

7. Streszczenie

Wstęp: Talasemia α jest jedną z najczęstszych przyczyn niedokrwistości mikrocytowej na świecie, ale w Polsce do niedawna rzadko brano ją pod uwagę podczas diagnostyki wrodzonych niedokrwistości. Badania z ostatnich lat, włącznie z naszymi, pokazują, że częstość tego zaburzenia w Polsce może być znacznie większa niż zakładano. Talasemia α jest wynikiem mutacji w genie/genach kodujących białko globiny α . Nadmiar łańcuchów globiny γ i/lub β oraz powstające z nich nieprawidłowe cząsteczki Hb są utleniane, czemu towarzyszy wytwarzanie dużych ilości reaktywnych form tlenu (RFT) i zachwianie równowagi oksydoredukcyjnej. Przypuszcza się, że stres oksydacyjny jest jedną z podstawowych składowych patogenez talasemii α . Najpoważniejsze konsekwencje mają oksydacyjne uszkodzenia białek. Ich wynikiem mogą być zaburzenie struktury cytoszkieletu i błony komórkowej, powstawanie neoantygenów rozpoznawanych przez autoprzeciwciała i przedwczesne usuwanie krwinek czerwonych z krążenia. Niewiele wiadomo na temat nasilenia stresu oksydacyjnego i jego skutków, a także poziomu obrony antyoksydacyjnej w krwinkach czerwonych w talasemii α , ale obserwowano zmienione właściwości erytrocytów z tym defektem oraz modyfikacje białkowe w ich frakcji cytoszkieletowej i błonowej.

Cele: 1) Porównanie krwinek czerwonych osób z talasemią α z erytrocytami pacjentów z wrodzoną mikrocytozą inną niż talasemie oraz mikrocytozą nabytą z powodu niedoboru żelaza (IDA) pod względem poziomu stresu oksydacyjnego i obrony antyoksydacyjnej. 2) Określenie udziału peroksyredoksyny 2 (Prx 2), kluczowego enzymu antyoksydacyjnego krwinek czerwonych, w neutralizacji RFT w badanych erytrocytach. 3) Analiza nasilenia wiązania przeciwciał przez wybrane białka błonowe krwinek czerwonych ze wszystkich badanych grup.

Materiał i metody: Badano próbki krwi 25 pacjentów z talasemią α , 50 z wrodzoną mikrocytozą inną niż talasemie, 10 z IDA i 90 próbek kontrolnych (po 3 próbki dawców do każdego eksperymentu). Poziom RFT endogenny oraz po indukcji stresu oksydacyjnego *in vitro* oceniano metodą cytometrii przepływowej z użyciem barwnika diocyanu dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH-DA). Stopień wiązania przeciwciał przez białka błonowe analizowano przy pomocy cytometrii przepływowej i przeciwciał sprzężonych z barwnikami fluorescencyjnymi, skierowanych do antygenów CD erytrocytów. Ilość białka Prx 2 we frakcji cytozolowej badanych krwinek czerwonych określano ilościową metodą Western blot. Zastosowano testy statystyczne Kruskala-Wallisa oraz U-Manna-Whitneya-Wilcoxon.

Wyniki: Endogenny poziom RFT krwinek czerwonych był w talasemii α porównywalny z kontrolą, a także z ilością reaktywnych form tlenu w erytrocytach w mikrocytozie wrodzonej innej niż talasemie i IDA. Podanie czynnika utleniającego nie zmieniało istotnie poziomu RFT w krwinkach czerwonych w mikrocytozie wrodzonej innej niż talasemie, zwiększało stres oksydacyjny w erytrocytach z IDA i istotnie statystycznie zmniejszało poziom RFT w krwinkach osób z talasemią α .

Obserwowano istotny statystycznie wzrost ilości białka peroksyredoksyny 2 we frakcji cytozolowej krwinek czerwonych jedynie u osób z talasemią α . U pacjentów z mikrocytozą wrodzoną inną niż talasemie i IDA różnice nie były istotne statystycznie i obejmowały zarówno wzrost, jak i zmniejszenie ilości białka Prx 2 w odniesieniu do kontroli.

Analiza stopnia wiązania przeciwciał przez wybrane białka powierzchniowe erytrocytów: CD44, CD47, CD55, CD58, CD59 i CD235a wykazała zmiany, z których większość była istotna statystycznie, we wszystkich badanych grupach pacjentów. Obserwowano zarówno wzrost (CD47, CD59, CD235a), jak i spadek (CD44, CD55, CD58) nasilenia wiązania przeciwciał.

Podsumowanie i wnioski: W pracy podjęto próbę oceny poziomu stresu oksydacyjnego i obrony antyoksydacyjnej, a także zmian we frakcji białkowej krwinek czerwonych mogących mieć związek z uszkodzeniami oksydacyjnymi w trzech niedokrwistościach mikrocytowych różniących się etiologią. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że: 1) Endogenny poziom stresu oksydacyjnego był porównywalny w krwinkach czerwonych prawidłowych i mikrocytowych, niezależnie od etiologii defektu. 2) Indukcja stresu oksydacyjnego *in vitro* powodowała wzmożenie obrony antyoksydacyjnej w krwinkach czerwonych w talasemii α , co sugeruje obecność w nich adaptacyjnych mechanizmów antyoksydacyjnych, nieobserwowanych w innych badanych mikrocytozach i prawidłowych krwinkach czerwonych. 3) Elementem wzmożonej obrony antyoksydacyjnej w erytrocytach w talasemii α może być stwierdzony we frakcji cytozolowej istotnie zwiększony poziom białka peroksyredoksyny 2 – kluczowego enzymu antyoksydacyjnego krwinek czerwonych. 4) Zmiany w nasileniu reakcji przeciwciał z wybranymi antygenami CD wskazują na możliwe rearanżacje frakcji białek błonowych w badanych mikrocytozach. 5) Ocena potencjału antyoksydacyjnego i poziomu peroksyredoksyny 2 we frakcji cytozolowej krwinek czerwonych może okazać się pomocna w różnicowaniu talasemii α i innych mikrocytoz.