

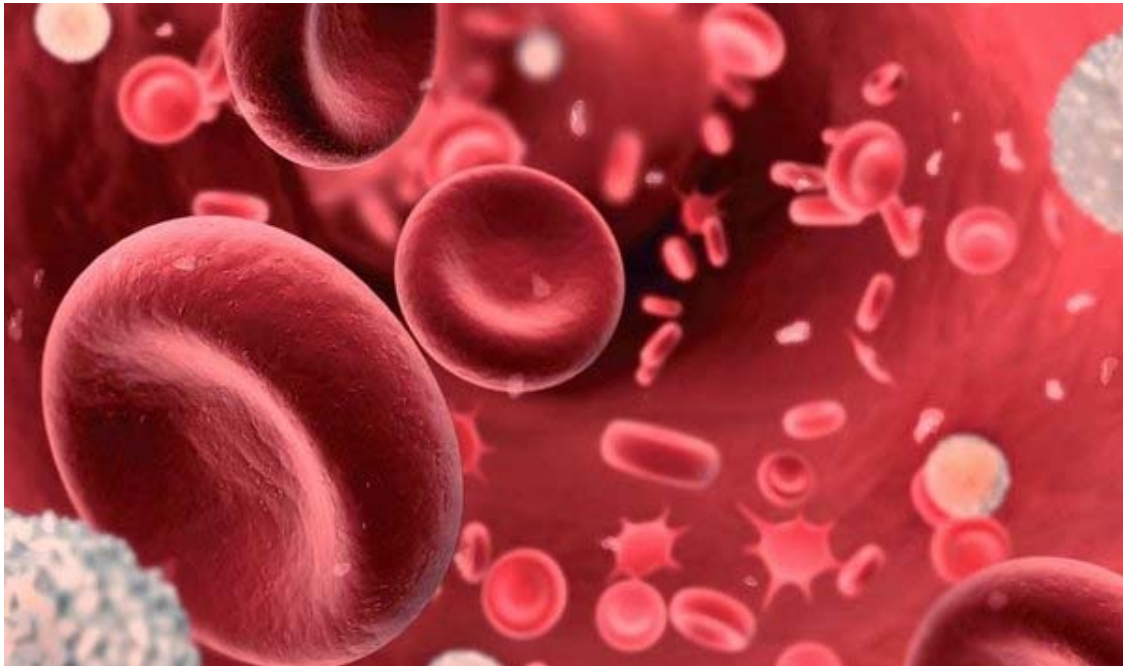
ΤΕΙ ΑΘΗΝΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

# In vitro επίδραση των ουραιμικών τοξινών σε ερυθρά αιμοσφαίρια υγιών ατόμων

---

Ευθυμιάδου Διαμάντω –  
Μπανανής Μάριος Άγγελος

Εισηγητής: Κριεμπάρδης Αναστάσιος



Αθήνα, Μάιος 2014

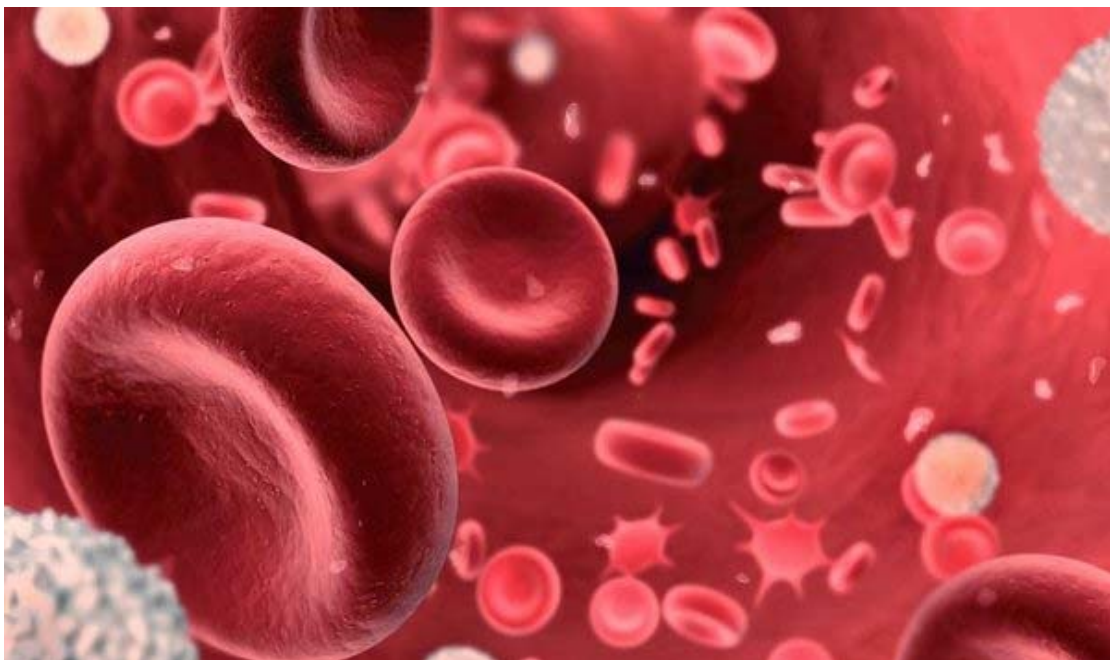
TEI OF ATHENS  
FACULTY OF HEALTH AND CARING PROFESSIONS  
DEPARTMENT OF MEDICAL LABORATORIES

# In vitro affection of the uremic toxins in red blood cells of healthy individuals'

---

Efthymiadoy Diamanto-  
Bananis Marios Angelos

Supervisor: Kriebardis Anastasios



Athens, May2014





## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας (ΤΕΙ Αθήνας) στα εργαστήρια Αιματολογίας-Αιμοδοσίας του τμήματος Ιατρικών εργαστηρίων. Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε όλους εκείνους που μας στήριξαν με τη υπομονή και τη συνεισφορά τους στην υλοποίηση της παρούσας εργασίας.

Αρχικά, θα θέλαμε να εκφράσουμε ένα μεγάλο ευχαριστώ στον εισηγητή μας Κριεμπάρδη Αναστάσιο για την βοήθεια του στην πορεία των πειραμάτων που διεξήχθησαν, το χρόνο που διέθεσε καθώς τις πολύτιμες συμβουλές του για την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Έπειτα, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον Καραμπέρη Καριοφύλλη για τη συμβολή του στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων μας καθώς και τον Γιώργο Μαρκοζάνες για την πολύτιμη συνεργασία του.

Τέλος, να εκφράσουμε θερμά τους γονείς και τους φίλους μας που στάθηκαν δίπλα μας καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειας μας.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

---

<b>XNN</b>	Χρόνια νεφρική νόσος
<b>Akt</b>	Πρωτεϊνική κινάση B
<b>ALP</b>	Αλκαλική φωσφατάση
<b>AP-1</b>	Activator Protein 1
<b>COX-2</b>	Κυκλο-οξυγενάσης 2
<b>DCFH-DA</b>	Δυοξική διχλωροφλουορεσκεΐνη
<b>DHA</b>	Δυ-υδροασκορβικό οξύ
<b>EPO</b>	Ερυθροποιητίνη
<b>ESA</b>	Διεγερτικός παράγοντας
<b>ESRD</b>	Χρόνια νεφρική νόσος τελικού σταδίου
<b>ESRF</b>	Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου
<b>FRAP</b>	Ferric Reducing Ability of Plasma
<b>GFR</b>	Ρυθμός σπειραματικής διήθησης
<b>GIT</b>	Γαστρεντερικός σωλήνας
<b>GLUT1</b>	Glucose Transporter 1
<b>Hb</b>	Αιμοσφαιρίνη
<b>HDL</b>	High-density lipoprotein
<b>HSP70</b>	Heat Shock Protein 70
<b>MCH</b>	Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης
<b>MCHC</b>	Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης
<b>MW</b>	Μοριακό βάρος
<b>NF-κB</b>	Nuclear-factor-kappa - light – chain–enhancer-of-activation B
<b>ORAC</b>	Ικανότητα απορρόφησης ριζών οξυγόνου
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCI</b>	Πρωτεωμικός καρβονυλικός δείκτης
<b>PI3K</b>	Φωσφατιδυλοσιτιδο-3 κινάση

<b>PPARs</b>	Peroxisomeproliferator–activated-receptors
<b>Prx2</b>	Peroxiredoxin II
<b>PS</b>	Φωσφατιδυλοσερίνη
<b>RBCs</b>	Red Blood Cells
<b>RDW</b>	Εύρος διακύμανσης μεγέθους ερυθρών αιμοσφαιρίων
<b>ROS</b>	Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
<b>R-Pe</b>	Φυκοερυθρίνη
<b>SCFA</b>	Short chain fatty acids
<b>SGOT</b>	Οξαλοξική τρανσαμινάση
<b>STAT</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription
<b>TEAC</b>	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

---

### ΠΡΟΛΟΓΟΣ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>Σελ 1</b>
1.1. Νεφρική νόσος .....	Σελ 1
1.1.1. Εισαγωγή .....	Σελ 1
1.1.2. Σταδιοποίηση της χρόνιας νεφρικής νόσου .....	Σελ 1
1.1.3. Βιοχημικές μεταβολές στο πλάσμα .....	Σελ 2
1.1.4. Η αναιμία στη χρόνια νεφρική νόσο .....	Σελ 3
1.2. Ερυθροκύτταρα στην αιμοκάθαρση .....	Σελ 4
1.2.1. Οξειδωτικό στρες και ROS .....	Σελ 4
1.2.2.Μορφολογικές αλλοιώσεις .....	Σελ 5
1.2.3. Πρωτέωμα κυτταρικής μεμβράνη .....	Σελ 6
1.2.4. Μεμβρανικός πρωτεωμικός καρβονυλικός δείκτης .....	Σελ 7
1.2.5. Βιοχημικοί δείκτες.....	Σελ 8
1.3. Αντιοξειδωτικά στη μονάδα τεχνητού νεφρού.....	Σελ 8
1.3.1. Εισαγωγή.....	Σελ 8
1.3.2.Τα αντιοξειδωτικά του ανθρώπινου οργανισμού και η χρήση τους	Σελ 9
1.3.3. Μέθοδοι μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος .....	Σελ 10
1.3.3.1. Μέθοδος FRAP .....	Σελ 11
1.4. Ρόδι: Μια νέα αντιοξειδωτική ουσία .....	Σελ 11
1.4.1. Εισαγωγή .....	Σελ 11
1.4.2. Χημική σύσταση .....	Σελ 12
1.4.3. Βιοδιαθεσιμότητα .....	Σελ 13
1.4.4. Μηχανισμοί δράσης και επιπτώσεις στην υγεία .....	Σελ 13
1.4.4.1. Ρόδι και παθολογικές καταστάσεις .....	Σελ 14



1.4.5. Δεσμευτική και αντιοξειδωτική ικανότητα της πουνικαλαγίνης .....	Σελ 16
---	--------

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ..... Σελ 18**

2.1 Πίνακας: Όργανα- Υλικά .....	Σελ 18
2.2.Σχεδιασμός μελέτη .....	Σελ 19
2.2.1 Επεξεργασία δειγμάτων .....	Σελ 19
2.2.2 Στάδια μελέτης .....	Σελ 20
2.3 Μέθοδοι- Πρωτόκολλα .....	Σελ 22
2.3.1 Μέθοδος υπολογισμού ελεύθερης αιμοσφαιρίνης (Hb) πλάσματος .....	Σελ 22
2.3.2.Μέθοδος υπολογισμού ωσμωτικής αντίστασης ερυθροκυττάρων .....	Σελ 22
2.3.3.Επίχρισμα αίματος .....	Σελ 23
2.3.4.Άμεση κυτταρομετρία ροής .....	Σελ 24
2.4.Στατιστική ανάλυση .....	Σελ 25

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ..... Σελ 26**

3.1. Υπολογισμός ελεύθερης αιμοσφαιρίνης .....	Σελ 26
3.1.1. Ουρία.....	Σελ 26
3.1.2. Κρεατινίνη .....	Σελ 29
3.2. Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων .....	Σελ 33
3.3.Μορφολογικές αλλοιώσεις των ερυθροκυττάρων .....	Σελ 38
3.4. Έκφραση Φωσφατιδυλοσερίνης (PS) .....	Σελ 40
3.5 Σύνοψη .....	Σελ 43
3.5.1.Επίδραση της ουρίας στα RBCs .....	Σελ 43

3.5.2.Επίδραση της κρεατινίνης στα RBCs .....	Σελ 43
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>Σελ 45</b>
4.1.Η επίδραση της ουρίας στα RBCs .....	Σελ 45
4.2.Η επίδραση της κρεατινίνης στα RBCs .....	Σελ 45
4.3. Επίδραση του εκχυλίσματος ροδιού στα RBCs .....	Σελ 45
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>Σελ 46</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>Σελ 47</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>Σελ 48</b>

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1.Νεφρική νόσος

#### 1.1.1.Εισαγωγή

Ως χρόνια νεφρική νόσος χαρακτηρίζεται η προοδευτική απώλεια της νεφρικής λειτουργίας κατά την εξέλιξη της νόσου. Η διαφοροποίηση της από την οξεία νεφρική νόσο είναι ότι η χρόνια καθορίζεται από βλάβη των νεφρών για τρεις μήνες ή και περισσότερους. Τα συμπτώματα που χαρακτηρίζουν μια νεφρική νόσο δεν είναι απαραίτητα ειδικά δηλαδή δεν προιδεάζουν τον πάσχοντα για το ενδεχόμενο αυτό, αντίθετα μπορεί να περιλαμβάνουν αδιαθεσίες, μείωση της όρεξης, κόπωση, ταχυπαλμία. Η διάγνωση μιας χρόνιας νεφρικής νόσου βασίζεται σε ευρήματα ανώμαλης δομής των νεφρών μέσω ακτινολογικού ελέγχου, παθολογικής λειτουργίας αυτών μέσω βιοχημικών εξετάσεων ή ελάττωσης του ρυθμού της σπειραματικής διήθησης (GFR) [1].

Η χρόνια νεφρική νόσος χαρακτηρίζεται από την ποσότητα της κρεατινίνης του ορού του αίματος. Υψηλά επίπεδα κρεατινίνης αντιστοιχούν σε χαμηλό δείκτη σπειραματικής διήθησης έχοντας ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ικανότητα των νεφρών να αποβάλλουν τα προϊόντα του μεταβολισμού. Στην περίπτωση όμως που τα επίπεδα της κρεατινίνης μπορεί να είναι φυσιολογικά όπου ο ασθενής βρίσκεται στα πρώτα στάδια της χρόνιας νεφρικής νόσου, η απάντηση δίνεται μέσω της γενικής εξέτασης ούρων. Η ύπαρξη ερυθρών αιμοσφαιρίων και λευκώματος στα ούρα μπορεί, επίσης, να επιβεβαιώσει τη νόσο. Για την πλήρη διερεύνηση της αιτίας της υποκείμενης νόσου διενεργούνται απεικονιστικές εξετάσεις, εξετάσεις αίματος ή ακόμα και βιοψία νεφρού ώστε να εκτιμηθεί η κατάσταση και να κριθεί αναστρέψιμη ή όχι [1].

#### 1.1.2.Σταδιοποίηση της νεφρικής νόσου

Τα στάδια της χρόνιας νεφρικής νόσου [1] βασίζονται στον υπολογισμό του δείκτη σπειραματικής διήθησης ή αλλιώς της κάθαρσης κρεατινίνης. Η σοβαρότητα αυτής της νόσου έχει ταξινομηθεί σε πέντε στάδια με το στάδιο 1 να θεωρείται η

πιο ήπια κατάσταση εμφανίζοντας ελάχιστα συμπτώματα και το στάδιο 5 ως μια σοβαρή ασθένεια με χαμηλό προσδόκιμο ζωής εάν αφεθεί χωρίς θεραπεία.

Τα στάδια της νεφρικής νόσου έχουν ως εξής:

**Πίνακας 1: Στάδια χρόνια νεφρικής νόσου (ΧΝΝ). Ανατύπωση από: National Kidney Foundation [1].**

Στάδια Χρόνιας Νεφρικής Νόσου		
Στάδιο	Περιγραφή	GFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )
1	Νεφρική βλάβη με φυσιολογικό ή αυξημένο GFR.	≥90
2	Νεφρική βλάβη με ήπια μείωση του GFR.	60-89
3	Με μέτρια μείωση του GFR.	30-59
4	Με σοβαρή μείωση του GFR.	15-29
5	Νεφρική ανεπάρκεια.	<15(ή εξωνεφρική κάθαρση)

Το πέμπτο στάδιο χαρακτηρίζεται από υπερβολική μείωση του δείκτη GFR καταλήγοντας στη χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου (ESRD) ή χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (ESRF). Για τα άτομα που εμπίπτουν σ' αυτό το στάδιο είναι σαφές πως σηματοδοτείται το τέλος της νεφρικής λειτουργίας μιας και είναι απαραίτητο να ληφθούν αναγκαία μέτρα για την επέκταση του χρόνου ζωής τους (αιμοκάθαρση, περιτοναϊκή κάθαρση, μεταμόσχευση νεφρού) [2].

### 1.1.3.Βιοχημικές μεταβολές στο πλάσμα

Οι ασθενείς που νοσούν από νεφροπάθεια τελικού σταδίου παρουσιάζουν εκτεταμένη παραγωγή τοξινών, οι οποίες οδηγούν σε οξειδωτικές αλλοιώσεις έπειτα από αλληλεπίδραση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια της περιφέρειας [15]. Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ανιχνεύεται κυρίως μέσω αύξησης της κρεατινίνης του πλάσματος. Η συγκέντρωση της κρεατινίνης στο πλάσμα είναι αντιστρόφως ανάλογη του GFR. Αυτό όμως δεν προϋποθέτει ότι κατά την απότομη μείωση του GFR υπάρχει ταυτόχρονη αύξηση των τιμών της κρεατινίνης. Επομένως, μια τιμή κρεατινίνης εντός των φυσιολογικών ορίων δεν συνεπάγεται και απαραίτητα μια ομαλή νεφρική λειτουργία [4]. Αυτό συμβαίνει διότι τα επίπεδα κρεατινίνης δε μπορούν να απεικονίσουν τις αλλαγές του GFR σε πραγματικό χρόνο. Προφανώς, η κρεατινίνη απαιτεί χρόνο ώστε να μπορέσει να συσσωρευτεί και να χαρακτηριστεί ως μη φυσιολογική οδηγώντας σε καθυστέρηση της διάγνωσης.

Εκτός από την κρεατινίνη, που αποτελεί αξιόπιστο μάρτυρα για την λειτουργία των νεφρών, η ουρία συντελεί και αυτή στην αξιολόγηση της νεφρικής νόσου. Οι μεταβολές που υπόκειται η ουρία του πλάσματος αποτελεί ενδεικτικό στοιχείο για τη νεφρική ανεπάρκεια. Σημαντική όμως θεωρείται και η πιθανή εξωνεφρική παρέμβαση στις συγκεντρώσεις της ουρίας κάτι που σίγουρα δεν ενοχοποιεί τους νεφρούς αλλά επηρεάζει την ενδογενή παραγωγή και την νεφρική κάθαρση ανεξαρτήτως GFR [4]. Η συγκέντρωση της ουρίας από μόνη της προδιαθέτει για δυσμενείς μεταβολικές και βιοχημικές επιδράσεις όπως η αύξηση του οξειδωτικού στρες, η μεταβολή της λειτουργίας της αντλίας καλίου-νατρίου ( $K^+$ - $Na^+$ ) και μεταβολές στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος[5].

#### 1.1.4. Η αναιμία στη χρόνια νεφρική νόσο

Η αναιμία της χρόνιας νεφρικής νόσου είναι μια νορμόχρωμη, νορμοκυτταρική αναιμία που αποτελεί χαρακτηριστικό σύμπτωμα με εμφάνιση σε ποσοστό 47,7% σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο πριν αυτοί μπουν στη διαδικασία της αιμοκάθαρσης [6]. Οι ασθενείς θα πρέπει να ελέγχονται τακτικά σχετικά με την τιμή της αιμοσφαιρίνης ενώ η παρακολούθηση πρέπει να εντείνεται όταν αυτοί βρίσκονται σε προχωρημένα στάδια της νεφρικής νόσου. Μόλις ξεκινήσει η υποστήριξη των ασθενών για διέγερση της ερυθροποίησης, η αξιολόγηση της αιμοσφαιρίνης γίνεται συχνότερα (μηνιαίως) [7]. Η αναιμία που εκδηλώνεται στους περισσότερους ασθενείς οφείλεται στην ανεπάρκεια ερυθροποιητίνης (EPO) λόγω αναστολής της διαδικασίας της ερυθροποίησης από ουραιμικά διαλυτά στοιχεία και μείωσης της διάρκειας ζωής των ερυθροκυττάρων. Αυτή είναι και η κύρια αιτία της αναιμίας στη χρόνια νεφρική νόσο [8,10]. Η δυσλειτουργία της ενδογενούς ερυθροποιητίνης είναι συνήθως κλινικά εμφανής όταν ο GFR πέφτει κάτω από 20-25 ml/min. Άλλες αιτίες αποτελούν η ανεπάρκεια σιδήρου, βιταμίνης B12, φυλλικού οξέος ή η απώλεια αίματος [9]. Η ανεπάρκεια του σιδήρου μπορεί να οφείλεται σε διάφορες αιτίες όπως η λανθάνουσα απώλεια αίματος μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα (GIT) εξαιτίας ανωμαλίας της δομής των αιμοπεταλίων, συχνών φλεβοτομιών και τρυπημάτων για αιμοκάθαρση. Η αξιολόγηση των αποθεμάτων του σιδήρου στον ορό, του αριθμού των ερυθροκυττάρων και των δικτυοερυθροκυττάρων, των επιχρισμάτων αίματος, των εκτιμήσεων για αιμολυτική αναιμία και της ύπαρξης γαστρεντερικής αιμορραγίας πρέπει να είναι κύριο μέλημα για την μελέτη ενός ιστορικού αναιμίας [11].

Η διάγνωση της αναιμίας στη χρόνια νεφρική νόσο γίνεται συνήθως μετά των αποκλεισμό άλλων αιτιών. Η αντιμετώπιση της αναιμίας στα πρώιμα στάδια της χρόνιας νεφρικής νόσου μπορεί να αποκλείσει την περαιτέρω επιδείνωση και να

μειώσει τη συχνότητα εμφάνισης επιπλοκών [12]. Η θεραπεία ωστόσο βασίζεται στη διόρθωση της ανεπάρκειας του σιδήρου και την αντικατάσταση της μειωμένης παραγωγής ερυθροποιητίνης από διεγερτικούς παράγοντες (ESA).

## 1.2.Ερυθροκύτταρα στην αιμοκάθαρση

Η αναιμία είναι μια από τις συνηθισμένες επιπλοκές στους ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, λόγω της μειωμένης ή και της απουσίας σύνθεσης ερυθροποιητίνης (EPO). Επιπλέον τα ήδη υπάρχοντα ερυθροκύτταρα δέχονται μηχανική καταπόνηση (mechanical stress) κατά τη ροή τους μέσα στη συσκευή αιμοκάθαρσης, καθώς και μεταβολική καταπόνηση (metabolic stress) λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ουραιμικών τοξινών και της απώλειας γλυκόζης, έχοντας ως αποτέλεσμα την αιμόλυση τους [**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**3]. Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης όμως φαίνεται πως σχετίζεται με μια τάση αύξησης των δεικτών μέσης περιεκτικότητας αιμοσφαιρίνης (MCH) και μέσης συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης (MCHC) που σχετίζονται με την περιεκτικότητα των RBCs σε αιμοσφαιρίνη (Hb). Η αύξηση αυτή, της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης, σε συνδυασμό με την συνεχή χορήγηση ερυθροποιητίνης (EPO) έχει συσχετιστεί με κυτταρικές αλλαγές όπως η απώλεια της κυτταρικής επιφάνειας [14], η παθολογική ρύθμιση της ενυδάτωσης του κυττάρου και οι αλλαγές στην πρωτεϊνική του δομή [15]. Οι αλλαγές στην πρωτεϊνική σύνθεση της μεμβράνης των κυττάρων έχουν ως αποτέλεσμα την μειωμένη ικανότητα ροής μέσω των τριχοειδών και την ικανότητα επιβίωσης τους [16]. Επίσης η επαφή των ερυθροκυττάρων με τα τοιχώματα της συσκευής της αιμοκάθαρσης προκαλεί την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου(ROS). Η απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων, καθώς επίσης και πολλοί άλλοι παράγοντες όπως η ηλικία, οι χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις κάνουν την ύπαρξη του οξειδωτικού στρες στο αίμα ουσιαστικό στοιχείο στην ουραιμική κατάσταση [17]. Φαίνεται όμως πως η οξείδωση των πρωτεϊνών των ερυθροκυττάρων είναι ένα κύριο αίτιο της χρόνιας αναιμίας στη νεφρική ανεπάρκεια σε ασθενείς που υφίστανται αιμοκάθαρση [18]. Οι ουραιμικοί δείκτες διαφέρουν αρκετά μεταξύ των ασθενών αλλά αντικατοπτρίζονται πλήρως, όχι μόνο στις βιοχημικές εξετάσεις του ορού αλλά και στους παράγοντες στρες στο πλάσμα, στα κύτταρα και στο σχήμα των κυττάρων [15].

### 1.2.1.Οξειδωτικό στρες και ROS

Η ουραιμία θεωρείται ως μια προ-οξειδωτική κατάσταση νόσου [19]. Οι ενζυμικοί, αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί των ερυθροκυττάρων είναι γνωστό πως καταστέλλονται στην χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και ειδικά στα ερυθροκύτταρα των ασθενών που υφίστανται αιμοκάθαρση [20] αν και η καταστολή αυτή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η ηλικία του ασθενή [21]. Όμως η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος φαίνεται να παραμένει σταθερή ή ακόμα και να αυξάνεται σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που υφίστανται αιμοκάθαρση [15]. Πιο συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί και έχει βρεθεί πως η διαδικασία της αιμοκάθαρσης μπορεί να μειώσει τα πολύ υψηλά ποσά συγκέντρωσης των ενδογενώς παραγόμενων ROS στις περισσότερες περιπτώσεις, αλλά όχι να τα επαναφέρει στις φυσιολογικές τιμές, υποδεικνύοντας έτσι την πολυπαραγοντική φύση της νόσου και την ουραιμική κατάσταση, και όχι την αιμοκάθαρση, ως αίτιο του οξειδωτικού στρες [22,23,24]. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η εξωγενής παραγωγή ROS, η οποία βρέθηκε αυξημένη μετά την αιμοκάθαρση. Τα ενδοκυτταρικά ROS φαίνεται να σχετίζονται με την χαμηλή ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος [15]. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και για την ρευστότητα της μεμβράνης [25] και την ευαισθησία στην λιπιδική υπεροξειδάση [26]. Η αύξηση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης στα κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη αυτό-οξείδωση της αιμοσφαιρίνης [27,28]. Επίσης, αυξάνεται η δέσμευση της Prx2 (Peroxiredoxin II) η οποία θεωρείται ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό για τα ερυθροκύτταρα [29,30,31] το οποίο υποδηλώνει την παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα [26]. Τέλος το ασκορβικό οξύ, ως μέσο σάρωσης των ROS οξειδώνεται σε δι-υδροασκορβικό οξύ (DHA) το οποίο περνάει στα ερυθροκύτταρα μέσω της GLUT1 (Glucose Transporter 1) [32]. Μέσα στα ερυθροκύτταρα αυτό επανέρχεται στην αρχική του μορφή και κατ' επέκταση στο πλάσμα. Στους νεφροπαθείς που κάνουν αιμοκάθαρση έχει παρατηρηθεί αυξημένη μετατροπή του ασκορβικού οξέος σε δι-υδροασκορβικό οξύ (DHA) [33]. Συμπερασματικά τα ερυθρά αιμοσφαίρια των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, βρίσκονται μόνιμα υπό την επήρεια αυξημένου οξειδωτικού στρες με την αιμοκάθαρση να μπορεί μόνο να μειώσει τα ποσά των ήδη υπαρχόντων ROS, προκαλώντας όμως την παραγωγή άλλων εξαιτίας της αυξημένης ευαισθησίας των ερυθροκυττάρων στα εξωγενή οξειδωτικά ερεθίσματα [24].

### 1.2.2.Μορφολογικές αλλοιώσεις

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια παρουσιάζουν μεμβρανική αστάθεια με αποτέλεσμα την απελευθέρωση κυστιδίων

και την αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων. Συνήθως παρουσιάζεται εχينوκυττάρωση και παραμόρφωση των ερυθροκυττάρων σε κυπελλοειδή κύτταρα ομοιάζοντα των στοματοκυττάρων, με παρουσία κενοδοπιών στο κυτταρόπλασμά τους που διαχωρίζονται με κυτταρική μεμβράνη [34]. Είναι πιθανή η παρουσία και άλλων μορφών των ερυθροκυττάρων όπως στοχοκύτταρα, στοματοκύτταρα και σφαιροκύτταρα, και σε μικρότερο ποσοστό δακρυκύτταρα, οβαλοκύτταρα, ελλειπτοκύτταρα και σχιστοκύτταρα σύμφωνα με τα κριτήρια κατηγοριοποίησης αντιστρεπτών και μη αλλαγών [35,36]. Επίσης λόγω της ερυθροποιητίνης που χορηγείται στις περισσότερες περιπτώσεις των ασθενών παρουσιάζεται ανισοκυττάρωση [24]. Οι αποκλίσεις αυτές από το φυσιολογικό σχήμα του αμφίκουλου δίσκου, με συνηθέστερα τα εχिनोकύτταρα και τα στοματοκύτταρα, γίνονται για επαναφορά της επιφανειακής ομοιόστασης, επηρεάζοντας όμως το ιξώδες του αίματος και την ικανότητα παραμόρφωσης της μεμβράνης και τη ρευστότητά της [34,37], τα οποία σε συνδυασμό με την αυξημένη οξειδωση στις μεμβρανικές πρωτεΐνες οδηγεί στην φαγοκυττάρωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και στη μειωμένη βιωσιμότητα τους *in vivo* [38]. Η αιμοκάθαρση φαίνεται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας μιας προσωρινής εμφάνισης αυξημένου ποσοστού εχينوκυττάρων [39], με τα ποσοστά των εχينوκυττάρων μετά το τέλος της διαδικασίας της αιμοκάθαρσης να παρουσιάζονται μειωμένα σε σύγκριση με τα αρχικά επίπεδα [40]. Με την αναστολή του ερεθίσματος που προκαλεί την εχينوκυττάρωση, τα ερυθροκύτταρα ανακάμπτουν από τη μορφή αυτή. Όμως σε κάποιες περιπτώσεις αυτή η ανάκαμψη προκαλεί μια οξειδοαναγωγικά συσχετιζόμενη μορφολογική αστάθεια και τα κύτταρα αυτά μεταπίπτουν σε στοματοκύτταρα αντί του φυσιολογικού αμφίκουλου δίσκου [41]. Επομένως σε περιπτώσεις μικρότερου βαθμού οξειδωτικού στρες, περισσότερα εχινोकύτταρα μεταπίπτουν σε στοματοκύτταρα και σε φυσιολογικά κύτταρα. Το μηχανικό στρες που προκαλείται στα ερυθροκύτταρα από την αιμοκάθαρση προκαλεί δυσμενείς αλλαγές στην περιεκτικότητα των κυττάρων σε αιμοσφαιρίνη [15], στη μετάπτωση αυτών σε στοματοκύτταρα αλλά και σε άλλες παθολογικές μορφές [26] και στην αυξημένη ωσμωτική ευθραυστότητα αυτών [42].

### 1.2.3. Πρωτέωμα κυτταρικής μεμβράνης

Σε προηγούμενες μελέτες έχουν αναφερθεί μετασχηματισμοί στο ηλεκτροφοριστικό προφίλ των ερυθροκυττάρων στους ασθενείς τελικού σταδίου με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια [42,43]. Αυτοί οι μετασχηματισμοί φαίνονται να μειώνονται με την διαδικασία της αιμοκάθαρσης [24]. Οι μεμβρανικές αυτές αναδιαμορφώσεις συσχετίζονται με πρωτεϊνικές τροποποιήσεις λόγω οξειδωσης και προσαρμωστικές αντιδράσεις της μεμβράνης την οξειδοαναγωγική αυτή κατάσταση.



Είναι συνηθισμένη η έλλειψη σπεκτρίνης, ζώνης 3, παλλιδίνης, ακτίνης και στοματίνης [43,44,45], και παρατηρείται σοβαρή μείωση της CD47 στα ερυθρά αιμοσφαίρια μετά την αιμοκάθαρση [46] καθώς επίσης και εμφάνιση έκτοπων ζωνών (θραύσματα). Σε αντίθεση, η δεσμευμένη στην μεμβράνη Prx-2 (Peroxiredoxin II), HSP70 (Heat Shock Protein 70), καλπαΐνη-1 και τα IgGs είναι αυξημένες [24]. Η δημιουργία του συμπλέγματος σπεκτρίνη-αιμοσφαιρίνη (ζώνη 255 kDa) [38] και η δέσμευση της κυτοσολικής HSP70 (Heat Shock Protein 70) και Prx-2 (Peroxiredoxin II) στην μεμβράνη [47] είναι τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα και υποδηλώνουν διαταραχή στην φυσιολογική γήρανση του κυττάρου, πιθανώς λόγω των αυξημένων επιπέδων των ενδογενών ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) [38]. **Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.** Τα επίπεδα των ουμικοποιητινών είναι σημαντικά υψηλότερα στα κύτταρα των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, το οποίο όμως δικαιολογείται αφού οι ασθενείς αυτοί έχουν νεότερα ερυθροκύτταρα και πιο ευέλικτα [25]. **Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**, ενώ οι ουβικουιτινομένες πρωτεΐνες μειώνονται με την γήρανση των κυττάρων και την μειωμένη ικανότητα παραμόρφωσης τους [48], όμως τα ποσά αυτά μπορούν να διορθωθούν αρκετά με την αιμοκάθαρση [24]. Τέλος, η GLUT1 (Glucose Transporter 1), η οποία έχει συσχετιστεί με πολλές ενδοκυτταρικές λειτουργίες των ερυθροκυττάρων, είναι μειωμένη, ως άμεση απάντηση στην έλλειψη της ζώνης 3, αφού οι πρωτεΐνες αυτές έχουν ρόλο ζωτικής σημασίας στην δομή της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων [49]. Με την αύξηση της GLUT1 (Glucose Transporter 1) αυξάνεται η πρόσληψη της γλυκόζης στα κύτταρα με αποτέλεσμα τα χαμηλά επίπεδα αυτής στο πλάσμα [26].

#### 1.2.4.Μεμβρανικός πρωτεωμικός καρβονυλικός δείκτης

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών είναι μία μη αναστρεπτή αντίδραση κατά την οποία παράγωγα καρβονυλίων εισάγονται στις πρωτεΐνες είτε με μία άμεση αντίδραση οξείδωσης είτε με μία δευτερεύουσα πρωτεϊνική αντίδραση με αντιδρώντες καρβονυλικές ενώσεις [50]. Η ουραιμία θεωρείται ως μια κατάσταση έντονου καρβονυλικού στρες [51]. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών υπολογίζεται με τον πρωτεωμικό καρβονυλικό δείκτη (PCI), ο οποίος είναι ελαφρά αυξημένος στους ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια και φαίνεται να αυξάνεται κατά τη διάρκεια αλλά και μετά την αιμοκάθαρση [24,25]. Η αύξηση αυτή γίνεται περισσότερο αισθητή στους ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας καθώς σε αυτούς ο πρωτεωμικός καρβονυλικός δείκτης (PCI) αυξανόταν κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης ενώ παρέμενε σταθερός ή ακόμα και βελτιωνόταν σε ασθενείς με καλύτερη πρόγνωση [15]. Η αύξηση αυτή υποδηλώνει ότι τα κύτταρα υφίστανται

σοβαρές μεμβρανικές αλλοιώσεις κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης. Παρά το γεγονός ότι κατά την αιμοκάθαρση μπορούν να απομακρυνθούν και αντιδρώντες καρβονυλικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους αλλά και καρβονυλομένες ενώσεις από το πλάσμα, καρβονυλικές ομάδες ανευρίσκονται στο πλάσμα και μετά το τέλος της αιμοκάθαρσης [52]. Όμως, δεν έχει γίνει δυνατή η συσχέτιση του πρωτεωμικού καρβονυλικού δείκτη (PCI) και των ενδοκυττάρων ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα πως η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών είναι προϊόν μη οξειδωτικών οδών ή πως υπάρχει κάποια αποτελεσματική πρωτεωμική απάντηση η οποία εξουδετερώνει τους οξειδωτικούς παράγοντες πριν αυτοί δημιουργήσουν μόνιμες καρβονυλικές αλλοιώσεις [24].

### 1.2.5.Βιοχημικοί δείκτες

Οι ουραιμικές τοξίνες αλληλεπιδρούν με τα ερυθροκύτταρα οδηγώντας τα σε μεμονωμένες ή εκτεταμένες οξειδωτικές αλλοιώσεις. Με την αιμοκάθαρση οι τοξίνες αυτές μειώνονται και με χρόνια θεραπεία τα επίπεδα παραμένουν σταθερά ή βελτιώνονται δείχνοντας την αποτελεσματικότητα της τεχνικής. Το ίδιο ισχύει για το γενικότερο βιοχημικό πρότυπο των ασθενών με χρόνια νεφρική νόσο [15]. Τα υψηλά αρχικά επίπεδα των ουραιμικών τοξινών καθώς και η παρατεταμένη αιμοκάθαρση έχουν θεωρηθεί ως παράγοντες κινδύνου [19,53]. Τα επίπεδα της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) και της οξαλοξικής τρανσαμινάσης (SGOT) μπορούν να ποικίλουν, συχνά ανεξάρτητα από τα υπόλοιπα ηπατικά ένζυμα, καθιστώντας τα και αυτά ως δείκτες καρδιαγγειακών νοσημάτων σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια [54]. Παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα ATP-άσης στην μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων των ασθενών, το οποίο έχει ως άμεση συνέπεια στα επίπεδα ασβεστίου του κυττάρου αλλά και στην ενυδάτωση αυτού αυξάνοντας έτσι την ωσμωτική αντίστασή του [42]. Η αύξηση του  $Ca^{2+}$  ενεργοποιεί  $Ca^{2+}$  εξαρτώμενα κανάλια καλίου [116] τα οποία οδηγούν στην συρρίκνωση του κυττάρου λόγω αποβολής  $K^+$ ,  $Cl^-$ , υπερπόλωση και συνεπώς κυτταρικού χλωριούχου καλίου (KCl) και την απώλεια νερού [117]. Επίσης ενεργοποιεί μια ανακατανομή στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων η οποία οδηγεί την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην επιφάνεια αυτών με αποτέλεσμα τον κυτταρικό τους θάνατο [116].

## 1.3.Αντιοξειδωτικά στην μονάδα τεχνητού νεφρού

### 1.3.1.Εισαγωγή

Τα αντιοξειδωτικά είναι φυσικές ή τεχνητές ουσίες που μπορούν να αποτρέψουν ή να καθυστερήσουν κάποιους τύπους βλάβης των κυττάρων. Η υπερβολική λήψη όμως αντιοξειδωτικών ουσιών είναι πολύ πιθανό να επιφέρει τα αντίθετα αποτελέσματα, χωρίς βεβαία η απουσία τους να καθίσταται ωφέλιμη. Το οξειδωτικό στρες προκύπτει κατά την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών ή/και λόγω της ανεπάρκειας αντιοξειδωτικών του οργανισμού, οδηγώντας σε εκτεταμένες καταστάσεις όπως η ουραιμία [56-61]. Τα ελλείμματα του οργανισμού σε αντιοξειδωτικά μπορεί να προκύψουν ως αποτέλεσμα μειωμένης πρόσληψης αυτών (όπως η βιταμίνες E και C), ή σύνθεσης ενζύμων (όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) ή αυξημένης χρήσης τους [55].

Οι διαταραχές στην κανονική κατάσταση οξειδοαναγωγής των κυττάρων μπορεί να προκαλέσει τοξικές επιδράσεις μέσω της παραγωγής υπεροξειδίων και ελευθέρων ριζών που καταστρέφουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA. Έτσι, το οξειδωτικό στρες [57] ενοχοποιείται για διαταραχές στη λειτουργία των μηχανισμών της κυτταρικής σηματοδότησης.

Η νεφρική νόσος τελικού σταδίου (ESRD), σχετίζεται με πολλές επιπλοκές που προκύπτουν από την περίσσεια της ποσότητας ελευθέρων ριζών και/ή τη μειωμένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Σημειώνεται ότι οι ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση εκτίθενται ταυτόχρονα σε οξειδωτικό στρες και φλεγμονές, γεγονότα που είναι στενά συνδεδεμένα με τις κυτταρικές διεργασίες [57,62].

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, είναι ουσιαστικά το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης διαφορετικών ενώσεων και μεταβολιτών που δρουν ομαδικά για την προστασία του κυττάρου από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS).

### 1.3.2. Τα αντιοξειδωτικά του ανθρώπινου οργανισμού και η χρήση τους

Το ουρικό και το ασκορβικό οξύ είναι από τα πιο συνηθισμένα αντιοξειδωτικά του ανθρώπινου οργανισμού και ανήκουν στα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά. Εκτός από αυτά, υπάρχουν και τα λιποδιαλυτά όπου βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις έναντι των υδατοδιαλυτών. Ουσιαστικά, υπάρχει ένα ευρύ δίκτυο αντιοξειδωτικών ουσιών, το οποίο έχει σαν κύριο στόχο του τον εντοπισμό των ελευθέρων ριζών.

Η βιταμίνη C όπως είναι το ευρέως γνωστό όνομα του ασκορβικού οξέος [55], είναι μια από τις πιο διαδεδομένες ουσίες με αντιοξειδωτική δράση, η οποία κατά την ύπαρξη ελευθέρων ριζών ενεργεί ως αναγωγικό μέσο εμποδίζοντας την δημιουργία οξειδωτικού στρες κατάστασης που δηλώνει την περίσσεια των ελευθέρων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό. Δεν είναι ακόμη βέβαιο, αν η βιταμίνη C και γενικότερα τα αντιοξειδωτικά προλαμβάνουν το οξειδωτικό στρες προάγοντας την υγεία.

Το ουρικό οξύ θεωρείται και αυτό μεταξύ των άλλων ένας αξιόπιστος δείκτης του οξειδωτικού στρες [63], ο οποίος παίζει σημαντικό θεραπευτικό ρόλο και ως αντιοξειδωτικό μέσο. Πρόκειται για ένα επιλεκτικό αντιοξειδωτικό με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση και ιδιαίτερα ικανό διότι δεν αντιδρά με κάποια οξειδωτικά, όπως το υπεροξειδίο [64], αλλά δρα ενάντια των υπεροξειδίων, του υπεροξυνιτρώδους και του υποχλωριώδους οξέος [65], καθώς επίσης να μετατρέπεται σε αβλαβή προϊόντα για το μεταβολισμό όπως αλλαντοΐνη, γλυοξικό, οξαλικό και ουρία. Σημαντικό, επίσης, θεωρείται ότι το ουρικό οξύ παρέχει πάνω από το ήμισυ της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος [64].

Ο ρόλος του σε συνθήκες οξειδωτικού στρες δεν είναι απολύτως σαφές. Αποδεικτικά στοιχεία βασιζόμενα κυρίως σε επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες δείχνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα του ουρικού οξέος στον ορό είναι ένας παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο, όπου το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο. Επίσης, η αλλοπουρινόλη, ένας αναστολέας οξειδοοξειδωτικής ξανθίνης που μειώνει τα επίπεδα του ουρικού οξέος στον ορό ασκεί προστατευτική δράση σε καταστάσεις που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (π.χ. ισχαιμία, καρδιαγγειακή νόσος) [66]. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετά πειραματικά και κλινικά στοιχεία που δείχνουν ότι το ουρικό οξύ διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο ως αντιοξειδωτικό *in vivo*.

Η χρήση των αντιοξειδωτικών ουσιών για την πρόληψη κάποιας νόσου θεωρείται μια κατάσταση αμφιλεγόμενη [67]. Σε διάφορες ομάδες υψηλού κινδύνου, όπως αυτή των καπνιστών, η χορήγηση υψηλής δόσης συνθετικής β-καροτίνης αυξάνει το οξειδωτικό στρες, συνεπώς και την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα [68]. Σε ομάδες μικρότερου υψηλού κινδύνου, η χρήση της βιταμίνης E φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων [69].

### 1.3.3. Μέθοδοι μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος

Για τη μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η ετερογένεια του πλάσματος, ότι αποτελείται δηλαδή τόσο από υδατοδιαλυτά όσο και από λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά [70,72].

Η πρώτη μέθοδος περιλαμβάνει την χρήση οξειδωτικών που δρουν ως προ-οξειδωτικά (παραγωγοί ριζών) και που ελέγχονται από έναν εξωγενή, που δύναται να οξειδωθεί. Η οξείδωση του καθετήρα θεωρητικά θα κατασταλεί από την παρουσία των αντιοξειδωτικών στο πλάσμα κατά την διάρκεια της παραγωγής ριζών [71]. Σ' αυτή την κατηγορία μεθόδων περιλαμβάνονται:

1. η μέθοδος ανάλυσης TRAP των Wayner et al (FEBS Lett 1985, 187:33 37).
2. η μέθοδος ανάλυσης της ικανότητας απορρόφησης των ριζών οξυγόνου (ORAC).
3. οι μέθοδοι ανάλυσης που βασίζονται στη δυοξική διχλωροφλουορεσκεΐνης (DCFH-DA), στην φυκοερυθρίνη (R-Pe), και στην κροκίνη.

Η δεύτερη μέθοδος αφορά την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα μέσω της αναχαίτισης μιας σταθερής και προ-σηματισμένης ρίζας που δεν δρα ,όμως, ως προ-οξειδωτικό. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται:

1. οι μέθοδοι ανάλυσης TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) και FRAP(Ferric Reducing Ability of Plasma).
2. η διαδικασία κυκλικής βολταμετρίας.

#### 1.3.3.1.Δοκιμασία FRAP

Πρόκειται για μια δοκιμασία μετατροπής του συμπλόκου του τρισθενούς σιδήρου σε σύμπλοκο δισθενούς σιδήρου από τα αντιοξειδωτικά του πλάσματος, με σκοπό τη μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής του ικανότητας [73]. Είναι μια μέθοδος απλή και πλήρως αυτοματοποιημένη, η οποία βασίζεται στην αλλαγή της απορρόφησης λόγω της αναγωγής του φορτίου του σιδήρου από τρισθενή σε δισθενή. Συνήθως συνδυάζεται με την μέτρηση της συμμετοχής του ουρικού οξέως για το οποίο μετράτε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος πριν και μετά την αδρανοποίηση του ουρικού οξέως με ουρικάσες. Η δοκιμασία FRAP αποτελείται από μια μη ειδική αντίδραση, καθώς οποιαδήποτε ημιαντίδραση έχει χαμηλότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, υπό τις αναγωγικές συνθήκες της αντίδρασης, από την αντίδραση τρισθενούς-δισθενούς σιδήρου θα οδηγήσει στη δημιουργία ιόντων  $Fe^{2+}$  [73].

## 1.4.Ρόδι: Μια νέα αντιοξειδωτική ουσία

### 1.4.1.Εισαγωγή

Η ροδιά (*Punicagranatum*) είναι ένας οπωροφόρος φυλλοβόλος θάμνος, ο καρπός του οποίου χαρακτηρίζεται από την παρουσία λεπτών μεμβρανών στο εσωτερικό του, επιτρέποντας τη διαμερισματοποίηση των επισπέρμων, όπου το καθένα περιβάλλεται από σάκους που περιέχουν χυμό. Ο καρπός μπορεί να διαχωριστεί σε τρία κυρίως μέρη: τον καρπό, τον χυμό και το φλοιό [74].

Αυτό το φρούτο έχει κινήσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας με εκατοντάδες δημοσιεύσεις στο διαδίκτυο την τελευταία δεκαετία, καθώς από αρχαιότατων χρόνων χρησιμοποιείται για την θεραπεία διαφόρων παθήσεων όπως παρασιτώσεις, μικροβιακές λοιμώξεις, διάρροια, έλκη, αιμορραγίες, αναπνευστικές επιπλοκές [75,76]. Κάποιες σύγχρονες εφαρμογές της θεραπευτικής δράσης του ροδιού έχουν να κάνουν με τη θεραπεία ορμονικής αντικατάστασης, την υγιεινή του στόματος, την αγωγή καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος και τις καρδιαγγειακές επιπλοκές, ενώ διερευνούνται η αντικαρκινική, η αντιφλεγμονώδης, η αντιική, η αντιβακτηριακή, και κατά της παχυσαρκίας δράσεις αυτού [77,78]. Ως εκ τούτου, η μελέτη των βιοενεργών συστατικών του και η συσχέτισή τους με συγκεκριμένους μηχανισμούς δράσης και τις επιπτώσεις αυτών στην υγεία υπόσχεται πολλά για την ανάπτυξη θεραπευτικών προϊόντων με βάση το ρόδι.

### 1.4.2.Χημική σύσταση

Εκχυλίσματα από διαφορετικά μέρη του φρούτου φαίνονται να έχουν διαφορετικές δράσεις [74]. Σύμφωνα με έρευνες, φαίνεται ότι τα πιο σημαντικά συστατικά είναι το ελλαγικό οξύ, οι ελλαγιταννίνες (εμπεριεχομένου της πουνικαλαγίνης), το πουνικικό οξύ, τα φλαβοειδή, οι ανθοκυανιδίνες, οι ανθοκυανίνες, οι οιστρογονικές φλαβονόλες και οι φλαβόνες [79]. Παρ' όλα αυτά δεν είναι ακόμα γνωστή η σχέση χημικής σύστασης και θεραπευτικής ιδιότητας, αν και έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην αναγνώριση αυτών. Το ελλαγικό οξύ, το οποίο παρουσιάζει και αντιοξειδωτικές αλλά και αντικαρκινικές ιδιότητες [80,81], θεωρείται από πολλούς το σημαντικό συστατικό για τη σπουδαία θεραπευτική του αξία. Όμως πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν πως η συνδυαστική δράση αρκετών συστατικών του ροδιού είναι πιο αποτελεσματική από την μεμονωμένη δράση του

ελλαγικού οξέως στην καταπολέμηση σοβαρών νοσημάτων όπως ο καρκίνος του προστάτη [82,83]. Μελετώντας τις ευεργετικές ιδιότητες του ροδιού δεν θα πρέπει να αγνοηθεί η συνδυαστική δράση των συστατικών αυτού. Επίσης πρέπει να δοθεί προσοχή, καθώς η σύνθεση του ροδιού μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή στην οποία καλλιεργήθηκε, την εποχή και τον τρόπο συλλογής. Τέλος, πρέπει να ελεγχθεί η βιοδιαθεσιμότητα των ουσιών που το απαρτίζουν καθώς πολλά δεν μεταβολίζονται ή δεν απορροφώνται όταν δίνονται σε βρώσιμη μορφή.

### 1.4.3.Βιοδιαθεσιμότητα

Πολλά πειράματα έχουν διεξαχθεί για τον έλεγχο της βιοδιαθεσιμότητας των συστατικών του ροδιού τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους. Σε ένα από αυτά, δόθηκαν 180 mL χυμός ροδιού σε υγιή άτομα και μετά από μια ώρα ανιχνεύθηκαν 31,9 ng/mL ελλαγικού οξέως και μεταβολιτών αυτού στο πλάσμα. Τρεις ώρες μετά δεν ανιχνεύθηκε ελλαγικό οξύ, το οποίο υποδεικνύει πως απορροφάται από τον ανθρώπινο οργανισμό [84]. Ενώ σε μια ακόλουθη μελέτη για την απορρόφηση και την κάθαρση των ελλαγιταννινών βρέθηκαν μεταβολίτες ουρολιθίνης μέχρι και 48 ώρες μετά τη χορήγηση της [85], οι οποίοι έχουν μεγάλη αντιοξειδωτική δράση [86,87]. Επίσης δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη συγκέντρωση του ελλαγικού οξέως και των μεταβολιτών του στο πλάσμα, ανεξαρτήτως του αν χορηγήθηκε με τη μορφή χυμού ροδιού, υγρού εκχυλίσματος ή εκχυλίσματος σε σκόνη [88]. Όμως δεν βρέθηκε καθόλου ελλαγικό οξύ, πουνικαλαγίνη, ανθοκυαννίνες ή προϊόντα καταβολισμού αυτών στο πλάσμα δεκατρείς μέρες μετά την χορήγηση 1L χυμού ροδιού που περιέχει 4,37 g/L πουνικαλαγίνη και 0,49 g/L ανθοκυαννίνες για πέντε μέρες [89]. Όμως βρέθηκαν μεταβολίτες του χυμού, όπως οι ουρολιθίνες A και B στο πλάσμα, οι οποίες βρέθηκαν και στα ούρα 24 ώρες μετά. Σύμφωνα, λοιπόν, με τον χρόνο εμφάνισης των μεταβολιτών στο πλάσμα και στα ούρα και σε συνδυασμό με προηγούμενες μελέτες που είχαν γίνει σε ποντίκια [90,91] εξάγεται το συμπέρασμα πως ο μεταβολισμός του ροδιού γίνεται από την μικροχλωρίδα του εντέρου.

Εν κατακλείδι, είναι πλέον γνωστό μέσω πειραμάτων που έχουν γίνει και σε ανθρώπους αλλά και σε ποντίκια πως οι ελλαγιταννίνες μεταβολίζονται στο στομάχι, όπου κάποια ποσότητα ελλαγικού οξέως περνά στην κυκλοφορία ενώ η υπόλοιπη μεταβολίζεται σε παράγωγα ουρολιθίνης από τη μικροχλωρίδα του εντέρου. Τα λιγότερο πολικά παράγωγα περνάνε στην κυκλοφορία και μεταβολίζονται σε γλυκορονίδες [78].



#### 1.4.4.Μηχανισμοί δράσης και επιπτώσεις στην υγεία

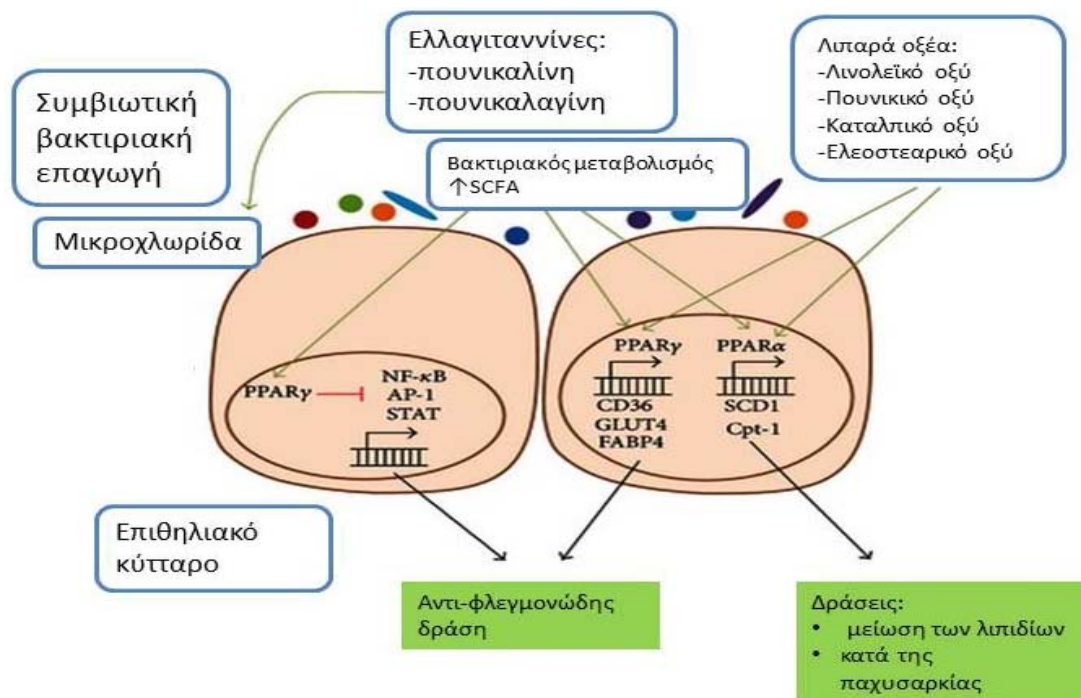
Στο έντερο ενός ενήλικα ανθρώπου υπάρχουν περίπου εκατό τρισεκατομμύρια μικροοργανισμοί [92]. Οι ελλαγιτανίνες που υπάρχουν στο ρόδι, υπάρχουν εκεί. Η πουνικαλαγίνη αναστέλλει την ανάπτυξη τους και την ικανότητα να επηρεάζουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών *Clostridia* spp, *Staphylococcus aureus*, και *Pseudomonas aeruginosa*, ενώ προάγει την ανάπτυξη των *Bifidobacterium breve* και *Bifidobacterium infantis*, καθώς επίσης και την παραγωγή των βραχέων αλυσίδων λιπαρών οξέων (Short chain fatty acids, SCFAs) [93,94], τα οποία ενεργοποιούν τα PPARs (Peroxisome proliferator – activated-receptors). Τα PPARs είναι υποδοχείς για μόρια ενδογενών λιπιδίων (π.χ. προσταγλανδίνες), μοριακός στόχος των φαρμάκων έναντι του διαβήτη τύπου II [95,96,97] και πιθανός στόχος για τη θεραπεία και την πρόληψη φλεγμονωδών νοσημάτων [98,99]. Τα PPARs είναι οι κύριοι ρυθμιστές του μεταβολισμού των λιπιδίων και των υδρογονανθράκων [100]. Λειτουργικά, ρυθμίζουν τις φλεγμονές, την ανοσία και τον μεταβολισμό [101]. Διακρίνονται σε τρεις ισομορφές: i) τα PPAR $\alpha$  (Peroxisome proliferator – activated-receptors  $\alpha$ ), τα οποία είναι σημαντικά για την κάθαρση των λιπιδίων τόσο στην κυκλοφορία όσο και σε κυτταρικό επίπεδο μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες [102], ii) τα PPAR $\beta/\delta$  (Peroxisome proliferator – activated-receptors  $\beta/\delta$ ) που εμπλέκονται στην οξείδωση των λιπιδίων και των κυτταρικό πολλαπλασιασμό [103], και τέλος iii) τα PPAR $\gamma$  που προάγουν την διαφοροποίηση των λιποκυττάρων για να βελτιώσει την απορρόφηση της γλυκόζης στο αίμα [102]. Η ενεργοποίηση των PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator – activated-receptors  $\gamma$ ) μπορεί να ανταγωνιστεί την ενεργοποίηση των προφλεγμονωδών μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF -  $\kappa$ B (nuclear-factor-kappa - light – chain – enhancer-of-activation B) [104].

##### 1.4.4.1.Ρόδι και παθολογικές καταστάσεις

Έχει γίνει συσχέτιση των ευεργετικών δράσεων των παραγόντων του ροδιού με αρκετές παθήσεις, μεταξύ αυτών είναι η παχυσαρκία, ο διαβήτης τύπου II, κάποιες περιπτώσεις φλεγμονών αλλά και, πιο πρόσφατα, κάποιες περιπτώσεις καρκίνων. Οι φυσικές ενώσεις που ενεργοποιούν ταυτόχρονα τους PPAR $\alpha$  (Peroxisome proliferator - activatedreceptors  $\alpha$ ) και PPAR $\beta/\delta$  (Peroxisome



proliferator - activated receptors β/δ) υπόσχονται πολλά στην αντιμετώπιση μεταβολικών συνδρόμων, της παχυσαρκίας και του διαβήτη καθώς μειώνουν τα τριγλυκερίδια, τη γλυκόζη του ορού και βελτιώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη αυξάνοντας τα επίπεδα της HDL (high-density lipoprotein) [115]. Η πουνικαλίνη και η πουνικαλαγίνη μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή SCFAs (Short chain fatty acids) από συμβιωτικά βακτήρια, προάγοντας την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό αυτών. Τα SCFAs (Short chain fatty acids) απορροφώνται και ενεργοποιούν τα PPARγ (Peroxisome proliferator – activated-receptors γ), τα οποία μπλοκάρουν την μεταγραφή των προ-φλεγμονωδών μορίων NF-κβ (nuclear factor kappa - light - chain - enhancer of transcription B), AP-1 (Activator Protein 1) και STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), δίνοντας έτσι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Οι PPARγ (Peroxisome proliferator – activated-receptors γ) μπορούν να ενεργοποιηθούν και από λιπαρά οξέα όπως το λινολεϊκό οξύ, το πουνικικό οξύ, το καταλπικό οξύ και το στεαρικό οξύ στα επιθηλιακά κύτταρα αλλά και στα μακροφάγα. Αυτά τα λιπαρά οξέα μπορούν να ενεργοποιήσουν και τα PPARα (Peroxisome proliferator activated-receptors α), δίνοντας έτσι ιδιότητες μείωσης των λιπιδίων και κατά της παχυσαρκίας στο ρόδι [105] (Εικόνα 1).

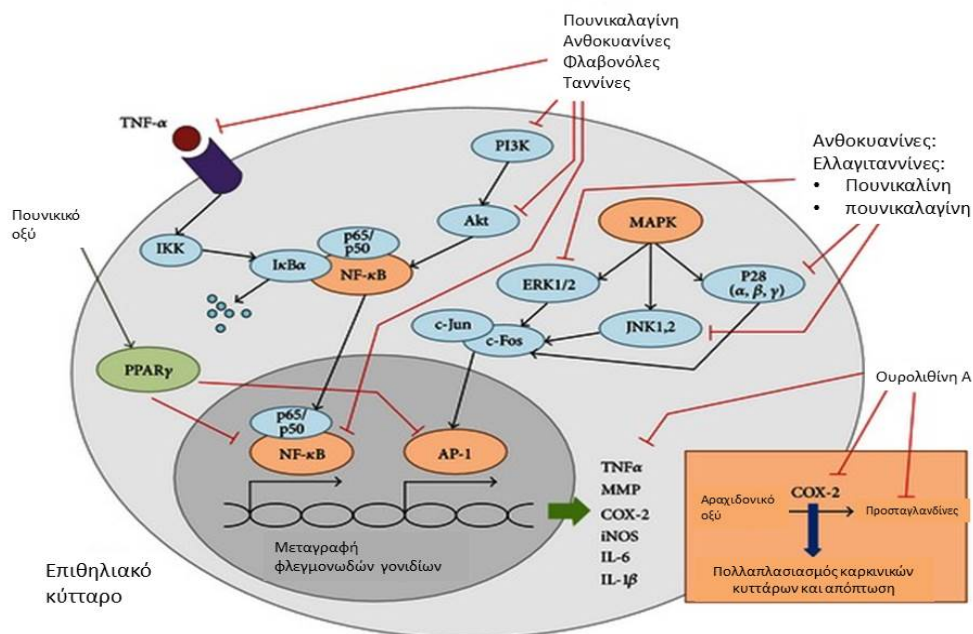


**Εικόνα 1: Δράση των παραγώγων του ροδιού κατά της παχυσαρκίας και των φλεγμονών. Ανατύπωση από: “Preventive and Prophylactic Mechanisms of Action of Pomegranate Bioactive Constituents” [105] .**

Τέλος, αρκετές έρευνες που έχουν χρησιμοποιήσει in vitro διαφορετικές καρκινικές σειρές έχουν υποδείξει ότι ο χυμός, ο καρπός και το έλαιο του ροδιού

μπορούν να αναστείλουν την διείσδυση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, και να προκαλέσουν διαταραχές του κυτταρικού κύκλου, απόπτωση και να αναστείλουν την ανάπτυξη του όγκου [106].

Είναι γνωστή η σχέση μεταξύ της αύξησης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της έκφρασης της κυκλο-οξυγενάσης 2 (COX-2), ένα ένζυμο με καταλυτικό ρόλο στον μεταβολισμό των αραχιδονικών σε προσταγλανδίνες, οι οποίες είναι σημαντικοί φλεγμονώδεις μεσολαβητές [107,108]. Ο χυμός του ροδιού φαίνεται να μειώνει την έκφραση της COX-2 μέσω της αναστολής της φωσφατιδυλοσιτιδο-3 κινάσης (PI3K) και της πρωτεϊνικής κινάσης B ή Akt, οι οποίες είναι και οι ταυτόχρονα απαραίτητες για την ενεργοποίηση του NF-κΒ [109,110] (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2: Αντικαρκινική δράση των συστατικών του ροδιού. Ανατύπωση από: “Preventive and Prophylactic Mechanisms of Action of Pomegranate Bioactive Constituents” [105] .**

#### 1.4.5. Δεσμευτική και αντιοξειδωτική δράση της πουνικαλαγίνης

Η πουνικαλαγίνη είναι ένα μεγάλο μοριακού βάρους (MW=1108), υδατοδιαλυτό, πολυφαινολικό μόριο που βρίσκεται στο ρόδι και παρουσιάζει σπουδαία αντιοξειδωτική δράση, η οποία έχει αποδοθεί στις 16 ομάδες  $\text{OH}^-$  που μπορούν να δράσουν πάνω στις ελεύθερες ρίζες και στη χηλική δομή που έχει ως πολυφαινόλη [111,112]. Η λιπιδική υπεροξειδάση είναι ένα ένζυμο πολλαπλασιασμού της υπεροξειδάσης που ενεργοποιείται από τις ελεύθερες ρίζες και δρα στα πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα και αδρανοποιείται είτε ενζυματικά, είτε υπό την παρουσία αντιοξειδωτικών [113]. Έχει παρατηρηθεί μια δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ της πουνικαλαγίνης και της αναστολής της δράσης της υπεροξειδάσης. Η αναστολή της υπεροξειδάσης γίνεται λόγω του σχηματισμού χηλικής ένωσης με τα ιόντα των μετάλλων. Άρα, η δράση της πουνικαλαγίνης έναντι της υπεροξειδάσης μπορεί να είναι, είτε λόγω των χηλικών ιδιοτήτων της, είτε λόγω της σάρωσης των ριζών. Τέλος, έχει παρατηρηθεί πως η πουνικαλαγίνη μπορεί να μειώσει σημαντικά την δράση μιας μεγάλης ποικιλίας δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) που είναι γνωστό πως προκαλούν παθολογικές καταστάσεις στην λειτουργία του κυττάρου [114].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται συνοπτικά οι εργαστηριακές δοκιμές που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να οριστεί το κατάλληλο εργαστηριακό πρωτόκολλο. Γνωρίζοντας την καινοτομία του πειράματος που πρόκειται να διεξαχθεί και για να οριστούν οι παράμετροι που απαιτούνται για την πορεία και το πέρας της πειραματικής διαδικασίας, χρειάστηκε να μελετηθούν ξεχωριστά ο χρόνος της επώασης, η προσθήκη ή όχι του εκχυλίσματος του ροδιού προς έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, καθώς και η ποσότητα της τοξίνης που χρησιμοποιείται την κάθε φορά (πλάσμα νεφροπαθών, ουρία ή κρεατινίνη).

### 2.1. Πίνακας: Όργανα-Υλικά

Πίνακας 2: Όργανα και υλικά.

	Όργανα και υλικά	Εταιρία-Κατασκευαστής
1	Ζυγός ακριβείας	KERN PCB & Sohn GmbH
2	Υδατόλουτρο	Kotterman P 3165
3	Φυγόκεντρος	Ecospin sorvall instruments
4	Φυγόκεντρος	Hawksley and Sons std

	μικροαιματοκρίτη	
5	Φωτόμετρο	Novaspec LKB Blochrom
6	Αναδευτήρας (Vortex)	Velpscientifica
7	Φυγόκεντρος eppendorfs	Minispin eppendorf AG
8	Μπουκαλάκια με αντιπηκτικό EDTA	BD Vacuteiner K2E 3.6 mg (2 ml)
9	Σύριγγες	BMDI DS10LSHN (10 ml)
10	Ουρία, κρεατινίνη και χλωριούχο νάτριο (NaCl)	Sigma
11	Διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS)	Bio-rad
12	Drabkin's reagent	Sigma
13	Ρυθμιστικό διάλυμα ανεξίνης (10x) <sup>1</sup>	
14	Αντισώματα CD235 και annexin V	BD P Harmigen (TM)
15	BSA (bovine serum albumin)	
16	Tubes	BD Falcon 5ml polystyren round, bottom tube 12x75 mm

<sup>1</sup> Το ρυθμιστικό διάλυμα ανεξίνης (buffer annexin) παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας α) 0,1 M HEPES σε διάλυμα NaOH με pH 7,4, β) 1,4 M NaCl και γ) 25mM CaCl<sub>2</sub> (10x).<sup>1</sup>

## 2.2. Σχεδιασμός μελέτης

### 2.2.1 Επεξεργασία δειγμάτων

Ο σκελετός του πειράματος αυτού έχει ως βασικό βήμα την λήψη περιφερικού αίματος ποσότητας περίπου 10 ml κάθε φορά σε σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA (x5), στα οποία και διεξάχθηκε γενική εξέταση αίματος με σκοπό τον έλεγχο: α) αρχικά σε αιματολογικό αναλυτή και έπειτα με τη μέθοδο του μικροαιματοκρίτη και β) του δείκτη ανισοκυττάρωσης RDW.

Ο διαχωρισμός και η λήψη των ερυθροκυττάρων έγινε με κλασμάτωση ύστερα από φυγοκέντρηση στις 3000 στρ. για δέκα λεπτά ενώ το πλύσιμο του συνόλου τους πραγματοποιήθηκε τρεις φορές με διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Η φυγοκέντρηση έγινε στις ίδιες στροφές και στον ίδιο χρόνο με σκοπό την απομάκρυνση του αυτόλογου πλάσματος που μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες αντιδράσεις οι οποίες σίγουρα δεν συνιστούν την αξιοπιστία και την ορθότητα του πειράματος.

Το βήμα που έπεται ήταν η επαναφορά του αιματοκρίτη έτσι ώστε να μην επέλθει καμία αλλαγή στην ισορροπία μετά την προσθήκη της επιλεχθείσας τοξίνης στην εκάστοτε παραλλαγή που δοκιμάστηκε. Η επαναφορά αυτή πραγματοποιήθηκε προσθέτοντας στα πλυμένα ερυθρά αιμοσφαίρια τόση ποσότητα όση απαιτείται ώστε μετά την επώαση η ένδειξη του αιματοκρίτη να είναι ίδια με την αρχική. Ο τρόπος υπολογισμού γίνεται μέσω του τύπου  $c_1 \times v_1 = c_2 \times v_2$  όπου στο τελικό αποτέλεσμα αφαιρούνται από τον ολικό όγκο οι ποσότητες των ερυθροκυττάρων που προστέθηκαν για τη δημιουργία των νέων διαλυμάτων.

Από δω και στο εξής επιχειρήθηκαν διαφορετικές παραλλαγές του ίδιου πρωτοκόλλου και πραγματοποιήθηκαν οι ίδιες δοκιμασίες πάνω σε κάθε παραλλαγή, θέλοντας να φανεί αν υπάρχει επίδραση πάνω στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και φυσικά από ποια τοξίνη.

### 2.2.2. Στάδια μελέτης

Την έναρξη των πειραμάτων σηματοδότησε η συλλογή δειγμάτων από νεφροπαθείς ασθενείς και η ταυτοποίηση της ομάδας αίματός τους κατά το σύστημα ABO ενώ παράλληλα έγινε η πρώτη προσπάθεια για εξαγωγή αποτελεσμάτων τοποθετώντας σε υγιή πλυμένα ερυθροκύτταρα εθελοντή -

αιμοδοτή γνωστής ομάδας αίματος την αντίστοιχη ποσότητα πλάσματος (με την ίδια ομάδα αίματος, θέλοντας να αποφευχθεί η αιμόλυση) επαναφέροντας τον αρχικό αιματοκρίτη. Το στάδιο αυτό έγινε εις τριπλούν με διαφορετικό εθελοντή-αιμοδοτή κάθε φορά, χωρίς την εκλογή κάποιου αποτελέσματος εξαιτίας των παραγόντων που ενδεχομένως να επηρεάζουν.

Το αμέσως επόμενο βήμα ήταν η οριστικοποίηση της προέλευσης των ερυθροκυττάρων (επιλογή σταθερού εθελοντή-αιμοδοτή) και η δοκιμή διαλυμάτων ουρίας σε συγκεντρώσεις των 200mg/dl και των 400mg/dl και 600mg/dl. Εδώ, χρησιμοποιήθηκαν οκτώ διαφορετικά πειράματα, τα οποία επώαστηκαν και στα 45 αλλά και 120 λεπτά και ήταν:

- ✓ RBCs + PBS
- ✓ RBCs + PBS + ρόδι (20μl)
- ✓ RBCs + 200 mg/dl
- ✓ RBCs + 200 mg/dl + ρόδι (20μl)
- ✓ RBCs + 400 mg/dl
- ✓ RBCs + 400 mg/dl + ρόδι (20μl)
- ✓ RBCs + 600 mg/dl
- ✓ RBCs + 600 mg/dl + ρόδι (20μl)

Το επόμενο στάδιο ήταν το να επιχειρηθεί να δημιουργηθεί πρωτόκολλο, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά αντί για ουρία, κρεατινίνη. Το δοκιμή αυτή, πράγματι επιτεύχθηκε και αποτέλεσε το εναρκτήριο βήμα για την υιοθέτηση του τελικού πρωτοκόλλου. Η αρχική του μορφή είχε την εξής εικόνα:

- ✓ RBCs + PBS
- ✓ RBCs + 2 mg/dl
- ✓ RBCs + 4 mg/dl
- ✓ RBCs + 10 mg/dl
- ✓ RBCs + 4mg/dl + 400 mg/dl

Στο σημείο αυτό της πειραματικής πορείας επιχειρήθηκε εκτός της επώασης των 120 λεπτών και η ολονύχτια επώαση (overnight incubation), η οποία και δεν επέφερε αξιολογήσιμα αποτελέσματα.

Η τελική του μορφή πια, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν, διαμορφώθηκε ως εξής:

- ✓ RBCs + PBS
- ✓ RBCs + 2 mg/dl
- ✓ RBCs + 4 mg/dl
- ✓ RBCs + 6 mg/dl
- ✓ RBCs + 10 mg/dl

- ✓ RBCs + 6 mg/dl + ρόδι (10μl)
- ✓ RBCs + PBS + ρόδι (10μl)

Εν κατακλείδι, αναφέρεται ότι η ποσότητα εκχυλίσματος ροδιού που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10 μl και πως μετά την οριστικοποίηση του παραπάνω πρωτοκόλλου, όλες οι εργαστηριακές δοκιμασίες διενεργήθηκαν με τρία διαφορετικά δείγματα αίματος υγιών εθελοντών-αιμοδοτών (Α, Β και C) και οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν. Στα επτά δείγματα παραπάνω υπολογίστηκε α) η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη (Hb) πλάσματος, β) η ωσμωτική αντίσταση των ερυθροκυττάρων και γ) μελετήθηκε το επίχρισμα αίματος. Στην κυτταρομετρία ροής μετρήθηκαν μόνο τα σημεία αυξημένης βαρύτητας, δηλαδή οι μάρτυρες και τα δύο δείγματα που περιείχαν κρεατινίνη 6 mg/dl με και χωρίς την προσθήκη ροδιού (10μl).

### 2.3.Μέθοδοι-Πρωτόκολλα

#### 2.3.1.Μέθοδος υπολογισμού ελεύθερης αιμοσφαιρίνης (Hb) πλάσματος

Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος υπολογίστηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Drabkin, το οποίο και παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας (Sigma) με μικρές τροποποιήσεις. Έπειτα, ακολούθησαν τα εξής βήματα:

1. Όλα τα δείγματα να σημειωθεί ότι κατά την έξοδο τους από το υδατόλουτρο φυγοκεντρήθηκαν σε ειδική φυγόκεντρο (φυγόκεντροs erpendorf) για δέκα λεπτά στις τρεις χιλιάδες στροφές για να ληφθεί το υπερκείμενο.
2. Προστέθηκε ποσότητα 20μl πλάσματος από κάθε δείγμα σε 2,5 ml του αντιδραστηρίου drabkin.
3. Πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση (Vortex) με προσοχή.
4. Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για πέντε λεπτά.
5. Ακολούθησε μέτρηση των απορροφήσεων όλων των δειγμάτων στα 540 nm.
6. Υπολογισμός της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος μέσω μαθηματικού τύπου, που προκύπτει από πρότυπη καμπύλη.

#### 2.3.2.Μέθοδος υπολογισμού ωσμωτικής αντίστασης ερυθροκυττάρων



Η ωσμωτική αντίσταση των ερυθροκυττάρων υπολογίστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Kraus και συν. του έτους 1997. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό παρασκευάστηκαν διαλύματα χλωριούχου νατρίου (NaCl) διαφόρων συγκεντρώσεων από αρχικό διάλυμα 0,9%. Τα διαλύματα αυτά παρουσιάζονται παρακάτω:

0,00% 0,20% 0,30% 0,40% 0,45% 0,50% 0,70% 0,90%
---

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες (οχτώ στον αριθμό) προστέθηκε ποσότητα 25 μl ολικού αίματος, το οποίο θα πρέπει να έχει ανακινηθεί καλά, σε 2,5 ml από το κάθε διάλυμα NaCl. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα σύμφωνα με το πρωτόκολλο.
2. Στη συνέχεια, έγινε ήπια ανάδευση με τη βοήθεια Vortex και παραμονή των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επωαστούν για δεκαπέντε λεπτά.
3. Αμέσως μετά τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 1500 στρ. για πέντε λεπτά.
4. Με σκοπό την μέτρηση της απορρόφησης του κάθε δείγματος, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση στα 540 nm.
5. Τέλος, η ωσμωτική αντίσταση των ερυθροκυττάρων σε όλες τις συγκεντρώσεις ωσμωτικών διαλυμάτων υπολογίστηκε μέσω του τύπου:

<b>OD εξεταστέου / OD με 100% αιμόλυση x 100</b>
--

Ακολούθησε κατασκευή πρότυπων καμπυλών για τη σύγκριση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

### 2.3.3.Επίχρισμα αίματος

Το ολικό αίμα μετά το πέρας των εργαστηριακών πειραμάτων επιστρώθηκε σε αντικειμενοφόρους πλάκες με τη βοήθεια δεύτερης αντικειμενοφόρου ή καλυπτρίδας με σκοπό τη δημιουργία λεπτής στοιβάδας αίματος κατάλληλη για τη μετέπειτα μικροσκόπηση αφού βέβαια έχει παραμείνει μερικά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσει. Το βασικό στάδιο που επιτελείται πριν από τη μικροσκόπηση του παρασκευάσματος είναι η χρώση. Η χρώση που χρησιμοποιείται σε αυτή την περίπτωση είναι η May-Grunwald-Giemsa το πρωτόκολλο της οποίας είναι το εξής:

1. Μονιμοποίηση με μεθανόλη για πέντε λεπτά.
2. Προσθήκη της χρωστικής May-Grunwald για πέντε λεπτά.
3. Ακολουθεί ξέπλυμα με άφθονο νερό.
4. Προσθήκη της χρωστικής Giemsa για δεκαπέντε λεπτά.
5. Ακολουθεί ξέπλυμα με άφθονο νερό.

Το παρασκεύασμα μετά την ολοκλήρωση της χρώσης αφήνεται να στεγνώσει καλά και έπεται η μικροσκόπηση. Η μικροσκόπηση έγινε με χρήση ξηρού φακού 10x και καταδυτικού φακού 100x με προσθήκη κεδρελαίου, με σκοπό τη μελέτη της μορφολογίας των ερυθροκυττάρων. Τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής ανάλυσης μελετήθηκαν εις διπλούν για μεγαλύτερη ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

#### 2.3.4. Άμεση κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνική που πραγματοποιείται με σκοπό τη μέτρηση και τον χαρακτηρισμό των μικροσκοπικών σωματιδίων που περιέχονται στο υγρό που μελετάται. Στην περίπτωση του ολικού αίματος, σκοπός είναι η μέτρηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η εύρεση εκείνων που εκφράζονται όταν σημανθούν με ανεξίνη.

Η ανεξίνη χρησιμοποιείται θέλοντας να εντοπιστούν τα αποπτωτικά ερυθρά αιμοσφαίρια. Ο εντοπισμός των κυττάρων αυτών, βασίζεται στην σύνδεση της ανεξίνης με τη φωσφατιδυλοσερίνη που βρίσκεται μετατοπισμένη στο εξωτερικό τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης κατά τη διάρκεια της αποπτωτικής διαδικασίας. Η μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης γίνεται πριν την έναρξη του κατακερματισμού του κυττάρου, επομένως η ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων μπορεί να γίνει στα αρχικά ακόμη στάδια.

Το ερευνητικό πρωτόκολλο που πραγματοποιήθηκε περιλάμβανε τα εξής:

1. Αρχικά, έγινε αραιώση 1:500 του ολικού αίματος σε ρυθμιστικό διάλυμα ανεξίνης, στο οποίο προστέθηκε 3,5% BSA.
2. Ακολούθησε επώαση του διαλύματος για τριάντα λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
3. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 50 μl του αραιωμένου αίματος σε ειδικό σωληνάριο (tube) για τον κυτταρομέτρη ροής.
4. Παράλληλα, προστέθηκαν 5 μl από το CD235 και 4 μl από την Annexin V.
5. Αμέσως μετά, το δείγμα επώαστηκε για είκοσι λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος, ώστε να μην εξασθενήσουν τα φθορίζοντα αντισώματα.

6. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, προστέθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα ανεξίνης σε ποσότητα 500 μl ώστε να σταματήσει την αντίδραση.
7. Τέλος, μετρήθηκαν στον κυτταρομέτρη ροής, με βάση τους μάρτυρες τα αποτελέσματα που προέκυψαν.

Οι μάρτυρες (controls) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δυο. Ο πρώτος θεωρήθηκε θετικός μάρτυρας για την ανεξίνη, γι' αυτό και δεν προστέθηκε καθόλου ποσότητα από το CD235. Αντίστοιχα, ο δεύτερος μάρτυρας παρασκευάστηκε απουσία της ανεξίνης, ώστε να θεωρηθεί μάρτυρας για το CD235.

#### 2.4. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης. Παρακάτω στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, θα παρουσιαστούν οι πίνακες με τους συντελεστές, τα διαστήματα εμπιστοσύνης και το p-value βάσει του εκάστοτε μοντέλου.

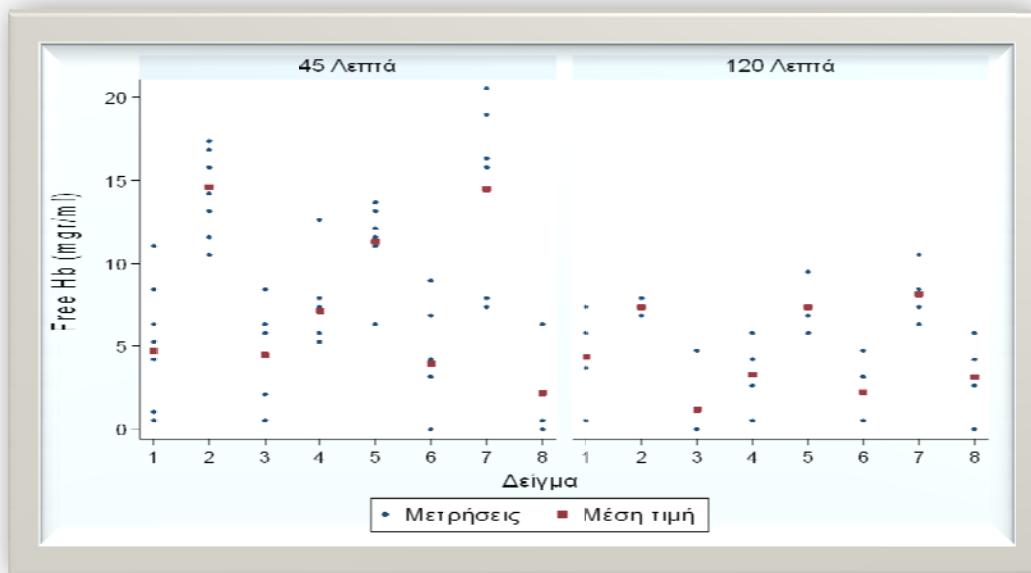
Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε είναι:  $E(Y) = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i$ , όπου  $Y$  είναι η εξαρτημένη μεταβλητή,  $X_i$  οι ανεξάρτητες τιμές με  $i=1-k$ , με μικρές τροποποιήσεις όπου χρειάζεται. Στην συγκεκριμένη μελέτη η μεταβλητή  $Y$  αντιστοιχεί στην αιμοσφαιρίνη και η μεταβλητή  $X$  στο δείγμα που χρησιμοποιείται κάθε φορά ή στον χρόνο επώασης, όπου μέσα στο μοντέλο υπάρχουν δείκτριες συναρτήσεις που παίρνουν τις τιμές 0 ή 1 ανάλογα με την απουσία ή την παρουσία του εκάστοτε δείγματος και για τον χρόνο επώασης 0 ή 1, όπου το 0 αντιστοιχεί στα 45 λεπτά επώασης και το 1 στα 120 λεπτά επώασης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1.Υπολογισμός ελεύθερης αιμοσφαιρίνης

#### 3.1.1.Ουρία

Για την αξιολόγηση της επίδρασης της ουρίας στα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων 200 mg/dl, 400 mg/dl και 600 mg/dl σε PBS και αντίστοιχα σε αυτά δοκιμάστηκε και η αντιοξειδωτική δράση του ροδιού. Αρχικά δοκιμάστηκε η επώαση για 45 λεπτά και κατόπιν για 120 λεπτά στους 37 °C (διάγραμμα 1).



**Διάγραμμα 1:** σύγκριση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης σε 45 και 120 λεπτά επώασης. Όλα τα δείγματα αποτελούνται από πλυμένα ερυθροκύτταρα υγιών ατόμων στα οποία έχει γίνει επαναφορά του αιματοκρίτη με διαλύματα: PBS για το δείγμα 1, διάλυμα ουρίας 200 mg/dl για το δείγμα 2, διάλυμα ουρίας 200 mg/dl και 20 μl εκχυλίσματος ροδιού για το δείγμα 3, PBS και 20 μl εκχύλισμα ροδιού για το δείγμα 4, διάλυμα ουρίας 400

mg/dl για το δείγμα 5, διάλυμα ουρίας 400 mg/dl και 20 μl εκχύλισμα ροδιού για το δείγμα 6, διάλυμα ουρίας 600 mg/dl για το δείγμα 7 και διάλυμα ουρίας 600 mg/dl και 20 μl εκχύλισμα ροδιού για το δείγμα 8.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 3 παρουσιάζεται μία σημαντική αύξηση στην ελεύθερη αιμοσφαιρίνη με την προσθήκη της ουρίας η οποία όμως δεν είναι δοσοεξαρτώμενη. Το στατιστικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε είναι:

$$E(Y) = \beta_0 + \sum_{i=1}^8 \beta_i(\text{δείγμα}_i) + \beta_9\text{χρόνος}$$

**Πίνακας 3:** Συντελεστές υπολογισμού ελεύθερης αιμοσφαιρίνης δειγμάτων με προσθήκη ουρίας. Όλα τα δείγματα αποτελούνται από πλυμένα ερυθροκύτταρα υγιούς ατόμου στα οποία έχει γίνει επαναφορά του αιματοκρίτη με τα διαλύματα που αναγράφονται στα δείγματα.

	Δείγμα	Συντελεστής μοντέλου	Τυπικό σφάλμα	Όρια διαστήματος εμπιστοσύνης		p-value
				Κατώτατο	Ανώτατο	
1 <sup>2</sup>	PBS	0				
2	Ουρία 200 mg/dl	7.837	1.328	5.194	10.480	<0.001
3	Ουρία 200 mg/dl και 20 μl εκχυλίσματος ροδιού	-1.228	1.298	-3.812	1.356	0.347
4	PBS και 20 μl εκχύλισμα ροδιού	1.231	1.327	-1.411	3.873	0.357
5	Ουρία 400 mg/dl	5.340	1.362	2.628	8.052	<0.001
6	Ουρία 400 mg/dl και 20 μl εκχύλισμα ροδιού	-1.228	1.298	-3.812	1.356	0.347

<sup>2</sup> Κατηγορία αναφοράς

7	Ουρία 600 mg/dl	7.551	1.362	4.839	10.262	<0.001
8	Ουρία 600 mg/dl και 20 μl εκχύλισμα ροδιού	-1.818	1.362	-4.529	0.894	0.186
<b>Χρόνος</b>						
	45 λεπτά	0				
	120 λεπτά	-3.126	0.712	-4.544	-1.709	<0.001

Η κατηγορία αναφοράς είναι το δείγμα 1 (μάρτυρας) των 45 λεπτών με τις τιμές που παρουσιάζονται στον πίνακα 4:

**Πίνακας 4: Στατιστικά στοιχεία δείγματος αναφοράς.**

Δείγμα	Μέση τιμή Hb (mg/dl)	Τυπικό σφάλμα	Όριο διαστήματος εμπιστοσύνης	
			Κατώτατο	Ανώτατο
μάρτυρας	5.647	0.948	3.760	7.535

Αναλυτικότερα, για μεγαλύτερη κατανόηση, οι μετρήσεις των 45 λεπτών παρουσιάζονται στον πίνακα 5:

**Πίνακας 5: Μετρήσεις ελεύθερης αιμοσφαιρίνης με προσθήκη ουρίας, με επώαση 45 λεπτών.**

	Δείγμα	Μέση τιμή Hb(mg/dl)	Τυπικό σφάλμα	Όριο διαστήματος εμπιστοσύνης	
				Κατώτατο	Ανώτατο
2	Ουρία 200 mg/dl	13,48	0,978	11,53	15,43
3	Ουρία 200 mg/dl και 20 μl εκχυλίσματος ροδιού	4,41	0,948	2,53	6,30
4	PBS και 20 μl εκχύλισμα ροδιού	6,87	0,993	4,90	8,85

5	Ουρία 400 mg/dl	10,98	1,045	8,90	13,06
6	Ουρία 400 mg/dl και 20 μιεκχύλισμα ροδιού	4,41	0,948	2,53	6,30
7	Ουρία 600 mg/dl	13,19	1,045	11,11	15,27
8	Ουρία 600 mg/dl και 20 μι εκχύλισμα ροδιού	3,82	1,045	1,74	5,90

Έτσι, καταλήγουμε στις τιμές του πίνακα 6 για τα 120 λεπτά:

**Πίνακας 6: Μετρήσεις ελεύθερης αιμοσφαιρίνης με προσθήκη ουρίας, με επώαση 120 λεπτών.**

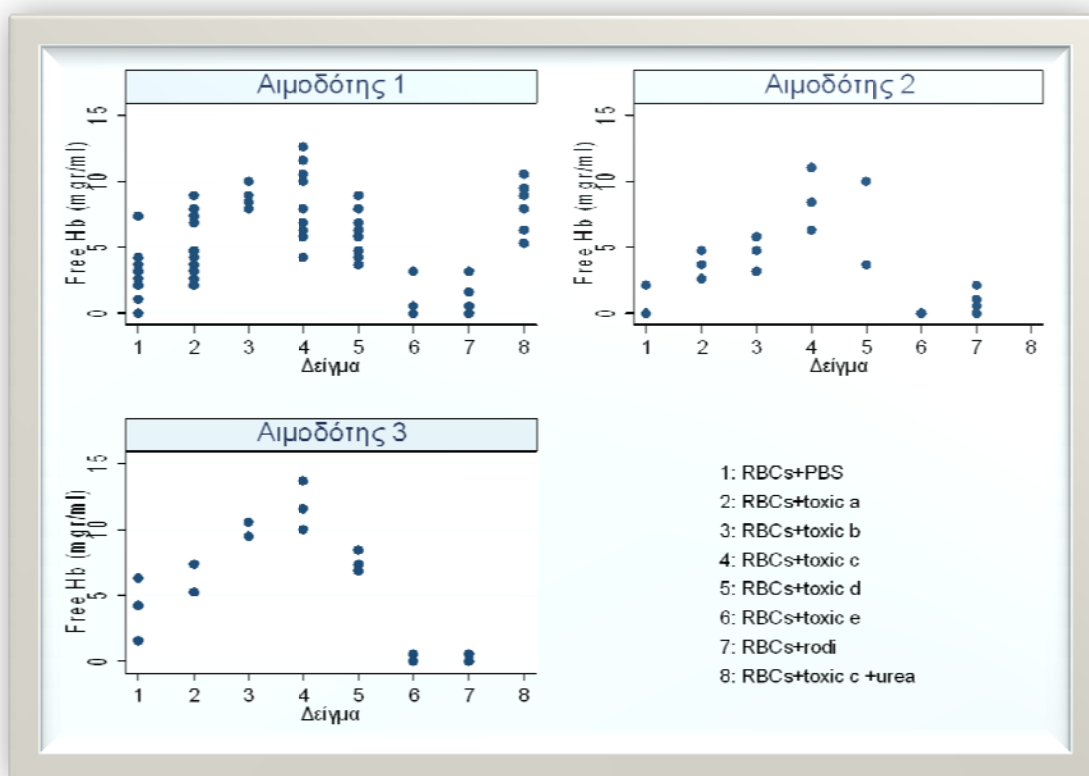
	Μέση τιμή Hb(mg/dl)	Τυπικό σφάλμα	Όρια διαστήματος εμπιστοσύνης	
			Κατώτατο	ανώτατο
2	10,35	1,089	8,18	12,52
3	1,29	1,033	-0,76	3,34
4	3,75	1,060	1,64	5,86
5	7,86	1,092	5,68	10,03
6	1,29	1,033	-0,76	3,34
7	10,07	1,092	7,89	12,24
8	0,70	1,092	-1,47	2,87

Τέλος, αξιολογήθηκε η δράση των διαλυμάτων 200 mg/dl, 400 mg/dl και 600 mg/dl ουρίας και υπολογίστηκε πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών. Πιο συγκεκριμένα, συγκρίνοντας τις τιμές της αιμόλυσης για τα διαλύματα που περιείχαν 200 mg/dl και 400 mg/dl ουρίας: το p-value υπολογίστηκε στο 0,077. Για τα διαλύματα με τα 200 mg/dl και 600 mg/dl το p-value υπολογίστηκε στο 0,838 και για τα 400 mg/dl και 600 mg/dl στο 0,124.

### 3.1.2.Κρεατινίνη

Για τον έλεγχο της δράσης της κρεατινίνης χρησιμοποιήθηκε δείγμα αίματος από τρεις διαφορετικούς, υγιείς, εθελοντές αιμοδότες και τα διαλύματα κρεατινίνης που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συγκέντρωση 2 mg/dl, 4 mg/dl, 6mg/dl και 10 mg/dl καθώς και ένα διάλυμα με κρεατινίνη 6 mg/dl και 400 mg/dl ουρία για να ελεγχθεί η συνεργατική δράση αυτών. Ο διαλύτης και ο μάρτυρας όλων διαλυμάτων είναι το PBS, όπως παρατηρείται και παραπάνω.

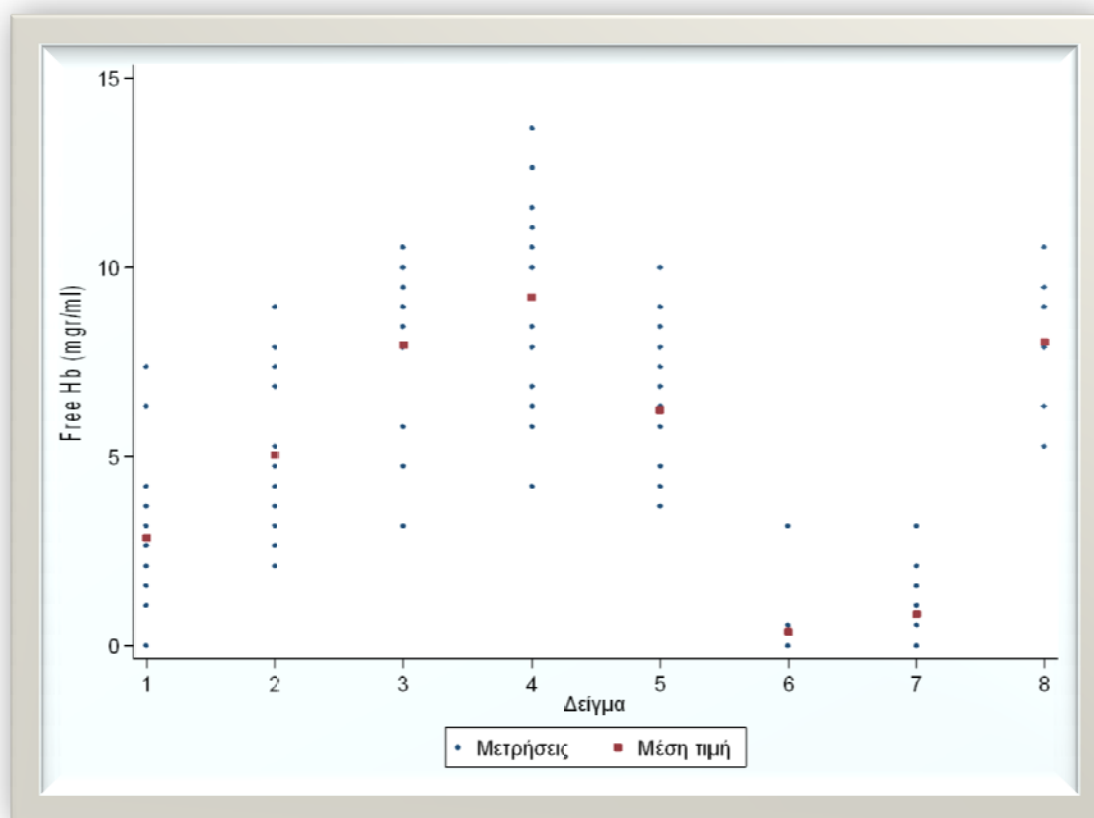
Τα αποτελέσματα παραμένουν αμετάβλητα ανεξαρτήτως του εθελοντή αιμοδότη όπως φαίνεται και στο διαγράμμα 2 καθώς η αιμόλυση αυξάνεται ανάλογα πάντα με το εκάστοτε διάλυμα που χρησιμοποιείται.



**Διάγραμμα 2:** Σύγκριση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης ανά αιμοδότη με την προσθήκη κρεατινίνης. Όλα τα δείγματα αποτελούνται από πλυμένα ερυθροκύτταρα υγιών ατόμων στα οποία έχει γίνει επαναφορά του αιματοκρίτη με διαλύματα: PBS για το δείγμα 1, διάλυμα κρεατινίνης 2 mg/dl για το δείγμα 2, διάλυμα κρεατινίνης 4mg/dl για το δείγμα 3, διάλυμα κρεατινίνης 6 mg/dl για το δείγμα 4, διάλυμα κρεατινίνης 10 mg/dl για το δείγμα 5, διάλυμα κρεατινίνης 6 mg/dl και 10 μλεγκύλισμα ροδιού για το δείγμα 6, PBS και 10 μl εκχύλισμα ροδιού για το δείγμα 7 και διάλυμα ουρίας 400 mg/dl και διάλυμα κρεατινίνης 6 mg/dl για το δείγμα 8.



Συνοπτικά, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3 και αναλύεται στον πίνακα 7, η κρεατινίνη αυξάνει την αιμόλυση και συγκεκριμένα παρουσιάζει συνεχή αύξηση της δραστικότητας μέχρι το σημείο των 6 mg/dl και μετά μειώνεται πάλι. Στο σημείο αυτό, δεν φαίνεται να παρουσιάζεται κάποιου είδους συνεργατική δράση μεταξύ ουρίας και κρεατινίνης. Να σημειωθεί πως η ποσότητα εκχυλίσματος ροδιού που χρησιμοποιήθηκε εδώ έχει μειωθεί στο μισό (10 ml ανά δείγμα) για λόγους οικονομίας, αφού ακόμα και αυτή η ποσότητα δίνει αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα όπως και με την ουρία.



**Διάγραμμα 3: Μέσος όρος ελεύθερης αιμοσφαιρίνης με προσθήκη κρεατινίνης.**

Το στατιστικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων είναι το:

**Πίνακας 7: Μετρήσεις ελεύθερης αιμοσφαιρίνης υγιών RBCs με προσθήκη κρεατινίνης.**

	Δείγμα	Συντελεστής μοντέλου	Τυπικό σφάλμα	Όρια διαστήματος εμπιστοσύνης		P-value
				Κατώτατο	Ανώτατο	
1 <sup>3</sup>	RBCs και PBS	2.853	0.449	1.963	3.743	
2	RBCs και 2 mg/dl	2.188	0.635	0.929	3.447	0.001
3	RBCs και 4 mg/dl	5.089	0.742	3.619	6.559	<0.001
4	RBCs και 6 mg/dl	6.357	0.644	5.081	7.634	<0.001
5	RBCs και 10 mg/dl	3.380	0.635	2.121	4.638	<0.001
6	RBCs και 6 mg/dl και ρόδι	-2.502	0.722	-3.933	-1.072	0.001
7	RBCs και PBS και ρόδι	-2.020	0.722	-3.451	-0.589	0.006
8	RBCs και 6 mg/dl και ουρία 400 mg/dl	5.173	0.825	3.538	6.808	<0.001

Συγκρίνοντας τις επιμέρους τιμές του παραπάνω πίνακα έχουμε τα εξής ευρήματα:

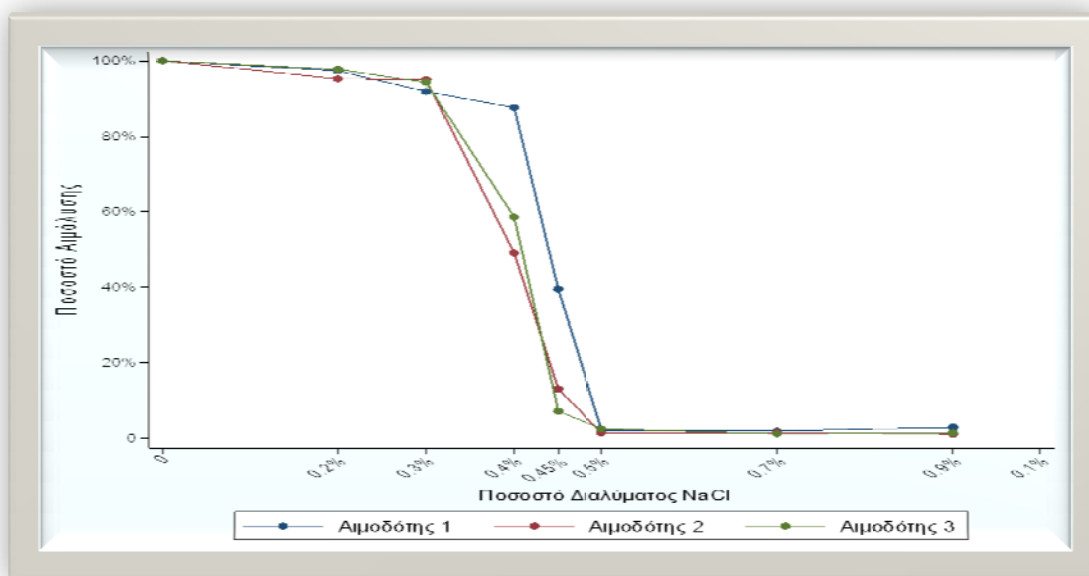
Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ όλων των δειγμάτων ως προς το μάρτυρα καθώς επίσης και μεταξύ των διαλυμάτων 2 mg/dl και 4 mg/dl, 6 mg/dl και 10 mg/dl, 4 mg/dl και 10 mg/dl, όπως και μεταξύ των διαλυμάτων με τα 6 mg/dl κρεατινίνης με και χωρίς εκχύλισμα ροδιού. Ενώ η διαφορά της αιμόλυσης είναι αμελητέα μεταξύ των δειγμάτων που περιέχουν 4 mg/dl και 6 mg/dl κρεατινίνη και 6 mg/dl κρεατινίνη με και χωρίς τα 400 mg/dl ουρίας.

<sup>3</sup> Κατηγορία αναφοράς

### 3.2.Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων

Για την αξιολόγηση της επίδραση της κρεατινίνης έγινε και μέτρηση της ωσμωτικής αντίστασης των ίδιων διαλυμάτων.

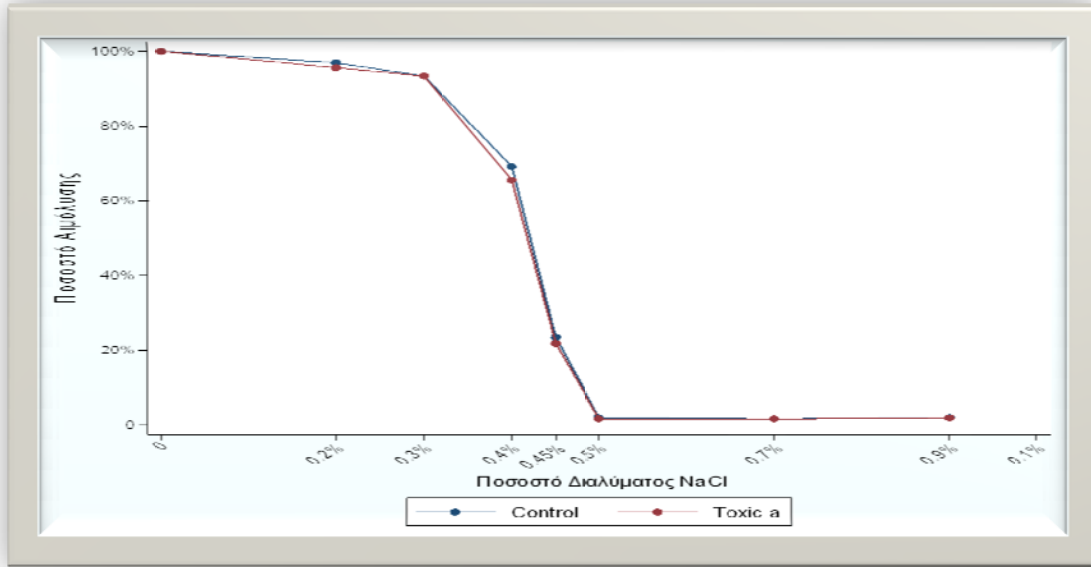
Τα αποτελέσματα εδώ παρουσιάζονται ομαδοποιημένα για τους τρεις εθελοντές αιμοδότες, καθώς όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4 δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών υγιών εθελοντών αιμοδοτών όπου συγκρίνονται οι μάρτυρες.



**Διάγραμμα 4: Σύγκριση καμπυλών ωσμωτικής αντίστασης των μαρτύρων των 3 αιμοδοτών.**

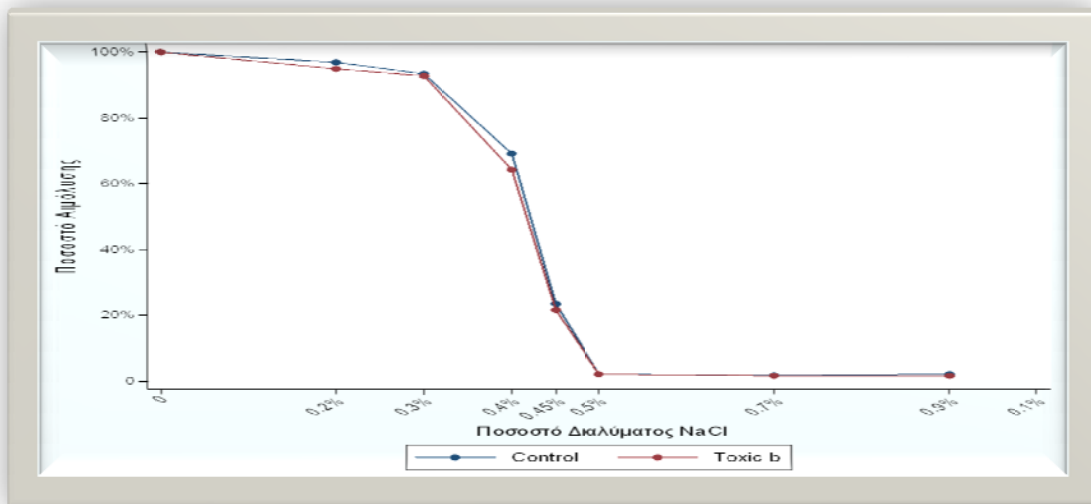
Αναλυτικά λοιπόν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγμάτων συγκριτικά πάντα με το μάρτυρα.

Αρχικά ο μάρτυρας συγκρίνεται με το διάλυμα της κρεατινίνης 2 mg/dl (toxic a), όπου παρατηρείται μια μικρή αύξηση στην ωσμωτική αντίσταση στα RBCs του δείγματος με τα 2 mg/dl κρεατινίνης (διάγραμμα 5).



**Διάγραμμα 5: Σύγκριση της ωσμωτικής αντίστασης μεταξύ του μάρτυρα και του δείγματος με τα 2 mg/dl κρεατινίνης.**

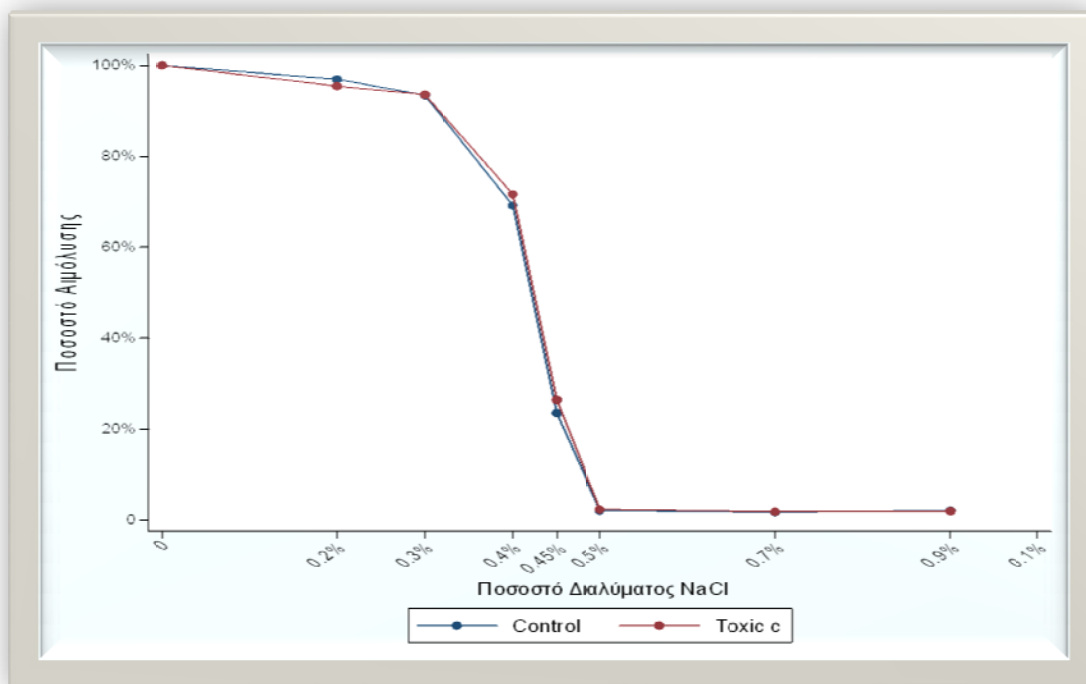
Το ίδιο συμβαίνει και για τα 4mg/dl (toxic b), δηλαδή τα κύτταρα του δείγματος αυτού αποκτούν αυξημένη ωσμωτική αντίσταση (διάγραμμα 6).



**Διάγραμμα 6: Σύγκριση της ωσμωτικής αντίστασης μεταξύ του μάρτυρα και του δείγματος με τα 4 mg/dl κρεατινίνης.**

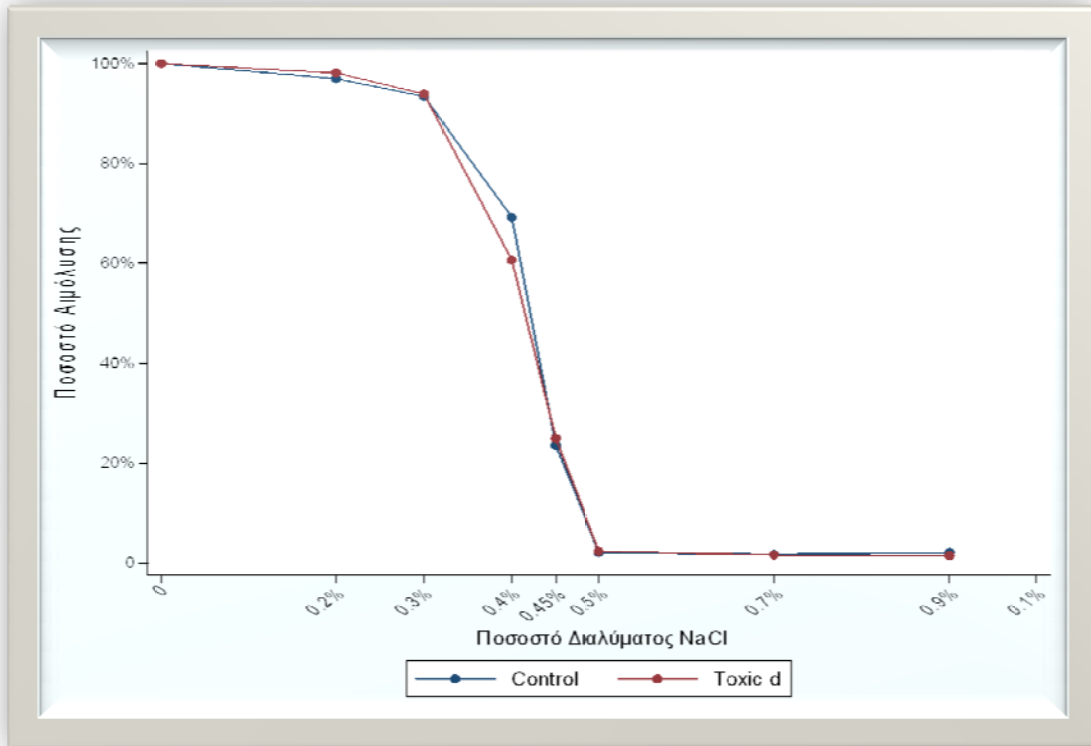
Όμως δεν ισχύει το ίδιο και για τα RBCs του διαλύματος των 6 mg/dl κρεατινίνης, όπου η αιμόλυση είναι ποσοστιαία υψηλότερη σε σχέση με το μάρτυρα λόγω της καταπόνησης που δέχονται τα ερυθροκύτταρα κατά την

επώαση, κάνοντας τα πιο ευαίσθητα κατά την δοκιμασία της ωσμωτικής αντίστασης (διάγραμμα 7).



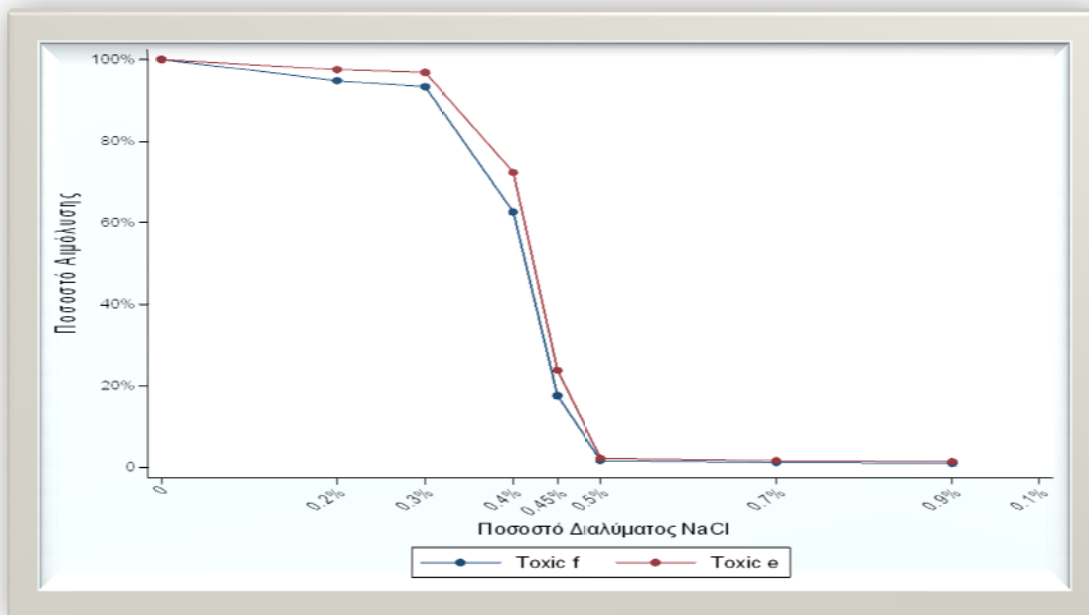
**Διάγραμμα 7: Σύγκριση της ωσμωτικής αντίστασης μεταξύ του μάρτυρα και του δείγματος με τα 6 mg/dl κρεατινίνης.**

Αλλά και για τα RBCs του διαλύματος των 10 mg/dl (toxic d), όπου και εδώ έχουμε αυξημένη ωσμωτική ευθραυστότητα σε σχέση πάντα με το μάρτυρα για τον ίδιο λόγο (διάγραμμα 8).



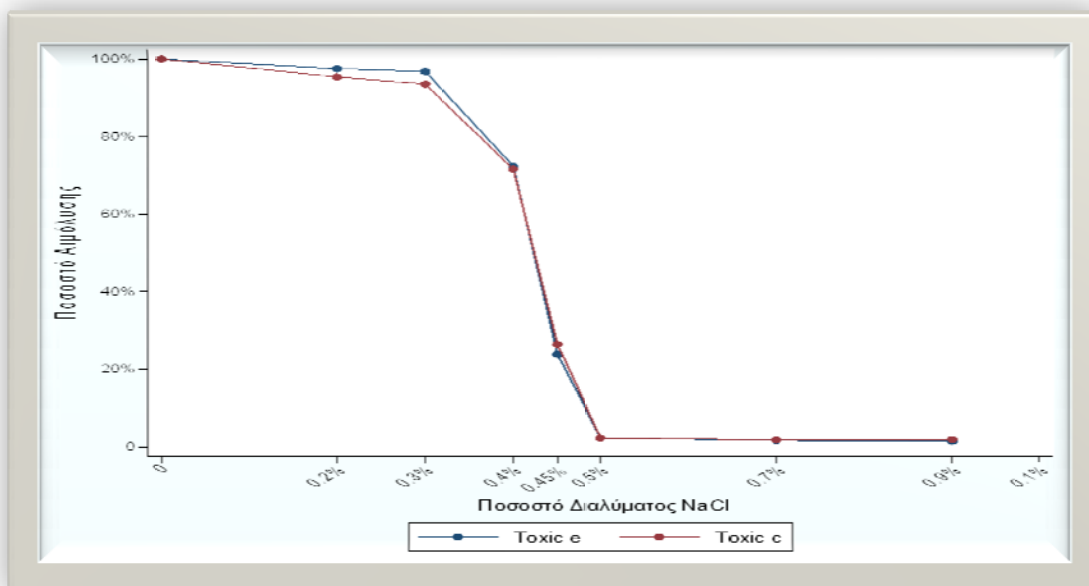
**Διάγραμμα 8: Σύγκριση της ωσμωτικής αντίστασης μεταξύ του μάρτυρα και του δείγματος με τα 10 mg/dl κρεατινίνης.**

Κατόπιν μετρήθηκε η δράση του ροδιού στην ωσμωτική αντίσταση των κυττάρων, όπου συγκρίνονται τα 6mg/dl κρεατινίνης με προσθήκη 10 μl εκχυλίσματος ροδιού (toxic e) με τον αντίστοιχο μάρτυρα για αυτό το δείγμα, το οποίο περιέχει PBS και 10 μl ροδιού (toxic f). Όπως αναμενόταν το toxic e παρουσιάζει μεγαλύτερα ποσοστά αιμόλυσης από το μάρτυρα λόγω της καταπόνησης που δέχονται τα ερυθροκύτταρα κατά τη διάρκεια της επώασής τους (διάγραμμα 9).



**Διάγραμμα 9:** Σύγκριση της ωσμωτικής αντίστασης μεταξύ του μάρτυρα με προσθήκη ροδιού και του δείγματος με τα 6mg/dl κρεατινίνης με προσθήκη ροδιού.

Τέλος, συγκρίνονται τα 6mg/dl κρεατινίνης με την προσθήκη του εκχυλίσματος του ροδιού (toxic e) και χωρίς αυτό (toxic c). Όπου τα αποτελέσματα είναι πολύ παρόμοια (διάγραμμα 10).



**Διάγραμμα 10:** Σύγκριση της ωσμωτικής αντίστασης μεταξύ των δειγμάτων με τα 6 mg/dl κρεατινίνης παρουσία και απουσία του εκχυλίσματος του ροδιού.

### 3.3.Μορφολογικές αλλοιώσεις των ερυθροκυττάρων

Η μικροσκοπική ανάλυση απέδωσε τα εξής ευρήματα για τον εθελοντή αιμοδότη 1 (πίνακας 8):

**Πίνακας 8: Μικροσκοπική ανάλυση αιμοδότη 1.**

Εύρημα	Δακρυοκύτταρα	Εχινοκύτταρα	Σφαιροκύτταρα
RBCs και PBS	-	-	-
RBCs και κρεατινίνη 2 mg/dl	+	-	-
RBCs και κρεατινίνη 4 mg/dl	+	-	-
RBCs και κρεατινίνη 6 mg/dl	++	+	-
RBCs και κρεατινίνη 10 mg/dl	+++	+	+
RBCs και PBS και ρόδι	-	-	-
RBCs και ρόδι και κρεατινίνη 6 mg/dl	+	+	-

Αντίστοιχα, η μικροσκοπική ανάλυση απέδωσε τα εξής ευρήματα για τον εθελοντή αιμοδότη 2 (πίνακας 9):



Πίνακας 9: Μικροσκοπική ανάλυση αιμοδότη 2.

Εύρημα	Δακρυοκύτταρα	Εχινοκύτταρα	Σφαιροκύτταρα
RBCs και PBS	-	-	-
RBCs και κρεατινίνη 2 mg/dl	+	+	-
RBCs και κρεατινίνη 4 mg/dl	++	+	-
RBCs και κρεατινίνη 6 mg/dl	+++	++	+
RBCs και κρεατινίνη 10 mg/dl	+++	++	+
RBCs και PBS και ρόδι	-	+	-
RBCs και ρόδι και κρεατινίνη 6 mg/dl	++	++	+

Παρομοίως, η μικροσκοπική ανάλυση απέδωσε τα εξής ευρήματα για τον εθελοντή αιμοδότη 3 (πίνακας 10):

Πίνακας 10: Μικροσκοπική ανάλυση αιμοδότη 3.

Εύρημα	Δακρυοκύτταρα	Εχινοκύτταρα	Σφαιροκύτταρα
RBCs και PBS	-	-	-
RBCs και κρεατινίνη 2 mg/dl	-	-	-
RBCs και κρεατινίνη 4 mg/dl	+	-	-
RBCs και κρεατινίνη 6 mg/dl	++	+	-
RBCs και κρεατινίνη 10	+++	++	+

mg/dl			
RBCs και PBS και ρόδι	-	+	-
RBCs και ρόδι και κρεατινίνη 6 mg/dl	+	++	+

Όπως φαίνεται και από τους τρεις αιμοδότες η αύξηση της κρεατινίνης προκαλεί την δημιουργία δακρυοκυττάρων, η οποία είναι ανάλογη της αύξησης της συγκέντρωσης της κρεατινίνης. Παράλληλα, στις συγκεντρώσεις 6 και 10 mg/dl κρεατινίνης παρουσιάζονται και εχινοκύτταρα και σφαιροκύτταρα. Η παρουσία αυτών είναι ανάλογη της παρουσίας των δακρυοκυττάρων. Τέλος, η μικροποσότητα ροδιού που προστέθηκε φαίνεται να βελτιώνει την μορφολογία των ερυθροκυττάρων.

### 3.4. Έκφραση Φωσφατιδυλοσερίνης (PS)

Κατά την κυτταρομετρία ροής λόγω υψηλού κόστους των αντιδραστηρίων μετρήθηκαν μόνο τα σημεία αυξημένης βαρύτητας δηλαδή οι μάρτυρες και τα δύο δείγματα με την κρεατινίνη 6mg/dl με την προσθήκη εκχυλίσματος ροδιού και χωρίς αυτήν. Παρακάτω παρουσιάζονται χωριστά οι μετρήσεις για τους τρεις εθελοντές υγιής αιμοδότες (πίνακας 11).

**Πίνακας 11:** Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων κυτταρομετρίας ροής. Το δείγμα A περιέχει πλυμένα ερυθροκύτταρα σε διάλυμα PBS και αποτελεί το μάρτυρα του δείγματος B που περιέχει πλυμένα ερυθροκύτταρα σε διάλυμα κρεατινίνης 6 mg/dl. Το δείγμα C περιέχει πλυμένα ερυθροκύτταρα και σε διάλυμα PBS στο οποίο έχουν προστεθεί 10 μl εκχυλίσματος ροδιού. Τέλος, το δείγμα D περιέχει πλυμένα ερυθροκύτταρα σε διάλυμα κρεατινίνης 6mg/dl στο οποίο έχουν προστεθεί 10 μl εκχυλίσματος ροδιού.

<b>Αιμοδότης</b>	<b>Δείγμα</b>	<b>CD235</b>	<b>Annexin</b>	<b>RBCs total (x10<sup>6</sup> / ml)</b>
1	A	807	44	4,51
1	B	509	99	3,93
1	C	403	6	4,05
1	D	271	8	4,42
2	A	1606	17	5,90
2	B	1013	53	5,49
2	C	976	3	5,68
2	D	1016	17	5,68
3	A	529	18	4,33
3	B	568	22	3,40
3	C	818	16	3,89
3	D	7041	75	4,17

Σε κάθε δείγμα μετρήθηκαν τα κύτταρα που εκφράζουν το αντιγόνο CD235, και θεωρήθηκαν ως ο γενικός πληθυσμός ερυθροκυττάρων του δείγματος καθώς και τα κύτταρα που εκφράζουν την ανεξίνη. Με τη βοήθεια του αιματολογικού αναλυτή υπολογίσθηκαν τα ερυθροκύτταρα των δειγμάτων ανά ml (total RBCs).

Έτσι υπολογίζεται ο αριθμός των ερυθροκυττάρων που εκφράζουν την ανεξίνη ανά ml αίματος στο οποίο έχει επαναφερθεί ο αιματοκρίτη (πίνακας 12).

**Πίνακας 12: Σύνολο των κυττάρων που εκφράζουν την ανεξίνη ανά ml ανά δείγμα εθελοντή.**

Δείγμα	Ανεξίνη (+) X10 <sup>4</sup> / ml
1A	24,58
1B	76,43
1C	6,02
1D	13,04
2A	6,24
2B	28,72
2C	1,74
2D	9,50
3A	14,73
3B	13,16
3C	7,60
3D	4,44

Από τα παραπάνω προκύπτουν οι εξής μέσοι όροι:

**Πίνακας 13: Συνοπτικός πίνακας έκφρασης ανεξίνης ανά ml ανά δείγμα.**

Δείγμα	Ανεξίνη (+) X10 <sup>4</sup> / ml
A	15,1895
B	39,4436
C	5,1282
D	8,9979

Τα κύτταρα που εκφράζουν την ανεξίτη αυξάνονται με την προσθήκη της κρεατινίνης όμως η δράση του ροδιού επιφέρει σημαντική μείωση των τιμών αυτών.

### 3.5.Σύνοψη

#### 3.5.1.Επίδραση της ουρίας στα RBCs

Η προσθήκη της ουρίας αυξάνει την αιμόλυση σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης. Η αιμόλυση παραμένει σταθερή ανεξάρτητα της συγκέντρωσης της ουρίας που προστέθηκε. Αυτό μας οδηγεί στην υπόθεση ότι υπάρχει μια μέγιστη συγκέντρωση που δίνει τη μέγιστη αιμόλυση, μικρότερη των 200 mg/dl, η οποία είναι η ελάχιστη ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη. Η προσθήκη των 20 μl του εκχυλίσματος του ροδιού μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα της αιμόλυσης αυτής.

Επίσης, ελέγχθηκε και η συνεργατική δράση ουρίας και κρεατινίνης στο ίδιο δείγμα, με τη μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, όπου δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο.

#### 3.5.2.Επίδραση της κρεατινίνης στα RBCs

Η κρεατινίνη αυξάνει επίσης την αιμόλυση με την διαφορά πως παρουσιάζει μεταβολή στο ποσοστό της αιμόλυσης ανάλογα με την συγκέντρωση της. Η αιμόλυση που παρατηρείται, παρουσιάζει αύξηση μέχρι τα 6 mg/dl ενώ στα 10 mg/dl μειώνεται.

Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα της κρεατινίνης και στην δοκιμασία της ωσμωτικής αντίστασης, η οποία αυξάνεται όπως αναμενόταν στα διαλύματα με μικρή συγκέντρωση κρεατινίνης. Περισσότερο στα 6 mg/dl αλλά ακόμη και στα 10 mg/dl κρεατινίνης παρατηρείται το αντίθετο, δηλαδή τα RBCs έχουν μειωμένη ωσμωτική αντίσταση, πιθανώς λόγω της καταπόνησης που υφίστανται τα ερυθροκύτταρα κατά την επώαση από την υψηλή συγκέντρωση της κρεατινίνης.

Κατά την μικροσκόπηση, οι παθολογικές μορφές των ερυθροκυττάρων που παρατηρήθηκαν είναι δακρυοκύτταρα των οποίων η συχνότητα αυξανόταν ανάλογα με την συγκέντρωση της κρεατινίνης. Επίσης, παρατηρήθηκαν εχινοκύτταρα και σφαιροκύτταρα τα οποία αντιπροσωπεύουν παθολογικές μορφές κυττάρων που προσπαθούν να επαναφέρουν την επιφανειακή τους ομοιότητα και των οποίων ο αριθμός αυξανόταν ανάλογα με τον αριθμό των δακρυοκυττάρων.

Τέλος, τα παραπάνω επιβεβαιώνονται και με την μέτρηση της φωσφατιδυλοσερίνης, η οποία αυξάνεται με την προσθήκη της κρεατινίνης.

Και στις τέσσερις δοκιμασίες όπου ελέγχθηκε η δράση του ροδιού επί της κρεατινίνης παρατηρήθηκαν θετικά αποτελέσματα που υποδεικνύουν την αναστολή της δράσης της στα ερυθροκύτταρα. Δηλαδή μειώθηκε η αιμόλυση στην μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, καθώς επίσης και η ωσμωτική αντίσταση στην αντίστοιχη μέτρηση, ενώ αυξήθηκαν τα εχινοκύτταρα και τα σφαιροκύτταρα που παρατηρήθηκαν κατά τη μικροσκόπηση. Τέλος, μειώθηκε η έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης που μετρήθηκε με την ανεξίνη.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1. Η επίδραση της ουρίας στα RBCs

Όπως αποδείχθηκε παραπάνω η ουρία αυξάνει την *in vitro* αιμόλυση των ερυθροκυττάρων, όπως αντίστοιχα επηρεάζεται και ο χρόνος ζωής τους λόγω της αυξημένης μεταβολικής καταπόνησης (metabolic stress) στον οργανισμό ενός νεφροπαθή (in vivo) [13]. Σημαντική θεωρείται η εύρεση της συγκεντρώσεως του διαλύματος ουρίας που προκαλεί την μέγιστη αιμόλυση, καθώς τα υψηλά αρχικά επίπεδα των ουραιμικών τοξινών έχουν θεωρηθεί ως παράγοντες κινδύνου [19,53].

### 4.2. Η επίδραση της κρεατινίνης στα RBCs

Η κρεατινίνη παρουσιάζει αυξημένη *in vitro* αιμόλυση ως ουραιμική τοξίνη που προκαλεί μεταβολικές διαταραχές στην ομαλή λειτουργία του κυττάρου. Σημαντική εδώ θεωρείται η μελέτη περισσότερων διαφορετικών συγκεντρώσεων κρεατινίνης για την ακριβέστερη αξιολόγηση της σχέσης συγκέντρωση κρεατινίνης- αιμόλυση, που παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς παρουσιάζει μείωση στα 10mg/dl.

Η ωσμωτική αντίσταση είναι αυξημένη όπως παρατηρείται και στις *in vivo* μελέτες, όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση το δείγμα επηρεάζεται αρκετά και από τα παθολογικά επίπεδα  $Ca^{2+}$  των ασθενών [117], ενοχοποιώντας έτσι σε μεγαλύτερο βαθμό την κρεατινίνη για την διαταραχή που προκαλεί στην ωσμωτική αντίσταση των κυττάρων.

Οι μορφές που παρατηρήθηκαν κατά τη μικροσκόπηση είναι παρόμοιες με αυτές που υπήρχαν στο αίμα των νεφροπαθών, οι οποίοι υφίστανται αιμοκάθαρση [24]. Η διαφορά είναι πως στις *in vitro* δοκιμές βρέθηκαν μόνο δακρυοκύτταρα ως μορφές που προκαλούνται από την αυξημένη συγκέντρωση κρεατινίνης, οι υπόλοιπες μορφές που παρατηρούνται στους νεφροπαθείς ίσως να αποτελούν προϊόν άλλων ουσιών ή και της ίδιας της αιμοκάθαρσης.

Η αυξημένη φωσφατιδυλοσερίνη (PS) που παρουσιάστηκε ίσως να οφείλεται σε μεμβρανικές ανακατανομές όπως έχει παρουσιαστεί και παλαιότερα λόγω της έκθεσης των κυττάρων στις ουραιμικές τοξίνες [116].

### 4.3. Επίδραση του εκχυλίσματος ροδιού στα RBCs

Τόσο στα διαλύματα ουρίας όσο και στα διαλύματα κρεατινίνης δοκιμάστηκε η δράση του εκχυλίσματος του ροδιού. Και στις δύο περιπτώσεις τα αποτελέσματα είναι εντυπωσιακά καθώς με μικροποσότητες (10μl και 20μl) σε όλες τις δοκιμές υπάρχει βελτίωση του αποτελέσματος. Δεν είναι γνωστό, ποιά είναι η δραστική ουσία του ροδιού αλλά έχει αποδειχθεί πως η συνεργατική δράση των ουσιών του είναι πιο σημαντική από την μεμονωμένη δράση αυτών σε παθολογικές καταστάσεις [82, 83].

**Background:** Ως χρόνια νεφρική νόσος χαρακτηρίζεται η προοδευτική απώλεια της νεφρικής λειτουργίας. Η σοβαρότητα αυτής της νόσου έχει ταξινομηθεί σε πέντε στάδια με το στάδιο 1 να θεωρείται η πιο ήπια κατάσταση εμφάνισης συμπτωμάτων και το στάδιο 5 ως μια σοβαρή ασθένεια με χαμηλό προσδόκιμο ζωής εάν αφεθεί χωρίς θεραπεία. Το πέμπτο στάδιο καταλήγει στη χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου (ESRD) ή αλλιώς χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (ESRF). Οι ασθενείς που νοσούν από νεφροπάθεια τελικού σταδίου παρουσιάζουν εκτεταμένη παραγωγή τοξινών, οι οποίες οδηγούν σε οξειδωτικές αλλοιώσεις έπειτα από αλληλεπίδραση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια της περιφέρειας. Επιπλέον, τα ήδη υπάρχοντα ερυθροκύτταρα των ασθενών δέχονται μηχανική καταπόνηση κατά τη ροή τους μέσα στη συσκευή αιμοκάθαρσης, καθώς και μεταβολική καταπόνηση λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ουραιμικών τοξινών και της απώλειας γλυκόζης, έχοντας ως αποτέλεσμα την οξείδωση τους, την πρόκληση μορφολογικών αλλοιώσεων, τις αλλαγές στο πρωτέωμα της κυτταρικής μεμβράνης και τέλος την αιμόλυση τους. Για την αντιμετώπιση της οξειδωτικής αυτής καταπόνησης χρησιμοποιούνται αντιοξειδωτικές ουσίες είτε φυσικές, είτε τεχνητές. Έχει παρατηρηθεί πως το ρόδι είναι πλούσιο σε αντιοξειδωτικές ουσίες, οι οποίες μπορούν να μεταβολιστούν από τον ανθρώπινο οργανισμό και να συνεισφέρουν σε αυτόν.

Στη μελέτη αυτή ελέγχεται η *in vitro* επίδραση της ουρίας και της κρεατινίνης σε υγιή ερυθροκύτταρα, καθώς επίσης και η αντιοξειδωτική δράση του ροδιού.

**Υλικά και μέθοδοι:** Σε πλυμένα ερυθροκύτταρα υγιών ατόμων προστέθηκαν διαλύματα ουρίας, κρεατινίνης και εκχυλίσματος ροδιού, επαναφέροντας τον αρχικό αιματοκρίτη. Στα δείγματα μετρήθηκε η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, η ωσμωτική αντίσταση των κυττάρων, οι μορφολογικές αλλοιώσεις και τέλος η έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης.

**Αποτελέσματα:** Η ουρία και η κρεατινίνη προκαλούν την αυξημένη αιμόλυση των ερυθροκυττάρων και αύξηση της ωσμωτικής τους αντίστασης καθώς και μορφολογικές αλλοιώσεις παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στο αίμα των νεφροπαθών. Το εκχύλισμα του ροδιού παρουσιάζει εντυπωσιακά αποτελέσματα στην δράση του έναντι των τοξικών ουσιών.

**Συζήτηση:** Τα *in vitro* αποτελέσματα παρουσιάζουν λίγες, όμως σημαντικές διαφορές με αυτά που είχαν ήδη βρεθεί σε *in vivo* μελέτες, τα οποία μπορούν να ενοχοποιήσουν μεταβλητές που δεν υπήρχαν σ' αυτά τα πειράματα όπως: η ροή του αίματος στο μηχάνημα της αιμοκάθαρσης. Για τη δράση της ουρίας και της κρεατινίνης επιβάλλονται περεταίρω έλεγχοι με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και συγκεντρώσεων καθώς παρατηρήθηκαν σημεία αυξημένης βαρύτητας, τα οποία σε αυτή τη μελέτη δεν μπόρεσαν να ελεγχθούν. Τέλος, το ρόδι παρότι έδωσε κάποια



σημαντικά αποτελέσματα δεν γνωστοποιήθηκε ο μηχανισμός δράσης του και το συστατικό το οποίο είναι το πιο αποτελεσματικό.

## ABSTRACT

---

**Background:** Chronic renal disease is characterized by the progressive loss of renal function. The severity of this disease has been classified into five stages, with stage 1 being considered the most mild state displaying symptoms and stage 5 as a serious disease with low life expectancy if didn't cured. The fifth stage redounds in chronic end stage renal disease (ESRD), otherwise chronic end stage renal failure (ESRF). Patients who have an ESRD background present extensive toxin production, leading to oxidative damage after interaction with red blood cells in the region. Furthermore, the already existing erythrocytes of the patients receiving mechanical stress during the flow through the dialyzer, and metabolic stress due to high concentration of uremic toxins and loss of glucose, resulting in oxidation, their induction of morphological changes, changes in the proteome of the cellular membrane and last but not least, hemolysis. To address this oxidative stress, natural or artificial antioxidants are used. It has been observed that the pomegranate is rich in antioxidants, which can be metabolized by the human organism and contribute to its health.

In this study the in vitro effect of urea and creatinine in erythrocytes of healthy individuals was tested, and the antioxidant activity of pomegranate .

**Materials and Methods:** In washed erythrocytes of healthy individuals' solutions of urea, creatinine and pomegranate extract was added, restoring the premium hematocrit of them. In the samples the free hemoglobin, the osmotic resistance of the cells, the morphological alterations and finally the expression of phosphatidylserine was measured.

**Results:** Urea and creatinine cause the increase of hemolysis of the erythrocytes and the increase of the osmotic resistance. The morphological alterations were similar to those which were observed in the blood of nephropathics. The extract of pomegranate shows impressive results in action against to toxic substances.

**Discussion:** The in vitro results have shown few but significant differences with what had already been found in the vivo studies, which may implicate variables not existed in these experiments: such that the flow of blood to the dialysis machine. For the effect of urea and creatinine imposed further controls, a greater number of samples and concentrations as signs of increased severity were observed, which in this study could not be controlled. Even if, the pomegranate yielded some significant results, the mechanism of pomegranate's action and the most effective ingredient of that, are not reported yet.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. National Kidney Foundation (2002). Definition and stages of chronic kidney disease. Retrieved 2008-06-29.
2. The kidney Foundation of Canada (2003). Evaluation and management of chronic kidney disease 3:1-163.
3. M. Antonelou, H. Georgatzakou, V. Tzounakas, A. Velentzas, A. Kokkalis, A. Kriebardis, I. Papassideri. Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study. *J Proteomics* 2014;101:88-101.
4. W. J. Marshall, S. K. Bangert. *Clinical Chemistry*, Elsevier Inc., sixth edition 2011.
5. Prabhakar SS, Zeballos GA, Montoya-Zavala M, et al: Urea inhibits inducible nitric oxide synthase in macrophage cell line. 1997; 273;C1882-C1888.
6. McClellan W, Aronoff SL, Bolton WK, Hood S, Lorber DL, Tang KL, Tse TF, Wasserman B, Leiserowitz M. The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease. *Curr Med Res Opin*. 2004 Sep; 20(9):1501-10.
7. Schmidt RJ, Dalton CL. Treating anemia of chronic kidney disease in the primary care setting: cardiovascular outcomes and management recommendations. *Osteopath Med Prim Care*. 2007 Oct 2; 1:14.
8. Eschbach JW, Varma A, Stivelman JC. Is it time for a paradigm shift? Is erythropoietin deficiency still the main cause of renal anaemia? *Nephrol Dial Transplant*. 2002 ;17Suppl 5:2-7.
9. Levin A, Thompson CR, Ethier J, Carlisle EJ, Tobe S, Mendelssohn D, Burgess E, Jindal K, Barrett B, Singer J, Djurdjev O. Left ventricular mass index increase in early renal disease: impact of decline in hemoglobin. *Am J Kidney Dis*.1999 Jul; 34(1):125-34.
10. Schwartz Allan B, Prasad Vinod, Garcha Jasjot. Anemia of chronic kidney disease: A combined effect of marginal iron stores and erythropoietin deficiency. *Dialysis and transplantation* 2004, 33(12):758-769.
11. Saeed F, Agrawal N, Greenberg E, Holley JL. Lower gastrointestinal bleeding in chronic hemodialysis patients. *Int J Nephrol*. 2011;2011:272535
12. Krikorian SA: Managing Anemia of Chronic Kidney Disease. *American Journal of Lifestyle Medicine* 2009, 3(2):135-146.

13. Eckardt KU. Pathophysiology of renal anemia. *ClinNephrol*2000;53:S2–8.
14. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3381–8.
15. M. Antonelou, H. Georgatzakou, V. Tzounakas, A. Velentzas, A. Kokkalis, A. Kriebardis, I. Papassideri. Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study. *J Proteomics* 2014;101:88-101
16. Sotirakopoulos N, Tsitsios T, Stambolidou M, Athanasiou G, Peiou M, Kokkinou V, et al. The red blood cell deformability in patients suffering from end stage renal failure on hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ren Fail* 2004;26:179–83.
17. Goi G, Massaccesi L, Baquero Herrera CJ, Musetti C, Ciurlino D, Cusi D, et al. Oxidative stress in elderly chronic renal failure patients: effects of renal replacement therapies on cell membrane fluidity. *J Nephrol* 2009;22:630–6.
18. Hashimoto H, Mio T, Sumino K. Lipid abnormalities of erythrocyte membranes in hemodialysis patients with chronic renal failure. *ClinChimActa* 1996;252:137–45.
19. Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J, Lindholm B, Heimbürger O, Massy Z. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:505–21.
20. Hashimoto H, Mio T, Sumino K. Lipid abnormalities of erythrocyte membranes in hemodialysis patients with chronic renal failure. *ClinChimActa* 1996;252:137–45.
21. Glass GA, Gershon D. Decreased enzymic protection and increased sensitivity to oxidative damage in erythrocytes as a function of cell and donor aging. *Biochem J* 1984;218:531–7.
22. Hirayama A, Nagase S, Gotoh M, Takemura K, Tomida C, Ueda A, et al. Hemodialysis does not influence the peroxidative state already present in uremia. *Nephron* 2000;86:436–40.
23. Lucchi L, Bergamini S, Iannone A, Perrone S, Stipo L, Olmeda F, et al. Erythrocyte susceptibility to oxidative stress in chronic renal failure patients under different substitutive treatments. *Artif Organs* 2005;29:67–72.
24. Antonelou MH, Kriebardis AG, Velentzas AD, Kokkalis AC, Georgakopoulou SC, Papassideri IS. Oxidative stress-associated shape transformations and membrane

proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. *J Proteomics*. 2011 Oct 19;74(11):2441-52.

25. Brzeszczynska J, Luciak M, Gwozdziński K. Alterations of erythrocyte structure and cellular susceptibility in patients with chronic renal failure: effect of haemodialysis and oxidative stress. *Free Radic Res* 2008;42:40–8.

26. Antonelou MH, Kriebardis AG, Velentzas AD, Kokkalis AC, Georgakopoulou SC, Papassideri IS. Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. *J Proteomics* 2011;74:2441–52.

27. Mansouri A, Perry CA. Hemoglobin autoxidation at physiological concentrations. *Hemoglobin* 1987;11:353–71.

28. Margetis P, Antonelou M, Karababa F, Loutradi A, Margaritis L, Papassideri I. Physiologically important secondary modifications of red cell membrane in hereditary spherocytosis—evidence for in vivo oxidation and lipid rafts protein variations. *Blood Cells Mol Dis* 2007;38:210–20.

29. Rocha S, Costa E, Coimbra S, Nascimento H, Catarino C, Rocha-Pereira P, et al. Linkage of cytosolic peroxiredoxin 2 to erythrocyte membrane imposed by hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Blood Cells Mol Dis* 2009;43:68–73.

30. Stuhlmeier KM, Kao JJ, Wallbrandt P, Lindberg M, Hammarstrom B, Broell H, et al. Antioxidant protein 2 prevents methemoglobin formation in erythrocyte hemolysates. *Eur J Biochem* 2003;270:334–41.

31. Low FM, Hampton MB, Winterbourn CC. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1621–30

32. Rumsey SC, Kwon O, Xu GW, Burant CF, Simpson I, Levine M. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 1997;272:18982–9.

33. Bakaev VV, Efremov AV, Tityaev II. Low levels of dehydroascorbic acid in uraemic serum and the partial correction of dehydroascorbic acid deficiency by haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1472–4.

34. Reinhart WH, Chien S. Red cell rheology in stomatocyte–echinocyte transformation: roles of cell geometry and cell shape. *Blood* 1986;67:1110–8.

35. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J Surg Res* 2002;102:6–12.

36. D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red blood cell concentrates: from metabolism to proteomics. *Haematologica* 2012;97:107–15.
37. Brimble KS, McFarlane A, Winegard N, Crowther M, Churchill DN. Effect of chronic kidney disease on red blood cell rheology. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006;34:411–20.
38. Snyder LM, Fortier NL, Trainor J, Jacobs J, Leb L, Lubin B, et al. Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *J Clin Invest* 1985;76:1971–7.
39. Hasler CR, Owen GR, Brunner W, Reinhart WH. Echinocytosis induced by haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:3132–7.
40. Agroyannis B, Kopelias I, Fourtounas C, Paraskevopoulos A, Tzanatos H, Dalamangas A, et al. Relation between echinocytosis and erythrocyte calcium content in hemodialyzed uremic patients. *Artif Organs* 2001;25:486–90.
41. Truong HT, Daleke DL, Huestis WH. Human erythrocyte shape regulation: interaction of metabolic and redox status. *Biochim Biophys Acta* 1993;1150:51–6.
42. Saradhadevi V, Sakthivel R, Vedamoorthy S, Selvam R, Parinandi N. Alterations in band 3 protein and anion exchange in red blood cells of renal failure patients. *Mol Cell Biochem* 2005;273:11–24.
43. Costa E, Rocha S, Rocha-Pereira P, Castro E, Miranda V, do Sameiro Faria M, et al. Altered erythrocyte membrane protein composition in chronic kidney disease stage 5 patients under haemodialysis and recombinant human erythropoietin therapy. *Blood Purif* 2008;26:267–73.
44. Costa E, Rocha S, Rocha-Pereira P, Castro E, Miranda V, Faria Mdo S, et al. Changes in red blood cells membrane protein composition during hemodialysis procedure. *Ren Fail* 2008;30:971–5.
45. Saradhadevi V, Sakthivel R, Vedamoorthy S, Selvam R, Parinandi N. Alterations in band 3 protein and anion exchange in red blood cells of renal failure patients. *Mol Cell Biochem* 2005;273:11–24.
46. Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 2000;288:2051–4.
47. Calabrese V, Mancuso C, Sapienza M, Puleo E, Calafato S, Cornelius C, et al. Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy. *Cell Stress Chaperones* 2007;12:299–306.

48. Corsi D, Paiardini M, Crinelli R, Bucchini A, Magnani M. Alteration of alpha-spectrin ubiquitination due to age-dependent changes in the erythrocyte membrane. *Eur J Biochem* 1999;261:775–83.
49. Khan AA, Hanada T, Mohseni M, Jeong JJ, Zeng L, Gaetani M, et al. Dematin and adducin provide a novel link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1. *J Biol Chem* 2008;283:14600–9.
50. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006;10:389–406.
51. Hashimoto H, Mio T, Sumino K. Lipid abnormalities of erythrocyte membranes in hemodialysis patients with chronic renal failure. *Clin Chim Acta* 1996;252:137–45.
52. Pavone B, Sirolli V, Bucci S, Libardi F, Felaco P, Amoroso L, et al. Adsorption and carbonylation of plasma proteins by dialyser membrane material: in vitro and in vivo proteomic investigations. *Blood Transfus* 2010;8(Suppl 3):s113–9.
53. Iseki K, Tozawa M, Takishita S. Effect of the duration of dialysis on survival in a cohort of chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:782–7.
54. Blayney MJ, Pisoni RL, Bragg-Gresham JL, Bommer J, Piera L, Saito A, et al. High alkaline phosphatase levels in hemodialysis patients are associated with higher risk of hospitalization and death. *Kidney Int.*
55. McGregor GP, Biesalski HK (November 2006). Rationale and impact of vitamin C in clinical nutrition.
56. Handelman GJ. Evaluation of oxidant stress in dialysis patients. *Blood Purif* 2000;18:343-9.
57. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: An emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1272-80.
58. Himmelfarb J. Oxidative stress in hemodialysis. *Contrib Nephrol* 2008;161:132-7.
59. Dirican M, Sarandol E, Serdar Z, Ocak N, Dilek K. Oxidative status and prevalent cardiovascular disease in patients with chronic renal failure treated by hemodialysis. *Clin Nephrol* 2007;68:144-50.

60. Poyrazoglu OK, Dogukan A, Yalniz M, Seckin D, Gunal AL. Acute effect of standard heparin versus low molecular weight heparin on oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *Ren Fail* 2006;28:723-7.
61. Mimi -Oka J, Savi -Radojevi  A, Pljesa-Ercegovac M, et al. Evaluation of oxidative stress after repeated intravenous iron supplementation. *Ren Fail* 2005;27:345-51.
62. Memon RA, Staprans I, Noor M, et al. Infection and inflammation induce LDL oxidation In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1536-42.
63. Becker BF (June 1993). Towards the physiological function of uric acid .*Free Radical Biology & Medicine* 14 (6): 615–31.
64. Sautin, Yuri; Johnson, Richard (2008). Uric Acid: The Oxidant-Antioxidant Paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 27 (6): 608–19.
65. Enomoto, Atsushi; Endou, Hitoshi (2005). Roles of organic anion transporters (OATs) and a urate transporter (URAT1) in the pathophysiology of human disease.
66. Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA (2005). Uric acid and oxidative stress. *Current Pharmaceutical Design* 11 (32): 4145–51.
67. Meyers DG, Maloley PA, Weeks D (1996). Safety of antioxidant vitamins .*Arch. Intern. Med.* 156 (9): 925–35.
68. Ruano-Ravina A, Figueiras A, Freire-Garabal M, Barros-Dios JM (2006). Antioxidant vitamins and risk of lung cancer. *Curr. Pharm. Des.* 12 (5): 599–613.
69. Pryor WA (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radic. Biol. Med.* 28 (1): 141–64.
70. Oxidative Stress, Human Diseases and Biomarkers. Torri C. *Clinical Laboratory International*, 27(5): 28-29, 2003.
71. Determination of Reactive Oxygen Species: Evaluation of a Simple Colorimetric Method Parmigianni S., Grassi L., Solari E., Torri C., Bacchi-Modena A., Bevilacqua G., *Perinat Med* 31 (Suppl 1): pp-264, 6th World Congress of Perinatal Medecine, 2003.
72. Blood measures of oxidative stress assessed in capillary blood: range of measures in normals and asymptomatic current smokers. M. Visconti, C. Micheletto, S. Tognella, F. Trevisan, C. Pomari, RW. Dal Negro. *European Respiratory Journal* 22 (Suppl 45): pp. 83S, 13th ERS Annual Congress, 2003.
73. [Benzie I.F.](#) and [Strain J.J.](#) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. [Anal Biochem.](#) 15;239(1):70-6.



[Duplancic D.](#), [Kukoc-Modun L.](#), [Modun D.](#), [Radic N.](#) (2011) Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. *Molecules*, 17;16(8):7058-68, 1996.

74. E. P. Lansky and R. A. Newman, *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 109, no. 2, pp. 177–206, 2007.

75. S. A. H. Naqvi, M. S. Y. Khan, and S. B. Vohora, Antibacterial, anti-fungal and anthelmintic investigations on Indian medicinal plants, *Fitoterapia*, vol. 62, no. 3, pp. 221–228, 1991.

76. A. Caceres, L. M. Giron, S. R. Alvarado, and M. F. Torres, Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 20, no. 3, pp. 223–237, 1987.

77. F. de Nigris, M. L. Balestrieri, S. Williams-Ignarro et al., The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats, *Nitric Oxide*, vol. 17, no. 1, pp. 50–54, 2007.

78. S. D. Johanningsmeier and G. K. Harris, Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Annual Review of Food Science and Technology*, vol. 2, pp. 181–201, 2011.

79. M. I. Gil, F. A. Tomas-Barberan, B. Hess-Pierce, D. M. Holcroft, and A. A. Kader, Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, no. 10, pp. 4581–4589, 2000.

80. M. Falsaperla, G. Morgia, A. Tartarone, R. Ardito, and G. Romano, Support ellagic acid therapy in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC) on standard chemotherapy using vinorelbine and estramustine phosphate, *European Urology*, vol. 47, no. 4, pp. 449–454, 2005.

81. E. A. Hassoun, J. Vodhanel, and A. Abushaban, The modulatory effects of ellagic acid and vitamin E succinate on TCDD-induced oxidative stress in different brain regions of rats after subchronic exposure, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, vol. 18, no. 4, pp. 196–203, 2004.

82. E.P.Lansky, W. Jiang, H. Mo et al., Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions, *Investigational New Drugs*, vol. 23, no. 1, pp. 11–20, 2005.

83. E. P. Lansky, G. Harrison, P. Froom, and W. G. Jiang, Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3



prostate cancer cell invasion across Matrigel, *Investigational New Drugs*, vol. 23, no. 2, pp. 121–122, 2005.

84. N. P. Seeram, R. Lee, and D. Heber, Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum*L.) juice, *Clinica Chimica Acta*, vol. 348, no. 1-2, pp. 63–68, 2004.

85. N. P. Seeram, S.M.Henning, Y. Zhang, M. Suchard, Z. Li, and D. Heber, Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours, *Journal of Nutrition*, vol. 136, no. 10, pp. 2481–2485, 2006.

86. A. González-Sarrías, M. Larrosa, F. A. Tomás-Barberán, P. Dolara, and J. C. Espín, NF- $\kappa$ B-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts, *British Journal of Nutrition*, vol. 104, no. 4, pp. 503–512, 2010.

87. B. Dobrosława, S. G. Kasimsetty, S. I. Khan, and F. Daneel, Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 21, pp. 10181–10186, 2009.

88. N. P. Seeram, Y. Zhang, R. McKeever et al., Pomegranate juice and extracts provide similar levels of plasma and urinary ellagitannin metabolites in human subjects, *Journal of Medicinal Food*, vol. 11, no. 2, pp. 390–394, 2008.

89. B. Cerdá, J. C. Espín, S. Parra, P. Martínez, and F. A. Tomás Barberán, The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans, *European Journal of Nutrition*, vol. 43, no. 4, pp. 205–220, 2004.

90. B. Cerdá, R. Llorach, J. J. Cerdón, J. C. Espín, and F. A. Tomás Barberán, Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice, *European Journal of Nutrition*, vol. 42, no. 1, pp. 18–28, 2003.

91. B. Cerdá, J. J. Cerdón, F. A. Tomás-Barberán, and J. C. Espín, Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 11, pp. 3493–3501, 2003.

92. P. A. Crawford and J. I. Gordon, Microbial regulation of intestinal radiosensitivity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 37, pp. 13254–13259, 2005.

93. D. Bialonska, P. Ramnani, S. G. Kasimsetty, K. R. Muntha, G. R. Gibson, and D. Ferreira, The influence of pomegranate byproduct and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 140, no. 2-3, pp. 175–182, 2010.
94. D. Bialonska, S. G. Kasimsetty, K. K. Schrader, and D. Ferreira, The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) byproducts and ellagitannins on the growth of human gut bacteria, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 18, pp. 8344–8349, 2009.
95. A. H. Mokdad, B. A. Bowman, E. S. Ford, F. Vinicor, J. S. Marks, and J. P. Koplan, The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States, *Journal of the American Medical Association*, vol. 286, no. 10, pp. 1195–1200, 2001.
96. B. Desvergne and W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism, *Endocrine Reviews*, vol. 20, no. 5, pp. 649–688, 1999.
97. R. W. Nesto, D. Bell, R. O. Bonow et al., Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association, *Diabetes Care*, vol. 27, no. 1, pp. 256–263, 2004.
98. K. Katayama, K. Wada, A. Nakajima et al., A novel PPAR $\gamma$  gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in murine model, *Gastroenterology*, vol. 124, no. 5, pp. 1315–1324, 2003.
99. L. Dubuquoy, E. A. Jansson, S. Deeb et al., Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in ulcerative colitis, *Gastroenterology*, vol. 124, no. 5, pp. 1265–1276, 2003.
100. S. C. Hsu and C. J. Huang, Changes in liver PPAR $\alpha$  mRNA expression in response to two levels of high-safflower-oil diets correlate with changes in adiposity and serum leptin in rats and mice, *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 18, no. 2, pp. 86–96, 2007.
101. R. A. Daynes and D. C. Jones, Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity, *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 10, pp. 748–759, 2002.
102. G. Chinetti, S. Lestavel, V. Bocher et al., PPAR- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$  activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway, *Nature Medicine*, vol. 7, no. 1, pp. 53–58, 2001.
103. B. H. Park, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler, Genetic disruption of PPAR $\delta$  decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 5, pp. 2598–2603, 2001.

104. M. Ricote, A. C. Li, T. M. Willson, C. J. Kelly, and C. K. Glass, The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation, *Nature*, vol. 391, no. 6662, pp. 79–82, 1998.
105. Monica Viladomiu, Raquel Hontecillas, Pinyi Lu, Josep Bassaganya-Riera Preventive and Prophylactic Mechanisms of Action of Pomegranate Bioactive Constituents, *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 789764.
106. M. Albrecht, W. Jiang, J. Kumi-Diaka et al., Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells, *Journal of Medicinal Food*, vol. 7, no. 3, pp. 274–283, 2004.
107. L. S. Adams, N. P. Seeram, B. B. Aggarwal, Y. Takada, D. Sand, and D. Heber, Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 3, pp. 980–985, 2006.
108. S. Shukla and S. Gupta, Molecular mechanisms for apigenin-induced cell-cycle arrest and apoptosis of hormone refractory human prostate carcinoma DU145 cells, *Molecular Carcinogenesis*, vol. 39, no. 2, pp. 114–126, 2004.
109. L. S. Meei, F. C. Kuo, J. S. Yen, W. L. Wan, Y. L. S. Shoei, and H. L. Shing, Activation of phosphoinositide 3-kinase in response to inflammation and nitric oxide leads to the up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and subsequent cell proliferation in mesangial cells, *Cellular Signalling*, vol. 17, no. 8, pp. 975–984, 2005.
110. H. Matsuura, M. Sakaue, K. Subbaramaiah et al., Regulation of cyclooxygenase-2 by interferon  $\gamma$  and transforming growth factor  $\alpha$  in normal human epidermal keratinocytes and squamous carcinoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 41, pp. 29138–29148, 1999.
111. Kulkarni, A. P.; Aradhya, S. M.; Divakar, S. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidants punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. *Food Chem.* 2004, 87, 551-557.
112. Torreggiani, A.; Trincherro, A.; Tamba, M.; Taddei, P. Raman and pulse radiolysis studies of the antioxidant properties of quercetin: Cu(II) chelation and oxidizing radical scavenging. *J. Raman Spectrosc.* 2005, 36, 380-388.
113. Holmlin, R. E.; Dandliker, P. J.; Barton, J. K. Charge transfer through the DNA base stack. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1997, 36, 2716-2730.
114. ANAND P. KULKARNI, H. S. MAHAL, S. KAPOOR, S. M. ARADHYA In Vitro Studies on the Binding, Antioxidant, and Cytotoxic Actions of Punicalagin. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1491-1500.

115. Tenenbaum A, Motro M, Fisman EZ. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. *Cardiovascular Diabetology*. 2005;4, article 14.

116. Lang E, Qadri SM, Lang F: Killing me softly - suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1236-1243.

117. Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM: Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285:C1553-C1560.



