



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

ΜΔΕ «ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΚΥΣΤΙΔΙΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΙΜΙΑΣ ΣΤΟΝ
ΑΝΘΡΩΠΟ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ευθυμιάδου Διαμάντω (Α.Μ.:225311)

Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων

Επιβλέπουσα:

Καθηγήτρια

Παπασιδέρη Ισιδώρα

ΑΘΗΝΑ 2017

Πίνακας περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	4
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α.: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
A1.: ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ ΑΙΜΑ	9
A1.1.: Τα Λευκά Αιμοσφαίρια	9
A1.2.: Τα Αιμοπετάλια	11
A1.3.: Τα Ερυθρά Αιμοσφαίρια	12
A.2.: ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΕΡΥΘΡΟΠΤΩΣΗ	20
A.3.: ΓΗΡΑΝΣΗ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	21
A.3.1.: Έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης	22
A.4.: ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ	23
A.5.: ΚΥΣΤΙΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	26
A.5.1.: Γενικά	26
A.5.2.: Κυστιδιοποίηση ερυθροκυττάρων.....	29
A.5.3.: Κυστιδιοποίηση και παθολογικές καταστάσεις.....	29
A.6.: ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	31
A.6.1.: Εξωκυτταρικά κυστίδια και Νεφρική Ανεπάρκεια.....	32
A.6.2.: Επίδραση της αιμοδιαδιήθησης (ΑΔΔ) στο αίμα ασθενών με ΧΝΑ	33
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β.: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	35
B.1.: ΎΡΓΑΝΑ – ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	35
Ασθενείς	36
B.2.: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΣΤΙΔΙΩΝ	36
B.2.1.: Μέτρηση των επιπέδων κυστιδιοποίησης με κυτταρομετρία ροής.....	37
Αρχή μεθόδου	37

Στατιστική επεξεργασία	39
Γ.: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	44
Δ.: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ – REFERENCES.....	49

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του ΜΔΕ «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» στο Εργαστήριο Αιματολογίας και Αιμοδοσίας του Τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων του ΤΕΙ Αθήνας σε συνεργασία με τον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα αρχικά, να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα μου και Διευθύντρια του ΜΔΕ Καθηγήτρια κα Παπασιδέρη Ισιδώρα για την στήριξη και βοήθεια που μου παρείχε για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Κριεμπάρδη Αναστάσιο για τη στήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, για όλες τις γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσε και για την σημαντική του βοήθειά στην συγγραφή αυτής της εργασίας.

Επίσης, ευχαριστίες οφείλω στην Επίκουρη Καθηγήτρια Αντωνέλου Μαριάννα για τη συνεργασία της και τις συμβουλές της σε όλα τα επίπεδα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους δικούς μου ανθρώπους για την συμπαράσταση και στήριξη σε όλο το διάστημα της μεταπτυχιακής μου φοίτησης που με βοήθησαν να καταφέρω να πραγματοποιήσω τα όνειρα και τους στόχους μου.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

NF – E2	Nuclear Factor - Erythroid 2
HbA	(Haemoglobin A) Αιμοσφαιρίνη A
KCl	Potassium Chloride- Χλωριούχο κάλιο
Ca²⁺	Κατιόντα ασβεστίου
G6PD	Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης
PS	Φωσφατιδυλοσερίνη
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
2,3 DPG	2,3 Διφωσφογλυκερικό
XNA	Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια
HSP-70	Heat Shock Protein – 70 (chaperon)
AIK	Αιμοκάθαρση
CD235	Αντίσωμα έναντι γλυκοφορίνης A
CD47	“Δείκτης εαυτού” - Ιντεγκρίνη
HDF	Αιμοδιαδιήθηση
cHD	Συμβατική Αιμοκάθαρση
GLUT -1	Μεταφορέας γλυκόζης
GSH	Γλουταθειόνη
ESRD	Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια Τελικού Σταδίου
ROS	(Reactive Oxygen Species) Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου
RBCs	Ερυθρά Αιμοσφαίρια

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αιμοδιαδιήθηση (ΑΔΔ) είναι μια θεραπευτική μέθοδος αναπλήρωσης της νεφρικής λειτουργίας, η οποία στηρίζεται στο φαινόμενο της διάχυσης και μεταφοράς των ουραιμικών τοξινών με σκοπό την εξάλειψή τους. Σημαντικός και ολοένα αυξανόμενος αριθμός ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ) τελικού σταδίου υποβάλλονται σε θεραπεία με αιμοδιαδιήθηση, ακόμα και ελλείπει τεκμηριωμένων δεδομένων που αφορούν την επιβίωση και την παρουσία αναιμίας σε σχέση με τη συμβατική αιμοκάθαρση. Όμως, οι επιπτώσεις στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων δεν έχουν ακόμα εξεταστεί εις βάθος. Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε σύγκριση ασθενών με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια (ΧΝΑ) που υποβλήθηκαν σε αιμοδιαδιήθηση και συμβατική αιμοκάθαρση αντίστοιχα, με σκοπό την έρευνα και τον σχολιασμό παραμέτρων που σχετίζονται άμεσα με τα ερυθροκύτταρα, όπως η κυστιδιοποίηση και η αναιμία τόσο πριν όσο και μετά την κάθε συνεδρία. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν παθολογική συσσώρευση των ολικών κυστιδίων (MV) και των κυστιδίων ερυθροκυτταρικής προέλευσης (R-MV). Μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, ο συνολικός πληθυσμός κυστιδίων μειώθηκε στα φυσιολογικά επίπεδα, ενώ τα κυστίδια που προέρχονται από ερυθροκύτταρα παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα. Η συσσώρευση των μικροκυστιδίων που εμπλέκεται σε θέματα φλεγμονής και πήξης σε ασθενείς με ουραιμικό προφίλ επιφέρει μεταβολές που είναι ενδεικτικές μεταβολικού και πιθανότατα οξειδωτικού στρες.

Λέξεις – κλειδιά: Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, αιμοδιαδιήθηση, αιμοκάθαρση, αναιμία, ερυθρά αιμοσφαίρια, οξειδωτικό στρες, κυστίδια.

ABSTRACT

Hemodiafiltration (HDF) is a method of renal therapy, which utilizes the principles of diffusion and convection of the uremic toxins in order to eliminate them. A rapidly increasing number of patients with end stage renal disease (ESRD) are treated by HDF, in spite of absence of data supporting a beneficial clinical effect on survival over conventional hemodialysis (cHD). However, the effects of HDF on red blood cell (RBC) features have not been examined in depth. In this study, patients under HDF or cHD treatments were examined for RBC-related parameters, including anemia and accumulation of microvesicles (MVs), in repeated measurements before and after sessions. Flow cytometry analysis in uremic plasma showed abnormal accumulation of total MVs and MVs of RBC-origin (R-MVs) shortly before sessions. At the end of the treatments, the total MVs population decreased to normal in both groups under investigation, while the R-MVs remained at high levels. In a ground of anemia and uremia, MVs accumulation might be clinical relevant in ESRD, in respect to inflammation and coagulation issues.

Key words: End stage renal disease, haemodiafiltration, haemodialysis, anemia, red blood cells, oxidative stress, microvesicles.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α.: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A1.: ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ ΑΙΜΑ

Το αίμα είναι υγρός ιστός που επιτελεί τη διαδικασία της μεταφοράς οξυγόνου αλλά και άλλων ουσιών σε όλο τον οργανισμό μέσω της φλεβικής, αρτηριακής και λεμφικής κυκλοφορίας. Το αίμα αποτελείται από τρεις τύπους κυττάρων:

1. Τα λευκά αιμοσφαίρια ή λευκοκύτταρα
2. Τα αιμοπετάλια ή θρομβοκύτταρα
3. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια ή ερυθροκύτταρα

A1.1.: Τα Λευκά Αιμοσφαίρια

Τα λευκά αιμοσφαίρια αποτελούν το κυτταρικό σκέλος του ανοσολογικού συστήματος. Συνδυαζόμενα με μόρια και ουσίες επιτελούν εξειδικευμένες διαδικασίες για την άμυνα του οργανισμού. Τα λευκά αιμοσφαίρια αποτελούνται από τα εξής επιμέρους κύτταρα, εκ' των οποίων στην αιματική κυκλοφορία βρίσκονται τα:

- ✓ Λεμφοκύτταρα (Τ-λεμφοκύτταρα και Β-λεμφοκύτταρα)
- ✓ Πολυμορφοπύρρηνα (Ουδετερόφιλα, Βασεόφιλα, Ηωσινόφιλα)
- ✓ Μονοκύτταρα

Ενώ στους επιμέρους ιστούς εναποτίθενται τα εξής:

- ✓ Μακροφάγα
- ✓ Μαστοκύτταρα
- ✓ Δενδριτικά

Το ανοσολογικό σύστημα αποτελείται από ένα σύνολο πολύπλοκων μηχανισμών με σκοπό την καταστροφή και θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών στους οποίους εκτίθεται ο οργανισμός είτε από το εξωτερικό περιβάλλον είτε από τον ίδιο τον οργανισμό. Οι κύριοι τύποι αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η φυσική ανοσία η οποία λειτουργεί πάντα με τον ίδιο τρόπο ανεξάρτητα με το είδος και την συχνότητα εισαγωγής ενός παθογόνου μικροοργανισμού στο ανθρώπινο σώμα και την έκθεσή του σε αυτό και η επίκτητη ανοσία, η οποία εξελίσσεται και βελτιώνεται με την επαναλαμβανόμενη προσβολή του οργανισμού από συγκεκριμένο παθογόνο. [1, 2]

Η φυσική ανοσία ενεργοποιεί και κινητοποιεί τα φαγοκύτταρα τα οποία αποτελούνται από τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, τα κύτταρα που εκκρίνουν ουσίες που συμμετέχουν στην καταπολέμηση της φλεγμονής όπως τα βασεόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, τα ηωσινόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, τα μαστοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK - natural killers). [3, 4, 5] Κάποια ακόμα συστατικά που συμμετέχουν στην κυτταρική ανοσία είναι οι κυτταροκίνες, οι ιντερφερόνες και το συμπλήρωμα. [6, 7]

Η επίκτητη ανοσία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή και κινητοποίηση των λεμφοκυττάρων, και συγκεκριμένα των ειδικών για κάθε αντιγόνο Β-λεμφοκυττάρων και Τ-λεμφοκυττάρων αλλά και για την ενεργοποίηση των αντίστοιχων ανοσοσφαιρινών με σκοπό την θανάτωση των παθογόνων. Η επίκτητη ανοσία ενεργοποιείται από την έκθεση του οργανισμού σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο και την αναγνώρισή του η οποία πραγματοποιείται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά επεξεργάζονται τα αντιγόνα στο κυτταρόπλασμά τους και εν συνεχεία τα «παρουσιάζουν» στη μεμβράνη τους με σκοπό τον πολλαπλασιασμό των Τ και Β λεμφοκυττάρων τα οποία είναι ειδικά για το συγκεκριμένο παθογόνο. Τα Β-λεμφοκύτταρα, υποβοηθούμενα από τα Τ-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούν την έκκριση των ανοσοσφαιρινών που θα αντιμετωπίσουν τον παθογόνο μικροοργανισμό. [8]

A.1.2.: Τα Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια ονομάζονται και αλλιώς θρομβοκύτταρα διότι συμβάλλουν στην πήξη του αίματος, κοινώς την δημιουργία θρόμβου με σκοπό την εξασφάλιση της αιμόστασης. Η αιμόσταση περιλαμβάνει την ακεραιότητα των αγγείων του αίματος και την ταχεία διακοπή της αιμορραγίας σε περίπτωση τραυματισμού των αγγείων. Τα αιμοπετάλια βρίσκονται στο αίμα σε συγκέντρωση $250-300 \times 10^9 / \text{lt}$, έχουν δισκοειδές σχήμα που οφείλεται στο εσωτερικό του σκελετού τους ο οποίος αποτελείται από σπεκτρίνη, ακτίνη και τουμπουλίνη και προέρχονται από την θραύση των μεγακαρυοκυττάρων κατά την διαδικασία της αιμοποίησης. [9, 10] Τα αιμοπετάλια εξελικτικά αποτελούν κυτταρικά υπολείμματα που υπάρχουν σε όλα τα θηλαστικά και προφυλάσσουν από την αιμορραγία, ζουν στην αιματική κυκλοφορία για περίπου 7 ημέρες ενώ ένας αριθμός της τάξης των 10^{10} αιμοπεταλίων παράγεται καθημερινά για τις ανάγκες ενός ενήλικου οργανισμού. Τα μικρά αυτά κυτταρικά θραύσματα ωθούνται από την κυκλοφορία του αίματος στην περιοχή της επιφάνειας του ενδοθηλίου οπότε σχηματίζεται μια στενή σχέση μεταξύ του τοιχώματος των αγγείων και των αιμοπεταλίων ενώ κατά την διαδικασία της παραγωγής τους από τα μεγακαρυοκύτταρα, εμπλουτίζονται με κυτταρικά συστατικά που είναι εξειδικευμένα για την επιτέλεση της αιμοστατικής τους λειτουργίας. [9, 10]

Για την δημιουργία και την παραγωγή των αιμοπεταλίων υπεύθυνα είναι τα μεγακαρυοκύτταρα που βρίσκονται στον μυελό των οστών, το κέντρο της αιμοποίησης. Μέσα από μια σειρά αντιδράσεων διαφοροποίησης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, σχηματίζεται η προμεγακαρυοβλάστη, η μεγακαρυοβλάστη και το ώριμο μεγακαρυοκύτταρο το οποίο απελευθερώνει τα αιμοπετάλια στην κυκλοφορία του αίματος. [10] Στο τέλος του σταδίου της ωρίμανσής τους, τα ώριμα μεγακαρυοκύτταρα ολοκληρώνουν την κυτταροπλασματική τους ωρίμανση παράγοντας αιμοπετάλια μέσω σχηματισμού ψευδοποδίων, τα οποία περιέχουν όλα τα συστατικά των ώριμων αιμοπεταλίων

και για αυτό το λόγο και ονομάζονται «προαιμοπετάλια». Τα «προαιμοπετάλια» απελευθερώνονται από το περιβάλλον του μεγακαρυοκυττάρου μετά από συστολή της βάσης της δομής τους και συγκεκριμένα της δομής των ψευδοποδίων και στη συνέχεια μπορούν να υποστούν περαιτέρω κατάτμηση ώστε να δημιουργηθούν τα αιμοπετάλια στην αιματική κυκλοφορία. Όλο αυτό το σύστημα είναι κάτω από την ρύθμιση του αυξητικού παράγοντα Nuclear Factor – Erythroid 2 (*NF-E₂*) αλλά και κάτω από την επίβλεψη της διαδικασίας ενεργοποίησης της αποπτωτικής οδού των κασπασών (εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης). Ως εκ τούτου, τα υπολείμματα του κυτταροπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων, καθώς και ο πυρήνας τους αναγνωρίζονται ως κύτταρα που έχουν υποστεί απόπτωση και ενεργοποιείται η διαδικασία της φαγοκυττάρωσής τους μετά την απελευθέρωση των «προαιμοπεταλίων» στην αιματική κυκλοφορία. [10, 11]

A.1.3.: Τα Ερυθρά Αιμοσφαίρια

Η φυσιολογία, η δομή και οι λειτουργίες των ερυθροκυττάρων αναλύονται διεξοδικά σε αυτό το κεφάλαιο γιατί η γνώση της φυσιολογικής αιμόστασης του ερυθρού αιμοσφαιρίου αποτελεί την βάση για την κατανόηση πολλών παθολογικών καταστάσεων όπως είναι και οι αναιμίες.

A.1.3.1: Γενικά χαρακτηριστικά

Τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια που κυκλοφορούν στο αίμα είναι προϊόντα διαφοροποίησης των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων, μια διαδικασία ωρίμανσης που λαμβάνει χώρα στον μυελό των οστών. Η δέσμευση προς την ερυθρά σειρά επιφέρει σταδιακά μεγαλύτερη ευαισθησία στις δράσεις της ερυθροποιητίνης. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι κύτταρα με υψηλή ειδικότητα και η βασική τους λειτουργία είναι η μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς και η μεταφορά διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς στον πνεύμονα προς αποβολή του με την διαδικασία της εκπνοής. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή

ως ανταλλαγή αναπνευστικών αερίων και οφείλεται στην αιμοσφαιρίνη, μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στο εσωτερικό των ερυθροκυττάρων. [11, 12, 13]

Τα ώριμα ερυθροκύτταρα διαθέτουν ιδιαίτερες μηχανικές ιδιότητες στις οποίες οφείλεται η μεγάλη ικανότητα αντοχής στις πολύ υψηλές πιέσεις της ροής του αίματος στις οποίες υπόκεινται κατά την κυκλοφορία τους εντός των αγγείων. Τα ερυθροκύτταρα δε διαθέτουν πυρήνα ενώ έχουν σχήμα αμφίκουλου δίσκου που τους προσδίδει αυτήν την αξιοσημείωτη ικανότητα παραμόρφωσης με σκοπό την εξασφάλιση των απαραίτητων αλλαγών σχήματος και της βέλτιστης μετακίνησής τους μέσω της μικροκυκλοφορίας. Υπολογίζεται ότι η παραμόρφωση των ερυθροκυττάρων λόγω του ιδιαίτερου σχήματός τους επιτρέπει την διέλευσή τους διαμέσου των αγγείων με μέγιστη διάμετρο σχεδόν 4μm. [14, 15] Τέλος, αξιοσημείωτο είναι ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια παρόλο που είναι απύρρηνα κύτταρα και απουσιάζουν όλα τα κυτταρικά οργανίδια επιζούν στην κυκλοφορία περίπου 120 ημέρες. [16, 17]

Σε κατάσταση ένδειας οργανιδίων όπως τα ριβοσώματα τα οποία επιτελούν τη μεταγραφή πρωτεϊνών ή τα μιτοχόνδρια που προωθούν τον αερόβιο μεταβολισμό για την παραγωγή ενέργειας, τα ερυθροκύτταρα ανταποκρίνονται άριστα στις απαιτήσεις της κυκλοφορίας, της ανταλλαγής αερίων αλλά και της παραμορφωσιμότητας. [18] Η επιτέλεση όλων αυτών των λειτουργιών αλλά και η επιβίωσή τους στο εχθρικό περιβάλλον της αιματικής κυκλοφορίας έγκειται στην δομή της κυτταρικής μεμβράνης και τη διαλυτή μορφή της αιμοσφαιρίνης στο κυτοσόλιο του κυττάρου. [19]

A.1.3.2.: Η Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στο εσωτερικό των ερυθροκυττάρων και αποτελεί το 90% του βάρους τους ενώ ήταν μια από τις πρώτες πρωτεΐνες της οποίας προσδιορίστηκε η δομή της. Αυτή η πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την αποτελεσματική μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς ενώ επίσης συμβάλλει στην μεταφορά του διοξειδίου του άνθρακα και των ιόντων υδρογόνου στους πνεύμονες προς αποβολή. [20]

Η ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη είναι ένα σύμπλοκο τεσσάρων υπομονάδων και πιο συγκεκριμένα απαρτίζεται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δυο πανομοιότυπες α αλυσίδες και δυο πανομοιότυπες β αλυσίδες. Το τετραμερές της αιμοσφαιρίνης που αναφέρεται ως αιμοσφαιρίνη Α (HbA) περιγράφεται καλύτερα ως ένα ζεύγος πανομοιότυπων διμερών $\alpha_2\beta_2$. Η αιμοσφαιρίνη απαντάται ως δεοξυαιμοσφαιρίνη ή ως οξυαιμοσφαιρίνη ανάλογα με το αν δεσμεύει η όχι το οξυγόνο.

Η ικανότητα της αιμοσφαιρίνης να προσδένει οξυγόνο εξαρτάται από την παρουσία μιας δεσμευμένης προσθετικής ομάδας, της αίμης η οποία βρίσκεται στο εσωτερικό καθεμίας από τις τέσσερις υπομονάδες της. Η ομάδα της αίμης είναι υπεύθυνη για το κόκκινο χρώμα του αίματος και αποτελείται από ένα οργανικό συστατικό και ένα κεντρικό άτομο σιδήρου. Το οργανικό συστατικό είναι η πρωτοπορφυρίνη η οποία απαρτίζεται από τέσσερις πυρρολικούς δακτυλίους οι οποίοι είναι ενωμένοι με μεθινικές γέφυρες για να σχηματιστεί ο τετραπυρρολικός δακτύλιος.

Ο τετραπυρρολικός δακτύλιος είναι ενωμένος με τέσσερις μεθυλικές ομάδες, δυο βινυλικές ομάδες και δυο προπιονικές ομάδες ενώ στο κέντρο της πρωτοπορφυρίνης βρίσκεται ένα άτομο σιδήρου ενωμένο με τα τέσσερα πυρρολικά άτομα αζώτου των δακτυλίων. Αν και ο σίδηρος στην αιμοσφαιρίνη μπορεί να βρίσκεται σε δισθενή (Fe^{2+}) ή και τρισθενή (Fe^{3+}) κατάσταση οξείδωσης, μόνο στην δισθενή κατάσταση (Fe^{2+}) έχει την ικανότητα δέσμευσης οξυγόνου. Το ιόν του σιδήρου μπορεί να σχηματίσει δυο επιπρόσθετους δεσμούς, έναν σε κάθε πλευρά του επιπέδου της αίμης. Αυτές οι θέσεις ονομάζονται πέμπτη και έκτη θέση συναρμογής. Το οξυγόνο συνδέεται στην έκτη θέση συναρμογής στον σίδηρο της αίμης της αιμοσφαιρίνης. [20, 21]

Η αιμοσφαιρίνη, για να απελευθερώσει οξυγόνο εκεί όπου η ανάγκη είναι μεγαλύτερη, έχει εξελιχθεί ώστε να ανταποκρίνεται σε υψηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων συγκεκριμένων μορίων που λειτουργούν ως αλλοστερικοί τελεστές της, προσδένονται σε διαφορετικές θέσεις της και είναι οι εξής:

1) Οξυγόνο:

Το οξυγόνο όπως έχει προαναφερθεί προσδένεται στην έκτη θέση συναρμογής στον σίδηρο της αίμης από τους πνεύμονες όπου η μερική πίεσή (pO_2) του είναι ελαττωμένη και ευνοείται η δέσμευσή του προς τους ιστούς όπου η μερική πίεσή (pO_2) του είναι αυξημένη και ευνοείται η απελευθέρωσή του.

2) Διοξείδιο του άνθρακα:

Το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) προσδένεται στα αμινοτελικά άκρα των τεσσάρων υπομονάδων της αιμοσφαιρίνης και είναι σε αυξημένη συγκέντρωση στους ιστούς λειτουργώντας ως σήμα για την αιμοσφαιρίνη για να απελευθερώσει οξυγόνο στους ιστούς όπου οι ανάγκες είναι αυξημένες.

3) Ιόντα υδρογόνου:

Τα ιόντα υδρογόνου (H^+) προσδένονται στα κατάλοιπα των αμινοξέων των πλευρικών αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης. Καθώς η αιμοσφαιρίνη μετακινείται σε περιοχές με υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων υδρογόνου, αυξάνεται η τάση της για απελευθέρωση οξυγόνου και αυτό συμβαίνει στους ιστούς ενώ στους πνεύμονες όπου υπάρχουν χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων υδρογόνου, αυξάνεται η τάση της αιμοσφαιρίνης για δέσμευση οξυγόνου.

4) 2,3 Διφωσφογλυκερικό:

Το 2,3 διφωσφογλυκερικό προσδένεται σε μια θήκη, στο διάκενο στο κέντρο του τετραμερούς της αιμοσφαιρίνης. Παρουσία του 2,3 διφωσφογλυκερικού πρέπει να καταληφθούν περισσότερες θέσεις δέσμευσης οξυγόνου μέσα στο τετραμερές της αιμοσφαιρίνης κι έτσι η αιμοσφαιρίνη παραμένει σε χαμηλότερη συγγένεια με το οξυγόνο έως ότου επιτευχθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις οξυγόνου.

A.1.3.3.: Κυτταρική μεμβράνη

Η κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι μια χιονοστιβάδα φωσφολιπιδίων εμπλουτισμένη με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που βρίσκονται σε σύνδεση με έναν υπομεμβρανικό σκελετό σπεκτρίνης-ακτίνης είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες από τις λειτουργίες τους αλλά και τις μηχανικές ιδιότητες και αντοχές τους. Άλλες πολύ σημαντικές λειτουργίες της ερυθροκυτταρικής

μεμβράνης είναι η μεταβίβαση σήματος, η ισχυρή αντιγονική δράση και η μεταφορά ουσιών εντός και εκτός της μεμβράνης. [25] Πολλές από τις δυσλειτουργίες των ερυθροκυττάρων σε διάφορους τύπους ασθενειών οφείλονται σε ελλείμματα ή κωλύματα στην σύνθεση και την δομή της κυτταρικής τους μεμβράνης.

Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι υπεύθυνη για την διατήρηση του σχήματος του αμφίκιουλου δίσκου των ερυθρών αιμοσφαιρίων αλλά και για την αναστρέψιμη ικανότητα παραμόρφωσης. Αυτά καθορίζονται από τους εξής παράγοντες:

- α)** Λιπιδική σύσταση της μεμβρανικής διπλοστιβάδας
- β)** Σύσταση πρωτεϊνών μεμβρανικού κυτταροσκελετού και αλληλεπιδράσεις του
- γ)** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και λιπιδίων στην κυτταρική μεμβράνη
- δ)** Βαθμός και επίπεδο ενυδάτωσης κυττάρου
- ε)** Ιοντική σύσταση κυτταρικής μεμβράνης
- στ)** Ωσμωτική ισορροπία του εσωτερικού περιβάλλοντος
- ζ)** Συγκέντρωση και διαλυτότητα αιμοσφαιρίνης στο εσωτερικό του κυττάρου

Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη αποτελείται από την χαρακτηριστική διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων, τις εσωτερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες και τον κυτταροσκελετό που είναι υπομεμβρανικός. [26, 27] Πρόκειται για ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών και διφωσφολιπιδίων που αποτελείται κατά 53% από πρωτεΐνες, 39% από λιπίδια και 8% από σάκχαρα ενώ η εσωτερική της πλευρά είναι επενδυμένη με ένα δίκτυο πρωτεϊνών που την στηρίζουν και τις προσδίδουν τις μοναδικές μηχανικές της ιδιότητες.

Ένα πολύ μεγάλο μέρος της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης αποτελείται από χοληστερόλη η οποία επηρεάζει άμεσα το μέγεθος και την επιφάνεια του ερυθροκυττάρου ενώ είναι υπεύθυνη για την ρευστότητα της μεμβράνης και την παθητική διαπερατότητά της σε κατίοντα. Το υπόλοιπο μέρος της κυτταρικής

μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελείται από λιπίδια και συγκεκριμένα φωσφολιπίδια, ελεύθερα λιπίδια και γλυκολιπίδια. Αύξηση της αναλογίας χοληστερόλης / φωσφολιπιδίων στην μεμβράνη μειώνει την ρευστότητά της ενώ μείωση της αναλογίας χοληστερόλης / φωσφολιπιδίων αυξάνει την ρευστότητα της μεμβράνης. Διαταραχές στη συγκέντρωση της χοληστερόλης εξισορροπούνται με άλλα λιπίδια. [27]

Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη περιέχει διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που συμπεριλαμβάνονται στην μεταγωγή σήματος και την μετακίνηση ουσιών. Αυτές οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τις γλυκοφορίνες και την πρωτεΐνη ζώνη - 3. Η εξωκυττάρια μεμβράνη των μεμβρανικών γλυκοφορινών είναι γλυκοζυλιωμένη και φέρει ερυθροκυτταρικά αντιγόνα ενώ στην κυκλοφορία του αίματος τα ερυθρά αιμοσφαίρια απωθούνται μεταξύ τους λόγω του ισχυρού αρνητικού φορτίου που υπάρχει στην εξωτερική τους μεμβράνη λόγω καρβοξυλικών ομάδων του σιαλικού οξέος που βρίσκεται συνδεδεμένο στις γλυκοφορίνες. Αυτές οι δυο πρωτεΐνες, η γλυκοφορίνη και η πρωτεΐνη ζώνη - 3 είναι σημαντικές για την πρόσδεση του μεμβρανικού σκελετού στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης ή αλλιώς την ενδοκυττάρια πλευρά. [19, 28]

Ο σκελετός της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αποτελείται από ένα σύνολο δομικών πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τις εξής πρωτεΐνες:

- Σπεκτρίνη α
- Σπεκτρίνη β
- Ακτίνη
- Αγκυρίνη
- Πρωτεΐνη 4.1
- Πρωτεΐνη 4.2
- Αδουσίνη
- Πρωτεΐνη 4.9
- Τροπομυοσίνη κ.α.

Ο μεμβρανικός κυτταροσκελετός και οι πρωτεΐνες από τις οποίες αποτελείται αλληλεπιδρούν με τα λιπίδια της διπλοστιβάδας αλλά και με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να προσδίδουν σταθερότητα, μηχανική ισχύ και ακεραιότητα στην κυτταρική μεμβράνη. Επίσης, το δίκτυο αυτό των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού διαπλεκόμενο μεταξύ τους, ενισχύει την εσωτερική επιφάνεια της διπλοστιβάδας λιπιδίων. Μόρια πρωτεΐνης α-σπεκτρίνης και β-σπεκτρίνης αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν ετεροδιμερή τα οποία συνδέονται ξανά μεταξύ τους σχηματίζοντας τετραμερή. Τα τετραμερή της σπεκτρίνης συνδέονται με την αγκυρίνη και μέσω αυτής με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Η πρωτεΐνη 4.2 συνδέεται με την πρωτεΐνη ζώνη 3 της κυτταρικής μεμβράνης ενισχύοντας την αλληλεπίδραση της αγκυρίνης ενώ οι γωνίες των δομών του κυτταροσκελετού σχηματίζονται από ενωτικά συμπλέγματα τα οποία αποτελούνται κυρίως από σπεκτρίνη, ινίδια ακτίνης και τροπομυοσίνης καθώς και πρωτεΐνες 4.1, 4.9 και αδουσίνη. [31]

Οι πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού δεν είναι στατικές αλλά βρίσκονται σε διαρκή ισορροπία σύνδεσης-αποσύνδεσης τόσο μεταξύ τους όσο και με τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια της κυτταροπλασματικής πλευράς της διπλοστιβάδας ενώ αυτή η ισορροπία επηρεάζεται από φυσικά ή χημικά ερεθίσματα. Διαταραχές της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνικών συστατικών του κυτταροσκελετού και της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης σε οποιοδήποτε σημείο είναι πολύ πιθανό να οδηγήσουν σε απώλεια της δομικής και λειτουργικής σταθερότητας και ακεραιότητας της μεμβράνης. [32, 33]

A.1.3.4.: Μεταβολικές οδοί

Όπως ισχύει για όλα τα κύτταρα, έτσι και για τα ερυθροκύτταρα είναι απαραίτητη η κατανάλωση ενέργειας για την επίτευξη των λειτουργιών τους. Η ενέργεια αυτή χρησιμοποιείται από το ερυθροκύτταρα για την διατήρηση του σιδήρου της αιμοσφαιρίνης σε δισθενή μορφή (Fe^{2+}), την σταθερότητα του σχήματος του αμφίκιουλου δίσκου που τους προσδίδει την ικανότητα παραμόρφωσης, καθώς και τη διατήρηση υψηλής συγκέντρωσης καλίου και

χαμηλής συγκέντρωσης ασβεστίου και νατρίου εντός του κυττάρου μέσω της φυσιολογικής λειτουργίας της αντλίας ιόντων της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Σφαιροκύτταρα μπορεί να σχηματιστούν όταν υπάρχει διαταραχή στην παροχή ενέργειας και τα ερυθροκύτταρα χάνουν το φυσιολογικό σχήμα του αμφίκιουλου δίσκου με αποτέλεσμα ή να απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος ή να κυκλοφορούν αλλά να καθίστανται μη λειτουργικά χάνοντας την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου στους ιστούς. [33]

Τα ερυθροκύτταρα, μετά τα κύτταρα του εγκεφάλου, είναι κυρίως τα κύτταρα που χρησιμοποιούν αποκλειστικά γλυκόζη για την παροχή ενέργειας. Η χρησιμοποίηση μόνο της αναερόβιας γλυκόλυσης από τα ερυθρά αιμοσφαίρια συμβαίνει γιατί είναι απύρρηνα κύτταρα, χωρίς κυτταρικά οργανίδια και μεγάλη πολυπλοκότητα βιολογικών διεργασιών. Τα ερυθροκύτταρα μεταβολίζουν τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό μέσω της αναερόβιας πορείας της γλυκόλυσης που ονομάζεται και οδός Embden-Meyerhof. Ακολούθως, το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε γαλακτικό μέσω της δράσης της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Από όλη την γλυκολυτική πορεία παράγονται δύο μόρια ATP τα οποία καταναλώνονται για την πραγματοποίηση των λειτουργιών των ερυθροκυττάρων. Ένα από τα ενδιάμεσα προϊόντα της αναερόβιας γλυκόλυσης είναι η 6-φωσφορική γλυκόζη η οποία αποτελεί το υπόστρωμα για την δράση της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης - (G-6-PD). Το ένζυμο αυτό φαίνεται να ελέγχει την πορεία των φωσφορικών πεντοζών μέσω της οποίας πραγματοποιείται η αναγωγή της γλουταθειόνης. Η «ανοιγμένη» γλουταθειόνη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων με κυριότερη λειτουργία της την προστασία των ερυθροκυττάρων από το οξειδωτικό στρες. [34]

A.2.: ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΕΡΥΘΡΟΠΤΩΣΗ

Η ερυθρόπτωση είναι μια διαδικασία αντίστοιχη της απόπτωσης των εμπύρηνων κυττάρων που παρατηρείται στα ερυθρά αιμοσφαίρια και ενεργοποιείται όταν αυτά βρίσκονται σε καταστάσεις στρες (π.χ. οξειδωτικού, οσμωτικού στρες). Χαρακτηριστικό αυτής της διαδικασίας αποτελεί η αύξηση των επιπέδων των ιόντων ασβεστίου στο κυτοσόλιο. Ουσιαστικά, ο οργανισμός αυτοπροστατεύεται από αιμολυτικά φαινόμενα μιας και η αιμοσφαιρίνη είναι τοξική για εκείνον εάν κυκλοφορεί ελεύθερη (μη-δεσμευμένη σε άλλες πρωτεΐνες) σε μεγάλες ποσότητες. [57]

Κατά την ερυθρόπτωση ένα πλήθος μονοπατιών λαμβάνει χώρα στο εσωτερικό του ερυθροκυττάρου. Μερικοί από τους σηματοδοτικούς παράγοντες (signaling factors) που συμμετέχουν είναι οι κασπάσες και πολλές κινάσες όπως η Janus - ενεργοποιούμενη κινάση 3, η AMP -εξαρτώμενη κινάση, η cGMP - εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση, η κινάση της 1α καζεΐνης, η p38 κινάση, η πρωτεϊνική κινάση C και η p21-ενεργοποιούμενη κινάση. [57]

Η ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών έχει ως αποτέλεσμα πολλές αλλαγές σε κυτταρικό κυρίως επίπεδο.

Οι κυριότερες από τις μεταβολές αυτές που έχουν παρατηρηθεί είναι:

- ✓ Αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα Ca^{2+} .
- ✓ Μείωση του όγκου του ερυθροκυττάρου (συρρίκνωση) λόγω απώλειας ιόντων KCl.
- ✓ Κυστιδιοποίηση της μεμβράνης
- ✓ Εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και
- ✓ Αυξημένη ποσότητα κεραμιδίου στη λιπιδιακή διπλοστιβάδα.

Η αύξηση της ποσότητας του ασβεστίου στο κυτοσόλιο οδηγεί στην ενεργοποίηση των ασβεστιοεξαρτώμενων καναλιών της μεμβράνης (Gardos) και κατά συνέπεια στην απώλεια ιόντων KCl και τη συρρίκνωση του ερυθροκυττάρου.

Ο υπομεμβρανικός σκελετός αποδιοργανώνεται και η μεμβράνη αρχίζει να κυστιδιοποιείται εξωτερικεύοντας παράλληλα την φωσφατιδυλοσερίνη λόγω ενεργοποίησης της ασβεστιο-εξαρτώμενης σκραμπλάσης. [56]

A.3.: ΓΗΡΑΝΣΗ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η επιβίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην αιματική κυκλοφορία διαρκεί 115 έως 120 ημέρες από την έξοδο των δικτυοερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος μέχρι την απομάκρυνση των γηρασμένων πια ερυθροκυττάρων από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα κυρίως του σπλήνα και δευτερευόντως του ήπατος. [4] Οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί για την γήρανση και τελικά την καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων, εκτός της κυστιδιοποίησης που θα περιγραφεί αναλυτικά παρακάτω, είναι οι εξής: [55]

α) Ελάττωση της παραμορφωσιμότητας

Η φυσιολογική επιφάνεια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης είναι περίπου 150μm και χάρη σε αυτήν τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν ικανότητα παραμόρφωσης. Κατά την διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων, η κυτταρική τους μεμβράνη υφίσταται προοδευτικές αλλοιώσεις σαν αποτέλεσμα της επίδρασης των ελεύθερων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν αλλαγή στο σχήμα της μεμβράνης με το κυριότερο να είναι η μετατροπή των ερυθροκυττάρων σε σφαιροκύτταρα. [34] Οι αλλοιώσεις αυτές αναγνωρίζονται από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και οδηγούν τα ερυθροκύτταρα στον σπλήνα για να επιτελεστεί η λειτουργία της φαγοκυττάρωσης και τελικά απομάκρυνσης από την κυκλοφορία του αίματος.

β) Μείωση αντιοξειδωτικών ενζύμων

Η συγκέντρωση των απαραίτητων ενζύμων με σκοπό την επιτέλεση των μεταβολικών πορειών και της προστασίας των ερυθρών αιμοσφαιρίων από την οξειδωτική βλάβη ελαττώνεται σταδιακά καθώς τα ερυθροκύτταρα διανύουν τη ζωή τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την διαταραχή και την ελαττωματική λειτουργία των διεργασιών που απαιτούνται για την παραγωγή ενέργειας αλλά και

τη βλάβη των ερυθροκυττάρων λόγω οξειδωτικού στρες. Για παράδειγμα, η προοδευτική μείωση της συγκέντρωσης του ενζύμου G-6-PD που αναφέρθηκε παραπάνω, η οποία συνοδεύει τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα, προκαλεί ελλιπή αντιοξειδωτική ικανότητα και τελικά οξείδωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών, λιπιδίων και αιμοσφαιρίνης. Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι εύθραυστη και δύσκαμπτη και τα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται από την κυκλοφορία οδηγούμενα σε φαγοκυττάρωση στον σπλήνα. [35]

γ) Δημιουργία νεοαντιγόνων γήρανσης

Η υπόθεση του άνισου μηχανισμού βασίζεται στην παρατήρηση ότι η οξειδωτική βλάβη της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων οδηγεί στην συνάθροιση ολιγομερών της πρωτεΐνης ζώνης - 3, τα μόρια της οποίας υπό φυσιολογικές συνθήκες σχηματίζουν μονομερή, διμερή και τετραμερή. Η παρουσία ολιγομερών όμως, αναγνωρίζεται από πρωτεΐνες όπως η πρωτεΐνη 4.1 και 4.2, η αγκυρίνη όπου συνδέονται με τα αντιγόνα που υπάρχουν στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη δημιουργώντας το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος (πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα), καθώς και το σύμπλεγμα του συμπληρώματος ώστε να γίνει ο οψωνισμός. Με αυτό τον τρόπο σηματοδοτείται το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα ώστε να απομακρύνει τα ερυθρά αιμοσφαίρια από την κυκλοφορία του αίματος και να τα οδηγήσει στον σπλήνα για φαγοκυττάρωση και τελικά καταστροφή.

A.3.1.: Έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά τη διάρκεια της απόπτωσης παρουσία οξειδωτικού στρες, διαθέτουν ορισμένους μηχανισμούς όπως το να εκθέτουν στην επιφάνειά τους φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και να αποσύρονται από την κυκλοφορία μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία (in vivo). Με την είσοδο του ερυθροκυττάρου στην διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, επέρχεται άμεση σηματοδότηση στα λευκά αιμοσφαίρια πως το ερυθρό

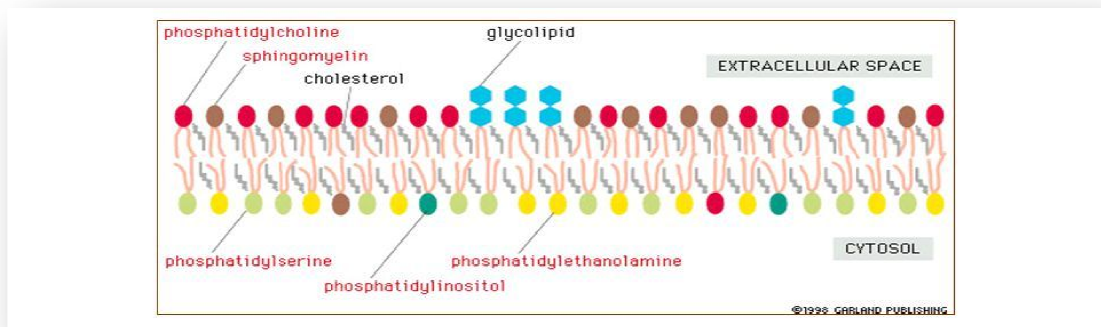
αιμοσφαίριο έχει χάσει την λειτουργικότητα του. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε συνθήκες αποθήκευσης υποβάλλονται σε οξειδωτικό στρες ή αποπίπτουν άρα εκθέτουν στην επιφάνεια τους φωσφατιδυλοσερίνη (PS). Λόγω της απουσίας των λευκών αιμοσφαιρίων εξαιτίας της λευκαφαίρεσης δε μπορεί να εφαρμοστεί ο μηχανισμός της φαγοκυττάρωσης άρα και κατ' επέκταση η απομάκρυνση των γερασμένων ερυθροκυττάρων σε συνθήκες αποθήκευσης (ex vivo). [48, 49]

A.4.: ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ

Αλλαγές του σχήματος των ερυθροκυττάρων θεωρούνται υπεύθυνες για την αιμόλυση και τελικά καταστροφή των ερυθροκυττάρων στον σπλήνα μετά από αύξηση της ευθραυστότητας και μείωση της ικανότητας παραμόρφωσής τους. Η αυξημένη ευθραυστότητα καθιστά τα ερυθρά αιμοσφαίρια ευάλωτα σε μηχανικές πιέσεις στην κυκλοφορία του αίματος με αποτέλεσμα την γρήγορη καταστροφή της μεμβράνης τους ενώ η μειωμένη παραμορφωσιμότητα μετατρέπει την είσοδό τους στην μικροκυκλοφορία μια πολύ δύσκολη διεργασία. [36]

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μετά το πέρας των ημερών που βρίσκονται στην κυκλοφορία και υφιστάμενα όλους τους προαναφερθέντες μηχανισμούς γήρανσης, παγιδεύονται στα κολποειδή του σπλήνα με αποτέλεσμα την ελάττωση της διαθεσιμότητας σε γλυκόζη άρα και την μειωμένη παροχή ενέργειας σε μορφή ATP. Κατά αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται το εσωτερικό περιβάλλον των ερυθρών αιμοσφαιρίων δηλαδή η ωσμωτική τους ισορροπία. Πιο συγκεκριμένα, τα ερυθροκύτταρα υφίστανται απώλεια ύδατος και ιόντων καλίου από το εσωτερικό της μεμβράνης τους, αυξάνεται η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου και των ιόντων υδρογόνου με αποτέλεσμα την μείωση του pH στο εσωτερικό. Όλα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την μετατροπή των ερυθροκυττάρων σε πυκνά, αδύναμα και άκαμπτα κύτταρα χωρίς δυνατότητα μετακίνησης και μεταφοράς οξυγόνου. [37]

Η παραμονή των ερυθροκυττάρων στον σπλήνα μετά το πέρας των ημερών της ζωής τους οδηγεί σε αυξημένη επαφή τους με τα μακροφάγα των χορδών του ερυθρού πλφου με αποτέλεσμα την βλάβη της κυτταρικής τους μεμβράνης και την αλλοίωση της αναλογίας όγκου-επιφάνειας και οδηγούνται σε ακόμα μεγαλύτερη παραμόρφωση και τελικά στην απόσυρση από την κυκλοφορία μέσω φαγοκυττάρωσης. [38]



Εικόνα 1: Δομή διπλοστιβάδας λιπιδίων. Ανατύπωση από Φυσιολογία μεμβρανών, Ιατρική Σχολή Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2009.

Η φαγοκυττάρωση αποτελεί το τελικό στάδιο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, δηλαδή της απόπτωσης. Τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα που έχουν οδηγηθεί στον σπλήνα μετά το πέρας των ημερών είναι γηρασμένα και έχουν υποστεί αλλοιώσεις κατά τη διάρκεια του αποπτωτικού μηχανισμού, όπου πραγματοποιούνται αλλαγές στο μεμβρανικό σκελετό, όπως η αναδιοργάνωση της ακτίνης, έλλειμμα στη σύνδεση σπεκτρίνης – αγκυρίνης, διαταραχή του συμπλόκου ακτίνης – τροπομυοσίνης – πρωτεΐνης 4.1 και αδουσίνης, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την κυστιδιοποίηση του ερυθρού αιμοσφαιρίου και κατ' επέκταση την απελευθέρωση μεμβρανικών κυστιδίων. Κατά τη διάρκεια της κυστιδιοποίησης, σε πρώτη φάση αποχωρίζεται κατά τόπους ο σκελετός από τη διπλοστιβάδα των λιπιδίων. Η επόμενη φάση χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία φυσαλίδων στην κυτταρική μεμβράνη του ερυθροκυττάρου διαταράσσοντας τη μορφολογία του δίνοντας το χαρακτηριστικό σχήμα "σφαίρας".

Η φαγοκυττάρωση των ερυθροκυττάρων στο σπλήνα πραγματοποιείται κυρίως από τα μακροφάγα, τα οποία λόγω του μεγέθους τους, έχουν την ικανότητα να φαγοκυτταρώνουν σωματίδια και οργανισμούς, που είναι αδύνατον να φαγοκυτταρωθούν από τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα. Συνήθως, τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα προσελκύονται πρώτα στο χώρο της φλεγμονής, αλλά ο χρόνος ζωής τους είναι περιορισμένος. Τα μακροφάγα ακολουθούν και καθαρίζουν το πεδίο της φλεγμονής από τα ιστικά υπολείμματα και τα άπεπτα σωματίδια που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι τα γηρασμένα ερυθρά αιμοσφαίρια στον σπλήνα. Η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης διευκολύνεται με την καθήλωση στα ερυθροκύτταρα ανοσοσφαιρινών ή κλασμάτων του συμπληρώματος, μια διαδικασία η οποία ονομάζεται οψωνοποίηση. [39]

Στη συνέχεια, τα ερυθροκύτταρα εγκολπώνονται με τη βοήθεια αμοιβαδοειδών κινήσεων, μέσω προεκβολών της κυτταρικής μεμβράνης του φαγοκυττάρου, που δημιουργούνται με συστολή των ινιδίων του κυτταροσκελετού. Τα φαγοκυτταρωμένα ερυθροκύτταρα του σπλήνα περικλείονται στο φαγόσωμα. Στη συνέχεια το φαγόσωμα συντήκεται με τα λυσοσώματα τα οποία είναι οργανίδια των μακροφάγων που περιέχουν τοξικούς παράγοντες και αποτελούν περιοχές ενδοκυττάριας πέψης σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους. Από τη σύντηξη αυτή σχηματίζεται το φαγολυσόσωμα. [40]

Στην τελική καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων συμβάλλουν αρκετοί παράγοντες. Αρχικά, μετά το σχηματισμό του φαγολυσόσωματος, παρατηρείται στο ερυθροκύτταρο αύξηση της κατανάλωσης της γλυκόζης, η οποία είναι γνωστή και ως «αναπνευστική έκρηξη». Δευτερευόντως, παράγονται διάφορα τοξικά προϊόντα, όπως το υπεροξειδικό ανιόν (O_2^-), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και η υδροξυλική ρίζα (OH^\cdot). Τα λυσοσώματα περιέχουν επίσης και ένζυμα που συμβάλλουν στη θανάτωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στον σπλήνα όπως η μυελοϋπεροξειδάση, η λυσοζύμη, και οι κατιονικές πρωτεΐνες, οι οποίες καταστρέφουν την ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Το χαμηλό pH ενεργοποιεί τα υδρολυτικά ένζυμα των λυσοσωμάτων, με αποτέλεσμα τη διάσπαση των

ερυθροκυττάρων στον σπλήνα και την απελευθέρωση των προϊόντων της καταστροφής τους στο περιβάλλον του φαγοκυττάρου.

A.5.: ΚΥΣΤΙΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

A.5.1.: Γενικά

Τα κυστίδια, γνωστά και ως μικροσωματίδια, είναι άφθονα στην κυκλοφορία του αίματος. Κυστίδια διαφορετικών μεγεθών είναι η βάση για την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων του εγκεφάλου και των δομών της συσκευής Golgi ενώ μέσω κυστιδίων μεταφέρονται και οι πρωτεΐνες μεταξύ των κυττάρων. Η εξωκυττάρωση, η αντίστροφη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης, είναι ο τρόπος με τον οποίο τα κύτταρα λαμβάνουν όλα τα μοριακά στοιχεία που χρειάζονται στο εσωτερικό τους.

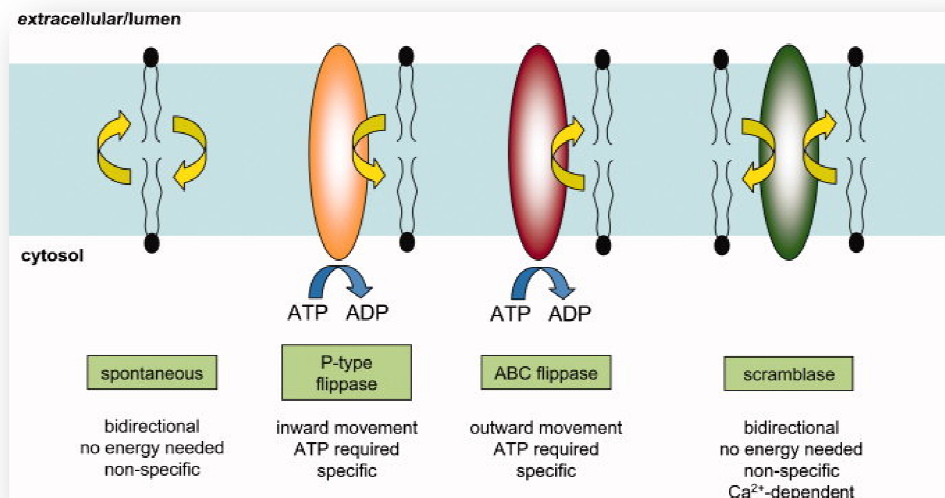
Μικροκυστίδια αποσχίζονται από τα αιμοπετάλια κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του αίματος. Αυτά τα μικροσωματίδια έχει δειχθεί ότι έχουν κλινική σημασία εξαιτίας της ενεργότητας του ινωδογόνου και της ενίσχυσης της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στο υποενδοθήλιο. Τα μικροκυστίδια του αίματος είναι ανέπαφα κυστίδια προερχόμενα από κυτταρικές μεμβράνες, με μέγεθος μικρότερο από 1μm. Είναι πλούσια σε φωσφολιπίδια, βρίσκονται στη κυκλοφορία του αίματος και απελευθερώνονται από τις μεμβράνες των ενδοθηλιακών κυττάρων, των αιμοπεταλίων, των λευκοκυττάρων και των ερυθροκυττάρων. Σε αυτά έχουν αποδοθεί ποικίλες λειτουργίες, όπως αυτή του ινωδογόνου, της κυτταρικής σηματοδότησης και των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων. Προκύπτουν κυρίως από διαδικασίες ενεργοποίησης της κυτταρικής μεμβράνης και από την απόπτωση ή προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Όπως συμβαίνει στα αιμοπετάλια, στα μονοκύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, έτσι και στα ερυθροκύτταρα οι μεμβράνες σχηματίζουν μικροσωματίδια ως απόκριση στην εισροή ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. Αυτή η εισροή

παρατηρείται ως αντίδραση στο τερματικό σύμπλοκο επίθεσης του συμπληρώματος και συνολικά σχετίζεται με έναν αριθμό παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένων της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας και της κληρονομικής σφαιροκυττάρωσης. [40]

Ο σχηματισμός μικροκυστιδίων συμβαίνει φυσιολογικά κατά την κανονική ερυθροκυτταρική ωρίμανση και γήρανση και εντοπίζεται και κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των ερυθροκυττάρων προς μετάγγιση. Τα μικροκυστίδια των ερυθροκυττάρων είναι γενικά μικρότερα σε μέγεθος σε σχέση με εκείνα των άλλων τύπων κυττάρων. Έχουν μέση διάμετρο περίπου 0,15μm και συνοδεύονται από ένα μικρότερο τύπο κυστιδίων (εξωσωμάτων) περίπου 0,06μm.

Στα ερυθροκύτταρα η σύσταση και η κατανομή των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων είναι απόλυτα εξειδικευμένη. Η φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη εντοπίζονται στο εξωτερικό μεμβρανικό στρώμα, ενώ η φωσφατιδυλοσερίνη και η φωσφατιδυλοαιθυλαμίνη στο εσωτερικό. Η διατήρηση αυτής της ασυμμετρίας είναι κρίσιμη και διατηρείται μέσω μιας σύνθετης διαμεμβρανικής ενζυμικής ισορροπίας. Αυτή η ενζυμική ισορροπία ελέγχεται από τρεις πρωτεΐνες-ένζυμα: 1) μια φλιπάση (flippase), που ελέγχει την προς τα μέσα μετατόπιση, 2) μια φλοπάση (floppase), που διευθύνει την προς τα έξω μετατόπιση και μεταφορά και 3) μια λιπιδιακή σκραμπλάση (lipid scramblase), που ελέγχει την μεταφορά των φωσφολιπιδίων και στις δύο στιβάδες. Απώλεια της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας συμβαίνει κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, την απόπτωση και τη νέκρωση και έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στο εξωτερικό μεμβρανικό στρώμα. Το γεγονός αυτό, με τη σειρά του, οδηγεί σε μία προθρομβωτική κατάσταση και προωθεί την απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων και κυτταρικών φραγμάτων από τα μακροφάγα. [41]



Εικόνα 2: Μεταφορά των φωσφολιπιδίων στην λιπιδική κυτταρική διπλοστιβάδα. Ανατύπωση από International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, Flipping and Flopping-Lipids on the Move, 2011

Κατά το σχηματισμό των μικροκυστιδίων, η συμμετρία της λιπιδικής διπλοστιβάδας τροποποιείται, οδηγώντας στην έκθεση μιας επιφάνειας πλούσιας σε αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια. Επιπρόσθετα, τα μικροκυστίδια φέρουν αντιγόνα που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων από τα οποία προέρχονται. Η ανιονική αυτή επιφάνεια πιθανά να είναι ο λόγος που μπορούν και προσδένουν πηκτικούς παράγοντες και να εκφράζουν λειτουργικά μόρια που διαμεσολαβούν σε βιολογικές δράσεις των μικροκυστιδίων. [41, 42]

Το πρώτο μοντέλο κυστιδιοποίησης περιγράφηκε στο ανθρώπινο ερυθρό αιμοσφαίριο. Τα ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια χάνουν μεμβράνη, τόσο *in vivo* όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης με τη δημιουργία μικροκυστιδίων από τις άκρες των εχνοκυττάρων. Τα μικροκυστίδια που εκκρίνονται από τα ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά τη γήρανση *in vivo* απομακρύνονται άμεσα από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, η απώλεια μεμβράνης σε συνδυασμό με την απώλεια ATP, 2,3-DPG, αιμοσφαιρίνης και βιωσιμότητας συνεισφέρει στην ερυθροκυτταρική αποθηκευτική βλάβη. Τα μικροκυστίδια που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης περιέχουν λιπίδια, πρωτεΐνη ζώνη 3, γλυκοφορίνες, και ακτίνη αλλά στερούνται

σπεκτρίνης, πρωτεΐνης 4.2 και αγκυρίνης. Τα μικροκυστίδια των ερυθρών αιμοσφαιρίων έχουν αντιγόνα ομάδων αίματος A, B, H και P καθώς και D.

A.5.2.: Κυστιδιοποίηση ερυθροκυττάρων

Όταν η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου αυξάνεται *in vitro* με χορήγηση του δισθενούς κατιονικού ιοντοφόρου A23187, προκαλείται αλλαγή σχήματος των ερυθροκυττάρων από αμφίκυκλοι δίσκοι σε εχινοκύτταρα, αυξάνεται το περιεχόμενο της μεμβράνης σε 1,2 διακυλογλυκερόλη και μικροκυστίδια προεκβάλλουν από τις λαχνοειδείς προεξοχές των εχινοκυττάρων. Αυτά τα κυστίδια στερούνται φωσφατιδυλοχολίνης, σπεκτρίνης, ακτίνης και γλυκοφορίνης, ενώ είναι εμπλουτισμένα σε ζώνη-3 και ακετυλοχολινεστεράση. [42, 43]

Η κλινική σημασία της μικροκυστιδιοποίησης αναδύθηκε μέσα από μελέτες των ερυθροκυττάρων ενός ασθενούς με σύνδρομο Scott. Τα αιμοπετάλια του ασθενούς είχαν αξιοσημείωτα ανεπαρκή ενεργότητα ινωδογόνου και προθρομβινάσης και μειωμένη ικανότητα σχηματισμού μικροσωματιδίων και αμινοφωσfolιπιδίων. [44] Τα ερυθροκύτταρα αντιστέκονταν στο σχηματισμό μικροκυστιδίων κατά την επώαση με ιονοφόρο A23187, διατηρώντας το δισκοειδές σχήμα. Από αυτές τις μελέτες ξεκίνησαν οι υποθέσεις σχετικά με το σχηματισμό δημιουργίας μικροκυστιδίων από τα κύτταρα. Η συνειδητοποίηση ότι η καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων σχετίζεται με την απώλεια φωσfolιπιδίων και χοληστερόλης από τα ερυθροκύτταρα κατά τη διάρκεια της γήρανσης *in vivo* χρονολογείται περίπου 100 χρόνια πριν. [45,46]

A.5.3.: Κυστιδιοποίηση και παθολογικές καταστάσεις

Παρά τον προστατευτικό εν μέρει ρόλο που έχουν τα μικροκυστίδια στα κύτταρα, στον οργανισμό μπορούν να συμβάλλουν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις πυροδοτώντας καταστάσεις φλεγμονής. Για παράδειγμα, εξαιτίας της μεγάλης

περιεκτικότητας σε αιμοσφαιρίνη στο εσωτερικό τους, συμβάλλουν στη μείωση της διαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου, ενώ λόγω της παρουσίας PS στην επιφάνειά τους, η οποία δρα καταλυτικά στη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη, παρουσιάζουν αυξημένη θρομβωτική ικανότητα. Επιπλέον, δεδομένου ότι τα κυριότερα συστατικά των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών είναι τα φωσφολιπίδια και η χοληστερόλη, τα μικροκυστίδια που προέρχονται από αυτά είναι πλούσια σε χοληστερόλη, λιπιδικές σχεδίες, μεμβρανικές πρωτεΐνες και αιμοσφαιρίνες. Έτσι, η χοληστερόλη μπορεί να επάγει φλεγμονώδεις αντιδράσεις ενώ ο σίδηρος μπορεί να δράσει σαν καταλύτης για την παραγωγή ROS που προκαλούν βλάβες στους ιστούς και ενεργοποιούν φλεγμονώδεις αντιδράσεις [75]. Όσον αφορά στα μικροκυστίδια του αίματος γενικότερα, αυτά μπορούν να προκαλέσουν απευθείας βλάβες στο ενδοθήλιο. In vitro πειράματα έχουν δείξει ότι τα μικροκυστίδια που προέρχονται από το ενδοθήλιο μπορούν να ρυθμίζουν την αγγειακή πίεση μεταβάλλοντας την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αντίστοιχα, τα λευκοκυτταρικά μικροκυστίδια διεγείρουν την απελευθέρωση κυτταροκινών από τα ενδοθηλιακά μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών, οδηγώντας πιθανά σε αυξημένη φλεγμονώδη και θρομβωτική δραστηριότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα αιμοπεταλιακά κυστίδια επάγουν την παραγωγή κυτταροκινών και την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα in vitro, ενώ μέσω μεταφοράς αραχιδονικού οξέος στα ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλούν υπερενεργοποίηση των μορίων προσκόλλησης και επακόλουθη προσκόλληση των μονοκυττάρων. Τα αιμοπεταλιακά κυστίδια μπορούν επίσης να προωθήσουν τη συσσωμάτωση των λευκοκυττάρων. Όμως, παρά τις βλαβερές επιδράσεις των μικροκυστιδίων στη λειτουργία του ενδοθηλίου in vitro, δεν υπάρχουν αναμφισβήτητες αποδείξεις ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου in vivo [76].

A.6.: ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

Με τον όρο Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια χαρακτηρίζεται η προοδευτική απώλεια της νεφρικής λειτουργίας κατά την εξέλιξη της νόσου και υπολογίζεται μέσω της μέτρησης του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (GFR) δηλαδή τον όγκο φιλτραρισμένου πλάσματος από τους νεφρούς στη μονάδα του χρόνου (1min). Τα συμπτώματα που χαρακτηρίζουν μια νεφρική νόσο δεν είναι απαραίτητα ειδικά δηλαδή δεν προϋδεάζουν τον πάσχοντα για το ενδεχόμενο αυτό, αντίθετα μπορεί να περιλαμβάνουν αδιαθεσίες, μείωση της όρεξης, κόπωση, ταχυπαλμία. Η διάγνωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας βασίζεται σε ευρήματα ανώμαλης δομής των νεφρών μέσω ακτινολογικού ελέγχου, παθολογικής λειτουργίας αυτών μέσω βιοχημικών εξετάσεων ή ελάττωσης του ρυθμού της σπειραματικής διήθησης (GFR). [50]

Τα αίτια της νεφρικής νόσου μπορεί να ποικίλλουν και περιλαμβάνουν: πρωτοπαθή νεφρικά νοσήματα όπως σπειραματονεφρίτιδες και χρόνιες πυελονεφρίτιδες, αποφρακτικές νεφροπάθειες (νεφρολιθιάσεις), συστηματικές παθήσεις (σακχαρώδης διαβήτης, αρτηριοσκλήρυνση, αρτηριακή υπέρταση).

Τα συμπτώματα που παρουσιάζονται στην εξέλιξη αυτής της νόσου περιλαμβάνουν πρωτεϊνουρία, αιμοσφαιρινουρία, οιδήματα με εντονότερη εμφάνιση στα κάτω άκρα λόγω αύξησης των επιπέδων των τοξινών, και φυσικά την αναιμία ως κυρίαρχο σύμπτωμα. [51]

Η αναιμία είναι μια παθολογική κατάσταση (σύμπτωμα) που εμφανίζεται σε όλα τα στάδια της νεφρικής ανεπάρκειας ανάλογα το στάδιο της νόσου και τη σοβαρότητα της κατάστασης. Η παρουσία αναιμίας σε ασθενείς με ΧΝΑ, δηλαδή ο μειωμένος αριθμός ερυθροκυττάρων, η αιμοσφαιρίνη και ο αιματοκρίτης που οφείλεται στη μειωμένη ικανότητα σύνθεσης ερυθροποιητίνης. Λόγω της μειωμένης λειτουργίας των νεφρών τα ερυθροκύτταρα των ατόμων με ΧΝΑ έχουν μικρή διάρκεια ζωής και έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με τα επίπεδα των ουραιμικών τοξινών που υπάρχουν σε περίσσεια στο αίμα των ασθενών αυτών. Το πλάσμα που

χαρακτηρίζεται από συσσώρευση παραπροϊόντων του μεταβολισμού οδηγεί σε εξωτερίκευση PS από τα ερυθροκύτταρα οδηγώντας τα σε πρόωρη απομάκρυνση από την κυκλοφορία. Τα ερυθροκύτταρα λόγω της μειωμένης παραγωγής ερυθροποιητίνης δεν είναι δυνατόν να αναπληρωθούν και ως εκ τούτου εμφανίζονται τα σημάδια της αναιμίας. Στα ερυθροκύτταρα στη ΧΝΑ εξαιτίας των μορφολογικών τροποποιήσεων των οποίων υφίστανται και των μεταβολών της πρωτεϊνικής τους σύνθεσης αλλά και εξαιτίας της κυστιδιοποίησης της μεμβράνης, παρατηρούνται μεταβολές και πιο συγκεκριμένα στη ζώνη – 3 και τη σπεκτρίνη που λόγω αυξημένου οξειδωτικού στρες παρατηρείται αλλοίωση της δομής του υπομεμβρανικού σκελετού επομένως και του σχήματος των ερυθροκυττάρων. Μείωση έχει παρατηρηθεί στις πρωτεΐνες ακτίνη, παλλιδίνη, στοματίνη, CD47, ενώ αύξηση στην υδατοπορίνη, HSP – 70 και καλπαΐνη. Επιπλέον, τα παθολογικά ερυθροκύτταρα που βρίσκονται στην κυκλοφορία ασθενών με ΧΝΑ μπορούν να χαρακτηριστούν λόγω της αλλαγής του σχήματος τους σε εχινοκύτταρα, στοματοκύτταρα, δακρυοκύτταρα και σφαιροκύτταρα. [52, 53, 54]

A.6.1.: Εξωκυτταρικά κυστίδια και Νεφρική Ανεπάρκεια

Στους ασθενείς με ΧΝΑ, οι ουραιμικές τοξίνες, η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες σε συνδυασμό με τη διαδικασία της ΑΙΚ, αποτελούν παράγοντες οι οποίοι φαίνεται να συμβάλλουν στην απελευθέρωση κυστιδίων στο πλάσμα. [77 , 78] Σε πολλές περιπτώσεις, έχει αναφερθεί αύξηση του βαθμού κυστιδιοποίησης από τη διαδικασία ΑΙΚ, πιθανά λόγω του μηχανικού στρες το οποίο ασκείται στα αιμοπετάλια και σε άλλα κύτταρα κατά την επαφή τους με τα υλικά του μηχανήματος κάθαρσης. [77, 78] Παρόλα αυτά, σε άλλες μελέτες έχει αναφερθεί μείωση των επιπέδων των κυστιδίων μετά την ΑΙΚ, η οποία έχει αποδοθεί στη μείωση των ουραιμικών τοξινών, στην επαναφορά της μηχανικής πίεσης που ασκείται στα κύτταρα λόγω της ροής του αίματος στην κυκλοφορία (*shear stress*) ή στα διαφορετικά πρωτόκολλα ΑΙΚ που χρησιμοποιούνται στις μελέτες. [77, 79] Σε αντίθεση με την πυροδότηση της κυστιδιοποίησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα,

κάποιες τοξίνες όπως η *p-cresol* δρουν ανασταλτικά στη δημιουργία κυστιδίων από τα ουδετερόφιλα, εμποδίζοντας την ενεργοποίησή τους και πιθανά γι' αυτόν τον λόγο, τα επίπεδα της κυστιδιοποίησης να μην ακολουθούν πάντα την εξέλιξη της νόσου. [80]

Παρότι τα μικροκυστίδια στη ΧΝΑ και ιδιαίτερα εκείνα τα οποία προέρχονται από αιμοπετάλια, παρουσιάζουν χαμηλό θρομβωτικό δυναμικό σε σχέση με άλλες ασθένειες [81], τα υψηλά επίπεδά τους θεωρείται ότι συμβάλλουν σε ένα βαθμό στα θρομβωτικά επεισόδια τα οποία παρουσιάζονται στους ασθενείς. [82] Επιπλέον, υπό την επίδραση των ουραιμικών τοξινών, το ενδοθήλιο απελευθερώνει μικροκυστίδια τα οποία μειώνουν σημαντικά την απελευθέρωση μονοξειδίου του αζώτου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, συμβάλλοντας περαιτέρω στην ενδοθηλιακή και αρτηριακή δυσλειτουργία στη ΧΝΑ. [83]

A.6.2.: Επίδραση της αιμοδιαδιήθησης (ΑΔΔ) στο αίμα ασθενών με ΧΝΑ

Η αιμοδιαδιήθηση είναι μια θεραπεία, η οποία χρησιμοποιεί φίλτρα με σκοπό την απομάκρυνση των τοξινών. Η μέθοδος της αιμοδιαδιήθησης φαίνεται να διατηρεί σταθερή την αιμοδυναμική, όπως και να βελτιώνει την υπάρχουσα αναιμία λόγω της ανταπόκρισης στην ερυθροποιητίνη μέσω της εκάστοτε θεραπείας, παρόλο που υπάρχουν και αποτελέσματα που το αντικρούουν [54,85]. Ακόμη, σε άλλες μελέτες, έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση των επιπέδων θνησιμότητας των ασθενών που υποβάλλονται σε HDF συγκριτικά με την cHD. [86-88]

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα ερυθροκύτταρα των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ) τελικού σταδίου που υποβάλλονται σε θεραπεία αιμοκάθαρσης παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές τόσο στο αιματολογικό πρότυπο σε σχέση με υγιή άτομα όσο και στα χαρακτηριστικά του πλάσματος και των ερυθροκυττάρων, ανάμεσα στα οποία περιλαμβάνονται διάφοροι δείκτες οξειδωτικού στρες, ερυθρόπτωση και αλλαγές στη μορφολογία και στην πρωτεϊνική σύσταση της μεμβράνης. Όσον αφορά την αιμοκάθαρση, εκτός από τη σημαντική επίδραση που έχει στο προσδόκιμο ζωής των ασθενών με ΧΝΑ και στην αντιμετώπιση της αναιμίας, έχει σημαντική επίδραση και σε χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση αναιμίας. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε ο βαθμός της αναιμίας των ασθενών που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση ή αιμοδιαδιήθηση, μέσα από τη μελέτη του αιματολογικού προτύπου αλλά και η σχέση της αναιμίας με την κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων και άλλων κυττάρων πριν και μετά τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β.: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα ερευνητικά πειράματα της παρούσας εργασίας διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Αιματολογίας – Αιμοδοσίας του Τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Αθήνας, το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2015 – Ιούνιος 2016. Τα βιολογικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ως προς ανάλυση ήταν δείγματα πλάσματος νεφροπαθών ασθενών, τα οποία έπειτα από ειδική επεξεργασία αναλύθηκαν με τη μέθοδο κυτταρομετρίας ροής.

Β.1.: ΌΡΓΑΝΑ – ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα όργανα, οι συσκευές και τα αντιδραστήρια – αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων αναφέρονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας: Όργανα - Συσκευές – Αντιδραστήρια

Αναδευτήρας (Vortex)	Velp Scientifica
Αιματολογικός αναλυτής	Nihon Kohden, Cell Tac E Mindray, BC – 300 Plus, Auto Haematology Analyzer
Βιοχημικός αναλυτής	Hitachi 9180 (Roche, Indianapolis, IN)
Κυτταρόμετρο ροής	Becton Dickinson, FACsScan
Μικροσκόπιο παρατήρησης	Nikon Eclipse E 400
Πιπέτες	Nichiryo, Autoclavable Nichipet EX II (V=100-1000μl και V=20-200μl) Nichiryo, Autoclavable Nichipet EX Plus (V= 2-20μl) Hirschmann Laborgerate, Labopette

	(V=0.1-2.5μl)
Αντισώματα	PE Annexin V, BD Pharmingen
	FITC Mouse anti-Human CD 235a, BD Pharmingen
Σωληνάρια (κυτταρομετρία)	BD Trucount Tubes
Σωληνάρια (μικροφυγοκέντρωσης)	Eppendorf Tubes
Φυγόκεντροι	Hettich Zentrifugen, Mikro 22R Bacacos Scientific, Econospin Sorvall Instruments Du Pont

Ασθενείς

Στη μελέτη συμμετείχαν 32 ασθενείς με ΧΝΑ τελικού σταδίου, στους οποίους χορηγήθηκε ενδοφλεβίως ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη ($9,225 \pm 4,781$ IU/εβδομαδιαίως), μετά το πέρας κάθε συνεδρίας, και 12 υγιή άτομα, που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Από τους ασθενείς οι 16 υποβλήθηκαν σε αιμοδιαδιήθηση ενώ οι υπόλοιποι σε συμβατική αιμοκάθαρση όπως παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2α). Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αναφέρεται σταθερός ο ρυθμός ροής του αίματος καθώς και ο ρυθμός ροής της αιμοκάθαρσης σε κάθε μια από τις μορφές θεραπείας. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στις συσκευές αιμοκάθαρσης όπως και στους χρησιμοποιούμενους αγωγούς και μεμβράνες. Οι ασθενείς της έρευνας είχαν διαφορετικές μορφές πρωτογενούς αιτίας νεφρικής βλάβης, ενώ εξαιρέθηκαν όσοι είχαν ιστορικό διαβήτη, κακοήθειας ή άλλων συστηματικών νοσημάτων. Τέλος, σημειώνεται ότι κρίθηκε απαραίτητη η συναίνεση όλων των ατόμων που συμμετείχαν στην έρευνα.

B.2.: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΣΤΙΔΙΩΝ

Η διαδικασία της απομόνωσης των ερυθροκυτταρικών μικροκυστιδίων (MVs) πραγματοποιήθηκε σε δείγματα ολικού αίματος. Η ανίχνευση των

μικροκυστιδίων πραγματοποιείται ύστερα από την κλασμάτωση του αίματος και απομόνωση του πλάσματος. Έπειτα από καλή ανάδευση του δείγματος που προορίζεται για την απομόνωση [59] ακολουθεί φυγοκέντρηση αυτού σε ψυχόμενη φυγόκεντρο των 4°C στις 3,000 στροφές για 20 λεπτά. Μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας λαμβάνεται το υπερκείμενο και απορρίπτεται το ίζημα που περιέχει τα τυχόν υπολείμματα των ερυθροκυττάρων. [58] Το βήμα αυτό κρίνεται σκόπιμο να επαναληφθεί προκειμένου να απομακρυνθούν πλήρως οποιαδήποτε ίχνη κυττάρων και ιδιαίτερα αιμοπεταλίων. Σ' αυτό το σημείο το πλάσμα συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -20° C έως ότου ολοκληρωθεί η συλλογή δειγμάτων που ακολουθούν το πρωτόκολλο της απομόνωσης.

B.2.1.: Μέτρηση των επιπέδων κυστιδιοποίησης με κυτταρομετρία ροής

Αρχή μεθόδου

Σε αυτή τη μέθοδο, μια δέσμη φωτός μεμονωμένου μήκους κύματος (λείζερ) κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλει το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού. Κάθε σωματίδιο αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως διαφορετικού μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός προσλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του σωματιδίου (κυττάρου ή κυστιδίου) και η πλάγια σκέδαση "SSC" (Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ. σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή

αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Τα κυστίδια ταυτοποιήθηκαν με βάση το μέγεθός τους (<1μm), την εξωτερική PS (Annexin V+) και την κυτταρική προέλευσή τους (CD235+, αντίσωμα έναντι της γλυκοφορίνης που είναι πρωτεΐνη χαρακτηριστική των ερυθροκυττάρων). Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των κυστιδίων χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια ορισμένου μεγέθους σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ενώ για τον προσδιορισμό του απόλυτου αριθμού των μικροκυστιδίων (κυστίδια/μL) χρησιμοποιήθηκαν ειδικά σωληνάκια με φθορίζοντα κυστίδια γνωστής συγκέντρωσης (TruCount tubes).

Υλικά-Αντιδραστήρια

- anti-annexinV PE, BD Biosciences
- Διάλυμα αννεξίνης, BD Biosciences
- Κυτταρομετρητής, BD FACScan
- Σωληνάκια TruCounts, BD Biosciences

Πειραματική διαδικασία

1. Απομόνωση πλάσματος από ολικό αίμα.
2. Προσθήκη 10μl πλάσματος σε 90μl ρυθμιστικού διαλύματος αννεξίνης.
3. Προσθήκη 3μl αντισώματος annexin V και 4μl αντισώματος CD235.
4. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Προσθήκη 400μl διαλύματος αννεξίνης, για να τερματιστεί η αντίδραση.
6. Μέτρηση και ανάλυση των δεδομένων (τουλάχιστον 100.000 counts ανά δείγμα).

Στατιστική επεξεργασία

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο (IBM SPSS, έκδοση 22.0 για Windows IBM Corp., Armonk, Νέα Υόρκη: Διαχειριζόμενο από το ΕΚΠΑ). Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων αξιολογήθηκαν με t-test ή μονόδρομη ανάλυση ANOVA και Mann-Whitney, ανάλογα με την περίπτωση. Η διόρθωση Benferroni χρησιμοποιήθηκε όπου ήταν απαραίτητο. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά για $P < 0.05$.

Γ.: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι ασθενείς που υποβάλλονται σε HDF ή cHD προ και μετά τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης, όπως και τα αποτελέσματα των μετρήσεων σε ποικίλες αιματολογικές και βιοχημικές παραμέτρους.

Πίνακας 2α: Κλινικοί και βιοχημικοί παράμετροι σε ασθενείς που υποβάλλονται σε HDF και cHD συνεδρίες συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες.

	HDF ασθενείς (n=16)		cHD ασθενείς (n=16)		Μάρτυρες (n=12)
	προ-AIK	μετά-AIK	προ-AIK	μετά-AIK	(-)
Κλινικές παράμετροι					
Ηλικία (έτη)	64±11		72±7		60±14
Βάρος (kg)	75±17		65±15		60±10
Διάρκεια θεραπείας (μήνες)	35±15		40±30		-
Δόση EPO (IU/εβδομάδα)	9.100±5.527		9.350±4.204		-
Βιοχημικές παράμετροι					
WBC (x10 ³ /μL)	6,6±1,5	6,5±1,2	5,7±1,7	5,8±2,3	6,8±1,1
RBC (x10 ⁶ /μL)	3,59±0,18	4,10±0,35[†]	3,61±0,40	3,99±0,89	4,77±0,56
Hb (gr/dL)	11,7±0,3*	12,8±1,6 [†]	10,9±0,7*	11,8±1,0	14,2±1,4
Hct (%)	36,1±1,0*	37,9±4,2*	33,9±1,9*	33,2±3,8*	43,1±4,6
MCV (fL)	100,4±3,0	93,0±6,0* [†]	95,4±9,0	84,0±9,0* [†]	93,2±5,4
MCH (pg)	32,6±1,3*	31,7±2,0	30,2±3,2*	29,6±4,4	32,5±2,2
MCHC (g/dL)	32,5±0,6*	34,1±1,3 [†]	31,2±0,6*	33,6±3,7	33,7±1,5

RDW (%)	15,1±1,1*	14,1±1,7	16,6±1,4*	15,7±1,8	12,8±0,9
PTH (pg/mL)	195±65	Δ/Π	235±129	Δ/Π	44±18
Ουρία (mg/dL)	143±23	32±11 [†]	123±27	38±9 [†]	31±12
Κρεατινίνη (mg/dL)	8,6±1,2*	Δ/Π	6,7±2,0*	Δ/Π	0,8±0,2
Ουρικό οξύ (mg/dL)	7,9±1,8*	Δ/Π	6,1±1,0*	Δ/Π	4,2±1,2
Χοληστερόλη (mg/dL)	148±29	Δ/Π	145±36	Δ/Π	145±18
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	150±60	Δ/Π	146±42	Δ/Π	132±29
HDL (mg/dL)	45±11	Δ/Π	43±11	Δ/Π	73±9
Ασβέστιο (mg/dL)	9,3±0,2	Δ/Π	9,3±0,3	Δ/Π	9,3±0,2
Φώσφορος (mg/dL)	5,0±0,6	Δ/Π	4,8±0,8	Δ/Π	3,6±0,6
Κάλιο (mmol/L)	5,0±0,3	4,5±0,5	4,9 ±0,5	4,7±0,6	4,2±0,3
Νάτριο (mmol/L)	137±2	Δ/Π	137±2	Δ/Π	139±2
Fe (μg/dL)	72,4±17,4	Δ/Π	66,5±11,5	Δ/Π	18,9±15,4
Φερριτίνη (ng/mL)	914±436	Δ/Π	831±487	Δ/Π	72±18
TIBC (μg/dL)	280±37*	Δ/Π	242±41*	Δ/Π	348±27
Ολικές πρωτεΐνες (g/dL)	7,1±0,3	Δ/Π	7,1±0,3	Δ/Π	7,4±0,5
Αλβουμίνη (g/dL)	4,3±0,3	Δ/Π	4,3±0,6	Δ/Π	4,2±0,4
ALP (IU/L)	83±19	Δ/Π	79±12	Δ/Π	63±10
γGT (IU/L)	17±7	Δ/Π	14±5	Δ/Π	12±9

Οι ομάδες που παρουσιάζονται στον πίνακα είναι α) ασθενείς που υποβάλλονται σε HDF (προ και μετά θεραπείας), β) ασθενείς που υποβλήθηκαν σε cHD (προ και μετά θεραπείας)

και γ) μάρτυρες. Όλες οι τιμές που αναφέρονται στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±τυπική απόκλιση (SD). Με τον όρο (Δ/Π) συμβολίζονται οι τιμές παραμέτρων που δεν προσδιορίστηκαν. $P < 0.05$.

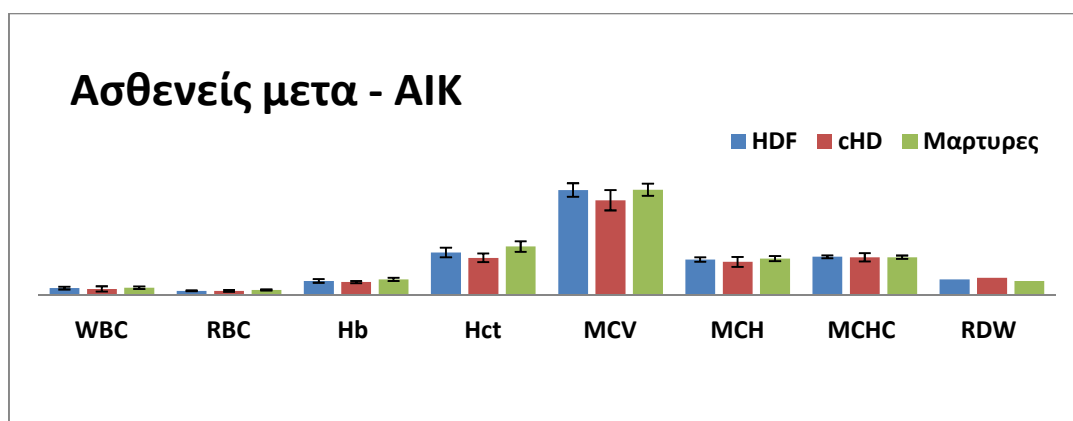
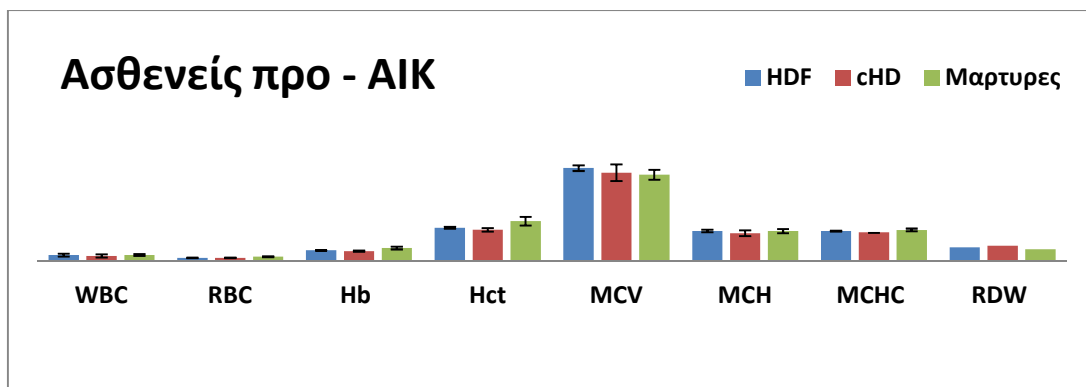
Οι συμβολισμοί των βιοχημικών παραμέτρων είναι οι εξής: ALP: αλκαλική φωσφατάση, γGT: γ - γλουταμυλοτρανσφεράση, PTH: παραθορμόνη,

Όλες οι παράμετροι, βιοχημικοί και αιματολογικοί, συγκρίθηκαν τόσο βάσει της ομάδας των υγιών ατόμων (μάρτυρες) όσο και μεταξύ των ασθενών που υποβάλλονται αντίστοιχα στην αιμοδιαδιήθηση (HDF) και στη συμβατική αιμοκάθαρση (cHD).

Τα επίπεδα των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) σ' όλους τους ασθενείς παρατηρούνται μειωμένα πριν την έναρξη της θεραπείας, ενώ μετά την ολοκλήρωση αυτής σ' εκείνους που ακολουθούν τη μέθοδο της αιμοδιαδιήθησης τα επίπεδα είναι ακόμα πιο χαμηλά σε αντίθεση με την μέθοδο της συμβατικής αιμοκάθαρσης παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού αυτών. Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης παρατηρείται σταθερά μειωμένη σ' όλους τους ασθενείς ανεξαρτήτως μεθόδου θεραπείας, ενώ ο δείκτης RDW ελέγχεται ιδιαίτερα αυξημένος. Οι δείκτες MCV, MCH, MCHC εμφάνισαν μικρές αλλά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τους μάρτυρες.

Όσον αφορά τις βιοχημικές παραμέτρους, παρατηρήθηκαν ιδιαιτέρως αυξημένες οι τιμές της ουρίας, της κρεατινίνης, της παραθορμόνης, του ουρικού οξέος και της φερριτίνης. Αυξημένη ελέγχεται και η ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα. Οι τιμές ουρίας και κρεατινίνης πιο συγκεκριμένα ήταν σαφώς αυξημένες λόγω της νεφρικής ανεπάρκειας.

Οι υπόλοιπες δείκτες δεν παρουσίασαν ιδιαίτερη μεταβολή.



Εικόνα 3α και 3β: Διαγραμματική απεικόνιση των μετρήσεων των ερυθροκυτταρικών δεικτών σε HDF και cHD ασθενείς, πριν και μετά από κάθε συνεδρία.

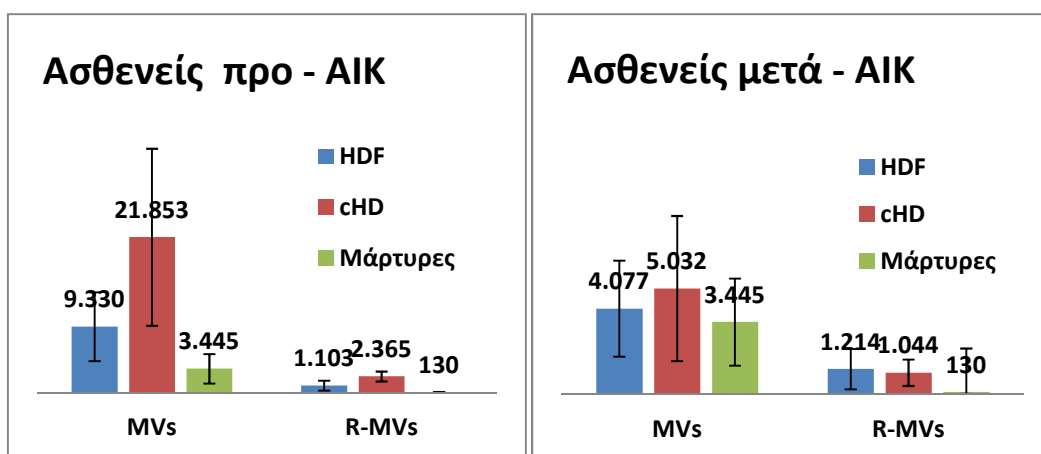
Πίνακας 2β: Συγκεντρωτικός πίνακας των επιπέδων κυστιδίων πλάσματος στις δυο ομάδες ασθενών καθώς και στα υγιή άτομα.

Κυστίδια (κυστίδια/μl)	Ασθενείς HDF (N=6)		Ασθενείς cHD (N=16)		Υγιείς (N=12)
	Προ - ΑΙΚ	Μετά - ΑΙΚ	Προ - ΑΙΚ	Μετά - ΑΙΚ	
Ολικά	9,330±4,813 ^{*,**}	4,077±2,275 [*]	21,853±12,391 ^{*,**}	5,032±3,439 [*]	3,445±2,062
Ευθροκυτταρικά	1,103±693 ^{*,**}	1,214±952 [*]	2,365±1,691 ^{*,**}	1,044±627 [*]	130±85

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ±τυπική απόκλιση, (*): cHD, HDF έναντι υγιών ατόμων (**): HDF έναντι cHD, (+): προ-ΑΙΚ έναντι μετά-ΑΙΚ, P<0,05.

Όπως είναι αναμενόμενο, το σύνολο των ασθενών παρουσιάζει παθολογικά επίπεδα ολικών και ερυθροκυτταρικών κυστιδίων στο πλάσμα (Εικ.3). Όμως, τόσο

τα ολικά όσο και τα ερυθροκυτταρικά κυστίδια παρουσιάζονται μειωμένα πριν από την αιμοκάθαρση στους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδίθηση σε σχέση με τη συμβατική αιμοκάθαρση (Εικ.3α και 3β, Πίνακας 2). Μετά το τέλος της συνεδρίας, ο πληθυσμός των ολικών κυστιδίων μειώνεται σε φυσιολογικά επίπεδα και στις δύο ομάδες των ασθενών, ενώ τα ερυθροκυτταρικά κυστίδια παραμένουν παθολογικά αυξημένα (Εικ.3α και 3β, διάγραμμα δεξιά). Αν και πολλοί ασθενείς που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση παρουσιάζουν σημαντική μείωση στα ερυθροκυτταρικά κυστίδια μετά τη συνεδρία, η μείωση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική εξαιτίας της μεγάλης διακύμανσης που παρατηρείται στους ασθενείς της ομάδας αυτής πριν από την αιμοκάθαρση (Εικ.3α και 3β, Πίνακας 2).



Εικόνα 4α και 4β : Διαγραμματική απεικόνιση του ολικού αριθμού κυστιδίων πλάσματος και εκείνων ερυθροκυτταρικής προέλευσης (MVs και R-MVs, αντίστοιχα) σε HDF και cHD ασθενείς, πριν και μετά από κάθε συνεδρία.

ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Το πλάσμα ασθενών με ΧΝΑ, χαρακτηρίστηκε από παθολογικά αυξημένη ποσότητα τόσο ολικών όσο και ερυθροκυτταρικών κυστιδίων. Στο πλάσμα ασθενών που υποβλήθηκαν σε HDF παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένος πληθυσμός κυστιδίων (MVs: 9.330 ± 4.813 πλήθος/ μL ; R-MVs: 1.103 ± 693 πλήθος/ μL) συγκριτικά με τους ασθενείς εκείνους που ακολούθησαν τη μέθοδο cHD (MVs: 9.330 ± 4.813 πλήθος/ μL ; R-MVs: 1.103 ± 693 πλήθος/ μL) πριν την έναρξη της θεραπείας. Μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας,

παρατηρείται μείωση του συνολικού πληθυσμού των κυστιδίων στα φυσιολογικά επίπεδα (HDF: 4.077 ± 2.275 πλήθος/ μL , cHD: 5.032 ± 3.439 πλήθος/ μL) και στις δυο μεθόδους, ενώ τα ερυθροκυτταρικής προέλευσης κυστίδια διατηρήθηκαν σε υψηλά επίπεδα (HDF: 1.214 ± 952 ; cHD: 1.044 ± 627 έναντι των μαρτύρων 130 ± 85 πλήθος/ μL). Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση στα ερυθροκυτταρικής προέλευσης κυστίδια σε αρκετούς cHD ασθενείς μετά το πέρας της συνεδρίας, χαρακτηριστικό που δεν καθίσταται στατιστικά σημαντικό λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας του δείκτη σε αυτή την ομάδα των ασθενών ($P = 0,080$).

Δ.: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όλοι οι ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη αυτή χαρακτηρίζονται από αναιμία γεγονός που εκδηλώνεται μέσω των αιματολογικού τους προτύπου (χαμηλές τιμές RBCs, Hct και Hb) που οφείλεται στη μειωμένη παραγωγή ερυθροποιητίνης. Η διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με τα επίπεδα των ουραιμικών τοξινών που υπάρχουν στο αίμα των νεφροπαθών λόγω της μειωμένης λειτουργίας των νεφρών. [53] Εξαιτίας της μειωμένης λειτουργίας των νεφρών τα ερυθροκύτταρα ατόμων με ΧΝΑ έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής ενώ έχει βρεθεί συσχέτιση με τα επίπεδα των τοξινών που υπάρχουν στο αίμα των ασθενών αυτών. Οι τοξίνες οδηγούν σε οξειδωτικό στρες μέσω παραγωγής ROS που επηρεάζει τη φυσιολογική λειτουργία των ερυθροκυττάρων. [89]

Έχει δειχθεί πως η συσσώρευση μικροκυστιδίων στο πλάσμα ασθενών με ΧΝΑ εμπλέκεται σε παθολογικές καταστάσεις φλεγμονής και πήξης (συμπεριλαμβανομένων των ενδοκυτταρικών θρομβώσεων) [61 , 62] επομένως, ο χαμηλότερος ρυθμός κυστιδιοποίησης μπορεί να συνδέεται με καλύτερη λειτουργία του ενδοθηλίου όπως αναφέρθηκε σε άλλες μελέτες [64] καθώς και με μειωμένο ποσοστό καρδιαγγειακών νοσημάτων σε ασθενείς που ακολούθησαν θεραπεία με HDF έναντι εκείνων που προτίμησαν τη μέθοδο cHD [63 , 65].

Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης έχει διαφορετική επίδραση στους ασθενείς που υποβάλλονται σε HDF έναντι της cHD θεραπείας. Στους cHD ασθενείς παρατηρείται αυξημένη κυστιδιοποίηση των κυττάρων έναντι εκείνων που υποβάλλονται στην εναλλακτική μορφή θεραπείας (HDF) πριν την έναρξη της συνεδρίας, πιθανότατα λόγω του μηχανικού στρες που ασκείται στα κύτταρα κατά τη διάρκεια επαφής τους με το μηχάνημα ΑΙΚ και τα υλικά που χρησιμοποιούνται σε αυτό (φίλτρα, μεμβράνες κτλ.). [77 , 78] Μετά το πέρας της θεραπείας παρατηρείται σημαντική μείωση τόσο των ερυθροκυτταρικών όσο και του ολικού αριθμού των κυστιδίων γεγονός που επιβεβαιώνεται από την μείωση των

ουραιμικών τοξινών και πιο συγκεκριμένα της ουρίας, γεγονός που έχει αναφερθεί σε αρκετές μελέτες και μπορεί να οφείλεται εκτός από τη μείωση των τοξινών και σε επαναφορά της πίεσης που ασκείται στα κύτταρα λόγω της κυκλοφορίας του αίματος ή σε χρήση διαφορετικών πρωτοκόλλων. [79] Τα αυξημένα ποσοστά τοξινών έχει παρατηρηθεί πως εμπλέκονται στην αντίσταση σε θεραπεία με EPO, [90] επομένως μείωση αυτών πιθανότατα να επιφέρει ενεργοποίηση του μυελού των οστών προς παραγωγή ερυθροκυττάρων και αποκατάσταση της αναιμίας. [91 , 92]

Αυτή η μελέτη είναι μοναδική ως προς την αξιολόγηση της επίδρασης της HDF στην κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων στην ΧΝΑ τελικού σταδίου. Παρόλα αυτά υπάρχουν περιορισμοί. Αρχικά, οι πληθυσμοί των ασθενών είναι μάλλον μικροί, όμως πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις πριν και μετά από κάθε συνεδρία προκειμένου να αυξηθεί η στατιστική αξιοπιστία της μελέτης. Επιπλέον, δε μετρήθηκαν δείκτες άμεσης φλεγμονής όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και οι ιντερλευκίνες. Εναλλακτικά, χρησιμοποιήθηκαν δείκτες φλεγμονής όπως ο RDW, δείκτης που φανερώνει τη μειωμένη ικανότητα επιβίωσης των ερυθροκυττάρων λόγω του έντονου οξειδωτικού στρες που τα χαρακτηρίζει.

Η διαφορά μεταξύ του συνολικού αριθμού κυστιδίων (MVs) και του αριθμού των ερυθροκυτταρικής προέλευσης κυστιδίων (R-MVs) αντιστοιχεί σε πληθυσμούς κυστιδίων προερχόμενους από διαφορετικούς τύπους κυττάρων, όπως λευκοκυττάρων, αιμοπεταλίων και ενδοθηλιακών κυττάρων που δεν μελετήθηκαν μεμονωμένα στην παρούσα εργασία αλλά σίγουρα θα μπορούσαν να ανιχνευτούν με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων (π.χ. CD41a για τα αιμοπεταλιακής προέλευσης κυστίδια). Επίσης, για τα κυστίδια που προέρχονται από τα ενδοθήλια λόγω της επίδρασης των ουραιμικών τοξινών, έχει παρατηρηθεί μείωση της απελευθέρωσης του NO που οδηγεί σε δυσλειτουργία τόσο των αρτηριών όσο και του ενδοθηλίου στη ΧΝΑ. [83]

Τέλος, παρόλο που οι δύο ομάδες ασθενών δεν είχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους στις παραμέτρους που ελέγχθηκαν, η ηλικία και ο συνολικός χρόνος

στον οποίο υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, δεν κατάφεραν να εξισορροπηθούν πλήρως μεταξύ τους, έτσι συνιστάται η δημιουργία μεγαλύτερων ομάδων συνυπολογίζοντας και εξισορροπώντας αυτές και άλλες παραμέτρους. Οι πιθανές βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες (δυσμενείς ή ευεργετικές) επιδράσεις της HDF στα ερυθροκύτταρα πρέπει να ελεγχθούν εκ νέου σε ευρύτερες κλινικές δοκιμές.

Βιβλιογραφικές παραπομπές – References

1. Chin-Yee I., Arya N, d’Almeida M. The red cell storage lesion and its implication for transfusion. *Transfus Sci.* 1997; 18:447–58.
2. Bosman G., Werre J., Willekens F., et al. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion. *Transfus Med.* 2008; 18:335–47.
3. Adamson J. New blood, old blood, or no blood? *N Engl J Med.* 2008; 358:1295–6.
4. Gladwin M., Shapiro K., Daniel B., Storage lesion in banked blood due to hemolysis-dependent disruption of nitric oxide homeostasis. *Curr Opin Hematol.* 2009; 16:515–23.
5. Klein H., Anstee D. *Mollison’s blood transfusion in clinical medicine.* 11th ed. Oxford: Oxford Blackwell; 2005.
6. Mazor D., Dvilansky A., Meyerstein N. Prolonged storage of red cells: the effect of pH, adenine and phosphate. *Vox Sang.* 1994; 66: 264–9.
7. Hillyer C., Silberstein L., Ness P., et al. *Blood banking and transfusion medicine: basic principles & practice.* Livingstone:Churchill; 2006.
8. Lutz H., Stringaro-Wipf G. Senescent red cell-bound IgG is attached to band 3 protein. *Biomed Biochim Acta.* 1983; 42:S117–21.
9. Lutz H., Bussolino F., Flepp R., et al. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987; 84: 7368–72.
10. Murphy G., Reeves B., Rogers C., et al. Increased mortality, postoperative morbidity, and cost after red blood cell transfusion in αθηνείς having cardiac surgery. *Circulation.* 2007; 116: 2544–52.
11. Spinella P., Carroll C., Staff I., et al. Effect of red blood cell storage is associated with increased incidence of deep vein thrombosis and in

- hospital mortality in ασθενείς with traumatic injuries. *Crit Care*.2009; 13:R151 (1–11).
12. Koch C., Li L., Sessler D., et al. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *N Engl J Med*.2008; 358:1229–39.
 13. Klenk E., Uhlenbruck G. Über neuramin-sauerehaltiges Mucoide aus Menschenerythrocytenstroma. [On the isolation of mucoids containing neuraminic acid from human erythrocyte stroma, a contribution to the chemistry of agglutinogens.] *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*.1960; 319: 151–60.
 14. Klenk E. In: Wolstenholme GEW, O'Connor M, editors. The chemistry and biology of stone ucopolysaccharides. London: Ciba Foundation Symposium. J. & A. Churchill; 1958.
 15. Klenk E., Faillard H., Lempfrid H. Über dieenzymatische Wirkung von Influenzavirus (Enzymatic effect of the influenza virus). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*.1955; 301:235–46.
 16. Piper W. Investigations of the effect of receptor destroying enzyme' on human erythrocytes. *Acta Haemat*. 1957; 18:414–28.
 17. Abramson H. The cataphoretic velocity of mammalian red blood cells. *J Gen Physio*. 1929; 12: 711–25.
 18. Mehrishi J. Molecular aspects of the mammalian cell surface. *Prog Biophys Mol Biol*. 1972; 25: 1–70.
 19. Seaman GVF. Electrokinetic behavior of red cells. In Surgenor, D. Mac N. editor. The red blood cell. 2nd ed. New York: Academic; 1975. p. 1135–229.
 20. Cook G., Heard D., Seaman G. Sialic acids and the electrokinetic charge of human erythrocytes. *Nature*. 1961; 191: 44–7
 21. Eylar E., Madoff M., Brody O., et al. The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. *J Biol Chem*. 1962; 237: 1992–2000.
 22. Mehrishi J., Bauer J. Electrophoresis of cells and the biological relevance of surface charge. *Electrophoresis*.2002; 23:1984–94.

23. Durocher J., Payne R., Conrad M. Role of sialic acid in erythrocyte survival. *Blood*.1975; 45:11–20.
24. Danon D., Marikovsky Y. Différence de charge électrique de surface entre érythrocytes jeunes and agés. [Difference of surface electric charge between young and old erythrocytes]. *Compte Rendu Acad Sci Biol D*. 1961; 253: 1271–2.
25. Marikovsky Y., Danon D. Electron microscope analysis of young and old red blood cells stained with colloidal iron for surface charge evaluation. *J Cell Biol*. 1969; 43:1–7.
26. Yaari A. Mobility of human red blood cells of different age groups in an electric field. *Blood*. 1969; 33: 159–63.
27. Seaman G., Knox R., Nordt F., et al. Red cell aging. I. Surface charge density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes. *Blood*. 1977; 50: 1001–11.
28. Luner S., Szklarek D., Knox R., et al. Red cell charge is not a function of cell age. *Nature*. 1977; 269: 719–21.
29. Murphy G. Influence of temperature and method of centrifugation on the separation of erythrocytes. *J Lab Clin Med*. 1973; 82: 334–41.
30. Huang Y-X., Zheng X-J., Kang L-L., et al. Quantum dots as a sensor for quantitative visualization of surface charges on single living cells with nano-scale resolution. *Biosens Bioelectron*. 2011; 26: 2114–8.
31. Chen X., Huang Y., Liu W., et al. Membrane surface charge and morphological and mechanical properties of young and old erythrocytes. *Current Appl Phys*.2007; 7: e94–6.2642, The Authors Journal of Cellular and Molecular Medicine - Foundation for Cellular and Molecular Medicine/Blackwell Publishing Ltd
32. Tscharnuter W. Mobility measurements by phase analysis. *Appl Opt*. 2001; 40:3995–4003.
33. Li J., Huang Y. Superresolution measurement on the minute fluctuation of cell membrane. *Chin Sci Bull*. 2006; 51: 143–7.

34. Kang L., Huang Y., Liu W., et al. Confocal Raman microscopy on single living young and old erythrocytes. *Biopolymers*. 2008; 89: 951–9.
35. Musielak M. Red blood cell-deformability measurement: review of techniques. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2009; 42:47–64.
36. Passlick B., Flieger D., Ziegler-Heitbrock H. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*.1989; 74:2527–34.
37. Ziegler-Heitbrock H., Fingerle G., Strobel MWS., et al. The novel subset of CD14/CD16 blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol*. 1993; 23: 2053–8.
38. Varol C., Yona S., Jung S. Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes. *Immunol Cell Biol*.2009; 87:30–8.
39. Bauer J. Cell electrophoresis. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994.
40. Curtis ASG. The cell surface – its molecular role in morphogenesis. London: Logos Press; 1967.
41. Mege J., Capo C., Benoliel A-M., et al. Use of cell contour analysis to evaluate the affinity between macrophages and glutaraldehyde-treated erythrocytes. *Biophys J*.1987; 52: 177–86.
42. Hanjan S., Talwar G., Kidwai Z., et al. Delineation and quantitation of human peripheral blood lymphocyte subpopulations by electrophoretic mobility and role of surface charge in cell to cell interaction. *J Immunol*. 1977; 118: 235–41.
43. Bongrand P., Capo C., Mège J., et al. Surface physics and cell adhesion. In: Bongrand P, editor. *Physical basis of cell adhesion*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988. p. 91–123.
44. Hiroshi I. Effects of abnormal Hb on red cell membranes. *Jpn J Clin Pathol*. 1999; 47: 232–7.
45. Rauenbuehler P., Cordes K., Salhany J. Identification of the hemoglobin binding sites on the inner surface of the erythrocytes membrane. *BBA*. 1982; 692.361–70.

46. Salhany J., Cassoly R. Kinetics of p-mercuribenzoate binding to sulfhydryl groups on the isolated cytoplasmic fragment of band 3 protein. Effect of hemoglobin binding on the conformation. *J Biol Chem.* 1989; 264: 1399–404.
47. Fendel, R., Mordmüller, B., Kreidenweiss, A., Rudat, A., Steur, C., Ambrosch, C., Kirstein, M., Berbel, W., Kreamsner, P., & Brandts, C. (2007). New method to quantify erythrophagocytosis by autologous monocytes. *Cytometry Part A*, 71(4), 258-264.
48. D’Alessandro A., Kriebardis A., Rinalducci S., Antonelou M., Hansen K., Papassideri IS., Zolla L., (2015). An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies, *Transfusion.*2015;55:205-219.
49. Πάγκαλης Γ., Αιματολογία στην κλινική πράξη, Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, Αθήνα, 2008.
50. National Kidney Foundation (2002). “Definition and stages of chronic kidney disease”. Retrieved 2008-06-29.
51. Jelkmann W. (1992). “Erythropoietin: structure, control of production, and function”. *Physiol Rev.*,72(2):449-89.
52. Antonelou M., Kriebardis A., Stamoulis K., Trougakos I., Papassideri IS. (2011). “Apolipoprotein J/clusterin in human erythrocytes is involved in the molecular process of defected material disposal during vesiculation.” *PLoS One*, 6(10):e26033.
53. Antonelou M., Kriebardis A., Stamoulis K., Trougakos I., Papassideri IS. (2011). “Apolipoprotein J/Clusterin is a novel structural component of human erythrocytes and a biomarker of cellular stress and senescence.” *PLoS One*, 6(10):e26032.
54. Georgatzakou H., Antonelou M., Papassideri IS., Kriebardis AG. (2016). “Red blood cell abnormalities and the pathogenesis of anemia in end-stage renal disease”. *Proteomics Clin Appl.*, 10(8):778-90.

55. Antonelou M., Kriebardis A., Papassideri IS. (2010). "Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice". *Blood Transfus.*, 3:s39-47.
56. Abed M., Artunc F., Alzoubi K., Honisch S., Baumann D., Föller M., Lang F. (2014) "Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease." *J Mol Med*, 92(8):871-9.
57. Lang E., Lang F. (2015) "Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death." *Semin Cell Dev Biol.*, 39:35-42.
58. Greenwald T., Bryan D., Dumaswala U. (1984) Erythrocyte membrane vesiculation and changes membrane composition during storage in citrate-phosphate-dextrose-adenin-1, *Vox Sang*, 47:261-70.
59. Greenwald T., Sostok C., Dumaswala U. (1990) Studies in red blood cells preservation: Comparison of vesicle formation, morphology and membrane lipids during storage CPDA-1 and AS-1, *Vox Sang*, 58:90-3.
60. D. Robert Sutherland et al., (2012) Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry, *Cytometry B Clin Cytom.*
61. He, Z., Zhang, Y., Cao, M., Ma, R., Meng, H., Yao, Z., et al. (2016). Increased phosphatidylserine-exposing microparticles and their originating cells are associated with the coagulation process in ασθενείς with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 31(5), 747-759.
62. Ando, M., Iwata, A., Ozeki, Y., Tsuchiya, K., Akiba, T., & Nihei, H. (2002). Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic ασθενείς. *Kidney Int*, 62(5), 1757-1763.
63. Jia, P., Jin, W., Teng, J., Zhang, H., Zou, J., Liu, Z., et al. (2016). Acute Effects of Hemodiafiltration Versus Conventional Hemodialysis on Endothelial Function and Inflammation: A Randomized Crossover Study. *Medicine (Baltimore)*, 95(16), e3440.

64. Daugirdas, J. T. (2016). Lower cardiovascular mortality with high-volume hemodiafiltration: a cool effect? *Nephrol Dial Transplant*, 31(6), 853-856.
65. Maduell, F., Moreso, F., Pons, M., Ramos, R., Mora-Macia, J., Carreras, J., et al. (2013). High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis ασθενείς. *J Am Soc Nephrol*, 24(3), 487-497.
66. Biondani, A., Turrini, F., Carta, F., Matte, A., Filippini, A., Siciliano, A., et al. (2008). Heat-shock protein-27, -70 and peroxiredoxin-II show molecular chaperone function in sickle red cells: Evidence from transgenic sickle cell mouse model. *Proteomics Clin Appl*, 2(5), 706-719.
67. Rentsch, R. L., Damsgaard, R., Lundby, C., & Juel, C. (2006). Effects of darbepoetin injections on erythrocyte membrane transport protein expressions in humans. *J Appl Physiol (1985)*, 101(1), 164-168.
68. Montel-Hagen, A., Kinet, S., Manel, N., Mongellaz, C., Prohaska, R., Battini, J. L., et al. (2008). Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C. *Cell*, 132(6), 1039-1048.
69. Lutz, H. U., & Bogdanova, A. (2013). Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. *Front Physiol*, 4, 387.
70. Candan, F., & Gultekin, F. (2002). Effect of vitamin C and zinc on osmotic fragility and lipid peroxidation in zinc-deficient haemodialysis ασθενείς. *Cell Biochem Funct*, 20(2), 95-98.
71. Usberti, M., Lima, G., Arisi, M., Bufano, G., D'Avanzo, L., & Gazzotti, R. M. (1997). Effect of exogenous reduced glutathione on the survival of red blood cells in hemodialyzed ασθενείς. *J Nephrol*, 10(5), 261-265.
72. D'Arrigo, G., Baggetta, R., Tripepi, G., Galli, F., & Bolignano, D. (2017). Effects of Vitamin E-Coated versus Conventional Membranes in Chronic Hemodialysis Ασθενείς: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Blood Purif*, 43(1-3), 101-122.

- 73.** Usberti, M., Gerardi, G., Micheli, A., Tira, P., Bufano, G., Gaggia, P., et al. (2002). Effects of a vitamin E-bonded membrane and of glutathione on anemia and erythropoietin requirements in hemodialysis ασθενείς. *J Nephrol*, 15(5), 558-564.
- 74.** Yang, C. C., Hsu, S. P., Wu, M. S., Hsu, S. M., & Chien, C. T. (2006). Effects of vitamin C infusion and vitamin E-coated membrane on hemodialysis-induced oxidative stress. *Kidney Int*, 69(4), 706-714.
- 75.** Rubin O. et al. (2012) Red blood cell microparticles clinical relevance. *Transfus Med Hemothe*, 39(5): p. 342-7.
- 76.** Puddu P. et al., (2010) The involvement of circulation microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol*, 26(4): p. 140-5.
- 77.** Faure V. et al., (2006) Elevation of circulating endothelial microparticles in ασθενείς with chronic renal failure, *J Thromb Haemost* 4(3): p. 566-73
- 78.** Daniel L. et al., (2006) Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis, *Kidney Int* 69(8): p.1416-23
- 79.** Boulanger C.M. et al., (2007) In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end stage renal disease, *Hypertension*, 49(4): 902-8
- 80.** Vanholder R. et al., (1995) Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production: characterization of the role of p-cresol, *Kidney Int*, 47(2): p.510-7
- 81.** Trappenburg M.C. et al., (2012) Chronic renal failure is accompanied by endothelial activation and a large increase in microparticle numbers with reduced procoagulant capacity, *Nephrol Dial Transplant*, 27(4): p.1446-53
- 82.** Burton J.O. et al., (2013) Elevated levels of procoagulant plasma microvesicles in dialysis ασθενείς. *PloS One*, 8(8) p. e72663

- 83.** Amabile N. et al., (2005) Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in ασθενείς with end-stage renal failure, *J Am Soc Nephrol*, 16(11) p. 3381-8
- 84.** Locatelli F. et al., (2012) Predictors of haemoglobin levels and resistance to erythropoiesis-stimulating agents in ασθενείς treated with low-flux haemodialysis, haemofiltration and haemodiafiltration: results of multicentre randomized and controlled trial, *Nephrol Dial Transplant*, 27(9)Q p. 3594-600
- 85.** Van der Weerd N.C. (2014) Resistance to erythropoiesis stimulating agents in ασθενείς treated with online haemofiltration and ultrapure low-flux haemodialysis: results from a randomized controlled trial, *PloS One*, 9(4): p. e4434
- 86.** Bowry S.K. et Gatti E. (2011) Impact of haemodialysis therapy on anemia of chronic kidney disease: the potential mechanisms, *Blood Purif*, 32(3) p.210-9
- 87.** Susantitaphong P.M. Siribamrungwong and Jaber B.L. (2013) Convective therapies versus low-flux haemodialysis for chronic kidney failure: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Nephrol Dial Transplant*, 28(11): p. 2859-74
- 88.** Leurs P. B. et al., (2013) Effects of haemodiafiltration on uremic inflammation, *Blood Purif*, 35 Suppl 1Q p. 11-7
- 89.** Putri A., Thaha M. (2014) Role of oxidative stress on chronic kidney disease Progression, *Acta Med Indones.*, 46(3):244-52.
- 90.** Bamgbola O. (2011) Pattern of resistance to erythropoietin-stimulating agents in chronic kidney disease, *Kidney Int.*, 80(5):464-74.
- 91.** Ahmed M., Abed M., Voelkl J., Lang F. (2013) Triggering of suicidal erythrocyte death by uremic toxin indoxyl sulfate, *BMC Nephrol.*, 14:244.
- 92.** Ahmed M., Langer H, Abed M., Voelkl J., Lang F. (2013) The uremic toxin acrolein promotes suicidal erythrocyte death, *Kidney Blood Press Res.*, 37(2-3):158-67.