

©Borgis

*Katarzyna Koza, Adrianna Łoniewska-Lwowska, Jadwiga Fabijańska-Mitek

Stres oksydacyjny w krwinkach czerwonych dawców oraz pacjentów z talasemiami i hemoglobinopatiami

Oxidative stress in red blood cells from donors and patients with thalassemias and haemoglobinopathies

Zakład Immunohematologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa
Kierownik Zakładu: dr hab. med. Jadwiga Fabijańska-Mitek

Słowa kluczowe

stan redoks, stres oksydacyjny, reaktywne formy tlenu, talasemia, hemoglobinopatia

Keywords

redox state, oxidative stress, reactive oxygen species, thalassemia, haemoglobinopathy

Streszczenie

Krwinki czerwone są szczególnie narażone na stres oksydacyjny. Podstawowym źródłem reaktywnych form tlenu w krwince czerwonej jest proces autoutleniania hemoglobiny, w wyniku którego powstaje niefunkcjonalna methemoglobina, dochodzi do reakcji krzyżowych pomiędzy łańcuchami globiny, które precypitują jako tzw. ciała Heinza, a wreszcie hemolizy. Dodatkowo w wyniku peroksydacji uszkodzeniom oksydacyjnym podlegają lipidy i białka. Obserwuje się fragmentację białek, tworzenie makrokompleksów białkowych, uszkodzenie glikoprotein na powierzchni krwinki, zaburzenie transportu przez błonę i potencjału błonowego. Wpływa to na strukturę, funkcje i przeżywalność krwinek czerwonych. Na stres oksydacyjny narażone są również przechowywane erytrocyty. Dochodzi w nich do wyczerpania zapasów glutationu, co dodatkowo powoduje spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych, nasilonej peroksydacji lipidów błony komórkowej oraz uszkodzeń oksydacyjnych hemoglobiny. Szczególnie narażone na stres oksydacyjny są krwinki pacjentów z hemoglobinopatiami i talasemiami. Charakteryzują się one skróconym czasem przeżycia i przyspieszonym usuwaniem, które może być związane z zaburzeniem stanu redoks i uszkodzeniami oksydacyjnymi. Nasilony stres oksydacyjny w krwinkach z talasemiami i hemoglobinopatiami stwierdzono w licznych badaniach, głównie w talasemii β , hemoglobinopatii E i niedokrwistości sierpowatokrwinkowej. Istnieją przesłanki pozwalające przypuszczać, że krwinki czerwone w talasemiach i hemoglobinopatiach mogą być wyposażone w mechanizmy znoszące lub łagodzące skutki nasilonego stresu oksydacyjnego. W talasemii β , hemoglobinopatii E oraz modelach zwierzęcych niektórych talasemii i hemoglobinopatii obserwowano zwiększony poziom glutationu, a także enzymów antyoksydacyjnych.

Summary

Red blood cells are particularly susceptible to oxidative stress. The main source of reactive oxygen species in erythrocytes is the process of haemoglobin autooxidation. The result of this reaction is formation of nonfunctional methaemoglobin, cross-reactions between free globin chains, formation of Heinz bodies and haemolysis. Additionally, peroxidative alterations of lipids and proteins are observed, resulting in proteins fragmentation, macrocomplexes formation, damage of glycoproteins on the surface of the cell, alteration of membrane transport and membrane potential. All this phenomena have influence on structure, functions and life-span of red blood cells. Also stored erythrocytes are exposed to oxidative damage. During the storage, glutathione pool is depleted, antioxidant enzymes activity is diminished, and membrane lipids and haemoglobin are oxidatively damaged. Red blood cells in thalassemias and haemoglobinopathies are particularly susceptible to reactive oxygen species. The life-span of erythrocytes in this disorders is shortened, and it may be connected with oxidative damage. Increased oxidative stress was confirmed in many experiments, mainly in thalassemia β , haemoglobinopathy E and sickle cell anaemia. There are premises that red blood cells in thalassemias and haemoglobinopathies are provided with protective mechanisms to combat increased reactive oxygen species production. Increased level of glutathione and antioxidant enzymes was observed in thalassemia β , haemoglobinopathy E and animal models of some forms of thalassemias and haemoglobinopathies.

Adres/address:

*Katarzyna Koza
Zakład Immunohematologii CMKP
ul. Marymoncka 99/103, 01-813 Warszawa
tel. +48 (22) 569-38-23
fax +48 (22) 569-38-29
immunohematologia@cmkp.edu.pl

Reaktywne formy tlenu (RFT) to cząsteczki chemiczne stale obecne w niewielkim stężeniu w prawidłowych komórkach – są wytwarzane i zużywane w wyniku procesów metabolicznych. Zaliczamy do nich wolne rodniki, czyli atomy lub cząsteczki zawierające niesparowane elektrony, do których należą między innymi anionorodnik ponadtlenkowy O_2^- , rodnik wodoronadtlenkowy HO_2^- , rodnik peroksydowy ROO^{\cdot} , rodnik hydroksyowy OH^{\cdot} oraz RFT niebędące wolnymi rodnikami, między innymi tlen O_2 , ozon O_3 i nadtlenek wodoru H_2O_2 (1, 2). RFT spełniają w komórkach rolę cząsteczek sygnałowych. Przede wszystkim uruchamiają odpowiedź zapalną poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych i indukcję wytwarzania cytokin (3). Wykazano również, że brak RFT ma konsekwencje w postaci osłabienia funkcji komórek fagocytujących i zmniejszonego usuwania bakterii i grzybów (3). Poza rolę w uruchamianiu odpowiedzi zapalnej i fagocytozy, RFT biorą udział jako przekaźniki informacji w procesach starzenia komórek i naprawy tkanek (1).

Zachowanie równowagi pomiędzy wytwarzaniem i usuwaniem RFT jest konieczne do utrzymania prawidłowego stanu redoks. W tym celu komórki są wyposażone w enzymatyczne i nieenzymatyczne mechanizmy antyoksydacyjne (przeciwtleniające). Do antyoksydantów nieenzymatycznych należą między innymi witaminy A, C i E, ubichinon, melatonina, kwas moczowy, transferyna, haptoglobina i przede wszystkim glutation (1). Glutation występuje w postaci zredukowanej (GSH) lub utlenionej (GSSG) i dzięki możliwości odwracalnego utleniania grup tiolowych bierze udział w reakcjach redoks jako związek redukujący. Ponadto działa jako kofaktor wielu enzymów antyoksydacyjnych (1, 4).

Najważniejsze enzymy biorące udział w obronie komórki przed skutkami nadmiernej produkcji RFT to: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx) i peroksyredoksyna (Prx). SOD katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego, w wyniku której powstaje H_2O_2 . Nadtlenek wodoru jest słabym oksydantem, ale w obecności jonów metalu, np. żelaza, jest przekształcany w bardzo reaktywny rodnik hydroksyowy (2). H_2O_2 jest dalej rozkładany przez jeden z pozostałych enzymów (CAT, GPx lub Prx) (3). Katalaza rozkłada wyłącznie H_2O_2 , peroksydaza glutationowa dodatkowo nadtlenek organiczny, a peroksyredoksyna ma najszersze spektrum działania i usuwa pięć różnych związków utleniających, w tym H_2O_2 (5). Inne enzymy zaangażowane w obronę antyoksydacyjną to między innymi reduktaza glutationowa, odtwarzająca pulę zredukowanego glutationu, oraz proteazy i hydrolazy usuwające białka uszkodzone w wyniku stresu oksydacyjnego (1).

Zaburzenia stanu redoks, których nie mogą zrównoważyć mechanizmy antyoksydacyjne, mają bardzo poważne konsekwencje dla komórki. Uszkodzenia obejmują pęknięcia nici DNA oraz peroksydację lipidów i białek, która skutkuje uszkodzeniem mechanizmów

transportu jonów, dezaktywacją enzymów oraz zaburzeniem struktury komórki (1). Najpoważniejsze konsekwencje ma proces karbonylacji białek (4). RFT powodują utlenianie aminokwasów wchodzących w skład bocznych łańcuchów polipeptydów. Utleniane mogą być wszystkie aminokwasy, ale najbardziej narażone są cysteina i metionina zawierające grupy tiolowe (4, 6). Proces utleniania tych dwóch aminokwasów jest również jedynym odwracalnym oksydacyjnym uszkodzeniem białek. Prawdopodobnie dlatego cysteina i metionina są pierwszym celem ataku RFT, a proces ich utleniania i redukcji służy jako mechanizm zabezpieczający pozostałe aminokwasy przed utlenianiem i ograniczający stopień nieodwracalnych zmian w łańcuchu polipeptydowym (6). Utlenianie aminokwasów prowadzi do niepożądanych reakcji pomiędzy łańcuchami bocznymi białek i tworzenia makrokompleksów, a także do fragmentacji cząsteczek białkowych (4, 6). Ponadto białka enzymatyczne stają się bardziej wrażliwe na proteolizę i wahania temperatury, zmienia się również ich aktywność katalityczna (6).

Karbonylację białek obserwowano podczas starzenia komórek i organizmów (około 1/3 białek podlega karbonylacji w podeszłym wieku) oraz w wielu chorobach, między innymi dystrofii mięśniowej, chorobie Alzheimera, artretyzmie, zaćmie, progerii, cukrzycy (6-8). Jest również najpowszechniej używanym wskaźnikiem stanu utlenienia białek, a co za tym idzie, markerem stanu redoks komórki (7). Wynika to między innymi z faktu, że grupy karbonylowe są stabilne chemicznie, co ułatwia przechowywanie próbek i wykrywanie badanych związków, ponadto karbonylacja zachodzi wkrótce po zadziałaniu czynnika utleniającego i pozwala wykryć zmiany stanu redoks na początkowym etapie (4, 7). Badanie stopnia karbonylacji białek wykorzystuje najczęściej reakcję grup karbonylowych ze związkiem o nazwie 2,4-dinitrofenylohydrazyna, której wynik wykrywa się spektrofotometrycznie, poprzez Western blot lub immunohistochemię (8).

Innym wskaźnikiem zaburzenia stanu redoks jest peroksydacja lipidów, polegająca na przyłączeniu tlenu do cząsteczki nienasyconego kwasu tłuszczowego (2). Podstawowym produktem utleniania lipidów jest dialdehyd malonowy (MDA) i większość testów wykrywa produkty jego reakcji z innymi związkami (4). Rosnącym zainteresowaniem cieszą się metody określania tzw. całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (ang. *total antioxidant capacity* – TAC). Zasada różnorodnych testów określających TAC jest podobna – mierzy ilość moli związku utleniającego zneutralizowanego przez określoną objętość badanej próbki. W związku z tym, że w próbce występuje zestaw rozmaitych przeciwtleniaczy, test nie mierzy aktywności poszczególnych związków, ale wydolność antyoksydacyjną wszystkich tych mechanizmów razem, zgodnie z nazwą testu (9). Związek utleniający to najczęściej rodnik peroksydowy, jony żelaza w kompleksie o potencjale oksydacyjnym lub H_2O_2 , a wynik reakcji jest wykrywany metodą fluorescencji lub spektrofotometrycznie (10).

Krwinki czerwone to komórki unikalne pod względem budowy, metabolizmu i funkcji. Również metabolizm reaktywnych form tlenu wyróżnia je spośród innych komórek, zarówno ze względu na szczególne narażenie erytrocytów na stres oksydacyjny, jak i z uwagi na dużą podatność krwinki na uszkodzenia związane z utlenianiem, powodujące znaczne zaburzenia jej struktury, upośledzenie funkcji i skrócenie czasu przeżycia. Podstawowym źródłem RFT w krwince czerwonej jest proces autoutleniania hemoglobiny. Wynikiem tej reakcji jest wytworzenie niefunkcjonalnej methemoglobiny (metHb) oraz anionorodnika ponadtlenkowego, natychmiast przekształcanego w H_2O_2 w reakcji katalizowanej przez SOD (11). W normalnych warunkach poziom metHb w krwince nie przekracza 1%, w sytuacji nasilonego lub przedłużającego się stresu oksydacyjnego zwiększa się on kilkukrotnie, dochodzi do reakcji krzyżowych pomiędzy łańcuchami globiny, które precypitują jako tzw. ciała Heinza, a wreszcie hemolizy (4, 12). Proces autoutleniania hemoglobiny prowadzący do lizy krwinek czerwonych to rodzaj „samonapędzającego się” mechanizmu. Uwolniona metHb zwiększa wytwarzanie na zewnątrz komórki RFT, które dodatkowo zaburzają stan redoks innych erytrocytów. Nasilony stres oksydacyjny powoduje dalsze utlenianie hemoglobiny, hemolizę i uwalnianie kolejnych porcji metHb (12). Proces wytwarzania RFT nasilają dodatkowo atomy żelaza, uwalniane z uszkodzonych cząsteczek hemoglobiny. Reagują one z H_2O_2 wytwarzając reaktywny rodnik hydroksylowy (1, 2). Erytrocyty są dodatkowo narażone na działanie RFT wydzielanych przez neutrofile, makrofagi i komórki śródbłonna, na stres oksydacyjny w warunkach wysokiego ciśnienia tlenu oraz wpływ RFT produkowanych w wyniku ataku pasożytów (np. zarodźca malarii) lub działania leków (12, 13). Symptomy stresu oksydacyjnego widoczne w krwinkach czerwonych mogą być wskaźnikiem różnego rodzaju stanów patologicznych niezwiązanych bezpośrednio z krwinkami czerwonymi, ale wynikających z zaburzenia stanu redoks (13).

Obok uszkodzenia cząsteczek hemoglobiny, krwinki czerwone podlegają modyfikacjom oksydacyjnym podobnym do uszkodzeń obserwowanych w innych komórkach, wynikających z peroksydacji lipidów i białek. Konsekwencje utlenienia tych związków to: fragmentacja białek, tworzenie makrokompleksów białkowych, uszkodzenie glikoprotein na powierzchni krwinki, zaburzenie transportu przez błonę i potencjału błonowego (1, 11, 14). Wpływa to na strukturę, funkcje i przeżywalność krwinek czerwonych. Uszkodzenia białek błonowych i cytoszkieletu powodują zmianę kształtu erytrocytów i upośledzają ich właściwości reologiczne, czyli zdolność do odkształceń. Uszkodzone oksydacyjnie cząsteczki białka pasma 3 tworzą kompleksy wiążące się z błoną i są rozpoznawane przez naturalne autoprzeciwiactwa, co powoduje przyspieszone usuwanie krwinek z defektem przez makrofagi (14). Wpływ stresu oksydacyjnego na strukturę i zdolności reologiczne krwinek czerwonych udo-

wodniono w eksperymentach *in vitro* z zastosowaniem wielu związków o silnie utleniających właściwościach. W każdym z tych doświadczeń obserwowano wyraźne zaburzenie zdolności erytrocytów do odkształceń (15). Podobne defekty obserwowano w erytrocytach transgenicznych myszy pozbawionych enzymów antyoksydacyjnych (16). Zmiany struktury krwinki mogą mieć również związek z zakłóceniem funkcjonowania pomp i kanałów w błonie komórkowej w wyniku działania stresu oksydacyjnego. Konsekwencje to zaburzenie homeostazy jonowej, kurczenie krwinek oraz aktywacja kalpain, enzymów degradujących białka cytoszkieletu, zależnych od stężenia jonów wapnia (11).

Mechanizmy antyoksydacyjne krwinek czerwonych są w większości takie same, jak w innych komórkach. Istotną różnicą polega na braku organelli komórkowych i znacznym ograniczeniu procesów metabolicznych w erytrocytach. Z tej przyczyny niedobory i uszkodzenia antyoksydantów nie mogą zostać uzupełnione i naprawione, a krwinki z tego rodzaju deficytem wykazują skrócony czas przeżycia. Z drugiej strony metabolizm erytrocytów opiera się głównie na przemianach glukozy, których celem jest wytworzenie ATP oraz NADPH – związku niezbędnego do odtworzenia puli zredukowanego glutationu, a więc utrzymania właściwego stanu redoks komórki (17). Głównym antyoksydantem nieenzymatycznym w erytrocytach jest glutation, a kluczowe enzymy to katalaza, peroksydaza glutationowa i peroksyredoksyna (1). Z licznych badań wynika, że CAT jest odpowiedzialna za usuwanie głównie H_2O_2 pochodzącego z zewnątrz oraz dużych stężeń tego związku (5, 18). GPx działa przy mniejszym stężeniu H_2O_2 , jest więc pierwszą linią obrony, ma również dostęp do RFT produkowanych w bezpośrednim sąsiedztwie lub na powierzchni błony komórkowej (5, 18). W erytrocytach ważną rolę spełniają również dodatkowe enzymy, w tym dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu (G6PD), enzym ze szlaku pentozofosforanowego, niezbędny do wytworzenia siły redukującej w postaci NADPH, oraz reduktazy metHb, redukujące hemoglobinę i przywracające jej funkcjonalność (1).

Spośród enzymów antyoksydacyjnych krwinki czerwonej wyróżnia się peroksyredoksyna II (Prx II). Ekspresja białka Prx II jest indukowana w bardzo wczesnym stadium erytropoezy, przed rozpoczęciem procesu akumulacji hemoglobiny, a w dojrzałych erytrocytach Prx II stanowi trzecie pod względem stężenia białko (19). Enzym zawiera grupy tiolowe, których odwracalne utlenianie umożliwia reakcję rozkładu H_2O_2 (20). Wykazano, że niedobór Prx II powoduje oksydacyjne uszkodzenie białek błony komórkowej i cytoszkieletu, zaburzenie struktury krwinki, tworzenie ciałek Heinza i nasiloną hemolizę (19, 21). Objawy te obserwowano w krwinkach wykazujących prawidłową ekspresję GPx i CAT, co wskazuje na nadrzędną rolę Prx II w znoszeniu skutków stresu oksydacyjnego w erytrocytach (19). Kluczową rolę Prx II w krwinkach czerwonych potwierdziły eksperymenty z użyciem transgenicznych myszy pozbawionych tego enzymu (Prx II^{-/-}). Wykazały one

zwiększony poziom metHb, gromadzenie ciałek Heinza, zaburzenie struktury krwinki (poikilocytoza), upośledzenie właściwości reologicznych, spadek hematokrytu, retikulocytozę i powiększenie śledziona związane z nasiloną hemolizą krwinek z deficytem (5, 19).

Spośród enzymów antyoksydacyjnych wyróżnia Prx II również zdolność wiązania z błoną komórkową. W prawidłowych warunkach około 5% białka jest związane z błoną krwinki, gdzie usuwa H_2O_2 produkowany na powierzchni błony komórkowej lub w jej bezpośrednim sąsiedztwie, np. w procesie autoutleniania cząsteczek hemoglobiny związanych z błoną (5, 13). Co więcej, proces wiązania Prx II z błoną komórkową podlega regulacji i zwiększa się w warunkach nasilonego stresu oksydacyjnego, kiedy większa ilość cząsteczek hemoglobiny wiąże się z błoną krwinki i ulega utlenieniu (5). Mechanizm ten jest kolejnym dowodem na kluczową rolę Prx II w utrzymywaniu prawidłowego stanu redoks erytrocytów.

O wpływie reaktywnych form tlenu na erytrocyty świadczą badania prowadzone z wykorzystaniem przechowywanych krwinek czerwonych. Wiadomo, że przechowywanie krwinek w sztucznych нефизiologicalznych warunkach banku krwi naraża je na stres oksydacyjny (22). Dochodzi przede wszystkim do wyczerpania zapasów glutationu, co dodatkowo powoduje spadek aktywności enzymów antyoksydacyjnych, dla których GSH jest kofaktorem (23). Stwierdzono, że w 42. dniu przechowywania koncentratów krwinek czerwonych stężenie GSH w komórkach jest niższe o 30% w porównaniu z krwinkami świeżymi. Może to wynikać z krótkiego okresu półtrwania GSH oraz ograniczonego odtwarzania puli zredukowanej formy tego związku w niskiej temperaturze banku krwi (24). W preparatach przechowywanych krwinek czerwonych stwierdzono również gromadzenie MDA, co świadczy o nasilonej peroksydacji lipidów błony komórkowej erytrocytu (24).

Zmiany dotyczą także hemoglobiny – w przechowywanych krwinkach czerwonych stwierdzono obecność hemichromów, kompleksów utworzonych w wyniku reakcji utlenionych cząsteczek hemoglobiny. Uwolnione w wyniku tego procesu żelazo nasila wytwarzanie RFT (22). Ze stresem oksydacyjnym związane jest również wielokrotnie opisywane zjawisko wytwarzania pęcherzyków w preparatach przechowywanych krwinek czerwonych. Wraz z uwalnianiem pęcherzyków z erytrocytów eliminowane są uszkodzone białka i lipidy, co ma na celu zabezpieczenie krwinek przed usunięciem z krążenia biorcy bezpośrednio po transfuzji (22).

Obserwacje dotyczące negatywnego wpływu RFT na przechowywane erytrocyty potwierdzają eksperymenty, w których podjęto próbę bankowania preparatów krwinek czerwonych w warunkach beztlenowych. Analiza proteomiczna porównująca profil białkowy przechowywanych erytrocytów z krwinkami świeżymi w różnych punktach czasowych wykazała brak objawów fragmentacji białek i tworzenia przez nie makrokompleksów przez większość okresu przechowywania. Pierwsze zmiany, o niewielkim stopniu nasilenia, zaobserwowano tuż pod koniec standardowego cza-

su przechowywania koncentratów krwinek czerwonych (42 dni) (25).

Jak wykazano w badaniach *in vivo* i *in vitro* oraz w modelach zwierzęcych, szczególnie narażone na stres oksydacyjny są krwinki pacjentów z hemoglobinopatiami i talasemiami. Są to wrodzone niedokrwistości mikrocytarne hemolityczne. Hemoglobinopatie to zaburzenia jakościowe – w wyniku mutacji powstają wadliwe łańcuchy globiny i nieprawidłowe cząsteczki hemoglobiny. Najczęstsze to niedokrwistość sierpowatokrwinkowa (ang. *sickle cell anaemia* – SCA) i hemoglobinopatia E (HbE) (26). Talasemie to defekty ilościowe – mutacja nie zmienia łańcucha białkowego globiny, powoduje natomiast ograniczenie lub zahamowanie syntezy białka. Zaburzenie dotyczy najczęściej genów kodujących globinę α (talasemia α) oraz β (talasemia β) (27, 28).

Krwinki czerwone pacjentów z talasemią i hemoglobinopatią charakteryzują się skróconym czasem przeżycia i przyspieszonym usuwaniem (2). Jest ono najprawdopodobniej związane z zaburzeniem stanu redoks i uszkodzeniami oksydacyjnymi. Nasilony stres oksydacyjny w krwinkach z talasemiami i hemoglobinopatiami stwierdzono w licznych badaniach, głównie w talasemii β , hemoglobinopatii E i niedokrwistości sierpowatokrwinkowej. Zwiększone wytwarzanie RFT ma związek z obecnością wolnych łańcuchów globiny, które łatwo ulegają utlenianiu, czemu towarzyszy nasilona produkcja anionorodnika ponadtlenkowego (29). Wytwarzanie RFT zwiększa obecność dużych ilości żelaza, uwolnionego z cząsteczek hemoglobiny, ale również gromadzonego w organizmach pacjentów poddawanych transfuzjom oraz w wyniku zwiększonego wchłaniania żelaza z przewodu pokarmowego w związku z nasileniem procesu erythropoezy, obserwowanym w talasemii i hemoglobinopatii (2, 30, 31). Ponadto uważa się, że krwinki występujące w tych schorzeniach są bardziej narażone na stres oksydacyjny w związku ze zmniejszoną zawartością hemoglobiny. W prawidłowych erytrocytach RFT są w dużej części zużywane w reakcji z hemoglobiną, w krwinkach z niektórymi przypadkami talasemii i hemoglobinopatii z większym nasileniem atakują błonę komórkową (29).

Uszkodzenia peroksydacyjne dotyczą lipidów – w krwinkach pacjentów stwierdzono zwiększony poziom MDA, podstawowego produktu peroksydacji lipidów, a także białek – wykazano zwiększony stopień ich karbonylacji (30, 32, 33). Do białek podlegających utlenianiu należą spektryny, kluczowy element cytoskieletu krwinki czerwonej. W talasemii β obserwowano zaburzenie wiązania cząsteczek spektryny z innymi białkami odpowiedzialnymi za utrzymanie struktury erytrocytu, aktywną oraz białkiem 4.1 (34). Utlenieniu ulegało również białko paśma 3, czego wynikiem było tworzenie kompleksów przez cząsteczki tego białka, do których dodatkowo przyłączają się hemichromy. Takie kompleksy są rozpoznawane przez naturalne autoprzeciwciała, co powoduje usuwanie opłaszczonych krwinek przez makrofagi i może stanowić jedną z przyczyn skróconego czasu przeżycia erytro-

cytów w talasemiach i hemoglobinopatiach (2, 35, 36). Do nasilonego usuwania krwinek czerwonych w tych chorobach przyczynia się również zjawisko obserwowane między innymi w talasemii β oraz SCA, polegające na ekspozycji na powierzchni komórki fosfotydyloseryny (PS) (2, 17, 36). PS w prawidłowych warunkach występuje w wewnętrznej warstwie błony komórkowej, ekspozycja tego fosfolipidu w warstwie zewnętrznej jest sygnałem starzenia lub uszkodzenia krwinek, rozpoznawanym przez makrofagi. Opisywane zjawisko ma związek ze stresem oksydacyjnym, ponieważ lipazy, enzymy transportujące PS z zewnętrznej do wewnętrznej warstwy błony komórkowej, ulegają inaktywacji poprzez nieodwracalne utlenienie cystein w centrum katalitycznym enzymu (17).

Istnieją przesłanki pozwalające przypuszczać, że krwinki czerwone w talasemii i hemoglobinopatii mogą być wyposażone w mechanizmy znoszące lub łagodzące skutki nasilonego stresu oksydacyjnego. W talasemii β i hemoglobinopatii E obserwowano zwiększony poziom glutationu, a także enzymów antyoksydacyjnych – dysmutazy ponadtlenkowej usuwającej anionorodnik ponadtlenkowy oraz SOD i GPx rozkładających H_2O_2 (29, 31). Wyższy poziom glutationu stwierdzono również w mysim modelu SCA. Towarzyszyła mu zwiększona aktywność reduktazy glutationowej, utrzymującej właściwą pulę zredukowanego glutationu (17). Kluczową rolę protekcyjną w krwinkach pacjentów z talasemią i hemoglobinopatią spełnia peroksyredoksyna II. Zwiększoną ekspresję tego enzymu stwierdzono w komórkach erytroidalnych w talasemii β i w mysim modelu talasemii β (37). Interesujące są obserwacje dotyczące regulacji połączenia Prx II z błoną komórkową w różnych typach wrodzonych niedokrwistości. O ile we wrodzonej sferocytocie i SCA wiązanie Prx II z błoną krwinki było znacznie nasilone, o tyle w talasemii β stwierdzono zjawisko odwrotne (20, 37, 38). W świetle obecnej wiedzy na temat roli Prx II w erytrocytach trudno o wyjaśnienie tego zjawiska.

Związek większości objawów obserwowanych w talasemii i hemoglobinopatii z zachwianiem stanu redoks krwinek czerwonych rodzi możliwości terapeutyczne. Wydaje się, że zastosowanie związków znoszących lub łagodzących skutki stresu oksydacyjnego powinno mieć korzystny wpływ na krwinki z defektem i ogólny stan chorych. Koncepcję tę wspierają obserwacje dotyczące spadku stężenia nieenzymatycznych antyoksydantów, np. witamin A, C i E w talasemii α oraz witamin A i E w talasemii β i SCA (39-41). Spadek stężenia witamin ma związek z ich zwiększonym zużyciem w warunkach nasilonego stresu oksydacyjnego. Uzupełnienie niedoboru tych związków miało korzystny efekt w talasemii β , gdzie obserwowano zwiększe-

nie liczby krwinek czerwonych w krążeniu, obniżenie stężenia MDA, związane ze spadkiem stopnia peroksydacji lipidów oraz zmniejszenie wrażliwości osmotycznej krwinek, mogące świadczyć o ograniczeniu uszkodzeń oksydacyjnych białek (2, 36, 42). Podobne działanie wykazywały: rutyna, kurkumina i inne polifenole oraz flawonoidy (2, 31, 36). Efekt terapeutyczny miało również zastosowanie związków chelatujących jony metali – ograniczało wytwarzanie RFT w reakcjach z udziałem wolnych atomów żelaza. Pozytywne skutki na poziomie biochemicznym przekładały się na poprawę stanu zdrowia pacjentów (2), chociaż zastosowanie antyoksydantów i chelatorów nie miało wpływu na objawy niedokrwistości, przede wszystkim poziom hemoglobiny (2, 31). Opisana strategia terapeutyczna w talasemiach i hemoglobinopatiach wydaje się więc obiecująca, ale wymaga dopracowania między innymi w zakresie dawki i czasu trwania leczenia.

W porównaniu z innymi opisanymi defektami, niewiele wiadomo na temat skutków nasilonego stresu oksydacyjnego i mechanizmów go znoszących w talasemii α . Praca sprzed dwóch dekad porównuje uszkodzenia oksydacyjne białek w talasemii α i β , ale temat nie został później zbadany dokładniej. Opisany eksperyment wykazał utlenianie białek 4.1 u pacjentów z talasemią β oraz β -spektryn w talasemii α (43). Późniejsze prace wykazały zwiększone wytwarzanie RFT w związku z utlenianiem nadmiaru wolnych łańcuchów β globiny oraz większą wrażliwość krwinek z talasemią α na działanie RFT i wspomniany spadek stężenia witamin antyoksydacyjnych (10, 30). Objawy stresu oksydacyjnego mierzono jako stopień peroksydacji lipidów i miał on związek z natężeniem objawów choroby – u pacjentów z chorobą hemoglobiny H był większy niż u osób z cechą talasemii α . Zaobserwowano również, że nasilenie uszkodzeń oksydacyjnych jest różne w zależności od rodzaju mutacji, w opisanym eksperymencie największe było u pacjentów z mutacją SEA (30). Jest prawdopodobne, że występuje korelacja pomiędzy genotypem a stopniem odporności na skutki nasilonego stresu oksydacyjnego, zawiązanym np. z poziomem i aktywnością enzymów antyoksydacyjnych.

Ponieważ patogeneza talasemii α jest związana z zaburzeniem stanu redoks krwinek czerwonych podobnie jak w innych talasemiach i hemoglobinopatiach, wydaje się, że również konsekwencje nasilonego wytwarzania RFT oraz mechanizmy znoszące skutki stresu oksydacyjnego powinny być podobne. Poznanie ich wydaje się nie tylko wyzwaniem badawczym, ale również może mieć zastosowanie diagnostyczne i terapeutyczne.

PIŚMIENNICTWO

- Çimen MYB: Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta* 2008; 390: 1-11.
- Fibach E, Rachmilewitz EA: The role of antioxidants and iron chelators in the treatment of oxidative stress in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1202: 10-16.
- Forman HJ, Torres M: Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 4-8.
- Pandey KB, Rizvi SI: Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011; 155: 131-136.

5. Nagababu E, Mohanty JG, Friedman JS, Rifkind JM: Role of peroxiredoxin-2 in protecting RBCs from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Free Radic Res* 2013; 47: 164-171.
6. Berlett BS, Stadtman ER: Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 20313-20316.
7. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D et al.: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 23-38.
8. Beal MF: Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 797-803.
9. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C: Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 1106-1014.
10. Fraga CG, Oteiza PI, Galleano M: *In vitro* measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840: 931-934.
11. Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM: Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol* 2014; 5: 84; doi:10.3389/fphys.2014.00084.
12. Balaji SN, Trivedi V: Extracellular Methemoglobin Mediated Early ROS Spike Triggers Osmotic Fragility and RBC Destruction: An Insight into the Enhanced Hemolysis During Malaria. *Indian J Clin Biochem* 2012; 27: 178-185.
13. Yang HY, Lee TH: Proteomic Analysis of the Increased Proteins in Peroxiredoxin & Deficient RBCs. *Reproductive & Developmental Biology* 2012; 36: 55-64.
14. Hale J, Winlove CP, Petrov PG: Effect of hydroperoxides on red blood cell membrane mechanical properties. *Biophysical Journal* 2011; 101: 1921-1929.
15. Kim DH, Kim YK, Won DI et al.: Assessment of hemorheological deformability of human red cells exposed to tert-butyl hydroperoxide, verapamil and ascorbate by ektacytometer. *Korean J Lab Med* 2008; 28: 325-331.
16. Mohanty JG, Nagababu E, Friedman JS et al.: SOD₂ deficiency in hematopoietic cells in mice results in reduced red blood cell deformability and increased heme degradation. *Experimental Hematology* 2013; 41: 316-321.
17. Banerjee T, Kuypers FA: Reactive oxygen species and phosphatidylserine externalization in murine sickle red cells. *Br J Haematol* 2004; 124: 391-402.
18. Nagababu E, Chrest FJ, Rifkind JM: Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1620: 211-217.
19. Lee TH, Kim SU, Yu SL et al.: Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood* 2003; 101: 5033-5038.
20. Rocha S, Vitorino RM, Lemos-Amado FM et al.: Presence of cytosolic peroxiredoxin 2 in the erythrocyte membrane of patients with hereditary spherocytosis. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 41: 5-9.
21. Yang HY, Kwon J, Choi HI et al.: In-depth analysis of cysteine oxidation by the RBC proteome: advantage of peroxiredoxin II knockout mice. *Proteomics* 2012; 12: 101-112.
22. D'Alessandro A, Liunbruno G, Grazzini G, Zolla L: Red blood cell storage: the story so far. *Blood Transfus* 2010; 8: 82-88.
23. Rinalducci S, Marrocco C, Zolla L: Thiol-based regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in blood bank-stored red blood cells: a strategy to counteract oxidative stress. *Transfusion* 2015; 55: 499-506.
24. Dumaswala UJ, Zhuo L, Jacobsen DW et al.: Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. *Free Radical Biology & Medicine* 1999; 27: 1041-1049.
25. D'Amici GM, Rinalducci S, Zolla L: Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage. *J Prot Res* 2007; 6: 3242-3255.
26. Kohne E, Kleihauer E: Hemoglobinopathies: a longitudinal study over four decades. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107: 65-71.
27. Hartevelde CL, Higgs DR: Alpha-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 13; <http://www.ojrd.com/content/5/1/13>.
28. Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G: Thalassemia. *Lancet* 2012; 28: 373-383.
29. Naithani R, Chandra J, Bhattacharjee J et al.: Peroxidative stress and antioxidant enzymes in children with β -thalassemia major. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46: 780-785.
30. Cheng ML, Ho HY, Tseng HC et al.: Antioxidant deficit and enhanced susceptibility to oxidative damage in individuals with different forms of alpha-thalassaemia. *Br J Haematol* 2005; 128: 119-127.
31. Kalpravidh RW, Sirtanaratkul N, Insain P: Improvement in oxidative stress and antioxidant parameters in beta-thalassemia/Hb E patients treated with curcuminoids. *Clin Biochem* 2010; 43: 424-429.
32. Detchaporn P, Kukongviriyapan U, Prawan A et al.: Altered vascular function, arterial stiffness, and antioxidant gene responses in pediatric thalassemia patients. *Pediatr Cardiol* 2012; 33: 1054-1060.
33. Adhianto C, Hattori Y, Yamashiro Y et al.: Oxidation status of β -thalassemia minor and Hb H disease, and its association with glycerol lysis time (GLT₅₀). *Hemoglobin* 2014; 38: 169-172.
34. De Franceschi L, Bertoldi M, Matte A et al.: Oxidative stress and β -thalassemic erythroid cells behind the molecular defect. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 985210. doi:10.1155/2013/985210.
35. Ferru E, Pantaleo A, Carta F: Thalassemic erythrocytes release micro-particles loaded with hemichromes by redox activation of p72Syk kinase. *Haematologica* 2014; 99: 570-578.
36. De Franceschi L, Turrini F, Honczarenko M et al.: *In vivo* reduction of erythrocyte oxidant stress in a murine model of beta-thalassemia. *Haematologica* 2004; 89: 1287-1298.
37. Matte A, Low PS, Turrini F et al.: Peroxiredoxin-2 expression is increased in β -thalassemic mouse red cells but is displaced from the membrane as a marker of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 2010; 49: 457-466.
38. Han YH, Kim SU, Kwon TH et al.: Peroxiredoxin II is essential for preventing hemolytic anemia from oxidative stress through maintaining hemoglobin stability. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2012; 426: 427-432.
39. Tesoriere L, D'Arpa D, Maggio A et al.: Oxidation resistance of LDL is correlated with vitamin E status in beta-thalassemia intermedia. *Atherosclerosis* 1998; 137: 429-435.
40. Cheng ML, Ho HY, Tseng HC et al.: Antioxidant deficit and enhanced susceptibility to oxidative damage in individuals with different forms of alpha-thalassaemia. *Brit J Haematol* 2005; 128: 119-127.
41. Chan AC, Chow CK, Chin D: Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 274-282.
42. Muanprasat C, Wongborisuth C, Patchomthongtaweetchai N et al.: Protection against oxidative stress in beta thalassemia/hemoglobin E erythrocytes by inhibitors of glutathione efflux transporters. *PLoS One* 2013; 8: e55685; doi:10.1371/journal.pone.0055685.
43. Advani R, Sorenson S, Shinar E et al.: Characterization and comparison of the red blood cell membrane damage in severe human alpha- and beta-thalassemia. *Blood* 1992; 79: 1058-1063.

otrzymano/received: 04.01.2016
 zaakceptowano/accepted: 29.01.2016