύτερη σαφήνεια η εξάντληση του διαθέσιμου NO στους πάσχοντες από δρεπανοκυτταρική νόσο λόγω της ενδοαγγειακής αιμόλυσης, όπως αναλύεται στο εδάφιο 1.1.4.6.

#### **1.1.4.2. Η φλεγμονή στη δρεπανοκυτταρική νόσο**

Η δρεπανοκυτταρική νόσος αποτελεί μια χρόνια φλεγμονώδη νόσο, παρά το γεγονός ότι προκαλείται από μετάλλαξη σε γονίδιο που δεν σχετίζεται με τη φλεγμονώδη απόκριση ούτε εκφράζεται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού. Τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας είναι διεγερμένα, ενώ οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ευρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα.

Συγκεκριμένα, τα ουδετερόφιλα των ασθενών με δρεπανοκυτταρική νόσο είναι ενεργοποιημένα, όπως αποκαλύπτεται από το προφίλ υποδοχέων που εκφράζονται στην επιφάνειά τους, και αλληλεπιδρούν άμεσα *in vitro* με τα δρεπανοκύτταρα και με τα επίσης ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα [56]. Παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση των μεμβρανικών μορίων CD11b/CD18, CD64 και μειωμένη έκφραση CD62L [57,58], ενώ αναλογικά μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού τους αποτελείται από γερασμένα, υπερενεργοποιημένα ουδετερόφιλα που τείνουν να σχηματίζουν NETs (Neutrophil Extracellular Traps) και προάγουν τη φλεγμονή [59]. Ο αριθμός των ουδετερόφιλων έχει συσχετισθεί με τη σοβαρότητα της νόσου και με πολλές επιπλοκές της [11]. Η χορήγηση υδροξυουρίας οδηγεί τόσο σε μείωση του αριθμού τους όσο και σε μικρότερη ενεργοποίησή τους [60].

Τα μονοκύτταρα επίσης είναι ενεργοποιημένα, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Ακόμα και σε σταθερή κατάσταση, παράγουν IL-1 $\beta$  και TNF- $\alpha$  σε μεγαλύτερο



βαθμό από τα αντίστοιχα υγιών μαρτύρων και διεγείρουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω των κυτταροκινών αυτών. Χαρακτηριστικό της ενεργοποίησής τους είναι ο σχηματισμός των λεγόμενων φλεγμονοσωμάτων (inflammasomes). Πρόκειται για ολιγομερή συμπλέγματα αποτελούμενα από διαφορετικούς τύπους πρωτεϊνών, που συναρμολογούνται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος υπό την επίδραση σημάτων κινδύνου για το κύτταρο ή παθογόνων μικροοργανισμών. Καλύτερα μελετημένο είναι το NLRP3, που αποτελείται από την πρωτεΐνη NLRP3 (Nod-Like Receptor family, Pyrin domain containing-3), την ASC και την προ-κασπάση-1. Το NLRP3 φλεγμονόσωμα καταλύει την ωρίμανση των προφλεγμονωδών ιντερλευκινών IL-1β και IL-18 [61]. Η ρύθμιση της δράσης του λαμβάνει χώρα τόσο σε μεταγραφικό (επίπεδο mRNA -πρώτο βήμα) όσο και μετα-μεταφραστικό επίπεδο (δεύτερο βήμα) [62]. Το αντίστοιχο γονίδιο, *NLRP3*, είναι μεταγραφικά ενεργό στα μονοκύτταρα και τα σπληνικά δενδριτικά κύτταρα και, σε μικρότερο βαθμό, στα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα [63]. Σε επίπεδο οργάνων, το *NLRP3* εκφράζεται κυρίως στο σπλήνα και η έκφρασή του επάγεται από την ενεργοποίηση των υποδοχέων Toll (TLRs), ειδικά του TLR-4, μέσω της οδού του MyD88 και του TNFR. Και στις δυο περιπτώσεις ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ [61]. Η ενεργοποίηση-συναρμολόγηση του NLRP3 προκαλείται από παθογόνα (βακτήρια, τοξίνες, ιούς) και σήματα κινδύνου, με κυριότερο το εξωκυττάριο ATP, τους κρυστάλλους (ουρικού οξέος, πυροφωσφορικού ασβεστίου, χοληστερόλης) και τα ινίδια (πυριτίου, αμιάντου, αμυλοειδούς). Τα παραπάνω ετερογενή ερεθίσματα προκαλούν μείωση του ενδοκυττάρου καλίου και αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα μιτοχόνδρια [62]. Πρόσφατα, οι Pitanga et al. (2016) έδειξαν ότι η έκθεση φυσιολογικών μονοπύρηνων περιφερικού αίματος σε δρεπανοκύτταρα προκαλεί αύξηση της έκφρασης των NLRP3, IL-1β, IL-18 και κασπάσης-1, ενώ τα μονοπύρηνια πασχόντων από δρεπανοκυτταρική νόσο υπερεκφράζουν τους TLR-2,4 και 5 και τα NLRP3 και IL-1β [64]. Τέλος, η άμεση αλληλεπίδραση των μονοκυττάρων με τα αιμοπετάλια και η επίδραση του παραγόμενου από τα προγονικά κύτταρα της

ερυθράς σειράς PIGF ευθύνονται σε σημαντικό βαθμό για την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων [11].

Παράλληλα με την ενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, παρατηρείται αυξημένη παραγωγή-έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Έχει δειχθεί ότι οι πάσχοντες από δρεπανοκυτταρική νόσο εμφανίζουν αυξημένο επίπεδο TNF-α, IL-1β, IL-3, IL-6, GM-CSF, ενδοθηλίνης-1 και προσταγλανδίνης E2, ενώ κατά τις επώδυνες κρίσεις το επίπεδο της IL-8 αυξάνεται [65,66]. Μάλιστα, οι κυτταροκίνες αυτές είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνες για την προσέλκυση και ενεργοποίηση φλεγμονωδών κυττάρων και για την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου, με αποτέλεσμα τα ενδοθηλιακά κύτταρα να προάγουν την προσκόλληση φλεγμονωδών κυττάρων και αιμοπεταλίων και την αγγειοσύσπαση.

#### **1.1.4.3. Η υπερπηκτικότητα στη δρεπανοκυτταρική νόσο**

Τα αγγειοαποφρακτικά φαινόμενα που χαρακτηρίζουν τη δρεπανοκυτταρική νόσο έστρεψαν τους ερευνητές προς τη μελέτη του μηχανισμού αιμόστασης-πήξης στους ασθενείς και έτσι ανακαλύφθηκαν διαταραχές που τεκμηριώνουν το χαρακτηρισμό της ΔΝ ως «υπερπηκτικής» κατάστασης. Συγκεκριμένα, πέραν της μετάθεσης φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική στιβάδα της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων [67,68,69,70] που αναφέρθηκαν και παραπάνω, παρατηρείται και αυξημένη παραγωγή ιστικού παράγοντα από τα μονοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα με συνοδό μείωση του παράγοντα VII [71], συχνότερη παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων, αυξημένη παραγωγή θρομβίνης –κλάσματος προθρομβίνης 1.2, αυξημένα επίπεδα D-dimers [67,71], μειωμένο επίπεδο των αντιπηκτικών πρωτεϊνών C, S [72] και αντιθρομβίνης III [71]. Παράλληλα, και το ινωδολυτικό σύστημα στρέφεται σε προθρομβωτική κατεύθυνση, όπως φαίνεται από τα αυξημένα επίπεδα PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) σε πάσχοντες από ΔΝ, που φαίνεται πως οφείλονται στην υπερέκκριση PIGF [73]. Τέλος, παρατηρείται αύξηση των συμπλεγμάτων πλασμίνης-αντιπλασμίνης [67]. Πολλές από τις παραπάνω

προθρομβωτικές μεταβολές επιτείνονται κατά τη διάρκεια των οξειών επιπλοκών της νόσου [71].

#### **1.1.4.4.Η υποξία στη δρεπανοκυτταρική νόσο**

##### **1.1.4.4.1.Υποξία**

Φυσιολογικά το μοριακό οξυγόνο  $O_2$  είναι απαραίτητο για όλους τους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, αλλά η διαθεσιμότητά του διαφέρει ανάλογα με τον ιστικό τύπο. Η έκθεση ενός ιστού σε συνθήκες υποξίας (με διαθέσιμο  $O_2$  λιγότερο από το απαιτούμενο για την κάλυψη των μεταβολικών αναγκών του) οδηγεί σε τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης με στόχο την επαναφορά του ισοζυγίου παροχής-κατανάλωσης  $O_2$  σε επίπεδο κυττάρου, ιστού και οργανισμού. Τα γονίδια που επάγονται από την υποξία ως επί το πλείστον κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης και του σιδήρου (Fe), την κυτταρική επιβίωση-πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται μεταξύ άλλων τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες GLUT-1, υδροξυλάση της τυροσίνης, ερυθροποιητίνη, VEGF (αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου), PlGF (πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας). Οι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται από την υποξία και εμπλέκονται στην επαγωγή αυτών των γονιδίων είναι οι HIF-1, HIF-2, NF- $\kappa$ B και AP-1 [74].

##### **1.1.4.4.2.Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 και η υπομονάδα του HIF-1 $\alpha$**

Ο παράγοντας HIF-1 είναι ο πρωταρχικός μεταγραφικός μεσολαβητής της προσαρμογής στην υποξία και βασικός ρυθμιστής της ομοιόστασης του  $O_2$  [75]. Αποτελείται από δυο υπομονάδες (HIF-1 $\alpha$  και  $\beta$ ) που εκφράζονται ιδιοσυστασιακά στα εμπύρνηνα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος. Η  $\beta$  υπομονάδα, γνωστή και ως ARNT, δε φαίνεται να υπόκειται σε κάποια ρύθμιση, ενώ η  $\alpha$  ρυθμίζεται ως προς την ποσότητα και την ενεργότητα της σε μετα-μεταφραστικό κυρίως επίπεδο. Υπό συνθήκες επάρκειας  $O_2$ , ειδικά ένζυμα (υδροξυλάσες της προλίνης, PHDs) υδροξυλιώνουν τα κατάλοιπα προλίνης στις θέσεις 402 και 564, με αποτέλεσμα την σύνδεση της με την πρωτεΐνη ουβικουιτίνη από το σύμπλεγμα πρωτεΐνης von Hippel Lindau

(VHL)-E3 λιγκάσης και την αποδόμησή του HIF-1α στα πρωτεασωμάτια [76,77]. Ακόμη, η υδροξυλίωση του καταλοίπου ασπαραγίνης στη θέση 803 από την υδροξυλάση FIH-1 παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη CBP/p300, που αποτελεί συν-ενεργοποιητή του HIF-1 [78]. Σε συνθήκες υποξίας, η εξάντληση υποστρωμάτων και συμπαραγόντων ( $Fe^{+2}$ , οξογλουταρικό) ουσιαστικά αναστέλλει τις παραπάνω αντιδράσεις, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του HIF-1α, τη συσσώρευσή του στο κυτταρόπλασμα και τη μετακίνησή του στον πυρήνα, όπου συνδέεται με τον HIF-1β. Το προκύπτον σύμπλεγμα προσδένεται σε υποκινητές και ενισχυτές γονιδίων που διαθέτουν στοιχεία απόκρισης στην υποξία (HREs, αλληλουχία G/ACGTG), προάγοντας τη μεταγραφή τους. Εκτός όμως της ενεργοποίησης του HIF-1 σε συνθήκες υποξίας, έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποίηση του ίδιου του παράγοντα και των γονιδίων-στόχων του μπορεί να συμβεί και σε παρουσία επαρκούς ποσότητας  $O_2$  όταν για παράδειγμα η δράση των PHDs μειώνεται, όπως σε συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού stress. Σε αυτή την περίπτωση, παρατηρείται ομοδιμερισμός των μορίων PHD μέσω σχηματισμού ενός δισουλφιδικού δεσμού και το ένζυμο αδρανοποιείται [79]. Μάλιστα, ελεύθερες ρίζες προερχόμενες από την αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων μπορούν να σταθεροποιήσουν τον HIF-1α με αυτό το μηχανισμό σε συνθήκες νορμοξίας, όπως συμβαίνει κατά τη δηλητηρίαση με αρσενικό [80]. Σε παθολογικές συνθήκες έχει παρατηρηθεί ρύθμισή του (επαγωγή) και στο επίπεδο της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω της οδού του HER2 [81] και στο επίπεδο της μεταγραφής-επιπέδων mRNA [82,83]. Μάλιστα, ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 φαίνεται να εμπλέκεται στην επαγωγή της μεταγραφής του *HIF1A* γονιδίου μετά από έκθεση σε τρισθενές αρσενικό [82], ενώ ο NF-kB προάγει την έκφραση του *HIF1A* σε συνθήκες φλεγμονής, ακόμη και απουσία υποξίας [84]. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) επηρεάζει τη σταθερότητα του HIF-1α με τρόπο που διαφοροποιείται ανάλογα με την παρουσία οξειδωτικού stress: παρουσία ελευθέρων ριζών, ο HIF-1α αποσταθεροποιείται από το NO. Αντίθετα, σε λιγότερο οξειδωτικό περιβάλλον το NO τον σταθεροποιεί σε λεία μυϊκά κύτταρα μεγάλων αρτηριών [85]. Συνολικά, φαίνεται ότι χαμηλές συγκεντρώσεις NO αποσταθεροποιούν τον

HIF-1α, ενώ υψηλότερες, όπως αυτές σε συνθήκες φλεγμονής, τον σταθεροποιούν [84]. Ωστόσο, ρύθμιση των επιπέδων του HIF-1α μπορεί να συμβεί φυσιολογικά και μέσω ελέγχου της δραστηριότητας των PHDs, όπως έδειξαν οι Wei et al. (2015) για την αποακετυλάση σιρτουίνης-3 (SIRT3) [86]. Αντίθετα, η σιρτουίνης-1 (SIRT1) αλληλεπιδρά άμεσα με τον HIF-1α αποακετυλιώνοντας το κατάλοιπο λυσίνης στη θέση 674 και μειώνοντας την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με την CBP/p300 [86,87], ενώ φαίνεται να ασκεί ρύθμιση και στη μεταγραφική ενεργότητα του *HIF1A* γονιδίου, μέσω αποακετυλίωσης της ιστόνης H3, με επακόλουθη μείωση της μεταγραφής του γονιδίου [82]. Η μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης του HIF-1α επιτελείται και με επιγενετικούς μηχανισμούς. Όπως έδειξαν οι Koslowski et al. (2011), η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -271 και +96 στο γονίδιο *HIF1A* είναι πλούσια σε CpG, μεγάλο μέρος των οποίων είναι μεθυλιωμένο. Η μείωση της μεθυλίωσης στην περιοχή αυτή, που παρατηρείται σε καρκινικά κύτταρα, αλλά και με την επίδραση φαρμακολογικών παραγόντων, αυξάνει την έκφραση του γονιδίου [88]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητα του HIF-1α να αυτορυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο, μέσω του HRE που υπάρχει στον υποκινητή μεταξύ των θέσεων -156 και -152, στο εσωτερικό του CpG νησιδίου. Η ικανότητα αυτή εξαρτάται από την κατάσταση μεθυλίωσης της περιοχής αυτής και διαδραματίζει ενεργό ρόλο κατά την ιστική ανάπτυξη-διαφοροποίηση [88,89]. Αντίστοιχοι επιγενετικοί μηχανισμοί επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της επαγωγικής δράσης του HIF-1α και σε άλλα γονίδια-στόχους του. Τέλος, επιγενετικοί μηχανισμοί με βάση τα microRNAs επίσης εμπλέκονται στη ρύθμισή του: το miR199a2 συνδέεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή του HIF-1α mRNA και το αποσταθεροποιεί [90].

#### **1.1.4.4.3. Γονίδια-στόχοι και η υποξία ως αγγειογενετικό ερέθισμα**

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα, πάνω από το 2% των γονιδίων ρυθμίζεται από τον HIF-1 [91]. Το πρώτο γονίδιο που βρέθηκε να ρυθμίζεται μεταγραφικά από τον HIF-1 ήταν αυτό της ερυθροποιητίνης, βασικού αυξητικού παράγοντα της ερυθράς σειράς [92]. Αργότερα, αποκαλύφθηκε ότι μεταφορείς γλυκόζης, γλυκολυτικά ένζυμα, αυξητικοί παράγοντες (IGF-2, TGF-α) και παράγοντες

διαφοροποίησης των μυοκυττάρων επίσης ρυθμίζονται από τον HIF-1 [76]. Άλλα γονίδια-στόχοι του HIF-1 είναι η ενδοθηλίνη-1 (ET-1), η επαγόμενη NOS (iNOS), ιντερλευκίνη 1β (IL-1β), η κυκλοξυγενάση-2 (COX-2) και ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (PAI-1) [84,93,94]. Η eNOS επίσης επάγεται από την ενεργοποίηση του HIF-1α τουλάχιστον στους σκελετικούς μυς μετά από άσκηση [95], μέσω του στοιχείου ανταπόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Element -HRE) που διαθέτει και αρχικά βρέθηκε να ενεργοποιείται από τον HIF-2 [21]. Τέλος, ο μεταγραφικός παράγοντας FoxO3, που σχετίζεται με την απόκριση στο οξειδωτικό stress και τη μιτοχονδριακή λειτουργία, ενεργοποιείται από τον HIF-1, προάγοντας τη μεταγραφή αντιοξειδωτικών ενζύμων και καταστέλλοντας τη μιτοχονδριακή βιογένεση [96,97].

Μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες στην οποία εμπλέκεται ο HIF-1α είναι η αγγειογένεση. Έχει δειχθεί ότι επάγει την έκφραση πολλών αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων (VEGF, PlGF, PDGF, ANGPT1, ANGPT2) και των υποδοχέων τους [98]. Ακόμη, ρυθμίζει την παραγωγή αγγειογενετικών χημειοκινών (SDF-1α, S1P) και των υποδοχέων τους (CXCR4, S1PR), ενισχύοντας την προσέλκυση προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs)[99], ενώ προάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων επάγοντας την έκφραση πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA [76,91]. Υπάρχει αλληλεπίδραση στη ρύθμιση του HIF-1 και του NF-κB, βασικού μεταγραφικού παράγοντα-μεσολαβητή της απόκρισης στα φλεγμονώδη ερεθίσματα, και οι δυο παράγοντες από κοινού ενορχηστρώνουν την έκφραση κυτταροκινών και υποδοχέων που προάγουν την αγγειογένεση [84].

#### **1.1.4.4. Η δρεπανοκυτταρική νόσος ως κατάσταση υποξίας**

Η ΔΝ χαρακτηρίζεται από χρόνια ιστική υποξία της οποίας η ένταση διαφοροποιείται ανάλογα με τον ιστό και τη φάση της νόσου (χρόνια σταθερή κατάσταση ή οξεία κρίση). Παθοφυσιολογικά, οφείλεται στην αναιμία (μειωμένη ποσότητα αιμοσφαιρίνης διαθέσιμη για μεταφορά O<sub>2</sub>), στη δυσλειτουργία του αναπνευστικού συστήματος οξέως (οξύ θωρακικό

σύνδρομο, πνευμονική εμβολή, λοίμωξη) ή χρονίως (πνευμονική υπέρταση), στις αυξημένες μεταβολικές ανάγκες ορισμένων ιστών και στην απόφραξη της μικροκυκλοφορίας ή μεγαλύτερων αγγείων. Όπως είναι αναμενόμενο, οι πάσχοντες από ΔΝ εμφανίζουν αυξημένο επίπεδο πολλών κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και άλλων σηματοδοτικών μορίων που σχετίζονται με την υποξία και προάγουν την αγγειογένεση, όπως οι VEGF, PlGF ή την αγγειοσύσπαση, όπως η ET-1, και έχουν συσχετισθεί με την κλινική βαρύτητα και τις επιπλοκές της νόσου [100,101,102,103]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, βασικός μεταγραφικός παράγοντας που μεσολαβεί στην έκφραση και τη δράση των παραπάνω μορίων είναι ο HIF-1 (εδάφιο 1.4.3), ενώ οι οδοί της φλεγμονής και της υποξίας αλληλεπικαλύπτονται και συμπλέκονται.

#### **1.1.4.5. Το οξειδωτικό stress στη δρεπανοκυτταρική νόσο**

##### **1.1.4.5.1. Οξειδωτικό stress**

Η εξέλιξη αερόβιας αναπνοής από κάποιους μονοκύτταρους και αργότερα πολυκύτταρους οργανισμούς, αφότου η γήινη ατμόσφαιρα έγινε οξειδωτική εμπλουτιζόμενη σε μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ), αποτέλεσε ισχυρό εξελικτικό πλεονέκτημα, λόγω της πολύ μεγαλύτερης ενεργειακής απόδοσης σε σύγκριση με την αναερόβια αναπνοή (38 μόρια ATP από τον αερόβιο καταβολισμό της γλυκόζης έναντι 2 από τον αναερόβιο). Είχε όμως ως παράπλευρη συνέπεια την έκθεση των αερόβιων οργανισμών σε ισχυρά οξειδωτικά μόρια που παράγονται κυρίως ως παραπροϊόντα από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια και δευτερευόντως από τη δράση διαφόρων ενζύμων και μερικώς ανηγμένων ιόντων μετάλλων και αποδίδονται με την έννοια «οξειδωτικό stress». Τα μόρια αυτά χαρακτηρίζονται από την παρουσία ασύζευκτων ηλεκτρονίων και ονομάζονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ή αζώτου (ROS, RNS), έχουν δε την ιδιότητα να αντιδρούν με βιολογικά μακρομόρια (νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες) και μικρότερα μόρια (λιπίδια, αμινοξέα, συνένζυμα), καταστρέφοντάς τα. Ακόμη, τείνουν να αναγεννώνται ή να μετατρέπονται από τη μια μορφή στην άλλη, παρατείνοντας την καταστροφική τους δράση. Η συνεχής παραγωγή ROS/RNS στους αερόβιους οργανισμούς οδήγησε στην ανάπτυξη ενός

συστήματος προστασίας των χημικών συστατικών των ίδιων των οργανισμών από την οξειδωτική καταστροφή, αλλά και στην αξιοποίηση των μορίων αυτών προς όφελος των οργανισμών (π.χ. ενδοκυτταρική και διακυτταρική σηματοδότηση, οξειδωτική καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών).

#### **1.1.4.5.2.Οι κυριότερες ελεύθερες ρίζες και τα αντιοξειδωτικά συστήματα**

Κατά τη λειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, μικρό ποσοστό (1-2%) των μορίων  $O_2$ , μετατρέπονται σε ανιόν υπεροξειδίου ( $\cdot O_2^-$ ). Ακόμη, η λειτουργία ενζύμων όπως οι οξειδάσες του NADPH, η eNOS, η οξειδάση της ξανθίνης, η κυκλοοξυγενάση, η λιποξυγενάση και το κυτόχρωμα P450 οδηγεί επίσης στην παραγωγή  $\cdot O_2^-$ . Το ανιόν υπεροξειδίου καθαίρεται από τις υπεροξειδικές δισμουτάσες (SODs), ένζυμα που καταλύουν τη μετατροπή του σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), μια λιγότερο δραστική ελεύθερη ρίζα. Στον άνθρωπο διακρίνονται τρεις μορφές του ενζύμου: η SOD1, με κυτταροπλασματική εντόπιση, η SOD2, που εδράζεται στα μιτοχόνδρια και η SOD3, που αφορά τον εξωκυττάριο χώρο. Οι SODs 1 και 3 χρησιμοποιούν ως συμπάροντες χαλκό και ψευδάργυρο (CuZnSOD), ενώ η SOD2 μαγγάνιο (MnSOD). Στη συνέχεια, άλλα ένζυμα (περοξειρεδοξίνες 3 και 5, καταλάση, γλουταθειονική υπεροξειδάση) αναλαμβάνουν τη μετατροπή του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$ . Αδυναμία έγκαιρης αποτοξίνωσης των ROS οδηγεί σε σχηματισμό πιο τοξικών ενώσεων, όπως το υπεροξεινιτρίδιο ( $ONOO^-$ ) από την αντίδραση μεταξύ υπεροξειδίου και μονοξειδίου του αζώτου, ή το υδροξύλιο ( $\cdot OH$ ) από τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

#### **1.1.4.5.3.Η υπεροξειδική δισμουτάση 2 (SOD2) και η ρύθμισή της**

Όπως προαναφέρθηκε, η SOD2 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, είναι υπεύθυνη για την απομάκρυνση των  $\cdot O_2^-$  που προκύπτουν κατά την κυτταρική αναπνοή και είναι απαραίτητη για την αερόβια ζωή [104]. Κωδικοποιείται από γονίδιο εδραζόμενο στο χρωμόσωμα 6q25.3, μήκους 10715bp, που περιλαμβάνει 5 εξώνια και 4 εσώνια. Ο υποκινητής του δεν περιέχει τα κλασικά πρότυπα TATA και CAAT, αλλά είναι πλούσιος σε «κουτιά» GC. Επιπλέον, στο εσώνιο 2 υπάρχει ένας ενισχυτής επίσης πλούσιος σε GC [105]. Από τη μεταγραφή του



γονιδίου προκύπτουν 2 μόρια mRNA, με το ίδιο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, αλλά με διαφορετικού μήκους 3' αμετάφραστη περιοχή, με μήκος 1500 και 4200bp αντίστοιχα, των οποίων η αναλογία διαφέρει αναλόγως της φάσης του κυτταρικού κύκλου και της έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία [106]. Η ρύθμιση της λαμβάνει χώρα σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο, ενώ εμπλέκονται και επιγενετικοί μηχανισμοί [105].

Στο επίπεδο της μεταγραφής, ποικιλία μεταγραφικών παραγόντων ευαίσθητων στο οξειδωτικό stress συνδέονται σε περιοχές του υποκινητή και του εσωνικού ενισχυτή του γονιδίου. Σε αυτούς ανήκουν ο NF-κB, ο Sp1 και ο Ap1, που προάγουν τη μεταγραφή, ενώ αντίθετα ο Ap2, όπως και η πρωτεΐνη p53, την καταστέλλουν, συνδεόμενοι ανταγωνιστικά προς τον Sp1 στις ίδιες ρυθμιστικές περιοχές [107,108]. Ο παράγοντας C/EBP συνδέεται στον ενισχυτή στο εσώνιο 2 και έχει ρόλο συν-ενεργοποιητή. Αντίθετα, ο Egr1 μειώνει τη βασική, αλλά όχι την επαγόμενη έκφραση του *SOD2*. Η νουκλεοφωσμίνη (NPM) είναι μια ριβονουκλεοπρωτεΐνη που με τη στερεοδομή της ολοκληρώνει την αλληλεπίδραση των NF-κB και Sp1 στον υποκινητή του *SOD2* και είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή του, αλλά μπορεί να λειτουργεί και κατασταλτικά σε υποκινητές άλλων γονιδίων [105]. Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο παίζουν οι παράγοντες FoxO3a, Nrf2 και PGC-1α. Ο FoxO3a προσδένεται στη θέση -1249 του υποκινητή, προάγοντας τη μεταγραφή του *SOD2*. Το πρότυπο φωσφορυλίωσης του FoxO3a, όπως καθορίζεται από τη δράση πολλών κινασών, ελέγχει τη δυνατότητά του να μετακινείται στον πυρήνα και να προσδένεται στο DNA, ή αντίθετα τον περιορίζει στο κυτταρόπλασμα ή προάγει την αποδόμησή του. Οι κινάσες Akt, ERK, JNK, IKKβ μειώνουν τη μεταγραφική ενεργότητα του FoxO3a, ενώ οι p38<sup>MAPK</sup>, AMPK, MK5, MST1 προάγουν τη δυνατότητά του να επιδρά στη μεταγραφή γονιδίων-στόχων [109]. Εξίσου σημαντική είναι η κατάσταση ακετυλίωσης του FoxO3a. Έχει δειχθεί ότι οι αποακετυλάσες σιρτουίνες προάγουν τη μεταγραφική του ενεργότητα απο-ακετυλιώνοντάς τον, πιθανώς όταν είναι συνδεδεμένος με τον PGC-1α [εδάφιο 1.1.4.5.4, 110], ενώ η SIRT3 προάγει την έκφραση της *SOD2* μέσω του FoxO3a [111]. Μάλιστα, η προσαρμογή των ενδοθηλιακών κυττάρων στο αυξημένο οξειδωτικό stress που παρατηρείται

κατά την υποξία λαμβάνει χώρα μέσω αυτής της οδού [112]. Ωστόσο, ο FoxO3 έχει συνδεθεί και με αυξημένο σχηματισμό μιτοχονδριακών ROS και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, ακόμη και με επαγωγή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σε νευρικά κύτταρα [113]. Ο Nrf2 (Nuclear factor2-Related transcription Factor 2), μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει-επάγει πολλά αντιοξειδωτικά συστήματα, προσδένεται στον υποκινητή του *SOD2* στα πειραματόζωα και αυξάνει την έκφραση της *SOD2* σε πολλές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, αν και η ακριβής θέση πρόσδεσής του στον υποκινητή /ενισχυτή του ανθρώπινου *SOD2* δεν έχει εντοπιστεί [105]. Ο PGC-1α αναλύεται στο εδάφιο 1.1.4.5.4.

Επιγενετικοί μηχανισμοί συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής του *SOD2*. Όπως φάνηκε αρχικά σε καρκινικά κύτταρα, η υπερμεθυλίωση καταλοίπων κυτοσίνης στον υποκινητή του γονιδίου οδηγεί σε καταστολή της έκφρασής του [105,114]. Η κατάσταση μεθυλίωσης συγκεκριμένων νησιδίων CpG μεταβάλλει την ικανότητα πρόσδεσης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, όπως έχειδειχθεί για τον Ar2 [105]. Αντίστοιχες μεταβολές στο επίπεδο μεθυλίωσης εμφανίζονται και στον ενισχυτή του *SOD2* στο εσώνιο 2 [115,116]. Σε υγιείς ανθρώπους, η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή και το επίπεδο έκφρασης του *SOD2* επηρεάζονται από τη διατροφή [117]. Η αποακετυλίωση των ιστονών επίσης μειώνει τη μεταγραφή του *SOD2*, ενώ και microRNAs αλληλεπιδρούν με το mRNA του *SOD2*.

Σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, έχειδειχθεί ότι η 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της *SOD2* περιέχει αλληλουχίες σύνδεσης με ρυθμιστικά RNA και πρωτεΐνες που επηρεάζουν τη σταθερότητά του και την αποτελεσματικότητα της μετάφρασής του. Ακόμη, το "μάτισμα" (splicing) του πρόδρομου mRNA, προκειμένου να μετατραπεί σε ώριμο, μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματική έκφραση πολλών γονιδίων, μεταξύ αυτών και του *SOD2*, όπως έχειδειχθεί σε σειρές καρκινικών κυτάρων [105]. Τέλος, όπως προαναφέρθηκε, από το *SOD2* παράγονται δυο μόρια mRNA, λόγω της ύπαρξης στο γονίδιο δυο πιθανών θέσεων πολυαδενυλίωσης. Τα μόρια αυτά διαφέρουν ως προς τη σταθερότητα και τη δυνατότητά τους να μεταφράζονται

και η κατά προτίμηση σύνθεση του ενός ή του άλλου φαίνεται πως συνιστά μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης της SOD2 [106].

Σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, η φωσφορυλίωση και η ακετυλίωση της SOD2 ρυθμίζουν τη δραστηριότητά της. Η φωσφορυλίωση φαίνεται πως μειώνει την καταλυτική ενεργότητα της SOD2, ενώ η εξαρτώμενη από το ασβέστιο αποφωσφορυλίωση ενεργοποιεί το ένζυμο [105]. Αντίστοιχα, η ακετυλιωμένη στο κατάλοιπο λυσίνης στη θέση 122 SOD2 εμφανίζει μικρότερη ενεργότητα από την αποακετυλιωμένη μορφή, ενώ και άλλα κατάλοιπα λυσίνης (θέσεις 53, 89) οδηγούν σε μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου αναλόγως της ακετυλίωσης τους [118]. Η αποακετυλάση σιρτουίνη 3 (SIRT3) ενεργοποιεί τη SOD2 καταλύοντας την αποακετυλίωση της λυσίνης 122 [118,119]. Τέλος, παρουσία οξειδωτικού stress, η νίτρωση της τυροσίνης 34 από τη ρίζα υπεροξεινιτριδίου αδρανοποιεί το ένζυμο [105].

#### **1.1.4.5.4.Ο PGC-1α και η σιρτουίνη-3**

Ο PGC-1α (PPAR Gamma Coactivator-1α) ανήκει στην οικογένεια συνενεργοποιητών PGC, μαζί με τους PGC-1β και PRC. Οι παράγοντες αυτοί προάγουν τη μεταγραφή γονιδίων αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες και διευκολύνοντας τη συναρμολόγηση του βασικού μεταγραφικού μηχανισμού, χωρίς να προσδένονται απευθείας στο DNA ή να ασκούν ενδογενώς δράση ακετυλ-τρανσφεράσης. Αποτελούν κύριους ρυθμιστές της μιτοχονδριακής βιογένεσης ανεξαρτήτως κυτταρικού/ιστικού τύπου, ενώ άλλες λειτουργίες τους παρουσιάζουν «ιστοειδικότητα», π.χ. προαγωγή θερμογένεσης στο φαιό λίπος, προαγωγή νεογλυκογένεσης από PGC-1α στο ήπαρ. Σε ότι αφορά τη βιογένεση των μιτοχονδρίων, ο PGC-1α σχετίζεται με την επαγωγή της υπό συνθήκες αυξημένων ενεργειακών αναγκών και προς τούτο ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια. Ο PGC-1β σχετίζεται με τη βασική μιτοχονδριακή βιογένεση και ο PRC με τη βιογένεση στα διαιρούμενα κύτταρα. Ωστόσο, όλο και περισσότερα στοιχεία συντείνουν στην εμπλοκή του PGC-1α στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού stress, μέσω της ευόδωσης της μεταγραφής πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων [120]. Το SOD2 ανήκει στα επαγόμενα από τον PGC-1α γονίδια [105]. Οι

Cherry et al. (2014) έδειξαν ότι ο PGC-1α αλληλεπιδρά με τον Nrf2 για να επάγει την έκφραση της SOD2 σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης σε ηπατοκύτταρα ποντικών υπό συνθήκες φλεγμονής-σήψης και ότι η ατελής δράση του σε ετερόζυγα πειραματόζωα οδήγησε σε αυξημένο οξειδωτικό stress [121]. Οι Zhang et al. (2011) έδειξαν ότι ο PGC-1α επάγει το SOD2 και άλλα γονίδια, μειώνει το οξειδωτικό stress στα ενδοθηλιακά κύτταρα και συμμετέχει στην αγγειογένεση [122], ενώ οι St-Pierre et al. (2006) έδειξαν ότι απουσία έκφρασης PGC-1α, τα νευρικά κύτταρα υφίστανται αυξημένο οξειδωτικό stress και η έκφραση του SOD2 και άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων καταστέλλεται [123]. Οι Wang et al. (2015) έδειξαν ότι ο PGC-1α οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του SOD2 σε κύτταρα PC12 [124], ενώ οι Lu et al. (2010) ανέδειξαν τη σημασία του για την έκφραση της SOD2 και άλλων μιτοχονδριακών αντιοξειδωτικών ενζύμων σε μυοκαρδιακά κύτταρα [125]. Ο PGC-1α αλληλεπιδρά με πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες, μεταξύ αυτών με τους Nrf1 και 2, PPAR $\gamma$ , ERR $\alpha$ , FoxO3a [110,126,127] και η επαγωγή από αυτόν των αντιοξειδωτικών ενζύμων εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή του με τον FoxO3a [128] και τον ERR $\alpha$  [127].

Η ρύθμιση του ίδιου του PGC-1α ως προς τη δραστηριότητά του γίνεται σε μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Και στα δυο επίπεδα, πρωταγωνιστικό ρόλο παίζει μια ομάδα αποακετυλασών της λυσίνης που ονομάζονται σιρτουίνες. Η οικογένεια των σιρτουινών περιλαμβάνει 7 μέλη (SIRT1-7), των οποίων η ενεργότητα εξαρτάται από τον ενδοκυττάριο λόγο NADH/NAD<sup>+</sup>, άρα από την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου: η συσσώρευση NAD<sup>+</sup> προάγει την ενεργοποίησή τους [129]. Με τη δράση τους, οι σιρτουίνες τροποποιούν την ενεργότητα ενζύμων ή άλλων πρωτεϊνών αλλά και τη γονιδιακή έκφραση, μέσω της άμεσης πρόσδεσής τους σε υποκινητές γονιδίων ή/και της αποακετυλίωσης των ιστονών. Έτσι, συντελούν στην προσαρμογή του κυττάρου σε συνθήκες ενεργειακής ένδειας, ενώ η δράση τους έχει συσχετισθεί με τη μακροζωία: ένας πολυμορφισμός του εσωνίου 5 του γονιδίου SIRT3 που αδρανοποιεί έναν ενισχυτή τροποποιεί το προσδόκιμο επιβίωσης [130]. Οι SIRT1 και SIRT3 εμπλέκονται άμεσα στη ρύθμιση του PGC-1α. Οι πρωτεΐνες αυτές αποακετυλιώνουν τον PGC-1α,

αυξάνοντας την ενεργότητα του, και προάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου του, αυξάνοντας το PGC-1α mRNA. Μάλιστα, στο επίπεδο της μεταγραφής, η SIRT1 προσδένεται άμεσα στον υποκινητή του *PPARGC1A*, του γονιδίου που κωδικοποιεί τον PGC-1α, ενεργοποιώντας τον [131]. Η SIRT3 είναι κατά βάση μιτοχονδριακή πρωτεΐνη και κύριος ρυθμιστής της μιτοχονδριακής λειτουργίας: αποακετυλιώνει τα συμπλέγματα I και III της αναπνευστικής αλυσίδας, την αφυδρογονάση του ισοκιτρικού και τη SOD2, προάγοντας την εύρυθμη λειτουργία του μηχανισμού αερόβιας αναπνοής, μειώνοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών και αυξάνοντας την απομάκρυνσή τους [129]. Έμμεση συνέπεια του μειωμένου επιπέδου ελευθέρων ριζών φαίνεται πως είναι η μειωμένη ενεργοποίηση του HIF-1 ως αποτέλεσμα της δράσης της SIRT3 [132,133]. Τέλος, τροποποιεί τη γονιδιακή έκφραση αποακετυλιώνοντας και ενεργοποιώντας την p53 [134] και τον PGC-1α [135] και αυξάνοντας την έκφραση του PGC-1α [124]. Είναι αξιοσημείωτο ότι το γονίδιο της ίδιας της SIRT3 αποτελεί μεταγραφικό στόχο του PGC-1α [124].

Άλλοι παράγοντες συμμετέχουν επίσης στη ρύθμιση της ποσότητας / ενεργότητας του PGC-1α. Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου επάγει τη μιτοχονδριακή βιογένεση μέσω της ενεργοποίησης πρωτεϊνικών κινασών όπως η PKC και η CaM κινάση. Τελικά, ενεργοποιείται η p38<sup>MAPK</sup>, που φωσφορυλιώνει τον PGC-1α στη σερίνη-265, τη θρεονίνη-262 και τη θρεονίνη-298, ενεργοποιώντας τον [136,137]. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α και IL-1 ενεργοποιούν τον PGC-1α μέσω της ίδιας οδού [136]. Η εξαρτώμενη από το AMP κινάση (AMPK) φωσφορυλιώνει τον PGC-1α στη σερίνη-538 και τη θρεονίνη-177 ενεργοποιώντας τον και προάγοντας τη μεταγραφική αυτο-επαγωγή του [138]. Πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργότητας του PGC-1α διαδραματίζει το μονοξειδίο του αζώτου (NO), που αυξάνει τόσο την έκφραση όσο και την ενεργότητα του PGC-1α στα μυϊκά κύτταρα. Η επαγωγή αυτή λαμβάνει χώρα μέσω της AMPK και του cGMP [139]. Μάλιστα, η AMPK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την eNOS, προάγοντας περαιτέρω την ενεργοποίηση του PGC-1α σε ένα κύκλο θετικής παλίνδρομης ρύθμισης [140]. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μικρής διάρκειας έκθεση στο NO μειώνει την έκφραση του PGC-1α, ενώ μεγαλύτερης διάρκειας

έκθεση την επάγει. Ακόμη, σε πειραματόζωα που δεν εκφράζουν την eNOS (-/-) η έκφραση του PGC-1α στα ενδοθηλιακά κύτταρα μειώνεται [141]. Τόσο ο παράγοντας FoxO3a, όσο και ο ίδιος ο PGC-1α, προάγουν τη μεταγραφή του τελευταίου και η εξαρτώμενη από το NO ενεργοποίηση της οδού cGMP/PI3k/Akt ρυθμίζει αρνητικά τη έκφραση του PGC-1α στα ενδοθηλιακά κύτταρα πιθανώς μέσω της φωσφορυλίωσης του FoxO3a [142]. Τέλος, στη μεταγραφή του PGC-1α συμμετέχει και ο παράγοντας ATF-2 [143], ενώ, όπως έδειξαν οι Pambianco et al. (2016) και οι Lochmann et al. (2015), επιγενετικοί μηχανισμοί και συγκεκριμένα η ακετυλίωση των ιστονών και η μεθυλίωση καταλοίπων κυτοσίνης σε ρυθμιστικές περιοχές του *PPARGC1A* εμπλέκονται άμεσα στη ρύθμιση της ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου [144,145].

#### **1.1.4.5.5. Το οξειδωτικό stress στους ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο**

Η ΔN χαρακτηρίζεται από αυξημένο οξειδωτικό stress [14,146,147,148]. Υπεύθυνοι γι' αυτό είναι πολλοί μηχανισμοί, με κυριότερους την HbS και τις ιδιότητές της, τη βλάβη από ισχαιμία-επαναιμάτωση και την ενδοαγγειακή αιμόλυση.

##### **1.1.4.5.5.1. Το δρεπανοκύτταρο ως πηγή οξειδωτικού stress**

Η πρόσληψη μοριακού οξυγόνου από τη δεοξυαιμοσφαιρίνη συνοδεύεται από τον κίνδυνο σχηματισμού υπεροξειδίου και μεθαιμοσφαιρίνης, μέσω μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου από το δισθενή σίδηρο της αίμης στο οξυγόνο. Η αντίδραση αυτή αφορά τόσο την HbS, όσο και τη φυσιολογική HbA, ωστόσο, στην πρώτη, η αντίδραση είναι 1,7 φορές ταχύτερη, και ο κορεσμός από το παραγόμενο υπεροξείδιο (και υπεροξείδιο του υδρογόνου στη συνέχεια) ευκολότερος [146]. Ακολούθως, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, που προκύπτει ενζυμικά ή μη από το υπεροξείδιο, αντιδρά με την οξυαιμοσφαιρίνη και τη μεθαιμοσφαιρίνη, παράγοντας φερυλ-αιμοσφαιρίνη και οξυφερυλ-αιμοσφαιρίνη αντίστοιχα, που περιέχουν τετρασθενή σίδηρο. Οι δυο τελευταίες μορφές αντιδρούν με υπεροξείδιο του υδρογόνου προς σχηματισμό μεθαιμοσφαιρίνης, ενώ στην περίπτωση της φερυλ-αιμοσφαιρίνης

σχηματίζεται και υπεροξειδίο. Η μεθαιμοσφαιρίνη χαρακτηρίζεται από μειωμένη συγγένεια αίμης-σφαιρίνης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της αίμης. Η αίμη, υπό την επίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου η υπεροξειδίου, διασπάται και απελευθερώνει σίδηρο. Ο τελευταίος συμμετέχει σε αντιδράσεις Fenton, που οδηγούν σε σχηματισμό ριζών υδροξυλίου από υπεροξειδίο του υδρογόνου. Τέλος, τα ερυθρά αιμοσφαίρια πασχόντων από ΔΝ εμφανίζουν αυξημένη ενεργότητα της οξειδάσης του NADPH, που επίσης οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου [149]. Συνολικά, τα ερυθρά αιμοσφαίρια με HbS παράγουν διπλάσια ποσότητα ριζών υπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου και υδροξυλίου σε σχέση με τα φυσιολογικά [150]. Παράλληλα, η ικανότητά τους να αντιμετωπίζουν το οξειδωτικό stress είναι μειωμένη, αφού παρουσιάζουν μειωμένη ενεργότητα SOD, πιθανότατα λόγω της οξειδωτικής καταστροφής του ενζύμου [151] και μειωμένη γλουταθειονική υπεροξειδάση και γλουταθειόνη [152,153]. Το οξειδωτικό stress καταστρέφει τη μεμβράνη και τις πρωτεΐνες των ερυθρών, προάγοντας την αιμόλυση.

#### **1.1.4.5.5.2. Η ενδοαγγειακή αιμόλυση και οι συνέπειές της**

Ένα από τα σημαντικότερα στοιχεία της παθοφυσιολογίας της ΔΝ είναι η ενδοαγγειακή καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η συνοδός απελευθέρωση των συστατικών τους στην κυκλοφορία του αίματος, που αφορά μέχρι και το 1/3 της συνολικά παρατηρούμενης αιμόλυσης. Από τη λύση των ερυθρών απελευθερώνονται μεταξύ άλλων οξυ και δεοξυ-αιμοσφαιρίνη S (και άλλες μορφές, αναλόγως β-γονοτύπου ασθενούς), αίμη, σίδηρος, αργινάση.

Η δεοξυαιμοσφαιρίνη είναι ευπαθής στην οξείδωση από υπεροξειδία, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Κατά την αντίδραση αυτή, ο σίδηρος παροδικά μετατρέπεται στην τετρασθενή μορφή, όπως περιγράφηκε παραπάνω, με τελικό αποτέλεσμα την οξείδωση του μορίου της σφαιρίνης. Αυτή τείνει να μεταφέρεται εκλεκτικά μέσω διαδοχικών αντιδράσεων σε ορισμένα ευπαθή αμινοξικά κατάλοιπα, όπως η κυστεΐνη 93 στη β-αλυσίδα και η τυροσίνη 42 στην α (ενδογενής οξείδωση), ή μπορεί να οξειδώσει παρακείμενα μόρια, όπως λιπίδια (εξωγενής οξείδωση)[154]. Η δημιουργία προϊόντων ενδογενούς

οξειδωσης έχει επαληθευθεί πειραματικά για την HbS [155]. Τέτοιες αντιδράσεις ευνοούνται σε συνθήκες οξειδωτικού περιβάλλοντος, όπως αυτό των ιστών, ιδιαίτερα υπό συνθήκες υποξίας. Φυσιολογικά, το πλούσιο σε αντιοξειδωτικά μόρια πλάσμα τις αναστέλλει, όπως και η σύνδεση της εξωκυττάριας αιμοσφαιρίνης με τη συντιθέμενη στο ήπαρ δεσμευτική πρωτεΐνη οξείας φάσης απποσφαιρίνη. Ωστόσο, στους πάσχοντες από ΔN η απποσφαιρίνη κορέννυται από τη συνεχή ενδοαγγειακή αιμόλυση και τα αντιοξειδωτικά μόρια του πλάσματος είναι μειωμένα, πιθανώς λόγω συνεχούς κατανάλωσης. Τελικά, η αιμοσφαιρίνη διασπάται τόσο στο εσωτερικό των δρεπανοκυττάρων όσο και εξωκυττάρια, μετά τη λύση τους, με απελευθέρωση αίμης και σιδήρου και συνεχή παραγωγή-κατανάλωση ελευθέρων ριζών. Ακόμη, τόσο η οξυ- όσο και η δεοξυ-αιμοσφαιρίνη αντιδρούν με το NO, συμβάλλοντας στη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του. Η πρώτη αντίδραση οδηγεί στο σχηματισμό νιτρικού ανιόντος, ενώ η δεύτερη σε σύμπλεγμα δισθενούς σιδήρου-NO-δεοξυαιμοσφαιρίνης, που μπορεί να συμμετάσχει σε αντίδραση Fenton προς σχηματισμό υδροξυλίου.

Η απελευθερούμενη στην κυκλοφορία του αίματος αίμη, σε αντίθεση με την πρωτεΐνη αιμοσφαιρίνη, είναι μια μη πολική, εξαιρετικά υδρόφοβη σιδηροπορφυρίνη, που μπορεί να διέρχεται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης και να προκαλεί οξειδωση των λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών της μεμβράνης, άλλων ενδοκυττάρων πρωτεϊνών και του DNA σε κύτταρα που δεν παράγουν αιμοσφαιρίνη. Η σύνδεσή της με την LDL λιποπρωτεΐνη προκαλεί την οξειδωση της τελευταίας [14]. Όπως αναφέρθηκε, η διάσπαση της αίμης οδηγεί στην απελευθέρωση σιδήρου, που με τη σειρά του συμμετέχει σε αντιδράσεις σχηματισμού υδροξυλίου. Το τελευταίο είναι ιδιαίτερα επικίνδυνο, γιατί, πέραν της δραστηριότητάς του, δεν υπάρχει ενζυμικό σύστημα που να το αποδομεί [14]. Αντιδράσεις Fenton καταλύονται και από το σίδηρο εντός του μορίου της αίμης. Η αίμη όμως αυξάνει το οξειδωτικό stress και με πιο έμμεσους και λιγότερο κατανοητούς τρόπους. Συνδέεται με τον υποδοχέα TLR-4 των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενεργοποιώντας τον παράγοντα NF-kB και επάγοντας την έκφραση μορίων προσκόλλησης, ενώ παράλληλα η ενεργοποίηση της οξειδάσης του NADPH



από την πρωτεϊνική κινάση C οδηγεί σε παραγωγή ελευθέρων ριζών και επακόλουθη εξωκύττωση των κοκκίων Weibel-Palade [54]. Στα μακροφάγα, η αίμη αναγνωρίζεται και επάγει τη συναρμολόγηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος και την επακόλουθη παραγωγή IL-1β. Στο μηχανισμό ενεργοποίησης εμπλέκεται η οξειδάση του NADPH 2 (NOX2) και η παραγωγή ελευθέρων ριζών από αυτή, και ακολούθως η παραγωγή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια. Ακόμη, εμπλέκεται η φωσφορυλίωση της κινάσης Syk και η εκροή καλίου από το κύτταρο, ενώ ο σίδηρος, η πρωτοπορφυρίνη IX, η οξυγενάση της αίμης, η καθεψίνη, το ATP και ο υποδοχέας του P2X7 δε φαίνεται να σχετίζονται [156]. Από τα παραπάνω συνάγεται ότι η παραγωγή ελευθέρων ριζών από την αίμη όχι μόνο καταστρέφει πρωτεΐνες, λιπίδια και γενετικό υλικό, αλλά συμμετέχει καθοριστικά στην αγγειακή απόφραξη και τη φλεγμονή της ΔΝ. Φυσιολογικά, η δεσμευτική πρωτεΐνη αιμοπηξίνη παραλαμβάνει την αίμη από άλλες πρωτεΐνες-φορείς με μικρότερη συγγένεια, όπως η αλβουμίνη, αποτρέποντας τις τοξικές δράσεις της και οδηγώντας στην πρόσληψή της από τα ηπατοκύτταρα [154]. Όμως και αυτός ο αμυντικός μηχανισμός κορεννύεται στους πάσχοντες από ΔΝ.

Τέλος, η απελευθερούμενη αργινάση, πέρα από το ότι αποτελεί πολύ καλό δείκτη ενδοαγγειακής αιμόλυσης, καταλύει τη διάσπαση της αργινίνης σε ορνιθίνη. Όμως, η αργινίνη αποτελεί υπόστρωμα της eNOS και η μείωση της διαθέσιμης αργινίνης προκαλεί αποσύζευξη ('uncoupling') της eNOS, με αποτέλεσμα την παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου αντί NO και την αύξηση του οξειδωτικού stress. Στο ίδιο αποτέλεσμα οδηγεί και η εξάντληση της τετραϋδροβιοπτερίνης (BH<sub>4</sub>), που αποτελεί συμπ παράγοντα στην αντίδραση σχηματισμού NO. Αυτή προκαλείται από την καταστροφική επίδραση του υπεροξεινιτριδίου, της ρίζας που προκύπτει από την αντίδραση υπεροξειδίου και NO.

#### **1.1.4.5.5.3. Η ισχαιμία και η βλάβη από επαναιμάτωση**

Κατά τη φάση της ισχαιμίας, όπως συμβαίνει π.χ. κατά την αγγειακή απόφραξη σε μια επώδυνη κρίση ΔΝ, η ανεπάρκεια O<sub>2</sub> οδηγεί σε δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα αυξημένη

παραγωγή υπεροξειδίου. Στη φάση αυτή, η ενεργειακή ανεπάρκεια οδηγεί στον υπερκαταβολισμό του ATP, που οδηγεί τελικά στο σχηματισμό υποξανθίνης και ξανθίνης. Τα μόρια αυτά αποτελούν υπόστρωμα του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης, που τα μετατρέπει σε ουρικό οξύ. Κατά την αντίδραση αυτή, που απαιτεί  $O_2$  για να πραγματοποιηθεί, παράγεται ανιόν υπεροξειδίου και NADPH. Όσο ένας ιστός ισχαιμεί, η πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι αδύνατη. Κατά την επαναιμάτωση ωστόσο, η ύπαρξη διαθέσιμου  $O_2$  επιτρέπει την πραγματοποίησή της και το παραγόμενο υπεροξείδιο ευθύνεται για την αρχική φάση της λεγόμενης βλάβης από επαναιμάτωση. Μάλιστα, η επαγωγή της οξειδάσης της ξανθίνης από προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που υπερπαράγονται σε ασθενείς με ΔN οδηγεί σε μεγιστοποίηση της βλάβης από επαναιμάτωση. Στο ίδιο αποτέλεσμα συντείνουν η παρουσία ελεύθερου σιδήρου, η λευκοκυττάρωση και τα πολλαπλά υποτροπιάζοντα επεισόδια ισχαιμίας, χαρακτηριστικά γνωρίσματα της ΔN [148]. Αντίθετα, η όψιμη φάση της βλάβης από επαναιμάτωση τελείται από την οξειδάση του NADPH, ένζυμο παρόν σε αφθονία στα φλεγμονώδη κύτταρα αλλά και στο ενδοθήλιο και επαγόμενο από επεισόδια ισχαιμίας-επαναιμάτωσης [14,148].

#### **1.1.4.6. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και η δρεπανοκυτταρική νόσος**

Όπως προαναφέρθηκε, το NO έχει αγγειοδιασταλτικές, αντιθρομβωτικές, αγγειογενετικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Στη ΔN, η βιοδιαθεσιμότητα του μειώνεται, λόγω μειωμένης παραγωγής και αυξημένης κατανάλωσης. Υπεύθυνοι για τα φαινόμενα αυτά είναι οι εξής μηχανισμοί: α) η κατανάλωση της αργινίνης από την απελευθερούμενη από τα ερυθρά αιμοσφαίρια αργινάση, β) η εξάντληση της τετραϋδροβιοπτερίνης από την αντίδρασή της με υπεροξεινιτρίδιο, γ) η αποσύζευξη της eNOS με παραγωγή υπεροξειδίου αντί NO συνεπεία των παραπάνω, δ) τα αυξημένα επίπεδα του αναστολέα της eNOS ADMA (Asymmetric Di-Methyl-Arginine) [157], ε) η αντίδραση του NO με το υπεροξείδιο προς σχηματισμό υπεροξεινιτρίδιου και κυρίως στ) η αντίδραση του NO με την οξυ- και τη δεοξυ-αιμοσφαιρίνη. Αποτέλεσμα της μείωσης του NO είναι η αυξημένη αγγειοσύσπαση λόγω αυξημένης σύνθεσης ενδοθηλίνης 1 και του υποδοχέα της, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, η

επίταση της φλεγμονώδους διαδικασίας και της ισχαιμίας και τελικά η εμφάνιση επιπλοκών όπως η πνευμονική υπέρταση. Χαρακτηριστικά, η ΔΝ περιγράφεται ως μια κατάσταση ανεπάρκειας NO και αντίστασης στην εξωγενή χορήγηση NO [158].

#### **1.1.4.7. Το φυλλικό οξύ και η δρεπανοκυτταρική νόσος**

##### **1.1.4.7.1. Το φυλλικό οξύ, ο μεταβολισμός του και ο ρόλος της MTHFR**

Το φυλλικό οξύ ανήκει στις βιταμίνες του συμπλέγματος Β. Προσλαμβάνεται με την τροφή (κυρίως πράσινα λαχανικά) και η περίσσεια απεκκρίνεται μέσω των κοπράνων και των ούρων. Λειτουργεί ως συνένζυμο σε αντιδράσεις μεταφοράς χημικών ομάδων με ένα άτομο άνθρακα (“one carbon metabolism”). Τέτοιες αντιδράσεις είναι απαραίτητες για τη σύνθεση των πουρινών και των πυριμιδινών, των βάσεων που συνθέτουν το DNA και το RNA, όπως και για τη μεθυλίωση του DNA και των πρωτεϊνών. Αρχικά, το φυλλικό οξύ μετατρέπεται σε τετραϋδροφυλλικό οξύ (THF) σε δύο βήματα, με τη δράση της αναγωγάσης του διϋδροφυλλικού (DHFR). Το πρώτο βήμα (μετατροπή φυλλικού σε διϋδροφυλλικό -DHF) καθορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης. Στη συνέχεια, το ένζυμο υδροξυμεθυλτρανσφεράση της σερίνης (SHMT), χρησιμοποιώντας φωσφορική πυριδοξάλη (βιταμίνη Β6) ως συνένζυμο, μεταφέρει μια μεθυλενομάδα από ένα μόριο σερίνης σε ένα μόριο THF, μετατρέποντας την πρώτη σε γλυκίνη και το δεύτερο σε 5,10μεθυλενοTHF. Το μόριο αυτό μπορεί στη συνέχεια να κατευθυνθεί α) προς τη σύνθεση μονοφωσφορικής θυμιδίνης (dTMP) από μονοφωσφορική ουρακίλη (dUMP) μέσω του ενζύμου συνθετάση της θυμιδίνης (TS), β) προς τη σύνθεση πουρινών, μέσω της αυθόρμητης μετατροπής σε 10φορμυλTHF ή τέλος γ) προς τη σύνθεση δοτών μεθυλομάδων από το ένζυμο αναγωγάση του μεθυλενοTHF (MTHFR). Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί FAD ως συμπράγοντα και μετατρέπει το 5,10μεθυλενοTHF σε 5μεθυλTHF, δεσμεύοντας μη αντιστρεπτά το υπόστρωμά του προς τη συγκεκριμένη μεταβολική οδό, ενώ η S-αδενοσυλομεθειονίνη-SAM αναστέλλει τη δράση του. Στη συνέχεια, η συνθετάση της μεθειονίνης (MS) μετατρέπει την ομοκυστεΐνη σε μεθειονίνη με μεταφορά μεθυλομάδας από το 5μεθυλTHF και

χρησιμοποιώντας κοβαλαμίνη (βιταμίνη B12) ως συμπαράγοντα. Το THF είναι έτσι διαθέσιμο να επαναχρησιμοποιηθεί από την SHMT, ενώ η μεθειονίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην πρωτεϊνσύνθεση ή ως δότης μεθυλομάδων για τη μεθυλίωση του DNA και των πρωτεϊνών, μετά τη μετατροπή της σε S-αδενοσυλομεθειονίνη-SAM [159,160]. Η SAM ρυθμίζει ανασταλτικά τη δράση του MTHFR. Εκτός της δράσης της MS, η ομοκυστεΐνη μπορεί να μεταβολιστεί από τα ένζυμα β-συνθάση της κυσταθειονίνης και κυσταθειονάση, σε μια οδό που χρησιμοποιεί βιταμίνη B6 ως συνένζυμο. Όπως γίνεται κατανοητό, η MTHFR είναι το ένζυμο του οποίου η δράση κατευθύνει το φυλλικό οξύ είτε προς την αναγέννηση της μεθειονίνης-μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης είτε προς τη σύνθεση πουρινών και πυριμιδινών. Κάθε παράγοντας που μπορεί να μεταβάλει την ενεργότητα του επηρεάζει ολόκληρη την ισορροπία του κύκλου του φυλλικού οξέος.

#### **1.1.4.7.2. Το γονίδιο της MTHFR και οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) C677T και A1298C**

##### **1.1.4.7.2.1. Το γονίδιο της MTHFR**

Η MTHFR κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 1p36 και έχει μήκος 2,2kb, ενώ περιλαμβάνει 13 εξώνια και 12 εσώνια. Το πρόδρομο mRNA υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα, με αποτέλεσμα να προκύπτουν δυο εναλλακτικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μια 77kdaltons (συνήθης μορφή) και μια μικρότερη, 70kdaltons σε κάποιους ιστούς, ενώ η φυσιολογικά η τελική πρωτεΐνη είναι διμερής. Μέχρι στιγμής, έχουν περιγραφεί 13 σημειακές μεταλλάξεις και μια διαγραφή, που οδηγούν σε μεγάλη μείωση της ενεργότητας του ενζύμου και είναι σπάνιες [161]. Αντίθετα, δυο αντικαταστάσεις βάσεων στις θέσεις 677 και 1298 του γονιδίου είναι συχνές και επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του ενζύμου.

##### **1.1.4.7.2.2. Ο πολυμορφισμός C677T, rs1801133**

Η αντικατάσταση της κυτοσίνης από θυμίνη στη θέση +677 (C677T, rs1801133) στο εξώνιο 4 του γονιδίου οδηγεί στην αλλαγή της αλανίνης σε βαλίνη στη θέση 222 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας [162,163]. Η αλλαγή αυτή

οδηγεί σε μείωση της καταλυτικής ενεργότητας του ενζύμου και αστάθεια του σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 37°C, και η αντίστοιχη μορφή του ενζύμου καλείται θερμοασταθής. Κύτταρα ομόζυγα για τον πολυμορφισμό εμφανίζουν 50-60% μειωμένη ενζυμική ενεργότητα στους 37°C, ενώ στους 46°C η μείωση φθάνει το 65% [164,165]. Ο πολυμορφισμός αυτός φαίνεται ότι συνδέεται με υπερομοκυστεϊναιμία με συνεπικρατή τρόπο: οι ετεροζυγώτες εμφανίζουν μικρή μόνο αύξηση των επιπέδων ομοκυστεϊνης στο αίμα σε σχέση με τους ομοζυγώτες υγιείς [165]. Η εμφάνιση υπερομοκυστεϊναιμίας στους φέροντες τον πολυμορφισμό εξαρτάται από τα επίπεδα φυλλικού οξέος, ενώ μια μελέτη συνέδεσε το γονότυπο 677TT με μειωμένα επίπεδα βιταμίνης B12 [161,166]. Η αύξηση της ομοκυστεϊνης στο αίμα έχει συνδεθεί με επιρρέπεια σε αρτηριακές και φλεβικές θρομβώσεις και αρτηριακή υπέρταση, ενώ τα επίπεδα λιπιδίων δε φαίνεται να επηρεάζονται. Πέραν όμως της υπερομοκυστεϊναιμίας, φαίνεται ότι η μείωση της διαθέσιμης μεθειονίνης και SAM στους φέροντες το T αλληλόμορφο σχετίζεται με τη μειωμένη μεθυλίωση των κυτοσινών στα CpG νησίδια του DNA [167], με ότι αυτό συνεπάγεται για τη γονιδιακή έκφραση. Σε κάθε περίπτωση, ο πολυμορφισμός αυτός έχει συσχετισθεί με την καρδιαγγειακή νόσο (στεφανιαία νόσος, αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, περιφερική αγγειακή νόσος), με διαταραχές της ανάπτυξης του νευρικού σωλήνα, με ψυχιατρικά νοσήματα (σχιζοφρένεια, διπολική διαταραχή, κατάθλιψη), με την ψωρίαση και με πολλές κακοήθειες νόσους [161,168]. Σε ότι αφορά τη δρεπανοκυτταρική νόσο, παρόλο που ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει μελετηθεί σε αρκετούς πληθυσμούς, τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και δεν οδηγούν σε σαφές συμπέρασμα.

#### **1.1.4.7.2.3.Ο πολυμορφισμός A1298C, rs1801131**

Η αντικατάσταση της αδενίνης από κυτοσίνη στη θέση +1298 του *MTHFR* (rs1801131, A1298C) στο έβδομο εξώνιο του γονιδίου οδηγεί στην αλλαγή από γλουταμικό οξύ σε αλανίνη στη θέση 428 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η αλλαγή αυτή αφορά την περιοχή της πρωτεΐνης κοντά στη θέση πρόσδεσης της SAM και, όταν συνδυάζεται με τον πολυμορφισμό C677T οδηγεί σε αύξηση της ομοκυστεϊνης. Θεωρείται ότι η μείωση της δραστηριότητας του

ενζύμου που προκαλεί είναι μικρότερη αυτής του C677T, έτσι ώστε οι ομοζυγώτες για τον A1298C να εμφανίζουν περίπου την ίδια δραστικότητα MTHFR με τους ετεροζυγώτες για τον C677T [169].

#### **1.1.4.7.3. Το φυλλικό οξύ στη δρεπανοκυτταρική νόσο**

Η χρόνια αιμόλυση που χαρακτηρίζει τη δρεπανοκυτταρική νόσο αντιρροπείται από την αυξημένη δραστηριότητα των προγονικών μορφών της ερυθράς σειράς του μυελού των οστών. Ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός που χαρακτηρίζει τα κύτταρα αυτά και οι αυξημένες ως εκ τούτου ανάγκες σύνθεσης DNA και RNA οδηγούν σε αύξηση των αναγκών των ασθενών σε φυλλικό οξύ. Δεν εκπλήσσει η παρατήρηση ότι οι πάσχοντες από δρεπανοκυτταρική νόσο εμφανίζουν λειτουργική ανεπάρκεια φυλλικού οξέος ακόμη και σε συγκεντρώσεις του συμπαραγόντα που θεωρούνται φυσιολογικές κατ' απόλυτη τιμή για τους μη πάσχοντες. Παράλληλα, η αυξημένη κατανάλωση φυλλικού για την αιμοποίηση προκαλεί ανεπάρκεια του διαθέσιμου φυλλικού για τη μεταφορά μεθυλομάδων, προδιαθέτοντας τους ασθενείς σε υπερομοκυστεϊναιμία.

#### **1.1.5. Γενετικοί υπότυποι της νόσου**

Η κλασική μορφή της νόσου αφορά πάσχοντες ομόζυγους για το  $\beta^S$  γονίδιο, ονομάζεται δρεπανοκυτταρική αναιμία και γενικά έχει τη βαρύτερη κλινική εικόνα. Στις χώρες της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής είναι συχνή η διπλή ετεροζυγωτία για δρεπανοκυτταρική αναιμία και  $\beta$ -θαλασσαιμία, που αποκαλείται και μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία, λόγω της υποχρωμίας και μικροκυττάρωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων εξαιτίας της μειωμένης σύνθεσης αιμοσφαιρίνης. Η κλινική βαρύτητα μεταξύ των πασχόντων από αυτή τη μορφή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ποσό της συντιθέμενης αιμοσφαιρίνης A από το θαλασσαιμικό γονίδιο. Έτσι, πάσχοντες με γονότυπο  $\beta^0/\beta^S$  εμφανίζουν παρόμοια βαρύτητα με τους ομόζυγους για το  $\beta^S$  γονίδιο, ενώ οι  $\beta^+/\beta^S$  ασθενείς εμφανίζουν πολύ ηπιότερη εικόνα. Επίσης ηπιότερη εικόνα παρουσιάζουν ασθενείς με διπλή ετεροζυγωτία για το  $\beta^S$  και άλλες μεταλλάξεις του  $\beta$ -γονιδίου που οδηγούν σε παθολογικές αιμοσφαιρίνες, π.χ.

αιμοσφαιρίνη C, αιμοσφαιρίνη Lepore κλπ, όπως και οι ασθενείς που φέρουν με έλλειψη δβ στο δεύτερο αλληλόμορφο του β-γονιδίου που οδηγεί σε αυξημένη σύνθεση εμβρυικής αιμοσφαιρίνης F. Η συνύπαρξη α-θαλασσαιμίας οδηγεί σε υποχρωμία και μικροκυττάρωση, αλλά αυξάνει τον αιματοκρίτη, λόγω μικρότερης αιμόλυσης [10], ενώ η συνύπαρξη κληρονομικής παραμονής αιμοσφαιρίνης F βελτιώνει την κλινική εικόνα.

#### **1.1.6.Κλινική εικόνα- Επιπλοκές**

Η κλινική εικόνα της νόσου χαρακτηρίζεται από τα συμπτώματα αγγειακής απόφραξης σε διάφορα όργανα/ιστούς και από τις χρόνιες επιπλοκές της αναιμίας, της αιμόλυσης και της ιστικής ισχαιμίας. Τα επεισόδια οξέος πόνου είναι υποτροπιάζοντα, εμφανίζονται σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος, συχνότερα στα οστά και ξεκινούν από την παιδική ηλικία, κατά την οποία συχνά εμφανίζονται στα χέρια/πόδια με τη μορφή της “δακτυλίτιδας”, δηλαδή με συνοδό οίδημα-ευαισθησία. Μπορεί να έχουν σαφή εκλυτικό παράγοντα (σωματική κόπωση, έκθεση στο ψύχος, αφυδάτωση, έκθεση σε μειωμένο διαθέσιμο οξυγόνο-υψόμετρο κ.λπ., λοίμωξη, έμμηνο ρύση, ψυχικό stress) ή να εμφανίζονται απρόκλητα. Ο πόνος μπορεί να προσλάβει χαρακτήρα χρονιότητας, εμμένοντας μεταξύ διαδοχικών κρίσεων, και να γίνει ιδιαίτερα βασανιστικός και δυσίατος. Ήδη από αυτή την ηλικία μπορεί να εμφανιστεί οξύ θωρακικό σύνδρομο (συνδυασμός πυρετού, βήχα/απόχρεμψης, θωρακικού άλγους, ταχύπνοιας, αναπνευστικής δυσχέρειας/υποξαιμίας, νέων διηθημάτων στην απεικόνιση του θώρακα), επιπλοκή που εμφανίζεται σπανιότερα αλλά είναι σοβαρότερη στους ενήλικες ασθενείς. Η κατοχύρωση επιμέρους διαγνώσεων (λοίμωξη αναπνευστικού, πνευμονική εμβολή, λιπώδης εμβολή) σπάνια είναι εφικτή. Άλλη εκδήλωση είναι το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, συνηθέστερα ισχαιμικό, λόγω απόφραξης μεγάλων αγγείων του εγκεφάλου, ήδη από την παιδική ηλικία. Συχνότερα όμως είναι τα σιωπηλά έμφρακτα, όπως και οι διαταραχές των γνωστικών λειτουργιών ή οι διαταραχές από την ψυχική σφαίρα, που επιτείνονται με την πάροδο του χρόνου και αποδίδονται σε ισχαιμία του κεντρικού νευρικού συστήματος. Παράλληλα, γενικά συμπτώματα όπως αδυναμία, εύκολη κόπωση,

καθυστέρηση ανάπτυξης, μικρό ύψος-βάρος για την ηλικία είναι συνήθη. Αιφνίδια επιδείνωση της χρόνιας αναιμίας μπορεί να οφείλεται σε παρόξυνση της αιμόλυσης (αιμολυτική κρίση), απλασία της ερυθράς σειράς στο μυελό των οστών λόγω λοίμωξης από τον ιό ραίνο Β19 (απλαστική κρίση) ή οξύ έμφρακτο σπληνός (σπληνικός εγκλωβισμός), οπότε συνοδεύεται από άλγος στο αριστερό υποχόνδριο. Ο σπλήνας συνήθως υπολειτουργεί και τελικά ρικνώνεται από υποτροπιάζοντα έμφρακτα, με τελικό αποτέλεσμα την ασπληνία και τη συνοδό επιρρέπεια σε λοιμώξεις από μικρόβια που περιβάλλονται από κάψα (πνευμονιόκοκκος, αιμόφιλος της γρίπης, μηνιγγιτιδόκοκκος, γονόκοκκος, σαλμονέλα-ειδικά οστεομυελίτιδες). Ωστόσο, η ρίκνωση του σπλήνα από έμφρακτα επέρχεται σε διαφορετικό χρόνο στους πάσχοντες από ομόζυγο δρεπανοκυτταρική νόσο σε σχέση με διπλούς ετεροζυγώτες για δρεπανοκυτταρική νόσο/β-θαλασσαιμία ή άλλες μορφές της νόσου, με αποτέλεσμα η τελευταία ομάδα ασθενών να διατηρεί σπληνική λειτουργία και κλινικά μεγαλοσπληνία κατά την ενήλικη ζωή και να είναι επιρρεπής στην εμφάνιση εμφράκτων/εγκλωβισμού στο σπλήνα και στην ενηλικίωση. Παράλληλα, η χρόνια αιμόλυση-υπερχοληρυθριναιμία προδιαθέτει σε χολολιθίαση, ειδικά όταν συνυπάρχει σύνδρομο Gilbert, που αυξάνει ανεξάρτητα την τιμή της έμμεσης χοληρυθρίνης. Άλλες επιπλοκές από το ήπαρ και τα χοληφόρα είναι ο ηπατικός εγκλωβισμός, οι ιογενείς ηπατίτιδες Β και C ως αποτέλεσμα μεταγγίσεων προ της καθιέρωσης του ελέγχου του αίματος για τους παράγοντες αυτούς, η αιμοσιδήρωση λόγω μεταγγίσεων (σπάνια) η κίρρωση και η χολόσταση. Με την πάροδο του χρόνου, γίνεται συχνότερη η άσηπτη νέκρωση οστών, όπως η κεφαλή του μηριαίου και του βραχιονίου, που εκδηλώνεται με χρόνια πόνο των αντίστοιχων αρθρώσεων και σταδιακά οδηγεί στην καταστροφή τους. Συχνή είναι επίσης η οστεοπόρωση. Η χρόνια ισχαιμία των νεφρών, ιδιαίτερα της μυελώδους μοίρας, οδηγεί σε αδυναμία συμπύκνωσης των ούρων (ισοσθενουρία), νεφρογενή άπιο διαβήτη (υποσθενουρία), άπω νεφροσωληναριακή οξέωση, νέκρωση θηλών, αιματουρία και τελικά χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Από τους πνεύμονες, πλην του οξέος θωρακικού συνδρόμου, μπορεί να προκύψουν διαταραχές του αερισμού τόσο αποφρακτικού, όσο και περιοριστικού τύπου.



Η χρόνια ισχαιμία του αμφιβληστροειδούς οδηγεί σε νεοαγγείωση, με συνέπεια την εμφάνιση παραγωγικής αμφιβληστροειδοπάθειας (συχνότερη σε ασθενείς με αιμοσφαιρινοπάθεια SC) με πιθανές επιπλοκές την αιμορραγία υαλοειδούς, την αποκόλληση αμφιβληστροειδούς και τελικά την απώλεια όρασης. Έχει δειχθεί ότι η χρόνια αιμόλυση μπορεί να οδηγήσει σε συγκεκριμένες επιπλοκές που ορίζουν ένα συγκεκριμένο φαινότυπο της νόσου όπως πριαπισμό στους άνδρες, δυσίατα άτονα έλκη στις κνήμες, ενδεχομένως εγκεφαλικά επεισόδια και πνευμονική υπέρταση. Η τελευταία θεωρείται ιδιαίτερα συχνή (30% των πασχόντων από ομόζυγη δρεπανοκυτταρική νόσο) και σχετίζεται με αυξημένη θνητότητα. Το διαθωρακικό υπερηχοκαρδιογράφημα αποτελεί την αρχική και τη συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη διαγνωστική μέθοδο για την πνευμονική υπέρταση στους πάσχοντες από ΔΝ τόσο σε κλινικό, όσο και σε ερευνητικό επίπεδο. Με βάση τα ευρήματα των αντίστοιχων μελετών, η πνευμονική υπέρταση ορίζεται με υπερηχοκαρδιογραφικά κριτήρια ως συστολική πίεση πνευμονικής αρτηρίας (PASP) μεγαλύτερη από 30mmHg ή ταχύτητα παλίνδρομης ροής διαμέσου της τριγλώχινας βαλβίδας (TRV) μεγαλύτερη από 2.5m/s. Τιμές PASP>41mmHg και TRV>3m/s παραπέμπουν σε μέτρια/σοβαρή πνευμονική υπέρταση, ενώ η αύξηση στη θνητότητα σχετίζεται με το βαθμό αύξησης της TRV [10,158,170]. Η οριστική διάγνωση τίθεται με καρδιακό καθετηριασμό, μέσω του οποίου γίνεται η διαφορική διάγνωση ανάμεσα σε προτριχοειδική (αυξημένες αντιστάσεις πνευμονικών αρτηριών) και μετατριχοειδική μορφή. Ωστόσο ο τελευταίος δε συνιστάται, εκτός αν υπάρχουν συμπτώματα πνευμονικής υπέρτασης που απαιτούν ειδική θεραπεία (π.χ. ανάλογα προστακυκλίνης). Έχει δειχθεί ότι η αυξημένη TRV σχετίζεται με αύξηση της τιμής των δεικτών αιμόλυσης [171]. Τέλος, οι ασθενείς εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο θρομβοεμβολικής νόσου, ιδίως πνευμονικής εμβολής, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό [10].

#### **1.1.7.Εργαστηριακά ευρήματα**

Οι πάσχοντες εμφανίζουν άλλοτε άλλου βαθμού αναιμία (μειωμένες τιμές αιματοκρίτη-αιμοσφαιρίνης), με ορθόχρωμο ορθοκυτταρικό χαρακτήρα στους

ομόζυγους ασθενείς και υπόχρωμους μικροκυτταρικούς δείκτες επί ετεροζυγωτίας με β-θαλασσαιμία, συνύπαρξης με α-θαλασσαιμία ή σιδηροπενίας (π.χ. αφαιμάξεις). Τα δικτυοερυθροκύτταρα είναι αυξημένα τόσο ως ποσοστό, όσο και σε απόλυτο αριθμό και αυξάνονται περαιτέρω επί αύξησης του ρυθμού αιμόλυσης ή άλλης αιτίας αιφνίδιας μείωσης του αιματοκρίτη, εκτός αν υπάρχει απλασία/ανεπαρκής αντιρρόπηση από το μυελό (π.χ. λοίμωξη από ραينو-B19, μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο σε πάσχοντες μεγαλύτερης ηλικίας, νέκρωση μυελού οστών, λήψη υδροξυουρίας). Λευκοκυττάρωση με πολυμορφοπυρηνικό τύπο μπορεί να υπάρχει και σε σταθερούς ασθενείς (χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση) ή ψευδώς λόγω πρόδρομων μορφών ερυθρών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα ή λόγω ασπληνίας, αλλά επιτείνεται επί αγγειοαποφρακτικής κρίσης ή άλλων οξειών επιπλοκών, όπως λοίμωξης. Αντίστοιχη διακύμανση εμφανίζουν και άλλοι δείκτες φλεγμονής, όπως η CRP. Λευκοπενία εμφανίζεται επί ανεπάρκειας φυλλικού /υπερσπληνισμού /παθολογίας του μυελού /λήψης υδροξυουρίας. Τα αιμοπετάλια μπορεί να είναι φυσιολογικά ή να αυξάνονται επί οξειών επιπλοκών /επί ασπληνίας ή να μειώνονται επί παθολογίας του μυελού /ανεπάρκειας φυλλικού οξέως /υπερσπληνισμού. Η ταχύτητα καθίζησης των ερυθρών είναι αυξημένη, λόγω της αναιμίας και της φλεγμονής. Λόγω της αιμόλυσης, η LDH, η ολική και η έμμεση χολερυθρίνη είναι αυξημένες, ενώ η απποσφαιρίνη μειώνεται. Αύξηση των αμινοτρανσφερασών (AST/SGOT, ALT/SGPT) και της άμεσης χολερυθρίνης συνήθως υποδηλώνει ηπατική παθολογία, ενώ αυξημένη γGT, αλκαλική φωσφατάση και άμεση χολερυθρίνη υποδηλώνει χολόσταση. Μεμονωμένη αύξηση αλκαλικής φωσφατάσης υποδηλώνει οστική παθολογία (κάταγμα σε πώρωση, οστεομυελίτιδα κ.λπ.). Υπολευκωματιναιμία υποδηλώνει κακή θρέψη, χρόνια λοίμωξη ή ηπατική ανεπάρκεια, ενώ υπεργαμμασφαιριναιμία εμφανίζεται επί χρόνιας λοίμωξης, ηπατίτιδας ή κίρρωσης. Οι τιμές των λιπιδίων είναι φυσιολογικές ή μειωμένες, ενώ και η κρεατινίνη έχει χαμηλές τιμές, λόγω υπερδιήθησης. Φυσιολογικές τιμές κρεατινίνης μπορεί να υποδηλώνουν νεφρική ανεπάρκεια. Υπερκαλιαιμία μπορεί να προκύπτει λόγω αιμόλυσης/νεφρικής κατακράτησης καλίου. Λόγω συνεχούς ενεργοποίησης

του καταρράκτη της πήξης και του ινωδολυτικού συστήματος, τα D-dimers είναι αυξημένα ακόμη και όταν οι ασθενείς είναι σε σταθερή κατάσταση. Παράταση των χρόνων πήξης σχετίζεται με ηπατική παθολογία/χολόσταση. Η φερριτίνη αυξάνεται λόγω της χρόνιας φλεγμονής και της συσσώρευσης σιδήρου από μεταγγίσεις. Το φυλλικό οξύ συνήθως είναι αυξημένο λόγω λήψης αντίστοιχου συμπληρώματος. Ο εντοπισμός δρεπανοκυττάρων στο επίχρισμα του περιφερικού αίματος θέτει την υπόνοια της νόσου, ενώ το τεστ δρεπάνωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων θέτει τη διάγνωση. Η ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης επιβεβαιώνει τη διάγνωση και προσδιορίζει την ακριβή μορφή της νόσου, ενώ ο γονιδιακός έλεγχος μπορεί κατά περίπτωση να προσφέρει καλύτερη τεκμηρίωση. Τα νατριουρητικά πεπτίδια (BNP και NT-proBNP) αποτελούν δείκτες αυξημένης θνητότητας [170].

### **1.1.8.Θεραπεία**

Η θεραπεία διακρίνεται σε χρόνια αγωγή και αντιμετώπιση των οξειών επιπλοκών. Περιλαμβάνει παρεμβάσεις μείωσης της συγκέντρωσης της HbS (ενυδάτωση, αφαίμαξη/αφαιμαξομετάγγιση, αύξηση άλλων μορφών αιμοσφαιρίνης), αύξηση άλλων μορφών αιμοσφαιρίνης (μετάγγιση, υδροξουρία προς επαγωγή αιμοσφαιρίνης F-HbF), υποστήριξης της αιμοποίησης (φυλλικό οξύ, βιταμίνη B12 επί ανεπάρκειας), αντιμετώπισης του πόνου (μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, οπιοειδή, φάρμακα κατά του νευροπαθητικού πόνου, αντικαταθλιπτικά) πρόληψης επιπλοκών (π.χ. ασπιρίνη/ αντιπηκτικά για θρομβοεμβολικά φαινόμενα) και αντιμετώπισης επιμέρους επιπλοκών (laser για παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια, χειρουργική αντικατάσταση ισχίου επί άσηπτης νέκρωσης κ.λπ.) [10].

## **1.2.Γονιδιακή Έκφραση, Γενετική και Επιγενετική**

### **1.2.1.Γενετική**

Πέραν της κλασικής γενετικής, πατέρας της οποίας θεωρείται ο Gregor Mendel, η ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας οδήγησε τη γενετική στην ανάπτυξη επιμέρους πεδίων, αυτών της μοριακής γενετικής (μελέτη της δομής και λειτουργίας των γονιδίων, της γονιδιακής έκφρασης και ρύθμισης και της

γονιδιακής ποικιλομορφίας σε επίπεδο ατόμων και πληθυσμών) και πιο πρόσφατα της επιγενετικής (μελέτη κληρονομήσιμων μεταβολών της γονιδιακής έκφρασης που δεν οφείλονται σε αλλαγές της αλληλουχίας του γονιδιώματος)[172].

### **1.2.2.Γονιδιακή έκφραση-ρύθμιση**

Τα δεδομένα μεταφέρονται από το DNA σε μόρια RNA με τη διαδικασία της μεταγραφής των γονιδίων. Από τα μόρια RNA που προκύπτουν, ορισμένα (αγγελιοφόρα RNA, mRNA) κωδικοποιούν πολυπεπτιδικές αλυσίδες, που συντίθενται με τη διαδικασία της μετάφρασης στα ριβοσωμάτια, ενώ άλλα, συνήθως μικρότερου μήκους, επιτελούν διάφορες λειτουργίες μέσω της αλληλεπίδρασής τους με πρωτεΐνες ή με το DNA. Οι διαδικασίες της μεταγραφής και της μετάφρασης, όπως και άλλες ενδιάμεσες διεργασίες, όπως το μάτισμα (splicing) του RNA, αποτελούν από κοινού τη γονιδιακή έκφραση. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης γίνεται σε πολλαπλά και αλληλοσυμπληρούμενα επίπεδα. Στο επίπεδο της μεταγραφής, η γονιδιακή έκφραση ελέγχεται μέσω της αλληλεπίδρασης ειδικών πρωτεϊνών και μορίων RNA με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA. Πιο συγκεκριμένα, για τη μεταγραφή ενός γονιδίου, απαιτείται η σύνδεση ειδικών πρωτεϊνών που ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες σε μια περιοχή DNA που συνήθως βρίσκεται λίγο πριν το αντίστοιχο γονίδιο και ονομάζεται υποκινητής. Ορισμένες ρυθμιστικές πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με την αλληλουχία του DNA, αλλά μόνο με μεταγραφικούς παράγοντες, των οποίων τη δράση δύνανται να τροποποιήσουν και ονομάζονται συν-ενεργοποιητές και συγκαταστολείς. Διαφορετικά γονίδια ενεργοποιούνται μεταγραφικά από διαφορετικούς συνδυασμούς μεταγραφικών παραγόντων-συνενεργοποιητών. Παράλληλα, άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες αναγνωρίζουν και συνδέονται σε άλλες περιοχές του DNA που μπορεί να βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση πριν ή μετά από το αντίστοιχο γονίδιο και επιδρούν στην έκφρασή του ευοδώνοντας την (ενισχυτές) ή καταστέλλοντας την (καταστολείς). Η δράση όλων των παραπάνω ρυθμιστικών πρωτεϊνών σε ένα κύτταρο ρυθμίζεται αυστηρά, αφενός στο επίπεδο της έκφρασης, αφετέρου σε μετα-μεταφραστικό

επίπεδο, μέσω της προσθήκης/αφαίρεσης χημικών ομάδων (ακετυλίωση / αποακετυλίωση, φωσφορυλίωση / αποφωσφορυλίωση, κλπ) από εξειδικευμένα ένζυμα, σε ανταπόκριση σε διάφορα φυσικά, χημικά ή βιολογικά ερεθίσματα. Με τον τρόπο αυτό, κάθε κύτταρο μπορεί να προσαρμόζει το είδος και την ποσότητα των πρωτεϊνών που παράγει κάθε στιγμή στα ερεθίσματα που δέχεται, με τρόπο που προάγει την επιβίωση και ομαλή λειτουργία του οργανισμού στον οποίο ανήκει το κύτταρο [173].

### **1.2.3.Επιγενετική**

Επιγενετική είναι ο κλάδος της γενετικής που μελετά κληρονομήσιμες αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης που δεν οφείλονται σε αλλαγές της αλληλουχίας του γονιδιώματος (αντικαταστάσεις βάσεων, ελλείψεις, προσθήκες). Οι μηχανισμοί που ευθύνονται για τη γονιδιακή ρύθμιση σε αυτό το επίπεδο είναι κυρίως η χημική τροποποίηση (μεθυλίωση) του DNA, οι μετα-μεταφραστικές χημικές τροποποιήσεις των ιστονών, των πρωτεϊνών που συμβάλλουν στον καθορισμό της στερεοδιάταξης των μορίων DNA στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, και τέλος τα μη κωδικά μόρια RNA. Οι παραπάνω μηχανισμοί οδηγούν σε τροποποίηση της στερεοδομής του DNA ή μεταβολή στην ικανότητα πρόσδεσης συγκεκριμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών σε περιοχές του γονιδιώματος, επηρεάζοντας έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων. Άλλα βήματα της γονιδιακής έκφρασης, όπως η μετάφραση, μπορούν να επηρεαστούν επιγενετικά από μη κωδικά μόρια RNA [173].

### **1.2.4.Μεθυλίωση του DNA**

Στον άνθρωπο, η μόνη χημική τροποποίηση του DNA που επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση είναι η μεθυλίωση καταλοίπων κυτοσίνης στη θέση 5'. Αυτή η τροποποίηση αφορά μόνο κατάλοιπα κυτοσίνης που βρίσκονται πριν από κατάλοιπα γουανίνης (CpG). Περιοχές DNA πλούσιες σε αυτό το δινουκλεοτίδιο ονομάζονται νησίδια CpG και ανευρίσκονται κοντά σε υποκινητές γονιδίων, μέσα σε γονίδια ή σε περιοχές DNA μεταξύ των γονιδίων. Η αντίστοιχη χημική αντίδραση καταλύεται από ένζυμα που ονομάζονται DNA μεθυλ-τρανσφεράσες (DNMTs) και χρησιμοποιούν ως

συμπαράγοντα την S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM). Υπάρχουν τρεις τύποι DNA μεθυλ-τρανσφερασών, οι DNMT1, DNMT3a και DNMT3b. Από αυτές, η DNMT1 είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του προτύπου μεθυλίωσης του μητρικού μορίου DNA στα θυγατρικά κατά την αντιγραφή. Οι DNMT3a και DNMT3b επιτελούν την εξ αρχής (de novo) μεθυλίωση μη μεθυλιωμένων καταλοίπων κυτοσίνης, ενώ και αυτές συμμετέχουν στη μεταφορά της μεθυλίωσης κατά την αντιγραφή. Έχειδειχθεί ότι οι DNA μεθυλ-τρανσφεράσες αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες, με αποτέλεσμα τη μεθυλίωση ρυθμιστικών περιοχών διαφόρων γονιδίων. Η μεθυλίωση μιας περιοχής οδηγεί συνήθως σε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του/των γονιδίου/ων που εδράζονται σε αυτή και σε συμπύκνωση της χρωματίνης (σύμπλεγμα DNA με πρωτεΐνες “πακεταρίσματος”-οργάνωσης της στερεοδομής του). Η επίδραση αυτή στη μεταγραφή οφείλεται σε παρακώλυση της πρόσδεσης ορισμένων ενεργοποιητικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών στη διπλή έλικα του DNA και σε προαγωγή της σύνδεσης άλλων, κατασταλτικών πρωτεϊνών. Οι τελευταίες ανήκουν σε τρεις μεγάλες οικογένειες: η πρώτη περιλαμβάνει τις MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MeCP2, η δεύτερη τις Kaiso, ZBTB4, ZBTB38 και η τρίτη τις UHRF1 και UHRF2. Όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες είναι καταστολείς της μεταγραφής μέσω ενεργοποίησης συν-καταστολέων και αποακετυλασών των ιστονών (εδάφιο 1.2.5), πλην της MBD4 (γλυκοζυλάση της θυμιδίνης) [174].

### **1.2.5.Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών**

Οι ιστόνες αποτελούν μια ομάδα καλά διατηρημένων κατά την εξέλιξη πρωτεϊνών, των οποίων βασικός ρόλος είναι η οργάνωση στο χώρο των μορίων του DNA και συγκεκριμένα η τεταρτοταγής δομή του DNA. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει 5 βασικά μέλη, τις ιστόνες H2A, H2B, H3, H4 και H1. Οι τέσσερις πρώτες (“ιστόνες του πυρήνα”) συγκροτούνται σε οκταμερείς δομές αποτελούμενες από δυο μόρια H2A, δυο H2B, δυο H3 και δυο H4 που ονομάζονται νουκλεοσώματα. Γύρω από κάθε νουκλεόσωμα περιελίσσονται 147 ζεύγη βάσεων DNA κατά 1.65 φορές, ενώ περίπου 50 ζεύγη βάσεων DNA παρεμβάλλονται μεταξύ διαδοχικών νουκλεοσωμάτων (συνδετικό DNA).

Η ιστόνη H1 (“συνδεδετική ιστόνη”) σταθεροποιεί εξωτερικά το σύμπλεγμα νουκλεοσώματος-DNA. Με αυτόν τον τρόπο, το μήκος 1.80 μέτρων DNA κάθε ανθρώπινου κυττάρου συμπυκνώνεται ώστε το τελικό του μήκος να μην ξεπερνά τα 0.08 χιλιοστά. Πέρα όμως από τη συμμετοχή τους στη συσκευασία του DNA όπως περιγράφηκε, οι ιστόνες επιτελούν πολύ πιο περίπλοκο ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Συγκεκριμένα, υπόκεινται σε χημικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, κιτρουλλινίωση, σύνδεση με ουβικουϊτίνη, ADP-ριβοζυλίωση) στο τμήμα τους που βρίσκεται εκτός του πυρήνα του νουκλεοσώματος. Οι τροποποιήσεις αυτές συνδέονται με διαφοροποιήσεις στη μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων των αντίστοιχων περιοχών του DNA και αφορούν περισσότερο τα κατάλοιπα λυσίνης (μεθυλίωση, ακετυλίωση), αργινίνης (μεθυλίωση, κιτρουλλινίωση), σερίνης και θρεονίνης (φωσφορυλίωση). Κάθε κατάλοιπο λυσίνης μπορεί να δεχθεί μέχρι τρεις μεθυλομάδες και κάθε κατάλοιπο αργινίνης μέχρι δυο. Το πρότυπο του συνόλου των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών είναι τόσο περίπλοκο, ώστε έχει αποκληθεί “κώδικας των ιστονών”. Ο πολυσύνθετος αυτός κώδικας σήμανσης συμμετέχει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και σε άλλες λειτουργίες. Συγκεκριμένα πρότυπα μεθυλίωσης και η ακετυλίωση σχετίζονται με μεταγραφικά ενεργά γονίδια, ενώ διαφορετικά μοτίβα μεθυλίωσης οδηγούν σε μεταγραφική καταστολή των αντίστοιχων γονιδίων. Η φωσφορυλίωση ορισμένων καταλοίπων σερίνης-θρεονίνης σηματοδοτεί την ύπαρξη βλάβης στην αντίστοιχη περιοχή του DNA, ενώ η φωσφορυλίωση με διαφορετικό πρότυπο σχετίζεται με συμπύκνωση της χρωματίνης [175].

#### **1.2.6.Μηχανισμοί με βάση το RNA**

Μια από τις πολλές λειτουργίες των μορίων RNA είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Αυτή γίνεται κυρίως από μικρά μόρια RNA, μεταξύ των οποίων τα καλύτερα μελετημένα είναι τα micro-RNA (miRNA). Πρόκειται για μόρια μονόκλωνου RNA, μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων που ασκούν τη ρυθμιστική τους δράση μέσω αλληλεπίδρασης με άλλα μόρια RNA, με

πρωτεΐνες και με συγκεκριμένες περιοχές του DNA. Τα miRNA κωδικοποιούνται σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματος (εκτός γονιδίων, σε εσώνια γονιδίων, στη μη κωδική έλικα του DNA εντός γονιδίων). Μεταγράφονται από τις RNA πολυμεράσες II και III σε μεγαλύτερα πρόδρομα μόρια RNA (πρωτογενή miRNA, pri-miRNA) με μια αγκύλη εσωτερικά, με τα τμήματα εκατέρωθεν αυτής να υβριδοποιούνται λόγω συμπληρωματικότητας βάσεων σχηματίζοντας ένα δίκλωνο στέλεχος, με δυο μονόκλωνες ουρές ακόμη περιφερικότερα. Το pri-miRNA υφίσταται επεξεργασία από ένα ενζυμικό σύμπλεγμα μετατρέπόμενο σε μια πιο ώριμη μορφή (pre-miRNA) και στη συνέχεια, με την επίδραση της ριβονουκλεάσης Dicer σε ds-miRNA. Η Dicer, μαζί με άλλες δυο πρωτεΐνες, τις TRBP και AGO, σχηματίζει μαζί με το miRNA το επάγον καταστολή RNA σύμπλεγμα (RNA-inducing silencing complex, RISC), μετατρέποντας το ds-miRNA σε ώριμο μονόκλωνο miRNA [176]. Στη συνέχεια, τα miRNAs, ασκούν τη δράση τους τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Στο κυτταρόπλασμα, το σύμπλεγμα miRISC συνδέεται με τα mRNAs-στόχους, αναστέλλοντας αρχικά τη μετάφρασή τους, στο στάδιο της έναρξης, και στη συνέχεια επάγοντας την αποδόμησή τους, με την απομάκρυνση της polyA ουράς. Στον πυρήνα, τα ώριμα miRNAs εισέρχονται από το κυτταρόπλασμα με μηχανισμούς που δεν έχουν προσδιοριστεί ακριβώς. Εκεί ασκούν ποικίλες δράσεις: συνδέονται με τα μακρά μη κωδικά μόρια RNA προάγοντας την αποδόμησή τους, εντοπίζονται στον πυρήνισκο όπου πιθανώς συμβάλλουν στην ποσοτική ρύθμιση και λειτουργική ολοκλήρωση του ριβοσωμικού RNA [177] ή/και αλληλεπιδρούν μετα-μεταγραφικά στο mRNA, ενώ ίσως εμπλέκονται και στο μάτισμα του mRNA. Η σημαντικότερη ωστόσο δράση τους αφορά την άμεση ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας πολλών γονιδίων (σχεδόν 60% των γονιδίων του ανθρώπου) [178], είτε ενεργοποιητικά, είτε κατασταλτικά. Πιθανότατα, η δράση αυτή επιτυγχάνεται με την άμεση πρόσδεση των miRNAs σε συμπληρωματικές αλληλουχίες ευρισκόμενες στον υποκινητή των γονιδίων-στόχων [179]. Εκτός από τα miRNAs, άλλα μικρά μόρια RNA με παρόμοια λειτουργία είναι τα siRNAs (small interfering RNA: μικρό παρεμβαλλόμενο RNA), που όμως είναι δίκλινα.



Επιπλέον, και τα lncRNAs (long non-coding RNAs: μακρά μη κωδικά RNAs, μήκος πάνω από 200 νουκλεοτίδια) εμπλέκονται στην επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Κάποια lncRNAs με αλληλουχία συμπληρωματική προς τον υποκινητή ενός γονιδίου σχηματίζουν τριπλή έλικα (δίκλωνο DNA και μονόκλωνο RNA) στον υποκινητή για να διεγείρουν τη μεταγραφή, ενώ άλλα συμπληρωματικά lncRNAs αποτρέπουν την έναρξη της μεταγραφής του αντίστοιχου γονιδίου. Ακόμη, άλλα αλληλεπιδρούν με την RNA πολυμεράση τύπου II, ή με μεταγραφικούς παράγοντες, συν-ενεργοποιητές ή συν-καταστολείς. Είναι γνωστό το φαινόμενο της γονιδιακής αποτύπωσης (imprinting), κατά το οποίο σε διπλοειδή κύτταρα ένα τμήμα του γονιδιώματος πατρικής ή μητρικής προέλευσης αδρανοποιείται μέσω συμπύκνωσης-υπερμεθυλίωσης, κάτω από την επίδραση ενός ειδικού lncRNA, όπως το Xist για το χρωμόσωμα X [180,181].

### **1.3. Προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCs: Endothelial Progenitor Cells)**

Με τον όρο Προγονικά Ενδοθηλιακά Κύτταρα (Endothelial Progenitor Cells, EPCs) εννοούμε μια ομάδα προγονικών κυττάρων που χαρακτηρίζονται από ενδοθηλιακούς δείκτες διαφοροποίησης και από την ικανότητα να συμβάλουν στη δημιουργία αιμοφόρων αγγείων και στην επιδιόρθωση του ενδοθηλίου. Κλασικά, για την ταυτοποίηση ενός κυττάρου ως EPC απαιτείται η έκφραση στην επιφάνειά του τουλάχιστον δυο από τους δείκτες CD34, KDR-VEGFR2 και CD133. Ο πρώτος είναι οικουμενικός δείκτης των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων και ο δεύτερος σχετίζεται με την ενδοθηλιακή διαφοροποίηση. Τέλος, ο τρίτος αφορά τις πλέον άωρες μορφές EPCs, ενώ και άλλοι δείκτες επιφανείας έχουν ταυτοποιηθεί στα EPCs, όπως ο παράγοντας Von Willebrand (vWF) , ο CD31 και ο CD144 [182]. Τα EPCs εντοπίζονται στο μυελό των οστών και το αγγειακό τοίχωμα, και σε άλλοτε άλλο βαθμό στο περιφερικό αίμα, από τη στιβάδα των μονοπύρηνων του οποίου είναι δυνατό να απομονωθούν. Ο αριθμός στους στο αίμα κυμαίνεται από 5 έως 40 κύτταρα ανά κυβικό χιλιοστόμετρο σε φυσιολογικούς ενήλικες [182]. Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν τον αριθμό και τη δραστηριότητα των

EPCs: το γυναικείο φύλο και η προεμμηνοπαυσιακή κατάσταση σχετίζονται με αυξημένο αριθμό και αγγειογενετική αποδοτικότητα αυτών [183]. Η υποξιαιστική ισχαιμία, η μηχανική βλάβη του ενδοθηλίου, η άσκηση, οι κυτταροκίνες, η ερυθροποιητίνη, η ινσουλίνη, ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες (VEGF, SDF1, GM-CSF) και το ουρικό οξύ κινητοποιούν τα EPCs. Παρόμοια επίδραση έχουν και φάρμακα όπως οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγιοτενσίνης, οι ανταγωνιστές των υποδοχέων της αγγιοτενσίνης, οι στατίνες, οι γλιταζόνες και η ορμονική υποκατάσταση με οιστρογόνα. Αντίθετα, η μεγαλύτερη ηλικία, το μειωμένο επίπεδο HDL, τα κορτικοστεροειδή και κάποια κυτταροστατικά-ανοσοτροποποιητικά φάρμακα (κυκλοσπορίνη, σιρόλιμους, ταξάνες) μειώνουν την αναγεννητική δραστηριότητα των EPCs [184]. Ο μειωμένος αριθμός ή αγγειογενετική δραστηριότητα των EPCs έχουν συσχετισθεί με πολλούς παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου και αγγειακές νόσους. Σε ότι αφορά τη δρεπανοκυτταρική νόσο, οι Anjum et al. (2012) έδειξαν ότι ο αριθμός ενός συγκεκριμένου υποπληθυσμού EPCs, των CD34+CD14-CD106+ συσχετίζεται με την παρουσία πνευμονικής υπέρτασης, τόσο υπερηχογραφικά (TRV) όσο και κλινικά (απόσταση βάρδισης 6 λεπτών, 6MWD) [185]. Λίγο αργότερα, η ομάδα των Rodrigo et al. (2013) έδειξε ότι οι πάσχοντες από ΔΝ εμφανίζουν μειωμένο αριθμό EPCs στο περιφερικό αίμα σε σχέση με υγιείς μάρτυρες και ο αριθμός αυτών σχετίστηκε γραμμικά με υπερηχογραφικούς δείκτες πνευμονικής υπέρτασης. Βέβαια, όπως επισημαίνουν οι συγγραφείς, οι ασθενείς επελέγησαν με κριτήριο την παρουσία δεικτών ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στο περιφερικό αίμα [186].

#### **1.4.Σκοπός**

Παρά τη μεγάλη πρόοδο που έχει συντελεστεί στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της δρεπανοκυτταρικής νόσου, σήμερα απέχουμε ακόμη από την πλήρη κατανόησή της, ενώ μεγάλο μέρος της κλινικής της ετερογένειας παραμένει ανερμήνευτο. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συμβολή στην καλύτερη κατανόηση της συμμετοχής του ενδοθηλίου και των λευκών αιμοσφαιρίων στην παθοφυσιολογία της δρεπανοκυτταρικής νόσου,

μέσω της μελέτης γονιδίων που εκφράζονται στους παραπάνω κυτταρικούς πληθυσμούς και σχετίζονται με τη λειτουργία τους. Χρησιμοποιήθηκαν λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με ΔN και υγιών ατόμων στα οποία μελετήθηκε η επιγενετική και γενετική κατάσταση όσο αφορά ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων *NOS3* και *SOD2*. Μελετήθηκε επιπλέον η έκφραση των γονιδίων αυτών (*NOS3* και *SOD2*) σε μεταγραφικό επίπεδο καθώς και η έκφραση των γονιδίων *HIF1A* και *PPARGC1A* που συμμετέχουν σε μηχανισμούς ρύθμισης της λειτουργίας του ενδοθηλίου. Πέραν των λευκοκυττάρων προσπάθεια έγινε και για την χρησιμοποίηση ενδοθηλιακών αποικιών/κυττάρων προερχόμενων από καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος ασθενών με ΔN, οι οποίες λόγω μειωμένου αναγεννητικού δυναμικού των μελετώμενων ατόμων δεν απέδωσαν αποικίες αυτού του τύπου. Στον πληθυσμό των μονοπύρηνων κυττάρων πιθανώς ανευρίσκονται αρχέγονες μορφές ενδοθηλιακών κυττάρων που μπορεί να διαφοροποιηθούν και πολλαπλασιασθούν.

Μελετήθηκαν δυο μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου *NOS3* (T786C και G894T) πιθανώς εμπλεκόμενοι στη δράση του ενδοθηλίου που έχουν συσχετισθεί με την πρόγνωση/επιπλοκές της ΔN και άλλων νοσημάτων.

Επιπλέον μελετήθηκαν δυο πολυμορφισμοί του γονιδίου *MTHFR*, τόσο λόγω της παθοφυσιολογικής του συνάφειας με τη νόσο και συγκεκριμένες επιπλοκές της, όσο και λόγω της συσχέτισης της δράσης του ενζύμου αυτού με την κατάσταση μεθυλίωσης του DNA.

Παράλληλα, μελετήθηκε το ιστορικό και έγινε βασικός εργαστηριακός έλεγχος στους ασθενείς και τα ευρήματα από τη γονιδιακή μελέτη και συσχετίστηκαν με κλινικά-εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών.



## **Β'. Ειδικό Μέρος**



## **2.Υλικά και Μέθοδος**

### **2.1.Πληθυσμός υπό μελέτη**

Ο πληθυσμός που μελετήθηκε ήταν Έλληνες (Καυκάσιοι) πάσχοντες από Δρεπανοκυτταρική Νόσο, παρακολουθούμενοι στο Εξωτερικό Ιατρείο Αιμοσφαιρινοπαθειών της Α' Παθολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α στο Νοσοκομείο «Λαϊκό», όλοι σε σταθερή κατάσταση κατά τη λήψη δειγμάτων. Ως «σταθερή» κατάσταση ορίστηκε η απουσία οποιασδήποτε οξείας επιπλοκής χρήζουσας ή μη νοσοκομειακής περίθαλψης κατά το τελευταίο τρίμηνο, η μη λήψη μετάγγισης συμπυκνωμένων ερυθρών ή άλλων παραγώγων αίματος κατά το τελευταίο τρίμηνο και η μη λήψη φαρμακευτικής αγωγής πέραν της χρονίως λαμβανόμενης για τη ΔΝ ή τυχόν συνυπάρχουσες χρόνιες νόσους/επιπλοκές τον τελευταίο μήνα. Ως υγιείς μάρτυρες ορίστηκαν άνθρωποι χωρίς ιστορικό κάποιας νόσου, που δε λαμβάνουν καμία φαρμακευτική αγωγή και εμφανίζουν φυσιολογική γενική εξέταση αίματος και ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης, προς αποκλεισμό παρουσίας ετερόζυγης δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Οι υγιείς προήλθαν από το αρχείο δειγμάτων του Ερευνητικού Εργαστηρίου της Α' Παθολογικής Κλινικής του Λαϊκού Νοσοκομείου-Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α. Όλοι οι ασθενείς και υγιείς μάρτυρες δήλωσαν εγγράφως τη συναίνεσή τους στη συμμετοχή σε αυτή τη μελέτη, βάσει ειδικού εντύπου.

### **2.2.Κλινικές πληροφορίες**

Κλινικά δεδομένα των περισσότερων ασθενών ήταν διαθέσιμα από το αρχείο του Ιατρείου Αιμοσφαιρινοπαθειών. Κατά την επίσκεψη του κάθε ασθενούς που μελετήθηκε στο ιατρείο, τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν / συμπληρώθηκαν / εμπλουτίστηκαν η/και τροποποιήθηκαν από τη λήψη λεπτομερούς ιατρικού ιστορικού βάσει πρότυπου ερωτηματολογίου. Το τελευταίο σχεδιάστηκε ειδικά για το σκοπό αυτό και συμπληρώθηκε από όλους τους ασθενείς. Για κάθε ασθενή καταγράφηκαν δημογραφικά στοιχεία (φύλο, ηλικία, κάπνισμα) και κλινικά στοιχεία (νοσηλείες κατά το τελευταίο έτος, ιστορικό οξέος θωρακικού συνδρόμου, σπληνικού εγκλωβισμού, επώδυνων οστικών κρίσεων, οστεομυελίτιδας, άσηπτης νέκρωσης οστών,

ισχαιμικού/αιμορραγικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, εν τω βάθει φλεβοθρόμβωσης/πνευμονικής εμβολής, δακτυλίτιδας, πριαπισμού, άτονων ελκών στις κνήμες, χολοκυστεκτομής, σπληνεκτομής, οστεοπόρωσης, χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, αρτηριακής υπέρτασης, κολπικής μαρμαρυγής, ισχαιμικής καρδιοπάθειας, αποφρακτικής νόσου των αεραγωγών, παραγωγικής αμφιβληστροειδοπάθειας, χρόνιου πόνου, ψυχικής επιβάρυνσης). Το οξύ θωρακικό σύνδρομο ορίστηκε ως ταυτόχρονη παρουσία θωρακικού άλγους με νέα διηθήματα στην απεικόνιση του πνευμονικού παρεγχύματος ή/και πυρετό, βήχα, απόχρεμψη, δύσπνοια, υποξαιμία. Ως επώδυνη κρίση ορίστηκε κάθε επεισόδιο άλγους που δεν μπόρεσε να αποδοθεί σε άλλη αιτία πλην της ΔΝ μετά την κατάλληλη διερεύνηση. Ως σπληνικός εγκλωβισμός ορίστηκε η εμφάνιση άλγους αριστερού υποχονδρίου με συνοδό μείωση της τιμής του αιματοκρίτη, θρομβοπενία και δικτυοερυθροκυττάρωση, χωρίς αντίστοιχη μεταβολή των υπόλοιπων δεικτών αιμόλυσης. Η διάγνωση της άσηπτης νέκρωσης οστών βασίστηκε σε ευρήματα από την MRI σε ασθενείς με συμβατή κλινική εικόνα, ενώ η οστεομυελίτιδα διαγνώσθηκε στη βάση εικόνας συστηματικής λοίμωξης (πυρετός, λευκοκυττάρωση, δείκτες φλεγμονής) με συμβατά απεικονιστικά ευρήματα (απλή ακτινογραφία/MRI) και θετική αιμοκαλλιέργεια ή καλλιέργεια από το πάσχον οστόν σε περίπτωση χειρουργικής αντιμετώπισης. Η εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση και η πνευμονική εμβολή διαγνώσθηκαν με υπερηχογράφημα-Doppler φλεβών κάτω άκρων και σπινθηρογράφημα αερισμού-αιμάτωσης /ελικοειδή CT αγγειογραφία της πνευμονικής αρτηρίας αντίστοιχα σε ασθενείς με συμβατή κλινική εικόνα. Ο πριαπισμός ορίστηκε ως επεισόδιο στύσης απουσία σεξουαλικής διέγερσης με/χωρίς συνοδό άλγος. Η διάγνωση ελκών κάτω άκρων έγινε μετά τον αποκλεισμό κάκωσης και άλλων αιτιών ελκών κάτω άκρων (αρτηριακή/φλεβική θρόμβωση, σακχαρώδης διαβήτης). Η οστεοπόρωση διαγνώσθηκε με μέτρηση οστικής πυκνότητας σε ασθενείς με /χωρίς ιστορικό παθολογικού κατάγματος. Η αποφρακτική νόσος των αεραγωγών (άσθμα/χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια διαγνώσθηκε με σπιρομέτρηση. Η παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια ορίστηκε ως παρουσία ευρημάτων νεοαγγείωσης στη βυθοσκόπηση ή τη φθοριοαγγειογραφία ή ως ιστορικό φωτοπηξίας με laser, μετά τον αποκλεισμό άλλων



αιτίων αμφιβληστροειδοπάθειας (π.χ. σακχαρώδης διαβήτης). Ο χρόνιος πόνος ορίστηκε ως πόνος που εμμένει συνεχώς/υποτροπιάζει καθημερινά μετά την πάροδο μιας αγγειοαποφρακτικής κρίσης για διάστημα μεγαλύτερο των τριών μηνών και δεν μπορεί να αποδοθεί σε άλλη αιτία πλην ΔΝ. Το αιμορραγικό ΑΕΕ διαγνώσθηκε με βάση τη CT εγκεφάλου, ενώ το ισχαιμικό με βάση την κλινική εικόνα και τον αποκλεισμό αιμορραγίας με τη CT εγκεφάλου. Η ψυχική επιβάρυνση ορίστηκε ως η τακτική παρακολούθηση από ψυχίατρο ή/και χρόνια λήψη αντιψυχωσικών/ αντικαταθλιπτικών/ υπναγωγών/ κατασταλτικών φαρμάκων.

### **2.3.Εργαστηριακός έλεγχος**

Ο εργαστηριακός έλεγχος έγινε στα εργαστήρια (αιματολογικό, βιοχημικό, ορολογικό, πυρηνική ιατρική) του Λαϊκού Νοσοκομείου και περιελάμβανε γενική εξέταση αίματος, δικτυοερυθροκύτταρα, ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης με ποσοτικό προσδιορισμό των κλασμάτων, ουρία, κρεατινίνη, αφυδρογονάση του γαλακτικού (LDH), χολερυθρίνη ολική και άμεση, νάτριο, κάλιο, αμινοτρανσφεράσες (του ασπαρτικού και της αλανίνης, AST, ALT), ολικά λευκώματα, αλβουμίνη, ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), ολική χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, HDL, φερριτίνη, βιταμίνη B12, φυλλικό οξύ. Ακόμη, μετρήθηκε το B-νατριουρητικό πεπτίδιο (BNP). Η αιμοληψία έγινε στις 8-9 το πρωί και όλοι οι ασθενείς ήταν νηστικοί τις προηγούμενες 8 τουλάχιστον ώρες.

### **2.4.Υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη**

Στους ασθενείς έγινε διαθωρακικό υπερηχογράφημα καρδιάς με τις τεχνικές 2D, έγχρωμου, παλμικού και συνεχούς Doppler με έμφαση στη μέτρηση της ταχύτητας παλίνδρομης ροής διαμέσου της τριγλώχινας (TRV) και τον υπολογισμό της συστολικής πίεσης της πνευμονικής αρτηρίας (PASP), βάσει της εξίσωσης Bernoulli ( $PASP=4 \times TRV^2 + CVP$ ), όπου CVP η κεντρική φλεβική πίεση, όπως εκτιμήθηκε από τη διάμετρο της κάτω κοίλης φλέβας και τη μεταβλητότητα αυτής κατά την εισπνοή-εκπνοή. Η μέση πίεση της πνευμονικής αρτηρίας (mPAP) υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση  $mPAP=0.61PASP+2$ . Παράλληλα, αξιολογήθηκε αδρά η συστολική λειτουργία

της αριστερής κοιλίας και η λειτουργία των καρδιακών βαλβίδων, προς αποκλεισμό αριστερής καρδιακής ανεπάρκειας/μείζονος πάθησης της μιτροειδούς ή της αορτικής βαλβίδας.

## **2.5.Απομόνωση DNA από ολικό περιφερικό αίμα**

Για την απομόνωση DNA, χρησιμοποιήθηκε ολικό περιφερικό αίμα που συλλέχθηκε σε σωληνάριο επικαλυμμένο με EDTA. Χρησιμοποιήθηκε το kit απομόνωσης γενωμικού DNA PureLink™ Genomic DNA Kit της εταιρίας Invitrogen Invitrogen με τις προτεινόμενες συνθήκες.

## **2.6.Έλεγχος της ποιότητας του DNA που απομονώθηκε**

Η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο, ώστε να υπολογιστεί η συγκέντρωση του δείγματος. Ο λόγος  $A_{260}/A_{280}$  είναι ενδεικτικός της καθαρότητας του DNA και πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1.7- 1.9. Τιμές κάτω από 1.7 φανερώνουν πρόσμιξη με φαινόλη ή πρωτεΐνες, ενώ τιμές πάνω από 1.9 φανερώνουν πρόσμιξη με άλλα μακρομόρια.

## **2.7.Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)**

Για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των τμημάτων του DNA που περιέχουν τους πολυμορφισμούς T786C και G894T του γονιδίου *NOS3* και C677T και A1298C του γονιδίου *MTHFR* εφαρμόστηκε PCR με κατάλληλους εκκινητές. Για την αντίδραση, (πέραν DNA πολυμεράσης και εκκινητών), απαιτούνται ρυθμιστικό διάλυμα 10X, άλας χλωριούχου μαγνησίου ( $MgCl_2$ ) που διευκολύνει την πρόσδεση των εκκινητών στις μητρικές αλληλουχίες και τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs).

### **2.7.1.PCR για τους πολυμορφισμούς T786C και G894T του NOS3**

Για τον πολυμορφισμό T786C χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες: αρχική αποδιάταξη για 2 λεπτά στους 92°C, αποδιάταξη στους 92°C για 15 δευτερόλεπτα, πρόσδεση των εκκινητών στους 62°C για 30 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση των αλυσίδων στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα, επανάληψη των

προηγούμενων τριών βημάτων για 34 κύκλους, τελική επιμήκυνση για 3 λεπτά στους 72°C και διατήρηση του προϊόντος στους 4°C. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των αλληλουχιών DNA που περιέχουν τους δυο πολυμορφισμούς αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πολυμορφισμός	Εκκινητές
T786C	5' ATGCTCCCACCAGGGCATCA3' (πρόσθιος-forward) 5' GTCCTTGAGTCTGACATTAGGG3' (αντίστροφος-reverse)
G894T	5' CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC 3' (πρόσθιος-forward) 5' AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC3' (αντίστροφος-reverse)

Τα τμήματα DNA που προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό έχουν μήκος 237bp για τον πολυμορφισμό T786C και 206bp για τον πολυμορφισμό G894T αντίστοιχα. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις παραπάνω αντιδράσεις αποτυπώνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Περιοχές	10X buffer	Betaine Solution	DNA	Εκκινητές Forward	Εκκινητές Reverse	MgCl <sub>2</sub>	dNTPs	Taq	Συνολικός Όγκος
Εξώνιο 7	2.5 μL	-	100ng	10 pmol	10 pmol	1.5 mM	800 μM	1.5U	25μL
Υποκινητής	2.5 μL	1M	100ng	20 pmol	20 pmol	1.5 mM	800 μM	1.5U	25μL

### 2.7.2.PCR για τους πολυμορφισμούς C677T και A1298C του *MTHFR*

Για τον πολυμορφισμό C677T χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες: αρχική αποδιάταξη για 4 λεπτά στους 95°C, αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, πρόσδεση των εκκινητών στους 55°C για 30 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση των αλυσίδων στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα, επανάληψη των προηγούμενων τριών βημάτων για 29 κύκλους, τελική επιμήκυνση για 5 λεπτά στους 72 °C και διατήρηση του προϊόντος στους 4°C. Για τον πολυμορφισμό A1298C χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες: αρχική αποδιάταξη για 4 λεπτά στους 94°C, αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, πρόσδεση των εκκινητών στους 62°C για 30 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση των αλυσίδων στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα, επανάληψη των προηγούμενων τριών βημάτων για 34 κύκλους, τελική επιμήκυνση για 5 λεπτά στους 72°C και διατήρηση του προϊόντος στους 4°C. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας DNA που περιέχει τους πολυμορφισμούς C677T και A1298C απεικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πολυμορφισμός	Εκκινητές
C677T	5' GGAAGGTGCAAGATCAGAGC 3' (πρόσθιος-forward) 5' CTGGGAAGAACTCAGCGAAC 3' (αντίστροφος-reverse)
A1298C	5' CCAGACCAAAGAGTTACATCTACCG 3' (πρόσθιος-forward) 5' CTTACCCTTCTCCCTTTGCCA 3' (αντίστροφος-reverse)

Το τμήμα που προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό έχουν μήκος 428bp για τον πολυμορφισμό C677T και 574bp για τον πολυμορφισμό A1298C αντίστοιχα. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται παρακάτω:

Περιοχές	10X buffer	DNA	Εκκινητές Forward	Εκκινητές Reverse	MgCl <sub>2</sub>	dNTPs	Taq	Συνολικός Όγκος
Εξώνιο 4	2.5 μL	50ng	10 pmol	10 pmol	2.5 mM	800 μM	0.625U	25μL
Εξώνιο 7	2.5 μL	50ng	10 pmol	10 pmol	2.5 mM	800 μM	0.625U	25μL

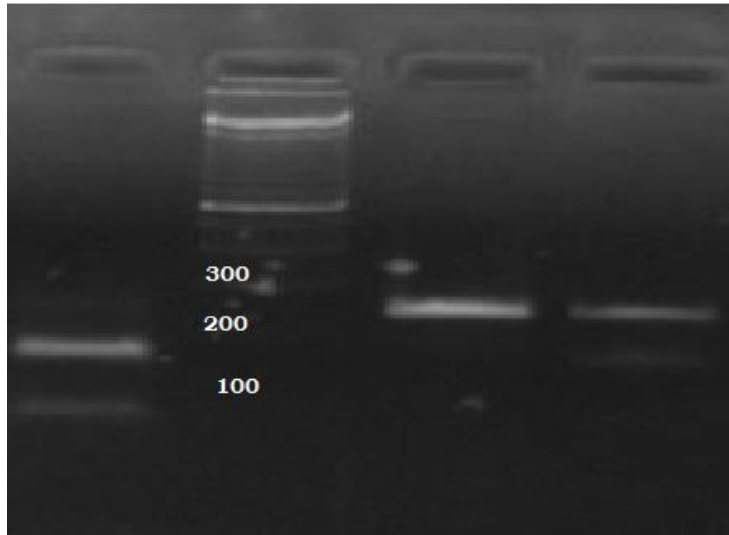
## 2.8.Η τεχνική RFLPs

### (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

Η τεχνική RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της παρουσίας συγκεκριμένων μεταλλάξεων (πολυμορφισμών) στο DNA. Βασίζεται σε περιοριστικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν μικρού μήκους (4-8bp) αλληλουχίες δίκλωνου DNA και τέμνουν το DNA στις αλληλουχίες αυτές. Ο γονότυπος ως προς ένα πολυμορφισμό αποκαλύπτεται μετά από επώαση με την αντίστοιχη ενδονουκλεάση και ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης.

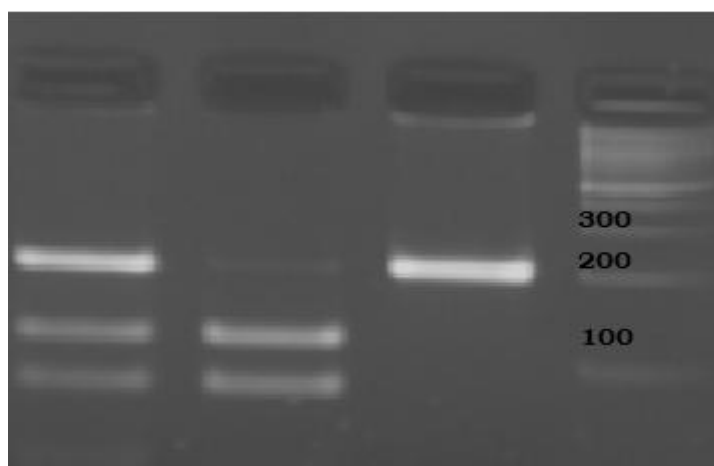
#### 2.8.1. Πολυμορφισμοί *NOS3*

Ο γονότυπος ως προς τον πολυμορφισμό T786C του υποκινητή του *NOS3* προσδιορίστηκε με τη χρήση του ενζύμου *MspI*. Η ενδονουκλεάση αυτή αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'C□ CGG3'. Η επώαση του προϊόντος της αντίστοιχης PCR, μήκους 237bp, με την *MspI* οδηγεί σε δυο τμήματα DNA μήκους 202bp και 35bp όταν ο πολυμορφισμός είναι παρών (αλληλόμορφο C), ενώ το αρχικό τμήμα 237bp δεν τέμνεται απουσία του πολυμορφισμού (αλληλόμορφο T). Η παρουσία των αντίστοιχων ζωνών στο πήκτωμα αγαρόζης μετά την ηλεκτροφόρηση προσδιορίζεται με τη βοήθεια του κατάλληλου μάρτυρα μεγέθους, 100bp ladder, όπως φαίνεται παρακάτω:



Ομόζυγο C/C 100kb ladder Ομόζυγο T/T Ετερόζυγο T/C

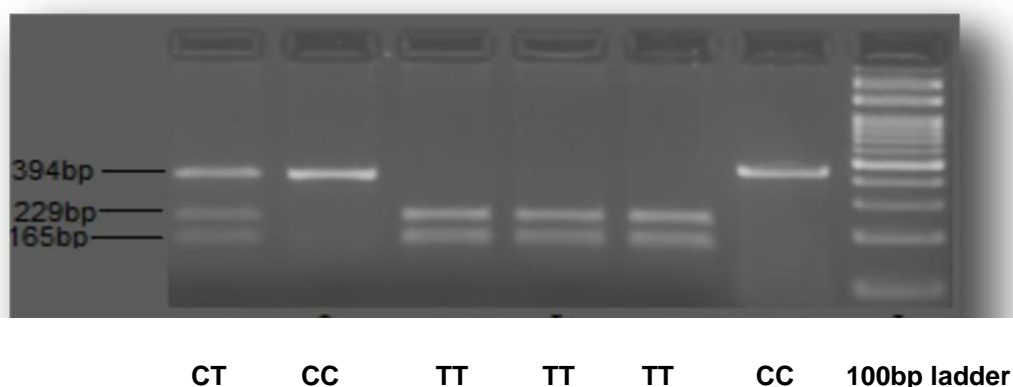
Αντίστοιχα, για τον πολυμορφισμό G894T του εξωνίου 7 του *NOS3* χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *Mbo*I, που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'G □ATC3'. Παρουσία του πολυμορφισμού (αλληλόμορφο T), το αρχικό τμήμα DNA μήκους 206bp τέμνεται σε δυο τμήματα με μήκος 119bp και 87bp. Η παρουσία μίας ή δύο ζωνών δηλώνει ομοζυγωτία για το φυσιολογικό και το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο αντίστοιχα, ενώ τρεις ζώνες παρατηρούνται σε ετερόζυγα άτομα, όπως αποτυπώνεται στο παρακάτω αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης:



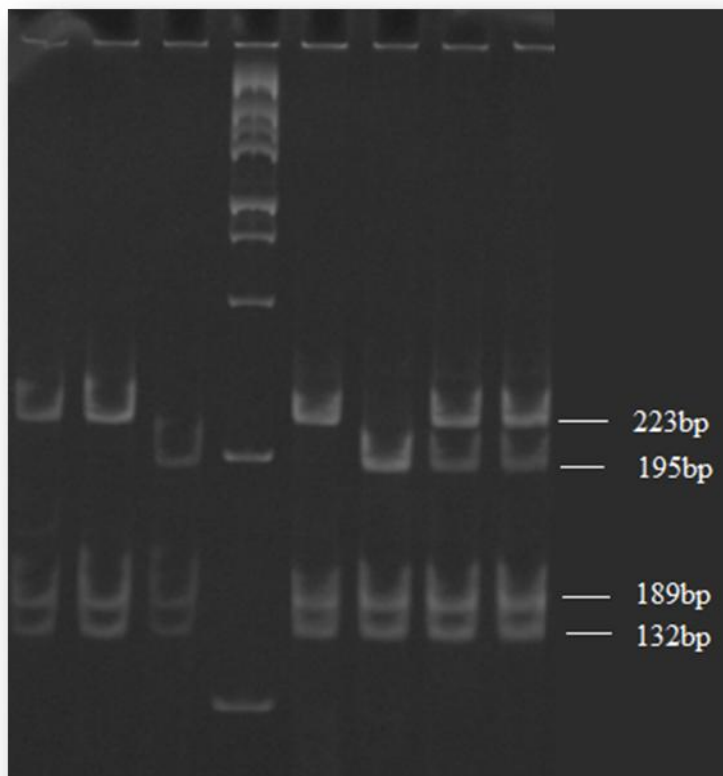
Ετερόζυγο G/T Ομόζυγο T/T Ομόζυγο G/G 100bp ladder

## 2.8.2. Πολυμορφισμοί *MTHFR*

Ο γονότυπος ως προς τον πολυμορφισμό C677T ταυτοποιήθηκε με την περιοριστική ενδονουκλεάση *HinfI*, που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'G□ANTC3', όπου N οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο. Θέση αναγνώρισης για το συγκεκριμένο ένζυμο υπάρχει ούτως ή άλλως στο προϊόν της PCR μήκους 428bp, παρουσία όμως του πολυμορφισμού (αλληλόμορφο T) δημιουργείται μια δεύτερη θέση αναγνώρισης. Έτσι, το φυσιολογικό αλληλόμορφο δίνει δυο τμήματα DNA μήκους 34bp και 394bp, ενώ παρουσία του πολυμορφισμού (αλληλόμορφο T) προκύπτουν τρία τμήματα μήκους 34bp, 165bp και 229bp. Οι ετεροζυγώτες εμφανίζουν και τα τέσσερα τμήματα. Παρακάτω απεικονίζεται το αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης του προϊόντος επώασης της PCR με το ένζυμο *Hinf I*:



Για τον προσδιορισμό του γονοτύπου ως προς τον πολυμορφισμό A1298C χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *MboII*, που αναγνωρίζει την αλληλουχία GAAGA(N)<sub>8</sub>. Παρουσία του φυσιολογικού αλληλομόρφου, το μήκους 574bp προϊόν της PCR εμφανίζει τέσσερις θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου, οπότε μετά από επώαση με την *MboII* προκύπτουν πέντε τμήματα DNA μήκους 132bp, 189bp, 30bp, 28bp και 195bp. Αντίθετα, η παρουσία του αλληλομόρφου C καταργεί την τελευταία θέση αναγνώρισης, με αποτέλεσμα να προκύπτουν τέσσερα θραύσματα DNA μήκους 132bp, 189bp, 30bp και 223bp. Τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης, όπως φαίνεται στην εικόνα:



CC CC AA ladder CC AA AC AC

## 2.9. Καθαρισμός προϊόντων PCR-αλληλούχιση κατά Sanger

### 2.9.1.Καθαρισμός προϊόντων PCR

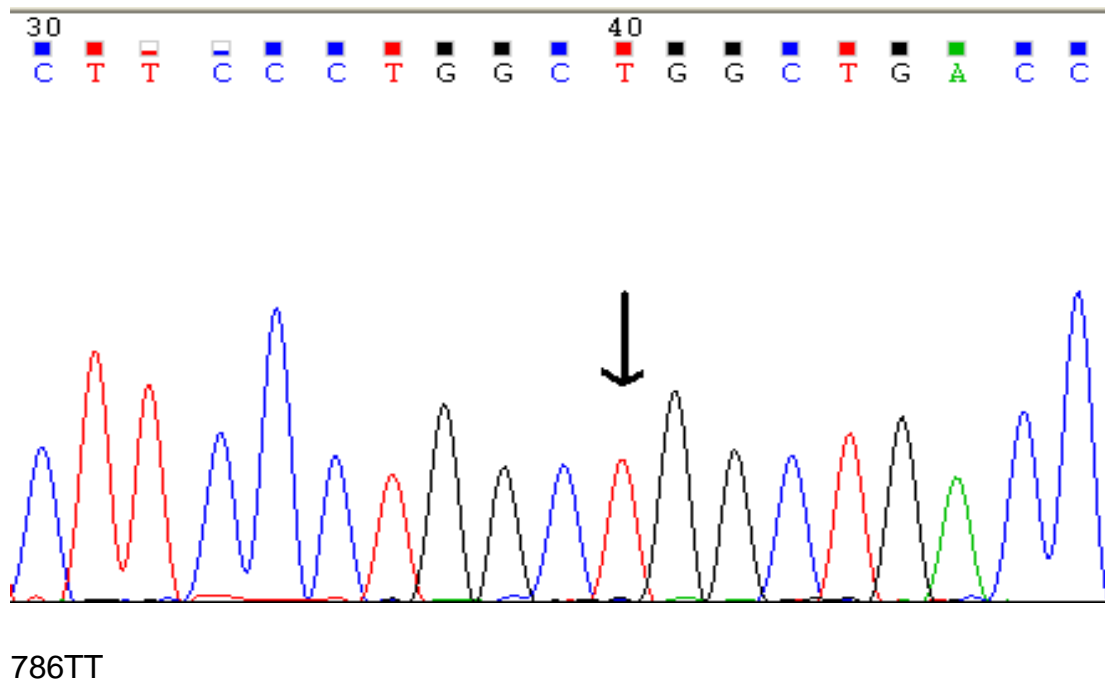
Η περαιτέρω μελέτη των πολλαπλασιασθέντων τμημάτων DNA για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους (sequencing) απαιτεί την απομάκρυνση διμερών εκκινητών, μικρών τμημάτων DNA, της DNA πολυμεράσης, των αλάτων και δεοξυριβονουκλεοτιδίων που δε χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η συλλογή PureLink® PCR Purification Kit της Invitrogen σύμφωνα με συνθήκες της εταιρίας.

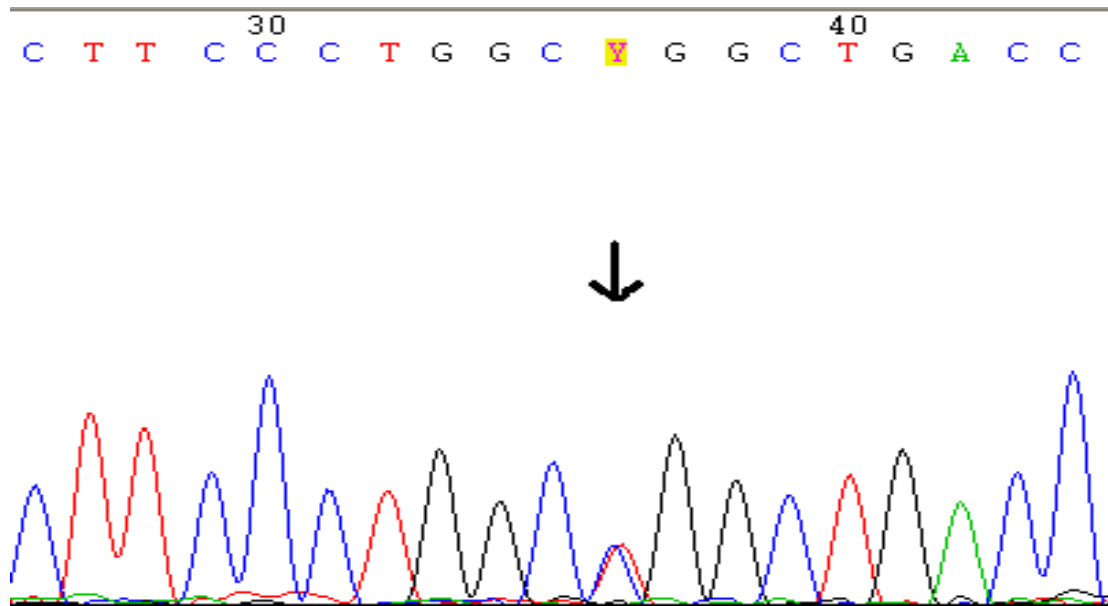
### 2.9.2.Αλληλούχιση του DNA κατά Sanger

Ο γονότυπος ως προς τους παραπάνω πολυμορφισμούς επιβεβαιώθηκε σε 10% των δειγμάτων με προσδιορισμό της ακριβούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των τμημάτων DNA που προέκυψαν από τις αντίστοιχες

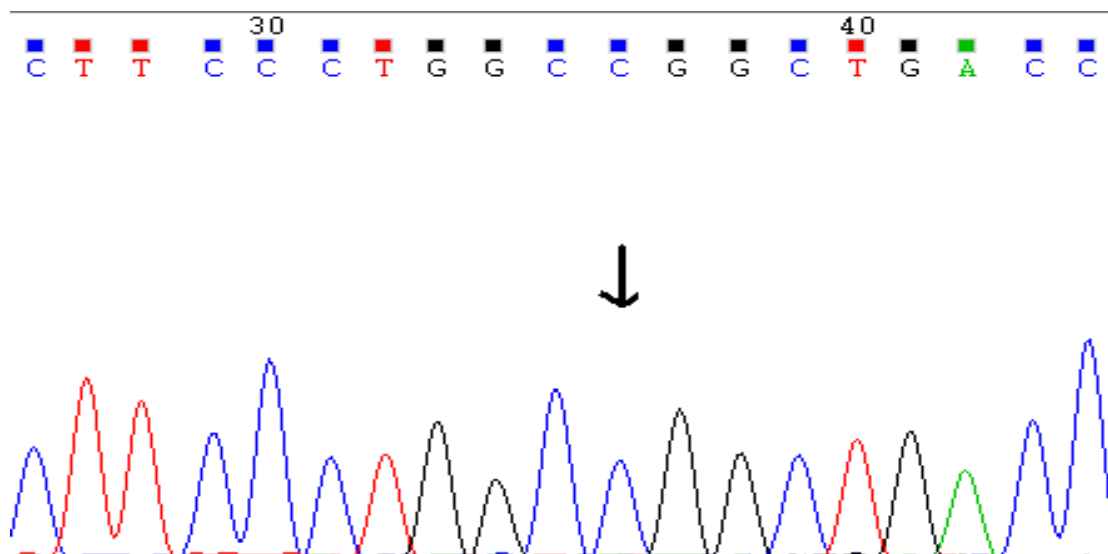


αντιδράσεις PCR. Η επιλογή των δειγμάτων έγινε τυχαία. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι η αλληλούχιση κατά Sanger. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην *in vitro* αντιγραφή του DNA παρουσία χημικά τροποποιημένων νουκλεοτιδίων, από τα οποία απουσιάζει η 3' υδροξυλομάδα (διδεοξυριβονουκλεοτίδια). Όταν ένα τέτοιο νουκλεοτίδιο ενσωματωθεί στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα, η σύνθεση της τελευταίας τερματίζεται. Τα διδεοξυριβονουκλεοτίδια σημαίνονται με φθορίζουσα χρωστική, το χρώμα της οποίας διαφέρει ανάλογα με τη βάση του αντίστοιχου νουκλεοτιδίου. Τα ποικίλου μήκους τμήματα DNA που προκύπτουν διαχωρίζονται με βάση το μήκος τους με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης και το χρωματογράφημα που προκύπτει από το φθορισμό τους αποκαλύπτει την αλληλουχία του αρχικού τμήματος DNA. Παρακάτω παρατίθενται τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του υποκινητή του *NOS3* ως προς τον πολυμορφισμό T786C:





786TC



786CC

## 2.10.Απομόνωση μονοπύρηνων περιφερικού αίματος-καλλιέργεια προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs)

Για τη μελέτη των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs), είναι αναγκαία η απομόνωση και η καλλιέργειά τους από το περιφερικό αίμα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η διάταξη αποικιών CFU-Hill 5 ημερών της εταιρίας StemCell Technologies. Χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία καλλιέργειών επικαλυμ-

μένα με ινωδονεκτίνη με 6 και 24 θέσεις καλλιέργειας και υγρό καλλιερητικό υλικό CFU-Hill αποτελούμενο από βασικό μέσο (Basal Medium) CFU-Hill και συμπληρώματα μέσου (Medium supplements) CFU-Hills σε αναλογία 4:1. Ακολουθήθηκαν οι προτεινόμενες συνθήκες του πρωτοκόλλου της εταιρίας.

### **2.11.Απομόνωση RNA από περιφερικό αίμα**

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων, απομονώθηκε RNA από περιφερικό αίμα ασθενών και μαρτύρων. Χρησιμοποιήθηκαν 2 σωληνάρια επικαλυμμένα με αντιπηκτικό EDTA και συνολικό όγκο 6mL αίματος. Ακολούθησε λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, με τη βοήθεια ειδικού διαλύματος (RCLB: Red Cell Lysis Buffer), ως εξής:

- Σε αποστειρωμένο πλαστικό σωληνάριο 50mL μεταφέρονται 6mL περιφερικού αίματος και 24mL διαλύματος RCLB. Ακολουθεί ανάμιξη με ανακίνηση του σωληναρίου και παραμονή στους 4°C για 30 λεπτά.
- Το μείγμα φυγοκεντρείται στους 4°C για 10 λεπτά στα 400g. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται με ήπια ανάδευση.
- Προστίθενται 12ml διαλύματος RCLB και ακολουθεί η ίδια διαδικασία για δύο φορές ακόμη ώστε να απομακρυνθούν πλήρως τα λυμένα ερυθρά αιμοσφαίρια.
- Το ίζημα των λευκοκυττάρων συλλέγεται και μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf 2ml.
- Η απομόνωση του RNA από τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος που έχουν παραληφθεί με την παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται με τη χρήση του kit Rneasy της Qiagen σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο της εταιρείας.

### **2.12.Σύνθεση cDNA**

Συμπληρωματικό DNA (complementary DNA: cDNA), συνετέθη με τη χρήση της συλλογής iSCRIPT cDNA synthesis kit της εταιρίας Biorad.

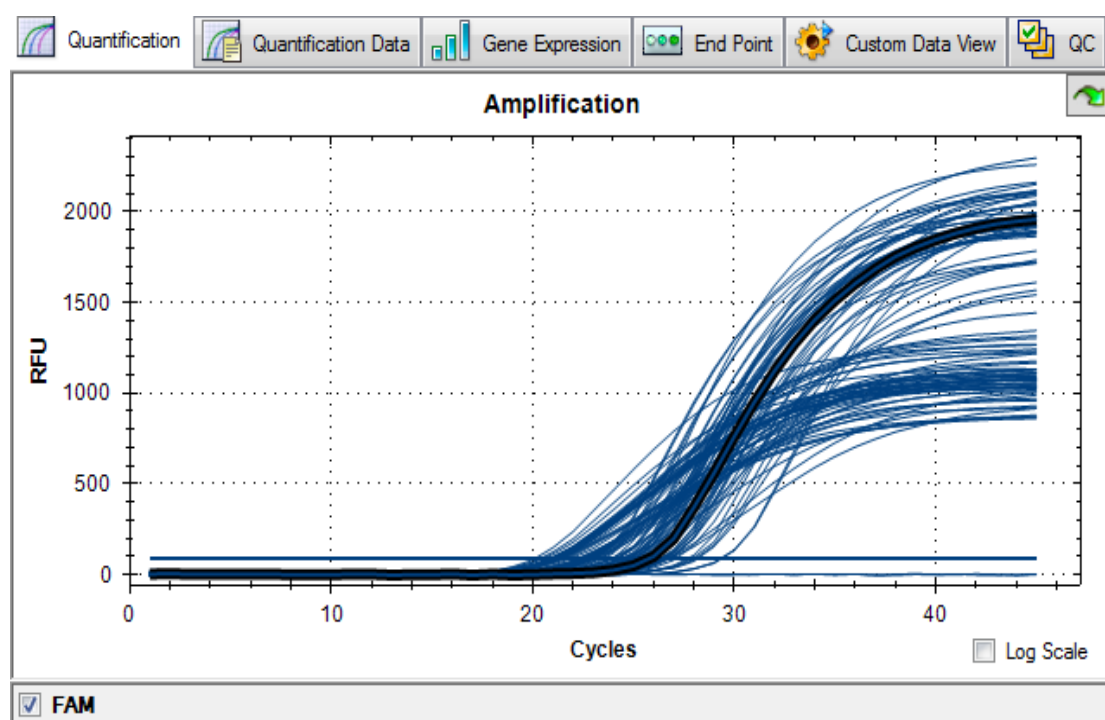
Χρησιμοποιήθηκε 1μg ολικού RNA που μετεγράφη σε cDNA σύμφωνα με τις συνθήκες του πρωτοκόλλου της εταιρίας (4μL 5x μίγματος αντίδρασης iScript που περιέχει oligo(dT) και random primers, 1μL αντίστροφης μεταγραφάσης (RNaseH+MMLV) σε τελικό όγκο 20μL). Το cDNA φυλάσσεται στους -20°C.

### **2.13. Quantitative reverse transcription real time PCR (RT-qPCR) Ποσοτικοποίηση του mRNA μέσω ανάστροφης μεταγραφής και PCR πραγματικού χρόνου.**

Η κλασική PCR, που περιγράφηκε παραπάνω, επιτρέπει την εκτίμηση του αποτελέσματος μιας αντίδρασης μόνο μετά το τέλος αυτής. Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης εφαρμόστηκε μια νεότερη εξελιγμένη μορφή της μεθόδου, η λεγόμενη ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (real-time). Η μέθοδος αυτή επιτελείται σε ειδικούς θερμικούς κυκλοποιητές με δυνατότητα ανίχνευσης φθορισμού από το μίγμα της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Ο εκλυόμενος φθορισμός είναι ανάλογος του σχηματισμού δίκλωνων μορίων DNA από την υβριδοποίηση εκκινητών-μητρικών μορίων, με αποτέλεσμα να είναι δυνατός ο προσδιορισμός σε πραγματικό χρόνο και πριν το τέλος της αντίδρασης της ποσότητας των προϊόντων αυτής. Ως πηγές φθορισμού χρησιμοποιούνται είτε χρωστικές που προσδένονται σε δίκλινα μόρια DNA, όπως γίνεται με τη SYBRGreen, είτε φθορίζοντα στοιχεία συμπληρωματικά προς τμήματα της πολλαπλασιαζόμενης αλληλουχίας DNA. Τα στοιχεία αυτά αποκαλούνται ιχνηθέτες (probes). Η εκπομπή φθορισμού από έναν ιχνηθέτη λαμβάνει χώρα μόνο μετά την αποκοπή και απομάκρυνση από το μόριο του ιχνηθέτη μιας περιοχής που συλλέγει τον εκπεμπόμενο φθορισμό και ονομάζεται quencher. Ο quencher αποκόπτεται όταν ο ιχνηθέτης υβριδοποιηθεί με μια συμπληρωματική αλληλουχία DNA με τη δράση εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης. Κατά συνέπεια, η εκπομπή φθορισμού λαμβάνει χώρα μόνο από μόρια στα οποία η Taq πολυμεράση έχει επιδράσει και οι αντίστοιχοι ανιχνευτές αποκαλούνται ιχνηθέτες υδρόλυσης (hydrolysis probes). Η qPCR με τη χρήση ιχνηθετών υδρόλυσης θεωρείται ακριβέστερη, καθώς δεν οδηγεί σε εκπομπή φθορισμού από τυχαία σχηματιζόμενα δίκλινα DNA όπως τα διμερή εκκινητών [187]. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές-φθορίζοντες ανιχνευτές υδρόλυσης-εκκινητές TaqMan™ της εταιρίας Applied Biosystems / ThermoFisher Scientific και ο θερμικός κυκλοποιητής CFX-96 της Biorad. Από το ολικό cDNA που σχηματίστηκε με αντίστροφη μεταγραφή όπως περιγράφεται στο εδάφιο 2.11, πολλαπλασιάστηκαν εκλεκτικά τα μόρια που αντιστοιχούν στο mRNA που προκύπτει από τη μεταγραφή των γονιδίων *NOS3*, *SOD2*, *HIF1A* και *PPARGC1A*. Το cDNA που αντιστοιχεί στο γονίδιο *GAPDH* χρησιμοποιήθηκε για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των

υπό μελέτη γονιδίων (housekeeping gene, διαχειριστικό γονίδιο). Οι εκκινητές-ιχνηθέτες για καθένα από τα μελετούμενα γονίδια αναφέρονται στο παράρτημα.

Για κάθε μελετούμενο γονίδιο, από την qPCR προκύπτει ο αριθμός του κύκλου της αντίδρασης κατά τον οποίο ο εκπεμπόμενος φθορισμός ξεπερνά ένα ορισμένο επίπεδο (10 σταθερές αποκλίσεις από την τιμή φθορισμού υποβάθρου). Η τιμή του κύκλου αυτού, που είναι φυσικός αριθμός, συμβολίζεται ως  $C_t$  ή  $C_q$  και τείνει να είναι μικρότερη όσο περισσότερο εκφράζεται το αντίστοιχο μόριο mRNA στο αρχικό δείγμα. Η διαφορά μεταξύ του  $C_t$  του υπό μελέτη γονιδίου από το  $C_t$  του γονιδίου αναφοράς συμβολίζεται ως  $\Delta C_t$  ή  $\Delta C_q$ , είναι ακέραιος αριθμός και αντιστοιχεί στη διαφορά του επιπέδου έκφρασης μεταξύ των δυο γονιδίων. Για την αρχική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό CFX Manager™ της Biorad, από το οποίο προέρχεται και η παρακάτω εικόνα-γραφική παράσταση αποτελέσματος αντίδρασης. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε όπως έχει περιγραφεί από τους Livak και Schmittgen (2008) [188].



## **2.14.Μετατροπή του DNA με όξινο θειώδες νάτριο -Προσδιορισμός της μεθυλίωσης σε CpG νησίδια**

Για τον προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης συγκεκριμένων περιοχών DNA, χρησιμοποιήθηκε η ειδική για μεθυλίωση PCR (MSP) με κατάλληλα σχεδιασμένους εκκινητές, μετά από κατεργασία των δειγμάτων με όξινο θειώδες νάτριο. Η τελευταία τεχνική έγινε με τη βοήθεια του EZ Methylation kit της εταιρίας Zymo και βασίζεται στην ικανότητα του όξινου θειώδους νατρίου να μετατρέπει τα μη μεθυλιωμένα κατάλοιπα κυτοσίνης σε ουρακίλη, επιφέροντας συγκεκριμένες αλλαγές στην πρωτοταγή δομή του DNA. Αντίθετα, τα μεθυλιωμένα κατάλοιπα κυτοσίνης είναι ανθεκτικά στην τροποποίηση και δεν αλλάζουν. Η τεχνική περιγράφηκε αρχικά από τους Frommer et al. (1992) [189]. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο της εταιρίας Zymo.

## **2.15.Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ειδική στη μεθυλίωση (MSP)**

Η MSP (Methylation-Specific PCR) περιγράφηκε από τους Herman et al (1996) ως μια ευαίσθητη και ειδική μέθοδος για την ανάδειξη της κατάστασης μεθυλίωσης συγκεκριμένων νησιδίων CpG του γονιδιώματος [190]. Αξιοποιεί την περιγραφείσα παραπάνω κατεργασία με όξινο θειώδες νάτριο και βασίζεται στο σχεδιασμό δυο διαφορετικών ζευγών εκκινητών για κάθε μελετούμενη θέση. Το ένα ζεύγος υβριδοποιείται εκλεκτικά με τη μη μεθυλιωμένη αλληλουχία στην οποία τα μη μεθυλιωμένα κατάλοιπα κυτοσίνης έχουν μετατραπεί σε ουρακίλη (συμβολισμός U: Unmethylated) και το άλλο με τη μεθυλιωμένη, στην οποία τα κατάλοιπα κυτοσίνης παραμένουν ως έχουν (συμβολισμός M: Methylated). Σε κάθε εκκινητή αντιστοιχούν 1-3 νησίδια CpG στην 3' περιοχή του [191]. Τόσο για το *NOS3*, όσο και για το *SOD2*, επελέγησαν περιοχές πλούσιες σε CpG, των οποίων η κατάσταση μεθυλίωσης φαίνεται από προγενέστερες έρευνες να σχετίζεται με τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Η σχεδίαση των εκκινητών έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού MethPrimer 1.1 [192]. Για τα γονίδια *NOS3* και *SOD2*, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές της εταιρίας Invitrogen:

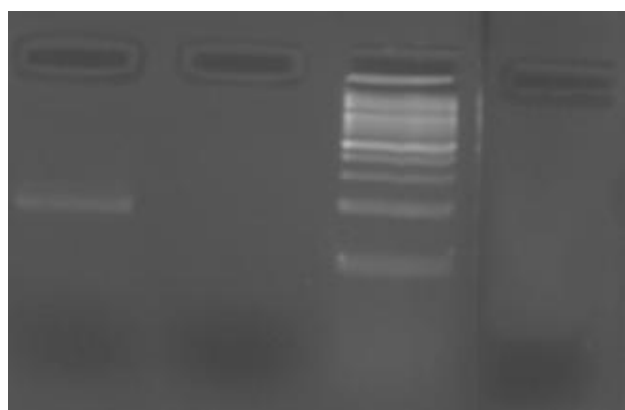
Γονίδιο	Εκκινητής - Αλληλουχία	Μεθυλίωση (Ναι/όχι)	Θέση στο γονίδιο	Μήκος προϊόντος
SOD2	GTAATGGCGATAGTGGTCGTATC (forward)	Ναι	2376	193
SOD2	GTCTACGCAAACCTAAACTACCGAA (reverse)	Ναι	2543	
SOD2	GGTAATGGTGATAGTGGTTGTATTG (forward)	Όχι	2375	196
SOD2	CATCTACACAAACTAAACTACCAAA (reverse)	Όχι	2544	
NOS3	TTGAGGTTTTAGAGTTTTTTAGT CG	Ναι	2565	195
NOS3	TCAAATTACCCATATTACTATAC GTC	Ναι	2733	
NOS3	TGAGGTTTTAGAGTTTTTTAGTT GG	Όχι	2566	195
NOS3	TTCAAATTACCCATATTACTATA CATC	Όχι	2734	
NOS3	GGGTTATAAAGAGTTAGGGATTT TC	Ναι	-2000	201
NOS3	CTCCATAATACCAAAAAAACGAC	Ναι	-1822	
NOS3	GGTATAAAGAGTTAGGGATTTT TGT	Όχι	-1999	202
NOS3	CCCTCCATAATACCAAAAAACA	Όχι	-1820	

Το μίγμα της αντίδρασης περιελάμβανε: 2,5μL ρυθμιστικού διαλύματος 10X, 1,25μL MgCl<sub>2</sub> συγκέντρωσης 2,5mM, 1μL από κάθε εκκινητή (10pmols), 0,5μL δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) με συγκέντρωση 800μM, 0,12μL DNA πολυμεράσης Platinum Taq (0,6IU/L) και δις αποσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 25μL. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή T-100™ (Biorad). Αρχικά το DNA αποδιατάχθηκε με θέρμανση για 10 λεπτά στους 95°C. Στη συνέχεια, παρέμεινε στους 94°C για 40 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη μεταξύ των κύκλων). Η υβριδοποίηση των εκκινητών έγινε με ψύξη στους 55°C (U) και στους 57°C (M) για 30 δευτερόλεπτα και η επιμήκυνση έγινε με θέρμανση στους 72°C για 50 δευτερόλεπτα. Οι τρεις αυτές φάσεις επαναλήφθηκαν 30 φορές. Ακολούθησε μια φάση τελικής επιμήκυνσης στους 72°C για 5 λεπτά και το προϊόν ψύχθηκε στους 4°C. Το

αποτέλεσμα της αντίδρασης προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, όπως αποτυπώνεται παρακάτω:



300U      HAECU      NegU      100bp ladder



300M      HAECM      100bp ladder      NegM

## 2.16. Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη βοήθεια φύλλων δεδομένων excel (.xls) και spss (.sav). Για τα ποιοτικά δεδομένα υπολογίστηκαν οι συχνότητες εμφάνισής τους σε διάφορες ομάδες ασθενών/υγιών και η μεταξύ τους σύγκριση έγινε με τις δοκιμασίες  $\chi^2$  κατά Pearson και Fischer, αναλόγως του αριθμού των συγκρινόμενων παρατηρήσεων. Για τη σύγκριση της κατανομής των πολυμορφισμών μεταξύ διαφόρων ομάδων, χρησιμοποιήθηκε το πλήρες, το επικρατές, το υπολειπόμενο μοντέλο, η σύγκριση των ετεροζυγωτών και η σύγκριση της



συχνότητας των αλληλομόρφων. Για τα ποσοτικά δεδομένα, υπολογίστηκαν η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση ως μέτρα της θέσης και της διασποράς τους αντίστοιχα. Η απόκλισή τους από την κανονική κατανομή ελέγχθηκε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov, ενώ κατά τη σύγκριση ποσοτικών δεδομένων μεταξύ δυο ομάδων, η ισότητα των διακυμάνσεων ελέγχθηκε με τη δοκιμασία F κατά Levene. Αναλόγως του αριθμού των συγκρινόμενων ομάδων και των αποτελεσμάτων των παραπάνω δοκιμασιών, επελέγη η κατάλληλη δοκιμασία σύγκρισης μέσων τιμών. Για σύγκριση μεταξύ δυο κανονικά κατανεμημένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία t κατά Student για ανεξάρτητα δείγματα, ενώ η σύγκριση μεταξύ τριών ομάδων έγινε με τη δοκιμασία ANOVA (Analysis of Variance). Για μη κανονικά κατανεμημένα δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες U κατά Mann-Whitney και Kruskal-Wallis για δύο και τρεις ομάδες δειγμάτων αντίστοιχα.

### **3.Αποτελέσματα**

#### **3.1.Δημογραφικά -Κλινικά χαρακτηριστικά**

Μελετήθηκαν 80 ασθενείς, 26 άνδρες και 54 γυναίκες, ηλικίας  $48.8 \pm 11.5$  ετών (25-76 έτη) και 57 υγιείς μάρτυρες. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δυο ομάδες, βάσει του γονοτύπου τους ως προς το γονίδιο της β-σφαιρίνης. Η μια ομάδα περιελάμβανε τους ασθενείς των οποίων ο γονότυπος προδιαθέτει σε βαρύτερη κλινικά μορφή της νόσου, συγκεκριμένα τους ομοζυγώτες για το  $\beta^S$  γονίδιο και τους σύνθετους ετεροζυγώτες  $\beta^S/\beta^0$ . Η άλλη ομάδα περιελάμβανε τους ασθενείς με γονότυπο  $\beta^S/\beta^+$ ,  $\beta^S/\beta^{Lepore}$  και  $\beta^S/\delta\beta$ . Σε αυτούς τους ασθενείς, η παραγωγή αιμοσφαιρίνης πέραν της HbS σε σημαντική ποσότητα (HbA, HbLepore, HbF αντίστοιχα) τείνει να κάνει την κλινική πορεία πιο ήπια. Η πρώτη ομάδα (ομάδα 1) περιελάμβανε 34 ασθενείς, ενώ η δεύτερη (ομάδα 2) 46. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Όπως φαίνεται, οι ασθενείς της ομάδας 1 εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη πιθανότητα νοσηλείας κατά το τελευταίο έτος λόγω αγγειοαποφρακτικής κρίσης, παρά τη λήψη της βέλτιστης ανεκτής θεραπείας (υδροξυουρία, αφαιμάξεις, μεταγγίσεις). Επιπλέον, εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά συχνότερα άτονα έλκη κνημών και επιπλοκές

σχετιζόμενες με την αιμόλυση (πριαπισμός, άτονα έλκη, ιστορικό πνευμονικής υπέρτασης). Άλλες επιπλοκές, όπως το οξύ θωρακικό σύνδρομο και η άσηπτη νέκρωση οστών, τείνουν να εμφανίζονται συχνότερα στους ασθενείς της ομάδας 1, αλλά η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, επιπλοκές όπως η παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια, τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, η χολολιθίαση, η φλεβική θρομβοεμβολική νόσος (εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση και πνευμονική εμβολή), η αποφρακτική νόσος των αεραγωγών (άσθμα και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια), η οστεομυελίτιδα, ο χρόνιος πόνος, η οστεοπόρωση εμφανίζονται με παραπλήσια συχνότητα και στις δυο ομάδες ασθενών της μελέτης, ενώ για κάποιες από τις επιπλοκές αυτές ο μικρός αριθμός των πασχόντων δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

<b>Χαρακτηριστικά</b>	<b>Ομάδα 1 n=34</b>	<b>Ομάδα 2 n=46</b>	<b>P</b>
<b>Δημογραφικά δεδομένα</b>			
<b>Φύλο</b>			0.16
Ανδρες	8	18	
Γυναίκες	26	28	
<b>Ηλικία</b>	50.8±9.4	47.6±12.7	0.29
<b>Κάπνισμα</b>	3	4	1
<b>Κλινικά δεδομένα</b>			
Χολοκυστεκτομή/ χολολιθίαση	10	13	0.96
Σπληνεκτομή	8	6	0.24
Φλεβική θρομβοεμβολική Νόσος	4	4	0.72
Αποφρακτική νόσος των αεραγωγών	3	3	1
Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο	2 (ισχαιμικά)	2 (1 ισχαιμικό, 1 αιμορραγικό)	1

Οστεομυελίτιδα	4	5	1
>1 νοσηλεία το τελευταίο έτος λόγω αγγειοαποφρακτικής κρίσης	21	17	0.04
Χρόνιος πόνος	9	10	0.66
Παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια	13	13	0.38
Άτονα έλκη κνημών	11	5	0.02
Επιπλοκές σχετιζόμενες με την αιμόλυση	13	7	0.02
Άσηπτη νέκρωση οστών	19	18	0.16
Οστεοπόρωση	5	8	0.72
Σπληνικός εγκλωβισμός	4	6	1
Οξύ Θωρακικό Σύνδρομο	17	15	0.14

### 3.2.Εργαστηριακά ευρήματα

Οι μέσες τιμές και οι αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις ορισμένων εργαστηριακών παραμέτρων των ασθενών αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα. Όπως φαίνεται, οι ασθενείς της ομάδας 1 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες τιμές αιματοκρίτη, αιμοσφαιρίνης και στατιστικά σημαντικά υψηλότερες απόλυτες και επί τοις εκατό τιμές δικτυοερυθροκυττάρων (ΔΕΚ) και αιμοσφαιρίνης S. Επίσης, τείνουν να παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), ολικής και έμμεσης χολερυθρίνης και C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), αλλά οι διαφορές δε φθάνουν το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%. Άλλες

εργαστηριακές παράμετροι, όπως τα λευκά αιμοσφαίρια (WBCs), τα αιμοπετάλια (PLTs), η αιμοσφαιρίνη F (HbF), η αιμοσφαιρίνη A2 (HbA2), η φερριτίνη, η βιταμίνη B12, το φυλλικό οξύ, η κρεατινίνη δε φαίνεται να διαφέρουν ουσιωδώς μεταξύ των δυο ομάδων ή παρουσιάζουν τόσο μεγάλη διακύμανση ώστε οι όποιες διαφορές είναι αδύνατο να αξιολογηθούν. Τέλος, οι ασθενείς της ομάδας 1 εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα Β-νατριουρητικού πεπτιδίου (BNP) σε σχέση με τους ασθενείς της ομάδας 2, παρά τον αποκλεισμό κατά την ανάλυση όσων εμφάνιζαν κάποιο γνωστό αίτιο αύξησης του συγκεκριμένου δείκτη πλην της πνευμονικής υπέρτασης (καρδιακή ανεπάρκεια, κολπική μαρμαρυγή, κλπ).

<b>Εργαστηριακές παράμετροι</b>	<b>Ομάδα 1</b>	<b>Ομάδα 2</b>	<b>P</b>
Hct	26.4±4.2	29.8±4.8	0.005
Hb	8.56±1.29	9.73±1.74	0.006
HbS	78.8±7.2	71.8±8.9	0.005
HbF	11.8±7.2	9.6±7.5	0.230
HbA2	3.90±1.05	4.08±1.04	0.520
WBCs	7970±2210	7720±3130	0.810
PLTs	335000±202000	250000±137000	0.200
ΔΕΚ%	7.89±3.55	4.11±2.34	0.005
ΔΕΚ	236071±82022	166973±75226	0.010
LDH	456±184	373±129	0.160
Ολική χολερυθρίνη	2.73±1.89	1.95±1.33	0.150
Έμμεση χολερυθρίνη	1.74±1.08	1.39±1.21	0.390
Κρεατινίνη	0.72±0.15	0.82±0.38	0.320
Ολική χοληστερόλη	143.3±42.2	158.7±31.2	0.500
HDL	47.5±20.3	48.3±8.2	0.92
Τριγλυκερίδια	121.7±34.5	114.4±35.7	0.76
Αλβουμίνη	4.62±0.22	4.18±0.15	0.23
Γ σφαιρίνες	18.3±0.49	1.30±0.30	0.05
Ομοκυστεΐνη	10.0±4.7	8.3±3.2	0.56

Σίδηρος ορού	71.67±41.05	78.13±39.23	0.82
Φερριτίνη	616±730	405±1085	0.36
Βιταμίνη B12	428±184	413±251	0.86
Φυλλικό οξύ	17.3±6	17±5	0.88
CRP	5.0±2.7	4.6±2.2	0.71
BNP	88.4±27.0	39.0±15.4	0.004

### 3.3.Υπερηχοκαρδιογραφικά ευρήματα

Στον παρακάτω πίνακα αποτυπώνονται τα ευρήματα του υπερηχοκαρδιογραφικού ελέγχου των ασθενών των ομάδων 1 και 2 και η μεταξύ τους σύγκριση.

Παράμετρος	Ομάδα 1	Ομάδα 2	P
EF<50%	0	0	
TRV	2.89±0.44	2.70±0.2	0.39
PASP	40.9±9.8	34.9±4.2	0.233

Στη συνέχεια, συγκρίθηκαν οι τιμές των εργαστηριακών παραμέτρων των ασθενών και των δυο ομάδων με υπερηχοκαρδιογραφικές ενδείξεις πνευμονικής υπέρτασης (TRV>2.8m/s) με αυτές των υπολοίπων ασθενών που δεν είχαν ενδείξεις πνευμονικής υπέρτασης. Ο παρακάτω πίνακας αποτυπώνει τις αντίστοιχες μέσες τιμές-σταθερές αποκλίσεις και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας P για τους ασθενείς των δυο ομάδων που υποβλήθηκαν σε απομόνωση RNA για μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των *SOD2*, *PPARGC1A*, *HIF1A*.

Εργαστηριακές παράμετροι	TRV>2.5m/s	TRV<2.5m/s	P
Hct	26.70±5.57	26.83±4.54	0.96
Hb	8.50±1.35	8.9±1.68	0.67
HbS	78.5±3.7	74.2±8.7	0.356
HbF	11.8±7.2	9.7±8.8	0.667

HbA2	3.6±1.8	3.7±1.1	0.90
WBCs	7880±1220	8030±2500	0.91
PLTs	519300±193500	285100±171700	0.032
ΔΕΚ%	8.03±2.62	7.11±4.44	0.737
ΔΕΚ	219000±27100	244600±102400	0.68
LDH	457±258	409±153	0.665
Ολική χολερυθρίνη	1.53±0.71	3.34±2.79	0.294
Έμμεση χολερυθρίνη	1.05±0.56	2.24±2.39	0.414
Κρεατινίνη	0.85±0.31	0.68±0.13	0.45
Φερριτίνη	1379±1096	289±283	0,002
Βιταμίνη B12	320±94	464±273	0,393
Φυλλικό οξύ	14,5±9,5	19±3,5	0,502
CRP	5,2±2,7	4,6±1,9	0,629
BNP	95,0±4,24	65,6±38,2	0,07

### 3.4. Πολυμορφισμοί NOS3

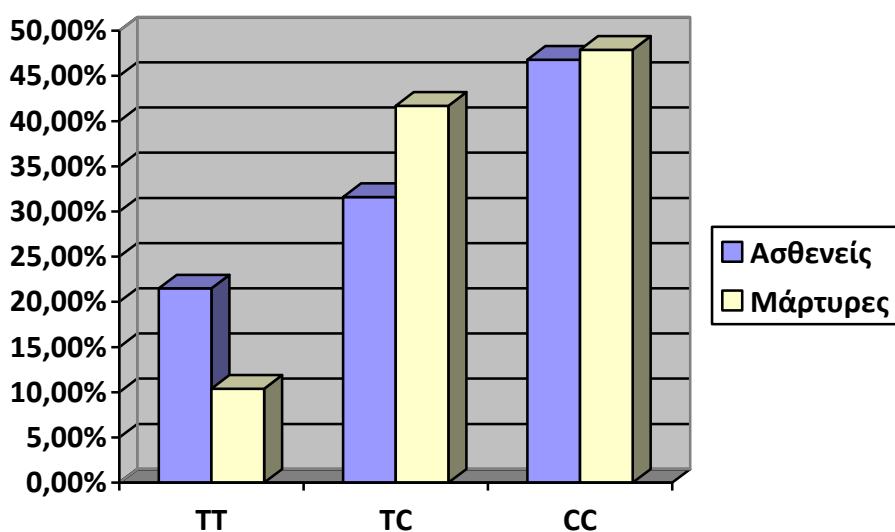
#### 3.4.1. T786C

Η συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων TT, TC και CC στους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες για τον πολυμορφισμό T786C απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα. Όπως προκύπτει, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων μεταξύ των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

	Γονότυποι			Αλληλόμορφα		P
	TT	TC	CC	T	C	
<b>T786C</b>						
Ασθενείς n =79	17 21.5%	25 31.6%	37 46.8%	0.373	0.627	0.226
Μάρτυρες n=48	5 10.4%	20 41.7%	23 47.9%	0.313	0.687	

Γονότυποι	Συχνότητες		P
	Ασθενείς n=79	Μάρτυρες n=48	
TT vs TC+CC	21.5% vs 78.5%	10.4% vs 89.6%	0.173
CC vs TT+TC	46.8% vs 53.2%	47.9% vs 52.1%	0.906
TT vs TC	40.5% vs 59.5%	20% vs 80%	0.084
Αλληλόμορφα			
T vs C	37.3% vs 62.7%	31.3% vs 68.7%	0.324

Το παρακάτω διάγραμμα αποτυπώνει την αναλογία των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό T786C μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων.



Στους παρακάτω πίνακες αποτυπώνεται η κατανομή των γονοτύπων των ασθενών των ομάδων 1 και 2 ως προς τον πολυμορφισμό T786C, ανάλογα με τα κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία-ευρήματα. Τα P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub> αντιστοιχούν στα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας για τη σύγκριση των ασθενών με γονοτύπους TT+TC σε σχέση με αυτούς με γονότυπο CC.

Χαρακτηριστικά	Ομάδα 1					Ομάδα 2				
<b>Δημογραφικά δεδομένα</b>										
	n	Γονότυποι			P <sub>1</sub>	n	Γονότυποι			P <sub>2</sub>
		ΠΠ	TC	CC			ΠΠ	TC	CC	
Ασθενείς	<b>34</b>	8	13	13		<b>45</b>	8	13	24	
Άνδρες	<b>8</b>	3	2	3		<b>17</b>	4	5	8	
Γυναίκες	<b>26</b>	5	11	10	1	<b>28</b>	4	8	16	0.51
<b>Κλινικά δεδομένα</b>										
>1 νοσηλεία το τελευταίο έτος λόγω αγγειοαποφρακτικής κρίσης	<b>21</b>	5	7	9	0.72	<b>17</b>	1	8	8	0.51
Χρόνιος πόνος	<b>9</b>	3	1	5	0.25	<b>10</b>	0	5	5	1.00
Παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια	<b>13</b>	3	2	8	0.03	<b>13</b>	2	5	6	0.54
Άτονα έλκη κνημών	<b>11</b>	3	3	5	0.55	<b>5</b>	0	1	4	0.35
TRV>2.8m/s	<b>10</b>	3	4	3	0.46	<b>5</b>	0	3	2	0.65
Επιπλοκές σχετιζόμενες με την αιμόλυση	<b>12</b>	3	3	6	0.30	<b>7</b>	0	2	5	0.42
Άσηπτη νέκρωση οστών	<b>19</b>	5	5	9	0.3	<b>18</b>	2	6	10	0.81
Οστεοπόρωση	<b>5</b>	2	2	1	0.63	<b>8</b>	0	4	4	1.0
Σπληνικός εγκλωβισμός	<b>4</b>	1	2	1	1.00	<b>6</b>	1	3	2	0.4
Οξύ Θωρακικό Σύνδρομο	<b>17</b>	5	3	9	0.1	<b>15</b>	1	6	8	1.0



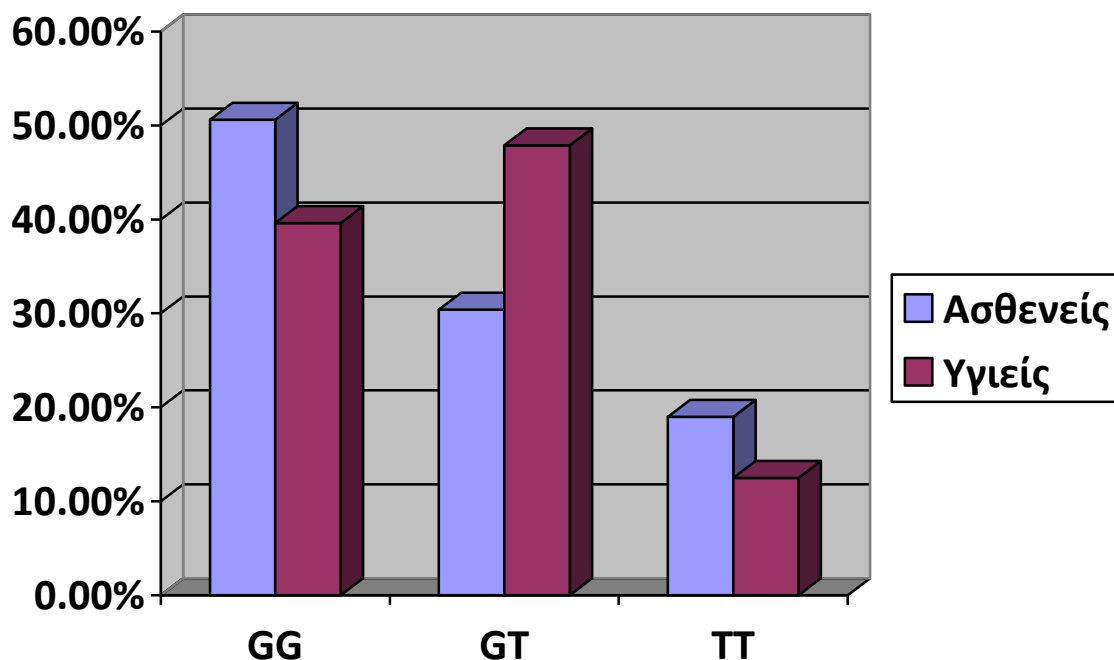
Εργαστηριακά ευρήματα	Ομάδα 1			Ομάδα 2		
	Γονότυποι		P <sub>3</sub>	Γονότυποι		P <sub>4</sub>
	TT+TC	CC		TT+TC	CC	
Hct	26.2±3.9	26.9±4.9	0.98	29.6±6.0	29.6±4. 1	0.12
HbS	78.1±7.8	79.9±6.1	0.22	73.9±4.5	70.2±11 .0	0.42
HbF	12.5±7.7	10.7±6.4	0.54	8.4±6.5	10.5±8. 2	0.25
WBCs	7800±22 00	8300±24 00	0.96	6180±24 00	8100±2 300	0.03
PLTs	360500± 217400	310900± 198400	0.85	153300± 94000	250100 ±11810 0	0.06
ΔΕΚ%	9.4±3.5	5.6±2.4	0.25	3.7±2.3	4.5±2.4	0.26
ΔΕΚ	260700± 91900	191800± 34100	0.15	143000± 57500	186900 ±84500	0.17
LDH	462±174	444±221	0.04	421±123	340±12 7	0.2
Ολική χολερυθρίνη	3.2±2.2	2.0±0.8	0.19	2.1±1.8	1.8±1.0	0.19
Κρεατινίνη	0.68±0.1 2	0.85±0.2 6	0.26	0.74±0.1 4	0.66±0. 14	0.98

### 3.4.2. G894T

Η συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων GG, GT και TT στους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες για τον πολυμορφισμό G894T απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα. Όπως προκύπτει, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων μεταξύ των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

G894T	Γονότυποι			Αλληλόμορφα		P
	GG	GT	TT	G	T	
Ασθενείς n =79	40 50.6%	24 30.4%	15 19.0%	0.658	0.342	0.134
Μάρτυρες n=48	19 39.6%	23 47.9%	6 12.5%	0.636	0.364	
Συχνότητες						
Γονότυποι	Ασθενείς n=79		Μάρτυρες n=48		P	
GG vs GT+TT	50.6% vs 49.4%		39.6% vs 60.4%		0.226	
TT vs GG+GT	19.0% vs 81.0%		12.5% vs 87.5%		0.340	
GG vs GT	62.5% vs 37.5%		45.2% vs 54.8%		0.080	
Αλληλόμορφα						
G vs T	65.8% vs 34.2%		63.6% vs 36.4%		0.712	

Το παρακάτω γράφημα αποτυπώνει την ποσοστιαία αναλογία των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό G894T μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων.



Στους παρακάτω πίνακες αποτυπώνεται η κατανομή των γονοτύπων των ασθενών των ομάδων 1 και 2 ως προς τον πολυμορφισμό G894T, ανάλογα με τα κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία-ευρήματα. Τα  $P_1$ ,  $P_2$  αντιστοιχούν στα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας για τη σύγκριση μεταξύ των ασθενών με γονότυπο GG σε σχέση με αυτούς με γονοτύπους GT+TT, ενώ τα  $P_3$ ,  $P_4$  αντιστοιχούν στα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας για τη σύγκριση μεταξύ των ασθενών με γονοτύπους GG+GT σε σχέση με αυτούς με γονότυπο TT.

Χαρακτηριστικά	Ομάδα 1					Ομάδα 2				
Δημογραφικά δεδομένα										
	n	Γονότυποι			P <sub>1</sub>	n	Γονότυποι			P <sub>2</sub>
		GG	GT	TT			GG	GT	TT	
Ασθενείς	<b>34</b>	18	9	7		<b>45</b>	22	15	8	
Άνδρες	<b>8</b>	4	1	3		<b>17</b>	8	5	4	
Γυναίκες	<b>26</b>	14	8	4	0.85	<b>28</b>	14	10	4	0.85
Κλινικά δεδομένα										
>1 νοσηλεία το τελευταίο έτος λόγω αγγειοαποφρακτικής κρίσης	<b>21</b>	11	6	4	0.93	<b>17</b>	7	5	5	0.42
Χρόνιος πόνος	<b>9</b>	5	2	2	1	<b>10</b>	4	3	3	0.72
Παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια	<b>13</b>	5	5	3	0.29	<b>13</b>	8	2	3	0.34
Άτονα έλκη κνημών	<b>11</b>	5	4	2	0.72	<b>5</b>	3	1	1	0.67
TRV>2.8m/s	<b>10</b>	7	2	1	0.64	<b>5</b>	3	0	2	0.21
Επιπλοκές σχετιζόμενες με την αιμόλυση	<b>12</b>	6	4	2	0.80	<b>7</b>	4	2	1	0.70
Άσηπτη νέκρωση οστών	<b>19</b>	9	6	4	0.46	<b>18</b>	10	4	4	0.47
Οστεοπόρωση	<b>5</b>	3	1	1	1	<b>8</b>	4	3	1	1
Σπληνικός εγκλωβισμός	<b>4</b>	3	1	0	0.60	<b>6</b>	3	1	2	1
Οξύ Θωρακικό Σύνδρομο	<b>17</b>	8	5	4	0.49	<b>15</b>	8	5	2	0.75

Εργαστηριακά ευρήματα	Ομάδα 1			Ομάδα 2		
	Γονότυποι		P <sub>3</sub>	Γονότυποι		P <sub>4</sub>
	GG+GT	TT		GG+GT	TT	
Hct	25.7±4.1	29.4±3.4	0.02	29.3±5.1	31.5±4. 5	0.41
HbS	79.1±7.9	77.6±4.0	0.41	71.6±9.5	72.9±5. 3	0.85
HbF	11.7±7.6	12.3±5.6	0.80	9.5±7.6	10.0±7. 5	0.74
WBCs	8300±24 00	6900±11 00	0.42	7150±26 00	8450±7 00	0.05
PLTs	318300± 187400	414000± 290000	0.77	192500± 112300	343500 ±16300	0.11
ΔΕΚ%	8.4±3.7	5.9±2.5	0.58	4.1±2.5	4.2±2.0	0.67
ΔΕΚ	247300± 87500	198000± 47700	0.58	161800± 77600	184600 ±71600	0.49
LDH	428±174	555±221	0.59	404±122	269±98	0.12
Ολική χολερυθρίνη	2.8±21	2.4±0.5	0.73	1.9±1.2	2.2±1.8	0.53
Κρεατινίνη	0.72±0.1 8	0.77±0.2 5	0.92	0.66±0.1 4	0.85±0. 06	0.06

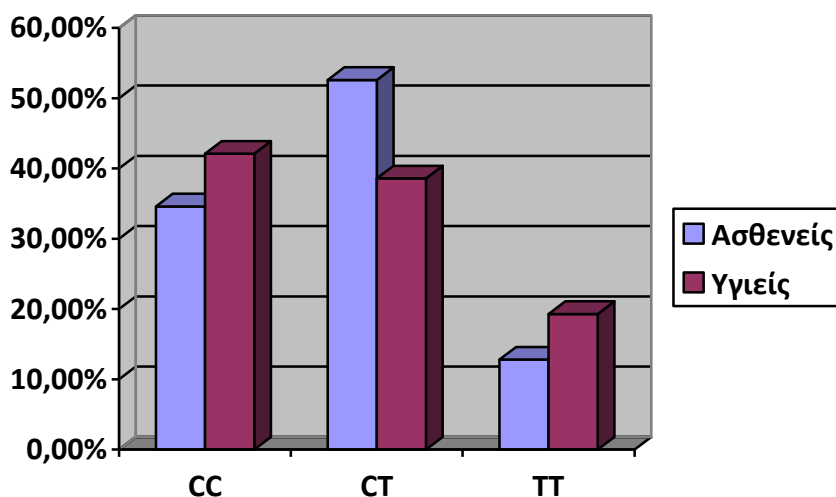
### 3.5. Πολυμορφισμοί *MTHFR*

#### 3.5.1. C677T

Η συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων CC, CT και TT στους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες για τον πολυμορφισμό C677T απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα. Όπως προκύπτει, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων μεταξύ των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

C677T	Γονότυποι			Αλληλόμορφα		P
	CC	CT	TT	C	T	
Ασθενείς n =78	27 34.6%	41 52.6%	10 12.8%	0.609	0.391	0.252
Μάρτυρες n=57	24 42.1%	22 38.6%	11 19.3%	0.614	0.386	
<b>Συχνότητες</b>						
Γονότυποι	Ασθενείς n=78		Μάρτυρες n=57		P	
CC vs CT+TT	34.6% vs 65.4%		42.1% vs 57.9%		0.375	
TT vs CC+CT	12.8% vs 87.2%		19.3% vs 80.7%		0.305	
CC vs CT	39.7% vs 60.3%		52.2% vs 47.8%		0.189	
Αλληλόμορφα						
C vs T	60.9% vs 39.1%		61.4% vs 38.6%		0.933	

Το παρακάτω γράφημα είναι ενδεικτικό της κατανομής των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό C677T μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων.



Στους παρακάτω πίνακες αποτυπώνεται η κατανομή των γονοτύπων των ασθενών των ομάδων 1 και 2 ως προς τον πολυμορφισμό *MTHFR* C677T, ανάλογα με τα κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία-ευρήματα. Τα  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$  αντιστοιχούν στα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας για τη σύγκριση των ασθενών με γονότυπο CC σε σχέση με αυτούς με γονότυπο CT+TT.

Χαρακτηριστικά	Ομάδα 1				Ομάδα 2					
Δημογραφικά δεδομένα										
	n	Γονότυποι			$P_1$	n	Γονότυποι			$P_2$
		CC	CT	TT			CC	CT	TT	
Ασθενείς	<b>33</b>	13	17	4		<b>45</b>	14	25	6	
Άνδρες	<b>8</b>	3	5	0		<b>17</b>	5	8	4	
Γυναίκες	<b>25</b>	10	11	4	1.0	<b>28</b>	9	17	2	0.85

Κλινικά δεδομένα										
>1 νοσηλεία το τελευταίο έτος λόγω αγγειοαποφρακτικής κρίσης	<b>20</b>	9	10	1	0.49	<b>17</b>	5	9	3	0.85
Χρόνιος πόνος	<b>9</b>	4	4	1	0.71	<b>10</b>	1	8	1	0.14
Παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια	<b>12</b>	5	6	1	0.84	<b>13</b>	3	9	1	0.72
Άτονα έλκη κνημών	<b>11</b>	3	7	1	0.31	<b>5</b>	2	3	0	0.64
TRV>2.8m/s	<b>9</b>	3	6	0	1.0	<b>5</b>	1	3	1	1.0
Επιπλοκές σχετιζόμενες με την αιμόλυση	<b>12</b>	4	7	1	0.72	<b>7</b>	3	3	1	0.66
Άσηπτη νέκρωση οστών	<b>18</b>	8	9	1	0.52	<b>18</b>	7	9	2	0.36
Οστεοπόρωση	<b>5</b>	2	2	1	1.0	<b>8</b>	2	5	1	1.0
Σπληνικός εγκλωβισμός	<b>4</b>	0	3	1	0.14	<b>6</b>	2	4	0	1.0
Οξύ Θωρακικό Σύνδρομο	<b>16</b>	6	9	1	0.83	<b>15</b>	6	7	2	0.36



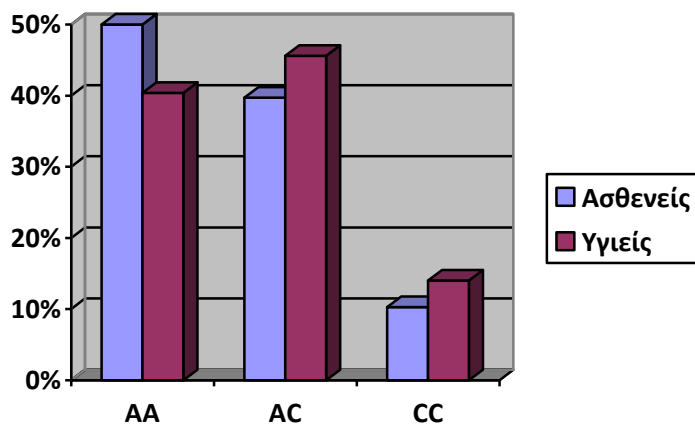
Εργαστηριακά ευρήματα	Ομάδα 1			Ομάδα 2		
	Γονότυποι		P <sub>3</sub>	Γονότυποι		P <sub>4</sub>
	CC	CT+TT		CC	CT+TT	
Hct	25.3±4.7	27.2±3.8	0.27	31.03±6. 5	29.0±4. 2	0.30
HbS	77.9±9.1	79.3±5.1	0.63	72.9±9.5	71.3±10 .1	0.61
HbF	13.1±9.2	11.0±5.8	0.47	9.3±8.5	9.7±7.2	0.88
WBCs	7000±22 10	8550±21 30	0.21	7620±25 40	7600±2 980	0.99
PLTs	402000± 305800	305000± 137700	0.53	174100± 84300	253400 ±13930 0	0.15
ΔΕΚ%	7.7±4.2	8.1±3.3	0.85	3.0±4.6	4.6±2.5	0.14
ΔΕΚ	226300± 83800	243400± 85600	0.72	131500± 62900	180300 ±76900	0.18
LDH	499±186	450±184	0.65	313±101	401±13 4	0.14
Ολική χολερυθρίνη	2.0±0.7	3.7±2.3	0.11	2.1±1.1	1.9±1.4	0.73
Κρεατινίνη	0.69±0.1 2	0.71±0.2 0	0.86	0.66±0.1 5	0.71±0. 14	0.49

### 3.5.2. A1298C

Η συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων AA, AC και CC στους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες για τον πολυμορφισμό A1298C απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα. Όπως προκύπτει, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων μεταξύ των ασθενών και των υγιών μαρτύρων.

A1298C	Γονότυποι			Αλληλόμορφα		P
	AA	AC	CC	A	C	
Ασθενείς n =78	39 50%	31 39.7%	8 10.3%	0.699	0.301	0.513
Μάρτυρες n=57	23 40.4%	26 45.6%	8 14%	0.632	0.368	
<b>Συχνότητες</b>						
Γονότυποι	Ασθενείς n=78		Μάρτυρες n=57		P	
AA vs AC+CC	50% vs 50%		40.4% vs 59.6%		0.266	
CC vs AA+AC	10.3% vs 89.7%		14% vs 86%		0.502	
AA vs AC	55.7% vs 44.3%		46.9% vs 53.1%		0.346	
Αλληλόμορφα						
A vs C	69.9% vs 30.1%		63.2% vs 36.8%		0.246	

Το ακόλουθο γράφημα απεικονίζει την ποσοστιαία αναλογία μεταξύ των γονοτύπων για τον πολυμορφισμό A1298C στους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες.



Στους παρακάτω πίνακες αποτυπώνεται η κατανομή των γονοτύπων των ασθενών των ομάδων 1 και 2 ως προς τον πολυμορφισμό *MTHFR* A1298C, ανάλογα με τα κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία-ευρήματα. Τα P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub> αντιστοιχούν στα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας για τη σύγκριση των ασθενών με γονότυπο AA σε σχέση με αυτούς με γονότυπο AC+CC.

Χαρακτηριστικά	Ομάδα 1				Ομάδα 2					
Δημογραφικά δεδομένα										
	n	Γονότυποι			P <sub>1</sub>	n	Γονότυποι			P <sub>2</sub>
		AA	AC	CC			AA	AC	CC	
Ασθενείς	<b>33</b>	18	11	4		<b>45</b>	21	20	4	
Άνδρες	<b>8</b>	3	3	2		<b>17</b>	8	7	2	
Γυναίκες	<b>25</b>	15	8	2	0.72	<b>28</b>	13	13	2	0.97

<b>Κλινικά δεδομένα</b>										
>1 νοσηλεία το τελευταίο έτος λόγω αγγειοαποφρακτικής κρίσης	<b>20</b>	12	7	1	0.44	<b>17</b>	10	5	2	0.20
Χρόνιος πόνος	<b>9</b>	5	4	0	1.0	<b>10</b>	5	4	1	0.81
Παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια	<b>12</b>	5	6	1	0.26	<b>13</b>	7	5	1	0.54
Άτονα έλκη κνημών	<b>11</b>	7	4	0	0.71	<b>5</b>	2	3	0	1.0
TRV>2.8m/s	<b>9</b>	4	4	1	0.7	<b>5</b>	4	1	0	0.17
Επιπλοκές σχετιζόμενες με την αιμόλυση	<b>12</b>	7	4	1	0.74	<b>7</b>	3	3	1	1.0
Άσηπτη νέκρωση οστών	<b>18</b>	10	7	1	0.90	<b>18</b>	9	7	2	0.71
Οστεοπόρωση	<b>5</b>	4	1	0	0.35	<b>8</b>	6	2	0	0.12
Σπληνικός εγκλωβισμός	<b>4</b>	3	1	0	0.61	<b>6</b>	3	2	1	1.0
Οξύ Θωρακικό Σύνδρομο	<b>16</b>	10	6	0	0.37	<b>15</b>	9	4	2	0.21

Εργαστηριακά ευρήματα	Ομάδα 1			Ομάδα 2		
	Γονότυποι		P <sub>3</sub>	Γονότυποι		P <sub>4</sub>
	AA	AC+CC		AA	AC+CC	
Hct	25.1±4.4	28.2±3.4	0.07	30.1±4.3	29.2±5. 6	0.61
HbS	80.4±7.3	76.4±6.7	0.17	69.6±12. 1	73.5±4. 8	0.22
HbF	9.9±7.2	14.4±6.6	0.11	10.4±8.6	8.9±6.6	0.54
WBCs	8940±19 40	6670±19 90	0.05	8270±31 60	6950±2 220	0.32
PLTs	331200± 189500	346500± 240000	0.89	288300± 139300	156800 ±61600	0.07
ΔΕΚ%	8.6±4.2	6.7±2.2	0.38	4.3±2.3	3.8±2.4	0.63
ΔΕΚ	266900± 95500	195000± 34400	0.08	176100± 77400	153800 ±74400	0.51
LDH	462±199	490±163	0.79	347±120	404±13 8	0.31
Ολική χολερυθρίνη	3.2±2.3	2.4±0.7	0.45	1.8±1.3	2.1±1.5	0.65
Κρεατινίνη	0.68±0.1 4	0.72±0.1 9	0.65	0.72±0.1 5	0.66±0. 14	0.37

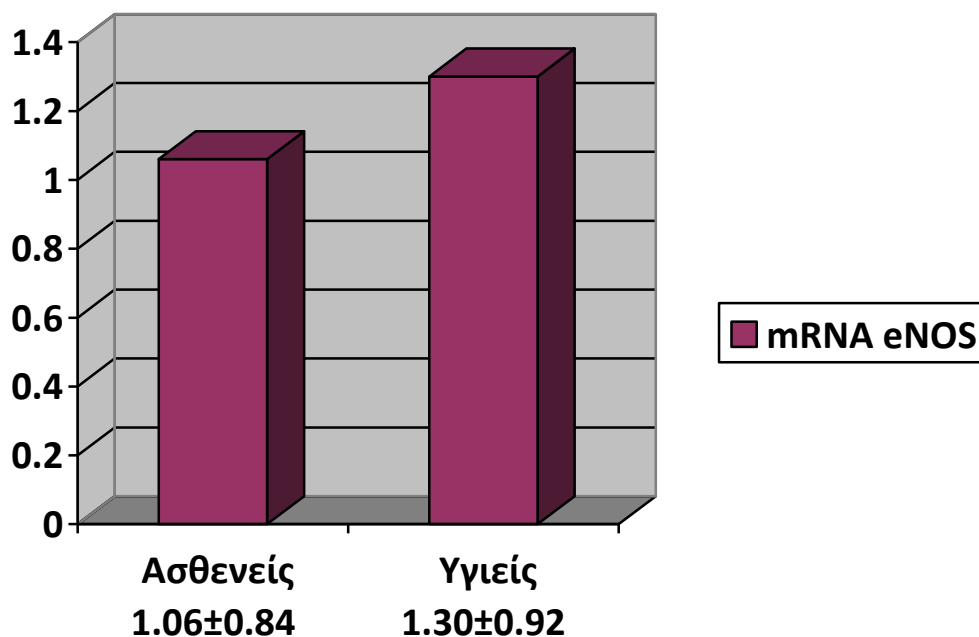
### 3.6. Καλλιέργεια προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (EPCs)

Η εφαρμογή του πρωτοκόλλου Hill για την ανάπτυξη προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων από υγιείς μάρτυρες οδήγησε στην ανάπτυξη αποικιών μετά από 5 ημέρες καλλιέργειας, όπως προβλέπεται από το πρωτόκολλο. Αντίθετα, στους πάσχοντες από ΔN, δεν κατέστη εφικτή η καλλιέργεια EPCs με βάση το ίδιο πρωτόκολλο, ούτε και με τη χρήση εναλλακτικών θρεπτικών υλικών, πιθανώς λόγω μειωμένης παρουσίας αυτών

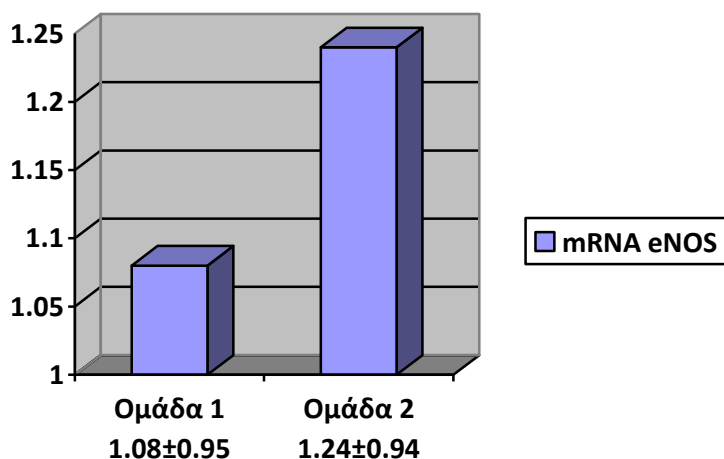
στο περιφερικό αίμα ή μειωμένου δυναμικού πολλαπλασιασμού των EPCs του περιφερικού αίματος των ασθενών. Οι Rodrigo et al. (2013) επισήμαναν το μειωμένο αριθμό EPCs στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΔN [186], παρατήρηση που είναι σύμφωνη με την παραπάνω δική μας. Επιπλέον, ορισμένοι από τους ασθενείς που μελετήθηκαν ελάμβαναν υδροξυουρία, ουσία που μειώνει περαιτέρω το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων.

### 3.7.Επίπεδα mRNA NOS3

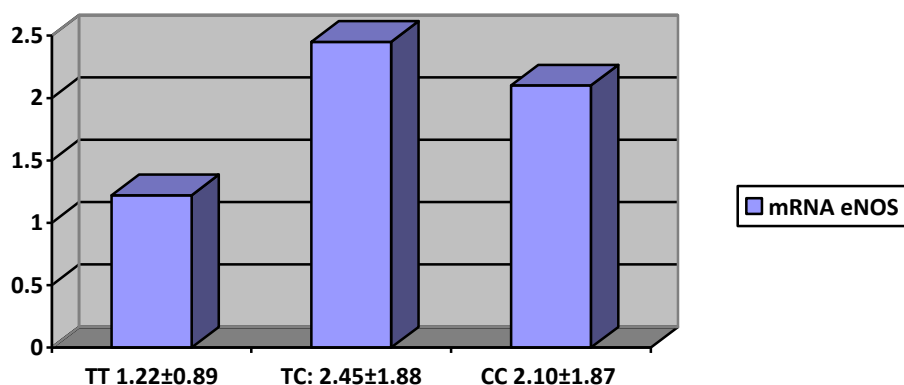
Η έκφραση του γονιδίου *NOS3* προσδιορίστηκε σε 18 πάσχοντες από ΔN και σε 9 υγιείς εθελοντές. Από τους ασθενείς, 9 ανήκαν στην ομάδα 1 (γονότυπος ως προς το β-γονίδιο της αιμοσφαιρίνης S/S και β<sup>0</sup>/S) και 9 στην ομάδα 2 (γονότυπος ως προς το β-γονίδιο της αιμοσφαιρίνης β<sup>+</sup>/S, Lepore/S, δβ/S). Επίσης, ο γονότυπος των ασθενών ως προς τον πολυμορφισμό T786C του υποκινητή του γονιδίου *NOS3* ήταν: TT:5, TC:5, CC:8. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του γονιδίου σε επίπεδο mRNA μεταξύ ασθενών και υγιών, με τους τελευταίους ως ομάδα αναφοράς (ασθενείς: 1.06±0.84, υγιείς: 1.30±0.92, P=0.11), όπως αποτυπώνεται και στο ακόλουθο γράφημα:



Η έκφραση της eNOS δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά ούτε μεταξύ των ασθενών των ομάδων 1 και 2, με την ομάδα 2 ως ομάδα αναφοράς (ομάδα 1:  $1.08 \pm 0.95$ , ομάδα 2:  $1.24 \pm 0.94$ ,  $P=0.71$ ), όπως φαίνεται παρακάτω:



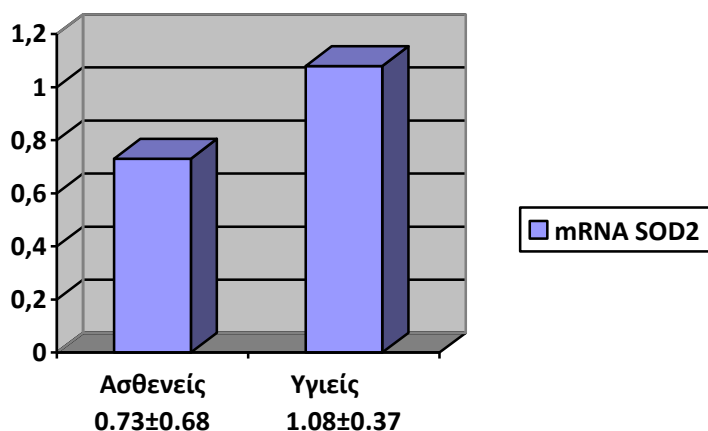
Τέλος, στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα του mRNA του *NOS3* το περιφερικό αίμα δε συσχετίστηκαν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με το γονότυπο ως προς τη θέση -786 στον υποκινητή του γονιδίου. Ως ομάδα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν οι ασθενείς με γονότυπο TT. Συγκεκριμένα, η έκφραση του γονιδίου με βάση τον πολυμορφισμό T786C είχε ως εξής: TT:  $1.22 \pm 0.89$ , TC:  $2.45 \pm 1.88$ , CC:  $2.10 \pm 1.87$   $P=0.45$ ):



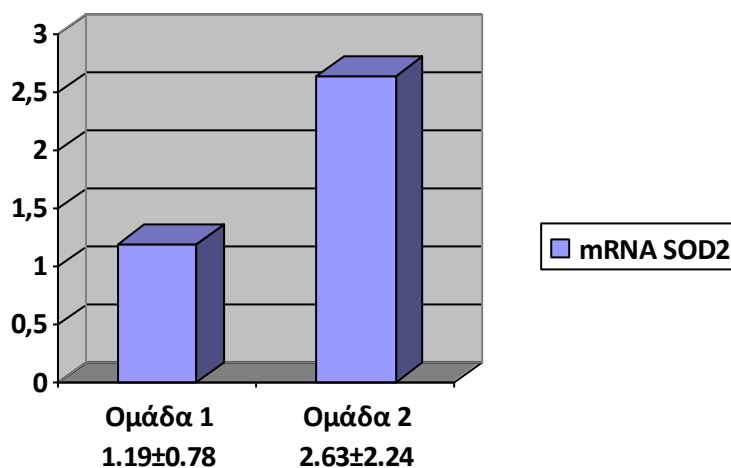
### 3.8.Επίπεδα mRNA *SOD2*

Η σχέση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *SOD2* σε σχέση με αυτά του γονιδίου *GAPDH* στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς ήταν  $0.73 \pm 0.68$ ,

P=0.008 (Mann-Whitney U-test). Η σημαντική αυτή διαφορά απεικονίζεται γλαφυρότερα στο παρακάτω διάγραμμα:



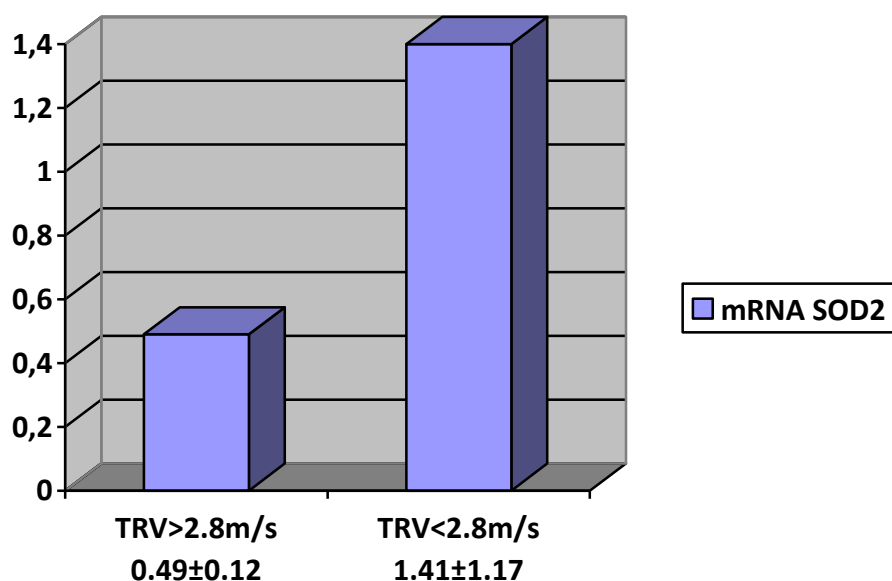
Όταν συγκρίθηκαν οι ασθενείς των ομάδων 1 (9 ασθενείς) και 2 (12 ασθενείς), με τους ασθενείς της ομάδας 1 να θεωρούνται ομάδα αναφοράς, οι ασθενείς της ομάδας 2 έτειναν να εμφανίζουν υψηλότερη έκφραση του *SOD2* από αυτούς της ομάδας 1, αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα, η σχέση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *SOD2* σε σχέση με αυτά του γονιδίου *GAPDH* στους ασθενείς της ομάδας 2 σε σχέση με τους ασθενείς της ομάδας 1 ήταν 2.63±2.24, P=0.110 (Mann-Whitney U-test).



Ακολούθως, συγκρίθηκε η έκφραση της *SOD2* σε επίπεδο mRNA μεταξύ των ασθενών που εμφανίζουν πνευμονική υπέρταση με υπερηχοκαρδιογραφικά



κριτήρια (6 ασθενείς) και αυτών που δεν εμφανίζουν (15 ασθενείς). Οι ασθενείς με TRV μεγαλύτερη από 2.8m/s έτειναν να εμφανίζουν μειωμένο επίπεδο mRNA *SOD2* σε σχέση με αυτούς με τιμές TRV μικρότερες των 2.8m/s και μάλιστα σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Συγκεκριμένα, η σχέση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *SOD2* σε σχέση με αυτά του γονιδίου *GAPDH* στους ασθενείς με TRV>2.8m/s σε σχέση με τους ασθενείς με TRV<2.8m/s ήταν  $0.49 \pm 0.12$ ,  $P=0.036$  (Mann-Whitney U-test).



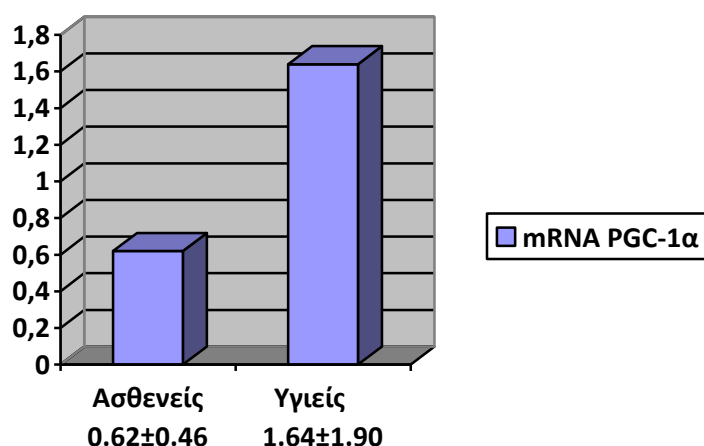
Στη συνέχεια, μελετήθηκε με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης η σχέση ανάμεσα στη  $\Delta C_T$ , που μαθηματικά ισούται με  $-3.32 \log[\text{mRNA}_{SOD2}]/[\text{mRNA}_{GAPDH}]$ , με τις εργαστηριακές παραμέτρους που μελετήθηκαν. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του  $\Delta C_T$ , τόσο μικρότερη είναι και η τιμή του λόγου της έκφρασης του *SOD2* προς το *GAPDH*, ενώ αρνητικές τιμές αντιστοιχούν σε υψηλότερη έκφραση *GAPDH* σε σχέση με το *SOD2*. Οι τιμές του συντελεστή παλινδρόμησης B, το αντίστοιχο τυπικό σφάλμα και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας για την κάθε μεταβλητή αποτυπώνεται στον παρακάτω πίνακα:

<b>Εργαστηριακές παράμετροι</b>	<b>B</b>	<b>S.E.B</b>	<b>P</b>
Hct	-1.19	0.84	0.18
Hb	-0.34	0.32	0.3
HbS	0.88	1.57	0.58
HbF	1.73	1.63	0.31
HbA2	-0.22	0.23	0.36
WBCs	83.4	468.7	0.86
PLTs	69170	37041	0.08
ΔΕΚ%	2.44	0.55	0.001
ΔΕΚ	47001	14511	0.005
LDH	30.7	31.9	0.35
Ολική χολερυθρίνη	1.02	0.45	0.04
Έμμεση χολερυθρίνη	0.89	0.37	0.03
Κρεατινίνη	0.0	0.03	0.96
Ολική χοληστερόλη	10.8	7.5	0.18
HDL	1.5	3.1	0.64
Τριγλυκερίδια	10.8	7.9	0.20
Αλβουμίνη	0.06	0.04	0.18
Γ σφαιρίνες	0.07	0.09	0.46
Ομοκυστεΐνη	0.69	1.18	0.59
Σίδηρος ορού	6.97	8.1	0.41
Φερριτίνη	254.9	129.3	0.07
Βιταμίνη Β12	-18.62	51.3	0.72
Φυλλικό οξύ	-0.22	1.0	0.83
CRP	0.79	0.49	0.12
BNP	23.5	5.5	0.003

Όπως προκύπτει, η έκφραση του *SOD2* σε επίπεδο mRNA σχετίζεται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με τον απόλυτο αριθμό δικτυοερυθροκυττάρων και με την ποσοστιαία αναλογία αυτών στο περιφερικό αίμα, με την έμμεση και με την ολική χολερυθρίνη, οι τιμές των οποίων αποτελούν δείκτες αιμόλυσης στο περιφερικό αίμα. Αντίθετα, δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την αφυδρογονάση του γαλακτικού (LDH), επίσης δείκτη αιμόλυσης, πιθανώς λόγω της ευρείας διακύμανσης και της έλλειψης ειδικότητας του τελευταίου. Παρατηρείται ακόμη στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του *SOD2* με την τιμή του νατριουρητικού πεπτιδίου τύπου Β (BNP), ενώ η συσχέτιση με τον αιματοκρίτη (Hct), τον αριθμό των αιμοπεταλίων, τη φερριτίνη και τη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) δεν εμφανίζει στατιστική σημαντικότητα στο επίπεδο 5%.

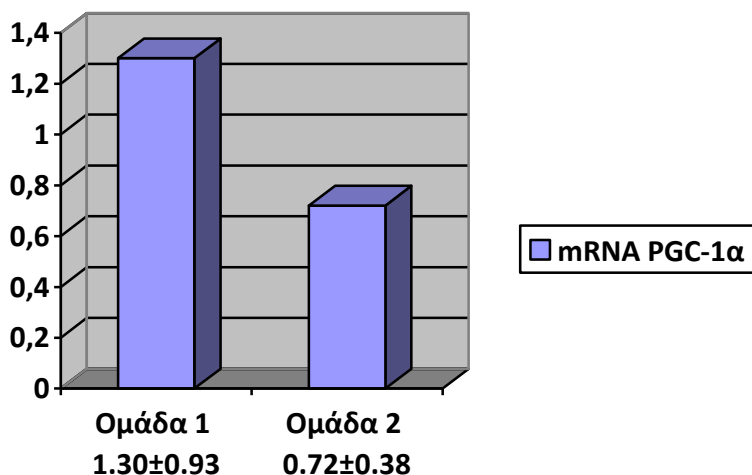
### 3.9.Επίπεδα mRNA *PPARGC1A*

Η σχέση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *PPARGC1A* σε σχέση με αυτά του γονιδίου *GAPDH* στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς ήταν  $0.62 \pm 0.46$ ,  $P=0.029$  (Mann-Whitney U-test), όπως αποτυπώνεται στο ακόλουθο διάγραμμα:

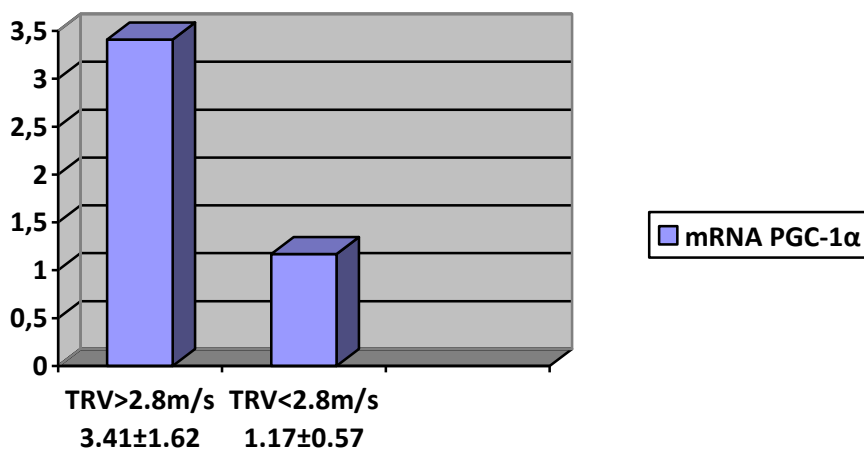


Όταν συγκρίθηκαν οι ασθενείς των ομάδων 1 (9 ασθενείς) και 2 (12 ασθενείς), με τους ασθενείς της ομάδας 1 να θεωρούνται ομάδα αναφοράς, οι ασθενείς

της ομάδας 2 έτειναν να εμφανίζουν χαμηλότερη έκφραση του *PPARGC1A* από αυτούς της ομάδας 1, αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Συγκεκριμένα, η σχέση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *PPARGC1A* σε σχέση με αυτά του γονιδίου *GAPDH* στους ασθενείς της ομάδας 2 σε σχέση με τους ασθενείς της ομάδας 1 ήταν  $0.72 \pm 0.38$ ,  $P=0.214$  (Mann-Whitney U-test):



Η σχέση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *PPARGC1A* σε σχέση με αυτά του γονιδίου *GAPDH* στους ασθενείς με  $TRV > 2.8 \text{ m/s}$  σε σχέση με τους ασθενείς με  $TRV < 2.8 \text{ m/s}$ , με τους τελευταίους ως ομάδα αναφοράς ήταν  $3.41 \pm 1.62$ ,  $P=0.08$  (Mann-Whitney U-test):



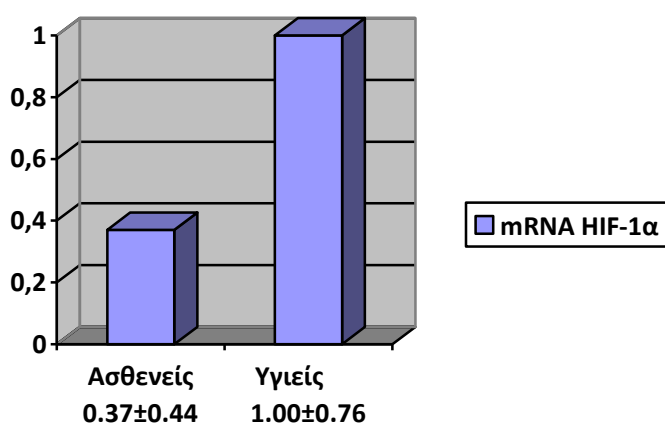
Στη συνέχεια, μελετήθηκε με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης η σχέση ανάμεσα στη  $\Delta C_T$ , που μαθηματικά ισούται με  $-3.32 \log[\text{mRNA}_{PPARGC1A}]/[\text{mRNA}_{GAPDH}]$ , με τις εργαστηριακές παραμέτρους που μελετήθηκαν. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του  $\Delta C_T$ , τόσο μικρότερη είναι και η τιμή του λόγου της έκφρασης του *PPARGC1A* προς το *GAPDH*, ενώ αρνητικές τιμές αντιστοιχούν σε υψηλότερη έκφραση *GAPDH* σε σχέση με το *PPARGC1A*. Οι τιμές του συντελεστή παλινδρόμησης *B*, το αντίστοιχο τυπικό σφάλμα και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας για την κάθε μεταβλητή αποτυπώνεται στον παρακάτω πίνακα:

<b>Εργαστηριακές παραμέτροι</b>	<b>B</b>	<b>S.E.<sub>B</sub></b>	<b>P</b>
Hct	0.86	1.1	0.45
Hb	0.18	0.41	0.66
HbS	0.56	1.97	0.78
HbF	-1.03	2.09	0.63
HbA2	0.21	0.54	0.55
WBCs	-604.2	570.7	0.31
PLTs	-99047	45114	0.04
ΔΕΚ%	-0.73	1.04	0.49
ΔΕΚ	-263	23855	0.99
LDH	29.5	41.4	0.49
Ολική χολερυθρίνη	0.57	0.65	0.39
Έμμεση χολερυθρίνη	0.08	0.56	0.88
Κρεατινίνη	-0.07	0.04	0.11
Ολική χοληστερόλη	-18.6	9.1	0.065
HDL	-8.62	2.41	0.005
Τριγλυκερίδια	11.6	10.5	0.29

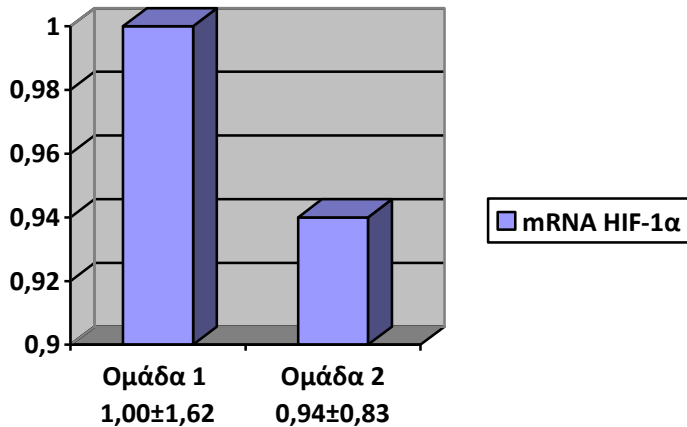
Αλβουμίνη	0.04	0.06	0.52
Γ σφαιρίνες	0.05	0.12	0.67
Ομοκυστεΐνη	-1.34	2.99	0.67
Σίδηρος ορού	0.35	12.41	0.98
Φερριτίνη	-433.2	130.4	0.004
Βιταμίνη Β12	126.2	54.7	0.025
Φυλλικό οξύ	-0.48	1.26	0.71
CRP	-0.24	0.63	0.71
BNP	-14.3	13.8	0.33

### 3.10.Επίπεδα mRNA *HIF1A*

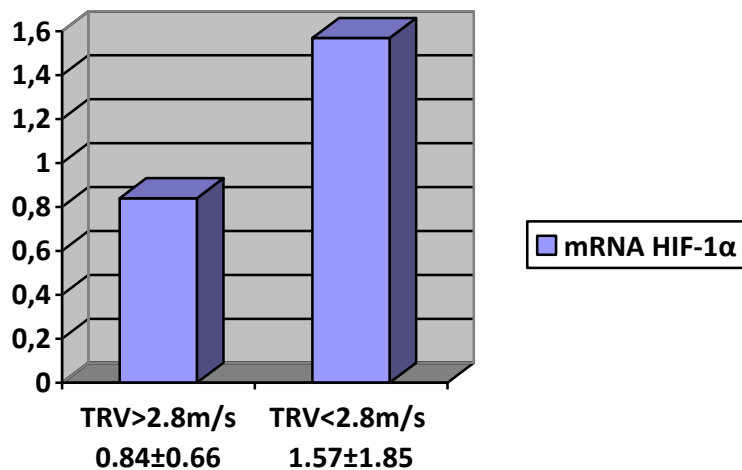
Η σχέση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *HIF1A* σε σχέση με αυτά του γονιδίου *GAPDH* στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς ήταν  $0.37 \pm 0.44$ ,  $P=0.007$  (Mann-Whitney U-test):



Όταν συγκρίθηκαν οι ασθενείς των ομάδων 1 (9 ασθενείς) και 2 (12 ασθενείς), με τους ασθενείς της ομάδας 1 να θεωρούνται ομάδα αναφοράς, οι ασθενείς των δυο ομάδων εμφάνιζαν παραπλήσιο επίπεδο έκφρασης του *HIF1A*. Συγκεκριμένα, η σχέση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *HIF1A* σε σχέση με αυτά του γονιδίου *GAPDH* στους ασθενείς της ομάδας 2 σε σχέση με τους ασθενείς της ομάδας 1 ήταν  $0.94 \pm 0.83$ ,  $P=0.703$  (Mann-Whitney U-test).



Κατά τη σύγκριση των επιπέδων mRNA *HIF1A* μεταξύ των ασθενών με  $TRV > 2.8 \text{ m/s}$  (6 ασθενείς) και αυτών με  $TRV < 2.8 \text{ m/s}$  (11 ασθενείς), με τους τελευταίους ως ομάδα αναφοράς, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Συγκεκριμένα, η σχέση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *HIF1A* σε σχέση με αυτά του γονιδίου *GAPDH* στους ασθενείς με υπερηχοκαρδιογραφικές ενδείξεις πνευμονικής υπέρτασης σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς τέτοιες ενδείξεις ήταν  $0.84 \pm 0.66$ ,  $P = 0.516$  (Mann-Whitney U-test).



Στη συνέχεια, μελετήθηκε με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης η σχέση ανάμεσα στη  $\Delta C_T$ , που μαθηματικά ισούται με  $-3.32 \log[\text{mRNA}_{HIF-1a}]/[\text{mRNA}_{GAPDH}]$ , με τις εργαστηριακές παραμέτρους που μελετήθηκαν. Όσο

μικρότερη είναι η τιμή του  $\Delta C_T$ , τόσο μικρότερη είναι και η τιμή του λόγου της έκφρασης του *HIF1A* προς το *GAPDH*, ενώ αρνητικές τιμές αντιστοιχούν σε υψηλότερη έκφραση *GAPDH* σε σχέση με το *HIF1A*. Οι τιμές του συντελεστή παλινδρόμησης B, το αντίστοιχο τυπικό σφάλμα και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας για την κάθε μεταβλητή αποτυπώνεται στον παρακάτω πίνακα:

<b>Εργαστηριακές παράμετροι</b>	<b>B</b>	<b>S.E.<sub>B</sub></b>	<b>P</b>
Hct	0.68	0.8	0.42
Hb	0.19	0.29	0.52
HbS	-3.02	1.21	0.03
HbF	2.59	1.63	0.31
HbA2	0.29	0.22	0.23
WBCs	120.1	407.9	0.77
PLTs	26756	41244	0.53
ΔΕΚ%	-1.43	0.64	0.05
ΔΕΚ	-28673	16103	0.1
LDH	-4.5	37.4	0.91
Ολική χολερυθρίνη	-0.31	0.39	0.48
Έμμεση χολερυθρίνη	-0.05	0.15	0.76
Κρεατινίνη	0.0	0.04	0.97
Ολική χοληστερόλη	-1.0	10.5	0.93
HDL	-0.6	4.1	0.89
Τριγλυκερίδια	13.6	9.2	0.18
Αλβουμίνη	0.06	0.04	0.18
Γ σφαιρίνες	0.07	0.09	0.46
Ομοκυστεΐνη	1.04	0.99	0.35
Σίδηρος ορού	6.51	12.46	0.62



Φερριτίνη	-57.2	157.4	0.72
Βιταμίνη B12	-38.2	18.1	0.52
Φυλλικό οξύ	-1.42	0.83	0.12
CRP	-0.26	0.44	0.56
BNP	-5.2	7.2	0.5

### 3.11.Μεθυλίωση *NOS3* και *SOD2*

Η εφαρμογή της ευαίσθητης στη μεθυλίωση PCR ως προς τα γονίδια *NOS3* και *SOD2* σε κύτταρα-θετικούς μάρτυρες (που είναι γνωστό πως εκφράζουν τα συγκεκριμένα γονίδια, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτής-HAECs, οδήγησε σε εμφάνιση μπάντας προϊόντος στα σωληνάρια με τους ειδικούς για μη μεθυλιωμένο DNA εκκινητές, αλλά όχι σε αυτά με τους ειδικούς για μεθυλιωμένο DNA. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την ικανότητα των σχεδιασμένων εκκινητών να διακρίνουν στην πράξη τις μεθυλιωμένες από τις αμεθυλιώτες αλληλουχίες. Η εφαρμογή της ίδιας μεθόδου στα λευκά αιμοσφαίρια τόσο των ασθενών με δρεπανοκυτταρική νόσο όσο και των υγιών μαρτύρων οδήγησε στην εμφάνιση μπάντας προϊόντος τόσο με τους ειδικούς για μεθυλιωμένες όσο και με τους ειδικούς για μη μεθυλιωμένες αλληλουχίες εκκινητές. Κατά συνέπεια, φαίνεται ότι τόσο οι ασθενείς όσο και οι υγιείς εμφανίζουν στο περιφερικό αίμα τις μεθυλιωμένες και τις αμεθυλιώτες μορφές των συγκεκριμένων ρυθμιστικών αλληλουχιών που μελετήθηκαν.

## 4.Συζήτηση

### 4.1.Οι πολυμορφισμοί T786C και G894T του NOS3, κλινικοί και εργαστηριακοί συσχετισμοί

Η ΔN χαρακτηρίζεται από μεγάλη κλινική ετερογένεια: το φάσμα της κλινικής βαρύτητας εκτείνεται από τις σχεδόν ασυμπτωματικές μορφές με άτυπα επεισόδια “μυοσκελετικού” πόνου με ή χωρίς χρόνια αναιμία και λίγες/μεμονωμένες χρόνιες επιπλοκές που δύσκολα εγείρουν την υπόνοια της νόσου ως τις έντονα συμπτωματικές μορφές με πολλές αγγειοαποφρακτικές κρίσεις, συχνές νοσηλείες, συχνή λήψη μεταγγίσεων συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων, σοβαρές χρόνιες επιπλοκές και σοβαρή επιδείνωση της ποιότητας και μείωση της διάρκειας της ζωής. Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες ευθύνονται για τις διαφορές αυτές. Παρά την εντατική ερευνητική προσπάθεια των τελευταίων δεκαετιών όμως, λίγοι τέτοιοι παράγοντες έχουν καλώς τεκμηριωμένη επίδραση. Μεταξύ αυτών, ο απλότυπος (haplotype) αντιπροσωπεύει την ύπαρξη ορισμένου συνδυασμού πολυμορφισμών στο χρωμόσωμα που φέρει το μεταλλαγμένο S γονίδιο και σχετίζεται με την απώτατη καταγωγή του ασθενούς, αλλά και με την κλινική βαρύτητα της νόσου [193]. Έτσι, πάσχοντες από ορισμένες γεωγραφικές περιοχές τείνουν να εμφανίζουν ηπιότερη/βαρύτερη κλινική εικόνα και χαρακτηριστικό πρότυπο έκφρασης των αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης, π.χ. αυξημένη HbF. Όμως, η διαφορά στον απλότυπο αδυνατεί να ερμηνεύσει τη διαφορά στην κλινική βαρύτητα μεταξύ πασχόντων της ίδιας εθνολογικής προέλευσης, που ενίοτε είναι σημαντική. Άλλος παράγοντας διαφοροποίησης της κλινικής εικόνας είναι ο ακριβής γονότυπος ως προς το άλλο (non-S) β-γονίδιο. Η συνύπαρξη του S γονιδίου με ένα β γονίδιο που παράγει άλλη παθολογική β αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης (π.χ. γονίδιο Lepore) ή κάποια ποσότητα φυσιολογικής β αλύσου (θαλασσαιμικό γονίδιο) ή που σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή γ αλύσου (έλλειψη δβ, κληρονομική παραμονή αιμοσφαιρίνης F) τροποποιεί-συνήθως βελτιωτικά- την κλινική εικόνα. Τέλος, η συνύπαρξη με α-θαλασσαιμία έχει επίσης συσχετισθεί με ηπιότερη κλινική έκφραση από κάποιους ερευνητές [194].

Πολλοί πολυμορφισμοί σε διάφορα γονίδια/γενετικούς τόπους έχουν συσχετισθεί με τις κλινικές εκδηλώσεις-επιπλοκές της ΔΝ [194]. Αν και η ελαττωμένη βιοδιαθεσιμότητα του NO είναι ευρέως αποδεκτή παθοφυσιολογική συνέπεια της νόσου και έχει συσχετισθεί με πολλές επιπλοκές της, οι μελέτες των πολυμορφισμών του γονιδίου *NOS3* σε πάσχοντες από ΔΝ είναι σχετικά λίγες. Οι Sharan et al. (2004) μελέτησαν τους πολυμορφισμούς T786C και G894T σε 87 πάσχοντες από ΔΝ Αφροαμερικανικής προέλευσης και διαπίστωσαν αυξημένη εμφάνιση οξέος θωρακικού συνδρόμου σε γυναίκες που έφεραν το αλληλόμορφο C για τη θέση -786 [33]. Αντίθετα, οι Chaar et al. (2006) παρατήρησαν μειωμένη εμφάνιση της ίδιας επιπλοκής σε παιδιά με ΔΝ γονοτύπου S/S που έφεραν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο C για τη θέση -786 [34]. Η ομάδα των Vargas et al. (2006) ανέφερε μια μη στατιστικά σημαντική τάση προς βαρύτερη κλινική εικόνα-αυξημένο πόνο στους ασθενείς με γονότυπο 786CC μεταξύ 73 πασχόντων από τη Βραζιλία με γονότυπο S/S [195]. Οι Nishank et al. (2013) μελέτησαν 150 Ινδούς πάσχοντες από ΔΝ, οι περισσότεροι από τους οποίους είχαν γονότυπο S/S, ως προς τους πολυμορφισμούς T786C και G894T. Παρατήρησαν αυξημένη εμφάνιση των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων C και T για τις θέσεις -786 και +894 αντίστοιχα μεταξύ των ασθενών σε σχέση με τους υγιείς και μεταξύ των πασχόντων με βαρύτερη κλινική εικόνα σε σχέση με αυτούς με ηπιότερη [35]. Αντίθετα, οι Thakur et al. (2014) δε βρήκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε 145 πάσχοντες γονοτύπου S/S από το Μαλί της Αφρικής [196]. Οι Yousry et al. (2016) ανέφεραν αυξημένη εμφάνιση οξέος θωρακικού συνδρόμου και αγγειοαποφρακτικών κρίσεων σε ασθενείς με γονότυπο 786CC μεταξύ 100 πασχόντων από ΔΝ αιγυπτιακής καταγωγής [36]. Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται μεταξύ των παραπάνω αποτελεσμάτων εξηγούνται από τη διαφορετική καταγωγή και ηλικία των ασθενών που μελετήθηκαν όπως και από το μικρό αριθμό ασθενών σε όλες τις μελέτες. Οι Tanus-Santos et al. (2001) έδειξαν ότι η συχνότητα των γονοτύπων-αλληλομόρφων ως προς τους πολυμορφισμούς T786C, G894T και 4a/4b VNTR του γονιδίου *NOS3* διαφέρουν μεταξύ φυλετικά διαφορετικών πληθυσμών, με τους καυκάσιους να εμφανίζουν υψηλότερη συχνότητα των

μεταλλαγμένων αλληλομόρφων 786C και 894T σε σχέση με αφρικανικής και ασιατικής καταγωγής πληθυσμούς [197]. Ακόμη, η μελέτη μικτών πληθυσμών ενηλίκων και παιδιών που πάσχουν από ΔN μπορεί να καθιστά τα αποτελέσματα δυσερμήνευτα, αφού η ίδια επιπλοκή της νόσου μπορεί να διαφέρει ως προς την αιτιολογία και την παθοφυσιολογία της ανάλογα με την ηλικία του ασθενούς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το οξύ θωρακικό σύνδρομο [198]. Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στην επίδραση των πολυμορφισμών T786C και G894T στην κλινική εικόνα και τα εργαστηριακά ευρήματα, αναλόγως του β-γονοτύπου των ασθενών: στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στους ασθενείς της ομάδας 1 (β-γονότυπος S/S και β<sup>0</sup>/S). Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με την αυξημένη αιμόλυση που παρατηρείται στους ασθενείς της ομάδας αυτής, όπως αυτή προκύπτει από τους αντίστοιχους δείκτες (ΔΕΚ, LDH, χολερυθρίνη), που πιθανώς οδηγεί σε μεγαλύτερη έλλειψη NO και καθιστά τους ασθενείς πιο επιρρεπείς στην εκδήλωση των συνεπειών των πολυμορφισμών του NOS3.

Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε αυξημένη εμφάνιση παραγωγικής αμφιβληστροειδοπάθειας στους ασθενείς της ομάδας 1 (γονότυποι S/S και β<sup>0</sup>/S) με γονότυπο CC ως προς τη θέση -786. Η συχνότητα εμφάνισης της επιπλοκής αυτής δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ασθενών με διαφορετικό γονότυπο ως προς το β-γονίδιο (ομάδες 1 και 2). Βιβλιογραφικά η συγκεκριμένη επιπλοκή εμφανίζεται συχνότερα σε πάσχοντες από τη μορφή S/C της ΔN, αλλά ο υπό μελέτη πληθυσμός δεν περιελάμβανε ασθενείς με αυτό το γονότυπο [199]. Αιτιολογικά, η παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια σχετίζεται με αμφιβληστροειδική ισχαιμία και επακόλουθη έκκριση προαγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων [199]. Σε αυτούς ανήκει ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), τα επίπεδα του οποίου είναι αυξημένα στο πλάσμα ασθενών με ΔN σε σταθερή κατάσταση [103]. Ο VEGF έχει συσχετισθεί με εμφάνιση νεοαγγείωσης και με την αμφιβληστροειδοπάθεια της ΔN [200]. Είναι άξια προσοχής η παρατήρηση ότι η εξαρτώμενη από το VEGF αγγειογένεση απαιτεί NO προερχόμενο από την eNOS για την επιτέλεσή της [201]. Μάλιστα, έχει δειχθεί ότι ο VEGF προκαλεί αύξηση της

έκφρασης του *NOS3* σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας και αορτής αρουραίου ( [202]. Πιθανώς, ο πολυμορφισμός T786C μεταβάλλει τη δυνατότητα του VEGF να επάγει το eNOS mRNA, με αποτέλεσμα την προδιάθεση των ασθενών με γονότυπο 786CC σε παραγωγική αμφιβληστροειδοπάθεια. Επιπλέον, άλλες μορφές παραγωγικής αμφιβληστροειδοπάθειας, όπως η διαβητική και η αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας, έχουν συσχετισθεί με τους πολυμορφισμούς του *NOS3*. Συγκεκριμένα, οι Taverna et al. (2005) παρατήρησαν πρώιμη εμφάνιση σοβαρότερης κλινικά διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας μεταξύ 128 ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I [31], ενώ οι Bazzaz et al. (2010) ανέφεραν αυξημένη εμφάνιση των γονοτύπων 786TC και 786CC σε διαβητικούς τύπου I σε σχέση με υγιείς εθελοντές [32]. Οι γονότυποι αυτοί εμφανίζονταν ακόμη συχνότερα σε πάσχοντες από διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια [32]. Τέλος, οι Yanamandra et al. (2010) συσχέτισαν τους γονοτύπους *NOS3* 786C και 894T με την αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας σε βρέφη καυκάσιας και Αφροαμερικανικής καταγωγής [203].

Παράλληλα, στους ασθενείς της ομάδας 1, ο πολυμορφισμός G894T φαίνεται να επηρεάζει τις τιμές του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης. Οι ασθενείς με γονότυπο 894TT τείνουν να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές των δυο αυτών παραμέτρων σε σταθερή κατάσταση σε σχέση με αυτούς με γονότυπο 894GG και 894GT, ενώ οι επιμέρους αναλογίες HbS, HbF, HbA2 δε διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Έχει δειχθεί ότι το NO εμπλέκεται στη διαδικασία της αιμοποίησης αναστέλλοντας τη διαφοροποίηση των προγονικών μορφών της ερυθράς σειράς στο μυελό των οστών. Παράλληλα, η eNOS εκφράζεται τόσο στα στρωματικά κύτταρα του μυελού, όσο και στις προγονικές μορφές των ερυθροκυττάρων [204]. Είναι εύλογη λοιπόν η υπόθεση ότι η μειωμένη σύνθεση NO στο μυελό ασθενών με γονότυπο 89TT οδηγεί σε αυξημένη αιμοποίηση, λόγω μικρότερης αναστολής από το NO.

#### 4.2.Οι πολυμορφισμοί C677T και A1298C του *MTHFR*, κλινικοί και εργαστηριακοί συσχετισμοί

Ο μεταβολισμός του φυλλικού οξέος παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο, τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις stress, όσο και σε νοσηρές καταστάσεις, και το ένζυμο *MTHFR* ανήκει στον πυρήνα του αντίστοιχου μεταβολικού μονοπατιού. Οι πολυμορφισμοί C677T και A1298C μειώνουν την ενεργότητα / σταθερότητα του ενζύμου, οδηγώντας σε αύξηση της ομοκυστεΐνης στον ορό λόγω ανεπάρκειας μεθυλομάδων. Η υπερομοκυστεϊναιμία έχει συσχετισθεί με αρτηριακές και φλεβικές θρομβώσεις, αν και η αιτιώδης συνάφεια μεταξύ του εργαστηριακού ευρήματος και της κλινικής εκδήλωσης έχει αμφισβητηθεί. Η δρεπανοκυτταρική νόσος χαρακτηρίζεται από χρόνια αιμόλυση, με αποτέλεσμα αυξημένες απαιτήσεις αναγέννησης των ερυθροκυττάρων από το μυελό των οστών, άρα αυξημένες απαιτήσεις σε πουρίνες και πυριμιδίνες. Από την άλλη, η δρεπάνωση των ερυθροκυττάρων και η ενδοαγγειακή αιμόλυση πυροδοτούν ένα καταρράκτη φαινομένων που σχετίζονται με αυξημένη ενεργοποίηση του μηχανισμού αιμόστασης. Η ενεργοποίηση αυτή εκφράζεται εργαστηριακά και κλινικά, τόσο με τα φαινόμενα απόφραξης της μικροκυκλοφορίας που χαρακτηρίζουν τη νόσο, όσο και με την αυξημένη επίπτωση θρομβώσεων μεγαλύτερων αγγείων του αρτηριακού και φλεβικού δικτύου (εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση, πνευμονική εμβολή, ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, κλπ). Έχει δειχθεί ότι οι πάσχοντες από ΔN εμφανίζουν υπερομοκυστεϊναιμία συχνότερα από τους μη πάσχοντες, παρά τα φυσιολογικά ή αυξημένα επίπεδα φυλλικού οξέος [205]. Επίσης, ασθενείς με ΔN και θρομβωτικές επιπλοκές όπως ΑΕΕ εμφανίζουν υπερομοκυστεϊναιμία συχνότερα από ασθενείς ελεύθερους τέτοιων επιπλοκών [206]. Στο παρελθόν, αρκετοί ερευνητές προσπάθησαν να μελετήσουν τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *MTHFR* σε πάσχοντες από ΔN, με ποικίλα αποτελέσματα. Οι Cumming et al. (1999) βρήκαν παρόμοια συχνότητα των γονοτύπων ως προς τον πολυμορφισμό C677T μεταξύ πασχόντων από ΔN με ιστορικό ΑΕΕ και πασχόντων χωρίς αντίστοιχο ιστορικό από τη Τζαμάικα [207]. Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν σε 73 πάσχοντες από τη Βραζιλία [208], όπως και στη μελέτη των Zimmerman &

Ware (1998) σε 86 πάσχοντες ενήλικές και παιδιά [209]. Επιπλέον, οι Balasa et al. (1999) δεν εντόπισαν κάποια συσχέτιση ανάμεσα στο γονότυπο ως προς τον πολυμορφισμό C677T, τα επίπεδα ομοκυστεΐνης και την εμφάνιση αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου σε παιδιατρικό πληθυσμό [210]. Μάλιστα, αν και τα πάσχοντα παιδιά εμφάνιζαν υψηλότερο επίπεδο ομοκυστεΐνης από τα υγιή, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Οι Balasa et al. (2002) κατέγραψαν το επίπεδο ομοκυστεΐνης και τον γονότυπο ως προς τον πολυμορφισμό C677T σε παιδιά με ή χωρίς ΔN. Παρατήρησαν αυξημένη επίπτωση υπερομοκυστεΐναιμίας μόνο στα πάσχοντα παιδιά με ηλικία μεγαλύτερη των 10 ετών, ενώ ο πολυμορφισμός C677T δε φάνηκε να επηρεάζει τα επίπεδα ομοκυστεΐνης, σε αντίθεση με την επάρκεια πυριδοξάλης και φυλλικού οξέος [211]. Σε μια μελέτη 106 πασχόντων από το Μπαχρέιν που περιελάμβανε παιδιά και ενήλικες, παρατηρήθηκε αυξημένη εμφάνιση του γονοτύπου 1298CC και του απλοτύπου 677T-1298C στους πάσχοντες, ενώ ο πολυμορφισμός C677T ήταν εξίσου συχνός στους πάσχοντες και τους υγιείς [212]. Ούτε σε παιδιά από την Υεμένη που πάσχουν από ΔN παρατηρήθηκε αυξημένη εμφάνιση του πολυμορφισμού C677T σε σχέση με μη πάσχοντες [213]. Σε ότι αφορά τον ετερογενή ινδικό πληθυσμό των πασχόντων από ΔN, οι Italia et al. (2015), Kangne et al. (2015), Pandey et al. (2012) δεν παρατήρησαν συσχέτιση του γονοτύπου ως προς το πολυμορφισμό C677T με την κλινική εικόνα [214] ή διαφορά μεταξύ πασχόντων από ΔN και υγιών [215,216]. Σε μια μικρή μελέτη 12 πασχόντων από ΔN με γονότυπο S/β0 από το Λίβανο, η συχνότητα των γονοτύπων ως προς τον πολυμορφισμό C677T δε διέφερε σημαντικά από αυτή υγιών και πασχόντων από ενδιάμεση β-θαλασσαιμία με καταγωγή από την ίδια χώρα [217]. Αντίθετα, 2 μελέτες σε πάσχοντες από τη Βραζιλία και μια σε πάσχοντες από την Ινδία κατέληξαν στην ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στο γονότυπο ως προς τον πολυμορφισμό C677T και την κλινική εικόνα της νόσου. Συγκεκριμένα, οι Moreira Neto et al. (2006) παρατήρησαν αυξημένη συχνότητα των γονοτύπων 677CT και TT σε πάσχοντες από τη Βραζιλία με “αγγειακές επιπλοκές”, σε σχέση με πάσχοντες χωρίς αυτές. Ως αγγειακές επιπλοκές ορίστηκαν το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, η

αμφιβληστροειδοπάθεια, η άσηπτη νέκρωση οστών και το οξύ θωρακικό σύνδρομο, ενώ οι ασθενείς είχαν γονότυπο S/S και S/C [218]. Στην ίδια χώρα, οι Hatzlhofer et al. (2012) προσδιόρισαν το γονότυπο ως προς τους πολυμορφισμούς C677T και A1298C σε 177 πάσχοντες από ΔN μέσης ηλικίας 26,5 ετών με “αγγειακές επιπλοκές” (οξύ θωρακικό σύνδρομο, άσηπτη νέκρωση οστών, πριαπισμός, έλκη κνημών, αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια) και σε 100 πάσχοντες μέσης ηλικίας 26,2 ετών χωρίς τις ανωτέρω επιπλοκές. Παρατήρησαν αυξημένη εμφάνιση των γονοτύπων 677CT και TT μεταξύ όσων εμφάνιζαν τις επιπλοκές, ενώ η κατανομή των γονοτύπων ως προς τον πολυμορφισμό A1298C δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων [219]. Τέλος, οι Nishank et al. (2013) κατέγραψαν το γονότυπο ως προς τον πολυμορφισμό C677T σε 150 Ινδούς πάσχοντες από ΔN μέσης ηλικίας 16,3 ετών και 150 υγιείς της ίδιας εθνικότητας. Παρατήρησαν αυξημένη συχνότητα των γονοτύπων 677CT και TT μεταξύ των πασχόντων, και αυξημένη βαρύτητα μεταξύ των ασθενών που έφεραν τους γονοτύπους αυτούς. Πιο συγκεκριμένα, οι φέροντες τους επιβαρυντικούς γονοτύπους χαρακτηρίζονταν από μικρότερη ηλικία έναρξης συμπτωμάτων, συχνότερη εμφάνιση επεισοδίων άλγους οστών, σπληνομεγαλίας, θωρακικού και κοιλιακού άλγους και πυρετού, καθώς και αυξημένες ανάγκες σε μεταγγίσεις [220].

Η παρούσα είναι η πρώτη μελέτη για τους πολυμορφισμούς C677T και A1298C σε Έλληνες και γενικότερα σε καυκάσιους πάσχοντες από ΔN. Η συχνότητα των πολυμορφισμών που καταγράφηκε είναι σύμφωνη με προηγούμενες μελέτες στην Ελλάδα [221,222]. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα των γονοτύπων και των αλληλομόρφων μεταξύ των ασθενών και των υγιών μαρτύρων, ούτε μεταξύ πασχόντων με θρομβωτικές επιπλοκές και άλλων χωρίς αυτές. Θα πρέπει ωστόσο να επισημανθεί ο μικρός αριθμός των ασθενών με φλεβική θρομβοεμβολική νόσο (8 ασθενείς) και ισχαιμικό ΑΕΕ (3 ασθενείς), με αποτέλεσμα τη μειωμένη δυνατότητα ανάδειξης πιθανών διαφορών. Από την πρώτη ομάδα, 7 από τους 8 ασθενείς εμφανίζουν τουλάχιστον ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο για τη θέση 677, ενώ όλοι οι πάσχοντες από ισχαιμικό ΑΕΕ είχαν γονότυπο 677CT ή 677TT. Παράλληλα, όλοι οι ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη λαμβάνουν



συμπλήρωμα φυλλικού οξέος από τη στιγμή της διάγνωσης της ΔΝ, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν υψηλά επίπεδα αυτού του συμπαραγόντα στον ορό και να προστατεύονται σε μεγάλο βαθμό από την πιθανή αρνητική επίδραση της μειωμένης ενεργότητας της *MTHFR* στους φέροντες τους πολυμορφισμούς.

Οι πολυμορφισμοί C677T και A1298C επιδρούν δυνητικά στην κλινική εικόνα ενός νοσήματος μέσω της αύξησης των επιπέδων ομοκυστεΐνης στον ορό και μέσω της ελάττωσης των διαθέσιμων μεθυλομάδων, με πιθανή συνέπεια την υπομεθυλίωση του γονιδιώματος ή/και συγκεκριμένων ρυθμιστικών περιοχών γονιδίων. Η ομοκυστεΐνη μπορεί να συνδεθεί με ορισμένες πρωτεΐνες, προκαλώντας μετα-μεταφραστική τροποποίησή τους (ομοκυστεΐνυλίωση), γεγονός που πιθανώς εξηγεί τη σύνδεση της υπερομοκυστεϊναιμίας με παθολογικές καταστάσεις [223]. Αυτές οι τροποποιημένες πρωτεΐνες, πέραν της διαταραγμένης λειτουργικότητάς τους, λειτουργούν και ως αυτοαντιγόνα, επάγοντας ανοσολογική απόκριση και προάγοντας τη φλεγμονή του αγγειακού τοιχώματος π.χ. στην αθηρωματική νόσο [224]. Επιπλέον, η ίδια η ομοκυστεΐνη και οι ομοκυστεΐνυλιωμένες πρωτεΐνες επάγουν συγκεκριμένες μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης [225]. Τέλος, πιθανώς η συσσώρευση ομοκυστεΐνης αυξάνει το οξειδωτικό stress [224]. Αν και αρκετές μελέτες συνέδεσαν τους πολυμορφισμούς του *MTHFR* με διάχυτη υπομεθυλίωση του γονιδιώματος ή υπομεθυλίωση συγκεκριμένων ρυθμιστικών περιοχών σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις [226,227,228,229,230], άλλες μελέτες και μια πρόσφατη μετα-ανάλυση κατέληξε σε απουσία συσχέτισης του πολυμορφισμού C677T με διάχυτη υπομεθυλίωση του γονιδιώματος [45, 231]. Σε κάθε περίπτωση, η αξιολόγηση των επιπτώσεων των πολυμορφισμών είναι δύσκολη, γιατί εξαρτώνται από την επάρκεια φυλλικού οξέος, βιταμίνης B12 και πυριδοξάλης σε ποικίλο βαθμό. Συγκεκριμένα, οι επιπτώσεις τους μεγεθύνονται παρουσία απόλυτης ή σχετικής ανεπάρκειας φυλλικού οξέος. Η τελευταία χαρακτηρίζει συχνά τους πάσχοντες από ΔΝ, λόγω της συνεχούς αιμόλυσης και της επακόλουθης ανάγκης αναγέννησης των ερυθροκυττάρων [211], αλλά είναι δύσκολο να μετρηθεί-ποσοτικοποιηθεί.

### 4.3. Η έκφραση της eNOS

Η eNOS εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στις προγονικές μορφές αυτών, σε βαθμό ανάλογο της διαφοροποίησής τους. Αρχικός στόχος της μελέτης ήταν η μελέτη της έκφρασής της στα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (EPCs) που θα καλλιεργούνταν σε προτυπωμένες συνθήκες για πέντε ημέρες βάσει της μεθόδου CFU-Hill σε πάσχοντες από ΔN και υγιείς. Ωστόσο, η αδυναμία ανάπτυξης αποικιών EPCs με τη μέθοδο αυτή από το περιφερικό αίμα των ασθενών κατέστησε αδύνατη τη μελέτη έκφρασης σε αυτόν τον σχετικά ομοιογενή κυτταρικό πληθυσμό. Έτσι, πραγματοποιήθηκε μελέτη της έκφρασης του *NOS3* στα λευκά αιμοσφαίρια (κοκκιοκύτταρα και μονοπύρρηνα-λεμφοκύτταρα) του περιφερικού αίματος των ασθενών, μετά από εκλεκτική λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Όπως προαναφέρθηκε, πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση του *NOS3* στα ενδοθηλιακά και ενδεχομένως και στα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Για τον έλεγχο αυτών, επελέγησαν ασθενείς σε σταθερή κατάσταση, χωρίς πρόσφατη αγγειοαποφρακτική/αιμολυτική/απλαστική κρίση που δεν είχαν μεταγγιστεί πρόσφατα και δε διέφεραν ως προς το φύλο και την ηλικία από τους αντίστοιχους μάρτυρες. Αν και οι ασθενείς έτειναν να παρουσιάζουν μειωμένο επίπεδο mRNA *NOS3* σε σχέση με τους υγιείς, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντιστοίχως, οι ασθενείς με γονότυπο ως προς το β-γονίδιο της αιμοσφαιρίνης που προδιαθέτει σε βαρύτερη κλινική εικόνα έτειναν να εμφανίζουν χαμηλότερη έκφραση *NOS3*, αλλά πάλι η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Τέλος, ο πολυμορφισμός T786C στον υποκινητή του γονιδίου δε φάνηκε να σχετίζεται με το επίπεδο mRNA του γονιδίου στη μελέτη μας. Η απουσία διαφοράς στα επίπεδα mRNA μεταξύ των ασθενών με γονοτύπους TT, TC, CC όμως κάθε άλλο παρά αποκλείει την πιθανότητα λειτουργικών επιπτώσεων του συγκεκριμένου πολυμορφισμού, αφού η μελέτη αφορούσε ασθενείς σε σταθερή κατάσταση, με δείκτες φλεγμονής εντός φυσιολογικών ορίων και απουσία ενδείξεων οξειών επιπλοκών της νόσου. Επιπλέον, ο κυτταρικός πληθυσμός που μελετήθηκε δεν είναι αυτός που εκφράζει το συγκεκριμένο γονίδιο στο μέγιστο βαθμό, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από τις υψηλές τιμές Ct τόσο στους ασθενείς όσο και στους

υγιείς μάρτυρες. Έτσι, πιθανώς ο πολυμορφισμός να διαδραματίζει λειτουργικό ρόλο στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά όχι στα λευκά αιμοσφαίρια. Τέλος, τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος συνιστούν έναν αρκετά ανομοιογενή πληθυσμό, αποτελούμενο από τα κοκκιοκύτταρα (πολυμορφοπύρηνα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα), τα μονοπύρηνα-μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα, με τους επιμέρους υποπληθυσμούς τους. Όλα τα παραπάνω κύτταρα, όπως και τα ερυθρά αιμοσφαίρια, εκφράζουν την eNOS, αλλά δεν είναι γνωστό αν η ρύθμιση της έκφρασης αυτής διαφοροποιείται σε κάποιον/κάποιους από τους πληθυσμούς αυτούς και ποιοι μηχανισμοί τη διέπουν.

#### **4.4.Η έκφραση της SOD2**

Η λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων και η ίδια η ύπαρξη αερόβιας ζωής εξαρτώνται από την εύρυθμη λειτουργία του συστήματος αποτοξίνωσης από τις παραγόμενες ROS, προεξάρχοντα ρόλο στο οποίο παίζει η SOD2. Πλήρης απουσία έκφρασης του ενζύμου είναι ασύμβατη με τη ζωή. Μειωμένη έκφρασή της οδηγεί σε αυξημένη κυτταρική βλάβη από οξειδωτικό stress και έχει συσχετισθεί με το φαινόμενο της γήρανσης και με πολλές παθολογικές καταστάσεις, αναλόγως του ιστού στον οποίο εμφανίζεται: η πνευμονική υπέρταση χαρακτηρίζεται από μειωμένη έκφραση SOD2 στα λεία μυϊκά κύτταρα των πνευμονικών αρτηριών και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι (v. Parkinson, v. Alzheimer κ.λπ.) από μειωμένη έκφραση SOD2 στον εγκέφαλο. Μειωμένη έκφραση SOD2 χαρακτηρίζει επίσης πολλές κακοήθεις νεοπλασίες, αν και, παραδόξως, ορισμένες πολύ επιθετικές μορφές χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση του ενζύμου [105,232,233]

Το αυξημένο οξειδωτικό stress που χαρακτηρίζει τη ΔN οδήγησε στη μελέτη της ενεργότητας της SOD στα ερυθρά αιμοσφαίρια (SOD1) και στο πλάσμα (SOD3), με αντικρουόμενα αποτελέσματα: ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα, την οποία ερμηνεύουν ως αποτέλεσμα οξειδωτικής καταστροφής του ενζύμου, χωρίς ωστόσο να έχει δειχθεί μειωμένη έκφραση κάποιου αντιοξειδωτικού ενζύμου στους πάσχοντες από

ΔΝ μέχρι τώρα [14, 234]. Η παρούσα είναι η πρώτη μελέτη της έκφρασης της *SOD2* σε πάσχοντες από ΔΝ. Το αποτέλεσμα (μειωμένο επίπεδο mRNA *SOD2*) ήταν μη αναμενόμενο, καθώς το αυξημένο οξειδωτικό stress οδηγεί φυσιολογικά στην επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών του αντιοξειδωτικού συστήματος με μηχανισμούς που αναφέρθηκαν στο εδάφιο 1, ενώ τα υπό μελέτη κύτταρα εκτίθεται άμεσα και συνεχώς σε αυξημένο οξειδωτικό stress, λόγω της θέσης και της φύσης τους. Επιπλέον, η σύσταση των ομάδων των ασθενών και των υγιών δε διέφερε ουσιωδώς ως προς το φύλο και την ηλικία, δυο παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση της *SOD2* και θα μπορούσαν δυνητικά να καταστούν συγχυτικοί για το αποτέλεσμα της μελέτης μας [235,236]. Κατά συνέπεια, τα ευρήματά μας θεμελιώνουν έναν επιπρόσθετο μηχανισμό που ευθύνεται για το αυξημένο οξειδωτικό stress στους πάσχοντες από ΔΝ.

Μάλιστα, με το μοντέλο της γραμμικής παλινδρόμησης, παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση της έκφρασης του *SOD2* και του βαθμού αιμόλυσης, όπως εκφράζεται από τους αντίστοιχους δείκτες: υποδιπλασιασμός των επιπέδων mRNA του *SOD2* σχετίζεται με αύξηση των δικτυοερυθροκυττάρων κατά 2.44% ή κατά 47000/μL κατ' απόλυτο αριθμό, αύξηση της ολικής χολερυθρίνης κατά 1.02mg/dL και της έμμεσης κατά 0.89mg/dL, ενώ η LDH αυξάνεται κατά σχεδόν 31IU/L. Η τελευταία συσχέτιση δεν έφθασε σε βαθμό στατιστικής σημαντικότητας 0.05, πιθανώς λόγω της ευρείας διακύμανσης του συγκεκριμένου δείκτη μεταξύ των ασθενών. Παράλληλα, μειωμένη έκφραση *SOD2* συσχετίσθηκε με μείωση της τιμής του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης, αύξηση της CRP και της φερριτίνης αλλά επίσης η συσχέτιση δεν ήταν στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 5% (στην περίπτωση της φερριτίνης οριακά,  $P=0.065$ ). Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα ευρήματα της παρούσας μελέτης ήταν η γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στην τιμή του Β-νατριουρητικού πεπτιδίου (BNP) και την έκφραση του *SOD2* στα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος: υποδιπλασιασμός της τελευταίας σχετίζεται με αύξηση του BNP κατά 23.5 μονάδες ( $P=0.003$ ). Η σημασία του ευρήματος αυτού έγκειται στο ότι τα νατριουρητικά πεππίδια συσχετίζονται γραμμικά με την ταχύτητα παλινδρόμησης δια της τριγλώχινας βαλβίδας

(TRV), τον ευρύτερα χρησιμοποιούμενο δείκτη πνευμονικής υπέρτασης σε ασθενείς με ΔΝ [237]. Επιπλέον, αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα αυξημένης θνητότητας [237,238]. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που παρέχει ένδειξη συσχέτισης ανάμεσα στην έκφραση της SOD2 στα λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος και την πνευμονική υπέρταση σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο: όπως δείξαμε, οι ασθενείς με υπερηχοκαρδιογραφικές ενδείξεις αυξημένης συστολικής πίεσης δεξιάς κοιλίας (άρα αυξημένης συστολικής πίεσης πνευμονικής αρτηρίας, γιατί κανένας από τους ασθενείς μας δεν εμφάνιζε στένωση-δυσπλασία της πνευμονικής βαλβίδας) εμφανίζουν μειωμένη έκφραση SOD2 σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ( $P=0.036$ , Mann-Whitney U-test) σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς. Αντίστοιχες παρατηρήσεις έχουν γίνει σε ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική αρτηριακή υπέρταση διαγνωσμένη με καθετηριασμό δεξιών καρδιακών κοιλοτήτων και πνευμονικών αγγείων [239], ενώ η μειωμένη έκφραση του ίδιου ενζύμου σε άλλους κυτταρικούς τύπους έχει σχετισθεί άμεσα με την παθοφυσιολογία του συνδρόμου [233]. Θα ήταν ενδιαφέρουσα η διερεύνηση πιθανής «συμμεταβολής» της έκφρασης του SOD2 και της TRV ως δείκτη της πίεσης των πνευμονικών αρτηριών με κατάλληλες στατιστικές δοκιμασίες (συσχέτισης-παλινδρόμησης). Τούτο ωστόσο στην παρούσα μελέτη δεν επιχειρήθηκε, διότι οι αιμοληψίες και οι υπερηχοκαρδιογραφικές μετρήσεις διενεργήθηκαν με χρονική απόσταση μεταξύ τους (μέχρι 1 εβδομάδα) για τεχνικούς λόγους, ενώ είναι γνωστή η μεταβλητότητα και των δυο παραμέτρων.

Η εκτίμηση των πιθανών παθοφυσιολογικών επιπτώσεων της μειωμένης έκφρασης της SOD2 προϋποθέτει την κατανόηση της λειτουργίας των λευκών αιμοσφαιρίων, τα οποία αφορά η παρατήρηση αυτή. Τόσο τα ουδετερόφιλα όσο και τα μονοκύτταρα είναι φαγοκύτταρα που παρουσιάζουν αυξημένη ενεργοποίηση, υπερέκφραση μορίων προσκόλλησης και αυξημένη παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών στους πάσχοντες από ΔΝ [11]. Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στην εισαγωγή, τα κύτταρα αυτά εκφράζουν τις πρωτεΐνες του φλεγμονοσώματος NLRP3, η ενεργοποίηση του οποίου κατόπιν έκθεσης σε παθογόνα ή σε ενδογενή/εξωγενή σήματα κινδύνου

οδηγεί σε παραγωγή IL-1β. Η αίμη που απελευθερώνεται κατά την ενδοαγγειακή αιμόλυση αποτελεί ενδογενές «σήμα κινδύνου», ενώ έχει δειχθεί ότι τα μονοπύρρηνα πασχόντων από ΔN εμφανίζουν ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3. Η τελευταία συμπεριλαμβάνει μεταξύ άλλων ως μεσολαβητές ελεύθερες ρίζες (ROS) μιτοχονδριακής προέλευσης [156], που φυσιολογικά καθαίρονται από τη SOD2. Κατά συνέπεια, η μειωμένη έκφραση SOD2 στα λευκοκύτταρα των πασχόντων από ΔN, πέραν της συμμετοχής της στην αύξηση του οξειδωτικού stress, δυνητικά αποτελεί μηχανισμό ενεργοποίησης, συντήρησης και επίτασης της χρόνιας φλεγμονώδους κατάστασης που χαρακτηρίζει τη ΔN.

Η προσπάθεια ερμηνείας και περαιτέρω διερεύνησης του ευρήματος αυτού οδήγησε στη μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης του υποκινητή και του ενισχυτή του γονιδίου SOD2 και στη μελέτη της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου, όπως ο PGC-1α και ο HIF-1α.

#### **4.5. Η έκφραση του PGC-1α**

Ο PGC-1α είναι ο μεταγραφικός συμπαράγοντας που με τη δράση του ελέγχει την έκφραση πολλών δομικών συστατικών των μιτοχονδρίων, στοιχείων της αναπνευστικής αλυσίδας και αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η SOD2. Εκτενέστερη μελέτη της δράσης και της ρύθμισής του έχει γίνει στα κύτταρα των σκελετικών μυών, ενώ η αντίστοιχη έρευνα στα κύτταρα του αίματος βρίσκεται σε αρχικό στάδιο. Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε το επίπεδο έκφρασης του στα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος πασχόντων από ΔN και προέκυψε στατιστικά σημαντικά ελαττωμένη έκφραση σε σχέση με τους μάρτυρες. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη της έκφρασης του συμπαράγοντα αυτού στη ΔN. Το αποτέλεσμα που προέκυψε προσφέρει πιθανώς μια ερμηνεία για τη μειωμένη έκφραση του SOD2 στους ασθενείς, αφού, όπως έχει δειχθεί, ο PGC-1α είναι θετικός ρυθμιστής του SOD2, σε ρυθμιστικές αλληλουχίες του οποίου αλληλεπιδρά με τους παράγοντες ERRa, Nrf2 και FoxO3a, όπως αναλύθηκε και στην εισαγωγή [121,122,123,124]. Ωστόσο, η απουσία γραμμικής συσχέτισης ανάμεσα στην έκφραση των

*PPARGC1A* και *SOD2* είναι ενδεικτική της πολύπλοκης ρύθμισης της έκφρασης του *SOD2*, στην οποία υπεισέρχονται πολλοί γνωστοί και ενδεχομένως και άγνωστοι παράγοντες [105]. Απαιτούνται μελέτες που θα περιλαμβάνουν την έκφραση και άλλων γονιδίων-στόχων του PGC-1α στα λευκοκύτταρα πασχόντων από ΔN, όπως και μελέτες με ζωικά μοντέλα της ΔN στην έκφραση *SOD2* και *PPARGC1A* για περαιτέρω επιβεβαίωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων μας.

Η μελέτη της συσχέτισης της έκφρασης του *PPARGC1A* με τα εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών δεν ανέδειξε κάποια στατιστικά σημαντική σχέση με τους δείκτες αιμόλυσης (δικτυοερυθροκύτταρα, ολική και έμμεση χολερυθρίνη, LDH), αιματοκρίτη και αιμοσφαιρίνες S/F/A<sub>2</sub>. Μάλιστα, κατά παράδοξο τρόπο, πολλές εργαστηριακές παράμετροι φάνηκαν να βελτιώνονται με τη μείωση της έκφρασης του *PPARGC1A*, αν και σε μη στατιστικά σημαντικό βαθμό. Μόνο η μείωση των αιμοπεταλίων εμφάνισε μια οριακή στατιστική σημαντικότητα (P=0.04). Αντίθετα, η μείωση στην έκφραση του συν-ενεργοποιητή συσχετίστηκε ισχυρά με μειωμένα επίπεδα της HDL-χοληστερόλης (P=0.005). Το συγκεκριμένο εύρημα είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα μελέτης των Song et al. (2015), που έδειξαν ότι η απολιποπρωτεΐνη A-1, δομικό συστατικό της HDL, ενεργοποιεί τον PGC-1α στους σκελετικούς μυς [240]. Η επαγωγή της AMPK, που όπως αναφέρθηκε ενεργοποιεί τον PGC-1α, σχετίζεται επίσης με αύξηση της HDL, όπως έδειξαν το 2012 οι Greene et al. [241]. Εξίσου εντυπωσιακή είναι η συσχέτιση ανάμεσα στο ΔCt για τον PGC-1α και τη φερριτίνη, με συντελεστή παλινδρόμησης B=-233.2 και P=0.004: υποδιπλασιασμός της έκφρασης του *PPARGC1A* σε επίπεδο mRNA σχετίζεται με μείωση της φερριτίνης κατά 233.2 μονάδες. Η ερμηνεία αυτού του ευρήματος προϋποθέτει την κατανόηση της φερριτίνης αφενός ως πρωτεΐνης οξείας φάσης αφετέρου ως δείκτη των σιδηραποθηκών του οργανισμού. Όπως έδειξαν οι Qian et al. (2013) σε πειραματόζωα, η έκθεση σε λιποπολυσακχαρίτη και σε ιντερλευκίνη-6 οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του PGC-1α στα ηπατοκύτταρα με παράλληλη αύξηση της παραγωγής επιδίνης, της κύριας ρυθμιστικής πρωτεΐνης του μεταβολισμού του σιδήρου. Η τελευταία συνδέεται με τη φερροπορτίνη, τη μοναδική πύλη εξόδου του

σιδήρου από τα κύτταρα, επάγοντας την ενδοκύττωση και αδρανοποίησή της και εγκλωβίζοντας το σίδηρο μέσα στα κύτταρα. Στην προαναφερθείσα μελέτη, η εναπόθεση σιδήρου στους ιστούς υπό την επίδραση λιποπολυσακχαρίτη και η συνοδός αύξηση της φερριτίνης αναστράφηκαν όταν προκλήθηκε υπερέκφραση του PGC-1α. Μάλιστα, οι ερευνητές έδειξαν την άμεση ανασταλτική επίδραση που ασκεί ο PGC-1α στη μεταγραφή του γονιδίου της εψιδίνης [242]. Αν και δεν είναι γνωστό αν ο PGC-1α ρυθμίζει άμεσα τη μεταγραφή των γονιδίων των L και H αλυσίδων της φερριτίνης, η επίδρασή του στην έκφραση της εψιδίνης δημιουργεί τις προϋποθέσεις έμμεσης ρύθμισης της φερριτίνης από τον PGC-1α, μέσω του εγκλωβισμού του σιδήρου στο εσωτερικό των κυττάρων του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, που εκφράζουν τη φερροπορτίνη στην επιφάνειά τους [243]. Έτσι, προκύπτει η ελκυστική υπόθεση ότι η μειωμένη έκφραση PGC-1α στους πάσχοντες από ΔΝ οφείλεται στη χρόνια υποκλινική φλεγμονή των ασθενών αυτών. Η μη ανεύρεση στατιστικά σημαντικής συσχέτισης της έκφρασης του PGC-1α με τη CRP στους ασθενείς μας όμως αποδυναμώνει τη συγκεκριμένη ερμηνεία για τους ασθενείς μας. Ωστόσο, ο PGC-1α συμμετέχει και στην επαγωγή της έκφρασης της εψιδίνης σε συνθήκες διατροφικής αποστέρησης, όπως έδειξαν οι Vecchi et al. (2014) σε πειραματόζωα. Στην τελευταία περίπτωση, καταστολή της έκφρασης του PGC-1α στα ηπατοκύτταρα προκαλεί μειωμένη παραγωγή εψιδίνης [244]. Αλλά και αντίστροφα, όπως έχουν δείξει κάποιες μελέτες, και ο σίδηρος μπορεί να ρυθμίσει το επίπεδο έκφρασης και την ενεργότητα του PGC-1α. Συγκεκριμένα, η διατροφική πρόσληψη σιδήρου φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του PGC-1α στο ήπαρ: όπως έδειξαν οι Simcox et al. (2015), αυξημένη πρόσληψη σιδήρου προκαλεί επαγωγή της έκφρασης του PGC-1α με μηχανισμούς που τουλάχιστον εν μέρει εμπλέκουν το αυξημένο οξειδωτικό stress [245]. Το εύρημα αυτό είναι συμβατό με τη γραμμική συσχέτιση μεταξύ έκφρασης του PGC-1α στο περιφερικό αίμα των ασθενών μας και των επιπέδων της φερριτίνης, θεωρώντας την τελευταία ως δείκτη των αποθεμάτων σιδήρου του οργανισμού. Νωρίτερα, οι Han et al. (2011) είχαν παρατηρήσει μια απροσδόκητη μείωση της ποσότητας του PGC-1α σε μυϊκά κύτταρα



πειραματόζωνων υπό συνθήκες σιδηροπενίας [246]. Κατά συνέπεια, εγείρεται η πιθανότητα η μειωμένη έκφραση του PGC-1α που παρατηρήθηκε στους ασθενείς μας να οφείλεται εν μέρει στη σιδηροπενία που εμφανίζουν κάποιοι από αυτούς, ως αποτέλεσμα των αφαιμάξεων στις οποίες υποβάλλονται. Ωστόσο, οι υπό αφαίμαξη ασθενείς αποτελούν τη μειοψηφία μεταξύ αυτών από τους οποίους απομονώθηκε RNA, ενώ όταν συγκρίναμε το ΔCt ως προς το γονίδιο PGC-1α μεταξύ των ασθενών που υποβάλλονται σε αφαιμάξεις και αυτών που δεν υποβάλλονται, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (υπό αφαίμαξη ασθενείς:  $\Delta ct=15.0\pm 0.73$  ασθενείς που δεν υποβάλλονται σε αφαιμάξη:  $\Delta ct=14.66\pm 1.19$ ,  $P=0.369$ , Student's t-test). Επίσης, οι τιμές φερριτίνης όλων των ασθενών στους οποίους μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων ήταν πάνω από τα κατώτερα φυσιολογικά όρια για τον ορισμό της σιδηροπενίας. Αντίθετα, είναι αρκετά πιθανό οι αυξημένες τιμές φερριτίνης να εξηγούν την ελαφρώς αυξημένη έκφραση του PGC-1α (όχι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό) σε ασθενείς αυξημένη TRV σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς. Πράγματι, από αυτή την ομάδα ασθενών κανένας δεν υποβάλλεται σε αφαιμάξεις και όλοι έχουν ιδιαίτερα υψηλή τιμή φερριτίνης ( $>800\text{mg/dl}$ ), η οποία, όπως δείχθηκε, σχετίζεται γραμμικά με την έκφραση του PGC-1α.

Ιδιαίτερη πρόκληση αποτελεί η διερεύνηση του μηχανισμού που ευθύνεται για τη μειωμένη έκφραση του PGC-1α σε επίπεδο mRNA στους πάσχοντες από ΔN και κατά συνέπεια για την αδυναμία του προστατευτικού αυτού μηχανισμού να απαλύνει το οξειδωτικό stress στους πάσχοντες. Στη ρύθμιση της μεταγραφής του αντίστοιχου γονιδίου συμμετέχουν πολλοί παράγοντες, μεταξύ των οποίων ο ίδιος ο PGC-1α, ο FoxO3a, οι σιρτουίνες 1 και 3, οι πρωτεϊνικές κινάσες p38MAPK και AMPK, το ενδοκυττάριο ασβέστιο και άλλοι. Το μονοξειδίο του αζώτου είναι θετικός ρυθμιστής του PGC-1α σε όλους τους κυτταρικούς τύπους που έχουν μελετηθεί, αν και στα ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνεται να ασκεί και αρνητική ρύθμιση τουλάχιστον υπό ορισμένες συνθήκες. Η επίδρασή του στην έκφραση του PGC-1α στα λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος δεν έχει μελετηθεί. Ωστόσο, είναι ο ρυθμιστικός παράγοντας που με μεγαλύτερη πιθανότητα εμπλέκεται στην προς τα κάτω

ρύθμιση του PGC-1α στους ασθενείς μας. Όπως αναλύθηκε στην εισαγωγή, η ενδοαγγειακή αιμόλυση πυροδοτεί μια ακολουθία φαινομένων-μηχανισμών που οδηγούν στην εξάντληση του διαθέσιμου NO, με αποτέλεσμα οι πάσχοντες από ΔN να εμφανίζουν άλλοτε άλλου βαθμού ανεπάρκεια NO. Σημαντικότεροι από τους μηχανισμούς είναι η αντίδραση της αιμοσφαιρίνης με το NO και η εξάντληση της αργινίνης, του υποστρώματος της eNOS, από την αργινάση των λυόμενων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ακόμη, η φλεγμονώδης αντίδραση που ενεργοποιείται στους πάσχοντες από ΔN πιθανώς ευθύνεται σε κάποιο βαθμό για την προς τα κάτω ρύθμιση του PGC-1α. Μάλιστα έχει δειχθεί σε πειραματόζωα ότι η συνεχής φλεγμονώδης διέγερση και ενεργοποίηση του NF-κB μειώνει την αντιοξειδωτική άμυνα καταστέλλοντας την έκφραση του PGC-1α σε κύτταρα από την αορτή σε απογόνους μητέρων που εκτέθηκαν σε λιποπολυσακχαρίτη, ενώ η αναστολή του NF-κB αποκαθιστά την έκφραση του PGC-1α και την αντιοξειδωτική άμυνα [247]. Τα αποτελέσματα των Qian et al. (2013) συμφωνούν με τις παραπάνω παρατηρήσεις [242]. Στη δική μας μελέτη, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στη CRP ως δείκτη φλεγμονής και την έκφραση του PGC-1α. Πιθανότατα, η έκφραση του PGC-1α καθορίζεται από την πολύπλοκη αλληλεπίδραση παραγόντων όπως η ενδοαγγειακή αιμόλυση (μέσω μείωσης NO), η χρόνια φλεγμονή και ο βαθμός πλήρωσης των σιδηραποθηκών του οργανισμού.

#### **4.6. Η έκφραση του HIF-1α**

Ο HIF-1α αποτελεί τη μια από τις δυο υπομονάδες του παράγοντα HIF-1, βασικού μεσολαβητή της ιστικής προσαρμογής στην υποξία. Τα αποτελέσματα πολλών μελετών έδειξαν ότι η ρύθμισή του γίνεται σε μεταμεταφραστικό επίπεδο, συγκεκριμένα από τις υδροξυλάσες της προλίνης και άλλα ένζυμα, ενώ για τη ρύθμιση της μεταγραφής του αντίστοιχου γονιδίου οι μελέτες είναι λιγοστές. Οι βασικοί παράγοντες που επάγουν την έκφραση του HIF-1α σε επίπεδο mRNA συνοψίζονται από τον Gorlach [248]. Πιο πρόσφατα, οι Dong et al. (2016), χρησιμοποιώντας κυτταρικά μοντέλα της νόσου Parkinson, έδειξαν ότι το mRNA του HIF-1α είναι μειωμένο και μάλιστα

ότι αυτή η μείωση σχετίζεται με αυξημένη ακετυλίωση της H3K14, λόγω μειωμένης δραστηριότητας της SIRT-1 [83]. Κατά συνέπεια, η SIRT-1 αναδείχθηκε ως ρυθμιστικός παράγοντας της μεταγραφής του *HIF1A*. Αντίστοιχα, οι Bornello et al. (2007) έδειξαν ότι οι ROS επάγουν την έκφραση του *HIF-1α* μέσω του παράγοντα NF-κΒ [249]. Στη δρεπανοκυτταρική νόσο, ο συνδυασμός ενδοαγγειακής αιμόλυσης, υποξίας, αυξημένου οξειδωτικού stress και φλεγμονής οδηγεί σε σταθεροποίηση και αύξηση της ποσότητας του HIF-1α σε επίπεδο πρωτεΐνης και σε αύξηση της έκφρασης των πεπτιδίων-στόχων του, όπως ο VEGF [250]. Όπως έδειξαν οι Da Guarda et al, η αίμη επάγει την αύξηση της έκφρασης του HIF-1α σε επίπεδο πρωτεΐνης σε ενδοθηλιακά κύτταρα από την ομφαλική φλέβα [251]. Ωστόσο, η έκφραση του HIF-1α σε επίπεδο mRNA στη ΔΝ δεν έχει μελετηθεί μέχρι τώρα. Στην παρούσα μελέτη, δείχθηκε ότι τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος πασχόντων από ΔΝ εμφανίζουν μειωμένο επίπεδο mRNA του παράγοντα αυτού σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Μειωμένη έκφραση του HIF-1α (αύξηση του ΔCt) συσχετίστηκε με βελτίωση των περισσότερων εργαστηριακών παραμέτρων των ασθενών, όμως στατιστική σημαντικότητα προέκυψε μόνο για την HbS ( $p=0.03$ ) και οριακά για το ποσοστό των δικτυοερυθροκυττάρων ( $p=0.05$ ).

#### **4.7.Η κατάσταση μεθυλίωσης των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων *NOS3* και *SOD2***

Αρχική πρόθεσή μας ήταν η μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης των ρυθμιστικών περιοχών των *NOS3* και *SOD2* στο σχετικά ομοιογενή κυτταρικό πληθυσμό των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων (EPCs) από πάσχοντες από ΔΝ και από υγιείς εθελοντές. Ωστόσο, κατά την εξέλιξη της μελέτης μας, προέκυψε αδυναμία καλλιέργειας EPCs από τους ασθενείς με τη μεθοδολογία που προτείνεται βιβλιογραφικά, όπως και με μικρές τροποποιήσεις αυτής, με αποτέλεσμα η σύγκριση στο συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό να είναι αδύνατη. Εναλλακτικά, μελετήθηκε η κατάσταση μεθυλίωσης των ίδιων ρυθμιστικών περιοχών των ίδιων γονιδίων στα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος, μετά από εκλεκτική λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τόσο στους

ασθενείς, όσο και στους υγιείς εθελοντές, τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος εμφανίζουν τις συγκεκριμένες ρυθμιστικές αλληλουχίες των γονιδίων αυτών και στη μεθυλιωμένη και στην αμεθυλιώτη μορφή τους. Το αποτέλεσμα αυτό δυνητικά επιβεβαιώνει το ρυθμιστικό ρόλο που ασκεί η κατάσταση μεθυλίωσης των περιοχών αυτών στην έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων γενικά, αλλά αδυνατεί να εξηγήσει τη διαφορά που προέκυψε στην έκφραση του *SOD2* μεταξύ ασθενών και υγιών. Υπεύθυνοι παράγοντες για την αδυναμία αυτή είναι η ετερογένεια του υπό μελέτη κυτταρικού πληθυσμού και ο ποιοτικός χαρακτήρας της μεθόδου. Συγκεκριμένα, τόσο ο αριθμός όσο και η σύσταση των λευκών αιμοσφαιρίων διαφοροποιούνται μεταξύ ασθενών και υγιών, όπως και μεταξύ επιμέρους ασθενών και υγιών. Είναι γνωστό ότι στα λευκά αιμοσφαίρια περιλαμβάνονται τα κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα), τα κύτταρα του μονοκυτταρικού-φαγοκυτταρικού συστήματος και τα λεμφοκύτταρα, που επίσης διαφοροποιούνται βάσει των δεικτών επιφανείας τους σε πολλούς υποπληθυσμούς. Το πρότυπο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης διαφέρει μεταξύ όλων των παραπάνω κυτταρικών τύπων και οι διαφορές πιθανώς αφορούν και τα υπό μελέτη γονίδια. Αν και όλα τα υπό μελέτη κύτταρα εκφράζουν τόσο την eNOS όσο και τη *SOD2*, δεν είναι γνωστό αν σε κάποια από τις επιμέρους αυτές ομάδες κυττάρων παρατηρείται σχετική υπερ- ή υπο-έκφραση των ενζύμων αυτών και αν αυτή η ρύθμιση επιτελείται μέσω αυξημένης/ μειωμένης μεθυλίωσης των αντίστοιχων ρυθμιστικών περιοχών στο συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό. Ενδεχόμενη τέτοια διαφοροποίηση θα μπορούσε να μην οδηγήσει σε στατιστικά σημαντική διαφορά στο επίπεδο mRNA των αντίστοιχων γονιδίων, αν εμφανίζεται σε κάποιο αναλογικά σπάνιο στο περιφερικό αίμα κυτταρικό πληθυσμό, όπως π.χ. τα κύτταρα-φυσικοί φονείς (NK-λεμφοκύτταρα). Αντίθετα, για τους πλειοψηφούντες κυτταρικούς πληθυσμούς των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων και των Β-λεμφοκυττάρων, σημαντικές διαφορές στην έκφραση του *NOS3* μεταξύ ασθενών και υγιών δεν φαίνονται πιθανές. Σε ότι αφορά την έκφραση του *SOD2* και τη διαφοροποίηση που προέκυψε μεταξύ ασθενών και υγιών, τα ευρήματα που σχετίζονται με την κατάσταση μεθυλίωσης των ρυθμιστικών περιοχών του γονιδίου δεν μπορούν να

αποκλείσουν τη συμμετοχή της τελευταίας στη ρύθμιση της έκφρασής του. Αυτό οφείλεται στον ποιοτικό χαρακτήρα της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης, δηλαδή της MSP, που δεν επιτρέπει την ποσοτική εκτίμηση του βαθμού μεθυλίωσης μιας περιοχής του γονιδιώματος. Μελέτη με τη χρήση νεότερων τεχνικών (ποσοτική ευαίσθητη στη μεθυλίωση PCR, qMSP) ίσως συμβάλει στη διαλεύκανση του βαθμού συμμετοχής της μεθυλίωσης στην μειωμένη έκφραση της SOD2 στους πάσχοντες από ΔΝ.

#### **4.8.Η κοινή παθοφυσιολογία δρεπανοκυτταρικής νόσου και πνευμονικής υπέρτασης**

##### **4.8.1.Η πνευμονική υπέρταση και η παθοφυσιολογία της**

Ως πνευμονική υπέρταση (Pulmonary Hypertension, PH) ορίζεται η παρουσία αυξημένης μέσης πίεσης πνευμονικής αρτηρίας (PAPm) μεγαλύτερης από 25mmHg, όπως αυτή προσδιορίζεται σε συνθήκες ηρεμίας με δεξιό καρδιακό καθετηριασμό. Η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (Pulmonary Arterial Hypertension, PAH) είναι ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από την παρουσία αυξημένων πιέσεων στην πνευμονική αρτηρία (PAPm>25mmHg) σε συνδυασμό με φυσιολογικές/χαμηλές τιμές της πίεσης ενσφύνωσης των πνευμονικών τριχοειδών (Pulmonary Arterial Wedge Pressure, PAWP μικρότερη των 15mmHg), και αφού αποκλειστούν τα χρόνια πνευμονικά νοσήματα, η φλεβική θρομβοεμβολική νόσος και κάποιες ακόμη σπάνιες νόσοι, όπως η ιστιοκυττάρωση X [252,253]. Παθοφυσιολογικά, η PAH χαρακτηρίζεται από μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα/δράση μεσολαβητών όπως το NO και η προστακυκλίνη, με δράση αγγειοδιασταλτική και ανασταλτική στον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών ινών και στην ενεργοποίηση / συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Αντίθετα, η βιοδιαθεσιμότητα/δράση αγγειοσυσπαστικών μεσολαβητών όπως η ενδοθηλίνη-1 (ET-1) είναι αυξημένη [254]. Σημαντική στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου φαίνεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), από ένζυμα όπως οι οξειδάσες του NADPH και η οξειδάση της ξανθίνης. Η PAH χαρακτηρίζεται από αυξημένο οξειδωτικό stress [255] και από ενεργοποίηση του συστήματος της φυσικής

και της ειδικής ανοσίας [256]. Μάλιστα, οι Villegas et al. έδειξαν ότι στην πνευμονική υπέρταση λόγω χρόνιας υποξίας παρατηρείται ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3, που μπορεί να αναστραφεί με την εξωγενή χορήγηση αναλόγου της SOD [255,256]. Ακόμη, η έκφραση της SOD2 σε παρασκευάσματα από πνευμονικό ιστό και στα λεία μυϊκά κύτταρα των πνευμονικών αγγείων από πάσχοντες είναι μειωμένη [259,260]. Η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFAT αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών και των ενδοθηλιακών κυττάρων των πνευμονικών αρτηριών, που σχηματίζουν ανώμαλους πλεγματοειδείς σχηματισμούς [254,261]. Παράλληλα, παρατηρείται ενεργοποίηση-σταθεροποίηση του HIF-1α σε συνθήκες φυσιολογικής παροχής οξυγόνου, που αποδίδεται στη μειωμένη απελευθέρωση α-κετογλουταρικού οξέος και στη μειωμένη παραγωγή  $H_2O_2$ , με αποτέλεσμα την προσαρμογή του ενεργειακού μεταβολισμού σε (ψευδο)αναερόβιες συνθήκες, την υπερπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, τη μειωμένη απόπτωση και την καταστολή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων, όπως συμβαίνει σε πολλούς κακοήθεις όγκους [76,254,259,260,261]. Το 2010, οι Archer et al. έδειξαν ότι η αυξημένη μεθυλίωση ρυθμιστικών περιοχών του SOD2 ευθύνεται για την καταστολή της έκφρασης του ενζύμου, συνδέοντας την PAH με επιγενετικούς μηχανισμούς [262], ενώ το 2012 οι Mata et al. (2012) διαπίστωσαν μειωμένη έκφραση SOD2 και στο περιφερικό αίμα ασθενών με PAH [237]. Το εύρημα αυτό είναι ενδεικτικό του συστηματικού χαρακτήρα των μεταβολικών διαταραχών που χαρακτηρίζουν την PAH και επεκτείνονται, μεταξύ άλλων, στο σπλήνα, το μυελό των οστών, τους σκελετικούς μυς και το μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων [261]. Μάλιστα, η τελευταία ερευνητική ομάδα μελέτησε και την έκφραση του PGC-1α στην PAH, διαπιστώνοντας αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στο επίπεδο έκφρασης του παράγοντα και δείκτες βαρύτητας της νόσου όπως η πίεση της πνευμονικής αρτηρίας και οι πνευμονικές αντιστάσεις. Σε σχέση με τους υγιείς, οι πάσχοντες εμφάνισαν αυξημένη έκφραση του PGC-1α. Μάλιστα, όσο υψηλότερο το επίπεδο mRNA για τον PGC-1α, τόσο υψηλότερες ήταν και οι αντίστοιχες τιμές για τη SOD2 και άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα που ελέγχονται μεταγραφικά από τον PGC-1α [239].

Αντίθετα, μειωμένη έκφραση του PGC-1α σε λεία μυϊκά κύτταρα από τις πνευμονικές αρτηρίες ασθενών με PAH και ζωικών μοντέλων της νόσου παρατήρησαν άλλες ερευνητικές ομάδες [263,264]. Μάλιστα, η ομάδα των Paulin et al. (2014) συσχέτισε για πρώτη φορά τη σιρτουΐνη 3, ένα μείζον ρυθμιστικό μόριο της μιτοχονδριακής λειτουργίας που ρυθμίζεται αμοιβαία με τον PGC-1α, με την ιδιοπαθή PAH: συγκεκριμένα, παρατήρησαν αυξημένη συχνότητα ενός πολυμορφισμού του αντίστοιχου γονιδίου που μειώνει την ενεργότητα της σιρτουΐνης 3 σε πάσχοντες από ιδιοπαθή PAH και μειωμένη έκφραση της σιρτουΐνης 3 σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης σε λεία μυϊκά κύτταρα πνευμονικών αρτηριών από πάσχοντες από ιδιοπαθή PAH. Τέλος, παρατήρησαν ότι ζωικά μοντέλα που δεν εκφράζουν τη σιρτουΐνη 3 έχουν προδιάθεση εμφάνισης PAH και ότι τα μιτοχόνδριά τους εμφανίζουν τις ίδιες μεταβολές με αυτά των ασθενών με PAH, ενώ η επαγωγή της έκφρασης της σιρτουΐνης 3 με γονιδιακή θεραπεία αποκατέστησε τις μεταβολές αυτές [264].

#### **4.8.2.Η συμβολή της παρούσας μελέτης στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της πνευμονικής υπέρτασης στη δρεπανοκυτταρική νόσο**

Είναι γνωστό ότι η PAH επιπλέκει τις αιμοσφαιρινοπάθειες, όπως η β-θαλασσαιμία και η ΔN και αυτή η μορφή PAH ταξινομείται στην κατηγορία 1.3.6 της αναθεωρημένης κλινικής ταξινόμησης της πνευμονικής υπέρτασης [253]. Η παθοφυσιολογία της πνευμονικής υπέρτασης σε αυτή την ομάδα ασθενών έχει μελετηθεί αρκετά και σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη χρόνια ενδοαγγειακή αιμόλυση και τη μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα NO, που συνιστούν μια κατάσταση «αντίστασης» στο NO [158]. Η μείωση του NO οδηγεί σε ανισορροπία αγγειοδιασταλτικών-αγγειοσυσπαστικών μορίων στην πνευμονική κυκλοφορία, άμεση αγγειοσύσπασση των πνευμονικών αρτηριών, προαγωγή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και της ανάπτυξης θρόμβων και τελικά αύξηση των πνευμονικών αντιστάσεων, που, σε συνδυασμό με την αυξημένη λόγω αναιμίας καρδιακή παροχή, οδηγούν σε αύξηση της πίεσης στις πνευμονικές αρτηρίες. Παράλληλα, η φλεβική θρομβοεμβολική νόσος, η χρόνια υποξαιμία και η μετατριχοειδική πνευμονική υπέρταση συμβάλλουν σε

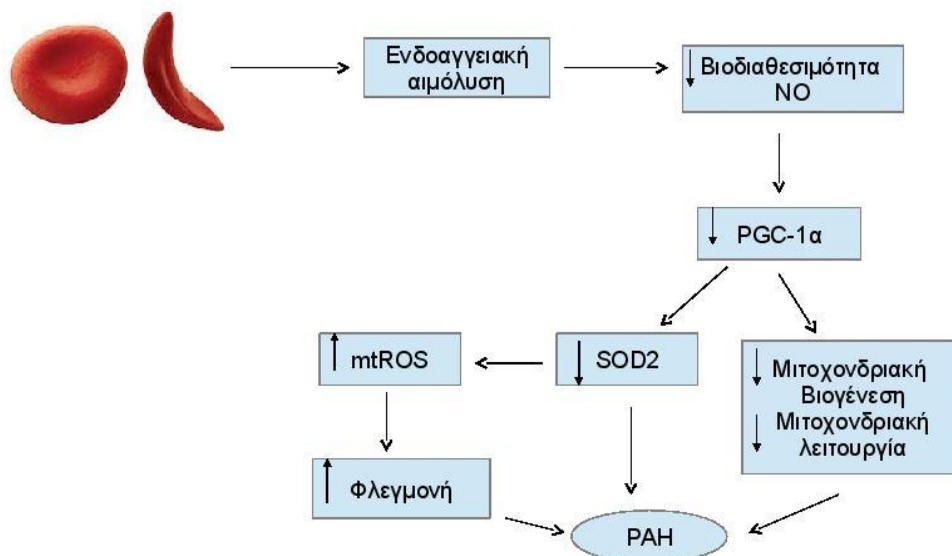
ποικίλο βαθμό στην αύξηση της πίεσης στις πνευμονικές αρτηρίες των ασθενών με ΔΝ [265]. Ωστόσο, στο μοριακό επίπεδο, αρκετές πτυχές των διεργασιών που οδηγούν στην ανάπτυξη πνευμονικής υπέρτασης, τόσο στους ασθενείς με τις υπόλοιπες μορφές του συνδρόμου, όσο και στους πάσχοντες από ΔΝ, παραμένουν ανεξερεύνητες. Όπως αναφέρθηκε εκτενέστερα στην εισαγωγή, η ΔΝ χαρακτηρίζεται από κινητοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης με ενεργοποιημένα κύτταρα της φυσικής ανοσίας και παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών και από αυξημένο οξειδωτικό stress. Παρόμοιες μεταβολές χαρακτηρίζουν και την PAH, όπως προαναφέρθηκε. Στην παρούσα μελέτη δείχθηκε ότι τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος πασχόντων από ΔΝ εμφανίζουν μειωμένη έκφραση του *SOD2*. Το ίδιο εύρημα προέκυψε και στους πάσχοντες από ιδιοπαθή PAH, στη μελέτη των Mata et al. (2012)[239]. Στην ίδια μελέτη, το επίπεδο mRNA του PGC-1α στο περιφερικό αίμα εμφάνισε θετική συσχέτιση με την έκφραση της *SOD2* και αντίστροφη συσχέτιση με αιμοδυναμικές παραμέτρους που αποτελούν δείκτες βαρύτητας του συνδρόμου: μειωμένα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα σχετίζονταν με μειωμένη έκφραση *SOD2* και αυξημένες τιμές πιέσεων πνευμονικής αρτηρίας και πνευμονικών αντιστάσεων. Ωστόσο, οι πάσχοντες από PAH εμφάνιζαν υψηλότερη έκφραση PGC-1α από τους μάρτυρες, πιθανώς στο πλαίσιο κάποιου αντιρροπιστικού μηχανισμού. Αντίθετα, όπως προέκυψε από την παρούσα μελέτη, στο περιφερικό αίμα πασχόντων από ΔΝ παρατηρείται μειωμένη έκφραση του PGC-1α (εδάφιο 3.8). Το εύρημα αυτό πιθανώς ερμηνεύεται από τη μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα NO, που στους περισσότερους ιστούς αποτελεί θετικό ρυθμιστή της έκφρασης του PGC-1α, εν μέρει μέσω της γουανυλικής κυκλάσης και εν μέρει μέσω της AMPK, όπως αναλύθηκε στην εισαγωγή (εδάφιο 1.1.4.5.4). Από τους ασθενείς στους οποίους μελετήθηκε η έκφραση των *SOD2* και *PPARGC1A*, μόνο 6 εμφανίζουν πνευμονική υπέρταση. Οι ασθενείς αυτοί είχαν στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφραση *SOD2*, αλλά έτειναν να παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του *PPARGC1A* σε σχέση με τους υπόλοιπους πάσχοντες. Τα παραπάνω ευρήματα είναι σύμφωνα με τη μείωση της έκφρασης του *SOD2* και με την αύξηση της έκφρασης του *PPARGC1A* σε



ασθενείς με PAH όπως περιγράφηκε από τους Mata et al. (2012)[239]. Ακόμη, η στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων φερριτίνης μεταξύ των ασθενών με υπερηχοκαρδιογραφικές ενδείξεις πνευμονικής υπέρτασης που μελετήθηκαν σε επίπεδο mRNA παρέχει μια πιθανή ερμηνεία της τάσης προς αυξημένη έκφραση PGC-1α μεταξύ αυτών των ασθενών: όπως δείξαμε, η φερριτίνη σχετίζεται γραμμικά με τη διαφορά  $\Delta C_t$  για το mRNA του PGC-1α, λειτουργώντας δυνητικά ως συγχυτικός παράγοντας. Επιπλέον, με βάση τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, οι δυο πολυμορφισμοί των γονιδίων *NOS3* και *MTHFR* δε φαίνεται να σχετίζονται με προδιάθεση στη συγκεκριμένη επιπλοκή της νόσου, αν και ο σχετικά μικρός αριθμός των υπό μελέτη ασθενών δεν επιτρέπει την εξαγωγή απόλυτων συμπερασμάτων.

Από τα παραπάνω ευρήματα της παρούσας μελέτης, σε συνδυασμό με τα προαναφερθέντα ευρήματα άλλων ερευνητών, αναδύονται σημαντικές παθοφυσιολογικές ομοιότητες μεταξύ της PAH και της ΔN: ο συστηματικός προφλεγμονώδης χαρακτήρας και το αυξημένο οξειδωτικό stress συνιστούν προφανείς ομοιότητες, όπως και η μειωμένη έκφραση *SOD2* στο περιφερικό αίμα, της οποίας η προ-φλεγμονώδης επίδραση αναλύθηκε παραπάνω (εδάφιο 4.4). Στη ΔN, η μειωμένη έκφραση *SOD2* συνυπάρχει με και εν μέρει εξηγείται από τη μειωμένη έκφραση του *PPARGC1A*. Η εξήγηση αυτή ωστόσο δε φαίνεται να καλύπτει πλήρως την υποομάδα των ασθενών με υπερηχοκαρδιογραφικές ενδείξεις πνευμονικής υπέρτασης, που χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη στατιστικά σημαντική μείωση στην έκφραση *SOD2*, αλλά ελαφρώς αυξημένη έκφραση *PPARGC1A* (στατιστικά μη σημαντική διαφορά). Λαμβάνοντας υπόψη τη σημαντική επίπτωση της πνευμονικής υπέρτασης στους πάσχοντες από ΔN, τα παραπάνω ευρήματα αποτελούν σημαντικό βήμα στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της επιπλοκής αυτής: αναδεικνύουν ένα νέο πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου η ενδοαγγειακή αιμόλυση και η επακόλουθη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO έμμεσα προκαλεί την εμφάνιση πνευμονικής υπέρτασης, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα:

## Παθοφυσιολογία Πνευμονικής Υπέρτασης στη ΔΝ



Η επιβεβαίωση του παραπάνω παθοφυσιολογικού μονοπατιού απαιτεί περισσότερες έρευνες στο μέλλον, τόσο σε ζωικά πειραματικά μοντέλα της ΔΝ όσο και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές/ιστολογικά παρασκευάσματα. Συγκεκριμένα, απαιτείται η επαλήθευση της υπόθεσης της ρύθμισης του PGC-1α από το NO στα λεία μυϊκά κύτταρα των πνευμονικών αγγείων και στα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος, όπως και η επιβεβαίωση της μειωμένης έκφρασης του SOD2 στα λεία μυϊκά κύτταρα των πνευμονικών αγγείων πασχόντων από ΔΝ και πνευμονική υπέρταση. Παράλληλα, ενδιαφέρον παρουσιάζει η εξέταση της εμπλοκής της καταστολής της έκφρασης-δράσης των PGC-1α και SOD2 σε άλλες κλινικές εκδηλώσεις-επιπλοκές της νόσου, όπως οι αγγειοαποφρακτικές κρίσεις και σε άλλους κυτταρικούς τύπους, όπως οι πρόδρομες μορφές των ερυθροκυττάρων στο μυελό των οστών.

## 5.Βιβλιογραφία

1. Frenette PS, Atweh GF. Sick cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest*. 2007, 117(4):850-8.
2. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, McMahon RP, Bonds DR. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med*. 1995, 332(20):1317-22.
3. <http://www.who.int/bulletin/volumes/86/6/06-036673/en/>
4. Serjeant GR, Petch MC, Serjeant BE. The in vivo sickle phenomenon: a reappraisal. *J Lab Clin Med*. 1973, 81(6):850-6.
5. Embury SH. The not-so-simple process of sickle cell vasoocclusion. *Microcirculation*. 2004, 11(2):101-13.
6. Ueda Y, Bookchin RM. Effects of carbon dioxide and pH variations in vitro on blood respiratory functions, red blood cell volume, transmembrane pH gradients, and sickling in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med*. 1984, 104(2):146-59.
7. Eaton WA. Linus Pauling and sickle cell disease. *Biophys Chem*. 2003, 100(1-3):109-16.
8. Uzunova VV, Pan W, Galkin O, Vekilov PG. Free heme and the polymerization of sickle cell hemoglobin. *Biophys J*. 2010, 99(6):1976-85.
9. Vekilov PG. Sick-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? *Br J Haematol*. 2007, 139(2):173-84.
10. Steinberg MH. Sick cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal*. 2008, 8:1295-324.
11. Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood*. 2016 Feb 18;127(7):801-9.
12. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical physiology*, 3<sup>rd</sup> edition, Elsevier ISBN: 9781455743773

13. Lowe J, Anderson P. Stevens & Lowe's Human Histology, 4<sup>th</sup> edition, Elsevier ISBN: 9780723435020
14. Voskou S, Aslan M, Fanis P, Phylactides M, Kleanthous M. Oxidative stress in  $\beta$ -thalassemia and sickle cell disease. *Redox Biol.* 2015, 6: 226-39.
15. Förstermann U, Sessa WC. Nitric Oxide Synthases: Regulation and Function. *Eur Heart J.* 2012, 33(7): 829-37.
16. Campbell MG, Smith BC, Potter CS, Carragher B, Marletta MA. Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014, 111(35): 3614-23.
17. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993, 268(23):17478-88.
18. Searles CD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006, 291(5): 803-16.
19. Zhang R, Min W, Sessa WC. Functional analysis of human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995, 270(25):15320-6.
20. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 1994, 23(6 Pt 2):1121-31.
21. Coulet F, Nadaud S, Agrapart M, Soubrier F. Identification of hypoxia-response element in the endothelial nitric oxide gene promoter. *J Biol Chem.* 2003, 278(47): 46230-40.
22. Chan Y, Fish JE, D'Abreo C, Lin S, Robb GB, Teichert AM, Karantzoulis-Fegaras F, Keightley A, Steer BM, Marsden PA. The cell-specific expression of endothelial nitric oxide synthase: a role for DNA methylation. *J Biol Chem.* 2004, 279(33):35087-100.

23. Man HS, Yan MS, Lee JJ, Marsden PA. Epigenetic determinants of cardiovascular gene expression: vascular endothelium. *Epigenomics*. 2016, 8(7):959-79.
24. Lee KS, Kim J, Kwak SN, Lee KS, Lee DK, Ha KS, Won MH, Jeoung D, Lee H, Kwon YG, Kim YM. Functional role of NF- $\kappa$ B in expression of human endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014, 448(1):101-7.
25. Qian J, Fulton D. Post-translational regulation of human endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Front Physiol*. 2013, 4: 347.
26. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K. T-786--&gt;C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 1999, 99(22): 2864-70.
27. Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Biagini A, Clerico A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clin Chem*. 2003, 49(3): 389-95.
28. Salvi E, Kuznetsova T, Thijs L, Lupoli S, Stolarz-Skrzypek K, D'Avila F, Tikhonoff V, De Astis S, Barcella M, Seidlerová J, Benaglio P, Malyutina S, Frau F, Velayutham D, Benfante R, Zagato L, Title A, Braga D, Marek D, Kawecka-Jaszcz K, Casiglia E, Filipovsky J, Nikitin Y, Rivolta C, Manunta P, Beckmann JS, Barlassina C, Cusi D, Staessen JA. Target sequencing, cell experiments, and a population study establish endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene as hypertension susceptibility gene. *Hypertension*. 2013, 62(5): 844-52.
29. Ghilardi G, Biondi ML, DeMonti M, Bernini M, Turri O, Massaro F, Guagnellini E, Scorza R. Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis:T786C mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Clin Chem*. 2002, 48(7): 989-93.
30. Cheng J, Liu J, Li X, Yu L, Peng J, Zhang R, Geng Y, Nie S. Effect of polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase on ischemic stroke: a

- case-control study in a Chinese population. *Clin Chim Acta*. 2008, 392(1-2): 46-51.
31. Taverna MJ, Elgrably F, Selmi H, Selam JL, Slama G. The T-786C and C774T endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms independently affect the onset pattern of severe diabetic retinopathy. *Nitric Oxide*. 2005, 13(1): 88-92.
  32. Bazzaz JT, Amoli MM, Pravica V, Chandrasegaran R, Boulton AJ, Larijani B, Hutchinson IV. eNOS gene polymorphism association with retinopathy in type 1 diabetes. *Ophthalmic Genet*. 2010, 31(3): 103-7.
  33. Sharan K, Surrey S, Ballas S, Borowski M, Devoto M, Wang KF, Sandler E, Keller M. Association of T-786C eNOS gene polymorphism with increased susceptibility to acute chest syndrome in females with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2004, 124(2): 240-3.
  34. Chaar V, Tarer V, Etienne-Julan M, Diara JP, Elion J, Romana M. ET-1 and ecNOS gene polymorphisms and susceptibility to acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crises in children with sickle cell anemia. *Haematologica*. 2006, 91(9): 1277-8.
  35. Nishank SS, Singh MP, Yadav R, Gupta RB, Gadge VS, Gwal A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with sickle cell disease patients in India. *J Hum Genet*. 2013, 58(12): 775-9.
  36. Yousry SM, Ellithy HN, Shahin GH. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of vasculopathy in sickle cell disease. *Hematology*. 2016, 21(6): 359-67.
  37. Wang J, Dudley D, Wang XL. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency: modifiable by cigarette smoking. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002, 22(5): e1-4.
  38. Senthil D, Raveendran M, Shen YH, Utama B, Dudley D, Wang J, Wang XL. Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. *DNA Cell Biol*. 2005, 24(4): 218-24.

39. Sim AS, Wang J, Wilcken D, Wang XL. MspI polymorphism in the promoter of the human endothelial constitutive NO synthase gene in Australian Caucasian population. *Mol Genet Metab.* 1998, 65(1): 62.
40. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet.* 1998, 103(1): 65-9.
41. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension.* 1998, 32(1): 3-8.
42. Szolnoki Z, Havasi V, Bene J, Komlósi K, Szöke D, Somogyvári F, Kondacs A, Szabó M, Fodor L, Bodor A, Gáti I, Wittman I, Melegh B. Endothelial nitric oxide synthase gene interactions and the risk of ischaemic stroke. *Acta Neurol Scand.* 2005, 111(1): 29-33.
43. Tesouro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, 97(6): 2832-5.
44. Joshi MS, Bauer JA. Preliminary computational modeling of nitric oxide synthase 3 interactions with caveolin-1: influence of exon 7 Glu298Asp polymorphism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008, 40(1): 47-54.
45. Matsha TE, Pfeiffer C, Mutize T, Erasmus RT, Kengne AP. Glucose Tolerance, MTHFR C677T and NOS3 G894T Polymorphisms, and Global DNA Methylation in Mixed Ancestry African Individuals. *J Diabetes Res.* 2016, 2016: 8738072.

46. Stockman JA, Nigro MA, Mishkin MM, Oski FA. Occlusion of large cerebral vessels in sickle-cell anemia. *N Engl J Med.* 1972, 287(17):846-9.
47. Russell MO, Goldberg HI, Hodson A, Kim HC, Halus J, Reivich M, Schwartz E. Effect of transfusion therapy on arteriographic abnormalities and on recurrence of stroke in sickle cell disease. *Blood.* 1984, 63(1):162-9.
48. Rothman SM, Fulling KH, Nelson JS. Sickle cell anemia and central nervous system infarction: a neuropathological study. *Ann Neurol.* 1986, 20(6):684-90.
49. Blei F, Fancher T, Guarini L. Elevated levels of circulating molecules of potential endothelial origin in sickle cell disease [abstract]. *Blood.* 1994, 81(suppl 1):409.
50. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med.* 1997, 337(22):1584-90.
51. Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest.* 1998, 101(9):1899-904.
52. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994, 84(7):2068-101.
53. Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood.* 2000, 96(7):2451-9.
54. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, Smith A, Nath KA, Hebbel RP, Vercellotti GM. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood.* 2014, 123(3):377-90.
55. Mosseri M, Bartlett-Pandite AN, Wenc K, Isner JM, Weinstein R. Inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by sickle erythrocytes. *Am Heart J.* 1993, 126(2):338-46.



56. Hofstra TC, Kalra VK, Meiselman HJ, Coates TD. Sickle erythrocytes adhere to polymorphonuclear neutrophils and activate the neutrophil respiratory burst. *Blood*. 1996, 87(10):4440-7.
57. Lard LR, Mul FP, de Haas M, Roos D, Duits AJ. Neutrophil activation in sickle cell disease. *J Leukoc Biol*. 1999, 66(3):411-5.
58. Lum AF, Wun T, Staunton D, Simon SI. Inflammatory potential of neutrophils detected in sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2004, 76(2):126-33.
59. Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, Burk RD, Kunisaki Y, Jang JE, Scheiermann C, Merad M, Frenette PS. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*. 2015, 525(7570):528-32.
60. Benkerrou M, Delarche C, Brahimi L, Fay M, Vilmer E, Elion J, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2002, 99(7):2297-303.
61. Davis BK, Ting JP. NLRP3 has a sweet tooth. *Nat Immunol*. 2010, 11(2):105-6.
62. Jo EK, Kim JK, Shin DM, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol*. 2016, 13(2):148-59.
63. Guarda G, Zenger M, Yazdi AS, Schroder K, Ferrero I, Menu P, Tardivel A, Mattmann C, Tschopp J. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J Immunol*. 2011 Feb 15;186(4):2529-34.
64. Pitanga TN, Oliveira RR, Zanette DL, Guarda CC, Santiago RP, Santana SS, Nascimento VM, Lima JB, Carvalho GQ, Maffili VV, Carvalho MO, Alcântara LC, Borges VM, Goncalves MS. Sickle red cells as danger signals on proinflammatory gene expression, leukotriene B<sub>4</sub> and interleukin-1 beta production in peripheral blood mononuclear cell. *Cytokine*. 2016, 83:75-84.

65. Duits AJ, Schnog JB, Lard LR, Saleh AW, Rojer RA. Elevated IL-8 levels during sickle cell crisis. *Eur J Haematol.* 1998, 61(5):302-5.
66. Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad ST, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematol.* 2005,113(2):130-6.
67. Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. *J Lab Clin Med.*2001, 137(6):398-407.
68. Wun T, Paglieroni T, Rangaswami A, Franklin PH, Welborn J, Cheung A, Tablin F. Platelet activation in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol.* 1998, 100(4):741-9.
69. Papadimitriou CA, Travlou A, Kalos A, Douratsos D, Lali P. Study of platelet function in patients with sickle cell anemia during steady state and vaso-occlusive crisis. *Acta Haematol.* 1993, 89(4):180-3.
70. Adamides S, Konstantopoulos K, Toumbis M, Douratsos D, Travlou A, Kasfiki A. A study of beta-thromboglobulin and platelet factor-4 plasma levels in steady state sickle cell patients. *Blut.* 1990, 61(4):245-7.
71. Pakbaz Z, Wun T. Role of the hemostatic system on sickle cell disease pathophysiology and potential therapeutics. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014, 28(2):355-74.
72. Westerman MP, Green D, Gilman-Sachs A, Beaman K, Freels S, Boggio L, Allen S, Zuckerman L, Schlegel R, Williamson P. Antiphospholipid antibodies, proteins C and S, and coagulation changes in sickle cell disease. *J Lab Clin Med.* 1999, 134(4):352-62.
73. Patel N, Sundaram N, Yang M, Madigan C, Kalra VK, Malik P. Placenta growth factor (PlGF), a novel inducer of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in sickle cell disease (SCD). *J Biol Chem.* 2010, 285(22):16713-22.
74. Faller DV. Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999, 26(1): 74-84.
75. Bardos JI, Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta.* 2005, 1755(2): 107-20.

76. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int.* 2015, 2015: 549412.
77. Michiels C, Minet E, Michel G, Mottet D, Piret JP, Raes M. HIF-1 and AP-1 cooperate to increase gene expression in hypoxia: role of MAP kinases. *IUBMB Life.* 2001, 52(1-2): 49-53.
78. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 2002, 16(12): 1466-71.
79. Lee G, Won HS, Lee YM, Choi JW, Oh TI, Jang JH, Choi DK, Lim BO, Kim YJ, Park JW, Puigserver P, Lim JH. Oxidative Dimerization of PHD2 is Responsible for its Inactivation and Contributes to Metabolic Reprogramming via HIF-1 $\alpha$  Activation. *Sci Rep.* 2016, 6:18928.
80. Li YN, Xi MM, Guo Y, Hai CX, Yang WL, Qin XJ. NADPH oxidase-mitochondria axis-derived ROS mediate arsenite-induced HIF-1 $\alpha$  stabilization by inhibiting prolyl hydroxylases activity. *Toxicol Lett.* 2014, 224(2):165-74.
81. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol.* 2001, 21(12):3995-4004.
82. Al Taleb Z, Petry A, Chi TF, Mennerich D, Görlach A, Dimova EY, Kietzmann T. Differential transcriptional regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by arsenite under normoxia and hypoxia: involvement of Nrf2. *J Mol Med (Berl).* 2016, 94(10):1153-1166.
83. Dong SY, Guo YJ, Feng Y, Cui XX, Kuo SH, Liu T, Wu YC. The epigenetic regulation of HIF-1 $\alpha$  by SIRT1 in MPP(+) treated SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016, 470(2):453-9.

84. Szade A, Grochot-Przeczek A, Florczyk U, Jozkowicz A, Dulak J. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IUBMB Life*. 2015, 67(3):145-59.
85. Wellman TL, Jenkins J, Penar PL, Tranmer B, Zahr R, Lounsbury KM. Nitric oxide and reactive oxygen species exert opposing effects on the stability of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in explants of human pial arteries. *FASEB J*. 2004, 18(2):379-81.
86. Wei L, Zhou Y, Qiao C, Ni T, Li Z, You Q, Guo Q, Lu N. Oroxylin A inhibits glycolysis-dependent proliferation of human breast cancer via promoting SIRT3-mediated SOD2 transcription and HIF1 $\alpha$  destabilization. *Cell Death Dis*. 2015, 6:e1714.
87. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell*. 2010, 38(6):864-78.
88. Koslowski M, Luxemburger U, Türeci O, Sahin U. Tumor-associated CpG demethylation augments hypoxia-induced effects by positive autoregulation of HIF-1 $\alpha$ . *Oncogene*. 2011, 30(7):876-82.
89. Mistry IN, Smith PJ, Wilson DI, Tavassoli A. Probing the epigenetic regulation of HIF-1 $\alpha$  transcription in developing tissue. *Mol Biosyst*. 2015, 11(10):2780-5.
90. Li C, Mpollo MS, Gonsalves CS, Tahara SM, Malik P, Kalra VK. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ -mediated transcription of miR-199a2 attenuates endothelin-1 expression via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *J Biol Chem*. 2014, 289(52):36031-47.
91. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005, 105(2):659-69.
92. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991, 88(13):5680-4.
93. Yamashita K, Discher DJ, Hu J, Bishopric NH, Webster KA. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. *Contributions of hypoxia-*

- inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J Biol Chem.* 2001, 276(16):12645-53.
94. Patel N, Kalra VK. Placenta growth factor-induced early growth response 1 (Egr-1) regulates hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2010, 285(27):20570-9.
  95. Rodriguez-Miguel P, Lima-Cabello E, Martínez-Flórez S, Almar M, Cuevas MJ, González-Gallego J. Hypoxia-inducible factor-1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase induced by eccentric exercise. *J Appl Physiol (1985).* 2015, 118(8):1075-83.
  96. Jensen KS, Binderup T, Jensen KT, Therkelsen I, Borup R, Nilsson E, Multhaupt H, Bouchard C, Quistorff B, Kjaer A, Landberg G, Staller P. FoxO3A promotes metabolic adaptation to hypoxia by antagonizing Myc function. *EMBO J.* 2011, 30(22):4554-70.
  97. Ferber EC, Peck B, Delpuech O, Bell GP, East P, Schulze A. FOXO3a regulates reactive oxygen metabolism by inhibiting mitochondrial gene expression. *Cell Death Differ.* 2012, 19(6):968-79.
  98. Greijer AE, van der Groep P, Kemming D, Shvarts A, Semenza GL, Meijer GA, van de Wiel MA, Belien JA, van Diest PJ, van der Wall E. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol.* 2005, 206(3):291-304.
  99. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* 2004, 10(8):858-64.
  100. Rybicki AC, Benjamin LJ. Increased levels of endothelin-1 in plasma of sickle cell anemia patients. *Blood.* 1998, 92(7):2594-6.
  101. Sundaram N, Tailor A, Mendelsohn L, Wansapura J, Wang X, Higashimoto T, Pauciulo MW, Gottliebson W, Kalra VK, Nichols WC, Kato GJ, Malik P. High levels of placenta growth factor in sickle cell disease promote pulmonary hypertension. *Blood.* 2010, 116(1):109-12.

102. Perelman N, Selvaraj SK, Batra S, Luck LR, Erdreich-Epstein A, Coates TD, Kalra VK, Malik P. Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. *Blood*. 2003, 102(4):1506-14.
103. Lopes FC, Traina F, Almeida CB, Leonardo FC, Franco-Penteado CF, Garrido VT, Colella MP, Soares R, Olalla-Saad ST, Costa FF, Conran N. Key endothelial cell angiogenic mechanisms are stimulated by the circulating milieu in sickle cell disease and attenuated by hydroxyurea. *Haematologica*. 2015, 100(6):730-9.
104. Holley AK, Bakthavatchalu V, Velez-Roman JM, St Clair DK. Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse. *Int J Mol Sci*. 2011, 12(10):7114-62.
105. Dhar SK, St Clair DK. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. *Free Radic Biol Med*. 2012, 52(11-12):2209-22.
106. Chaudhuri L, Nicholson AM, Kalen AL, Goswami PC. Preferential selection of MnSOD transcripts in proliferating normal and cancer cells. *Oncogene*. 2012, 31(10):1207-16.
107. Xu Y, Porntadavity S, St Clair DK. Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). *Biochem J*. 2002, 362(Pt 2):401-12.
108. Dhar SK, Xu Y, Chen Y, St Clair DK. Specificity protein 1-dependent p53-mediated suppression of human manganese superoxide dismutase gene expression. *J Biol Chem*. 2006, 281(31):21698-709.
109. Klotz LO, Sánchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, Urbánek P, Steinbrenner H, Monsalve M. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol*. 2015, 6:51-72.
110. Olmos Y, Sánchez-Gómez FJ, Wild B, García-Quintans N, Cabezudo S, Lamas S, Monsalve M. SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1 $\alpha$  complex. *Antioxid Redox Signal*. 2013, 19(13):1507-21.

111. Tseng AH, Shieh SS, Wang DL. SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage. *Free Radic Biol Med.* 2013, 63:222-34.
112. Tseng AH, Wu LH, Shieh SS, Wang DL. SIRT3 interactions with FOXO3 acetylation, phosphorylation and ubiquitinylation mediate endothelial cell responses to hypoxia. *Biochem J.* 2014, 464(1):157-68.
113. Hagenbuchner J, Ausserlechner MJ. Mitochondria and FOXO3: breath or die. *Front Physiol.* 2013, 4:147.
114. Huang Y, Peng J, Oberley LW, Domann FE. Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5' CpG island. *Free Radic Biol Med.* 1997, 23(2):314-20.
115. Huang Y, He T, Domann FE. Decreased expression of manganese superoxide dismutase in transformed cells is associated with increased cytosine methylation of the SOD2 gene. *DNA Cell Biol.* 1999, 18(8):643-52.
116. Cyr AR, Hitchler MJ, Domann FE. Regulation of SOD2 in cancer by histone modifications and CpG methylation: closing the loop between redox biology and epigenetics. *Antioxid Redox Signal.* 2013, 18(15):1946-55.
117. Thaler R, Karlic H, Rust P, Haslberger AG. Epigenetic regulation of human buccal mucosa mitochondrial superoxide dismutase gene expression by diet. *Br J Nutr.* 2009, 101(5):743-9.
118. Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, van der Meer R, Nguyen P, Savage J, Owens KM, Vassilopoulos A, Ozden O, Park SH, Singh KK, Abdulkadir SA, Spitz DR, Deng CX, Gius D. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell.* 2010, 17(1):41-52.
119. Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park SH, Jiang H, Kim HS, Flynn CR, Hill S, Hayes McDonald W, Olivier AK, Spitz DR, Gius D. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122

- regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell*. 2010, 40(6):893-904.
120. Shoag J, Arany Z. Regulation of hypoxia-inducible genes by PGC-1 alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010, 30(4):662-6.
121. Cherry AD, Suliman HB, Bartz RR, Piantadosi CA. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activator 1- $\alpha$  as a critical co-activator of the murine hepatic oxidative stress response and mitochondrial biogenesis in *Staphylococcus aureus* sepsis. *J Biol Chem*. 2014, 289(1):41-52.
122. Zhang K, Lu J, Mori T, Smith-Powell L, Synold TW, Chen S, Wen W. Baicalin increases VEGF expression and angiogenesis by activating the ERR $\alpha$ /PGC-1 $\alpha$  pathway. *Cardiovasc Res*. 2011, 89(2):426-35.
123. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 2006, 127(2):397-408.
124. Wang Q, Li L, Li CY, Pei Z, Zhou M, Li N. SIRT3 protects cells from hypoxia via PGC-1 $\alpha$ - and MnSOD-dependent pathways. *Neuroscience*. 2015, 286:109-21.
125. Lu Z, Xu X, Hu X, Fassett J, Zhu G, Tao Y, Li J, Huang Y, Zhang P, Zhao B, Chen Y. Mitochondrial development and the influence of its dysfunction during rat adipocyte differentiation. *Mol Biol Rep*. 2010, 37(5):2173-82.
126. Villena JA. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *Villena JA.FEBS J*. 2015 Feb;282(4):647-72.
127. Rangwala SM, Li X, Lindsley L, Wang X, Shaughnessy S, Daniels TG, Szustakowski J, Nirmala NR, Wu Z, Stevenson SC. Estrogen-related receptor alpha is essential for the expression of antioxidant protection genes and mitochondrial function. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 May 25;357(1):231-6.



128. Olmos Y, Valle I, Borniquel S, Tierrez A, Soria E, Lamas S, Monsalve M. Mutual dependence of Foxo3a and PGC-1alpha in the induction of oxidative stress genes. *J Biol Chem.* 2009, 284(21):14476-84.
129. Wątroba M, Szukiewicz D. The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Adv Med Sci.* 2016, 61(1):52-62
130. Bellizzi D, Rose G, Cavalcante P, Covello G, Dato S, De Rango F, Greco V, Maggiolini M, Feraco E, Mari V, Franceschi C, Passarino G, De Benedictis G. A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics.* 2005, 85(2):258-63.
131. Amat R, Planavila A, Chen SL, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Co-activator-1alpha (PGC-1alpha) gene in skeletal muscle through the PGC-1alpha autoregulatory loop and interaction with MyoD. *J Biol Chem.* 2009, 284(33):21872-80.
132. Finley LW, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, Teruya-Feldstein J, Moreira PI, Cardoso SM, Clish CB, Pandolfi PP, Haigis MC. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 $\alpha$  destabilization. *Cancer Cell.* 2011, 19(3):416-28.
133. Bell EL, Emerling BM, Ricoult SJ, Guarente L. SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. *Oncogene.* 2011, 30(26):2986-96.
134. Li S, Banck M, Mujtaba S, Zhou MM, Sugrue MM, Walsh MJ. p53-induced growth arrest is regulated by the mitochondrial SirT3 deacetylase. *PLoS One.* 2010, 5(5):e10486.
135. Hu N, Ren J, Zhang Y. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase obliterates insulin resistance-induced cardiac dysfunction through deacetylation of PGC-1 $\alpha$ . *Oncotarget.* 2016, 7(47):76398-76414.
136. Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell.* 2001, 8(5):971-82.

137. Wright DC, Geiger PC, Han DH, Jones TE, Holloszy JO. Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* 2007, 282(26):18793-9.
138. Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007, 104(29):12017-22.
139. Lira VA, Brown DL, Lira AK, Kavazis AN, Soltow QA, Zeanah EH, Criswell DS. Nitric oxide and AMPK cooperatively regulate PGC-1 in skeletal muscle cells. *J Physiol.* 2010, 588(Pt 18):3551-66.
140. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science.* 2005, 310(5746):314-7.
141. Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *FASEB J.* 2006, 20(11):1889-91.
142. Borniquel S, García-Quintáns N, Valle I, Olmos Y, Wild B, Martínez-Granero F, Soria E, Lamas S, Monsalve M. Inactivation of Foxo3a and subsequent downregulation of PGC-1 alpha mediate nitric oxide-induced endothelial cell migration. *Mol Cell Biol.* 2010, 30(16):4035-44.
143. Diaz F, Moraes CT. Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium.* 2008, 44(1):24-35.
144. Pambianco S, Giovarelli M, Perrotta C, Zecchini S, Cervia D, Di Renzo I, Moscheni C, Ripolone M, Violano R, Moggio M, Bassi MT, Puri PL, Latella L, Clementi E, De Palma C. Reversal of Defective Mitochondrial Biogenesis in Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2D by Independent Modulation of Histone and PGC-1 $\alpha$  Acetylation. *Cell Rep.* 2016, 17(11):3010-3023.

145. Lochmann TL, Thomas RR, Bennett JP Jr, Taylor SM. Epigenetic Modifications of the PGC-1 $\alpha$  Promoter during Exercise Induced Expression in Mice. *PLoS One*. 2015, 10(6):e0129647.
146. Chirico EN, Pialoux V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*. 2012, 64(1):72-80.
147. Gizi A, Papassotiriou I, Apostolakou F, Lazaropoulou C, Papastamataki M, Kanavaki I, Kalotychoy V, Goussetis E, Kattamis A, Rombos I, Kanavakis E. Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: The glutathione system and the oxidant-antioxidant status. *Blood Cells Mol Dis*. 2011, 46(3):220-5.
148. Nur E, Biemond BJ, Otten HM, Brandjes DP, Schnog JJ. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *Am J Hematol*. 2011, 86(6):484-9.
149. George A, Pushkaran S, Konstantinidis DG, Koochaki S, Malik P, Mohandas N, Zheng Y, Joiner CH, Kalfa TA. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. *Blood*. 2013, 121(11):2099-107.
150. Amer J, Ghoti H, Rachmilewitz E, Koren A, Levin C, Fibach E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *Br J Haematol*. 2006, 132(1):108-13.
151. Schacter L, Warth JA, Gordon EM, Prasad A, Klein BL. Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. *FASEB J*. 1988, 2(3):237-43.
152. Natta CL, Chen LC, Chow CK. Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. *Acta Haematol*. 1990, 83(3):130-2.
153. Morris CR, Suh JH, Hagar W, Larkin S, Bland DA, Steinberg MH, Vichinsky EP, Shigenaga M, Ames B, Kuypers FA, Klings ES. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*. 2008, 111(1):402-10.

154. Schaer DJ, Vinchi F, Ingoglia G, Tolosano E, Buehler PW. Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways-basic science, clinical perspectives, and drug development. *Front Physiol.* 2014, 5:415.
155. Kassa T, Jana S, Strader MB, Meng F, Jia Y, Wilson MT, Alayash AI. Sick Cell Hemoglobin in the Ferryl State Promotes  $\beta$ Cys-93 Oxidation and Mitochondrial Dysfunction in Epithelial Lung Cells (E10). *J Biol Chem.* 2015, 290(46):27939-58.
156. Dutra FF, Alves LS, Rodrigues D, Fernandez PL, de Oliveira RB, Golenbock DT, Zamboni DS, Bozza MT. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014, 111(39):E4110-8.
157. Schnog JB, Teerlink T, van der Dijs FP, Duits AJ, Muskiet FA. Plasma levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, are elevated in sickle cell disease. *Ann Hematol.* 2005, 84(5):282-6.
158. Gladwin MT, Kato GJ. Cardiopulmonary complications of sickle cell disease: role of nitric oxide and hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005, 51-7.
159. Nelson D, Cox M. Lehninger
160. Bailey LB, Gregory JF 3rd. Folate metabolism and requirements. *J Nutr.* 1999 Apr;129(4): 779-82.
161. Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet.* 2015, 58(1): 1-10.
162. Bailey LB, Gregory JF 3rd. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr.* 1999, 129(5): 919-22.
163. Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, Zivelin A, Geffen E, Seligsohn U. The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. *Am J Hum Genet.* 2002, 70(3): 758-62.

164. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet.* 1988, 43(4): 414-21.
165. Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost.* 1997, 78(1): 523-6.
166. Pereira AC, Schettert IT, Morandini Filho AA, Guerra-Shinohara EM, Krieger JE. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. *Clin Chim Acta.* 2004, 340(1-2): 99-105.
167. Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi SW. Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000, 9(8): 849-53.
168. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci.* 2001, 22(4): 195-201.
169. Rai V. Methylenetetrahydrofolate Reductase A1298C Polymorphism and Breast Cancer Risk: A Meta-analysis of 33 Studies. *Ann Med Health Sci Res.* 2014, 4(6): 841-51.
170. Klings ES, Machado RF, Barst RJ, Morris CR, Mubarak KK, Gordeuk VR, Kato GJ, Ataga KI, Gibbs JS, Castro O, Rosenzweig EB, Sood N, Hsu L, Wilson KC, Telen MJ, Decastro LM, Krishnamurti L, Steinberg MH, Badesch DB, Gladwin MT. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: diagnosis, risk stratification, and management of pulmonary hypertension of sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014,189(6):727-40.
171. Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor J 6th, Morris CR, Nichols JS, Wang X, Poljakovic M, Morris SM Jr, Gladwin MT. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide

- resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*. 2006, 107(6):2279-85.
172. Waterland RA. Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. *J pediatr*. 2006, 149 (suppl 5): 137-42.
173. Lewin Genes X
174. Razin A, Kantor B. DNA methylation in epigenetic control of gene expression. *Prog Mol Subcel Biol*. 2005, 138: 151-67.
175. Bannister A, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011, 21(3): 381-95.
176. Krol J, Kryzosiak WJ. Structural aspects of microRNA biogenesis. *IUBMB Life*. 2004, 56(2): 95-100.
177. Atwood BL, Woolnough JL, Lefevre GM, Saint Just Ribeiro M, Felsenfeld G, Giles KE. Human Argonaute 2 is tethered to ribosomal RNA through MicroRNA interactions. *J Biol Chem*. 2016, 291(34): 17919-28.
178. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian RNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009, 19(1): 92-105.
179. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in control of Gene expression: an overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci*. 2016, 17(10): 1712.
180. Quan M, Chen J, Zhang D. Exploring the secrets of long noncoding RNAs. *nt J Mol Sci*. 2015, 16(3): 5467-96.
181. Belmont JW. Genetic control of X inactivation and processes leading to X-inactivation skewing. *Am J Hum Genet*. 1996, 58(6): 1101-8.
182. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004, 95(4):343-53.
183. Fadini GP, de Kreutzenberg S, Albiero M, Coracina A, Pagnin E, Baesso I, Cignarella A, Bolego C, Plebani M, Nardelli GB, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008, 28(5):997-1004.

184. Kiewisz J, Kaczmarek MM, Pawlowska A, Kmiec Z, Stompor T. Endothelial progenitor cells participation in cardiovascular and kidney diseases: a systematic review. *Acta Biochim Pol.* 2016, 63(3):475-82.
185. Anjum F, Lazar J, Zein J, Jamaledine G, Demetis S, Wadgaonkar R. Characterization of altered patterns of endothelial progenitor cells in sickle cell disease related pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ.* 2012, 2(1):54-60.
186. Rodrigo M, Mendelsohn L, Bereal-Williams C, Hunter L, Dalby CK, McGowan V 2nd, Hunter CJ, Machado RF, McCoy JP, Cannon RO 3rd, Kato GJ. Circulating endothelial progenitor cells in adults with sickle cell disease. *Pulm Circ.* 2013, 3(2):448-9.
187. Miller JR, Andre R. Quantitative polymerase chain reaction. *Br J Hosp Med (Lond).* 2014, 75(12):C188-92.
188. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008, 3(6):1101-8.
189. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, 89(5):1827-31.
190. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, 93(18):9821-6.
191. Derks S, Lentjes MH, Hellebrekers DM, de Bruïne AP, Herman JG, van Engeland M. Methylation-specific PCR unraveled. *Cell Oncol.* 2004, 26(5-6):291-9.
192. Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002, 18(11):1427-31.
193. Konstantopoulos K, Vulliamy T, Swirsky D, Reeves JD, Kaeda J, Luzzatto L. DNA haplotypes in Africans and West Indians with sickle cell anaemia or SC disease. *Gene Geogr.* 1996, 10(1):19-24.

194. Driss A, Asare KO, Hibbert JM, Gee BE, Adamkiewicz TV, Stiles JK. Sick Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. *Genomics Insights*. 2009, (2):23-48.
195. Vargas AE, da Silva MA, Silla L, Chies JA. Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. *Tissue Antigens*. 2005, 66(6):683-90.
196. Thakur TJ, Guindo A, Cullifer LR, Li Y, Imumorin IG, Diallo DA, Thomas BN. Endothelin-1 but not Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism is Associated with Sick Cell Disease in Africa. *Gene Regul Syst Bio*. 2014, 8:119-26.
197. Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics*. 2001, 11(8):719-25.
198. Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B. Acute chest syndrome in sickle cell disease: clinical presentation and course. *Cooperative Study of Sick Cell Disease. Blood*. 1997, 89(5):1787-92.
199. Bonanomi MT, Lavezzo MM. Sick cell retinopathy: diagnosis and treatment. *Arq Bras Oftalmol*. 2013, 76(5):320-7.
200. Kim SY, Mocanu C, Mcleod DS, Bhutto IA, Merges C, Eid M, Tong P, Luty GA. Expression of pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in sickle cell retina and choroid. *Exp Eye Res*. 2003, 77(4):433-45.
201. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98(5):2604-9.
202. Bouloumié A, Schini-Kerth VB, Busse R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 1999, 41(3):773-80.
203. Yanamandra K, Napper D, Pramanik A, Bocchini JA Jr, Dhanireddy R. Endothelial nitric oxide synthase genotypes in the etiology of retinopathy



- of prematurity in premature infants. *Ophthalmic Genet.* 2010, 31(4):173-7.
204. Cokić VP, Schechter AN. Effects of nitric oxide on red blood cell development and phenotype. *Curr Top Dev Biol.* 2008, 82:169-215.
205. van der Dijs FP, Schnog JJ, Brouwer DA, Velvis HJ, van den Berg GA, Bakker AJ, Duits AJ, Muskiet FD, Muskiet FA. Elevated homocysteine levels indicate suboptimal folate status in pediatric sickle cell patients. *Am J Hematol.* 1998, 59(3):192-8.
206. Houston PE, Rana S, Sekhsaria S, Perlin E, Kim KS, Castro OL. Homocysteine in sickle cell disease: relationship to stroke. *Am J Med.* 1997, 103(3):192-6.
207. Cumming AM, Olujohungbe A, Keeney S, Singh H, Hay CR, Serjeant GR. The methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism in patients with homozygous sickle cell disease and stroke. *Br J Haematol.* 1999, 107(3):569-71.
208. Andrade FL, Annichino-Bizzacchi JM, Saad ST, Costa FF, Arruda VR. Prothrombin mutant, factor V Leiden, and thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase among patients with sickle cell disease in Brazil. *Am J Hematol.* 1998, 59(1):46-50.
209. Zimmerman SA, Ware RE. Inherited DNA mutations contributing to thrombotic complications in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol.* 1998, 59(4):267-72.
210. Balasa VV, Gruppo RA, Gartside PS, Kalinyak KA. Correlation of the C677T MTHFR genotype with homocysteine levels in children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1999, 21(5):397-400.
211. Balasa VV, Kalinyak KA, Bean JA, Stroop D, Gruppo RA. Hyperhomocysteinemia is associated with low plasma pyridoxine levels in children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2002, 24(5):374-9.
212. Al-Absi IK, Al-Subaie AM, Ameen G, Mahdi N, Mohammad AM, Fawaz NA, Almawi WY. Association of the methylenetetrahydrofolate reductase

- A1298C but not the C677T single nucleotide polymorphism with sickle cell disease in Bahrain. *Hemoglobin*. 2006, 30(4):449-53.
213. Al-Saqladi AW, Harper G, Delpisheh A, Fijnvandraat K, Bin-Gadeem HA, Brabin BJ. Frequency of the MTHFR C677T polymorphism in Yemeni children with sickle cell disease. *Hemoglobin*. 2010, 34(1):67-77.
214. Italia K, Kangne H, Shanmukaiah C, Nadkarni AH, Ghosh K, Colah RB. Variable phenotypes of sickle cell disease in India with the Arab-Indian haplotype. *Br J Haematol*. 2015, 168(1):156-9.
215. Kangne HK, Jijina FF, Italia YM, Jain DL, Nadkarni AH, Ghosh KK, Colah RB. The Prevalence of Factor V Leiden (G1691A) and Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Mutations in Sickle Cell Disease in Western India. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2015, 21(2):186-9.
216. Pandey SK, Meena A, Kishor K, Mishra RM, Pandey S, Saxena R. Prevalence of factor V Leiden G1691A, MTHFR C677T, and prothrombin G20210A among Asian Indian sickle cell patients. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012, 18(3):320-3.
217. Isma'eel H, Arnaout MS, Shamseddeen W, Mahfouz R, Zeineh N, Jradi O, Taher A. Screening for inherited thrombophilia might be warranted among Eastern Mediterranean sickle-beta-0 thalassemia patients. *J Thromb Thrombolysis*. 2006, 22(2):121-3.
218. Moreira Neto F, Lourenço DM, Noguti MA, Morelli VM, Gil IC, Beltrão AC, Figueiredo MS. The clinical impact of MTHFR polymorphism on the vascular complications of sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res*. 2006, 39(10):1291-5.
219. Hatzlhofer BL, Bezerra MA, Santos MN, Albuquerque DM, Freitas EM, Costa FF, Araújo AS, Muniz MT. MTHFR polymorphic variant C677T is associated to vascular complications in sickle-cell disease. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012, 16(9):1038-43.
220. Nishank SS, Singh MP, Yadav R. Clinical impact of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations among sickle cell disease patients of Central India. *Eur J Haematol*. 2013, 91(5):462-6.

221. Gialeraki A, Politou M, Rallidis L, Merkouri E, Markatos C, Kremastinos D, Travlou A. Prevalence of prothrombotic polymorphisms in Greece. *Genet Test*. 2008, 12(4):541-7.
222. Yapijakis C, Serefoglou Z, Nixon AM, Vylliotis A, Ragos V, Vairaktaris E. Prevalence of thrombosis-related DNA polymorphisms in a healthy Greek population. *In Vivo*. 2012, 26(6):1095-101.
223. Jakubowski H, Boers GH, Strauss KA. Mutations in cystathionine beta-synthase or methylenetetrahydrofolate reductase gene increase N-homocysteinylated protein levels in humans. *FASEB J*. 2008, 22(12):4071-6.
224. Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, Halašová E, Lehotský J. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int J Mol Sci*. 2016, 17(10). pii: E1733.
225. Gurda D, Handschuh L, Kotkowiak W, Jakubowski H. Homocysteine thiolactone and N-homocysteinylated protein induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Amino Acids*. 2015, 47(7):1319-39.
226. Aarabi M, San Gabriel MC, Chan D, Behan NA, Caron M, Pastinen T, Bourque G, MacFarlane AJ, Zini A, Trasler J. High-dose folic acid supplementation alters the human sperm methylome and is influenced by the MTHFR C677T polymorphism. *Hum Mol Genet*. 2015, 24(22):6301-13.
227. van Mil NH, Bouwland-Both MI, Stolk L, Verbiest MM, Hofman A, Jaddoe VW, Verhulst FC, Eilers PH, Uitterlinden AG, Steegers EA, Tiemeier H, Steegers-Theunissen RP. Determinants of maternal pregnancy one-carbon metabolism and newborn human DNA methylation profiles. *Reproduction*. 2014, 148(6):581-92.
228. McKay JA, Groom A, Potter C, Coneyworth LJ, Ford D, Mathers JC, Relton CL. Genetic and non-genetic influences during pregnancy on infant global and site specific DNA methylation: role for folate gene variants and vitamin B12. *PLoS One*. 2012, 7(3):e33290.

229. Cheng H, Deng Z, Wang Z, Zhang W, Su J. MTHFR C677T polymorphisms are associated with aberrant methylation of the IGF-2 gene in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Biomed Res.* 2012, 26(2):77-83.
230. Cheng H, Lu M, Mao LJ, Wang JQ, Li W, Wen RM, Chen JC. Relationships among MTHFR a1298c gene polymorphisms and methylation status of Dact1 gene in transitional cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012, 13(10):5069-74.
231. Wang L, Shangguan S, Chang S, Yu X, Wang Z, Lu X, Wu L, Zhang T. Determining the association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and genomic DNA methylation level: A meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2016, 106(8):667-74.
232. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009, 47(4):344-56.
233. Archer SL. Acquired Mitochondrial Abnormalities, Including Epigenetic Inhibition of Superoxide Dismutase 2, in Pulmonary Hypertension and Cancer: Therapeutic Implications. *Adv Exp Med Biol.* 2016, 903:29-53.
234. Ren H, Ghebremeskel K, Okpala I, Lee A, Ibegbulam O, Crawford M. Patients with sickle cell disease have reduced blood antioxidant protection. *Int J Vitam Nutr Res.* 2008, 78(3):139-47.
235. Khymenets O, Covas MI, Farré M, Langohr K, Fitó M, de la Torre R. Role of sex and time of blood sampling in SOD1 and SOD2 expression variability. *Clin Biochem.* 2008, 41(16-17):1348-54.
236. Sinha S. Anti-oxidant gene expression imbalance, aging and Down syndrome. *Life Sci.* 2005, 76(12):1407-26.
237. Machado RF, Anthi A, Steinberg MH, Bonds D, Sachdev V, Kato GJ, Taveira-DaSilva AM, Ballas SK, Blackwelder W, Xu X, Hunter L, Barton B, Waclawiw M, Castro O, Gladwin MT; MSH Investigators. N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels and risk of death in sickle cell disease. *JAMA.* 2006, 296(3):310-8.

238. Maitra P, Caughey M, Robinson L, Desai PC, Jones S, Nouraie M, Gladwin MT, Hinderliter A, Cai J, Ataga KI. Risk factors for mortality in adult patients with sickle cell disease: a meta-analysis of studies in North America and Europe. *Haematologica*. 2017, 102(4):626-636.
239. Mata M, Sarrion I, Milian L, Juan G, Ramon M, Naufal D, Gil J, Ridocci F, Fabregat-Andrés O, Cortijo J. PGC-1 $\alpha$  induction in pulmonary arterial hypertension. *Oxid Med Cell Longev*. 201,236572.
240. Song P, Kwon Y, Yea K, Moon HY, Yoon JH, Ghim J, Hyun H, Kim D, Koh A, Berggren PO, Suh PG, Ryu SH. Apolipoprotein a1 increases mitochondrial biogenesis through AMP-activated protein kinase. *Cell Signal*. 2015, 27(9):1873-81.
241. Greene NP, Fluckey JD, Lambert BS, Greene ES, Riechman SE, Crouse SF. Regulators of blood lipids and lipoproteins? PPAR $\delta$  and AMPK, induced by exercise, are correlated with lipids and lipoproteins in overweight/obese men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012, 303(10):E1212-21.
242. Qian J, Chen S, Huang Y, Shi X, Liu C. PGC-1 $\alpha$  regulates hepatic hepcidin expression and iron homeostasis in response to inflammation. *Mol Endocrinol*. 2013, 27(4):683-92
243. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab*. 2005, 1(3):191-200.
244. Vecchi C, Montosi G, Garuti C, Corradini E, Sabelli M, Canali S, Pietrangelo A. Gluconeogenic signals regulate iron homeostasis via hepcidin in mice. *Gastroenterology*. 2014, 146(4):1060-9.
245. Simcox JA, Mitchell TC, Gao Y, Just SF, Cooksey R, Cox J, Ajioka R, Jones D, Lee SH, King D, Huang J, McClain DA. Dietary iron controls circadian hepatic glucose metabolism through heme synthesis. *Diabetes*. 2015, 64(4):1108-19.
246. Han DH, Hancock CR, Jung SR, Higashida K, Kim SH, Holloszy JO. Deficiency of the mitochondrial electron transport chain in muscle does not cause insulin resistance. *PLoS One*. 2011, 6(5):e19739.

247. Deng Y, Zhang Q, Luo H, Chen X, Han Q, Wang F, Huang P, Lai W, Guan X, Pan X, Ji Y, Guo W, Che L, Tang Y, Gu L, Yu J, Namaka M, Deng Y, Li X. Sustained elevation of NF- $\kappa$ B activity sensitizes offspring of maternal inflammation to hypertension via impairing PGC-1 $\alpha$  recovery. *Sci Rep.* 2016, 6:32642.
248. Görlach A. Regulation of HIF-1 $\alpha$  at the transcriptional level. *Curr Pharm Des.* 2009, 15(33):3844-52.
249. Bonello S, Zähringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, Kietzmann T, Görlach A. Reactive oxygen species activate the HIF-1 $\alpha$  promoter via a functional NF $\kappa$ B site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007, 27(4):755-61.
250. Kaul DK, Fabry ME, Suzuka SM, Zhang X. Antisickling fetal hemoglobin reduces hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in normoxic sickle mice: microvascular implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013, 304(1):H42-50.
251. Da Guarda CC, Santiago RP, Pitanga TN, Santana SS, Zanette DL, Borges VM, Goncalves MS. Heme changes HIF- $\alpha$ , eNOS and nitrite production in HUVECs after simvastatin, HU, and ascorbic acid therapies. *Microvasc Res.* 2016, 106:128-36.
252. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M, Aboyans V, Vaz Carneiro A, Achenbach S, Agewall S, Allanore Y, Asteggiano R, Paolo Badano L, Albert Barberà J, Bouvaist H, Bueno H, Byrne RA, Carerj S, Castro G, Erol Ç, Falk V, Funck-Brentano C, Gorenflo M, Granton J, Iung B, Kiely DG, Kirchhof P, Kjellstrom B, Landmesser U, Lekakis J, Lionis C, Lip GY, Orfanos SE, Park MH, Piepoli MF, Ponikowski P, Revel MP, Rigau D, Rosenkranz S, Völler H, Luis Zamorano J. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European

- Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J.* 2016, 37(1):67-119.
253. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009, 54(1 Suppl):S43-54.
254. Lai YC, Potoka KC, Champion HC, Mora AL, Gladwin MT. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. *Circ Res.* 2014, 115(1):115-30.
255. Reis GS, Augusto VS, Silveira AP, Jordão AA Jr, Baddini-Martinez J, Poli Neto O, Rodrigues AJ, Evora PR. Oxidative-stress biomarkers in patients with pulmonary hypertension.
256. Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmueller P, Huertas A, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Humbert M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest.* 2012, 141(1):210-221.
257. Villegas LR, Kluck D, Field C, Oberley-Deegan RE, Woods C, Yeager ME, El Kasmi KC, Savani RC, Bowler RP, Nozik-Grayck E. Superoxide dismutase mimetic, MnTE-2-PyP, attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, pulmonary vascular remodeling, and activation of the NALP3 inflammasome. *Antioxid Redox Signal.* 2013, 8(14):1753-64.
258. Lee S, Suh GY, Ryter SW, Choi AM. Regulation and Function of the Nucleotide Binding Domain Leucine-Rich Repeat-Containing Receptor, P2X7 Domain-Containing-3 Inflammasome in Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016, 54(2):151-60.
259. Bowers R, Cool C, Murphy RC, Tuder RM, Hopken MW, Flores SC, Voelkel NF. Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004, 169(6):764-9.
260. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thébaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK,

- Archer SL. An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2006, 113(22):2630-41.
261. Sutendra G, Michelakis ED. The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension. *Cell Metab*. 2014, 19(4):558-73.
262. Archer SL, Marsboom G, Kim GH, Zhang HJ, Toth PT, Svensson EC, Dyck JR, Gomberg-Maitland M, Thébaud B, Husain AN, Cipriani N, Rehman J. Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation*. 2010, 121(24):2661-71.
263. Ryan JJ, Marsboom G, Fang YH, Toth PT, Morrow E, Luo N, Piao L, Hong Z, Ericson K, Zhang HJ, Han M, Haney CR, Chen CT, Sharp WW, Archer SL. PGC1 $\alpha$ -mediated mitofusin-2 deficiency in female rats and humans with pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013, 187(8):865-78.
264. Paulin R, Dromparis P, Sutendra G, Gurtu V, Zervopoulos S, Bowers L, Haromy A, Webster L, Provencher S, Bonnet S, Michelakis ED. Sirtuin 3 deficiency is associated with inhibited mitochondrial function and pulmonary arterial hypertension in rodents and humans. *Cell Metab*. 2014, 20(5):827-39.
- 265.** Gordeuk VR, Castro OL, Machado RF. Pathophysiology and treatment of pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*. 2016, 127(7):820-8.



## **6.Παράρτημα**

Ακολουθως παρατίθενται οι συσκευές, τα όργανα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη την πειραματική διαδικασία σε κλινικό και εργαστηριακό επίπεδο.

### **6.1.Συσκευές - όργανα**

Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής στείρου αέρα βιολογικής ασφάλειας ELMED UltraSafe 36-D

Επωαστικός κλίβανος διοξειδίου του άνθρακα (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)

Ψυχόμενες φυγόκεντροι M240R (BOECO) και Eppendorf Centrifuge 5810R

Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας

Μηχανικός αναδευτήρας Vortex

Ψυγειοκαταψύκτης

Μαγνητικός αναδευτήρας

Υδατόλουτρο

Χρονόμετρο

Φωτόμετρο Eppendorf Biophotometer

Οπτικό μικροσκόπιο Olympus CK2

Ηλεκτρονικός Υπολογιστής

Φωτογραφική μηχανή Cannon

Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Θερμικός κυκλοποιητής (PCR) Biorad T100™ και MJ Science PSC 200

Θερμικός κυκλοποιητής real-time qPCR CFX 96™ Thermal Cycler-C1000 Touch (Biorad)

### **6.2.Σκεύη-Αντικείμενα**

Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέττες μιας χρήσης των 10, 5 και 2 mL

Αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου Eppendorf 2, 1,5 και 0,5mL

Δοκιμαστικοί σωλήνες από πολυστυρένιο των 50 και των 14 mL

Αυτόματες πιπέττες ρυθμιζόμενου όγκου των 1-20μL, 20-100μL και 200-1000μL

Ακρορρύγχια πιπεττών μιας χρήσης με/χωρίς φίλτρο

Πιπέτες Pasteur μιας χρήσης  
Τρυβλία με 6 και 24 βοθρία καλλιέργειας  
Αντικειμενοφόρες πλάκες  
Καλυπτρίδες  
Βαθμονομημένο θερμόμετρο  
Ογκομετρικοί κύλινδροι  
Κωνικές φυάλες  
Δοκιμαστικοί σωλήνες  
Σύριγγες μιας χρήσης των 5, 10 και 20mL  
Αποστειρωμένα σωληνάρια συλλογής περιφερικού αίματος επικαλυμμένα με EDTA, κιτρικό οξύ και χωρίς αντιπηκτικό

### **6.3.Αντιδραστήρια-Διαλύματα**

Δις απεσταγμένο νερό  
100% Αιθανόλη  
3% Οξικό οξύ  
Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline)  
Ορός εμβρύου μόσχου 2% (FBS: Fetal Bovine Saline)  
Ινωδονεκτίνη  
Αγαρόζη low EEO type I  
Αγαρόζη Nusieve GTG  
Ακρυλαμίδα electroforesis grade (Sigma)  
TEMED (Sigma)  
Βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma)  
Χρωστική κυανούν του μεθυλενίου  
Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Tris, Βορικό οξύ, EDTA)  
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X  
Χλωριούχο Μαγνήσιο  
Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen)  
Μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων ( dATP, dTTP, dGTP, dCTP, New England Biolabs)  
DNA Ladder 50 και 100bp (GeneRuler)

Συλλογή απομόνωσης μονοπυρήνων περιφερικού αίματος Ficoll-Paque™ PLUS

Συλλογή καλλιέργειας-απομόνωσης προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων CFU-Hill Liquid-medium kit (StemCell Technologies)

Διάλυμα λύσης ερυθρών αιμοσφαιρίων (RCLB: Red Cell Lysis Buffer)

Συλλογή απομόνωσης RNA RNEasy Minikit (Qiagen)

Συλλογή σύνθεσης συμπληρωματικού DNA iSCRIPT cDNA synthesis kit (Biorad)

Συλλογή χημικής τροποποίησης DNA για προσδιορισμό της κατάστασης μεθυλίωσης EZ Methylation kit (Zymo)

Φθορίζοντες εκκινητές-ιχνηθέτες Taqman™ (Thermo Fisher Scientific)

<b>Γονίδιο</b>	<b>Εκκινητής</b>
<i>NOS3</i>	Hs01574665_m1
<i>SOD2</i>	Hs00167309_m1
<i>HIF1A</i>	Hs00153153_m1
<i>PPARGC1A</i>	Hs00173304_m1
<i>GAPDH</i>	Hs03929091_g1

#### **6.4.Γλωσσάριο-Συντομογραφίες**

Akt: protein kinase B

ALT: alanine aminotransferase

AMPK: Adenosine MonoPhosphate Kinase

ANGPT 1,2: angiopoietin 1,2

AP-1: Activator Protein-1(transcription factor)

AP-2: Activating enhancer-binding Protein-2

ARNT (HIF-1b): Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (Hypoxia Inducible Factor-1b)

ASC: Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD

AST: Aspartate aminotransferase

ATF-2: Activating Transcription Factor-2

ATP: Adenosine TriPhosphate  
BH<sub>4</sub>: tetrahydrbiopterin  
CaM: CalModulin  
CBP/p300: CREB-Binding Protein/p300  
CD: Clusters of Differentiation  
C/EBP: CCAAT Enhancer Binding Protein  
CECs: Circulating Endothelial Cells  
CFU: Colony Forming Unit  
cGMP: cyclic Guanosine MonoPhosphate  
cNOS: constitutive Nitric Oxide Synthase  
COX-2: CyclOXygenase-2  
CRP: C-Reactive Protein  
CuZnSOD: Copper-Zinc Superoxide Dismutase  
CXCL-8: interleukin-8 (C-X-C motif Ligand-8)  
CXCR-4: C-X-C chemokine Receptor-4  
DHF: DiHydroFolic acid  
DHFR: DiHydroFolate Reductase  
dTMP: deoxyThymidine MonoPhosphate  
EDTA: EthyleneDiamineTetraacetic Acid  
Egr-1: Early Growth Response protein-1  
Elf-1: E74-Like transcription Factor-1  
eNOS: endothelial Nitric Oxide Synthase  
EPCs: Endothelial Progenitor Cells  
EPO: Erythropoietin  
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase  
ERR $\alpha$ : Estrogen Related Receptor- $\alpha$   
Ets1: E26-Transformation- Specific-1  
FAD: Flavin Adenin Dinucleotide  
FIH-1: Factor Inhibiting HIF-1  
FMN: Flavin MonoNucleotide  
GC: Guanylate Cyclase  
 $\gamma$ GT:  $\gamma$ GlutamylTransferase

GLUT-1: GLUcose Transporter-1  
GM-CSF: Granulocytes-Macrophages Colony-Stimulating Factor  
GMP: Guanosine MonoPhosphate  
GTP: Guanosine TriPhosphate  
HbA: Hemoglobin A (adult)  
HbA<sub>2</sub>: Hemoglobin A<sub>2</sub> (adult)  
HbF: Hemoglobin F (fetal)  
HbS: Hemoglobin S (sickle)  
HDAC: Histone DeAcetylases  
HepG2: human liver cancer cell lineher2  
HER2: Human Epidermal growth factor Receptor-2  
HIF-1: Hypoxia-Inducible Factor-1  
HIF-2: Hypoxia-Inducible Factor-2  
HRE: Hypoxia Response Element  
HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells  
ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1  
IGF-2: Insulin-like Growth Factor-2  
IκBα: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha  
IKKβ: Inhibitor of nuclear factor Kappa-b Kinase subunit β  
IL-1,3,6: Interleukin-1,3,6  
iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase  
JNK: cJun N-terminal Kinase  
KDR-VEGFR2: Kinase insert Domain Receptor-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2  
LDL: Low Density Lipoprotein  
MBD1,2,3,4: Methyl-CpG- Binding Domain protein 1,2,3,4  
MeCP2: Methyl-CpG binding Protein2  
MK5: MAP kinase-activated protein Kinase5  
MnSOD: Manganese Superoxide Dismutase  
mPAP: mean Pulmonary Artery Pressure  
MS: Methionine Synthase

MST1: Macrophage- Stimulating 1  
MTHFR: Methylene TetraHydro Folic acid Reductase  
MyD88: Myeloid Differentiation primary response 88  
NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide reduced  
NADP: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate  
NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced  
NET: Neutrophil Extracellular Traps  
NF-1: NeuroFibromin-1  
NF-kB: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
NLRP-3: Nod-Like Receptor family, Pyrin domain containing-3  
nNOS: neuronal Nitric Oxide Synthase  
NO: Nitric Oxide  
NOS1,2,3: Nitric Oxide Synthase 1,2,3  
NOSIP: Nitric Oxide Synthase Inhibiting Protein  
NOSTRIN: Nitric Oxide Synthase Trafficking  
NOX2: NADPH-Oxidase 2  
NPM: NucleoPhosMin  
Nrf-1: Nuclear Respiratory Factor-1  
Nrf-2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2  
P2X7: Purine receptor 2X7  
p53: tumor protein 53  
PAH: Pulmonary Arterial Hypertension  
PAI-1: Plasminogen Activator-Inhibitor-1  
PASP: Pulmonary Artery Systolic Pressure  
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor  
PGC: Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator  
PGC-1 $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1 $\alpha$   
PHD: Proline HyDroxylase  
PI3k: Phospholinositide-3kinase  
PIGF: Placental Growth Factor  
PKC: Protein Kinase C  
PPAR $\gamma$ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma

PRC: PPAR gamma coactivator Related protein  
PRD I,II: Positive Regulatory Domain I,II  
RCLB: Red Cell Lysis Buffer  
RISC: RNA-silencing Inducing Complex  
ROS: Reactive Oxygen Species  
RNS: Reactive Nitrogen Species  
SAM: S-Adenosyl Methionine  
SDF-1a: Stromal-Derived Factor-1a  
SGOT: Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (AST)  
SGPT: Serum Glutamic Pyruvate Transaminase (ALT)  
SOD: Superoxide Dismutase  
Sp1: Specificity protein1  
Sp3: Specificity protein 3  
THF: TetraHydroFolate  
THFR: TetraHydroFolate Reductase  
TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor- $\beta$   
TLR-4: Toll-Like Receptor-4  
TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$   
TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor  
TRV: Tricuspid Regurgitant jet Velocity  
UHRF1,2: Ubiquitin like, containing PHD and RING Finger domains1,2  
VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1  
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor  
vWF: von Willebrand Factor  
YY1: Yin Yang1  
ZBTB4, 38: Zinc finger and BTB domain containing 4, 38