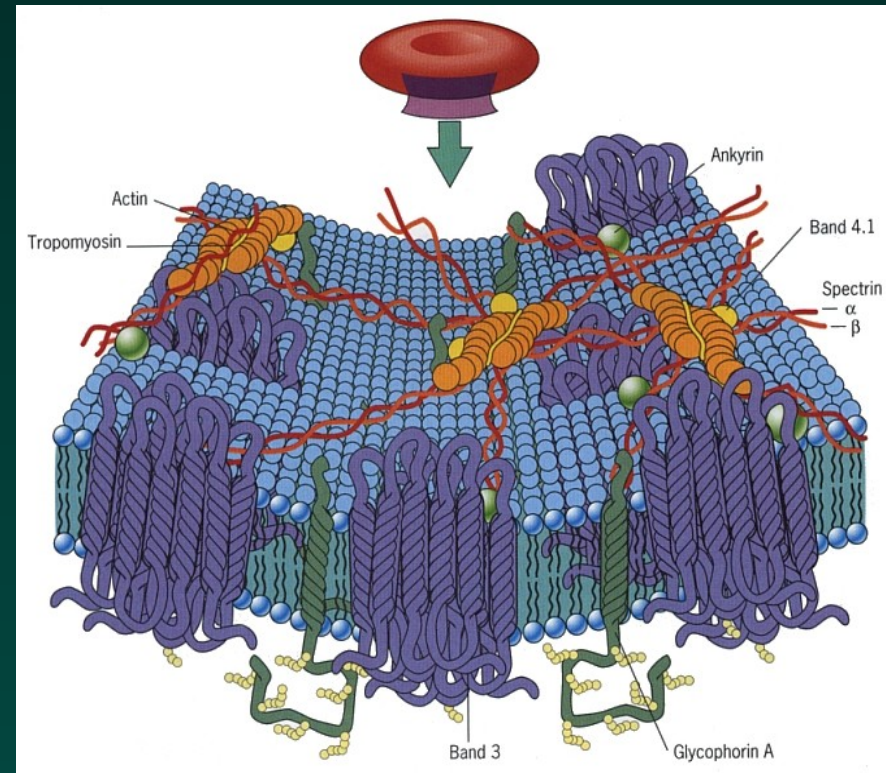
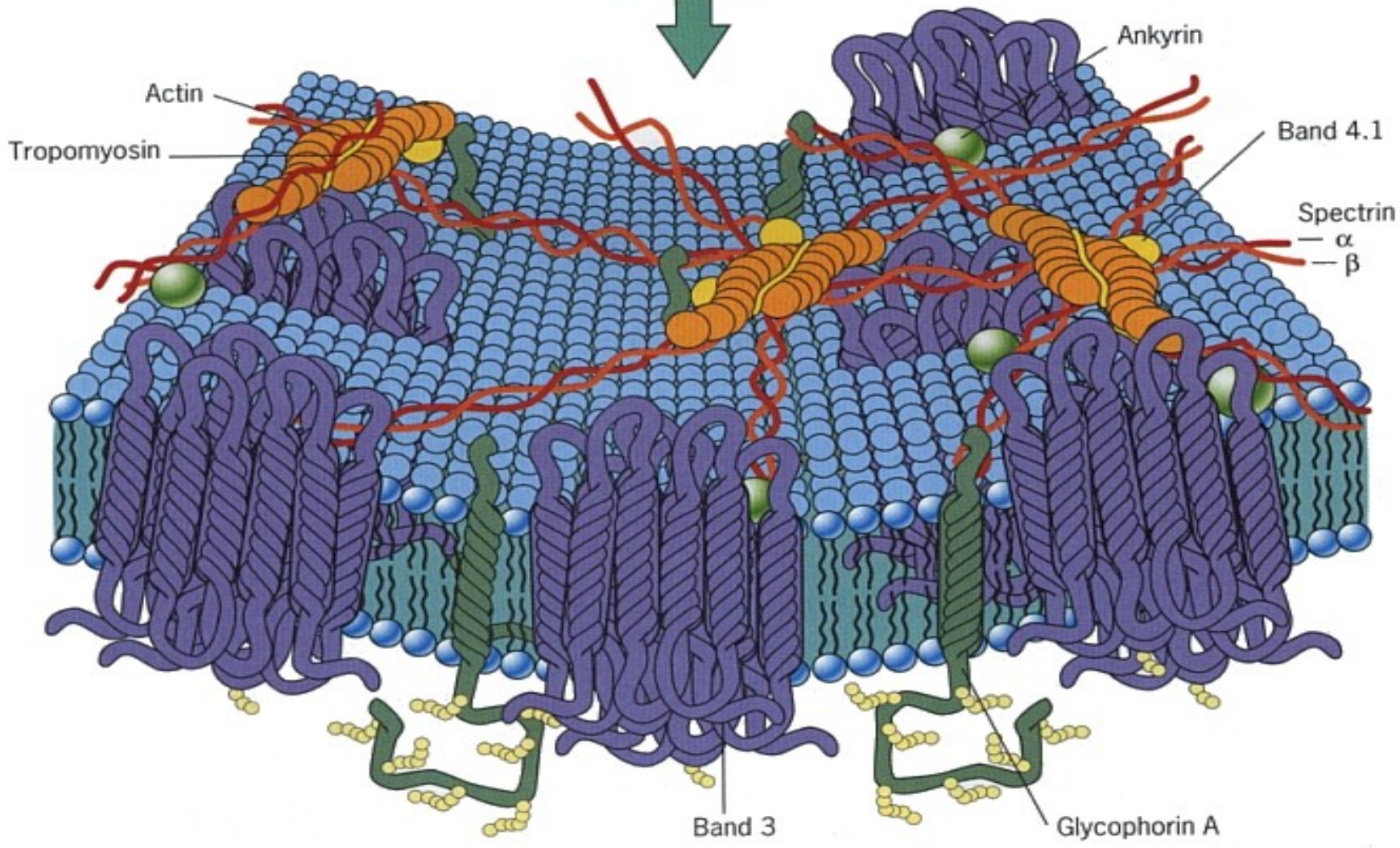
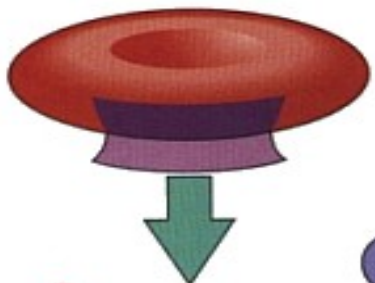


Ερυθροκυτταρική μεμβράνη

- Είναι η καλύτερα μελετημένη βιολογική μεμβράνη
- Αν και αντιπροσωπεύει μόνο το 1% του βάρους του ερυθρού
- Σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του κυττάρου
- Αποτελεί άριστο μοντέλο «ρευστού μωσαϊκού»





Ερυθροκυτταρική μεμβράνη

αποτελείται από κινητά, ασύμμετρα κατανεμημένα **λιπίδια** και **πρωτεΐνες**

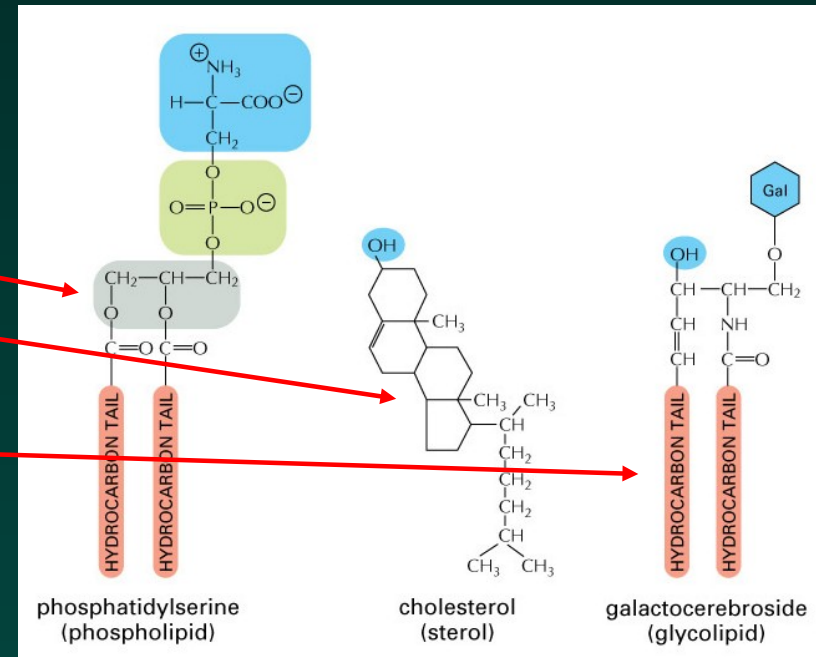
– **Λιπίδια** 50% του βάρους της μεμβράνης

φωσfolιπίδια

μη εστεροποιημένη (ελεύθερη) χοληστερόλη

γλυκολιπίδια

Ίσα ποσοστά φωσfolιπιδίων και χοληστερόλης (ως προς το βάρος)



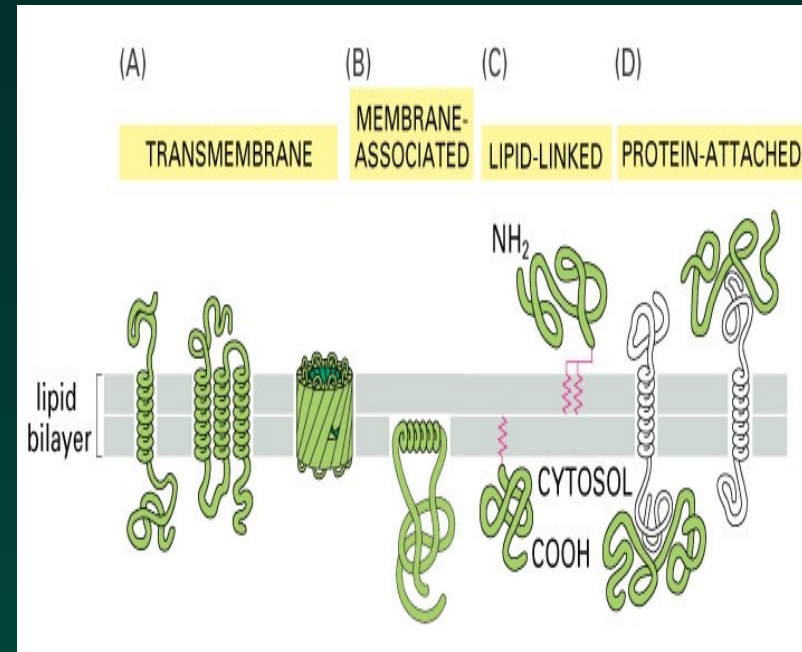
Πρωτεΐνες ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

- Έχουν βρεθεί περίπου 300 πρωτεΐνες
- Παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς τις λειτουργίες τους
- Από αυτές μόνο για το 15% γνωρίζουμε
 - τη θέση τους
 - κάποιες από τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες
 - τη λειτουργία τους

Πρωτεϊνική σύσταση ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

Οι πρωτεΐνες διακρίνονται σε:

- **Διαμεμβρανικές**
 - εισχωρούν ή διαπερνούν τη διπλοστιβάδα των λιπιδίων
- **Περιφερειακές**
 - αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και λιπίδια στη μεμβρανική επιφάνεια αλλά δεν εισχωρούν στο λιπιδικό πυρήνα



Διαμεμβρανικές

Έχουν χαρακτηριστεί ≈ 50

- γλυκοφορίνες A,B,C,D

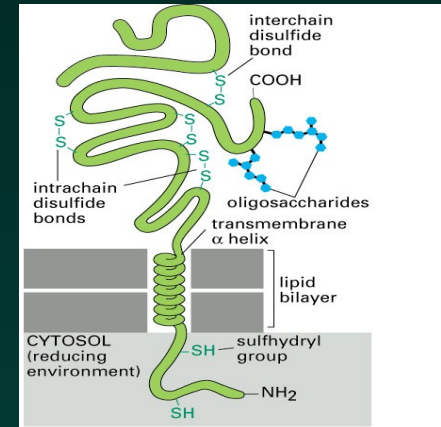
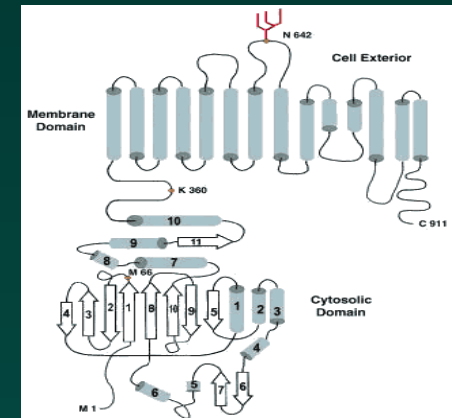


Figure 10-22. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

- ζώνη 3 (ο διάυλος ανταλλαγής ανιόντων, AE1)



- Rh και RhAG

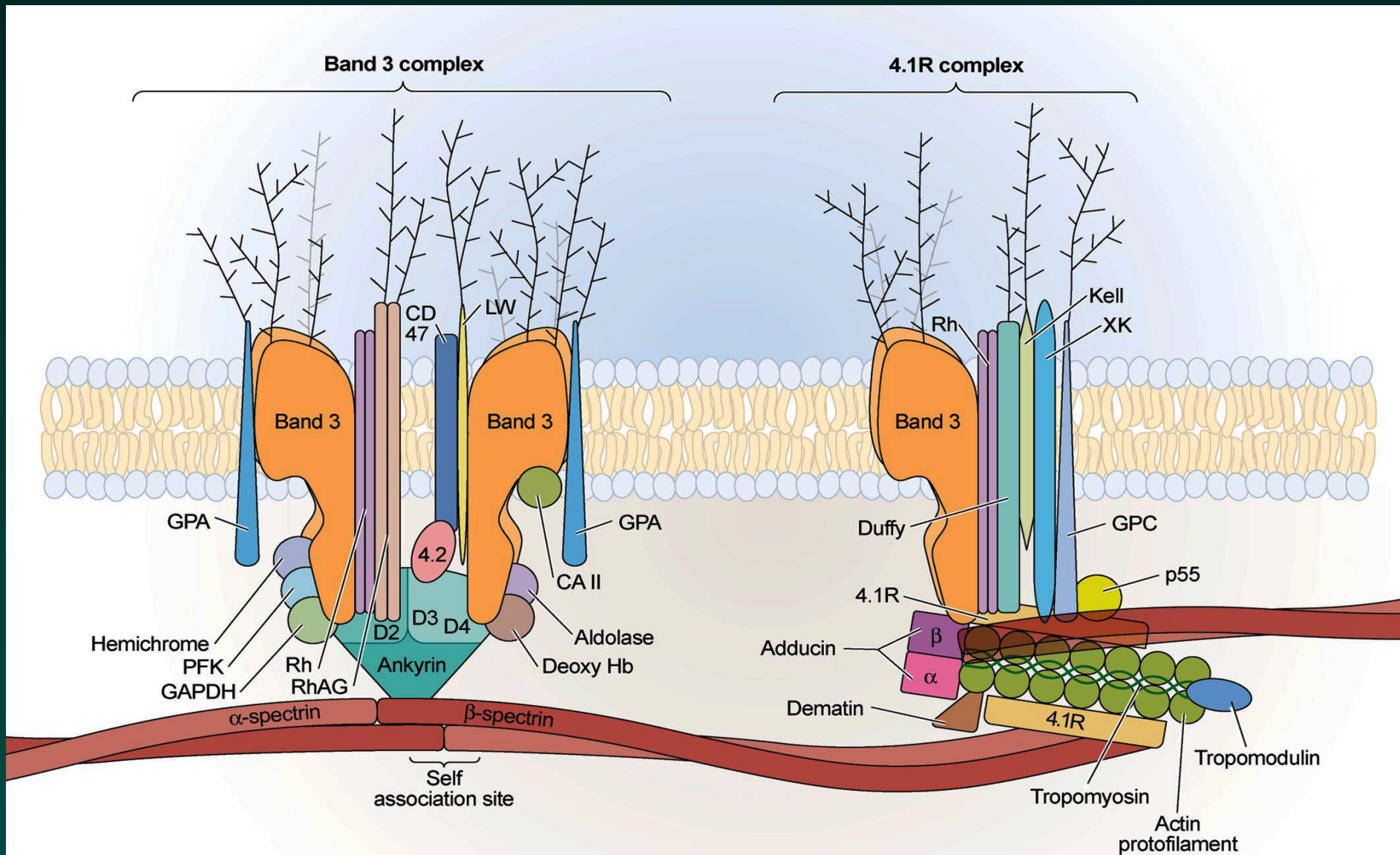



Περιφερειακές

- Σπεκτρίνη
- Αγκυρίνη
- Ακτίνη
- Πρωτεΐνη 4.1
- Πρωτεΐνη 4.2

- Αδουσίνη
- Δεματίνη
- Τροπομυοσίνη
- Τροπομοντουλίνη

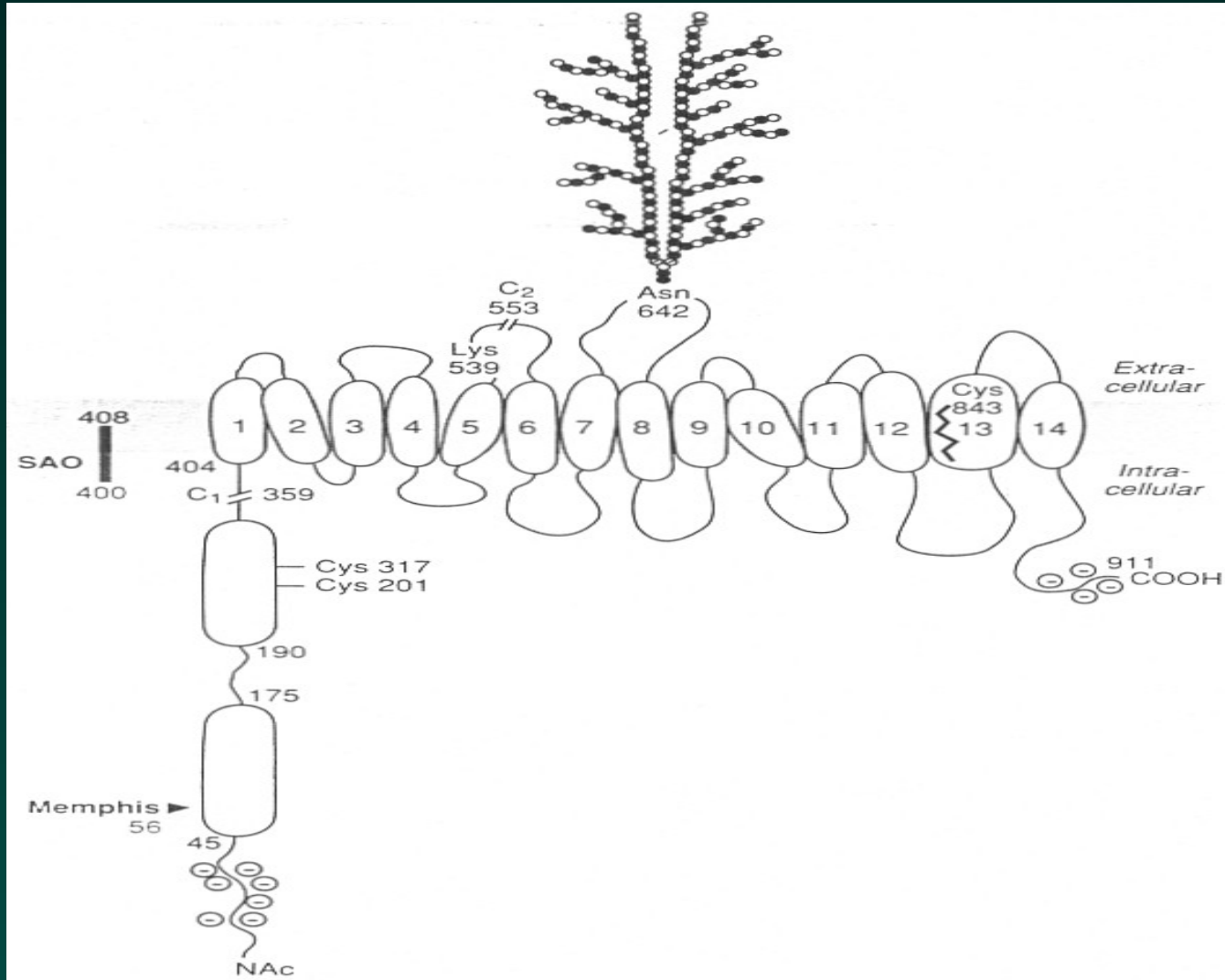
Οργάνωση μεμβρανικού σκελετού



Ζώνη 3 (band 3)

- 25-30% των πρωτεϊνών της μεμβράνης
- 1.2×10^6 αντίγραφα ανά κύτταρο
- 911 αμινοξέα
- Χρωμόσωμα 17q21-qter
- Γλυκοζυλιωμένη στην Asn-642
- 4-20% ετεροζυγώτες κοινού πολυμορφισμού της ζώνης 3 (band 3 Memphis, $\text{Lys}_{56} \rightarrow \text{Glu}$)
- Δύο περιοχές με διαφορετικές λειτουργίες
 - 43Kd N-τελική (αμινοξέα 1-359)
 - 52Kd C-τελική (αμινοξέα 360-911)

Μοντέλο ερυθροκυτταρικού διαύλου ανταλλαγής ανιόντων (AE1)






Σπεκτρίνη (Sp)

- κύριο σκελετικό συστατικό
- το 50-70% της σκελετικής μάζας
- 2×10^5 περίπου αντίγραφα ανά κύτταρο
- αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες
- δομικά διακριτές
 - α -Sp, 240Kd
 - β -Sp, 220Kd




α – σπεκτρίνη (α -Sp)

- 2429 αμινοξέα
- γονίδιο SPTA1
- χρωμόσωμα 1q22-q23




β -σπεκτρίνη (β –Sp)

- 2137 αμινοξέα
- γονίδιο SPTB
- χρωμόσωμα 14q23-q24.2

Αγκυρίνη (Ank1)

- μεγάλη (206Kd), πυραμιδοειδούς σχήματος πρωτεΐνη
- 1880 αμινοξέα
- χρωμόσωμα 8p11.2
- Διαιρείται σε 3 χυμοθρυπτικές περιοχές
 - 89Kd N-τελική (αμινοξέα 2-827)
 - 62Kd περιοχή (αμινοξέα 828-1382)
 - 55Kd C-τελική περιοχή



Πρωτεΐνη 4.1

- σφαιρική πρωτεΐνη MB 66Kd (80Kd σε SDS-PAGE)
- χρωμόσωμα 1q32-1ptr
- υπάρχουν 2×10^5 αντίγραφα ανά ερυθρό
- δύο ισομορφές 4.1b και 4.1a (απαμίνωση της Asn 502)
- αποτελείται από 4 χυμοθρυπτικές περιοχές
 - 30Kd (N-τελικό)
 - γλυκοφορίνη A και C, ζώνη3, καλμοντουλίνη
 - 16Kd
 - θέσεις φωσφορυλίωσης
 - 10Kd
 - σπεκτρίνη, ακτίνη
 - 22-24Kd (C-τελικό)

Πρωτεΐνη 4.2 (παλλιδίνη)

- Αποτελεί το 5% του βάρους της μεμβράνης
- Υπάρχουν περίπου 2×10^5 αντίγραφα ανά ερυθρό
- Αποτελείται από 721 αμινοξέα (MW 72Kd)
- Χρωμόσωμα 15q15-q21
- Δεν έχει προσδιοριστεί η κύρια λειτουργία της
- Συνδέεται με την κυτταροπλασματική περιοχή της ζώνης 3
- Συμμετέχει στη σταθεροποίηση της σύνδεσης αγκυρίνης ζώνης 3

Διαταραχές ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

- Κληρονομική σφαιροκυττάρωση
- Κληρονομική ελλειπτοκυττάρωση
- Νοτιοανατολική Ασιατική Οβαλοκυττάρωση (SAO)

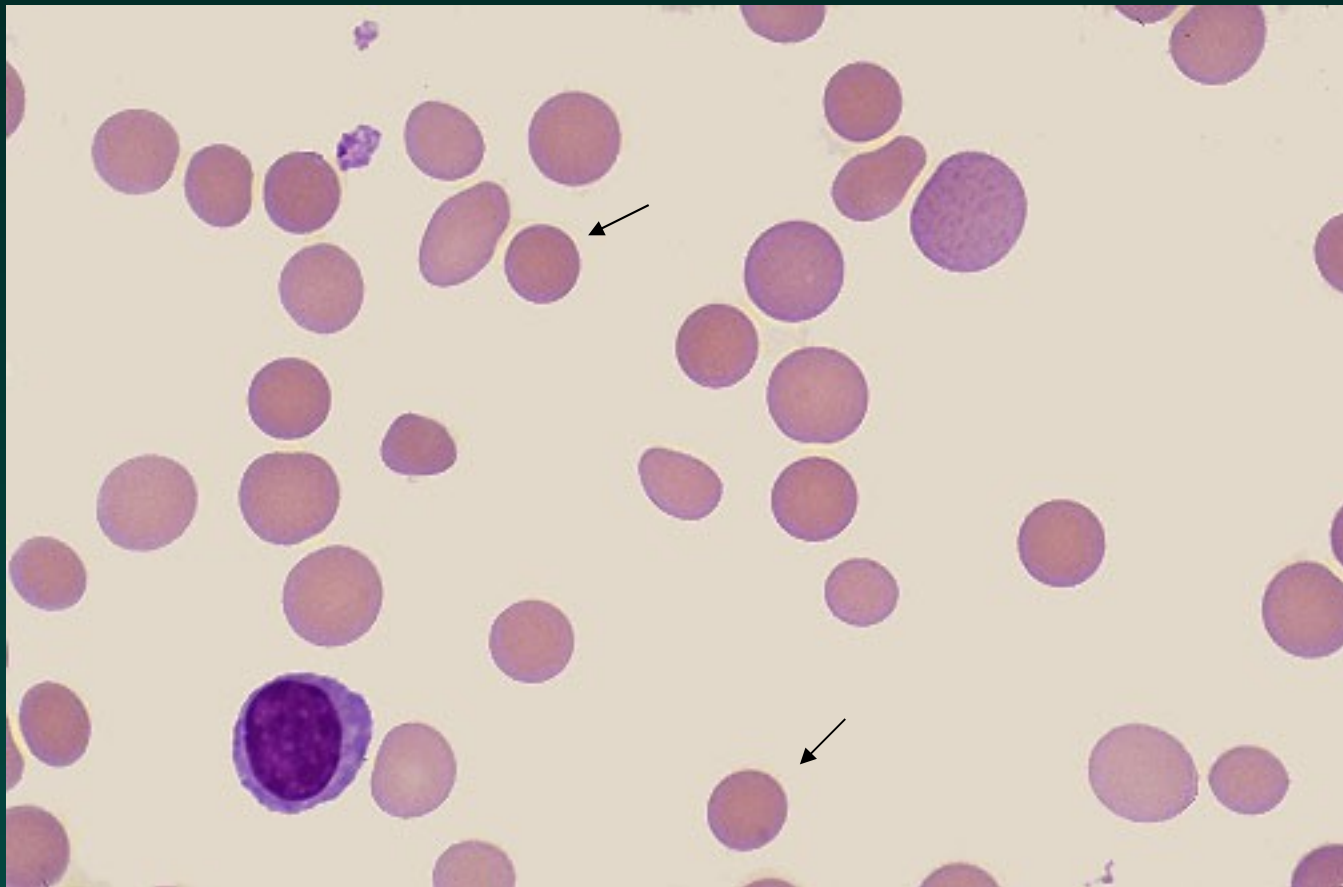


Κληρονομική σφαιροκυττάρωση

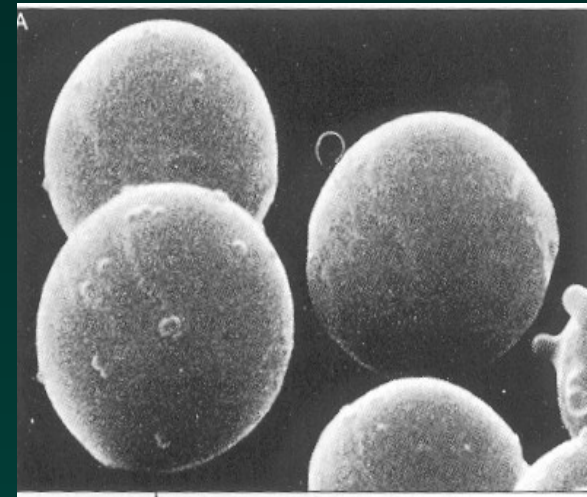
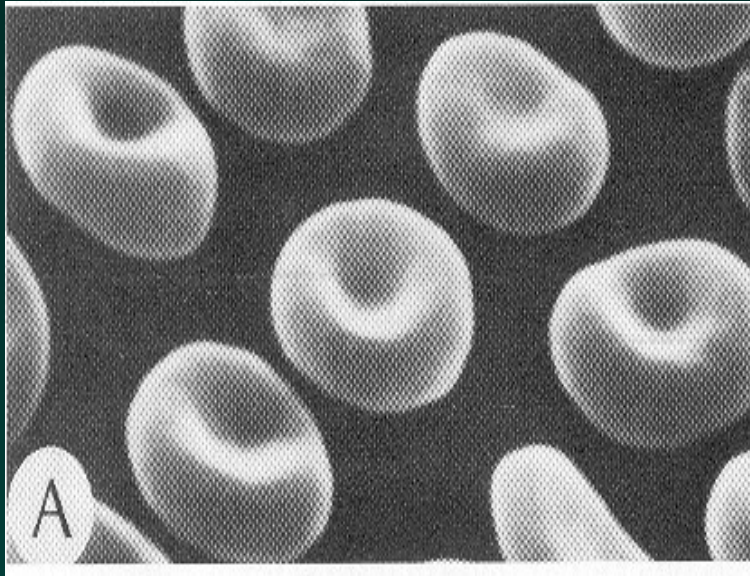
Ετερογενής ομάδα αιμολυτικών αναιμιών

- Ασυμπτωματικούς φορείς έως ασθενείς με βαριά αναιμία
- Χαρακτηριστική μορφολογία ερυθρών (σφαιροκύτταρα)
- Επικρατούντα και υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας
- Καλή ανταπόκριση στη σπληνεκτομή

σφαιροκύτταρα



σφαιροκυτταρα





Επικράτηση (prevalence) και Γενετική

- εμφανίζεται σε όλες τις φυλές και όλα τα έθνη
- ιδιαίτερα συχνή σε λαούς της Β. Ευρώπης
- επικράτηση σε αυτόν τον πληθυσμό είναι 1:5000

- το 75% έχουν αυτοσωμικό επικρατούντα τύπο κληρονομικότητας
- το 25% έχουν υπολειπόμενο τύπο ή φέρουν νέες μεταλλάξεις.

Κλινική εικόνα

- Αναιμία
 - Ίκτερος
 - Σπληνομεγαλία
- } Τυπική ΚΣ

Παιδική ηλικία → αναιμία – διαλείπων ίκτερος

Νεογνική ηλικία → ίκτερος εντός των πρώτων 48h

20-30% { ασθενείς ασυμπτωματικοί
χωρίς αναιμία
ήπια αντιρροπούμενη αιμόλυση
ελαφρά σπληνομεγαλία



Κλινικοί τύποι της ΚΣ

- Σιωπηλός φορέας
- Ήπια ΚΣ
- Μέτρια
- Μετρίως σοβαρή
- Σοβαρή

Σιωπηλός φορέας

- Hb (g/dL) Φυσιολογική
- ΔΕΚ (%) 1-3
- Χολερυθρίνη (mg/dL) 0-1
- Sp (%) 100
- Μορφολογία ερυθρών Φυσιολογική
- Ωσμωτική αντίσταση
 - Χωρίς επώαση Φυσιολογική
 - Μετά από επώαση Ελαφρώς επηρεασμένη

Ήπια σφαιροκυττάρωση

- Hb (g/dL) 11-15
- ΔΕΚ (%) 3-8
- Χολερυθρίνη (mg/dL) 1-2
- Sp (%) 80-100
- Μορφολογία ερυθρών Λίγα σφαιροκύτταρα
- Ωσμωτική αντίσταση
 - Χωρίς επώαση ΚΦ ή λίγο επηρεασμένη
 - Μετά από επώαση Ελαττωμένη

Μέτρια σφαιροκυττάρωση

- Hb (g/dL) 8-12
- ΔΕΚ (%) >8
- Χολερυθρίνη (mg/dL) >2
- Sp (%) 50-80
- Μορφολογία ερυθρών Σφαιροκύτταρα
- Ωσμωτική αντίσταση
 - Χωρίς επώαση Ελαττωμένη
 - Μετά από επώαση Ελαττωμένη

Μετρίως σοβαρή σφαιροκυττάρωση

- Hb (g/dL) 6-8
- ΔΕΚ (%) >10
- Χολερυθρίνη (mg/dL) 2-3
- Sp (%) 40-80
- Μορφολογία ερυθρών Σφαιροκύτταρα
- Ωσμωτική αντίσταση
 - Χωρίς επώαση Σημαντικά ελαττωμένη
 - Μετά από επώαση Σημαντικά ελαττωμένη



Σοβαρή σφαιροκυττάρωση

- Hb (g/dL) <6
- ΔΕΚ (%) >10
- Χολερυθρίνη (mg/dL) >3
- Sp (%) 20-50
- Μορφολογία ερυθρών Σφαιρο & ποκιλοκύτταρα
- Ωσμωτική αντίσταση
 - Χωρίς επώαση Σημαντικά ελαττωμένη
 - Μετά από επώαση Πάρα πολύ ελαττωμένη



Επιπλοκές

- **Κρίσεις**
 - Αιμολυτικές
 - Απλαστικές
 - Μεγαλοβλαστικές
- **Χολολιθίαση**
 - Αυξάνει 40-50% από τη 2η στην 5η δεκαετία της ζωής



Μοριακές βλάβες των πρωτεϊνών της μεμβράνης στην ΚΣ

- Μεμονωμένο έλλειμμα σπεκτρίνης
- Συνδυασμένο έλλειμμα σπεκτρίνης και αγκυρίνης
- Έλλειμμα ζώνης 3
- Έλλειμμα της πρωτεΐνης 4.2



Παθοφυσιολογία ελλείμματος μεμβρανικής επιφάνειας

απελευθέρωση μεμβρανικών κυστιδίων

➤ **έλλειμμα Sp ή συνδυασμένο έλλειμμα Sp+Ank**

απελευθέρωση λιπιδικής στιβάδας, λόγω μειωμένης
υποστήριξης του υπομεμβρανικού σκελετού

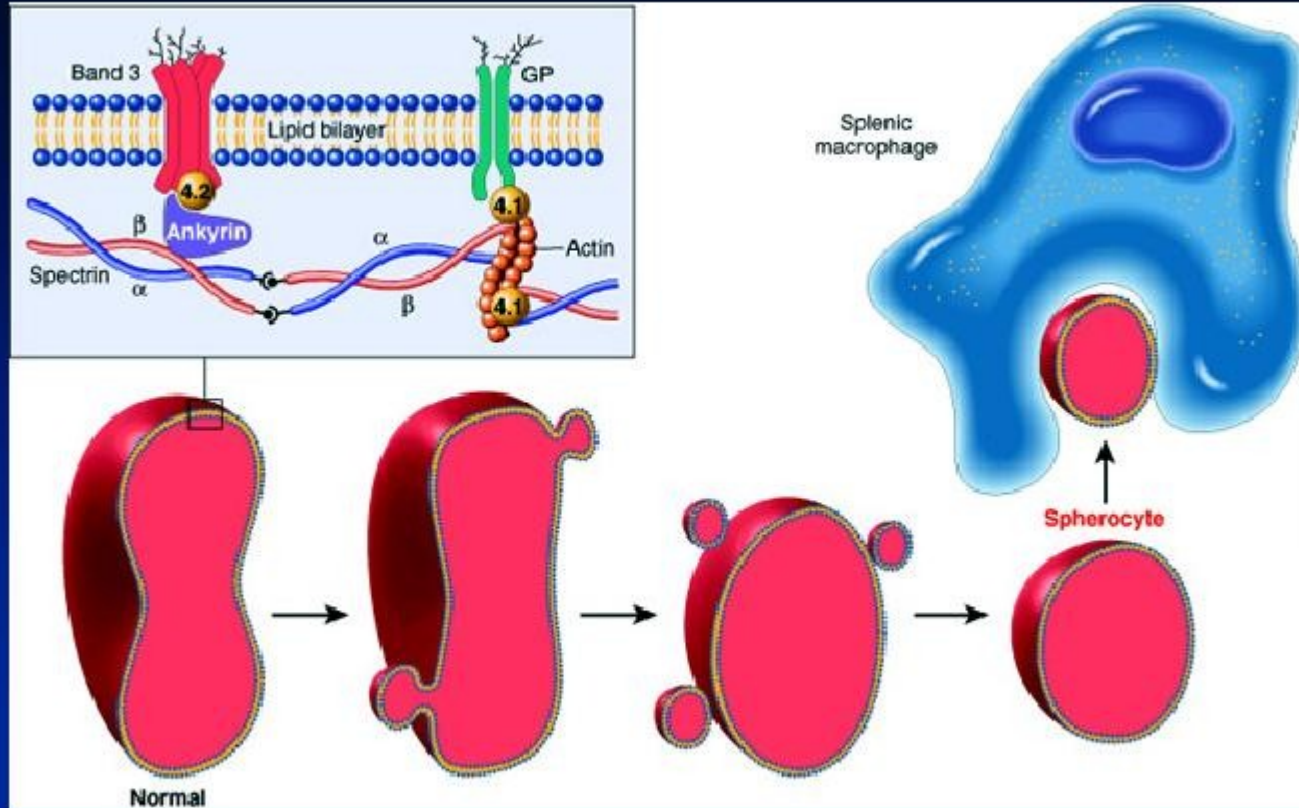
Παθοφυσιολογία ελλείμματος μεμβρανικής επιφάνειας

Έλλειμμα ζώνης 3 (band 3 deficiency)

- η αύξηση των περιοχών της μεμβράνης με μειωμένη πυκνότητα διαμεμβρανικών σωματιδίων (IMPs), έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωσή τους από το κύτταρο
- η ενσωμάτωση των λιπιδίων στη μεμβράνη, απαιτεί την παρουσία ζώνης 3
- βλάβες σχηματισμού τετραμερών ζώνης 3 ή σύνδεσης τετραμερών ζώνης 3 με την αγκυρίνη

χαλαρή σύνδεση της διπλοστιβάδας των λιπιδίων στον κυτταροσκελετό και συνεπώς την απελευθέρωση μεμβρανικών τμημάτων

Παθοφυσιολογία





Κληρονομική Ελλειπτοκυττάρωση (HE)

Μορφολογική κατάταξη HE

- Κοινή Κληρονομική Ελλειπτοκυττάρωση
- Σφαιροκυτταρική HE
- Νοτιοανατολική Ασιατική Οβαλοκυττάρωση (SAO)



Κλινικοί φαινότυποι

- Κοινή κληρονομική ελλειπτοκυττάρωση
 - Ετερόζυγος κοινή ΗΕ
 - Ομόζυγος κοινή ΗΕ
 - Κληρονομική ποικιλοκυττάρωση (HPP)
- Σφαιροκυτταρική ΗΕ
- Νοτιοανατολική Ασιατική Οβαλοκυττάρωση



Ετερόζυγος κοινή ΗΕ

- Σιωπηλός φορέας
- Ήπια ΗΕ
- Κοινή ΗΕ με χρόνια αιμόλυση
- Κοινή ΗΕ με σποραδική αιμόλυση
- ΗΕ με νεογνική ποικιλοκυττάρωση



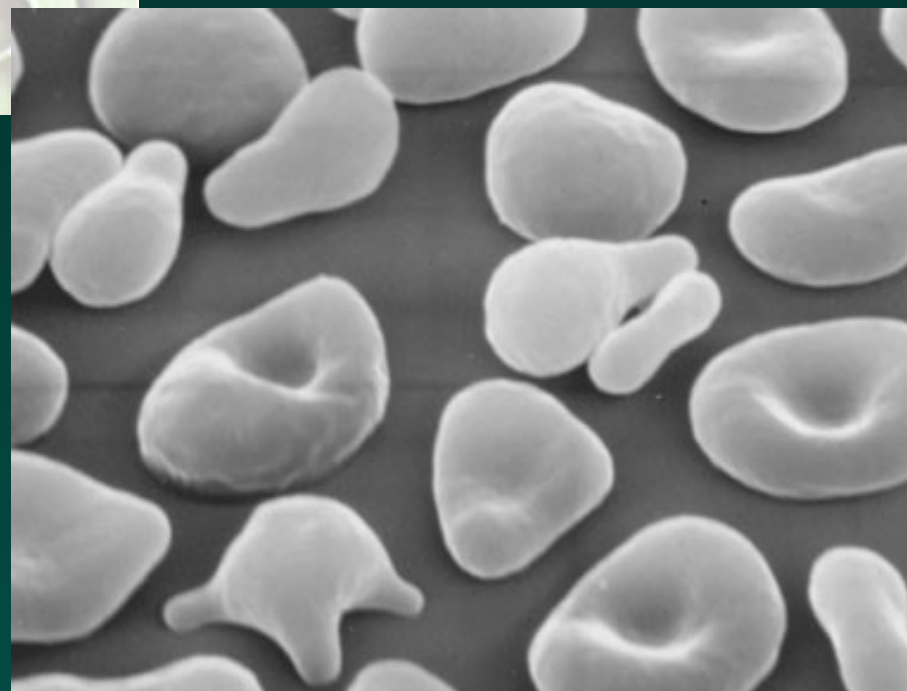
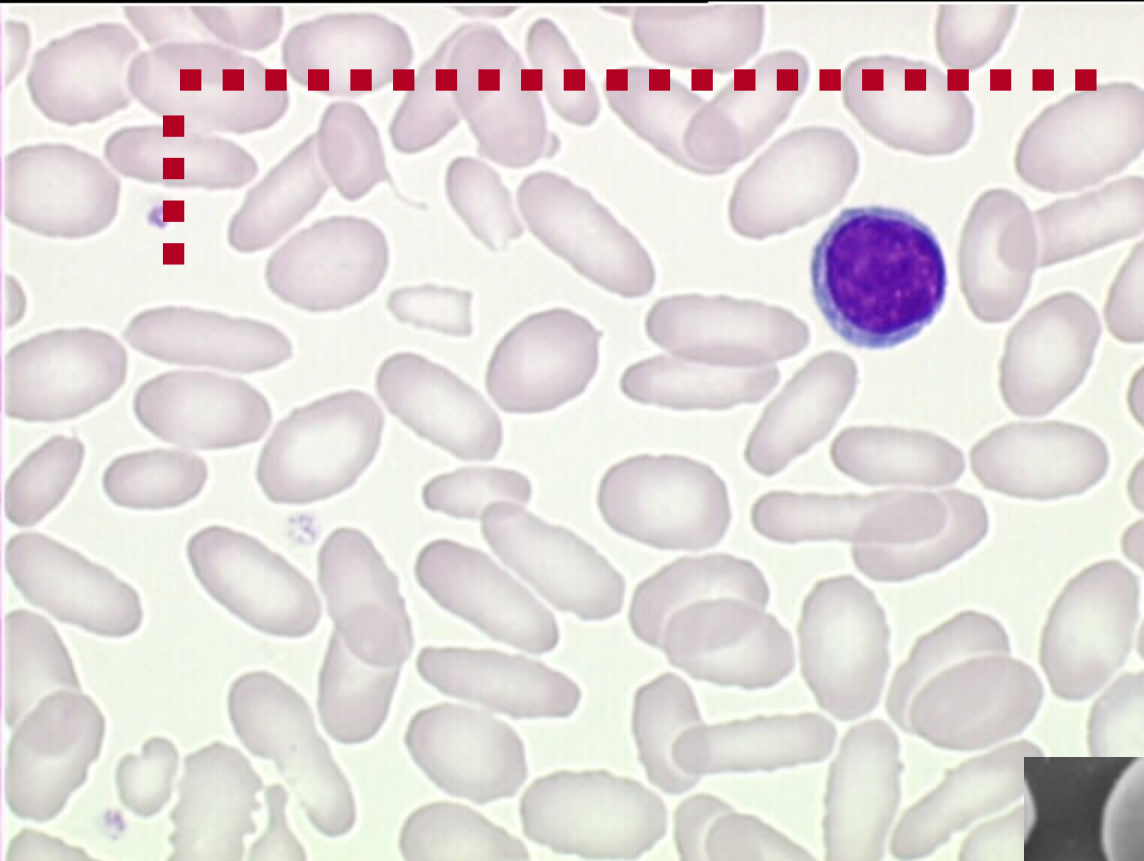
Κατάσταση Σιωπηλού φορέα

- Φυσιολογική μορφολογία ερυθρών
- Χωρίς ενδείξεις αιμόλυσης
- Μειωμένη θερμική σταθερότητα ερυθρών
- Μειωμένη μηχανική σταθερότητα απομονωμένων κυτταροσκελετών
- Αυξημένο κλάσμα διμερών σπεκτρίνης
- Παθολογικούς χάρτες πεπτιδίων σπεκτρίνης μετά από επίδραση θρυψίνης



Ήπια ΗΕ

- Συνηθέστερος κλινικός τύπος της ΗΕ
- Ασυμπτωματικοί ασθενείς
- Χωρίς αναιμία και σπληνομεγαλία
- Ήπια αντιρροπούμενη αιμόλυση
- Ελαφρά δικτυοερυθροκυττάρωση
- Μειωμένα επίπεδα απτοσφαιρινών
- Μορφολογία ερυθρών
 - Ελλειπτοκύτταρα 30-100%



Κοινή ΗΕ με χρόνια αιμόλυση

- Σοβαρότερη μορφή της κοινής ΗΕ
- Καθόλου ή ήπια αναιμία
- Δικτυοερυθροκυττάρωση
- Μορφολογία ερυθρών με
 - ελλειπτοκύτταρα
 - budding cells
 - θραύσματα ερυθρών
 - bizarre poikilocytes
- Φαινότυπος ασθενών $\alpha^{HE}/\alpha^{LELY}$

Κοινή ΗΕ με σποραδική αιμόλυση (1)

Παρατηρείται μη αντιρροπούμενη αιμόλυση σε καταστάσεις όπως:

- ιική ηπατίτιδα
- κίρρωση
- λοιμώδη μονοπυρήνωση
- βακτηριακές μολύνσεις
- ελονοσία

Κοινή ΗΕ με σποραδική αιμόλυση (2)

Αιμόλυση παρατηρείται επίσης σε:

- Καταστάσεις θρομβοπενικής πορφύρας
- Απόρριψης νεφρικού μοσχεύματος με επιπλοκή διάχυτης ενδαγγειακής πήξης
 - **ελλειπτοκύτταρα ευαίσθητα σε μικροαγγειοπαθητική βλάβη**
- Για άγνωστους λόγους στην:
 - Εγκυμοσύνη
 - Έλλειψη βιταμίνης B₁₂

ΗΕ με νεογνική ποικιλοκυττάρωση (1)

Νεογνά με "ήπια κοινή ΗΕ" στα πρώτα στάδια της ζωής τους εμφανίζουν:

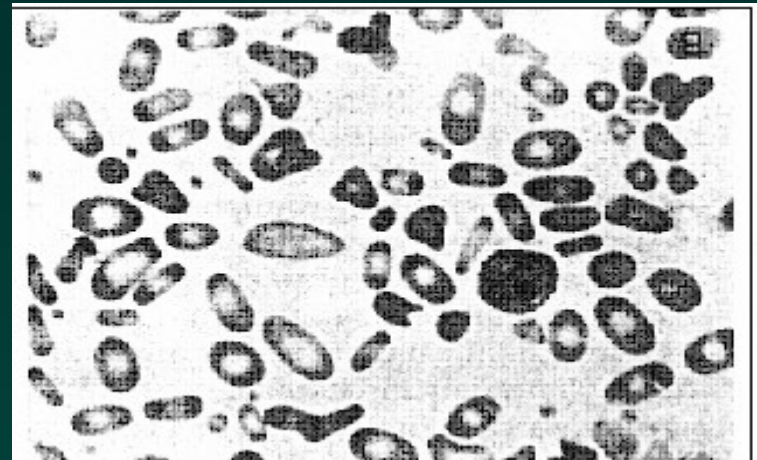
- Μετρια αιμολυτική αναιμία
- Ίκτερο
- Μορφολογία ερυθρών με
 - ελλειπτοκύτταρα
 - θραύσματα ερυθρών
 - ποικιλοκύτταρα
- Ο ένας γονιός έχει κοινή ΗΕ

ΗΕ με νεογνική ποικιλοκυττάρωση (2)

- Με την πάροδο του χρόνου εμφάνιση “ήπιας κοινής ΗΕ”
- Περίοδος μετάβασης 4 μήνες έως 2 χρόνια
- Πιθανή αιτιολογία
 - ↑ 2,3DPG στα εμβρυϊκά ερυθρά, λόγω μη σύνδεσης με την HbF \Rightarrow αποσταθεροποίηση συμπλόκου σπεκτρίνης/ακτίνης/ πρωτεΐνης 4.1

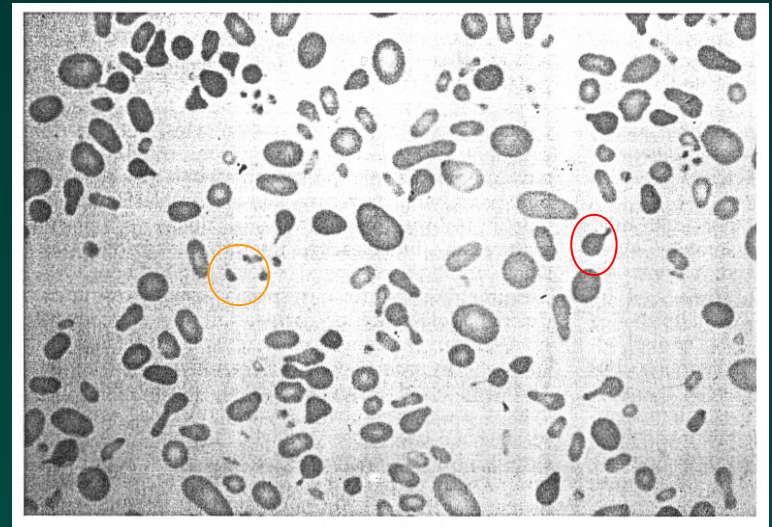
Ομόζυγη Ελλειπτοκυττάρωση

- Βαριά εξαρτώμενη από μεταγγίσεις αιμολυτική αναιμία
- Μορφολογία ερυθρών με
 - θραύσματα ερυθρών
 - ποικιλοκύτταρα
 - σφαιροκύτταρα
 - ελλειπτοκύτταρα
- Καλή ανταπόκριση στη σπληνεκτομή
- Δύσκολα διαχωρίζεται από την ΗΡΡ

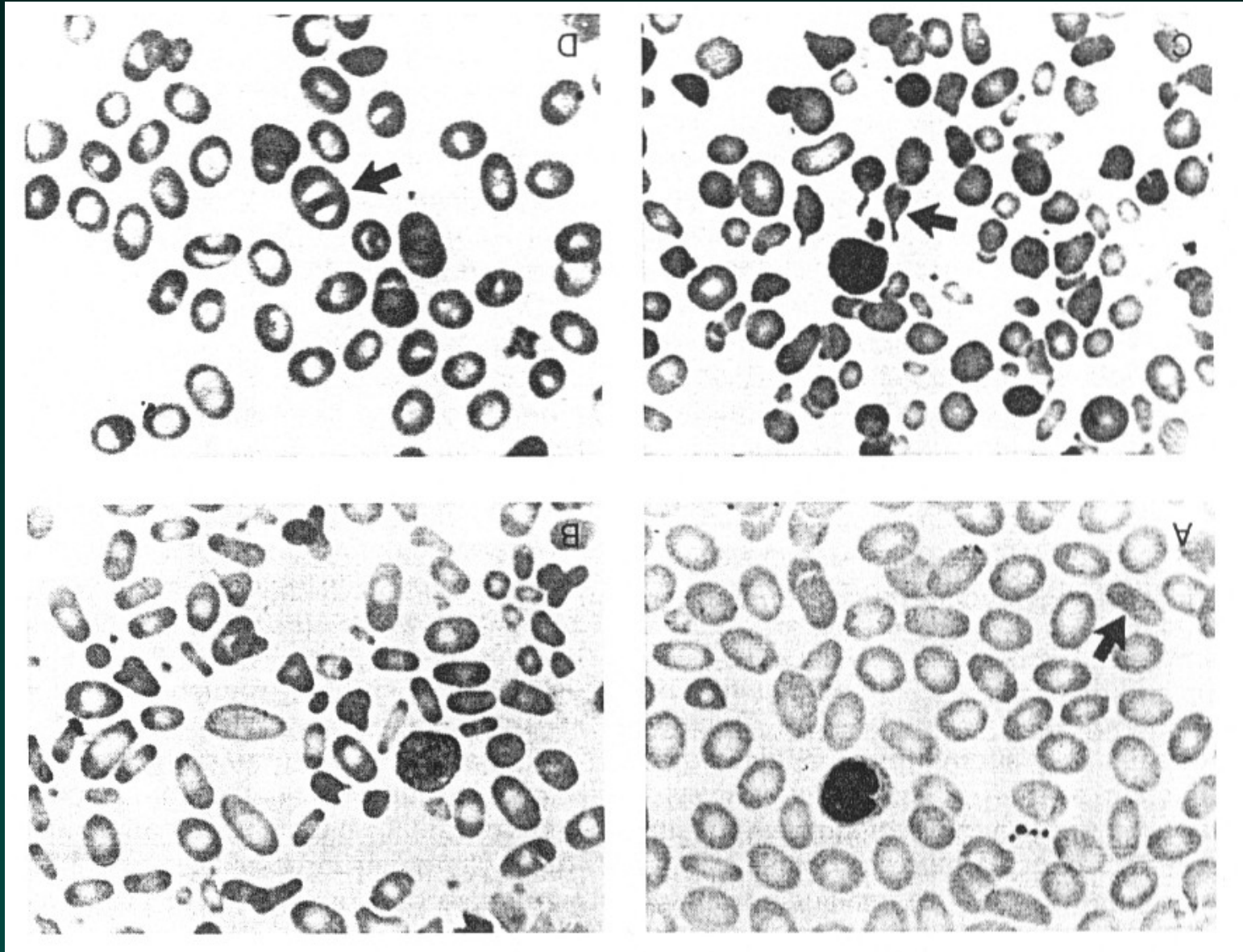


Κληρονομική πυροποικιλοκυττάρωση (HPP) (1)

- Σοβαρή αιμολυτική αναιμία
(Hb 4.0 – 8.0 g/dL)
- Υπερχολερυθριναιμία κατά τη νεογνική περίοδο
- Σπληνομεγαλία
- Χαρακτηριστική μορφολογία ερυθρών
 - σημαντική ποικιλοκυττάρωση
 - budding red cell
 - bizarre red cell
 - θράυσματα ερυθρών
 - λίγα ή καθόλου ελλειπτοκύτταρα
 - λίγα σφαιροκύτταρα



HPP

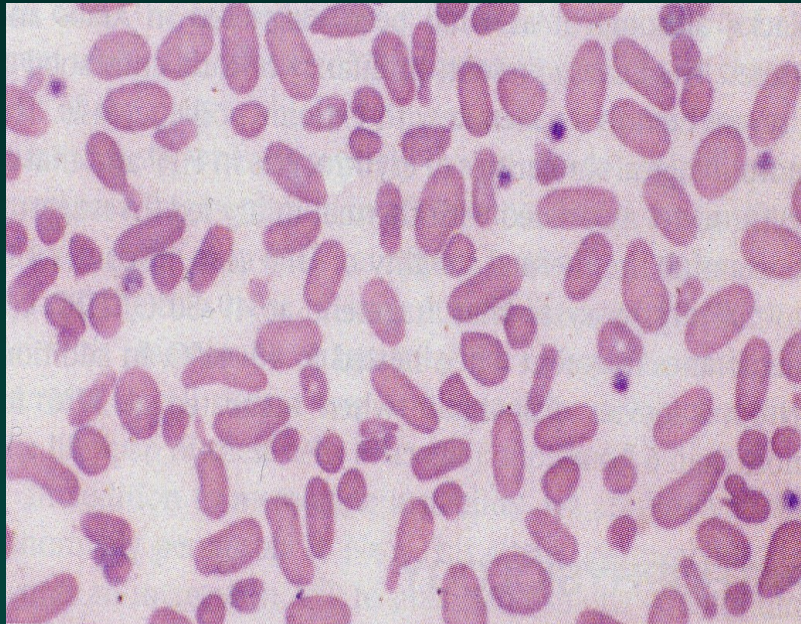


Ομόζυγη HE

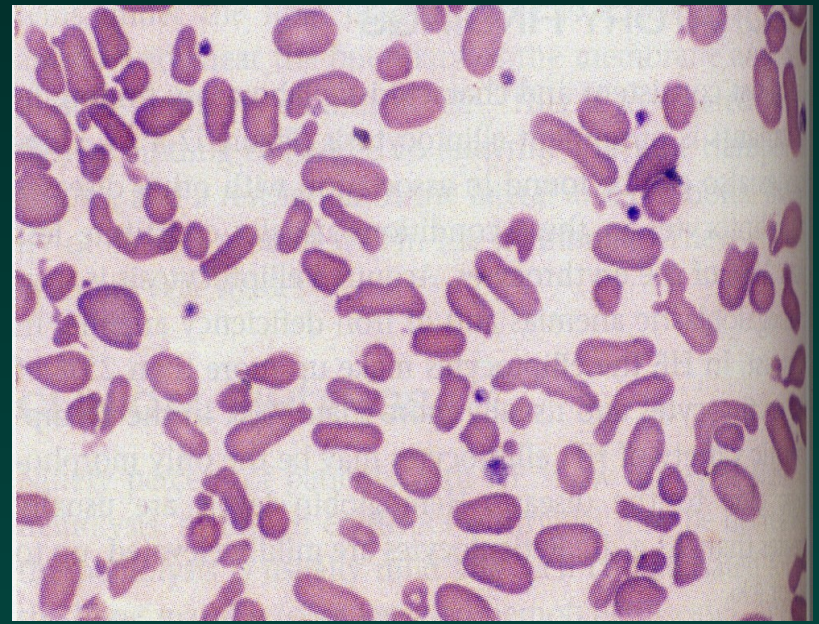
Κληρονομική πυροποικιλοκυττάρωση (2)

- Σημαντική μικροκυττάρωση (MCV 25 – 75fL)
- Πολύ επηρεασμένη ωσμωτική αντίσταση
- Αυξημένη αυτοαιμόλυση
- Ερυθρά ευαίσθητα στη θερμότητα
 - Θραύση στους 45 - 46°C (φυσιολογικά 49°C)
- Καλή ανταπόκριση στη σπληνεκτομή

ΗΡΡ



ΗΡΡ μετά από θέρμανση





Κληρονομική πυροποικιλοκυττάρωση (3)

Μετά τη σπληνεκτομή

➤ Σημαντική μείωση αιμόλυσης

- Hb 10.0 – 14.0 g/dL
- ΔΕΚ 3 – 10%

Κληρονομική πυροποικιλοκυττάρωση (HPP)

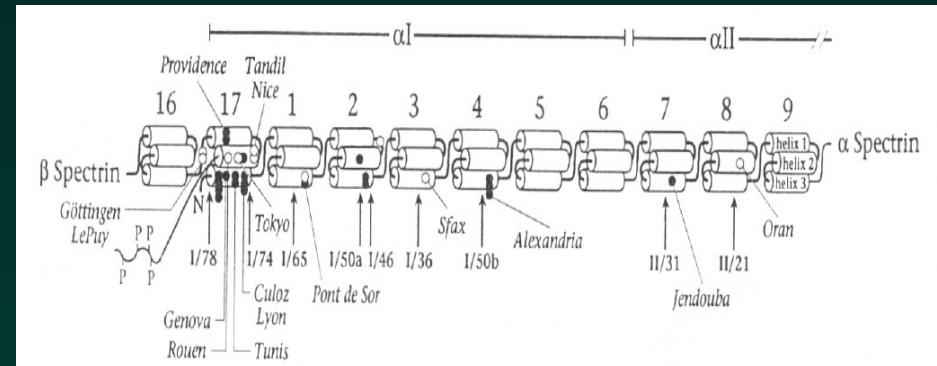
Μοριακές βλάβες της HPP

Ένας γονιός φέρει μετάλλαξη της α -Sp
Ο άλλος έχει έλλειμμα σπεκτρίνης

Ομοζυγώτες ή διπλοί ετεροζυγώτες για
δομικές βλάβες της σπεκτρίνης

Βιοχημικές βλάβες της κοινής HE

- Βλάβες στην αυτοσυγκρότηση της σπεκτρίνης
 - Μεταλλάξεις της α -Sp
 - Μεταλλάξεις της β -Sp
- Βλάβες της πρωτεΐνης 4.1
 - έλλειμμα της πρωτεΐνης 4.1
 - “βραχύτερη” πρωτεΐνη 4.1
 - πρωτεΐνη 4.1 υψηλού μοριακού βάρους



Πρωτεϊνικές βλάβες στην Κληρονομική Ελλειπτοκυττάρωση

- α-σπεκτρίνη 65%
- β-σπεκτρίνη 30%
- πρωτεΐνη 4.1 5%

Μεταλλάξεις των κληρονομικών μεμβρανοπαθειών

σφαιροκυττάρωση	ελλειπτοκυττάρωση	οβαλοκυττάρωση
αγκυρίνη	α-σπεκτρίνη	ζώνη 3 (band 3)
ζώνη 3 (band 3)	β-σπεκτρίνη	
πρωτεΐνη 4.2	πρωτεΐνη 4.1	
α-σπεκτρίνη		
β-σπεκτρίνη		
σύμπλοκο Rh		

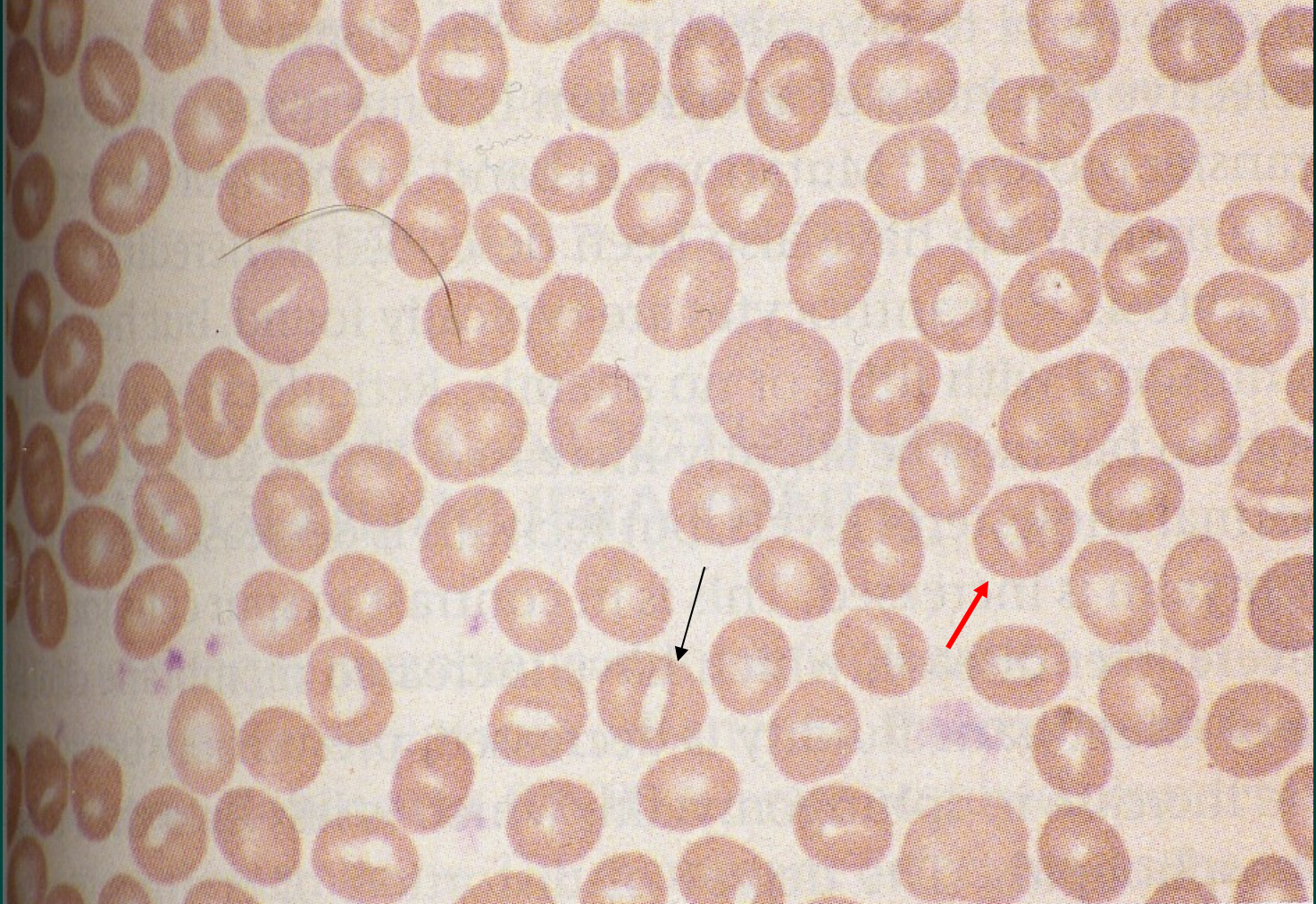
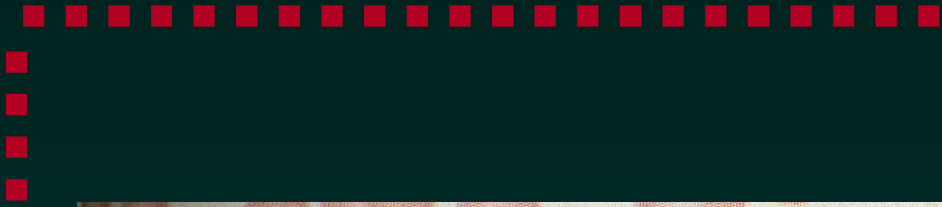


ΝΟΤΙΟΑΝΑΤΟΛΙΚΗ ΑΣΙΑΤΙΚΗ ΟΒΑΛΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ (SAO) (1)

- Ασυμπτωματική
- Επικρατούντα τύπο κληρονομικότητας
- Πεδινές ιθαγενείς φυλές, ιδιαίτερα στη Μελανησία και τη Μαλαισία
- Πολύ άκαμπτα ερυθροκύτταρα που αντιστέκονται στην εισβολή των παρασίτων της ελονοσίας

ΝΟΤΙΟΑΝΑΤΟΛΙΚΗ ΑΣΙΑΤΙΚΗ ΟΒΑΛΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ (2)

- Λίγη ή καθόλου αναιμία ή αιμόλυση
- Θερμοανθεκτικά ερυθρά
- Μοναδική μορφολογία ερυθρών
- Ετεροζυγώτες για δύο μεταλλάξεις της ζώνης 3
in cis
 - Έλλειψη 9 κωδικονίων (αμινοξέα 400 – 408)
 - Αντικατάσταση της $Lys_{56} \rightarrow Glu$ (band 3 Memphis)



Σφαιροκυτταρική ΗΕ (1)

- Φαινοτυπικό υβρίδιο της κοινής ΗΕ και της ΗS
- Αντιπροσωπεύει το 5% των ασθενών με ΗΕ
- Ήπια έως μέτρια αιμόλυση
- Μορφολογία ερυθρών
 - Λίγα μικροελλειπτοκύτταρα
 - Σφαιροκύτταρα
 - Μικροσφαιροκύτταρα
 - ❖ όχι ποικιλοκύτταρα και θραύσματα ερυθρών

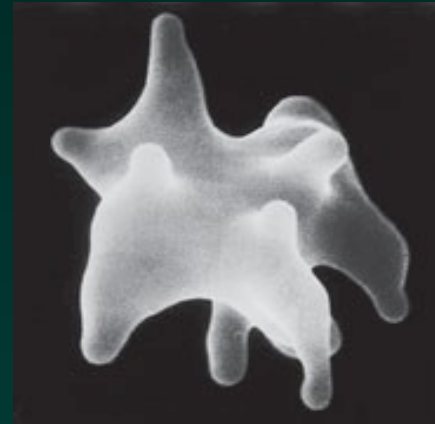


Σφαιροκυτταρική ΗΕ (2)

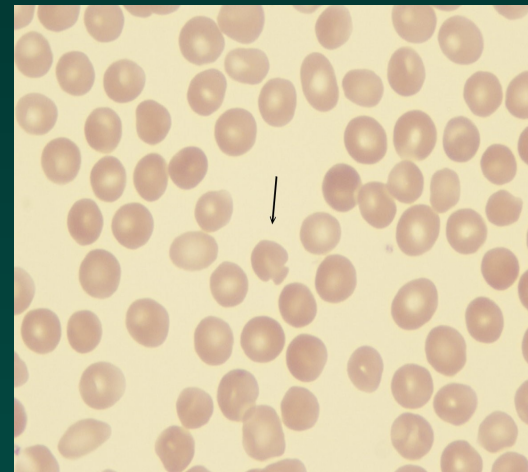
- Αυξημένη οσμωτική ευθραυστότητα
 - Χαρακτηριστική δοκιμασία αυτοαιμόλυσης
 - Η παθολογία του σπλήνα μιμείται την HS
 - Άγνωστη μοριακή βλάβη
-
- ❖ Ελάχιστοι ασθενείς είναι διπλοί ετεροζυγώτες ΗΕ και HS

Συσχέτιση βιοχημικής βλάβης – μορφολογίας ερυθρών

- Βλάβες β-σπεκτρίνης



- Έλλειμμα ζώνης 3
(band 3)





Μεθοδολογία (1)

- Γενική αίματος, μορφολογία ερυθρών
- ΔΕΚ
- Άμεση Coombs*
- Ωσμωτική αντίσταση ερυθρών
 - Χωρίς επώαση
 - Μετά από επώαση στους 37°C επί 24 ώρες

* Μόνο στην ΚΣ

Μεθοδολογία (2)

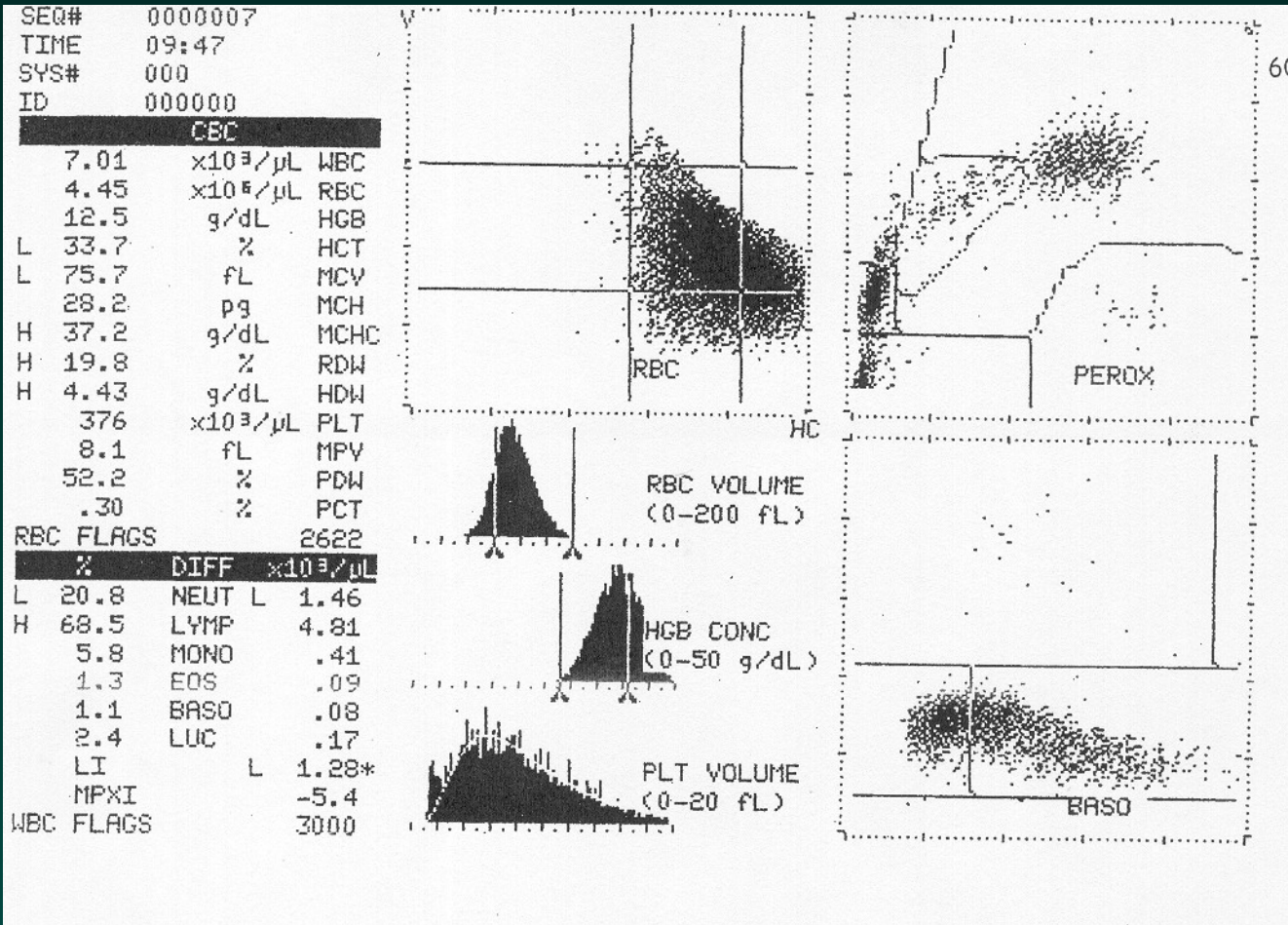
- **Fe ορού**
- **Φερριτίνη ορού**
- **Χολερυθρίνη ορού**
- **Ανάλυση πρωτεϊνών σε SDS-PAGE**
 - 3.5-17% κατά Fairbanks
 - 5-15% κατά Laemmli
- **Πυκνομετρική ανάλυση πρωτεϊνών στα 540nm**
- **Ανάλυση DNA**



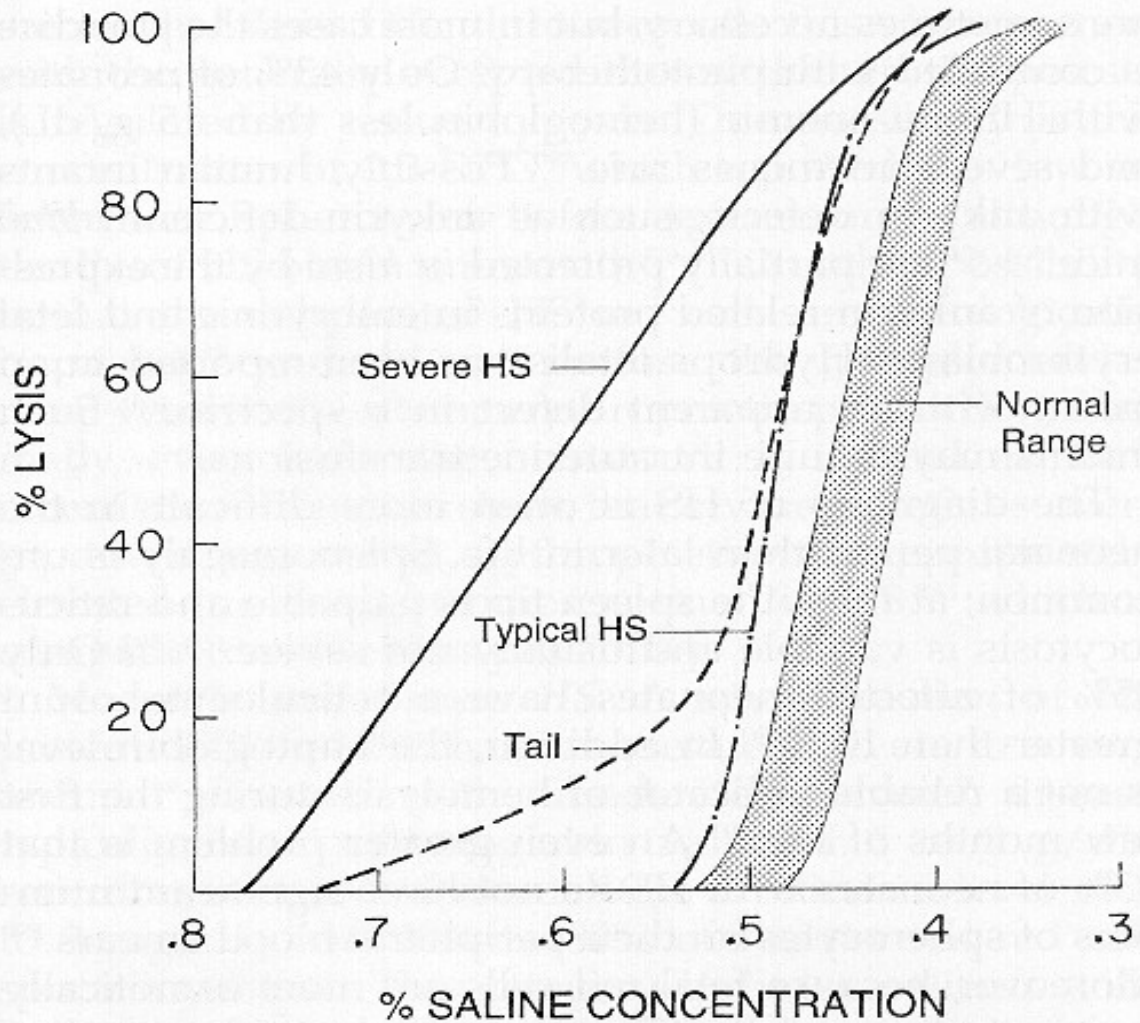
Ειδική μεθοδολογία για ΗΕ

- Απομόνωση σπεκτρίνης στους 0°C
- Διαχωρισμός SpD και SpT σε μη αποδιατακτικό πηκτωμα ακρυλαμίδης
- Περιορισμένη πέψη SpD με θρυψίνη
- Ανάλυση των πεπτιδίων σε SDS-PAGE
- Πυκνομετρική ανάλυση πεπτιδίων στα 540nm

Ερυθροκυτταρικές παραμετροί



Καμπύλες ωσμωτικής αντίστασης ερυθρών



Ανάλυση πρωτεϊνών σε SDS-PAGE

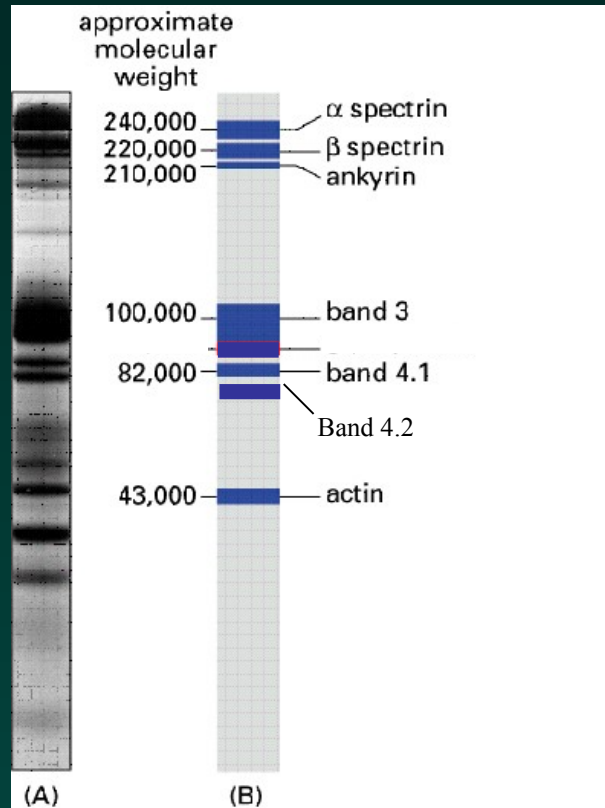
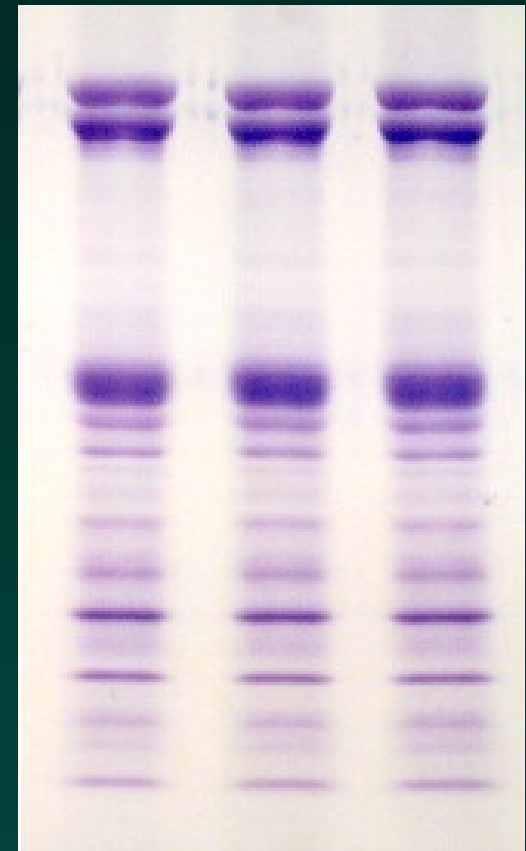


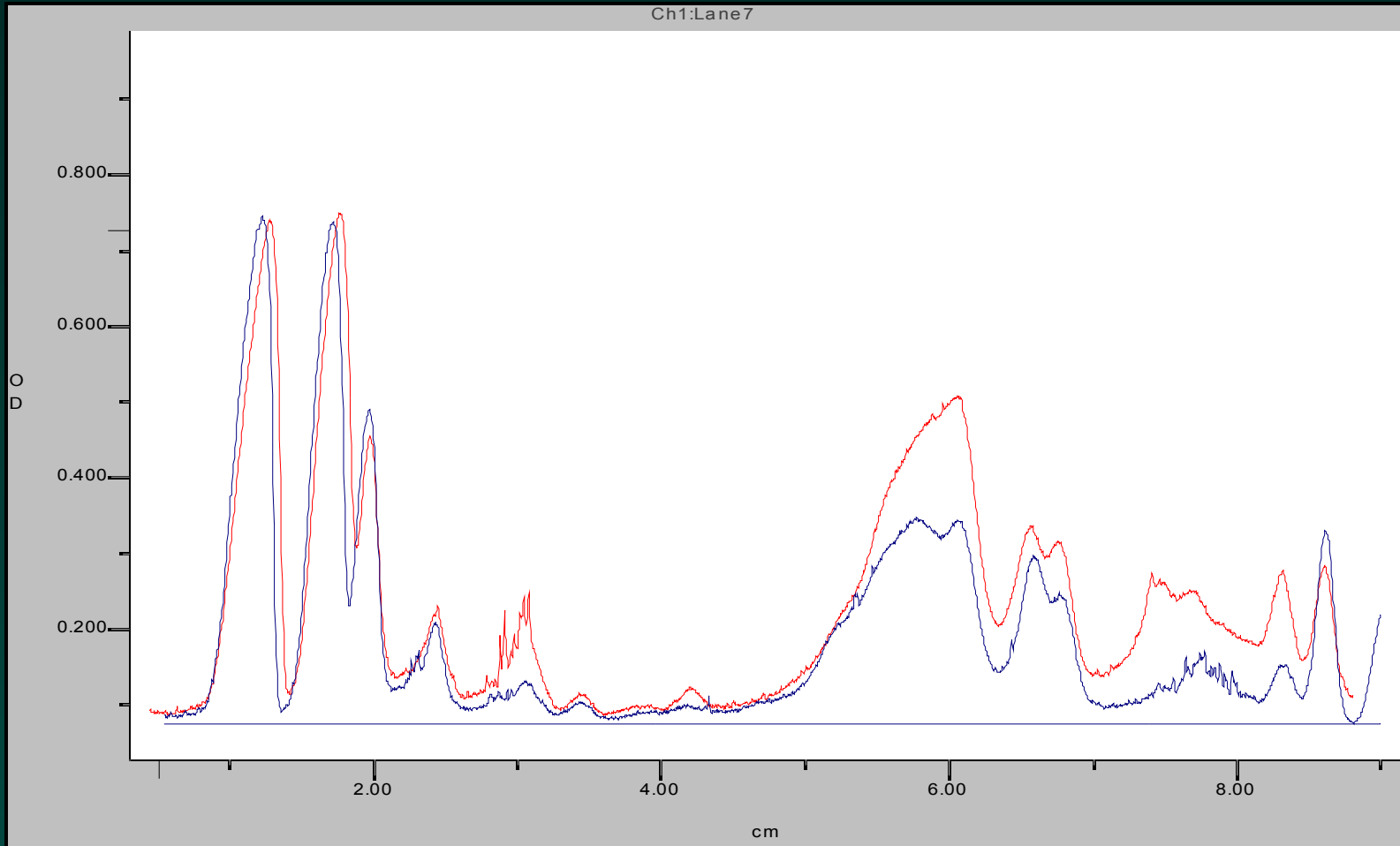
Figure 10-29. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.



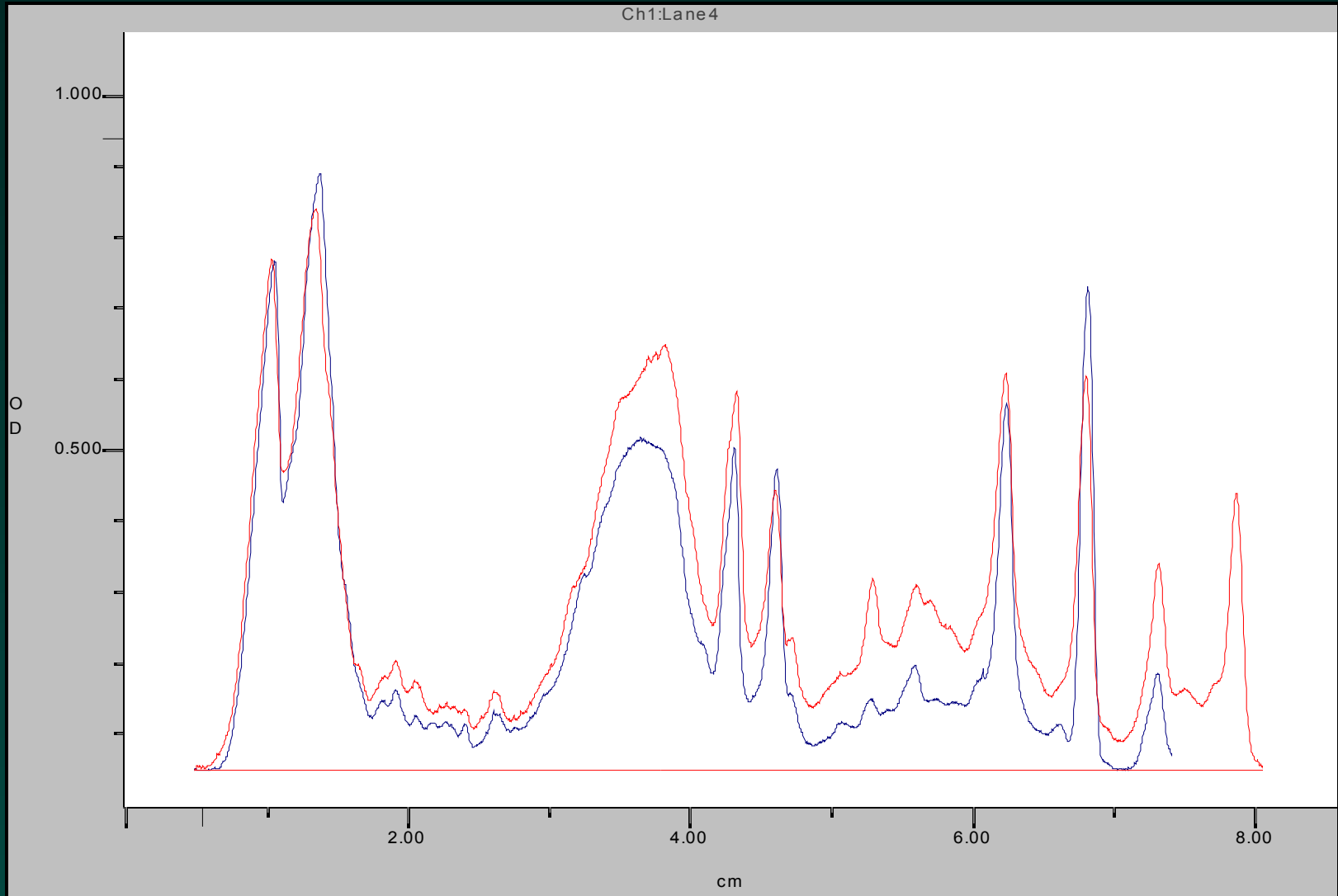
3.5-17% κατά Fairbanks

5-15% κατά Laemmli

Πυκνομετρική ανάλυση πρωτεϊνών



Πυκνομετρική ανάλυση πρωτεϊνών



Πεπτιδική ανάλυση σπεκτρίνης

