



UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI”
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
DEPARTMENTUL DE BIOLOGIE EXPERIMENTALĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT
Stresul oxidativ și anemia hemolitică

Conducător de doctorat:

Prof. Dr. Octavian POPESCU

Student-doctorand:

MUTAZ DANA

CLUJ-NAPOCA

2013

CUPRINS

ABREVIERI

1. INTRODUCERE	5
1.1 Radicalii liberi	5
1.2 Proprietățile chimice ale unor specii reactive ale oxigenului (SRO).....	7
1.3 Stresul oxidativ în anemiile hemolitice	9
1.3.1 β -Talasemia.....	10
1.3.1.1 Patofiziologia beta-talasemiei.....	12
1.3.1.2 Eritrocitele (RBC) conținând ADN talasemic - corpi Howell-Jolly (HJ)...	13
1.3.2 Sferocitoza ereditară.....	14
1.3.3 Rolul stresului oxidativ în hemoliza intra-vasculară mediată de complement...	14
1.3.3.1 Hemoglobinuria nocturnă paroxistică (HNP).....	16
1.3.3.2 Anemia hemolitica autoimună (AHAI).....	17
1.4 Efectul antioxidantilor asupra statusului oxidativ.....	18
1.4.2 Preparatul de papaya fermentată (FPP).....	18
1.4.3 Peptide mimetice ale tioredoxinei (TRX).....	18
1.5 Efectul eritropoietinei (EPO) asupra stresului oxidativ	19
2. OBIECTIVE.....	21
3. METODE.....	22
3.1 Citometria de flux.....	22
3.2 Probele de sânge.....	23
3.3 Măsurarea markerilor stresului oxidativ prin citometria de flux	23
3.4 Prelevarea de SRO (specii reactive ale oxigenului)	24
3.5 Prelevarea de GSH (glutation redus)	24
3.6 Prelevarea în peroxidarea lipidică.....	25
3.7 Analiza FS (fosfatidilserina)	25
3.8 Măsurarea stresului oxidativ la HJ-RBC și reticulocite.....	25
3.9 Administrarea de EPO la șoarecii cu beta-talasemie.....	26
3.10 Prelevări pentru fagocitoza eritrocitelor	26
3.11 Studiul în <i>vitro</i> al efectului FPP asupra eritrocitelor sub stres oxidativ.....	26
3.12 Studiul în <i>vitro</i> al efectului FPP asupra hemolizei.....	27
3.13 Studiul în <i>vivo</i> al efectului FPP asupra eritrocitelor sub stres oxidativ	27
3.14 Susceptibilitatea HNP-RBC față de agresiunea oxidativă	27
3.15 Rolul stresului oxidativ în efectul mediat de complement asupra celulelor HNP	27
3.16 Studiul efectului antioxidantilor asupra anticorpilor/lizei mediate de complement a eritrocitelor..	27
3.17 Studiul efectului CB3 asupra hemolizei HNP-RBC	28

3.18 Prepararea eritrocitelor AET	28
4. REZULTATE.....	29
4.1 Rolul stresului oxidativ în talasemie.....	29
4.2 Rolul stresului oxidativ asupra eritrocitelor cu ADN talasemic	31
4.3 Efectul antioxidant al eritropoietinei asupra celulelor sanguine cu talasemie	32
4.4 Contribuția stresului oxidativ la hemoliză în cazul pacienților cu sferocitoză ereditară	35
4.5 Rolul stresului oxidativ în hemoglobinuria nocturnă paroxistică (HNP).....	37
4.5.1 Statusul oxidativ al celulelor HNP-RBC	37
4.5.2 Statusul oxidativ al eritrocitelor cu CD55/CD59 negativ	38
4.5.3 Efectul de complement al HNP-RBC asupra SRO	39
4.5.4 Eritrocitele de tip HNP.....	40
4.5.4.1 Statusul oxidativ al celulelor RBC de tip HNP.....	40
4.5.4.2 Efectul de complement al celulelor roșii tratate cu AET.....	41
4.6 Efectul antioxidantilor asupra statusului oxidativ în hemoliza intravasculară mediată de complement.....	42
4.6.1 Efectul CB3 și NAC asupra SRO și GSH din celulele sanguine.....	42
4.6.2 Efectul tratamentului cu CB3 <i>in vitro</i> asupra hemolizei.....	43
4.6.3 Efectul tratamentului cu CB3 <i>in vitro</i> asupra hemolizei eritrocitelor de tip HNP	44
4.7 Rolul stresului oxidativ în anemia hemolitică autoimună (AHAI).....	45
4.7.1 Modelul AHAI <i>in vitro</i>	45
4.7.2 Efectul CB3 și NAC asupra SRO și GSH în celulele sanguine cu AHAI.....	48
5. DISCUȚII.....	49
5.1 Măsurarea stresului oxidativ prin citometria de flux.....	49
5.2 Stresul oxidativ în talasemie.....	50
5.3 Stresul oxidativ în sferocitoza ereditară.....	51
5.4 Stresul oxidativ în hemoliza mediată de complement (HNP și AHAI).....	52
6. CONCLUZII.....	54
7. REFERINȚE.....	55
8. LISTA DE PUBLICAȚII.....	64
9. ANEXE.....	64
10. MULȚUMIRI.....	65

Cuvinte cheie:

Acetil cisteina proline amida cisteina, antioxidant, anemia hemolitică autoimună, eritropoietina, preparat de papaya fermentată, citometrie de flux, hemoliza, sferocitoza ereditară, RBC Howell-Jolly, hemoliza intra-vasculară mediată de complement, N-acetilcisteina, stresul oxidativ, hemoglobinuria paroxistică nocturnă, beta-talasemia.

1. REZUMAT

Radicalii liberi sunt specii chimice compuse din fragmente moleculare care posedă un electron nepereche pe orbita (valența) exterioară, ceea ce le face să fie extrem de reactive. Cei mai importanți radicali liberi sunt cei derivați din oxigen, cunoscuți sub numele de specii reactive ale oxigenului (SRO). Ei se produc în mod continuu în celule, fiind derivați ai metabolismului. Statusul oxidativ al celulelor reprezintă echilibrul dintre oxidanți (de exemplu, SRO) și antioxidanți (de exemplu, glutation redus, GSH). Perturbarea acestui echilibru în favoarea oxidanților conduce la stresul oxidativ. Producerea lor se poate amplifica la modul extrem ca răspuns la diverse condiții fiziopatologice, cum ar fi inflamațiile, problemele imunologice, hipoxia, hiperoxia, metabolismul drogurilor sau alcoolului, expunerea la radiațiile UV sau la radioterapie, sau deficitul de vitamine antioxidante (Chan et al. 1999). SRO formate în celule pot oxida diverse molecule, producând moartea celulelor și prejudiciind țesuturile (Droge et al. 2002). Se presupune că stresul oxidativ joacă un rol în fiziopatologia multor boli, inclusiv a bolilor inflamatorii, bolilor cardiovasculare, în cazul unor leziuni ale sistemului nervos central, al bolilor pulmonare etc. (Kohen și Nyska 2002). Acesta poate fi, de asemenea, implicat în anemiile hemolitice (Rachmilewitz și Fibach 2002). SRO contribuie la patogeneza mai multor anemii hemolitice congenitale sau dobândite, inclusiv a talasemiei, sferocitozei ereditare, hemoglobinuriei paroxistice nocturne (HNP), precum și a anemiilor hemolitice autoimune (AHAI).

În beta-hemoglobinopatii, cum ar fi talasemia și siclemia, deși leziunea de bază afectează genele globinei, patologia implică distrucția celulelor măduvei osoase, mediată de stresul oxidativ (producerea deficitară de celule roșii = eritropoieză inefficientă), datorită apoptozei precursorilor eritroizi prematuri, și ale sângelui periferic (supraviețuirea pe termen scurt a eritrocitelor mature). Pentru a studia rolul stresului oxidativ în anemiile hemolitice, am dezvoltat o metodologie a citometriei de flux, pentru măsurarea acestui stres în diferite celule sanguine. Folosind această metodologie, am arătat că eritrocitele prelevate de la acești pacienți conțin niveluri crescute de SRO, de peroxidare a lipidelor și fosfatidilserină externă, precum și niveluri scăzute de GSH comparativ cu eritrocitele donatorilor normali, indicând o stare de stres oxidativ. În ciuda eforturilor ample de cercetare din ultimii ani, care au condus la rezultate promițătoare, există încă nevoia unor cercetări suplimentare asupra stresului oxidativ la om. În studiul nostru am investigat, pentru prima dată, statusul oxidativ al altor tipuri de anemii hemolitice și efectul altor compuși antioxidanți, cum ar fi FPP, EPO și CB3. Rezultatul nostru a sugerat că acești antioxidanți ar putea fi utilizați ca o modalitate terapeutică.

Am studiat impactul stresului oxidativ în ceea ce privește următoarele aspecte ale anemiilor hemolitice:

- 1-Rolul stresului oxidativ în talasemie (pagina 7).
- 2-Statusul oxidativ al celulelor roșii din sânge conținând ADN talasemic (pagina 9).
- 3-Efectul antioxidant al eritropoietinei asupra celulelor sanguine talasemice (pagina 9).
- 4-Contribuția stresului oxidativ la hemoliză în cazul pacienților cu sferocitoză ereditară (pagina 11)
- 5-Implicarea stresului oxidativ în hemoglobinuria nocturnă paroxistică (pagina 12).
- 6 - Efectul noului antioxidant asupra stresului oxidativ în anemia hemolitică (pagina 14).
- 7 - Rolul stresului oxidativ în anemia hemolitică autoimună (pagina 16)

Deși etiologia primară este diferită în aceste anemii, stresul oxidativ mediază mai multe patologii ale lor, în special hemoliza.

2. OBIECTIVE

Am studiat posibilul rol al stresului oxidativ în patologia diferitelor aspecte ale anemiilor hemolitice.

Obiective specifice:

1 - Măsurarea stresului oxidativ în celulele sanguine provenite de la pacienții cu talasemie, sferocitoză ereditară, hemoglobinurie paroxistică nocturnă și anemie hemolitică autoimună, comparativ cu celulele prelevate de la donatorii normali.

2 - Măsurarea nivelurilor speciilor reactive ale oxigenului și ale fosfatidilserinei expuse în celulele Howell-Jolly din sângele periferic al pacienților cu talasemie.

3 - Investigarea efectului *in vitro* al eritropoietinei asupra statusului oxidativ al eritrocitelor și trombocitelor la pacienții cu beta-talasemie și efectului *in vivo* pe care îl are administrarea de eritropoietină asupra acestor celule la șoarecii cu beta-talasemie.

4 - Investigarea statusului oxidativ al eritrocitelor în sferocitoza ereditară și identificarea contribuției sale la hemoliză, precum și a efectelor pe care le are un antioxidant, atât *in vitro* cât și *in vivo*.

5 - Analizarea condițiilor și medicamentelor care atenuază stresul oxidativ *in vitro* și *in vivo*.

6 - Studiarea rolului pe care îl joacă stresul oxidativ în patogeneză hemolizei mediate de complement, și posibilitatea utilizării antioxidantilor pentru tratament.

3. METODE

Metodele utilizate au fost descrise în detaliu în articolele atașate. Metoda cea mai frecvent utilizată este citometria de flux.

3.1 Probele de sânge

Probele de sânge periferic (PB) au fost prelevate în tuburi cu EDTA, de la donatori sănătoși și de la pacienți cu anemie hemolitică (în funcție de tipul de anemie). Sângele a fost diluat cu soluții tampon fosfat salin Dulbecco (PBS) fără Ca^{2+} și Mg^{2+} și utilizat în decurs de 2 ore de la prelevare. În unele cazuri, probele au fost obținute din flacoanele gradate după ce toate testele diagnostice de laborator s-au încheiat. Cercetarea a fost aprobată de către Comisia de Etică privind Experimentele pe Oameni de la Centrul Medical Universitar Hadassah-Hebrew. În toate cazurile a fost obținut consimțământul informat. La pacienții politransfuzăți, probele de sânge au fost obținute înainte de transfuzie, la cel puțin 3 săptămâni după precedenta transfuzie.

3.2 Prelevarea de SRO (Specii reactive ale oxigenului)

RBC au fost incubate cu 2',7' diclorofluorescein diacetat (DCF) (Sigma), dizolvat în metanol (Bio Lab, Ierusalim, Israel), până la o concentrație finală de 0,4 mM. După incubare la 37°C timp de 15 min într-o atmosferă umidificată de 5% CO_2 în aer, celulele au fost spălate și resuspendate în soluție tampon fosfat salin Dulbecco (PBS) la concentrația celulară originală.

La traversarea membranei, DCF suferă de acetilare prin esterazele intracelulare, producând un compus nonfluorescent care devine de un verde foarte fluorescent în urma oxidării de către SRO.

3.3 Prelevarea de GSH (glutation redus)

RBC au fost spălate cu PBS și apoi centrifugate. Peleta a fost incubată timp de min. la temperatura camerei, cu 40 μM (concentrație finală) de mercur portocaliu (Sigma). În acetonă a fost preparată o soluție stoc de 100 μM de oxid de mercur și a fost depozitată la 4°C. RBC au fost apoi spălate, resuspendate în PBS, și analizate prin citometria de flux.

Oxidul de mercur reacționează cu grupul SH de GSH, producând o fluorescență roșie-portocalie.

3.4 Prelevarea în peroxidarea lipidică

Suspensiile RBC (5×10^6 celule/ml) în PBS au fost marcate cu 50 μM N-(fluoresceină-5-tiocarbamoil)-1, 2-dihexadecanoyl-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamină, sare de trietilamoniu (fluor-DHPE) (Molecular Probes, Eugene, OR) dizolvată în etanol. Celulele au fost incubate timp de 1 h la 37°C într-o atmosferă umidificată de 5% CO_2 în aer cu agitare continuă, fiind centrifugate o dată pentru a îndepărta markerul nelegat și resuspendate în PBS.

Fluor-DHPE este o sondă fluorescentă lipofilică care își pierde fluorescența în urma reacției cu radicalii peroxil, mai ales după inducerea peroxidării lipidice.

3.5 Prelevarea de FS (fosfatidilserină)

Atât celulele normale, cât și cele talasemice sau celulele la care a fost indusă apoptoza au fost spălate în PBS. Peleta a fost resuspendată în 45 μl tampon de legare conținând calciu. Am adăugat cinci μl de AnnexinV-FITC și am incubat-o timp de 15 min. la 37°C. Celulele au fost apoi spălate și resuspendate cu PBS.

3.6 Citometria de flux

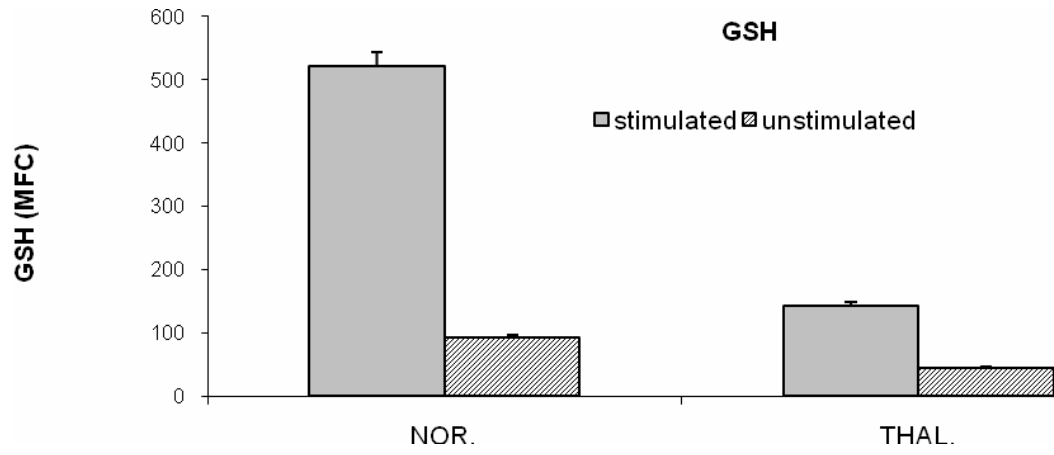
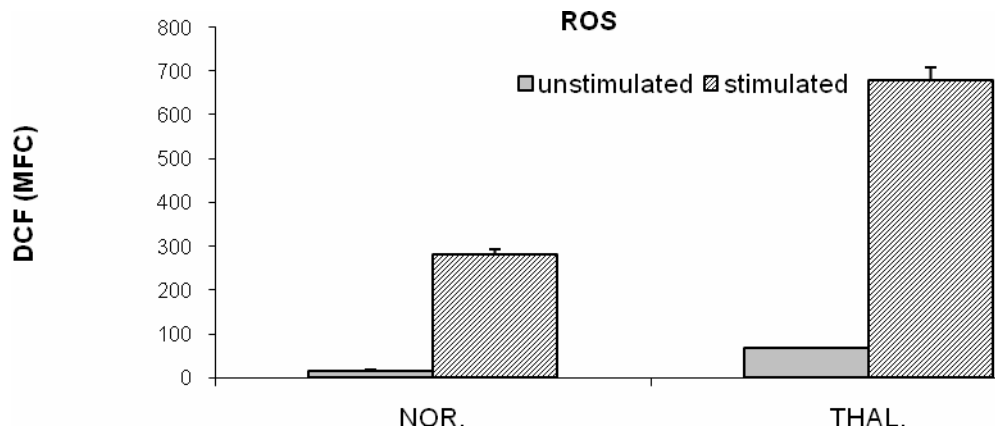
Eritrocitele tratate așa cum am indicat mai sus au fost analizate cu un sortator celular cu activare prin fluorescență (FACScalibur, Becton Dickinson, Immunofluorometry systems, Mountain View, CA). Celulele au fost trecute cu un ritm de aproximativ 1.000 pe secundă, utilizând serul fiziologic ca și curent de transport. Un fascicul laser argon de 488 nm a fost folosit ca sursă de excitație luminoasă. Pentru a exclude non-eritrocitele din analiză, a fost analizată mai întâi o diagramă cu puncte în doi parametri - ai împrăștierii laterale (SSC) și împrăștierii înainte (FSC) a populației. S-a stabilit un filtru de sortare care să includă doar eritrocitele și să excludă reticulocitele și leucocitele (WBC). RBC marcate cu DCF și fluor-DHPE au fost detectate de FL-1 PMT utilizând amplificarea liniară, iar RBC marcate cu oxid de mercur au fost detectate de FL-2 PMT utilizând amplificarea logaritmică. La fiecare prelevare, au fost folosite ca martori celule necolorate, atât tratate cât și netratate. Calibrarea instrumentelor și setările au fost efectuate cu ajutorul globulelor Cali- BRITE™-3. Canalul de fluorescență medie (MFC) al întregii populații de RBC a fost calculat pentru DCF, GSH și peroxidarea lipidică cu ajutorul unui software CellQuest echipat cu FACS.

4. REZULTATE

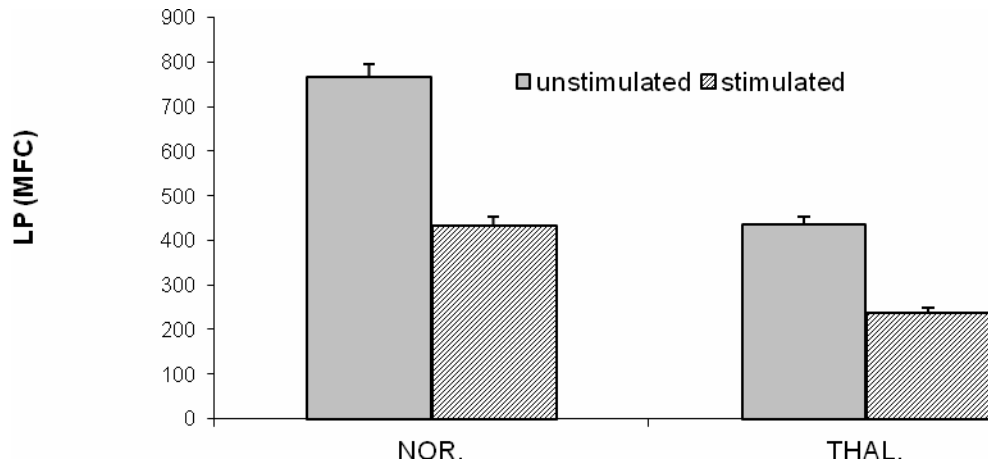
4.1. Rolul stresului oxidativ în talasemie

Au fost utilizate metodele citometriei de flux pentru măsurarea statusului oxidativ al eritrocitelor normale și talasemice și pentru studierea efectelor diferiților oxidanți și antioxidanți. Au fost mășurați următorii parametri celulari s-au (Fig. 1): (1) generarea de SRO, incluzând atât capacitatea de bază a celulelor de a genera aceste specii de oxigen, cât și răspunsul lor la stresul oxidativ (de pildă, expunerea la peroxid de hidrogen); (2) conținutul de GSH redus; și (3) peroxidarea lipidelor membranare.

Rezultatele au indicat că SRO și peroxidarea lipidică au fost mai mari, iar GSH a fost mai scăzut în eritrocitele talasemice raportat la cele normale, atât la momentul inițial, precum și după supunerea la stresul oxidativ, ca de pildă în cazul expunerii la peroxid de hidrogen.



Peroxidarea



lipidică

Figura 1. Analizarea prin citometria de flux a (SRO), (GSH), și peroxidării lipidice a eritrocitelor (RBC) stimulate și nestimulate cu H_2O_2 provenite de la donatori normali și talasemici reprezentativi. Pentru prelevările de SRO și GSH, RBC au fost preincubate cu și fără 2 mM H_2O_2 timp de 1 h și au fost apoi marcate fie cu 0,4 mM (DCF) timp de 15 min., fie cu 40 μM oxid de mercur timp de 3 min, la temperatura camerei. Ambii coloranți au fost apoi spălați și celulele au fost reintroduse în suspensie cu PBS. În analiza peroxidării lipidice, RBC au fost mai întâi marcate cu 50 μM fluor-DHPE la 37°C timp de 1 h, apoi au fost spălate și stimulate/nestimulate cu 8 mM H_2O_2 timp de 1 h la temperatura camerei. Au fost prezentate rezultatele MFC.

Corelate, aceste rezultate au subliniat relația inversă dintre SRO și GSH. SRO și peroxidarea lipidică au fost mai mari, iar GSH mai scăzut în eritrocitele talasemice în raport cu cele normale, atât la momentul inițial, precum și după expunerea la stresul oxidativ, cum ar fi cel exercitat de peroxidul de hidrogen.

4.2 Eritrocitele cu conținut de ADN talasemic aflate sub stres oxidativ

M. Dana, E. Prus, E. Fibach. Anemia, 2012 Article ID 943974, (2012).

(Anexa 1)

Am studiat natura eritrocitelor anucleate ce conțin resturi de ADN, eritrocitelor Howell-Jolly (HJ) și reticulocitelor, care sunt în mod caracteristic prezente în sistemul circulator al pacienților cu talasemie, mai ales după splenectomie. Folosind citometria de flux, am măsurat parametrii statusului oxidativ al acestor celule la pacienții cu beta-talasemie. La fiecare pacient studiat, aceste celule au avut un conținut mai mare de specii reactive ale oxigenului și fosfatidilserină expusă, comparativ cu echivalentele lor libere de ADN. Aceste rezultate sugerează că stresul oxidativ asupra precursorilor eritrocitelor ai talasemiei ar putea, prin ruperea ADN-ului, să genereze reticulocite HJ și HJ-RBC și că externalizarea fosfatidilserinei indusă de stresul oxidativ este implicată în eliminarea acestor celule din circulație, prin intermediul splinei, un mecanism similar cu cel al eliminării eritrocitelor senescente.

4.3. Efectul antioxidant al eritropoietinei asupra celulelor sanguine în talasemie

Amer J, Dana M, Fibach E. *The antioxidant effect of erythropoietin on thalassemic blood cells.* Anemia 2011; 2010(978710).

(Anexa 2).

Efectul EPO asupra generării de SRO

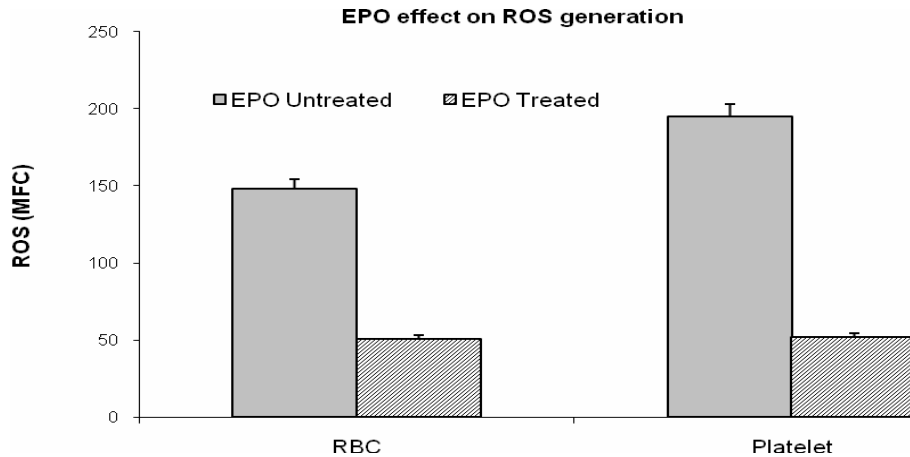


Figura 2: Efectul EPO asupra generării de SRO, la eritrocite și trombocite. O probă de sânge diluată, obținută de la un pacient cu talasemie, fost tratată timp de 2 ore cu EPO (1 U/ml) la 37°C, colorată cu DCF și apoi stimulată cu 1 mM H₂O₂ timp de 15min. SRO au fost măsurate prin citometria de flux, după separarea eritrocitelor și trombocitelor.

Efectul in vivo al EPO asupra șoarecilor cu

The EPO effect on thalassemic mice

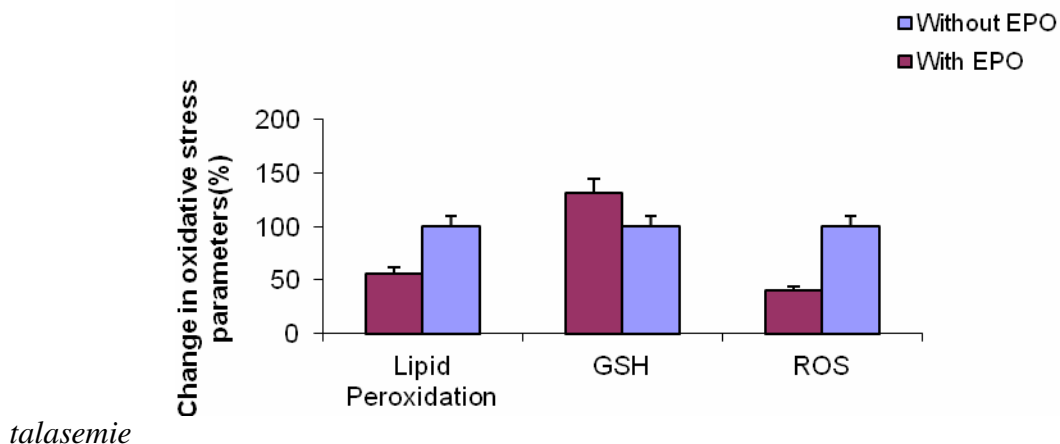


Figura 3. Efectul EPO la șoarecii cu talasemie. Șoareci (N = 4) heterozigoți cu beta-talasemie moderată (Hbb^{th3/+}), cu valori mici ale hemoglobinei (7–9 g/dL) au fost inoculați (i.p) cu sau fără EPO (5000 U/kg). După 2 ore, le-a fost prelevat sânge și au fost analizate eritrocitele. Sunt afișate schimbările parametrilor indicați. Valorile de la șoarecii netratați (fără EPO) au fost luate ca 100%.

4.4. Contributia stresului oxidativ la hemoliză în cazul pacienților cu sferocitoză ereditară

Ghoti H, Fibach E, Dana M, et al. *Oxidative stress contributes to hemoliză in patients with hereditary spherocytosis and can be ameliorated by fermented papaya preparation.* Ann Hematol 2010; 90(5):509-13
(Anexa 3).

Studiu in vitro

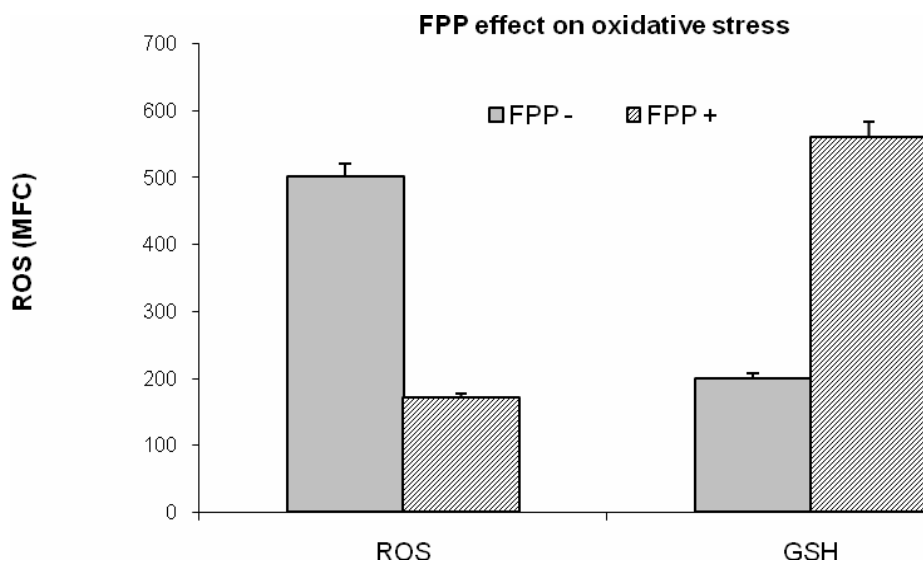


Figura 4. Efectul in vitro al FPP asupra stresului oxidativ al HS-RBC. Eritrocitele de la pacienții cu HS au fost diluate în PBS și incubate timp de 2 h, cu sau fără 0,1 mg/ml FPP. Celulele au fost apoi testate pentru SRO și GSH. Rezultatele sunt exprimate ca medie a MFC la 17 pacienți.



Figura 5. Efectul in vitro al FPP asupra hemolizei HS-RBC. Eritrocitele de la un pacient cu HS au fost diluate în PBS și incubate peste noapte cu sau fără 0,1 mg/ml FPP. Hemoliza este prezentă în absența FPP (tub stânga), dar nu și după incubarea cu FPP (tub dreapta).

4.5 Rolul stresului oxidativ în hemoglobinuria nocturnă paroxistică (HNP)

4.5.1 Statusul oxidativ al celulelor HNP-RBC

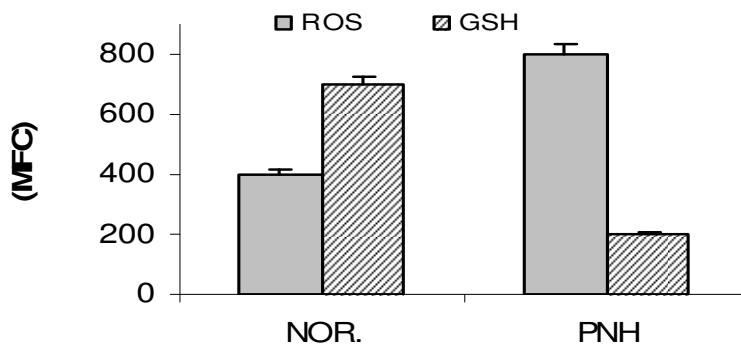


Figura 6. Statusul oxidativ al RBC la pacienții HNP comparativ cu RBC de la donatori normali. Eritrocitele au fost testate pentru SRO și GSH. SRO au fost măsurate după expunerea timp de 15 minute la 1 mM H₂O₂. MFC sunt afișate.

4.5.2 Statusul oxidativ al eritrocitelor cu CD55/CD59 negativ

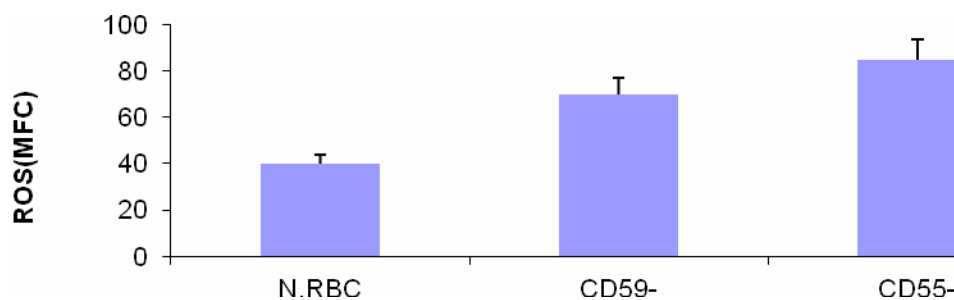


Figura 7. Statusul oxidativ al RBC CD55/CD59 negative. Probele de sânge obținute de la 5 donatori normali și 5 pacienți HNP au fost colorate pentru CD55 și CD59 și SRO. Au fost stabilite filtre pentru RBC, și a fost determinată intensitatea fluorescenței CD55, CD59 și SRO. Proportia de celule CD55 și CD59 în sângele pacienților a variat de la 20% la 27%. Rezultatele cu celule de la pacienții cu HNP arată un nivel mai ridicat de SRO în celulele CD55/CD59-negative decât în cele CD55/CD59 pozitive (celulele normale).

4.5.3 Efectul de complement al HNP-RBC asupra SRO

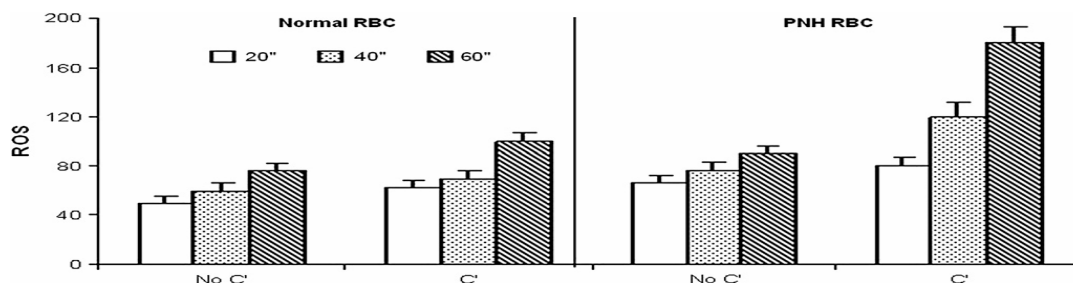


Figura 8. Efectul de complement al RBC asupra SRO. Eritrocite normale și HNP-RBC au fost incubate la 37°C cu ser conținând complement (C') sau cu ser cu complement inactivat (încălzit la 56°C timp de 30 minute) (No C'). Serurile au fost ABO compatibile cu eritrocitele tratate. La momentele indicate, alicote de RBC au fost analizate pentru SRO. Rezultatele sunt exprimate ca media 6 SD a canalului de fluorescență medie de la patru experimente efectuate cu RBC de la diferiți donatori normali și pacienți cu HNP (având 20-27% celule CD55/CD59-negative).

4.5.4 Eritrocitele de tip HNP

4.5.4.1 Statusul oxidativ al celulelor RBC de tip HNP

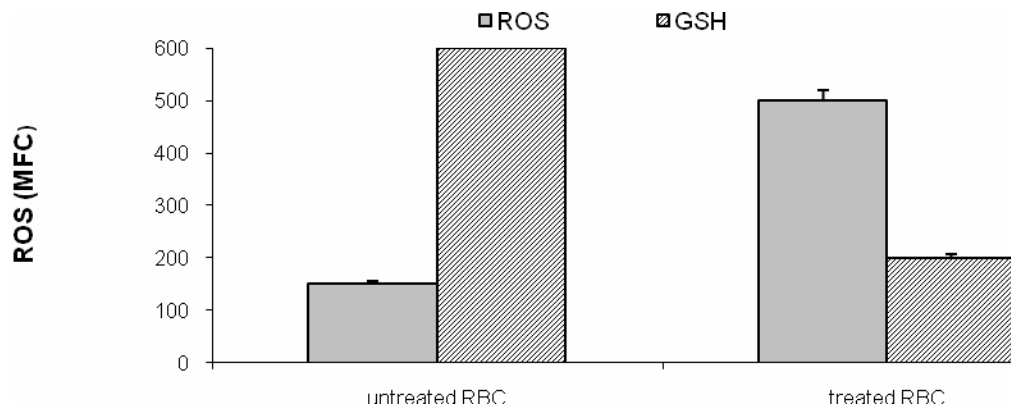


Figura 9. Statusul oxidativ al RBC tratate AET. RBC au fost testate pentru SRO, și GSH. MFC sunt arătate.

4.5.4.2 Efectul de complement al celulelor roșii tratate cu AET

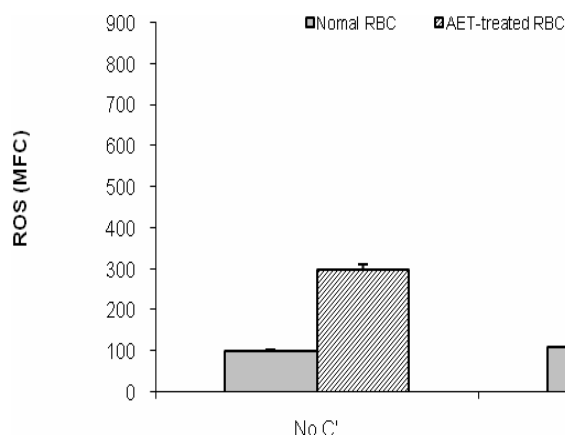


Figura 10. Efectul de complement al RBC de tip HNP asupra SRO. RBC normale și tratate AET au fost incubate la 37°C cu ser conținând C' sau cu ser cu C' inactivat (încălzit la 56°C timp de 30 minute) (No C').Serurile au fost compatibile ABO cu eritrocitele tratate. Rezultatele au indicat o creștere a fluorescenței în serul neîncălzit, dar nu și în serul încălzit.

4.6 Efectul antioxidant al peptidelor mimetice ale tioredoxinei (TRX) asupra statusului oxidativ al RBC HNP și RBC de tip HNP

4.6.1 Efectul CB3 și NAC asupra SRO și GSH în celulele sanguine

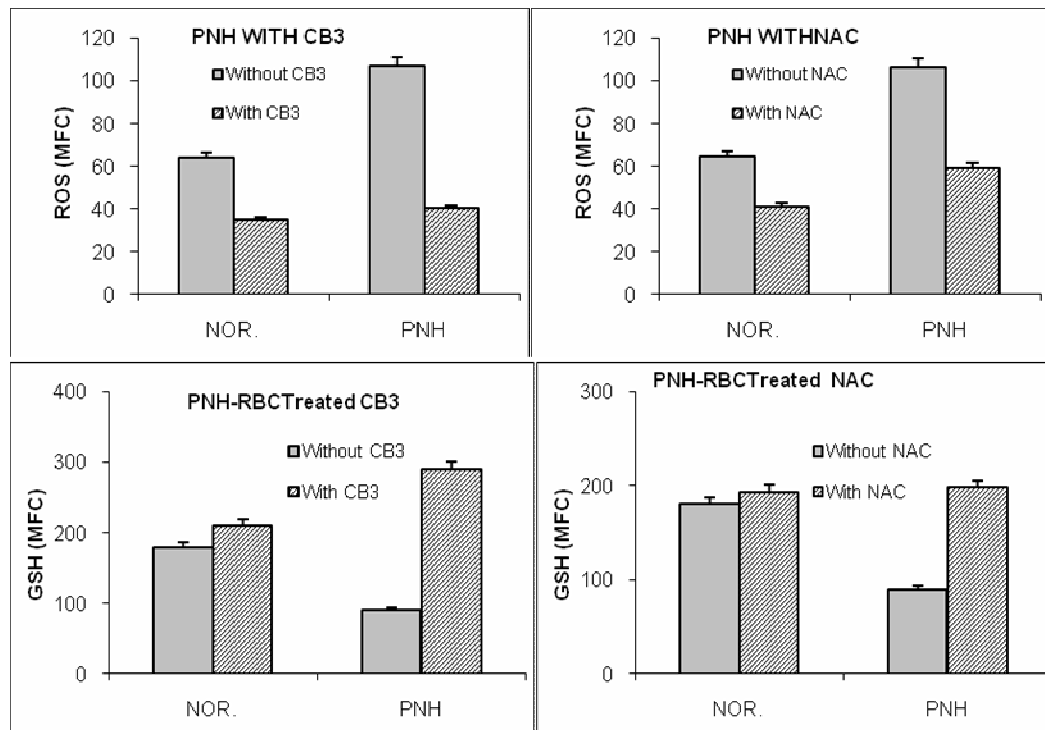


Figura 11. Efectul CB3 și NAC asupra SRO și GSH în RBC. HNP-RBC diluate în PBS au fost incubate timp de 30 min, cu 1 mM de CB3 sau NAC. SRO și GSH au fost măsurate după colorarea cu DCF și, respectiv, oxid de mercur. Rezultatele noastre arată că CB3 a redus semnificativ producția de SRO și a crescut conținutul de GSH, și că acesta a fost mai eficient decât NAC.

4.6.2 Efectul tratamentului cu CB3 *in vitro* asupra hemolizei

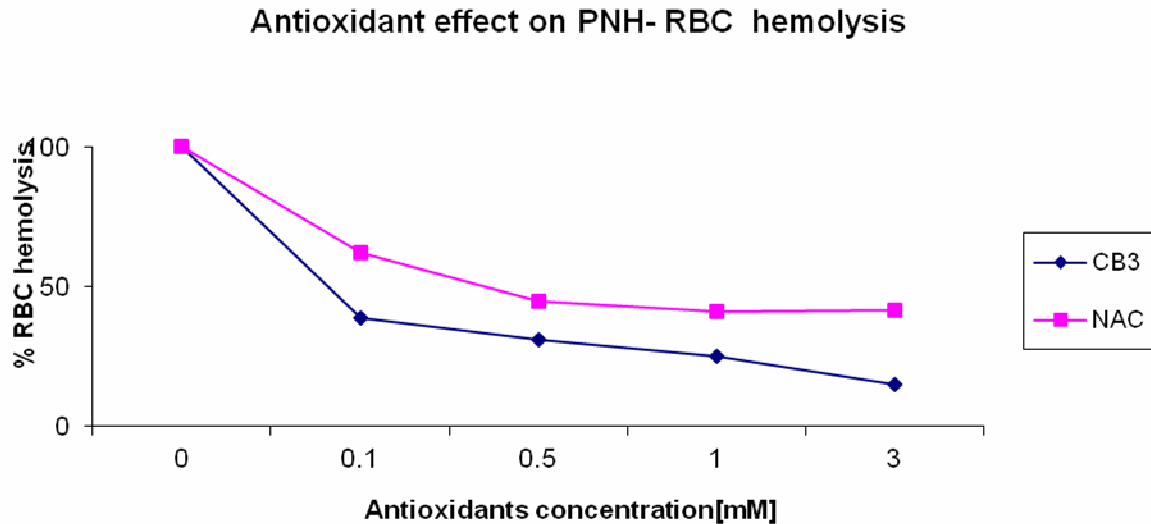


Figura 12. Efectul tratamentului cu CB3 *in vitro* asupra hemolizei. HNP-RBC diluate în PBS au fost incubate peste noapte cu diferite concentrații de CB3 sau NAC. Celulele au fost apoi centrifugate, Hb au fost măsurate prin Reactivul Drabkin. A fost detectată hemoliza completă prin liza soluției RBC prin șoc osmotic în apă și măsurarea Hb, care reprezintă 100% hemoliză (măsurător), apoi rezultatele au fost exprimate ca absorbanta probei de testat comparativ cu proba măsurător ca referință la 540 nm. Rezultatele au indicat o hemoliză gravă a HNP-RBC netratate; pe de altă parte, tratamentul cu NAC și CB3 a inhibat liza, într-un mod dependent de doză.

4.6.3 Efectul tratamentului cu CB3 *in vitro* asupra hemolizei eritrocitelor de tip HNP

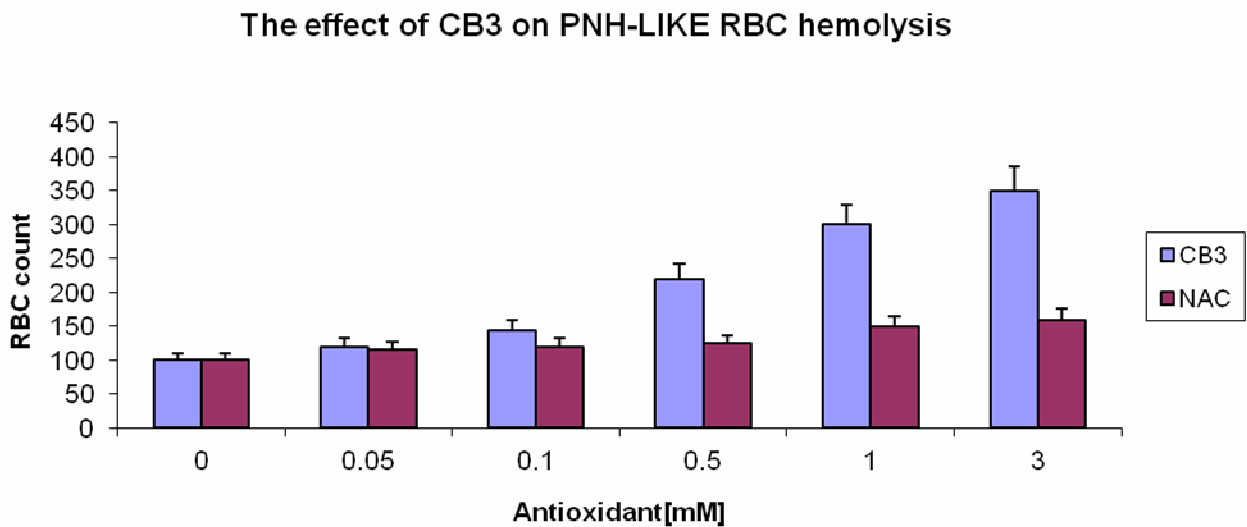


Figura 13. Efectul tratamentului cu CB3 asupra hemolizei eritrocitelor de tip HNP. RBC de tip HNP diluate în PBS au fost incubate peste noapte cu diferite concentrații de CB3 sau NAC. Celulele au fost apoi centrifugate, iar sedimentul de RBC a fost numărat cu hematocitometrul.

4.7 Rolul stresului oxidativ în anemia hemolitică autoimună (AHAI)

4.7.1 Modelul AHAI *in vitro*

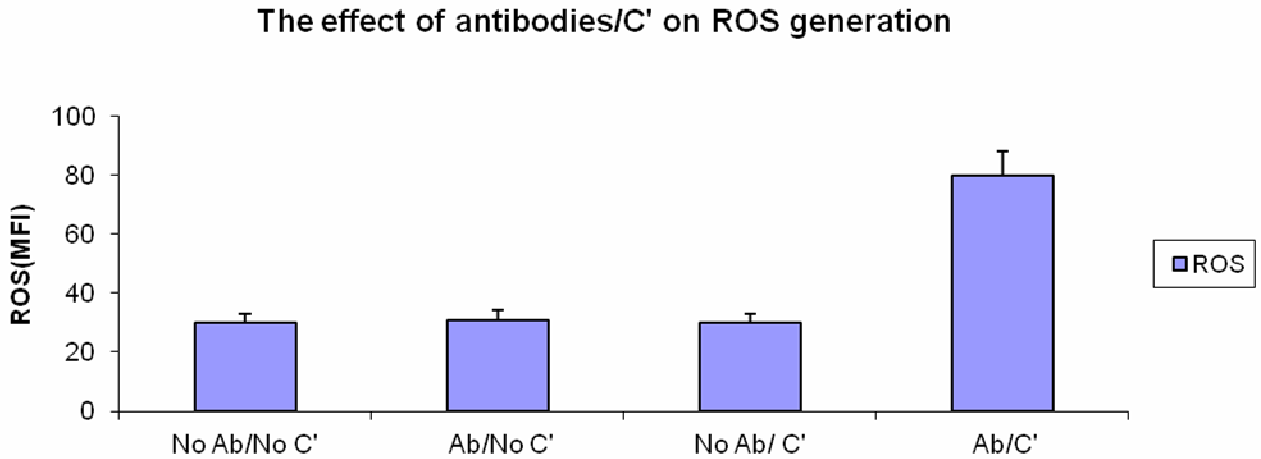


Figura 14A. Efectul anticorpilor și complementului asupra generării de SRO

MFC al RBC umane normale de tip A, incubate cu anticorpi monoclonali anti-A și C'. Rezultatele au indicat că nici anticorpilor, nici C' singur nu au indus SRO.

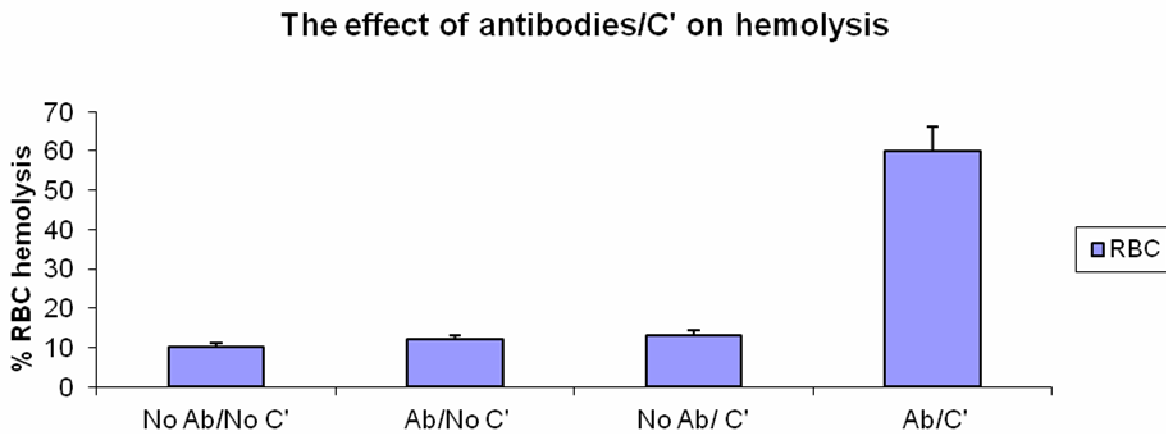


Figura 14B. Efectul anticorpilor și complementului asupra hemolizei.

RBC umane normale de tip A, incubate cu anticorpi monoclonali anti-A și C'. Hemoliza a fost observată în decurs de 30 min, și a fost măsurată prin determinarea conținutului de hemoglobină liberă de supernatant. Rezultatele au indicat că nici anticorpilor, nici C' singur nu au indus hemoliza.

Aceste rezultate au sugerat că nici anticorpilor, nici C' singur nu au indus hemoliza.

Efectul antioxidantilor asupra anticorpilor/lizei mediate de complement a eritrocitelor

Antioxidant effect on C'-mediated hemolysis

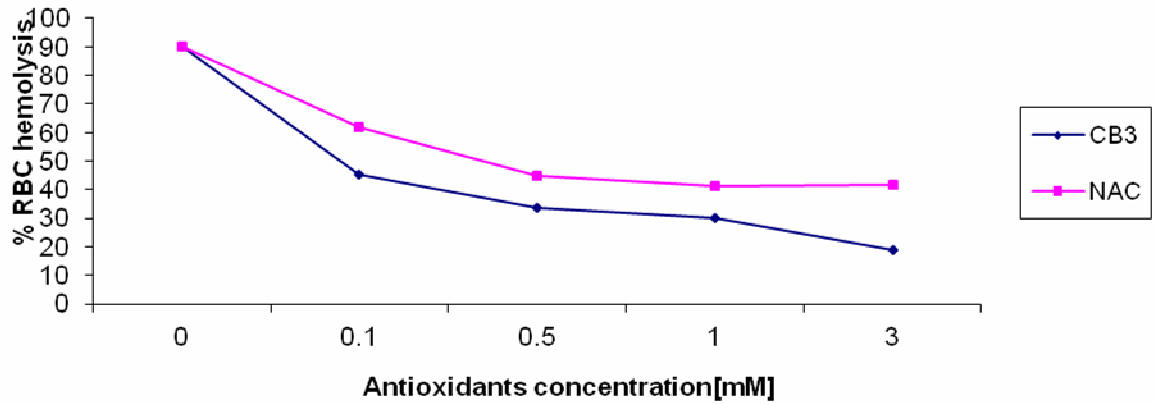


Figura 15. Efectul antioxidantilor asupra anticorpilor / lizei mediate de complement a RBC. RBC umane de tip A au fost incubate cu ser autolog, la un raport de 1:5 cu 2 μ L anticorpi monoclonali anti-A proveniți de la șoareci (IgM) la diferite concentrații de CB3, NAC la 37°C timp de 40 min. Hemoglobina serică a fost testată cu o soluție Drabkin. Rezultatele noastre arată că CB3 a inhibat semnificativ liza celulelor sanguine, comparativ cu NAC.

Rezultatele noastre arată că CB3 a inhibat semnificativ liza eritrocitelor, comparativ cu NAC.

4.7.2 Efectul CB3 și NAC asupra SRO și GSH în celulele sanguine cu AHAI

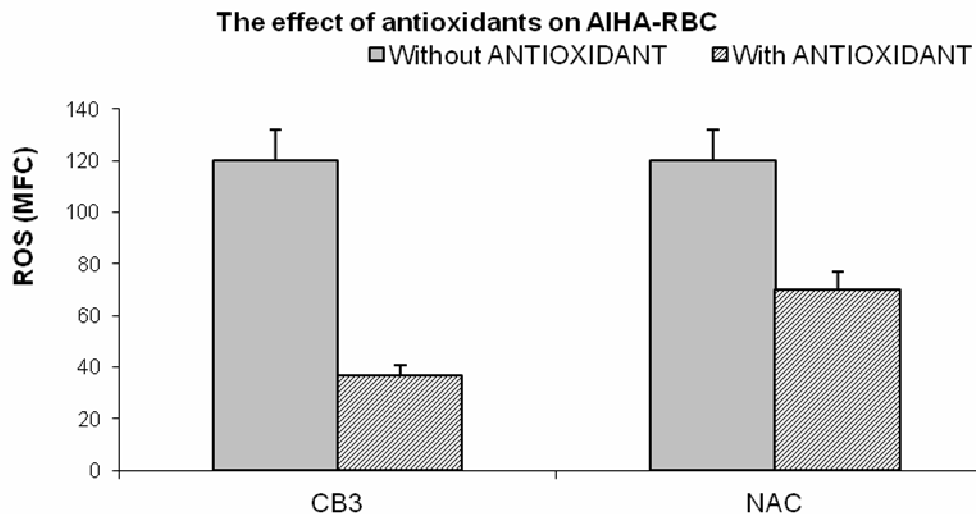


Figura 16. Efectul CB3 și NAC asupra SRO și GSH în celulele sanguine cu AHAI

RBC umane normale de tip A au fost tratate cu 1 mM de CB3 și NAC, timp de 20 de minute, iar apoi au fost incubate cu ser autolog (C) și anticorpi monoclonali anti-A de la șoareci. RBC au fost spălate și testate pentru SRO.

Rezultatele noastre sugerează că aceste peptide mimetice ale TRX sunt excelenți candidați potențiali pentru tratarea tulburărilor legate de stresul oxidativ.

5. DISCUȚII

Stresul oxidativ apare atunci când echilibrul dintre oxidanți și antioxidanți este tulburat, balanța înclinându-se în favoarea celor dintâi. Acest fenomen poate fi influențat de agenți exogeni (cum ar fi radiațiile, traumele, activarea medicamentoasă, excesul de oxigen), dar și de factori endogeni, asociați cu numeroase stări patologice, inclusiv tulburări inflamatorii, boli cardiovasculare, leziuni la nivelul sistemului nervos central, boli pulmonare, tulburări cauzate de diabet, etc. (Kohen și Nyska, 2002). Antioxidanții au fost testați clinic în unele tulburări legate de factori oxidativi (de exemplu, tulburări cauzate de diabet) (Giacco et al., 2010). Deși nu reprezintă etiologia lor primară, stresul oxidativ joacă un rol important și în anemiile hemolitice, în principal prin distrucția cauzată la nivelul RBC. Antioxidanții pot neutraliza stresul oxidativ, însă studiile clinice au fost efectuate în principal în cazul beta-hemoglobinopatiilor și nu și în alte tipuri de anemie hemolitică. De exemplu, s-a raportat că antioxidanții, cum ar fi compusul tiol N-acetilcisteina (NAC), vitamina C și derivatul de vitamina E, tocotrienolul, au redus stresul oxidativ al celulelor sanguine obținute de la pacienți cu talasemie (Amer et al., 2004, Amer et al., 2005). În ciuda eforturilor ample de cercetare din ultimii ani, care au condus la rezultate promițătoare, există încă nevoia de cercetări suplimentare privind stresul oxidativ la om. În studiul nostru am investigat, pentru prima dată, statusul oxidativ în alte tipuri de anemii hemolitice și efectul altor compuși antioxidanți, cum ar fi FPP, EPO și CB3. Rezultatele noastre au sugerat că acești antioxidanți ar putea fi folosiți ca o potențială modalitate terapeutică.

5.1 Măsurarea stresului oxidativ prin citometria de flux

Aspectele tehnice ale testelor prezintă o limitare serioasă. De exemplu, metodele de măsurare a SRO, cum ar fi rezonanța electronică de spin și capcanele de spin, sunt complicate și au o sensibilitate redusă. O tehnică ce poate demonstra, identifica și cuantifica speciile de radicali liberi aplicabile în studiile umane este de o importanță fundamentală. O astfel de tehnică trebuie să permită aplicațiile clinice de rutină, cum ar fi screeningul și identificarea subiecților cu stres oxidativ, și monitorizarea efectelor tratamentelor farmacologice, suplimentelor cu antioxidanți sau ale modificării stilului de viață.

Am dezvoltat o metodologie bazată pe tehnici ale citometriei de flux, pentru a măsura mai multe aspecte legate de stresul oxidativ în diferite celule sanguine. Citometria de flux oferă o serie de avantaje: (1) capacitatea de a cuantifica o singură celulă, față de media populației totale, (2) prin utilizarea unei strategii de filtrare a fasciculului, pot fi măsurate subpopulații specifice, celulele contaminante fiind excluse. Datele sunt exprimate în unități arbitrare de fluorescență, și nu în greutate sau concentrații molare, dar metoda este utilă în scopuri comparative. Recent, a fost utilizată o tehnologie automată și robotică cu un randament foarte înalt pentru screeningul a mii de compuși în ce privește activitățile lor.

Mai multe sonde fluorescente au fost utilizate în citometria de flux pentru măsurarea stresului oxidativ. Aceste sonde sunt permeabile la celule și sunt supuse unei sechestrări celulare, astfel încât pot fi atinse concentrații intracelulare semnificative. Aceste sonde își pot modifica proprietățile de fluorescență în urma interacțiunii cu compusul testat, având o specificitate înaltă și o rată scăzută de conversie spontană cu toxicitate celulară minimă.

Tehnicile de flux ne-au permis să măsurăm generarea de SRO cu 2',7' diclorofluorescin diacetat (DCF-DA), conținutul GSH prin colorarea cu oxid de mercur, peroxidarea lipidică cu Fluor-DHPE și markerul apoptotic al fosfatidilserinei (FS) prin colorarea cu anexina V. Folosind aceste abordări mai sus menționate, am demonstrat că în beta-talasemie, în sferocitoza ereditară, hemoglobinuria nocturnă paroxistică (HNP), precum și în anemia hemolitică autoimună (AHAI), eritrocitele sunt supuse stresului oxidativ. Aceste celule generează cantități crescute de SRO, PS și peroxidare lipidică membranoasă și au valori scăzute de GSH comparativ cu celulele normale.

5.2 Stresul oxidativ în talasemie

Am arătat că SRO și peroxidarea lipidică au valori mai mari, iar valoarea GSH este mai scăzută la eritrocitele talasemice în raport cu cele normale, atât la momentul inițial, cât și după supunerea la stresul oxidativ, ca de pildă în cazul expunerii la peroxid de hidrogen.

La pacienții cu talasemie, și mai ales după splenectomie, precursorii eritrocitelor nucleate (normoblasti) și eritrocitele și reticulocitele mature care conțin resturi de ADN (corpi Howell-Jolly, HJ) sunt detectabile în număr mare în circulația sanguină. În mod normal, astfel de celule nu există în sângele periferic. Folosind citometria de flux, am arătat că HJ-RBC și reticulocitele sunt sub stres oxidativ și transportă PS expuse, ceea ce poate reprezenta factorul declanșator al fagocitozei lor de către macrofage și eliminarea lor în splină.

Am demonstrat că mai multe anomalii induse de stresul oxidativ pot fi ameliorate prin tratament cu antioxidanți. În beta-talasemie, am demonstrat că tratamentul cu EPO conduce la ameliorarea stării de anemie. Există două rațiuni pentru acest tratament în talasemie: de a stimula eritropoieza și de a ridica producția de Hb fetală; aceasta din urmă compensează lipsa sau conținutul redus de HbA. Se știe că EPO are un efect protector în celulele non-eritroide, cum ar fi celulele neuronale și cardiomiocitele (Joyeux-Faure et al., 2007). Mai multe rapoarte au atribuit rolul protector al EPO în celulele non-eritroide efectului său anti-oxidativ (Katavetin et al., 2007, Wu et al., 2007). Am raportat un efect direct al EPO asupra RBC, care nu este legat de eritropoieză. Efectele au fost observate *in vitro*, prin incubarea RBC din sângele periferic cu EPO, precum și la scurt timp (3 ore) după injectarea de EPO în șoareci cu beta-talasemie. Rezultatele noastre sugerează că EPO ar putea atenua simptomele anemiilor hemolitice, acționând ca un antioxidant.

5.3 Stresul oxidativ în sferocitoza ereditară

Utilizând citometria de flux, am documentat prezența stresului oxidativ la 17 pacienți cu HS din 7 familii arabe palestiniene. Acest lucru a fost demonstrat prin generarea crescută de SRO și peroxizi lipidici și prin nivelurile mai scăzute de GSH în eritrocitele lor, comparativ cu donatorii sănătoși, de control. Constatarea că stresul oxidativ al RBC de la pacienții cu HS poate fi parțial explicat prin rata mai mare a auto-oxidării Hb și formării metemoglobinei (Cadet et al., 2010), care pot fi cauzate de creșterea concentrației de Hb intracelulară (CHEM), datorită deshidratării RBC. Acumularea de Hb oxidată în apropierea membranei RBC favorizează producerea de daune oxidative localizate la nivelul proteinelor osoase și fosfolipidelor, distrugând în cele din urmă structura membranei și funcția sa (Cadet et al., 2010). S-a raportat, de asemenea, că spectrina în HS-RBC este extrem de sensibilă la stresul oxidativ, ceea ce poate contribui la deteriorarea membranei (Belloni et al., 2011).

Am demonstrat că tratamentul cu FPP ameliorează parametrii oxidativi în HS și scade hemoliza, atât *in vitro* cât și *in vivo*. Proprietățile antioxidante ale FPP (Keerthivasan et al., 2011) ar putea fi atribuite conținutului ridicat de acid glutamic, glicină, și metionină, care servesc drept substrat pentru sinteza glutationului. Ameliorarea parametrilor de stres oxidativ prin FPP a fost, de asemenea, raportată în talasemie, dar fără schimbări semnificative ale parametrilor hematologici (Khandelwal et al., 2007). O posibilă explicație ar fi faptul că speciile libere ale fierului, cum ar fi fierul labil plasmatic și fierul labil intracelular sunt mai mari în talasemie, conducând la o producere crescută de SRO, în raport cu HS sau HNP (a se vedea mai jos), în cazul cărora a fost detectată o îmbunătățire a parametrilor hematologici (Galili et al., 1958).

5.4 Stresul oxidativ în hemoliza mediată de complement (HNP și AHAI)

Utilizând metodologia citometriei de flux, am constatat că HNP-RBC se află sub stres oxidativ: la ele nivelul SRO este mai mare și cel al GSH este mai mic decât la RBC normale. În HNP, celulele stem patologice și cele normale coexistă, dând naștere la un mozaic de celule sanguine normale, având fenotipul CD55+CD59+, și celule anormale, cu un fenotip CD55-CD59-. În experimentele cu dublu-colorare cu anticorpi fluorescenți la CD55/CD59 și markeri ai stresului oxidativ, am demonstrat că există un status oxidativ mai ridicat în celulele derivate din clona patologică, comparativ cu celulele derivate din clone normale ale unuia și aceluiași pacient. Într-adevăr, am observat că celulele normale (cu fenotipul CD55/CD59-positive) din sângele pacienților cu HNP au un status oxidativ mai ridicat decât celulele de la donatorii de sânge sănătoși. Hemoliza mediată de complement (C') datorată deficienței de CD55/CD59 este o caracteristică majoră a HNP. Am arătat că tratamentul cu complement *in vitro* aplicat HNP-RBC a dus la stresul oxidativ înainte de orice semne de hemoliză și că anti-oxidanții, cum ar fi CB3 și NAC au redus hemoliza, sugerând implicarea stresului oxidativ ca mediator sau ca adjuvant. HNP este o boală rară, și pentru a putea studia diferite aspecte ale HNP, am folosit RBC artificiale, de tip HNP. RBC normale au fost incubate cu compus sulfidril de bromură 2-aminoetilisotiuronium (AET). AET induce susceptibilitatea la liza mediată de complement prin perturbarea integrității structurale și funcționale a elementelor constitutive ale membranei, cum ar fi

factorul de accelerare a degradării (DAF), inhibitorul membranelor de liză reactivă (MIRL), și receptorul de complement de tip 1 (CR1) care reglementează activitatea atât a convertazei C3 cât și a complexului de atac al membranei, mediată de complement (Sirchia, Ferrone și Mercuriali, 1965; Sirchia, Ferrone, Milani și Mercuriali, 1966).

AHAI este o altă formă de anemie hemolitică C' - mediată, cauzată de auto-anticorpi împotriva antigenelor exprimate pe suprafața RBC. Odată formați, acești anticorpi se leagă la suprafața RBC și le marchează pentru distrugere prin liză C'-mediată (hemoliză intravasculară) și/sau prin fagocitoză Fc-mediată (hemoliză extravasculară). Este o boala autoimună sistemică gravă, pentru care nu există tratamente viabile, cu excepția splenectomiei și medicației cu imunosupresoare și substanțe anti-inflamatorii generale.

Pentru a simula o situație AHAI, au fost dezvoltate două modele AHAI *in vitro*: RBC umane normale de tip A au fost incubate cu (a) anticorpi monoclonali anti-A și C' (b) O seruri (conținând C' și Ab). În cele două modele, a fost observată hemoliza. Aceasta a fost precedată de o creștere bruscă în producția de SRO. De unii singuri, nici anticorpii, nici C₇ nu au indus hemoliza.

Antioxidanți cum ar fi NAC și CB3 au redus creșterea C'-mediată a SRO, precum și hemoliza ulterioară. Aceste peptide mimetice ale tioredoxinei (TRX) sunt blocate atât la terminusul N- cât și la C-, ceea ce le permite să traverseze liber membranele celulare și să aibă acces la citosol. Ele au fost examinate pentru a li se determina capacitatea de a îmbunătăți starea redox a celulelor în timpul stresului oxidativ (Bartov et al., 2006, Bachnoff et al., 2011). Este de așteptat ca aceste peptide să producă reducerea chimică a proteinelor TRX-țintă, cum ar fi oxidoreductaza, inversând stresul oxidativ prin mimarea activității TRX atribuite unui consens al motivului CxxC, prezent la locul catalitic. Fiind ditioli, aceste peptide ar putea, în plus față de acțiunea catalitică mai selectivă și specifică asupra substraturilor TRX, să acționeze direct ca antioxidanți, prin interacțiunea lor cu speciile oxidante nocive și neutralizarea acestora. Acționând ca necrofagi SRO și precursori de glutation, unele dintre aceste peptide s-au dovedit capabile să atenueze în mod eficient kinaza proteică activată de mitogeni (MAPK) fosforilare/ activare și translocarea NF-κB inversă a nucleului în condiții de stres oxidativ *in vitro* (Bartov et al., 2006, Lee et al., 2007).

Peptidele TRX au demonstrat o eficacitate semnificativ mai mare în comparație cu antioxidanții convenționali cu conținut de tiol, inclusiv N-acetilcisteina (NAC), GSH, ditiotretitol, și acidul ascorbic. S-a arătat că o nouă formă amidică de tiol N-acetilcisteina (AD4), forma amidică de NAC, a fost mult mai eficace decât compusul parental în privința efectelor sale antioxidante și protectoare asupra RBC umane supuse stresului oxidative (Grinberg et al., 2005). În studiul nostru, am investigat proprietățile antioxidante ale unui nou compus pe bază de tiol hidrofob (CB3), comparativ cu antioxidantul cunoscut N-acetilcisteina (NAC). Rezultatele noastre furnizează dovezi privind superioritatea CB3 pentru creșterea nivelului de GSH și inhibarea lizei RBC, venind în sprijinul potențialei sale utilizări clinice în tulburările legate de stresul oxidativ.

Pe scurt, stresul oxidativ joacă un rol important în anemiile hemolitice: cu toate că nu reprezintă etiologia principală a acestor boli, acesta contribuie la provocarea deteriorării RBC, iar efectul său poate fi neutralizat prin antioxidanți.

6. CONCLUZII

- ❑ Beta-talasemia este extrem de răspândită în Israel și în Autoritatea Palestiniană. Tratatamentul cu anti-oxidanți scade nivelurile de SRO și ameliorează simptomele clinice asociate cu stresul oxidativ.
- ❑ Citometria de flux, o tehnologie standard în majoritatea laboratoarelor hematologice și imunologice, poate fi utilă pentru măsurarea statusului oxidativ al RBC, trombocitelor și PMN în diverse boli, cum ar fi SCA și talasemia și pentru a studia diverși agenți chimici ca potențiali anti-oxidanți.
- ❑ Prin dezvoltarea precursorilor eritroizi, stresul oxidativ ar putea genera HJ-reticulocite și HJ-RBC și acea externalizare a PS indusă de stresul oxidativ ar putea sta la baza eliminării lor din circulație prin intermediul splinei, un mecanism similar cu cel al eliminării de RBC îmbătrânite (senescente).
- ❑ EPO ar putea atenua simptomele anemiilor hemolitice ca antioxidant.
- ❑ Stresul oxidativ joacă un rol important în patofiziologia HS, care poate fi ameliorată prin antioxidanți, cum ar fi FPP.
- ❑ În hemoliza intravasculară mediată de complement, cum ar fi cazul HNP și AHAI, nici anticorpilor, nici C' nu au indus singuri hemoliza.
- ❑ Peptidele mimetice ale tioredoxinei (TRX), cum ar fi CB3, sunt excelenți candidați potențial pentru tratarea tulburărilor legate de stresul oxidativ.

7. REFERINȚE (selectie)

Amer J, Dana M, Fibach E. *The antioxidant effect of erythropoietin on thalassemic blood cells.* Anemia 2011; 2010(978710).

Amer J, Goldfarb A, Fibach E. *Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal thalassemic red blood cells.* Eur J Haematol. 2003; 70:84–90

Amer J., Goldfarb A., and Fibach E., “*Flow cytometric analysis of the oxidative status of normal and thalassemic red blood cells,*” Cytometry Part A, vol. 60, no. 1, pp. 73–80, 2004

Chan AC, Chow CK and Chiu D “*Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia.*” Proc Soc Exp Biol Med 222(3): 274-82. (1999).

Dana M, Prus E, and Fibach E, “*Thalassemic DNA-Containing Red Blood Cells Are under Oxidative Stress*” Anemia, vol. 2012, pp. 1–5, 2012.

Dertinger S. D., Chen Y., Miller R. K. et al., “*Micronucleated CD71-positive reticulocytes: a blood-based endpoint of cytogenetic damage in humans,*” Mutation Research, vol. 542, no. 1-2, pp. 77–87, 2003.

Droge W “*Free radicals in the physiological control of cell function.*” Physiol Rev 82(1): 47- 95(2002).
Eber S, Lux SE ‘*Hereditary spherocytosis defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer* Semin Hematol 41:118–141(2004)

Eschbach J. W., “*Anemia management in chronic kidney disease: role of factors affecting epoetin responsiveness,* Journal of the American Society of Nephrology, vol. 13, no. 5 pp. 1412–1414, 2002

Eschbach J. W., “*Anemia management in chronic kidney disease: role of factors affecting epoetin responsiveness,* Journal of the American Society of Nephrology, vol. 13, no. 5 pp. 1412–1414, 2002
Fibach E, Rachmilewitz EA ‘*The role of oxidative stress in hemolytic anemia.* Curr Mol Med 7:609–619(2008)

Ghoti H, Fibach E, Dana M, et al. *Oxidative stress contributes to hemolysis in patients with hereditary spherocytosis and can be ameliorated by fermented papaya preparation.* Ann Hematol 90,509-13;2010

Ghoti H, Rosenbaum H, Fibach E, Rachmilewitz EA ‘*Decreased hemolysis following administration of antioxidant fermented papaya preparation (FPP) to a patient with HNP.* Ann Hematol 89:429–430(2010)

Giacco F, Brownlee M, *Oxidative stress and diabetic complications.* Circ Res; 107; 1058-70, (2010).

Grinberg L, Fibach E, Amer J and Atlas D. *N-acetylcysteine amide, a novel cell-permeating thiol, restores cellular glutathione and protects human red blood cells from oxidative stress.* Free Radic Biol Med 38:136-145, (2005).

Halliwell B. *Antioxidant defense mechanisms: from beginning to the end.* Free Radic Biol Med 31:261–272 (1999).

Joyeux-Faure M., “Cellular protection by erythropoietin: new therapeutic implications?” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 323, no. 3, pp. 759–762, 2007.

Katavetin P., Inagi R., Miyata T. et al., “Erythropoietin induces heme oxygenase-1 expression and attenuates oxidative stress,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 359, no. 4, pp. 928–934, 2007.

Kohen R and Nyska A "Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification." *Toxicol Pathol* **30**(6): 620-50,(2002).

Krantz S. B., “Erythropoietin,” *Blood*, vol. 77, no. 3, pp. 419–434, 1991.

Lee KS, Kim SR, Park HS, Park SJ, Min KH, Lee KY, Choe YH, Hong SH, Han HJ, Lee YR, Kim JS, Atlas D and Lee YC. *A novel thiol compound, N-acetylcysteine amide, attenuates allergic airway disease by regulating activation of NF-kappaB and hypoxia-inducible factor-1alpha.* Exp Mol Med 39:756-768, (2007).

Offer T., Bhagat A., Lal A. et al., “Measuring chromosome breaks in patients with thalassemia,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1054, pp. 439–444, 2005.

Rocha S, Rebelo I, Costa LE et al ‘*Protein deficiency balance as a predictor of clinical outcome in hereditary spherocytosis* Eur J Haematol 74:374–380(2005)

Sirchia, G., S. Ferrone, and F. Mercuriale. *The action of two sulfhydryl compounds on normal human red cells. Relationship to red cells of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.* Blood. 25:502-510, 1965.

Wu Y., Shang Y., Sun S. G., Liu R. G., and Yang W. Q., “*Protective effect of erythropoietin against 1-methyl-4- phenylpyridinium- induced neurodegeneration in PC12 cells,*” *Neuroscience Bulletin*, vol. 23, no. 3, pp. 156–164, 2007.

8. LISTA DE PUBLICAȚII

Dana M, Prus E, and Fibach E, “*Thalassemic DNA-Containing Red Blood Cells Are under Oxidative Stress*” *Anemia*, vol. 2012, pp. 1–5, 2012.

Amer J, **Dana M**, Fibach E. *The antioxidant effect of erythropoietin on thalassemic blood cells.* *Anemia* 2011; 2010(978710).

Ghoti H, Fibach E, **Dana M**, et al. *Oxidative stress contributes to hemolysis in patients with hereditary spherocytosis and can be ameliorated by fermented papaya preparation.* *Ann Hematol* 2010; 90(5):509-13

9. ANEXE

Anexa 1. **Dana M**, Prus E, and Fibach E, “*Thalassemic DNA-Containing Red Blood Cells Are under Oxidative Stress*” *Anemia*, vol. 2012, pp. 1–5, 2012.

Anexa 2. Amer J, **Dana M**, Fibach E. *The antioxidant effect of erythropoietin on thalassemic blood cells.* *Anemia* 2011; 2010(978710).

Anexa 3. Ghoti H, Fibach E, **Dana M**, et al. *Oxidative stress contributes to hemolysis in patients with hereditary spherocytosis and can be ameliorated by fermented papaya preparation.* *Ann Hematol* 2010; 90(5):509-13