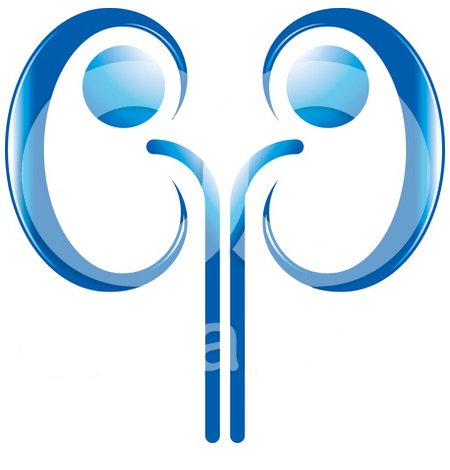
**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΤΕΙ) ΑΘΗΝΑΣ**

Β ΑΘΗΝΑ, 2014

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**

Εργαστηριακό Πρότυπο Ασθενών Που Υποβάλλονται σε Αιμοκάθαρση Ανάλογα με την Ανταπόκριση σε Ερυθροποιητίνη



**Μπάσσα Χριστίνα Α.Μ:10033**

**Ζώη Μαρτίνα Α.Μ:10100**

Εισηγητής: **Αναστάσιος Κριεμπάρδης**

Επίκουρος Kαθηγητής Εργαστηριακής Αιματολογίας-Αιμοδοσίας

TECHNOLOGICAL INSTITUTE OF ATHENS

FACULTY OF HEALTH AND CARING PROFESSIONS

DEPARTMENT OF MEDICAL LABORATORIES

**Laboratory Standards patients undergoing dialysis depending on the response to erythropoietin**

**ZOI MARTINA**

**BASSA CHRISTINA**

Dr. Kriebardis Anastasios

Assistant Proffessor of Laboratory Haematology and Transfusion medicine

ATHENS, 2014

**Περίληψη**

**Εισαγωγή:** Στις μέρες μας η νεφρική ανεπάρκεια παραμένει ένα μείζον πρόβλημα με μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας. Βασικό σύμπτωμα της νεφρικής ανεπάρκειας είναι η αναιμία η οποία πολλές φορές εκδηλώνεται ως μια παθολογική κατάσταση βαρίας μορφής. Ως θεραπεία εδώ και αρκετά χρόνια χρησιμοποιείται η χορήγηση ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης η οποία παρόλο που σε ορισμένους ασθενείς έχει εμφανή αποτελέσματα σε άλλους ασθενείς παρά την αυξανόμενη δόση ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης (rhEPO) δεν παρατηρείται κανένα αποτέλεσμα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση πρόκειται για αντίσταση στη θεραπεία με rhEPO. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα πιθανότερα και σημαντικότερα αίτια που οδηγούν στην αντίσταση αυτή είναι η φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες, η έλλειψη σιδήρου, η καταστροφή των ερυθροκυττάρων, η διαδικασία της αιμοκάθαρσης ενώ ως ελάσσονος σημασίας αιτίες θεωρούνται η έλλειψη B12, τα αντισώματα κατά της ερυθροποιητίνης, η ανεπάρκεια της βιταμίνης Ε καθώς και οι αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων ερυθροποιητίνης.

**Σκοπός:** Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η κυτταροβιολογική μελέτη των ερυθροκυττάρων, ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση και είχαν αντίσταση ή/και όχι στην χορήγηση της ερυθροποιητίνης.

**Υλικά & μέθοδοι:** Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν συνολικά 12 ασθενείς που βρίσκονταν υπο αιμοκάθαρση από τους οποίους οι 6 ανταποκρίνονταν φυσιολογικά στη θεραπεία με ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη (rhEPO) ενώ οι άλλοι 6 δεν ανταποκρίνονταν στην ίδια θεραπεία παρά την αυξημένη χορηγούμενη δόση ερυθροποιητίνη. Σημειώνεται ότι οι ασθενείς αυτοί δεν είχαν κάποιο μεταδοτικό νόσημα ούτε ήταν διαβητικοί. Οι δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα που συλλέχθηκαν ήταν η ωσμωτική ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων, η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος, η μέτρηση των δικτυοερυθροκυττάρων και η μικροσκόπηση όλων των αιμοτολογικών επιχρισμάτων.

**Αποτελέσματα:** Κατά την μελέτη των δύο κατηγορίων των ασθενών, βρέθηκαν στους μη ανταποκριθέντες χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη , υψηλά επίπεδα δικυτοερυθροκυττάρων πριν και μετά την αιμοκάθαρση, η ωσμωτική αντίσταση των ερυθροκυττάρων ήταν η ίδια τόσο πριν όσο και μετά την αιμοκάθαρση. Παράλληλα όλοι οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες παρατηρήθηκαν φυσιολογικοί εκτός από το RDW σε ορισμένους από τους ασθενείς που ήταν ελαφρά αυξημένο. Οι ανταποκρινόμενοι στη θεραπεία ασθενείς παρουσίασαν φυσιολογικά επίπεδα αιμοσφαιρίνης, αιματοκρίτη και δικτυοερυθροκυττάρων, φυσιολογική ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και βελτίωση της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθροκυττάρων μετά την αιμοκάθαρση.

**Συζήτηση:** Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι, στους μη ανταποκριθέντες ασθενείς εξαιτίας πολλών παραγόντων όπως η διαδικασία της αιμοκάθαρσης, το είδος της αιμοκάθαρσης, το οξειδωτικό στρες, η καταστροφή των ερυθροκυττάρων, η έλλειψη σιδήρου και η φλεγμονή, συγκριτικά με τους μη ανταποκριθέντες, η ανταπόκριση τους στην θεραπεία με rhEPO επηρεάζεται σημαντικά. Ωστόσο περαιτέρω διερεύνηση συνίσταται κυρίως όσον αφορά τις μεταβολές που προκύπτουν στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη λόγω της αιμοκάθαρσης η οποία παίζει πολυποίκιλο ρόλο τόσο στη φλεγμονή όσο και στο οξειδωτικό στρες.

**Abstract**

**Introduction:** Nowadays renal failure remains a major problem with high levels of mortality. A basic symptom of renal failure is anemia that many times manifests with its heavy form. As a treatment of this anemia, for several years, was used recombinant erythropoietin, which in some patients has obvious effects, while in others patients despite the increasinh dose of rhEPO did not show any effect. In this case we are talking about resistance to treatment with rhEPO. According to the literature, the most likely and important causes leading to this resistance is inflammation, oxidative stress, iron deficiency, destruction of erythrocytes, the process of dialysis and as no important considered causes are lack of vitamin 12, antibodies against erythropoietin deficiency, lack of vitamin E and the interactions of the erythropoietin receptor.

**Purpose:** The purpose of this study was to search for the causes that lead to the inevitable resistance in some patients treated with recombinant erythropoietin compared with non responders and controls.

**Materials & Methods:** In the present study a total of 12 patients were examined which were under hemodialysis and from which 6 responded normally to treatment with recombinant erythropoietin (rhEPO) while the other six did not respond to the same treatment despite increased dose EPO. Noted that these patients do not have a contagious disease or were diabetic. The assays were performed on the samples collected, was the osmotic fragility of RBCs, plasma free hemoglobin, measuring reticulocytes count and microscopy all hematological coatings.

**Results:** During the study of the two groups of patients, were found in non-responders low Hb levels and Hct, high levels of reticulocytew before and after dialysis, osmotic resistance of RBCs was the same both before and after dialysis, normal erythrocyte indices except from RDW which in some of these patients was slightly increased. The responders showed normal levels of Hb, Hct and reticulocytes, normal free hemoglobin and osmotic resistance of RBCs improved after hemodialysis.

**Conclusions:** The above results show that the non-responders due to many factors such as the dialysis procedure, the type of dialysis, the oxidative stress, the destruction of erythrocytes, the lack of Fe and the nflammation are affected to their response to treatment with rhEPO compared to responders. However, further investigation is recommended particularly in regard to changes that occur in the erythrocyte membrane due to dialysis that plays diverse role in both inflammation and oxidative stress.

|  |
| --- |
| Κεφάλαιο A |
| 1. Εισαγωγή |
| Α.1.1 Νεφρική Ανεπάρκεια. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 9 |
| Α.1.2 Αιμοποίηση. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .12 |
| Α.1.3 Σχέση αναιμίας και νεφρικής ανεπάρκειας. . . . . . . . . .14 |
| Α.1.4 Ορισμός και Δράση ερυθροποιητίνης. . . . . . . . . . . . . .22 |
| Α.1.5 Διαφορά ενδογενούς και ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 26 |
| Α.1.6 Παρενέργειες ερυθροποιητίνης. . . . . . . . . . . . . . . . . . 29 |
| Α.1.7Αιμοκάθαρση. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .32 |

# Περιεχόμενα

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| |  | | --- | | A.2.1 Αντίσταση στη θεραπεία με rhEPO. . . . . . . . . . . . . . . .42 | | A.2.2 Σχέση Φλεγμονής και μη ανταπόκρισης στην rhEPO. .45 | | A.2.2.1 Ενεργοποίηση λευκοκυττάρων. . . . . . . . . . . . . . . . . .48 | | A.2.2.2 Ενεργοποίηση Ουδετερόφιλων. . . . . . . . . . . . . . . . . 51 |  |  | | --- | | A.2.3 Σχέση σιδήρου και μη ανταπόκρισης στην rhEPO. . . 53 | | A.2.3.1 Μεταβολισμός σιδήρου. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .53 | | A.2.4 Οξειδωτικό Stress . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .59 | | A.2.4.1 Οξειδωτικό Stress και αντιοξειδωτικά συστήματα σε Νεφροπαθείς Τελικού Σταδίου. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 62 | | A.2.5 Δομή ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. . . . . . . . . . . . . .64 | | A.2.6 Καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων. . . . . . . . . .66 | | A.2.7 Δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός. . . . . . . . . . .69 | | A.2.8 Διαδικασία αιμοκάθαρσης και αντίκτυπος στη μεμβράνη των RBCs. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .70 | | A.2.9 Έλλειψη βιταμίνης Β12 και Βιταμίνη Ε. . . . . . . . . . . .73 | | A.3.1 Αντισώματα κατά της ερυθροποιητίνης. . . . . . . . . . .74 | | A.3.2 Αλληλεπιδράσεις υποδοχέων ερυθροποιητίνης . . . . .77 | | A.3.3 Υποδοχείς ερυθροποιητίνης και η σχέση τους με την ανταπόκριση στην rhEPO. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 78 | | A.3.4 Σχέση διαφόρων ασθενειών με την μη ανταπόκριση στην rhEPO. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 80 |  |  | | --- | | Κεφάλαιο B | | 1. Υλικά και μέθοδοι | | Σκοπός πτυχιακής εργασίας . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 81 | | B.1 Πειραματικά πρωτόκολλα. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .81 | | B.2 Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων . . . . . . . . . . . . . . .86 | | B.3 Δότες και κριτήρια κατηγοριοποίησης. . . . . . . . . . . . . . .87 | |

**Κεφάλαιο Γ**

|  |
| --- |
| Γ) Αποτελέσματα . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .94 |

**Κεφάλαιο Δ**

|  |
| --- |
| Δ. Συζήτηση. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .105 |
| Δ) Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι . . . . . . . . . . . . . . 108 |

**Κεφάλαιο Ε**

|  |
| --- |
| Ε) Βιβλιογραφία . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 110 |

|  |
| --- |
| Συντμήσεις |

**BFU-E**  : burst forming unit, erythroid

**CFU-E** : colony forming unit, erythroid

**CD4+**: δείκτης στην επιφάνεια των Τ- βοηθητικών κυττάρων

**CXCR1**  : δείκτης στην επιφάνεις των ουδετερόφιλων

**DMT1** : δισθενής μεταφορέας μετάλλου

**EPO**  : erythropoietin, ερυθροποιητίνη

**EPOR**  : erythropoietin receptor

**ESA**  : erythropoiesis stimulating agents

**ESRD** : end stage renal disease

**GM-SCF** : παράγοντας διέγερσης των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων

**HFE** : αιμοχρωμάτωση

**HMWAg**  : high molecular weight aggregates

**HDF** : Hemodiafiltration

**HD** : Hemodialysis

**IL-1** : ιντερλευκίνη 1

**IPN-γ** : ιντερφερόνη γ

**Pfrag**  : proteolytic fragments

**RBCs**  : red blood cells

**Ros** : reactive oxygen species, δραστικά είδη οξυγόνου

**RhEPO**  : recombinant human erythropoietin, Ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη

**SODC** : δισμουτάση του υπεροξειδίου

**S-TFR** : διαλυτός υποδοχέας τρασφερρίνης

**TGF-B** : αυξητικός μεταβολικός παράγοντας

**TNF-a** : παράγοντας νέκρωσης όγκων

**Th1** : τύπος βοηθητικών κυττάρων

**XNA** : χρόνια νεφρική ανεπάρκεια

**AXN**  : αναιμία χρόνιας νόσου

**Κεφάλαιο A**

**Α) Εισαγωγή**

*Α.1.1 Νεφρική ανεπάρκεια*

Η **χρόνια νεφρική ανεπάρκεια** είναι η προοδευτική, μη αναστρέψιμη μείωση της νεφρικής λειτουργίας, η οποία προκαλείται από βλάβη του νεφρού ποικίλης αιτιολογίας. Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ξεκινάει ήπια και μπορεί να φτάσει μέχρι τελικού σταδίου και μπορεί να διαρκέσει από 2 έως 10 χρόνια. Στο τελικό στάδιο της νόσου ο ασθενής χρειάζεται άμεση υποστήριξη της νεφρικής λειτουργίας, με αιμοκάθαρση ή περιτοναϊκή κάθαρση.

***Οι πιο κοινές αιτίες της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας είναι:***

* *Η υπέρταση*: Όταν η πίεση που ασκεί το αίμα στα αγγεία που αιματώνουν τους νεφρούς είναι πολύ μεγάλη, μπορεί να προκαλέσει την καταστροφή τους, με συνέπεια τη μείωση της λειτουργίας των νεφρών.
* *Μολύνσεις του ουροποιητικού:* Εάν εισέλθουν βακτηρίδια στην ουροποιητική οδό και προκαλέσουν μόλυνση, η οποία δεν περιορίζεται μόνο στην ουροδόχο κύστη αλλά επεκτείνετε και στους νεφρούς. Αυτή η μόλυνση είναι ικανή να προκαλέσει απώλεια της λειτουργίας του νεφρού.
* *Διάφορες νεφροπάθειες:* όπως η σπειραματονεφρίτιδα, που είναι φλεγμονή των νεφρών και μπορει να προκαλέσει σταδιακή απώλεια της νεφρικής λειτουργίας. Η χρόνια σπειραματονεφρίτιδα αποτελεί στην Ελλάδα, την προεξάρχουσα αιτία του τελικού σταδίου της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας και ακολουθούν η άγνωστη νεφροπάθεια, η χρόνια διάμεση νεφροπάθεια και η διαβητική νεφροπάθεια.
* *Ο σακχαρώδης διαβήτης:* Όταν στο αίμα κυκλοφορεί μεγάλη ποσότητα γλυκόζης καταστρέφει τα μικρά αγγεία του σώματος, επομένως και των νεφρών. Έτσι οι νεφροί δεν μπορούν να καθαρίσουν το αίμα αποτελεσματικά. Επιπρόσθετα, ο σακχαρώδης διαβήτης προκαλεί βλάβες οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την κένωση της ουροδόχου κύστης.
* *Νεφρολιθίαση και πολυκυστική νόσος των νεφρών:* Και οι δύο αυτές ασθένειες μπορούν να προκαλέσουν απόφραξη της ουροποιητικής οδού ή κάποια μόλυνση.
* *Εκ γενετής προβλήματα του ουροποιητικού συστήματος*: Τα προβλήματα αυτά, μπορούν να προκαλέσουν απόφραξη της ουροποιητικής οδού ή παλινδρόμηση των ούρων προς τους νεφρούς, με συνέπεια να παρατηρούνται μολύνσεις ή καταστροφή των νεφρών.
* *Φάρμακα ή ναρκωτικές ουσίες:* Όπου μπορούν να καταστρέψουν την λειτουργία των νεφρών [(Ιωαννιδης, 2004)](#ιωαννιδης).

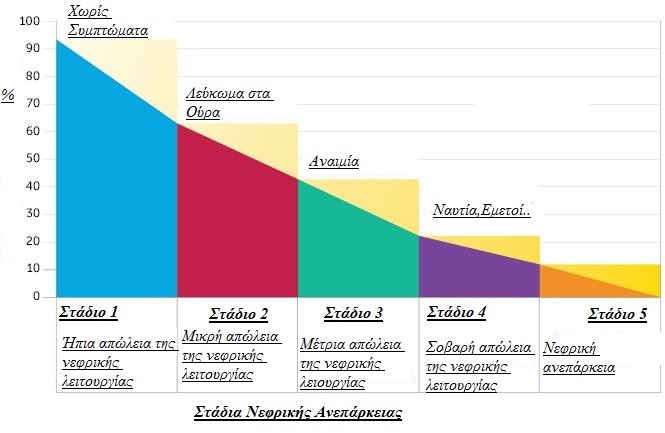
***Κλινική εικόνα-Εργαστηριακά Ευρήματα***

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια στα αρχικά στάδια δεν παρουσιάζει συμπτώματα παρά μόνο αυξημένη αρτηριακή πίεση. Έτσι κάποιος μπορεί να νοσεί αλλά να μην το γνωρίζει. Επίσης άλλα συμπτώματα που εμφανίζουν είναι τα εξής: Η αυξημένη ποσότητα κρεατινίνης στο αίμα, η απώλεια πρωτεϊνών στα ούρα (δεν μπορούν τα νεφρά να απομακρύνουν μόνο τις άχρηστες ουσίες με αποτέλεσμα την απώλεια πρωτεϊνών, άρα προκαλείτε πρωτεινουρία), ηλεκτρολυτικές διαταραχές (τέτοιες μπορεί να είναι: 1) αυξημένα επίπεδα φωσφόρου, νατρίου και καλίου 2) χαμηλά επίπεδα ασβεστίου στο αίμα), τα οιδήματα (λόγω κατακράτησης υγρών), αυξημένη ποσότητα ινσουλίνης-υπερινσουλιναιμία. Ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης (GFR). Ο GFR είναι μια εξέταση που αποτελεί πολύ καλό δείκτη εκτίμησης της νεφρικής λειτουργίας (Εάν η τιμή του είναι κάτω από 60 ml/min/1,732 για πάνω από τρεις μήνες τότε το άτομο αυτό πάσχει από νεφρική ανεπάρκεια). Εκτός από τα παραπάνω κλινικά συμπτώματα, ο ασθενής με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια μπορεί να εμφανίζει:

* μειωμένη ποσότητα ούρων
* μειωμένη σεξουαλική λειτουργία
* δυσκολία στην αναπνοή
* πόνους στο στήθος, κράμπες και σπασμούς
* αδυναμία, υπνηλία
* ναυτία και εμετούς
* τέλος αναιμία [(Schilling,1991)](#Schilling).

Για την κατάταξη **της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας σε στάδια** χρησιμοποιούμε ως ένδειξη την τιμή του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (GFR).

* Στάδιο 1ο : νεφρική βλάβη με μειωμένο ή αυξημένο GFR > 90 ml/min/1,73 m2
* Στάδιο 2ο: μικρή μείωση του GFR: 60 - 89 ml/min/1,73 m2
* Στάδιο 3ο: μέτρια μείωση του GFR: 30 - 59 ml/min/1,73 m2
* Στάδιο 4ο: σημαντική μείωση του GFR: 15 - 29 ml/min/1,73 m2
* Στάδιο 5ο: νεφρική ανεπάρκεια - με τιμή του GFR < 15 ml/min/1,73 m2

Τα ***συμπτώματα*** εμφανίζονται κυρίως στα στάδια 4 και 5 [(Χανιώτης, 2009)](#Χανιώτης).

Εικόνα 1: Στάδια χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας

**Ανατύπωση από**: http://iris.med.duth.gr

***Θεραπεία της χρόνιας νεφρικής νόσου***

Η θεραπεία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας περιλαμβάνει την αντιμετώπιση και την υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας με κάθαρση (αιμοκάθαρση ή περιτοναϊκή κάθαρση) ή με μεταμόσχευση νεφρού. Τόσο με την αιμοκάθαρση αλλά και με την περιτοναϊκή κάθαρση (αιμοκάθαρση με την βοήθεια του περιτοναίου που αποτελεί φυσιολογικό όργανο του οργανισμού) έχει επιτευχθεί μερική αποκατάσταση του προβλήματος της πλήρης ανεπάρκειας του νεφρού.

***Α.1.2 Αιμοποίηση***

Τα κύτταρα του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια) έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής γι’ αυτό καθημερινά παράγονται από το μυελό των οστών 200 εκατομμύρια ερυθρά και 100 εκατομμύρια λευκά αιμοσφαίρια.

Ολα προέρχονται από το μητρικό αρχέγονο πολυδύναμο κύτταρο (stem cell) που έχει την ικανότητα να αυτοπαράγεται αλλά και να διαφοροποιείται προς κύτταρα της κάθε σειράς. Η αιμοποίηση στηρίζεται στην διαφοροποίηση των κυττάρων, στην επίδραση του μικροπεριβάλλοντος και στους χημικούς παράγοντες.

Η ερυθρά σειρά από πολυδύναμο αρχικό κύτταρο γνωστό σαν (CFUs, colony forming units), που βρίσκεται στο μυελό των οστών, μετατρέπεται σε (BFU-E, Burst forming unit erythroid), στη συνέχεια σε CFU-E, που ωριμάζει σε ερυθρoβλάστη (προερυθροβλάστη, ερυθροβλάστη και ώριμο ερυθρό). Πάνω στα CFUs, BFU-E και CFU-E δρουν πολλοί αυξητικοί παράγοντες όπως: IL-3, GM-CSF, Epo, Θρομβοποιητίνη, SCF.

Η ερυθροποίηση αποτελεί μέρος μίας γενικότερης διαδικασίας, της αιμοποίησης, η οποία ξεκινά στο λεκιθικό ασκό και μεταναστεύει στον μυελό των οστών τη 10η -12η εμβρυική εβδομάδα. Τα αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (Hemopoietic Stem Cell, HSC) είναι πολυδύναμο με δυνατότητα διαφοροποίησης προς όλες τις αιμοποιητικές σειρές. Από το κοινό προγονικό κύτταρο MEP (Megakaryocyte-Erythroid Progenitor), προέρχονται οι “δεσμευμένες” για την ερυθρά σειρά αποικίες κυττάρων BFU-E και CFU-E [(Ney et al, 2006)](#Ney).

Στο στάδιο CFU-E η EPO είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων, ενώ παρατηρείται αντίστοιχη αύξηση στην έκφραση του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης γνωστού ως EPOR. Το πρώτο αναγνωρίσιμο κύτταρο της ερυθράς σειράς στο μυελό των οστών είναι η προερυθροβλάστη. Μεταξύ της προερυθροβλάστης και της μη διαιρούμενης ερυθροβλάστης μεσολαβούν τέσσερις κυτταρικοί κύκλοι και προκύπτουν το περισσότερο 16 ώριμα ερυθροκύτταρα, αφού κάποια χάνονται με την απόπτωση και τη μη αποτελεσματική ερυθροποίηση. Tα δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ) και τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν εκφράζουν τον EPOR και συνεπώς δεν ανταποκρίνονται στην EPO [(Sawada et al,1987).](#Sawada)

Συνολικά, η διαδικασία διαφοροποίησης των ερυθροβλαστών χαρακτηρίζεται από την προϊούσα ελάττωση του μεγέθους των κυττάρων, την αύξηση στη συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης και την αύξηση της αιμοσφαιρίνης. Κατά την ωρίμανση αυξάνει η έκφραση γονιδίων που χαρακτηρίζουν την ερυθρά σειρά, όπως αντιγόνα ομάδων αίματος, πρωτεΐνες της μεμβράνης και του κυτταροσκελετού (σπεκτρίνη, αγκυρίνη, ακτίνη) και ένζυμα της γλυκολυτικής οδού. Τα κύτταρα της ερυθράς σειράς αποτελούν το 20% των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών με φυσιολογικό χρόνο επιβίωσης 120 ημέρες. Η παραγωγή και η σταθερότητα του αριθμού τους υπόκειται στη ρυθμιστική λειτουργία του μηχανισμού απάντησης στην υποξία μέσω του παράγοντα που επάγεται από την υποξία (Hypoxia-Inducible Factor, HIF) και της οδού αλληλεπίδρασης της EPO με τον EPOR [(Broudy et al,1991)](#Broudy).

**Α.1.3 Σχέση αναιμίας και νεφρικής ανεπάρκειας**

Στην **χρόνια νεφρική ανεπάρκεια** εμφανίζεται αναιμία, η οποία ονομάζεται αναιμία χρόνιας νόσου. Η αναιμία της χρόνιας νόσου (ΑΧΝ) ορίζεται ως η αναιμία που παρατηρείται σε χρόνιες λοιμώξεις και σε φλεγμονώδη ή νεοπλασματικά νοσήματα, η οποία δεν οφείλεται σε αιμορραγία, αιμόλυση ή διήθηση του μυελού των οστών από νεοπλασματικά κύτταρα και η οποία τυπικά είναι ορθόχρωμη, ορθοκυτταρική και υποπλαστική. Διάφορες παρατηρήσεις δείχνουν ότι η ΑΧΝ μπορεί να παρατηρηθεί και σε διάφορες άλλες καταστάσεις όπως βαρύ τραύμα, καρδιακή νόσο και σακχαρώδη διαβήτη. Το νεότερο όνομα είναι αναιμία φλεγμονής λόγω του ότι αντανακλά καλύτερα την παθοφυσιολογία και συμπεριλαμβάνει και μια άλλη παραπλήσια διαταραχή, την αναιμία βαριάς νόσου που αναπτύσσεται σε λίγες μέρες από την έναρξη της.

Η ΑΧΝ φαίνεται ότι οφείλεται σε μειωμένη παραγωγή ερυθροκυττάρων από τον μυελό των οστών. Υπάρχει επίσης μικρή μείωση της επιβίωσης των ερυθροκυττάρων. Τρείς παράγοντες φαίνεται ότι συμβάλλουν στην μειωμένη παραγωγή: α) εγκλωβισμός του σιδήρου στα μακροφάγα, με αποτέλεσμα να μην είναι σχετικά εύκολα διαθέσιμος για τη σύνθεση νέας αιμοσφαιρίνης-διαταραγμένη κινητική σιδήρου, [(Means,1999)](#Means) β) μη δυνατότητα του μορφολογικά φυσιολογικού μυελού να αυξήσει την ερυθροποίηση σε απάντηση της αναιμίας, πιθανά λόγω αυξημένης απόπτωσης των πρόδρομων μορφών των ερυθροκυττάρων, [(Papadaki et al, 2002](#Papadaki)) γ) σχετική μείωση της παραγωγής ερυθροποιητίνης, ([Means et al,1992](file:///F:\Πτυχιακή\13.%09Means%20RT%20et%20al.%20Progress%20in%20understading%20the%20pathogenesis%20of%20the%20anemia%20of%20chronic%20disease.%20Blood%201992;%2080:1639))δ) χρόνια φλεγμονή.

***Εργαστηριακά ευρήματα***

Η αναιμία της χρόνιας νόσου ποικίλει σε βαρύτητα. Οι περισσότεροι ασθενείς έχουν μέτρια αναιμία, με επίπεδα αιμοσφαιρίνης από 10 έως 11 g/dL. Η αναιμία είναι ορθόχρωμη και ορθοκυτταρική. Στο 20% των περιπτώσεων μπορεί να εμφανισθεί βαρειά αναιμία με επίπεδα αιμοσφαιρίνης < 8 g/dL. Ο απόλυτος αριθμός των δικτυοερυθροκυττάρων είναι συνήθως χαμηλός (< 25000/μL), πράγμα που αντανακλά τη μειωμένη παραγωγή ερυθροκυττάρων. Η αναιμία μπορεί να συνοδεύεται από αύξηση των πρωτεινών οξείας φάσεως όπως, ινωδογόνου, ΤΚΕ, CRP. Τα επίπεδα σιδήρου και η σιδηροδεσμευτική ικανότητα (TIBC) του ορού είναι αμφότερα χαμηλά, ενώ ο κορεσμός της τρανσφερρίνης είναι συνήθως κοντά στα φυσιολογικά επίπεδα, πράγμα που βοηθάει στην διαφορική διάγνωση από τη σιδηροπενία. Εντούτοις στο 20% των ασθενών με ΑΧΝ ο κορεσμός της τρανσφερρίνης είναι πολύ χαμηλός (μέχρι 10%), στα επίπεδα της σιδηροπενίας, ακόμη και αν μόνο το 25% αυτών των ασθενών είναι πραγματικά σιδηροπενικοί. Στους υπόλοιπους ασθενείς, η αδυναμία χρησιμοποίησης του σιδήρου φαίνεται πως είναι υπεύθυνη για το χαμηλό κορεσμό της τρανσφερρίνης.

Τα επίπεδα της φερριτίνης στον ορό είναι συνήθως φυσιολογικά ή αυξημένα στην ΑΧΝ, αλλά μπορεί να είναι μη ασφαλής εκτίμηση των αποθεμάτων σιδήρου σε χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, γιατί η φερριτίνη αποτελεί πρωτείνη οξείας φάσης και φυσιολογικά μπορεί να είναι αυξημένη παρά την εξάντληση των αποθηκών του σιδήρου. Για τις περιπτώσεις αυτές έχει προταθεί, ότι επίπεδα φερριτίνης μεγαλύτερα από 60 μg/L αντανακλούν φυσιολογικά ή αυξημένα αποθέματα σιδήρου. Η εξέταση του μυελού των οστών και η κατανομή του σιδήρου μπορεί να είναι χρήσιμη. Στην πιο κλασική της εμφάνιση, τα μακροφάγα του μυελού περιέχουν φυσιολογικά ή αυξημένα κοκκία σιδήρου, ενώ ανευρίσκεται μειωμένος ή καθόλου σίδηρος στους ερυθροβλάστες [(Blake et al, 1981)](#Blake).

***Διαφορική διάγνωση***

Η ΑΧΝ είναι συνήθως ορθοκυτταρική αναιμία χωρίς να επηρεάζονται οι άλλες σειρές. Νοσήματα που παρουσιάζουν ίδια εργαστηριακά ευρήματα είναι η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και διάφορες ενδοκρινικές διαταραχές όπως υπερθυρεοειδισμός, υποθυρεοειδισμός, πανυποφυσισμός, πρωτοπαθής και δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός.

Μερικοί ασθενείς με ΑΧΝ παρουσιάζουν μεγαλύτερου βαθμού αναιμία (Hb < 8 g/dL) και τα ερυθροκύτταρα εμφανίζονται υπόχρωμα και μικροκυτταρικά. Στις περιπτώσεις αυτές η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει την σιδηροπενική αναιμία, τις διάφορες μορφές θαλασσαιμίας και τις σιδηροβλαστικές μορφές των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η μέτρηση στον ορό των επιπέδων σιδήρου, της TIBC και της φερριτίνης μπορεί να μη βοηθάει απόλυτα στη διαφορική διάγνωση μεταξύ αυτών των καταστάσεων. Επειδή η διαφορική διάγνωση μεταξύ σιδηροπενικής αναιμίας και ΑΧΝ είναι κλινικά σημαντική και μερικές φορές δύσκολη, μερικοί πρότειναν την μέτρηση των επιπέδων του διαλυτού υποδοχέα της τανσφερρίνης (sTfR) για την διάκριση μεταξύ αυτών των δύο. Σε καταστάσεις με σιδηροπενία αυξάνουν στην κυτταρική μεμβράνη οι υποδοχείς της τρανσφερρίνης, με αποτέλεσμα μορφές του υποδοχέα της τρανσφερρίνης να εμφανίζονται στον ορό σε αυξημένα επίπεδα. Μερικοί υποστηρίζουν ότι η μέτρηση του sTfR μπορεί να ξεχωρίσει τη σιδηροπενική αναιμία από την ΑΧΝ [(Fitzsimons et al, 2000**)**](#Fitzsimons). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα του sTfR δεν αποδείχθηκαν πιο χρήσιμα στην διαφορική διάγνωση από ότι η TIBC [(Wians et al, 2001)](#Wians).

***Συμπτώματα Αναιμίας***

* Διάρροια – απώλεια βάρους – κόκκινη γλώσσα – νευρολογικά προβλήματα όπως μούδιασμα, παραισθήσεις, δυσκολία στη βάδιση, απώλεια μνήμης, κατάθλιψη και σύγχυση (σε έλλειψη βιταμίνης Β12 και φυλλικού οξέως).
* Aδυναμία, Κόπωση
* Ελαττωμένη αντοχή
* Ταχυκαρδία
* Δύσπνοια σε ηρεμία
* Νυκτερινά μυϊκά άλγη
* Μυϊκές συσπάσεις
* Αίσθημα ψύχους
* Διαλείπουσα χωλότητα
* Στηθαγχικές κρίσεις
* Κεφαλαλγία
* Ζάλη, Ίλιγγος
* Ανορεξία
* Διαταραχές έμμηνου ρύσεως
* Ωχρότητα βλεννογόνων, δέρματος, κοίτης νυχιών
* Οιδήματα κάτω άκρων [(Davidson's "*Παθολογία*", 2005)](#Davidson).

***Θεραπεία της νεφρικής αναιμίας***

1.Θεραπεία της αναιμίας με παράγοντες διέγερσης της ερυθροποίησης

Οι παράγοντες διέγερσης της ερυθροποίησης (ESAs) θα πρέπει να χορηγούνται σε όλους τους ασθενείς με ΧΝΝ και επίπεδα αιμοσφαιρίνης (Hb) σταθερά κάτω από 11g/dl (μετρημένα τουλάχιστον 2 φορές με απόσταση 2 εβδομάδων) όταν όλα τα άλλα αίτια αναιμίας έχουν αποκλεισθεί. Αυτό έχει επίσης εφαρμογή σε :

* Ασθενείς με ΧΝΝ (στάδια 1-5) που εμφανίζουν αναιμία
* Ασθενείς με ΧΝΝ στάδιο 5 που αντιμετωπίζονται με αιμοκάθαρση ή περιτοναϊκή κάθαρση
* Μεταμοσχευμένοι ασθενείς με ΧΝΝ και αναιμία.

Η οδός χορήγησης εξαρτάται από την ομάδα ασθενών που θεραπεύεται και από τον τύπο του ESA που χορηγείται.

* Για ασθενείς στην αιμοκάθαρση η ενδοφλέβια οδός (I.V) ίσως να είναι προτιμότερη για την άνεση και ευκολία των ασθενών, αλλά η υποδόρια οδός (S.C) μπορεί να μειώσει την δοσολογία του ESA.
* Σε ασθενείς με ΧΝΝ που δεν είναι σε κάποια μορφή κάθαρσης καθώς και στους μεταμοσχευμένους ασθενείς, η ερυθροποιητίνη β είναι προτιμότερο να χορηγείται μέσω S.C. για οικονομικούς και πρακτικούς λόγους.
* Σε ασθενείς που υποβάλλονται σε περιτοναϊκή κάθαρση η ενδοπεριτοναϊκή οδός χορήγησης δεν συνίσταται λόγω της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας των ESAs όταν χορηγούνται δια αυτής της οδού.

Η δοσολογία έναρξης του ESA για διόρθωση της νεφρικής αναιμίας μπορεί να εξαρτηθεί από πολλούς παράγοντες όπως ο βαθμός και η υποκείμενη αιτία της αναιμίας. Η δόση του ESA θα πρέπει να τιτλοποιείται αναλόγως του επιπέδου της Hb.

* Στη φάση διόρθωσης τα επίπεδα της Hb θα πρέπει να εξετάζονται κάθε 2-4 εβδομάδες. Αρχικά ο ρυθμός αύξησης των επιπέδων της Hb θα πρέπει να είναι 1-2 gr/dl το μήνα. Μια μεταβολή <1 gr/dl των επιπέδων της Hb ίσως να αποτελεί ένδειξη για μια αύξηση κατά 25% της ολικής εβδομαδιαίας ή μηνιαίας δοσολογίας του ESA.
* Κατά την φάση συντήρησης όταν τα επίπεδα της Hb έχουν σταθεροποιηθεί η μέτρηση των επιπέδων της θα πρέπει να γινεται κάθε 1-2 εβδομάδες και πιθανόν λιγότερο συχνά σε χρόνιους νεφροπαθείς που βρίσκονται εκτός αιμοκάθαρσης.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Πίνακας 1. Προτεινόμενη οδός χορήγησης και συχνότητα της δοσολογίας  Ανατύπωση από: http://www.ahepahosp.gr/ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ/ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΝΕΦΡΩΝ/ΑΝΑΙΜΙΑ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΝΟΣΟΥ.pdf | | | | | |
| Σύσταση | **Τύπος ασθενούς** | |  |  |  |
|  | ΧΝΝ στάδια 1-5 όχι σε αιμοκάθαρση | | Αιμοκάθαρση\* | Περιτοναϊκή Κάθαρση\* | Μεταμόσχευση\* |
| Προτεινόμενη οδό χορήγησης | S.C | | S.C ή I.V | S.C | S.C |
| Προτεινόμενη συχνότητα δοσολογίας (Φάση διόρθωσης) | ΕΑ:3/εβδομάδα  ΕΒ:1-3/εβδομάδα  DA:1/εβδομάδα  MPG-Ε.Β:1 | | EA:3/εβδομάδα  ΕΒ:3/εβδομάδα  DA:1/εβδομάδα  MPEG-EB:1/2 εβδομάδες | EA: 3/εβδομάδα  ΕΒ:1-3/εβδομάδα  DA: 1/εβδομάδα  MPG-EB:1/2 εβδομάδες | ΕΑ:3/εβδομάδα  ΕΒ:1-3/εβδομάδα  DA:1/εβδομάδα  MPG-EB:1 |
| (Φάση συντήρησης) | | ΕΑ:3/εβδομάδα  ΕΒ:1-3/εβδομάδα  DA:1/εβδομάδα έως ½ εβδομάδες  MPG-Ε.Β:1 | ΕΑ 3/εβδομάδα  ΕΒ: 1-3/εβδομάδα  DA:1/εβδομάδα  MPG-Ε.Β:1/μήνα | ΕΑ 3/εβδομάδα  ΕΒ:1-3/εβδομάδα  DA:1/εβδομάδα ή 2/εβδομάδες  MPG-ΕΒ:1/μήνα | ΕΑ 3/εβδομάδα  ΕΒ:1-3/εβδομάδα  DA:1/εβδομάδα ή 2/εβδομάδες  MPG-Ε.Β:1/μήνα |
| ΕΑ=ερυθροποιητίνη άλφα, ΕΒ=ερυθροποιητίνη βήτα, DA=νταρμπεποετίνη άλφα, MPG-EB=μεθοξυ-πολυεθυλέν-γλυκολ-εποετίνη βήτα, S.C=Υποδόρεια χορήγηση, I.V=Ενδοφλέβια χορήγηση | | | | | |
| Για τη χορήγηση των ESAs στους ασθενείς με ΧΝΝ και αναιμία, καλό θα είναι να λαμβάνεται υπ’όψιν: η συχνότητα εφαρμογής των ΕSAS, ο πόνος της ένεσης (σε S.C χορήγηση), η αποτελεσματικότητα των ESAS (βραδείας vs μακράς δράσης), το κόστος χορήγησης των φαρμάκων (οδηγίες NICE για την αναιμία 2006) | | | | | |

* Ασθενείς με επιτυχθέντες στόχους φυσιολογικών επιπέδων Hb ή με συνοδά νοσήματα που μπορεί να επηρεάσουν την συγκέντρωση της Hb,ίσως να χρειάζονται πιο συχνή παρακολούθηση των επιπέδων της Hb, τόσο κατά την φάση διόρθωσης όσο και κατά την φάση διατήρησης [(Revised European Best Practice Guidelines, 2004)](#Revised).

Η λειτουργία της αγγειακής προσπέλασης θα πρέπει να παρακολουθείται σε όλους τους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς για να προλαμβάνεται η θρόμβωση. Όμως η θεραπεία με ESAs δεν απαιτεί κατά ανάγκη αυξημένη παρακολούθηση της αγγειακής προσπέλασης. Μερικές ενδείξεις υπάρχουν για αύξηση του κινδύνου της θρόμβωσης σε ασθενείς που φέρουν συνθετικά μοσχεύματα (PTFE) όταν τα επίπεδα της Hb έρθουν σε φυσιολογικά επίπεδα.

Το καθορισμένο πρόγραμμα αιμοκάθαρσης δεν θα πρέπει να μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της θεραπείας με ESA καθώς η συχνότητα δυνητικών συμβαμάτων όπως σπασμοί και κεφαλαλγία, μείωση της απόδοσης του φίλτρου και υπερκαλιαιμία δεν αυξάνονται σημαντικά. Δεν υπάρχει επίσης ανάγκη για αύξηση της δοσολογίας της αντιπηκτικής αγωγής με ηπαρίνη κατά την διάρκεια της αιμοκάθαρσης σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με ESA.

2. Θεραπεία της αναιμίας με σίδηρο:

Σε όλους τους ασθενείς με ΧΝΝ και νεφρική αναιμία που λαμβάνουν θεραπεία με ESA θα πρέπει να τους χορηγείται συμπληρωματικά σίδηρος για να διατηρούν (ή να επιτύχουν) τους στόχους ανεξάρτητα από το εάν βρίσκονται ή όχι σε αιμοκάθαρση. Οι ασθενείς σε αιμοκάθαρση συνήθως έχουν αυξημένες ανάγκες σιδήρου σε σχέση με τους εκτός αιμοκάθαρσης.

Η ενδοφλέβια οδός (i.v) είναι η ιδανική οδός για χορήγηση του σιδήρου για τους ασθενείς με ΧΝΝ καθώς ο από τους στόματος χορηγούμενος σίδηρος δεν απορροφάται καλά από τους ουραιμικούς ασθενείς.

Η ιδανική ενδοφλέβια δοσολογία του σιδήρου είναι 25-150 mg/εβδομάδα για τους πρώτους 6 μήνες θεραπείας με ESA.

Η επάρκεια σιδήρου εκτιμάται τακτικά στους ασθενείς με ΧΝΝ.

* Τα επίπεδα της φερριτίνης πρέπει να χρησιμοποιούνται ως μέτρο των αποθηκών σιδήρου.
* Το ποσοστό των υποχρώμων ερυθροκυττάρων (HRC) είναι το καλύτερο μέτρο για την λειτουργική ανεπάρκεια σιδήρου (FID). Εάν η μέτρηση των HRC δεν είναι εφικτή, ο κορεσμός τρανσφερρίνης (TSAT) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πιστοποίηση της λειτουργικής ανεπάρκειας σιδήρου. Η περιεκτικότητα Hb στα δικτυοερυθροκκύταρα (CHr) < pg είναι μια τρίτη επιλογή για εκτίμηση της λειτουργικής ανεπάρκειας σιδήρου.
* Τα επίπεδα των αποθηκών σιδήρου θα πρέπει να ελέγχονται κάθε 2-6 μήνες στους ασθενείς με ΧΝΝ και σταθερά επίπεδα Hb που δεν λαμβάνουν ESA.
* MCV δείχνουν την ανάγκη για περαιτέρω έλεγχο.
* Κατά την διάρκεια της έναρξης και της τιτλοποίησης της θεραπείας με ESA, η κατάσταση, του σιδήρου θα πρέπει να ελέγχεται κάθε 4-6 σε ασθενείς που δεν λαμβάνουν σίδηρο i.vκαι κάθε 1-3 μήνες σε ασθενείς που λαμβάνουν σίδηρο i.v, μέχρι να επιτευχθεί ο στόχος συγκέντρωσης της Hb.
* Μετά την επίτευξη του στόχου συγκέντρωσης της Hb, η κατάσταση του σιδήρου θα πρέπει να ελέγχεται κάθε 1-3 μήνες.
* Η i.v χορήγηση σιδήρου (σε δόσεις > 100 mg) θα πρέπει να διακόπτεται τουλάχιστον 1 εβδομάδα πριν γίνουν οι προσδιορισμοί της συγκέντρωσης σιδήρου.

3. Θεραπεία της αναιμίας με μεταγγίσεις:

Οι μεταγγίσεις με συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια πρέπει να αποφεύγονται, εάν είναι δυνατόν, σε ασθενείς με ΧΝΝ, ειδικότερα σε αυτούς που είναι στην αναμονή για μεταμόσχευση.

Οι μεταγγίσεις δεν θα γίνονται εκτός εάν οι ασθενείς έχουν ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω:

* Συμπτώματα αναιμίας (κόπωση, στηθάγχη, δύσπνοια)και ή συνοδούς παράγοντες κινδύνου (σακχαρώδη διαβήτη, καρδιακή ανεπάρκεια, στεφανιαία νόσο, αγγειοπάθεια, μεγάλη ηλικία)
* Οξεία επιδείνωση της αναιμίας λόγω απώλειας αίματος (αιμορραγία ή χειρουργείο) ή αιμόλυση.
* Σοβαρή αντίσταση ή υπο-απαντητικότητα στην θεραπεία με ESA π.χ λόγω παρουσίας αιματολογικού νοσήματος ή σοβαρής συστηματικής φλεγμονώδους νόσου [(National Institute for Health, 2006)](#NHS).

4. Θεραπεία με rhEPO (ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη):

**Δοσολογία rhEPO:** Η rhEPO χορηγείται αρχικά σε δόση 100 έως 150 U/kg υποδόρια τρείς φορές την εβδομάδα με ή χωρίς την ταυτόχρονη χορήγηση σιδήρου παρεντερικά ή από το στόμα. Οι ανταποκρινόμενοι ασθενείς οφείλουν να ανεβάσουν την αιμοσφαιρίνη τους τουλαχιστον κατά 0.5 g/dL μετά πάροδο δύο έως τεσσάρων εβδομάδων [(Cazzola et al, 1977)](#Cazzola), αν και τα δεδομένα μιας μετα-ανάλυσης δείχνουν ότι το 46% των ασθενών που δεν ανταποκρίθηκαν στις δύο έως τέσσερις εβδομάδες ανταποκρίνονται τελικά στη χορήγηση rhEPO μετά πάροδο έξι έως οκτώ εβδομάδων [(Schriber et al, 1996)](#Schriber). Αν δεν υπάρξει ανταπόκριση μετά την χορήγηση rhEPO για 6-8 εβδομάδες, τότε αυξάνεται η δόση σε 300 U/kg υποδόρια τρείς φορές την εβδομάδα. Αν και με την αύξηση αυτή της δόσης δεν υπάρξει ανταπόκριση μετά την πάροδο τεσσάρων εβδομάδων (συνολική χορήγηση 12 εβδομάδων) τότε η χορήγηση rhEPO διακόπτεται.

Εναλλακτικά, μπορούν να χορηγηθούν 40000 U rhEPO υποδόρια άπαξ την εβδομάδα, δόση που αντιστοιχεί με δόση 190 U/kg τρεις φορές την εβδομάδα για ασθενή βάρους 70 kg [(Henry et al, 1992)](#Henry). Η δόση αυτή μπορεί να αυξηθεί σε 60000 U αν δεν υπάρχει ανταπόκριση μετά πάροδο τεσσάρων εβδομάδων και διακόπτεται η χορήγηση αν δεν υπάρξει ανταπόκριση μετά από τέσσερις έως έξι ακόμη εβδομάδες. Μια νεότερη μορφή ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης η Darbepoetin, έχει μεγαλύτερη ημιπερίοδο ζωής και χορηγείται άπαξ ανά δύο έως τέσσερις εβδομάδες, με καλά υποσχόμενα αποτελέσματα [(Spivac,1994](#Spivac)/[Glaspy,1997).](#Glaspy)

**Α.1.4 Ορισμός και Δράση ερυθροποιητίνης**

*Παθοφυσιολογία*

Η ερυθροποιητίνη είναι ορμόνη που εκκρίνεται από τους νεφρούς και ρυθμίζει την ταχύτητα παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων. Πρόκειται για μία γλυκοπρωτεϊνη ΜΒ 39.000 daltons, 165 αμινοξέα με υψηλό βαθμό γλυκοζυλίωσης (40% υδατάνθρακες), η οποία παράγεται κατά κύριο λόγο στους νεφρούς και σε μικρότερη ποσότητα στο ήπαρ (<10 % της συνολικής παραγωγής. Ομόλογο ερέθισμα για την έκκριση της ορμόνης αποτελεί η υποξία, η οποία γίνεται αντιληπτή, στους νεφρούς και το ήπαρ, από ειδικούς αισθητήρες οξυγόνου (oxygen sensors), με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή mRNA της ερυθροποιητίνης και την ταχεία αύξηση της συγκέντρωσής της στο πλάσμα όπως συμβαίνει στην αναιμία. Η υποξία που προκαλείται από ελαττωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου διεγείρει τους νεφρούς να απελευθερώσουν ερυθροποιητίνη η οποία με τη σειρά της διεγείρει το μυελό των οστών, στην παραγωγή περισσοτέρων ερυθροκυττάρων και αιμοσφαιρίνης για τη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς.

Τα επίπεδα ερυθροποιητίνης σε αναιμία καθορίζονται κυρίως από το βαθμό της αναιμίας. Υψηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης ή αιματοκρίτη αναστέλλουν την απελευθέρωση της ερυθροποιτίνης [(Haroon et al, 2003)](#Haroon).

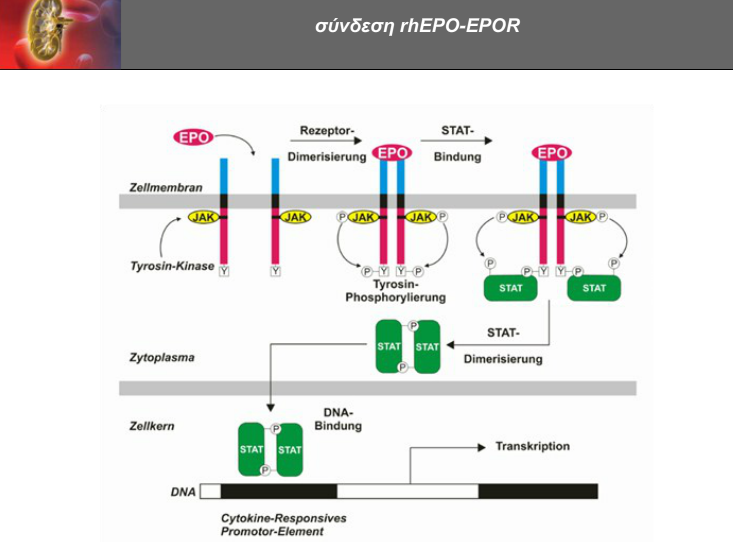
H Epo δρα στα BFU-E αλλά κυρίως στα CFU-E και στα κύτταρα που προέρχονται από αυτή τη σειρά (ερυθροβλάστες, μέχρι δικτυοερυθροκύτταρο, όχι στο ώριμο ερυθρό αιμοσφαίριο που δεν έχει πυρήνα ή υπολείμματα πυρήνος).

Η κύρια δράση της Epo εξασκείται πάνω στην BFU-E σειρά και επιταχύνει τον χρόνο ωρίμανσης των ερυθρών.

Η Epo δρα πάνω στα κύτταρα μέσω υποδοχέων της ερυθροποιητίνης, οι οποίοι είναι πολλοί περισσότεροι στην σειρά CFU-E από την σειρά BFU-E. Οι υποδοχείς αυτοί είναι ειδικοί για την ερυθροποιητίνη και είναι απαραίτητοι για την δράση της, και υπάρχουν υποδοχείς Epo υψηλής και χαμηλής συγγένειας.

Οι υποδοχείς Epo έχουν εξωκυττάριο και ενδοκυττάριο τμήμα. Η Epo ενώνεται με τους υποδοχείς, εισέρχεται ταχέως στο κύτταρο και η ίδια αποδομείται χωρίς να είναι γνωστό αν το ίδιο συμβαίνει με τους υποδοχείς της Epo. Η ένωση Epo-υποδοχέων ενεργοποιεί μια τυροσίνη κινάση και αρχίζει πιθανά η βιολογική δράση της.

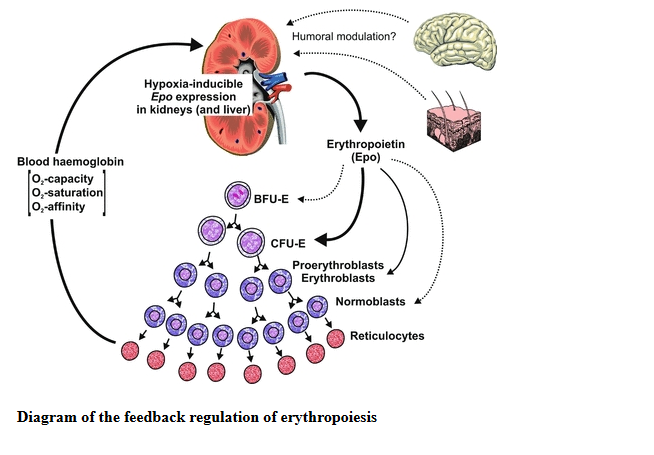
Η ένωση Epo και υποδοχέων Epo πιθανά προκαλεί ταχεία φωσφορυλίωση και διφωσφορυλίωση σε ένα αριθμό διαφορετικών πρωτεϊνών μεταξύ αυτών της τυροσίνης και της σερίνης. Επίσης έχει σχέση με την Raf-1 πρωτεΐνη που χρειάζεται για την ωρίμανση των ερυθρών. Πιθανά ενεργοποιεί το ras πρωτοογκογονίδιο.



Εικόνα 2: Σύνδεση rhEPO-EPOR

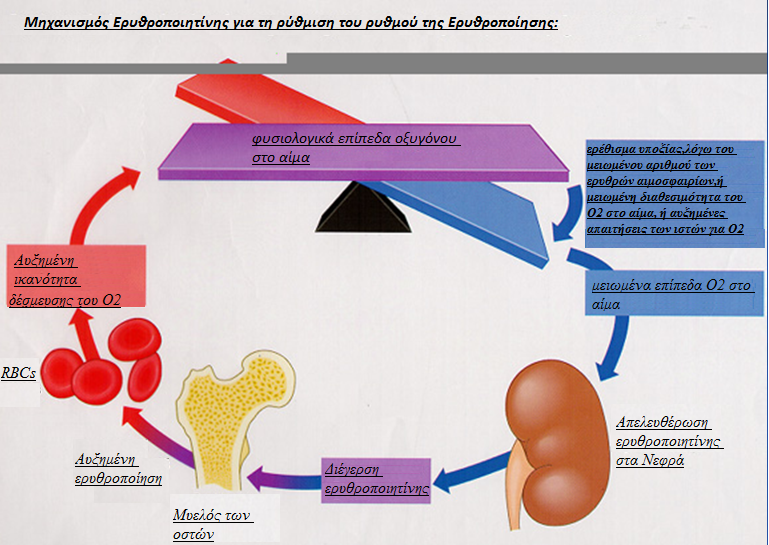
**Ανατύπωση από**: www.chios-medical.gr

Με την μέθοδο PCR έχουν βρεθεί σε φυσιολογικά κύτταρα του μυελού των οστών τρεις τύποι υποδοχέων της ερυθροποιητίνης που πιθανόν παίζουν ρόλο στην ωρίμανση αλλά και στον προγραμματισμένο θάνατο των ερυθρών. Η ερυθροποιητίνη προκαλεί αλλαγές στο ασβέστιο του κυττάρου, αδρανοποιεί την σύνθεση ολικού RNA, συμμετέχει στο μεταβολισμό της γλυκόζης και του σιδήρου, στη μεταγραφή των α και β αλυσσίδων, στην έκφραση των υποδοχέων της τρανσφερίνης, στη σύνθεση της Hb και των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης. Όλα τα παραπάνω καταλήγουν στην αύξηση της ερυθροποίησης, η οποία ευννοείται και από την αυξημένη παραγωγή και επιβίωση CFU-E. Η απουσία Epo σε υπάρχουσα μάζα ερυθρών αιμοσφαιρίων αυξάνει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (apoptosis) των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

 Ανασταλτική επίδραση στην δράση της ορμόνης ασκεί η παρουσία οιστρογόνων ενώ ευωδοτική επίδραση ασκούν τα ανδρογόνα και οι θυρεοειδικές ορμόνες. Έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει αρνητική σχέση μεταξύ των επιπέδων της κρεατινίνης του ορού και της συγκέντρωσης ερυθροποιητίνης στο πλάσμα καθώς επίσης ότι σε άτομα με φυσιολογική νεφρική λειτουργία η πτώση του αιματοκρίτη οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της ερυθροποιητίνης του ορού. Η ερυθροποιητίνη (EPO) αλληλεπιδρά άμεσα με τον υποδοχέα της (Erythropoietin Receptor, EPOR) στην επιφάνεια των πρόδρομων κυττάρων της ερυθράς σειράς, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό, την τελική διαφοροποίηση και την προστασία από την απόπτωση (Beckman et al, 1985).

**Εικόνα 3:** Έλλειψη O2 (υποξία) είναι ένα ερέθισμα για την σύνθεση της ερυθροποιητίνης (ΕΡΟ), κυρίως στα νεφρά. Η ΕΡΟ είναι ένας παράγοντας πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των ερυθροκυτταρικών προγονικών κυττάρων, και ιδίως οι μονάδες σχηματισμού αποικιών-ερυθροειδή (CFU-Es). Η ικανότητα O2 του αίματος αυξάνει με την αυξημένη απελευθέρωση των δικτυοερυθροκυττάρων. Ο ρόλος των εξω-νεφρικών θέσεων (εγκεφάλου, δέρματος) στον έλεγχο της νεφρικής σύνθεσης Ερο εξακολουθεί να είναι ατελώς κατανοητή.

**Ανατύπωση από**: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3082088/figure/fig01/



Εικόνα 4: Μηχανισμός Ερυθροποιητίνης για την ρύθμιση της EPO.

Ανατύπωση από: Γ.Μπουρικος-Αναιμια χρονιας νεφρικής νόσου

**Α.1.5 Διαφορές ενδογενούς και ανασυνδιασμένης ερυθροποιητίνης**

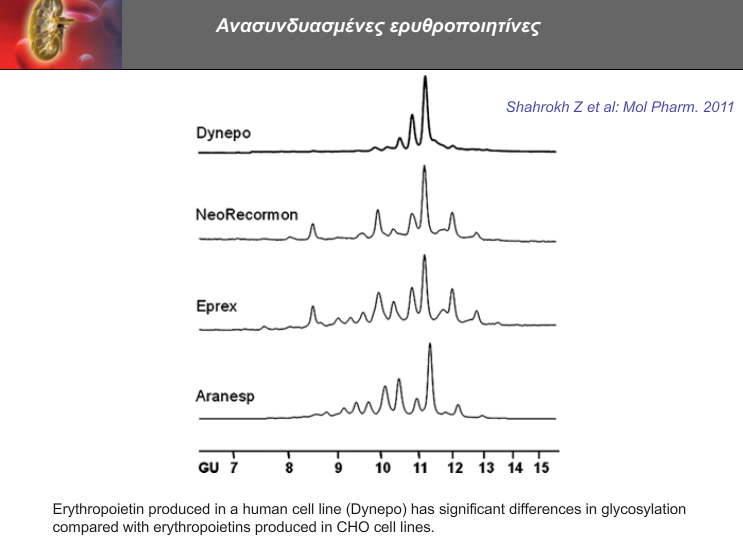
Για να δημιουργηθεί αρχικά η πρώτη ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη χρειάστηκε να απομονωθεί η βιολογική ερυθροποιητίνη από ασθενείς με απλαστική αναιμία (1977) 10mg/1000ml ούρων, να κλωνοποιηθεί το μόριο αυτό και να ενσωματωθεί σε κυτταρικές σειρές. Υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί τύποι ερυθροποιητινών. Οι Procrit ® και Epogen ® είναι δύο μάρκες της epoetin alfa. Aranesp ® (darbepoetin alfa), είναι ένας άλλος τύπος της ερυθροποιητίνης. Η κύρια διαφορά μεταξύ Procrit / Epogen και Aranesp είναι ότι Aranesp χορηγείται λιγότερο συχνά από ότι το Procrit. Διαφορετικά, όλοι οι τρεις παράγοντες λειτουργούν εξίσου καλά στη θεραπεία της αναιμίας.

Η epoetin α (Epogen, AMGEN) αποτέλεσε την πρώτη rhEPO στο εμπόριο στις ΗΠΑ και ακολούθησαν η epoetin α (Eprex, Ortho Biotech Products) και η epoetin β (NeoRecormon, La Roche Ltd) στην Ευρώπη. Οι ερυθροποιητίνες α,β και theta προήλθαν από κυτταρικές σειρές ωοθηκών κινέζικων κρικητών (Chinese hamster ovary cells, CHO), είχαν ελάχιστες δομικές διαφορές και τις ίδιες φυσιολογικές ιδιότητες [(Lasne de Ceaurriz, 2000)](#Lasne). Η epoetin ω διέφερε από τις προηγούμενες στο profile γλυκοζυλίωσης και παράγεται από κύτταρα νεφρού μικρών ποντικιών (Baby Hamster Kidney Cells, BHK). Πιο πρόσφατες είναι η epoetin δ (Dynepo), παραγόμενη από σειρές ανθρώπινου ινοσαρκώματος ( σειρά HT-1080) και η epoetin z (Retacrit), η οποία παράγεται με τεχνική ανασυνδυασμένου DNA από κύτταρα CHO και είναι πανομοιότυπη στην αλληλουχία αμινοξέων και στη σύνθεση των υδατανθράκων με την ενδογενή EPO (Martin KJ et al, 2007). Οι ερυθροποιητίνες α και β είναι πρώτης γενιάς και έχουν σχετικά μικρό χρόνο ημιζωής. Η darbepoetin alfa είναι δεύτερης γενιάς και έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής σε σχέση με τις άλλες δυο. Τέλος η Mircera (Cera) δηλαδή μεθόξυ-πολυεθυλένιο γλυκολ-epoetin beta είναι τρίτης γενιάς και έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από όλες τις παραπάνω. Επίσης υπάρχει διαφορά στην δοσολογία της ερυθροποιητίνης [(Jolling, 2004)](#Jolling).

Η Εποετίνη άλφα και βήτα είναι οι δύο μορφές του DNA που προέρχονται από ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη (rEPO), αμφότερα συντίθονται σε κύτταρα ωοθηκών κινεζικού χάμστερ, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία με τη ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη (ΕΡΟ) ως ανταπόκριση αναιμίες. Αρκετές παρτίδες καθενός από αυτά τα rhEPO συγκρίθηκαν για διαφορές στις συνθέσεις ισομορφής ΕΡΟ τους με ισοηλεκτρική εστίαση (IEF), σε μια σειρά από δοκιμασίες λεκτίνης δεσμεύσεως και για τις διαφορές στις δραστηριότητές των ΕΡΟ με in-vivo και in-vitro βιοδοκιμασίες ποντικιού και με ανοσοπροσδιορισμό. Η Epoetin beta βρέθηκε να διαφέρει από την άλφα εποετίνη γιατί περιέχει: (α) ένα μεγαλύτερο ποσοστό των πιο βασικών ισόμορφων, (β) ένα μεγαλύτερο ποσοστό της ΕΡΟ σύνδεσης προς Erythrina cristagalli συγκολλητίνη (η οποία δεσμεύει Ν-γλυκανών με μη σιαλυλιωμένα εξωτερικό Gal β1-4GlcNAc τμήματα) και (γ) των ισομορφών με υψηλότερη in-νίνο/ in-vitro αναλογία βιοδραστικότητας. Η Epoetin beta παρουσίασε μεγαλύτερη σύνδεση προς τη συγκολλητίνη Lycopersicon esculentum (που δεσμεύει Ν-γλυκάνες που περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες Gal β1-4GlcNAc), προς την leucoagglutinin του Phaseolus vulgaris (το οποίο δεσμεύεται στην 2,6-διακλαδισμένη Ν-γλυκάνη) και την Agaricus bisporus συγκολλητίνη (η οποία δεσμεύει την Gal β1-3GalNAc και περιέχει Ο-γλυκάνες) από ότι η epoetin alfa. Δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο rhEPO στην σύνδεσή τους με τις άλλες πέντε λεκτίνες. Οι διαφορές μεταξύ της συνθέσεως ισομορφή της εποετίνης άλφα και βήτα, και οι μικρότερες διαφορές μεταξύ παρτίδων φαίνεται να οφείλονται σε διαφορές στην γλυκοζυλίωση. Η υψηλότερη αναλογία βιοδραστικότητας της epoetin beta σε σχέση με την epoetin alfa στο ποντίκι in-vivo/in-vitro δεν μπορούσε να εξηγηθεί με βάση τις διαφορές σε μοίρες τους σιαλυλίωσης, αλλά ήταν συνεπής με τις διαφορές στις φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες που παρατηρήθηκαν στον άνθρωπο. [(Br J Haematol, 1998)](#Br).

Δεν υπήρξαν αναφορές ότι η epoetin alfa διαφέρει από epoetin beta στην κλινική αποτελεσματικότητα του, αλλά οι διαφορές ανάμεσα στην epoetin alfa και βήτα σε ορισμένα συστήματα ανάλυσης υποδηλώνουν ότι ενδέχεται να υπάρξει ανάγκη για ξεχωριστά διεθνή πρότυπα για τους δύο αυτούς τύπους rhEPO. [(Elliott et al, 2003](#Elliott)/[Tolman et al, 2005)](#Tolman).

Η αύξηση της ερυθροκυτταρικής μάζας κατά τη χορήγηση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης EPO (recombinant human EPO, rhEPO), ελέγχεται κυρίως από το χρόνο διατήρησης στο ορό των επιπέδων της EPO και όχι από τα επίπεδα της EPO κάθε αυτά .



Εικόνα 5:Η διαφορά γλυκοζυλίωσης ανάμεσα στην Ερυθροποιητίνη που παράγεται σε ανθρώπινα κύτταρα και την Ερυθροποιητίνη που παράγεται σε CHO

**Aνατύπωση από:** Shahrokh Z et al,2011

Όλες αυτές οι ανασυνδυασμένες ερυθροποιητίνες είναι ταυτόσημες με την ενδογενή στις αλληλουχίες αμινοξέων, στις θέσεις των δισουλφιδικών δεσμών και της γλυκοζυλίωσης. Συνδέονται με τον υποδοχέα EPOR-κυτταρική εσωτερίκευση κατά την οποία αποδομούνται. Η συγγένεια τους με τον υποδοχέα είναι αντιστρόφως ανάλογη με τον αριθμό των σιαλικών οξέων και των Ν υδατανθράκων στο μόριο τους. Τέλος όσο περισσότερα σιαλικά οξέα περιέχονται τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος ημιζωής.

**Α.1.6 Παρενέργειες ερυθροποιητίνης**

Συνήθως οι παρενέργειες ήταν ασυνήθεις και εύκολα αντιμετωπίσιμες, περιορίζοντας σημαντικά τον αριθμό των μεταγγίσεων και τα ανεπιθύμητα συμβάματα εξ αυτών. Οι ερυθροποιητικοί παράγοντες είναι γενικά καλά ανεκτοί. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτά τα φάρμακα έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης του αίματος. Παράγοντες που μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης θρόμβων στο αίμα περιλαμβάνουν:

* Ένα ιστορικό θρόμβων στο αίμα
* Πρόσφατη χειρουργική επέμβαση
* Παρατεταμένες περιόδους ανάπαυσης ή περιορισμένη δραστηριότητα

Προληπτική θεραπεία με αραίωση του αίματος (όπως ηπαρίνη) μπορεί να ληφθεί από τους ασθενείς όντας υψηλού κινδύνου.

Οι παρενέργειες που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα από την χρήση της ερυθροποιητίνης είναι: Η υπέρταση, η εμφάνιση σπασμών, η θρόμβωση της αγγειακής προσπέλασης, μείωση της επάρκειας αιμοκάθαρσης, εμφάνιση πηγμάτων στο φίλτρο και εμφάνιση συμπτωμάτων "κρυολογήματος". Οι συνήθεις παρενέργειες από την χρήση rHuEpo είναι υπέρταση, κνησμός, πυρετός, κεφαλαλγία, αλλεργική αντίδραση και θρομβωτικά επεισόδια σε όποιους χορηγείται η ορμόνη. Η συχνότερη όμως παρενέργεια από την χορήγηση ερυθροποιητίνης είναι η αρτηριακή υπέρταση η οποία εμφανίζεται στους αρρώστους με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια σε ποσοστό 23% [(Abels, 1992)](#Abels).

Η εμφάνιση της υπέρτασης οφείλεται σε αυξημένη αντιδραστικότητα των αγγείων και σε αιμοδυναμικές διαταραχές που οφείλονται στην αυξημένη μάζα των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Συνήθως ανταποκρίνεται επαρκώς στην χορήγηση αντιυπερτασικών φαρμάκων, στην αύξηση της δόσης των ήδη χορηγουμένων και στην μείωση του σωματικού βάρους με την εφαρμογή υπερδιήθησης.

Σε διάφορες μελέτες αναφέρεται η εμφάνιση σπασμών κατά τους τρεις πρώτους μήνες της θεραπείας σε ποσοστά που κυμαίνονται από 0-13%. Πλέον τεκμηριωμένες μελέτες δεν έδειξαν αυξημένη επίπτωση σπασμών σε ασθενείς με ελεύθερο ιστορικό πριν την έναρξη της θεραπείας γι' αυτό και η παρουσία σπασμών δεν θεωρείται πλέον αντένδειξη για την χορήγηση ερυθροποιητίνης με την προϋπόθεση ότι θα ακολουθηθεί η σωστή τακτική στην χορήγηση της ορμόνης.

Πάντως η μελέτη της Amgen διαπίστωσε αυξημένη επίπτωση θρόμβωσης των αρτηριοφλεβικών επικοινωνιών στους αρρώστους με υψηλούς αιματοκρίτες 42±3 % σε σχέση με αυτούς που είχαν χαμηλό αιματοκρίτη 30±3 %. Η αύξηση του αιματοκρίτη πάνω από 30 % βελτιώνει τους μηχανισμούς πήξης του αίματος και επομένως αυξάνει την πιθανότητα δημιουργίας πηγμάτων στο φίλτρο αιμοκάθαρσης με προφανή μείωση της επιφάνειας του φίλτρου και συνεπώς της χορηγούμενης δόσης αιμοκάθαρσης. Συμπτώματα όπως μυαλγίες, πονοκέφαλος, πόνος στην οσφυϊκή μοίρα και ερυθρότητα των ματιών είχαν περιγραφεί στις πρώτες μελέτες εφαρμογής της ερυθροποιητίνης, νεότερα όμως δεδομένα δεν επιβεβαιώνουν την ύπαρξη τέτοιων συμπτωμάτων σε μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ αρρώστων που λαμ-βάνουν ερυθροποιητίνη και εικονικό φάρμακο (placebo).

Επίσης σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε πρόσφατα, μελετήθηκαν 1432 ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο, από τους οποίους οι 715 επιλέχθηκαν τυχαία και λαμβάνανε δόση της epoetin alfa με στόχο την επίτευξη ενός επιπέδου αιμοσφαιρίνης 13,5 g/dL και οι 717 λαμβάνανε δόση της epoetin alfa με στόχο την επίτευξη ενός επιπέδου αιμοσφαιρίνης 11,3 g/dL. Η διάμεση διάρκεια της μελέτης ήταν 16 μήνες. Το τελικό σημείο της μελέτης ήταν ο συνδυασμός θανάτου, εμφράγματος του μυοκαρδίου, νοσηλείας για συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (χωρίς θεραπεία νεφρικής υποκατάστασης) και εγκεφαλικό επεισόδιο. Συνολικά 222 σύνθετα γεγονότα συνέβησαν: 125 επεισόδια στην ομάδα  με την υψηλή αιμοσφαιρίνη, σε σύγκριση με 97 επεισόδια στην ομάδα χαμηλής αιμοσφαιρίνης. Υπήρξαν 65 θάνατοι (29,3%), 101 νοσηλείες για συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (45,5%), 25 εμφράγματα του μυοκαρδίου (11,3%), και 23 εγκεφαλικά επεισόδια (10,4%). Επτά ασθενείς (3,2%) νοσηλεύθηκαν για συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και έμφραγμα του μυοκαρδίου σε συνδυασμό, και ένας ασθενής (0.5%) πέθανε μετά από ένα εγκεφαλικό επεισόδιο [(Eschbach, 1995)](#Eschbach).

Η ποιότητα ζωής ήταν παρόμοια και στις δύο ομάδες. Περισσότεροι ασθενείς όμως που βρίσκονταν στην ομάδα με την υψηλή αιμοσφαιρίνη είχαν τουλάχιστον ένα σοβαρό ανεπιθύμητο συμβάν. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν ότι υπήρξε συσχέτιση του υψηλού επιπέδου αιμοσφαιρίνης με στόχο τα 13,5 g ανά δεκατόλιτρο (σε σύγκριση με τα 11,3 g ανά δεκατόλιτρο) με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κάποιου συμβάντος όπως εγκεφαλικό ή καρδιακή ανεπάρκεια και δεν υπήρξε καμία βελτίωση στη ποιότητα ζωής των ασθενών [(Ajay,Singh et al, 2006)](#Ajay).

***Α.1.7 Διαδικασία αιμοκάθαρσης***



Η χρήση ενός τεχνητού νεφρού για την κάθαρση της ουρίας, των άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού όπως κρεατινίνης και ουρίας, των τοξινών και της περίσσειας των υγρών από το αίμα. Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου, της παροδικής νεφρικής ανεπάρκειας και κάποιων περιπτώσεων δηλητηρίασης ή υπερδοσολογίας φαρμάκων. Η κύρια χρήση της αιμοκάθαρσης είναι η αντιμετώπιση της νεφρικής ανεπάρκειας, μια διαταραχή στην οποία υγρά, οξέα, ηλεκτρολύτες και πολλά φάρμακα δεν αποβάλλονται αποτελεσματικά με τα ούρα. Υπερκαλιαιμία, ουραιμία, υπερφόρτωση υγρών, οξέωση και ουραιμική περικαρδίτιδα είναι άλλες ενδείξεις αιμοκάθαρσης.

Εικόνα 6: Μηχάνημα αιμοκάθαρσης

Ανατύπωση από: www.google.gr

**Η αρχή της αιμοκάθαρσης** είναι η ίδια με άλλες μεθόδους διύλισης και περιλαμβάνει τη διάχυση διαλυτών ουσιών κατά μήκος μιας ημιδιαπερατής μεμβράνης. Η Αιμοδιύλιση χρησιμοποιεί την αντιρροή αίματος και υγρού αιμοκάθαρσης, μέσω ενός φίλτρου που αποτελεί το εξωσωματικό κύκλωμα. Η ανταλλαγή των ουσιών έχει σχέση με τη διαφορά συγκέντρωσης του στο αίμα και στο υγρό αιμοκάθαρσης όπου η δραστικότητα της κάθαρσης είναι μεγαλύτερη ανάλογα με αυτή τη διαφορά.

Η μετακίνηση των υγρών (υπερδιήθηση) βασίζεται στη διαφορά υδροστατικής πίεσης μεταξύ του αιματικού χώρου και του χώρου διαλύματος του φίλτρου του τεχνητού νεφρού, όπου παράλληλα μετακινούνται και διαλυτές ουσίες από την ημιδιαπερατή μεμβράνη.

Το υγρό της αιμοκάθαρσης πού χρησιμοποιείται είναι αποστειρωμένο διάλυμα, που περιέχει μεταλλικά ιόντα. Ο φωσφόρος, το κάλιο και το μαγνήσιο είναι σε μικρές συγκεντρώσεις, ώστε να επιτρέπεται η διάχυση από το αίμα, ενώ το νάτριο και το χλώριο σε σχεδόν φυσιολογικές, ώστε να εξισορροπείται με αυτήν του πλάσματος, ενώ μπορεί να προστίθεται και μικρή ποσότητα γλυκόζης. Το διττανθρακικό νάτριο μπορεί επίσης να ρυθμίζει την οξύτητα του πλάσματος.

Η τεχνική της αιμοκάθαρσης περιλαμβάνει τα εξής:

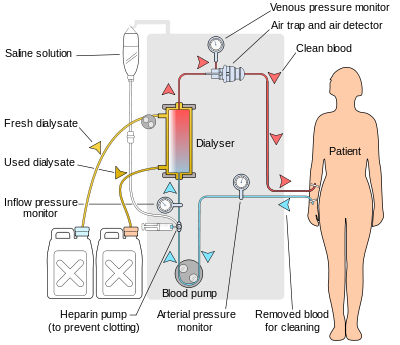
1. Εξασφάλιση πρόσβασης στην κυκλοφορία (π.χ. μέσω ενός αρτηριοφλεβώδους συριγγίου, μοσχεύματος ή προσωρινού καθετήρα).

2. Αντιπηξία του αίματος του ασθενή για την πρόληψη εξωσωματικής πήξης.

3. Άντληση του αίματος σε μία μεμβράνη διάλυσης.

4. Προσαρμογή της διάχυσης των διαλυμένων ουσιών από το αίμα σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα διάλυσης.

5. Επιστροφή του κεκαθαρμένου και ρυθμισμένου αίματος στον ασθενή.

  
 Η αποτελεσματικότητα της αιμοκάθαρσης προσδιορίζεται από το ποσό του υγρού και των διαλυτών ουσιών (ειδικά της ουρίας) που απομακρύνονται από το σώμα. Τυπικά, η αιμοκάθαρση διαρκεί περίπου 3 ή 4 ώρες και επαναλαμβάνεται πολλές φορές την εβδομάδα.

Εικόνα 7: Η διαδικασία της Αιμοκάθαρσης

**Ανατύπωση από:** http://www.iatronet.gr

Ακόμα και με την τακτικές συνεδρίες αιμοκάθαρσης, οι ασθενείς με νεφροπάθεια τελικού σταδίου έχουν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Στις Η .Π.Α., το 25% των ασθενών περίπου που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση πεθαίνουν κάθε χρόνο, συνήθως λόγω καρδιακής νόσου, εγκεφαλικού επεισοδίου ή προϋπάρχοντος σακχαρώδους διαβήτη.

Η αιμοκάθαρση έχει πολλές δυνητικές επιπλοκές, που περιλαμβάνουν υπόταση, λοίμωξη του σημείου εισόδου, σήψη, εμβολή αέρα, αντίδραση υπερευαισθησίας, διαταραχή της ισορροπίας από την αιμοκάθαρση, μυϊκές κράμπες, αναιμία ([Rolston et al, 2003)](#ROLSTON).

ΠΕΡΙΘΑΛΨΗ ΑΣΘΕΝΟΥΣ:

***Πριν τη διαδικασία:*** Αν πρόκειται για την πρώτη συνεδρία αιμοκάθαρσης του ασθενή, του εξηγείται ο σκοπός της θεραπείας και τα αναμενόμενα αποτελέσματα. O ασθενής υποβάλλεται σε μια χειρουργική διαδικασία για τη δημιουργία αγγειακής προσπέλασης. Αφού δημιουργηθεί η προσπέλαση και ο ασθενής είναι έτοιμος για την αιμοκάθαρση, ζυγίζεται και λαμβάνονται τα ζωτικά του σημεία· η αρτηριακή πίεση δεν πρέπει να μετράται στο χέρι που με την αγγειακή προσπέλαση και οι μετρήσεις γίνονται ενώ ο ασθενής είναι στην ύπτια και στην όρθια θέση.

Προετοιμάζεται ο εξοπλισμός της αιμοκάθαρσης σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του κατασκευαστή και το πρωτόκολλο του ιδρύματος. Τηρούνται αυστηρά άσηπτες συνθήκες για την αποφυγή εισαγωγής παθογόνων στην κυκλοφορία του ασθενή στη διάρκεια της θεραπείας.

Ο ασθενής τοποθετείται σε ύπτια ή σε χαμηλή θέση Fowler όσο πιο άνετα γίνεται με τη θέση φλεβικής προσπέλασης να υποστηρίζεται καλά και να βρίσκεται πάνω σε ένα στείρο ύφασμα ή σε μια άλλη στείρα επικάλυψη.

***Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας:*** Οι επαγγελματίες της υγείας, ακολουθώντας τις κατευθυντήριες οδηγίες της Εφαρμογής Επαγγελματικής Ασφάλειας και Υγείας, φοράνε κατάλληλα γάντια και προστατευτικά των οφθαλμών σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Ο ασθενής παρακολουθείται σε όλη τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης. Τα ζωτικά σημεία του ασθενή ελέγχονται και καταγράφονται κάθε 30 λεπτά για να ανιχνευτούν πιθανές επιπλοκές. Η εμφάνιση πυρετού μπορεί να υποδεικνύει λοίμωξη από παθογόνα του διαλύματος διαπίδυσης ή του εξοπλισμού και πρέπει να αναφερθεί στον ιατρό, ο οποίος μπορεί να συνταγογραφήσει ένα αντιπυρετικό, ένα αντιβιοτικό ή και τα δύο. Η υπόταση μπορεί να υποδεικνύει υποογκαιμία, σήψη ή μειωμένα επίπεδα αιματοκρίτη, ενδοφλέβια συμπληρώματα υγρών ή αίματος πρέπει να χορηγούνται σύμφωμα με τις οδηγίες. Η ταχεία αναπνευστική συχνότητα μπορεί να υποδηλώνει υπερογκαιμία ή υποξαιμία. Η συμπληρωματική χορήγηση οξυγόνου πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες.

Περίπου κάθε 1 ώρα, λαμβάνεται 1 δείγμα αίματος για να μετρηθεί ο χρόνος πήξεως. Ο ασθενής ζυγίζεται τακτικά στη ζυγαριά της μονάδας αιμοκάθαρσης ή σε μια φορητή ζυγαριά για να εξασφαλιστεί η επαρκής αιμοδιήθηση στη διάρκεια της θεραπείας. Οι γραμμές αίματος της συσκευής ελέγχονται επίσης περιοδικά για να εξασφαλιστεί ότι όλες οι συνδέσεις είναι ασφαλείς και οι γραμμές παρακολουθούνται για πήξη.

Ο ασθενής εκτιμάται για κεφαλαλγία, μυϊκούς σπασμούς, πόνο στην οσφυϊκή μοίρα ή στην πλάτη, ναυτία ή έμετο και σπασμούς, οι οποίοι μπορεί να υποδηλώνουν σύνδρομο διαταραχής της ισορροπίας που προκαλείται από ταχεία αφαίρεση υγρού και μεταβολές των ηλεκτρολυτών. Αν εμφανιστεί το σύνδρομο αυτό, ο ιατρός πρέπει να ενημερωθεί άμεσα πρέπει να μειώσει την ταχύτητα ροής του αίματος ή να σταματήσει την αιμοκάθαρση. Μυϊκές κράμπες μπορεί επίσης να προκύψουν από ταχεία μεταβολή των υγρών και των ηλεκτρολυτών. Οι κράμπες ανακουφίζονται με έγχυση διαλύματος 0,9% χλωριούχου νατρίου στη φλεβική γραμμή.

Ο ασθενής παρακολουθείται προσεκτικά για σημεία εσωτερικής αιμορραγίας, φόβου ανησυχίας, ωχρότητας, ψυχρό και υγρό δέρμα, υπερβολική δίψα, υπόταση, ταχύ, αδύναμο, νηματοειδή σφυγμό, αυξημένη συχνότητα αναπνοών και μειωμένη θερμοκρασία σώματος. Τέτοια ευρήματα καταγράφονται και αναφέρονται στον ιατρό αμέσως και γίνονται προετοιμασίες για τη μείωση του ηπαρινισμού και πιθανόν τη χορήγηση αίματος.

Οι επαγγελματίες της υγείας βρίσκονται σε ετοιμότητα για σημεία εμβολής αέρα, μια δυνητικά θανατηφόρο επιπλοκή που χαρακτηρίζεται από αιφνίδια υπόταση, δύσπνοια, θωρακικό άλγος, κυάνωση και αδύναμο, ταχύ σφυγμό.

Αν εμφανιστούν αυτά τα σημεία, ο ασθενής γυρίζει στην αριστερή πλευρά, το κεφάλι του κρεβατιού χαμηλώνει (για να βοηθήσει στη διατήρηση των φυσαλίδων του αέρα στην δεξιά πλευρά της καρδιάς, όπου μπορούν να απορροφηθούν από τα πνευμονικά αγγεία) και ο ιατρός ενημερώνεται αμέσως.

***Μετά τη διαδικασία:*** Η θέση της φλεβικής προσπέλασης παρακολουθείται για αιμορραγία. Αν η αιμορραγία είναι υπερβολική, διατηρείται πίεση στο σημείο και ενημερώνεται ο ιατρός. Για να προληφθεί η πήξη και άλλα προβλήματα της ροής του αίματος, το χέρι που χρησιμοποιείται για τη φλεβική προσπέλαση δε χρησιμοποιείται για οποιαδήποτε άλλη διαδικασία συμπεριλαμβανομένων της εξασφάλισης φλεβικής γραμμής, της παρακολούθησης της αρτηριακής πίεσης και των φλεβοπαρακεντήσεων.

Τουλάχιστον 4 φορές την ημέρα, εκτιμάται η θέση της φλεβικής προσπέλασης με ακρόαση του φυσήματος και ψηλάφηση του ροίζου· δίνονται οδηγίες στον ασθενή για αυτές τις τεχνικές εκτίμησης. Διατηρείται επίσης ακριβές αρχείο της πρόσληψης τροφής και υγρών από τον ασθενή και ο ασθενής ενθαρρύνεται να τηρεί τους συνιστώμενους περιορισμούς, όπως είναι η περιορισμένη πρόσληψη πρωτεϊνών, καλίου και νατρίου, η αυξημένη θερμιδική πρόσληψη και η μειωμένη πρόσληψη υγρών.

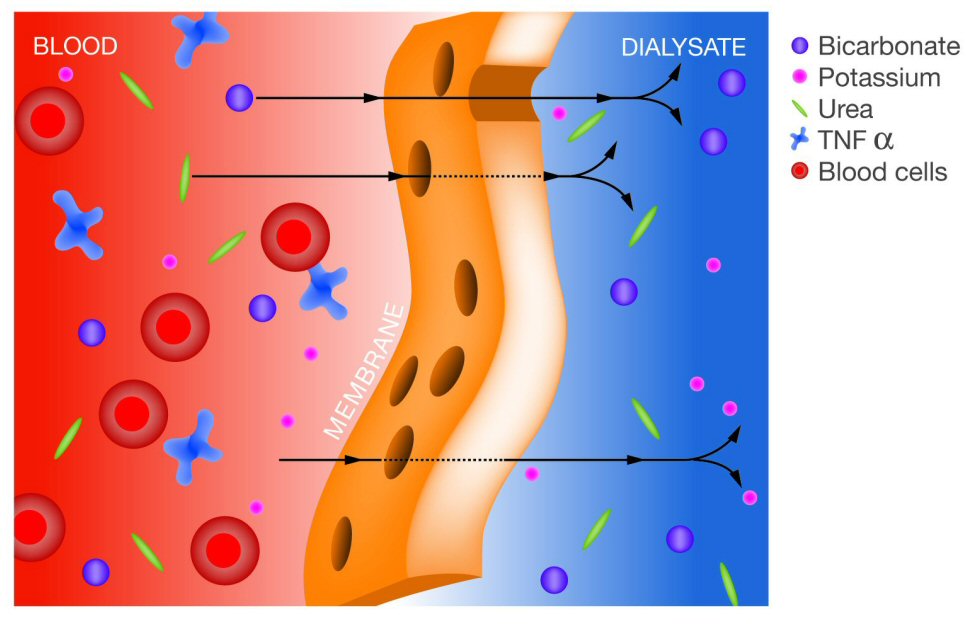
Δίνονται οδηγίες στον ασθενή σχετικά με τη φροντίδα της θέσης φλεβικής προσπέλασης: πρέπει να γίνεται καθαρισμός της τομής με διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου καθημερινά και διατήρησή της στεγνής μέχρι να επουλωθεί πλήρως (συνήθως χρειάζονται 10 με 14 ημέρες). Οποιοσδήποτε πόνος, οίδημα, ερυθρότητα ή εκκρίσεις στη θέση της προσπέλασης πρέπει να αναφερθεί αμέσως.

Ο ασθενής πρέπει επίσης να αποφεύγει την άσκηση υπερβολικής πίεσης στο χέρι αυτό, δηλαδή να αποφεύγει να κοιμάται πάνω σε αυτό, να μη φοράει σφιχτά ρούχα και να μη σηκώνει βαριά αντικείμενα. Πρέπει επίσης να αποφεύγει το ντους, το μπάνιο ή το κολύμπι για αρκετές ώρες μετά την αιμοκάθαρση. Δίνονται οδηγίες στον ασθενή για τις παρακάτω ασκήσεις, για να προαχθεί η διαστολή των φλεβών και να ενισχυθεί η ροή του αίματος στο προσβεβλημένο βραχίονα.

Αν ο ασθενής πρόκειται να κάνει αιμοκάθαρση στο σπίτι, τόσο ο ασθενής όσο και ένα μέλος της οικογένειας πρέπει να κατανοήσουν πλήρως όλες τις πλευρές της διαδικασίας. Τους δίνεται ένας τηλεφωνικός αριθμός του κέντρο αιμοκάθαρσης και τους ενθαρρύνουν να τον καλέσουν, αν προκύψουν οποιεσδήποτε ερωτήσεις ή προβλήματα. Συμβουλεύουν επίσης τον ασθενή να κανονίσει να υπάρχει και κάποιο άλλο (εκπαιδευμένο) πρόσωπο στη διάρκεια της αιμοκάθαρσης σε περίπτωση που εμφανιστεί οποιοδήποτε πρόβλημα και να επικοινωνήσει με τον αντίστοιχο σύλλογο ασθενών για πληροφορίες και υποστήριξη [(Stoner, 2003)](#STONER).

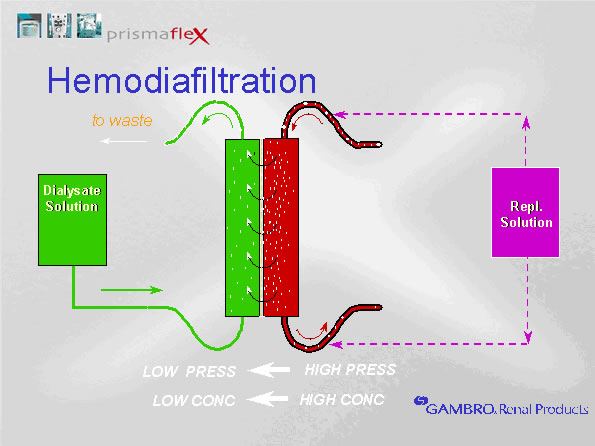
**Tύποι αιμοκάθαρσης** **(HDF και HD)**

Η αιμοκάθαρση (HD) είναι κατά κύριο λόγο μια μέθοδος καθαρισμού του αίματος και βασίζεται στις διαφορές συγκέντρωσης των ουσιών καθώς η κινητήρια δύναμη παίρνει τις τοξίνες από το αίμα. Αυτή η μέθοδος είναι αποτελεσματική για μικρές ουραιμικές τοξίνες όπως η ουρία, ωστόσο, για μεγαλύτερου μοριακού βάρους ουραιμικές τοξίνες, όπως η βήτα-2-μικροσφαιρίνη, η διάχυση είναι πολύ πιο αργή και, επομένως, δεν απομακρύνεται πολύ αποτελεσματικά χρησιμοποιώντας την HD. Οι μεμβράνες έχουν χαμηλό συντελεστή υπερδιήθησης(μέχρι 10 ml/min/100mmHg) και το διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι τα διττανθρακικά.



Εικόνα 8: Κλασική αιμοδιάλυση όπου οι ουραιμικξές τοξίνες απομακρύνονται με το φαινόμενο της διάχυσης δηλαδή λόγω της διαφοράς της συγκέντρωσης µεταξύ του αίµατος και του διαλύµατος, που χωρίζονται από την ηµιδιαπερατή µεµβράνη του φίλτρου

**Ανατύπωση από**: [http://www.baxter.com/continuous renal replacement therapy](http://www.baxter.com/continuous%20renal%20replacement%20therapy)

Η αιμοδιαδιήθηση (hemodiafiltration, HDF) είναι μία εναλλακτική μέθοδος καθαρισμού του αίματος που ενσωματώνει ένα συνδετικό τύπο στην κινητήρια δύναμη η οποία καταλήγει σε απομάκρυνση μεγαλύτερου μοριακού βάρους ουραιμικών τοξινών. Η αιµοδιαδιήθηση είναι συνδυασµός αιµοκάθαρσης και αιµοδιήθησης κατά την οποία οι ουραιµικές τοξίνες αποµακρύνονται µε διάχυση (κλίση συγκεντρώσεως) και συµµεταφορά µε έγχυση διαλύµατος αναπλήρωσης. Η μεταφορά κατά την αιμοδιαδιήθηση επιτυγχάνεται με τη δημιουργία μιας θετικής πίεσης κατά μήκος της μεμβράνης του διαλύτη η οποία προκαλεί μία σημαντική ποσότητα ουραιμικού πλάσματος (ένα συστατικό του αίματος που απομακρύνεται) να περάσει διαμέσου της μεμβράνης. Αυτή η ροή του ουραιμικού πλάσματος με το νερό διάλυσης μεταφέρει αποτελεσματικά αλλά αργά μεγάλες, τοξίνες κατά μήκος της μεμβράνης με ένα τρόπο παρόμοιο με τα αντικείμενα που μεταφέρονται προς τα κάτω από ένα ρεύμα αντίθετο. Για να παραμείνουν σε ισορροπία τα υγρά του οργανισμού, η αιμοδιαδιήθηση απαιτεί την προσθήκη ενός καθαρισμένου ή αποστειρωμένου υγρού υποκατάστασης για να εγχέεται πίσω στο αίμα για να αντικαταστήσει τη ροή του ουραιμικό πλάσματος που ωθήθηκε διαμέσου της μεμβράνης. Ως υγρό αντικατάστασης χρησιμοποιούνται διττανθρακικά. Χησιμοποιεί συνδυασμό δύο φίλτρων σε σειρά (απλό και υψηλής διαβατότητας) σε ενιαίο στεγανό περίβλημα. Ο συνδυασμός των δύο φίλτρων είναι χρήσιμος θεωρητικά διότι οδηγεί σε καλή απομάκρυνση τόσο των μεγάλων όσο και των μικρών μοριακού βάρους διαλυμένων ουσιών. ([Karkar](#Karkar), 2013)

Εικόνα 9: Η αιµοδιαδιήθηση αποτελεί συνδυασµό αιµοκάθαρσης και αιµοδιήθησης . Οι ουραιµικές τοξίνες αποµακρύνονται µε διάχυση και συµµεταφορά µε έγχυση διαλύµατος αναπλήρωσης.

Ανατύπωση από: <http://www.lhsc.on.ca/Health_Professionals/CCTC/elearning/crrt/crrt.htm>

**Φίλτρα και μεμβράνες αιμοκάθαρσης**

H συσκευή διάλυσης είναι το βασικό συστατικό του συστήματος αιμοδιάλισης όπου γίνεται το φιλτράρισμα του αίματος. Ο τρόπος με τον οποίο η μεμβράνη αλληλεπιδρά με τα άλλα συστατικά της αιμοδιάλυσης είναι σημαντικός για την αποτελεσματικότητα της. Το αίμα και το υγρό αιμοκάθαρσης περνάνε την συσκευή αιμοκάθαρσης σε αντίθετη μεταξύ τους κατεύθυνση χωριζόμενα από μια ημιπερατή μεμβράνη. Οι μεμβράνες των φίλτρων αιμοκάθαρσης χαρακτηρίζονται από τα φυσικά χαρακτηριστικά (κάθαρση, συντελεστής υπερδιήθησης), καθώς και από την επιφάνεια για να γεμίσει με συγκεκριμένο όγκο.

Για τη βέλτιστη αποτελεσματικότητα τα φίλτρα έχουν σχεδιαστεί για να ελαχιστοποιήσουν τις αποστάσεις διαχύσεως μεγιστοποιώντας την αναλογία επιφάνειας μεμβράνης προς τον όγκο του αίματος. Το εμβαδόν επιφανείας της μεμβράνης θα πρέπει να ταιριάζει περίπου την επιφάνεια του ασθενούς.

Τα φίλτρα διακρίνονται ανάλογα με τη βιοσυμβατότητά τους δηλαδή με την δυαντότητα να προκαλούν λιγότερες ανεπιθύμητες αντιδράσεις όταν έρχονται σε επαφή με τα συστατικά του αίματος. Η αξιολόγηση της βιοσυμβατότητας γίνεται με τον προσδιορισμό των ακόλουθων παραμέτρων: την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, των λευκών αιμοσφαιρίων, του μηχανισμού πήξης όπως για παράδειγμα τη τάση για δημιουργία θρόμβου, των αιμοπεταλίων, των μονοπύρηνων και των λεμφοκυττάρων. Η εκτίμηση της απόδοσης γίενται συνήθως με τον βαθμό απομάκρυνσης της β2-μικροσφαιρίνης. Φίλτρα με κακή βιοσυμβατότητα είναι οι μη τροποποιημένες κυτταρινικές μεμβράνες ενώ οι τροποποιημένες κυτταρινικές και τα συνθετικά φίλτρα έχουν καλύτερη βιοσυμβατότητα. Αν και είναι δύσκολη η κάταταξη των μεμβρανών με βάση τη βιοσυμβατότητα του συμπληρώματος και την παροδική λευκοπενία η μεμβράνη πολυακριλονιτρίλη θεωρείται από εκείνες που έχουν την χαμηλότερη ενεργοποίηση του συμπληρώματος και την καλύτερη απόδοση (Γριβέας, [2008](#Γριβέας)).

Η χημική σύσταση της μεμβράνης του φίλτρου καθορίζει τις ιδιότητές της και έχει ιδιαίτερη σημασία στην επιλογή, εφόσον οι ιδιότητες αυτές σχετίζονται με διάφορες επιδράσεις όπως, τον βαθμό ενεργοποίησης του συμπληρώματος, του συστήματος πήξης, (γεγονός που αφορά σε ασθενείς με αιμορραγική διάθεση), την αλλεργική αντίδραση σε ασθενείς που λαμβάνουν συγκεκριμένα φάρμακα. Στις μέρες μας δύο ομάδες υλικών μεμβράνης χρησιμοποιούνται. Μεμβράνες που βασίζονται στη κυτταρίνη (μη τροποποιημένες και τροποποιημένες) και μεμβράνες συνθετικές. Αυτές που έχουν ως βάση την κυτταρίνη είναι κατασκευασμένες από ανασυσταμένη κυτταρίνη που είναι σχετικά φθηνή. Αυτές έχουν συσχετιστεί με ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Σε τροποποιημένες μεμβράνες κυτταρίνης όπως το Hemophan, μερικά ή όλα από τα υπολείμματα υδροξυλίου είναι εστεροποιημένα για τη μείωση της αλληλεπίδρασης με τους παράγοντες συμπληρώματος. Οι τελευταίες, ωστόσο οδηγούν σε υψηλότερη ενεργοποίηση της πήξης καθιστώντας απαραίτητη τη χορήγηση αντιπηκτικού. Οι συνθετικές μεμβράνες παρασκευάζονται από πολυμερή και παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερη ενεργοποίηση του συμπληρώματος λόγω πρωτεϊνικής προσρόφησης (Βradley[Bradley](#Bradley) et al, 2012). Παρακάτω παρουσιάζονται οι υποκατηγορίες των μεμβρανών:

Στις κυτταρινικές ανήκουν:

1. Αναγεννημένη κυτταρίνη ( Cuprophan)
2. Οξεική κυτταρίνη
3. Τριοξεική κυτταρίνη
4. Αιμοφάνη ( Haemophan)

Στις συνθετικές ανήκουν:

1. Πολυακρυλονιτρίλη
2. Πολυαμίδη
3. Πολυκαρβονική
4. Πολυσουλφόνη

Επίσης οι μεμβράνες διακρίνονται με βάση τη διαβατότητα τους σε χαμηλής και υψηλής διαβατότητας με βάση τον συντελεστή υπερδιήθησης (ΚUF) ο οποίος αναφέρεται στον όγκο (ml) του νερού του πλάσματος, που φιλτράρεται την ώρα για κάθε mmHg πίεσης. Οι χαμηλής διαβατότητας μεμβράνες έχουν μικρούς πόρους για ουσίες μικρού μοριακού βάρους και ο συντελεστής υπερδιήθησης τους είναι (KUF < 10ml/mmHg/h/m2) ενώ οι υψηλής διαβατότητας μεμβράνες όπως είναι οι συνθετικές μεμβράνες (polysulfone, polyacrylonitrile, polyethersulfone) έχουν μεγάλους πόρους για μικρού και μεσαίου μοριακού βάρους ουσίες και ο συντελεστής υπερδιήθησης τους είναι (KUF > 20ml/mmHg/h/m2) ([Γριβέας](#Γριβέας), 2008).

**Α.2.1 Αντίσταση στη θεραπεία με rhEPO**

Η αναιμία είναι μια συχνή επιπλοκή που συμβάλλει στην επιβάρυνση των ασθενών υπο αιμοκάθαρση. Έχει επίσης αρνητικές επιπτώσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα, τη νοητική λειτουργία, την ικανότητα άσκησης και την ποιότητα ζωής, με αποτέλεσμα τη σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα σε αυτούς τους ασθενείς. Η χρόνια νεφρική νόσος είναι ένας παράγοντας κινδύνου για την καρδιαγγειακή θνησιμότητα. Αυτή η μελέτη αποκαλύπτει κομμάτια αιματολογικών και ποικίλης μεταβλητότητας της πρωτεϊνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων που παρατηρείται σε νεφρική νόσο τελικού σταδίου (ESRD) σε σχέση με την εξέλιξη της νόσου, τη διάρκεια και τη θνησιμότητα. Χρησιμοποιώντας μια ποικιλία πειραματικών προσεγγίσεων, οι αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς που έλαβαν ερυθροποιητίνη σε σύγκριση με τα υγιή κοντρόλς και παρακολουθούνταν για 36 μήνες. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, ​ μισοί από τους ασθενείς, πέθαναν από καρδιαγγειακές παθήσεις. Τα υψηλά επίπεδα των ουραιμικών τοξινών σε εκείνους τους ασθενείς συνδέθηκαν με κατεστραμμένα ερυθρά αιμοσφαίρια, κακή ανοχή και κακή απόκριση στη θεραπεία με αιμοκάθαρση. Η μελέτη των αιτιών που πέθαναν οι συγκεκριμένοι ασθενείς αποκάλυψε μια σημαντική διακύμανση στην αλκαλική φωσφατάση, τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης, τον μετασχηματισμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων και την ενδοκυτταρική συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης σε σύγκριση με τους ασθενείς που επέζησαν. Οι πρωτεΐνες των ερυθροκυττάρων έδειξαν σημαντική αναδιαμόρφωση των παθολογικών κυττάρων ενυδάτωσης και ευαισθησία στην προκαλούμενη από τη διάλυση οξείδωση. Σύμφωνα με την μελέτη παρακολούθησης, η διάρκεια της αιμοκάθαρσης συνδέθηκε με μια τάση προς αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, έκφραση του μεταφορέα-1 γλυκόζης και στοματίνης στη μεμβράνη καθώς και χαμηλότερα επίπεδα κυκλοφορούντων στοματοκυττάρων. Η διακύμανση του ουραιμικού δείκτη στο χρονικό διάστημα επιβίωσης των ασθενών αντανακλάται σε τροποποιήσεις του πλάσματος και των ερυθρών αιμοσφαιρίων λόγω του οξειδωτικού στρες. Οι ασθενείς με νεφρική νόσο τελικού σταδίου παρουσιάζουν εντυπωσιακά αντισταθμιστικές απαντήσεις στις χρόνιες προκλήσεις του ουραιμικού περιβάλλοντος. Αυτή η μελέτη δείχνει νέες τροποποιήσεις του αίματος που πιθανώς σχετίζεται με τη διάρκεια της αγωγής με ερυθροποιητίνη ή και τη θεραπεία με αιμοκάθαρση, την εξέλιξη της νόσου και τη καρδιαγγειακή θνησιμότητα σε τελικού σταδίου νεφρική νόσο. Η παρατηρούμενη μεταβλητότητα προσθέτει νέες πληροφορίες για την παθοφυσιολογία των ερυθρών αιμοσφαιρίων, σε τελικού σταδίου νεφρικής νόσου και προτείνει νέες αιματολογικές και πρωτεομικούς παράγοντες για μελλοντική εξέταση για την καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα των ουραιμικών ασθενών. ([Antonelou](#Antonelou14) et al, 2014)

Η εισαγωγή της θεραπείας με rhEPO στις αρχές του 1990 για τη θεραπεία της αναιμίας των ασθενών με ΧΝΑ οδήγησε σε σημαντική μείωση της αναιμίας και την βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών. Υπάρχει, ωστόσο, μια σημαντική ποικιλία όσον αφορά την ευαισθησία στην rhEPO, με ποικιλία που φτάνει έως και δεκαπλάσια της απαιτούμενης δόσης, για να επιτευχθεί η διόρθωση της αναιμίας. Επιπλέον, περίπου το 5-10% των ασθενών εμφανίζουν μια αξιοσημείωτη αντίσταση στη θεραπεία με rhEPO. Οι ευρωπαϊκές κατευθυντήριες γραμμές καθορίζουν την αντίσταση στη θεραπεία με rhEPO ως μια αποτυχία στην επίτευξη επιπέδων αιμοσφαιρίνης-στόχου (μεταξύ 11 και 12g/dL) με διατήρηση της δόσης της rhEPO υψηλότερη από 300 IU/Kg/εβδομάδα της εποετίνης ή υψηλότερες δόσεις από 1,5 μg/Kg/εβδομάδα της darbopoietin-άλφα (Locatelli, 2004b)

Οι λόγοι για αυτή την ποικιλία απόκρισης στην rhEPO είναι ασαφείς. Υπάρχουν πολλές καταστάσεις που αναφέρθηκαν ότι σχετίζονται με την αντίσταση στην rhEPO, όπως, η φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και η έλλειψη σιδήρου, ως σημαντικές αιτίες και η απώλεια αίματος, ο υπερπαραθυρεοειδισμός, η τοξικότητα από αλουμίνιο και η βιταμίνη Β12 ή το φυλλικό οξύ, ως ελάσσονας σημασίας αιτίες. Ωστόσο, ο αποκλεισμός αυτών των παραγόντων, δεν εξαλείφει την έντονη ποικιλία στην ευαισθησία προς την rhEPO. Επιπλέον, οι περισσότερες από τις δημοσιευμένες μελέτες, έχουν διερευνήσει μερικές από τις παραμέτρους και περιελάμβαναν πολύ περιορισμένο αριθμό ασθενών. Οι θεραπευτικές μέθοδοι καθώς και η διαδικασία της αιμοκάθαρσης έχουν αλλάξει τα τελευταία χρόνια. Η αξία αυτών των αλλαγών όσον αφορά την βιοσυμβατότητα της μεμβράνης αιμοκάθαρσης και της αγγειακής προσπέλασης, πρέπει επίσης να διευκρινιστεί σε τι επηρεάζει την αντίσταση στη θεραπεία με rhEPO. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι αιτίες για την μη ανταπόκριση στην θεραπεία με rhEPO.

Η συχνότερη από τις αιτίες ανεπαρκούς ανταπόκρισης στην ερυθροποιητίνη είναι η έλλειψη σιδήρου. Άλλες αιτίες κατά σειρά συχνότητας είναι:

* Η λοίμωξη ή η φλεγμονή, οποιασδήποτε αιτιολογίας, όπως λοιμώξεις της αγγειακής προσπέλασης, χειρουργική λοίμωξη, οδοντικά αποστήματα, AIDS, συστηματικός ερυθηματώδης λύκος κλπ. Η φλεγμονώδης διαδικασία επηρεάζει την ερυθροποίηση δια μέσου της παραγωγής κυτταροκινών όπως της IL-1 και του παράγοντα TNF, οι οποίες μέσω της παραγωγής ιντερφερόνης γ και β, αντίστοιχα, μπλοκάρουν την ωρίμανση των CFU-E προς ερυθροβλάστη.
* Χρόνια απώλεια αίματος η οποία πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν σε αρρώστους που απαιτούν συνεχώς αυξανόμενες δόσεις ερυθροποιητίνης, παρουσιάζουν πτώση του αιματοκρίτη και αδυνατούν να αυξήσουν τα επίπεδα σιδήρου μετά από ενδοφλέβια χορήγηση.
* Κυστική ινώδης οστεϊτις η οποία οφείλεται σε δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό και οδηγεί σε ίνωση του μυελού των οστών.
* Τοξικότητα από αλουμίνιο η οποία μπορεί να οδηγήσει σε καθυστέρηση της ανταπόκρισης η αυξημένες δόσεις ερυθροποιητίνης όχι όμως σε μη ανταπόκριση.
* Αιμοσφαιρινοπάθειες όπως δρεπανοκυτταρική νόσος και μεσογειακή αναιμία, ομόζυγος ή ετερόζυγος μορφή. Γενικά οι αιμοσφαιρινοπάθειες απαιτούν την χορήγηση μεγάλων δόσεων ερυθροποιητίνης οι οποίες αυξάνουν, παροδικά, την περιεκτικότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη και σε πολύ βραδύτερο ρυθμό την αιμοσφαιρίνη τύπου ενήλικα.
* Ανεπάρκεια φυλλικού οξέος και βιταμίνης Β12, παρά το γεγονός ότι δεν έχει αποδειχθεί ανεπάρκεια των ανωτέρω παραγόντων κατά την διάρκεια θεραπείας με ερυθροποιητίνη η ταχεία ερυθροποίηση από την χορήγηση της ορμόνης απαιτεί την αναπλήρωσή τους, ιδιαίτερα για το φυλλικό οξύ το οποίο είναι υδατοδιαλυτό και διέρχεται από το φίλτρο αιμοκάθαρσης.
* Πολλαπλούν μυέλωμα, το οποίο απαιτεί την χορήγηση μεγάλων δόσεων ερυθροποιητίνης 125-320 U/Kg/εβδομάδα, χωρίς σημαντικά αποτελέσματα. Σε ορισμένους, ωστόσο, είναι δυνατή η διατήρηση ικανοποιητικού αιματοκρίτη χωρίς την ανάγκη μεταγγίσεων. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι υπάρχει πιθανότητα διέγερσης των παθολογικών κλόνων από την χρόνια χορήγηση ερυθροποιητίνης, όμως δεν μπορεί να υποστηριχθεί, εκ του ασφαλούς, ότι αντενδείκνυται η χορήγηση της ορμόνης στην μυελωματική προσβολή του νεφρού.
* Κακή θρέψη η οποία οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα λευκωματίνης στον ορό θεωρείται αιτία μειονεκτικής ανταπόκρισης στην θεραπεία με ερυ-θροποιητίνη αφού σε καταστάσεις υποθρεψίας ο μυελός αποστερείται τα απαραίτητα συστατικά για την αιμοποίηση.
* Η αιμόλυση η οποία συνοδεύει την χρόνια έκθεση σε φορμαλδεϋδη καθώς και την αντικατάσταση καρδιακών βαλβίδων με τεχνητές.

Άλλες καταστάσεις που οδηγούν σε αντίσταση, είναι η παρουσία κακοήθων νεοπλασμάτων και πιθανώς η χορήγηση αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου. Σε περίπτωση που αποδεικνύεται η παρουσία αντίστασης στην δράση της ορμόνης, τότε ο άρρωστος θεραπεύεται όπως πριν από την χρήση της ερυθροποιητίνης, δηλαδή με την χορήγηση μεταγγίσεων αίματος καθώς και με άλλα μέσα που πιθανώς αυξάνουν την δραστηριότητα της ερυθροποιητίνης όπως καρνιτίνη και ανδρογόνα. Επίσης μπορεί να επιχειρηθεί η αύξηση της δόσης αιμοκάθαρσης (Kt/V) αυξάνοντας τον χρόνο αιμοκάθαρσης ή την επιφάνεια της μεμβράνης αιμοκάθαρσης.

**Α.2.2 Σχέση φλεγμονής και μη ανταπόκρισης στην rhEPO**

Η φλεγμονή είναι η φυσιολογική απόκριση σε μία ποικιλία επιβλαβών ερεθισμάτων, όπως βλάβη ιστού που προκαλείται από μόλυνση ή φυσική βλάβη. Είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει τη συμμετοχή των διαφόρων κυττάρων και μορίων, και μπορεί να παρουσιάσει διαφορετικές εντάσεις και διάρκειες.

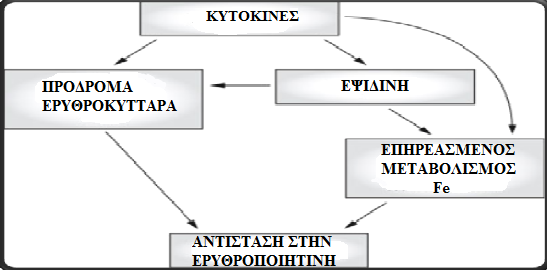
Η φλεγμονή αναφέρεται συνήθως σε μια τοπική διαδικασία. Ωστόσο, εάν το επιβλαβές ερέθισμα είναι αρκετά σοβαρό, εμφανίζονται μεταγενέστερες συστηματικές αλλαγές, οι οποίες αναφέρονται ως ̏οξεία φάση απόκρισης˝, η οποία συνοδεύεται από συμπτώματα όπως πυρετό, ανορεξία, και υπνηλία. Αυτή η απόκριση οξείας φάσεως περιλαμβάνει νευροενδοκρινικές, αιμοποιητικές και μεταβολικές αλλαγές καθώς και αλλαγές σε μη πρωτεϊνικά συστατικά του πλάσματος [(Ceciliani, 2002).](#Ceciliani) Η αιμοποιητική απόκριση περιλαμβάνει την λευκοκυττάρωση και την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων, την θρομβοκυττάρωση, και την αναιμία που οφείλεται είτε σε βλάβη των ερυθρών αιμοσφαιρίων είτε σε μειωμένη ερυθροποίηση.

Τα φλεγμονώδη ερεθίσματα επάγουν την απελευθέρωση των κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF)-α, την IL-1, την IL-6, και την ιντερφερόνη (ΙΡΝ)-γ, η οποία μπορεί να παραχθεί από διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των λευκοκυττάρων, των ινοβλαστών και των ενδοθηλιακών κυττάρων [(Kushner και Rzewnicki, 1999).](#Kushner) Αυτή η απελευθέρωση των κυτοκινών προκαλεί πολλές συστημικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης σύνθεσης και απελευθέρωσης των θετικών πρωτεϊνών οξείας φάσης, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεϊνη και το ινωδογόνο καθώς επίσης και την καταστολή των αρνητικών πρωτεϊνών οξείας φάσης, όπως είναι η αλβουμίνη και η τρανσφερίνη.

Τα αίτια για τη φλεγμονώδη απόκριση σε ασθενείς που κάνουν αιμοκάθαρση δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Υπάρχουν αρκετές πιθανές εκδοχές, συμπεριλαμβανομένης της βακτηριακής μόλυνσης λόγω της αιμοδιάλυσης, της ασυμβατότητας με τη μεμβράνη διάλυσης και τη μόλυνση της αγγειακής διόδου. Ωστόσο, η διαδικασία της αιμοκάθαρσης μπορεί να είναι εν μέρει υπεύθυνη για την φλεγμονώδη αντίδραση, γιατί ακόμη και οι ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια οι οποίοι δεν είναι ακόμη στο στάδιο της αιμοκάθαρσης παρουσιάζουν αυξημένους δείκτες φλεγμονής, οι οποίοι αυξάνονται περαιτέρω μετά την έναρξη τακτικής θεραπείας με αιμοκάθαρση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η νόσος αυτή καθαυτή προκαλεί μια φλεγμονώδη απάντηση. [(Gunnell, 1999; Macdougall και Cooper, 2002; Schindler, 2002](#Gunnell)).

Μαζί με την φλεγμονώδη απόκριση, κινητοποείται και ο σίδηρος στους αποθηκευτικούς χώρους εντός του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των προγονικών ερυθρών αιμοσφαιρίων, και αμβλύνοντας την απόκριση στην ΕΡΟ (ενδογενή ή/και εξωγενή). Η καταστολή της ερυθροποίησης έχει επίσης αποδοθεί σε αυξημένη δραστηριότητα των προφλεγμονωδών κυτοκινών που αναφέρθηκαν σε αυτή την φλεγμονώδη κατάσταση, και αυτή η σχέση έχει προταθεί ως πιθανός παράγοντας που σχετίζεται με την αντίσταση στη θεραπεία με rhEPO [(Descamps-Latscha, 1995; Gunnell, 1999; MacDougall και Cooper, 2002; Schindler, 2002; Cooper, 2003).](#Descamps)

Στην πραγματικότητα, έχει αναφερθεί ότι οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η IL-1, η IL-2, η IL-4, η IL-6, ο παράγοντας TNF-α και η ΙΝΡ-γ μειώνουν τα κύτταρα ΒFU-E και CFU-Ε, με αποτέλεσμα την καταστολή της ερυθροποίησης [(Μeans και Krantz, 1996; Allen, 1999; MacDougall, 2002)](#Means). Επιπλέον, αναφέρθηκε [(MacDougall, 2002)](#Macdougall) ότι ο ορός που προέρχεται από ασθενείς που κάνουν αιμοκάθαρση, καταστέλλει τον σχηματισμό της ερυθράς σειράς και συνεπώς και την απόκριση στην ΕΡΟ, κατά τρόπο που μπορεί να ανασταλεί από αντισώματα έναντι του παράγοντα TNF-α και της ΙΝΡ-γ. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν έναν βασικό ρόλο των φλεγμονωδών μεσολαβητών στην απόκριση στη θεραπεία με rhEPO. [(Waltzer, 1984; Foley, 1996; Meyer, 2002; Cooper, 2003).](#Waltzer)



Εικόνα 10: Ο ρόλος των κυτοκινών στην αντίσταση της EPO

Ανατύπωση από: Karien van der Putten,2007 Nature Clinical Practice Nephrology

Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι, οι μη-ανταποκρινόμενοι ασθενείς στην θεραπεία με rhEPO, σε σύγκριση με αυτούς που ανταποκρίθηκαν, παρουσίασαν υψηλότερη CRP και αναλογία ουδετερόφιλων/λεμφοκυττάρων και χαμηλότερα επίπεδα λευκωματίνης ορού [(Costa, 2008a)](#Costa), γεγονός που υποδηλώνει μια σχέση μεταξύ της αντίστασης στην θεραπεία με την rhEPO και την φλεγμονώδη απόκριση. Επιπλέον, παρατηρήθηκε λεμφοπενία από CD4+ που συνδέεται με αυξημένη παραγωγή IL-7 στον ορό [(Costa, 2008b)](#Costa08), ένα στάδιο ενεργοποίησης των Τ-κυττάρων και μια ενισχυμένη ικανότητα αυτών των κυττάρων να παράγουν κυτοκίνες που σχετίζονται με την Th1 (IL-2, INF-γ και TNF-α) μετά από σύντομη in vitro διέγερση. Αυτή η αύξηση της ικανότητας των Τ-κυττάρων για παραγωγή των Th1 κυτοκινών θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν, τουλάχιστον εν μέρει, την αναιμία που βρέθηκε σε ασθενείς υπο αιμοδιάλυση. Αυτά τα αποτελέσματα, δείχνουν ότι οι αυξημένες φλεγμονώδεις κυτοκίνες αποτελούν ένα αξιόπιστο εύρημα που μπορεί να συσχετιστεί με την αντίσταση στη θεραπεία με rhEPO, ενεργώντας άμεσα στην ερυθροποίηση ή έμμεσα, με τη μείωση της διαθεσιμότητας του σιδήρου για ερυθροποίηση.

**Α.2.2.1 Ενεργοποίηση λευκοκυττάρων**

Η λευκοκυττάρωση και τα κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα στις φλεγμονώδεις περιοχές είναι το αίτιο της φλεγμονής. Τα λευκοκύτταρα έλκονται από τις φλεγμονώδεις περιφέρειες και η μετανάστευση τους από το αίμα στον τραυματισμένο ιστό προκαλείται κατά κύριο λόγο από την έκφραση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, τα οποία αλληλεπιδρούν με υποδοχείς επιφανείας που υπάρχουν πάνω στα λευκοκύτταρα [(Muller, 1999; Sullivan, 2000).](#Muller) Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ λευκοκυττάρων και ενδοθηλιακού συστήματος ρυθμίζεται από πολλά άλλα μοριακά βήματα που είναι ανάλογα τις μορφολογικές αλλαγές που συνοδεύουν την προσκόλληση. Τα βήματα που εξηγούν την προσκόλληση έχουν χωριστεί σε διαδοχικά στάδια με βάση την οπτική εκτίμηση των μετα-τριχοειδών φλεβιδίων κατά τα πρώτα στάδια της οξείας φλεγμονής. Σε απουσία της φλεγμονής, τα λευκοκύτταρα ρέουν κατά μήκος του τοιχώματος του αγγείου. Μετά την εμφάνιση του φλεγμονώδους ερεθίσματος, τα λευκοκύτταρα ρέουν κατά μήκος των μετα-τριχοειδών φλεβιδίων (αλλά όχι αρτηριδίων ή μικρών αρτηριών) με ταχύτητα ευδιάκριτα κάτω από εκείνη του ρέοντος αίματος. Μερικά από κύτταρα που κυκοφορούν στο περιφεριακό αίμα μπορεί να φαίνονται σαν να είναι ανενεργά, αλλά μετά από μερικά λεπτά αλλάζουν το σχήμα τους, ως απάντηση στα τοπικά ερεθίσματα που δέχονται. Ακολουθεί εξαγγείωση στον εξωαγγειακό ιστό. Κάθε ένα από αυτά τα βήματα απαιτεί είτε αύξηση των ήδη υπάρχοντων κυττάρων ή ενεργοποίηση ειδικών περιοχών προσκόλλησης των μορίων. Στην περιοχή της φλεγμονής, τα λευκοκύτταρα απελευθερώνουν τα προϊόντα των κοκκίων τους και μπορούν πλέον να ασκήσουν τις φαγοκυτταρικές τους ικανότητες.

Στην οξεία φλεγμονή, τα λευκοκύτταρα που απαντώνται περισσότερο είναι κυρίως τα ουδετερόφιλα, ενώ στην χρόνια φλεγμονή παρατηρούνται κυρίως μονοπύρηνα κύτταρα (κυρίως μακροφάγα και λεμφοκύτταρα). Μολονότι η αλληλεπίδραση των λευκοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι σημαντική για την εξαγγείωση των λευκοκυττάρων και την διακίνηση τους σε φυσιολογικές καταστάσεις, υπάρχουν αυξανόμενα στοιχεία ότι μεταβαλλόμενες αλληλεπιδράσεις λευκοκυττάρων-ενδοθηλίου εμπλέκονται στην παθογένεια νόσων που συνδέονται με την φλεγμονή, ενδεχομένως από την καταστροφή του ενδοθηλίου ή μεταβάλλοντας την ενδοθηλιακή λειτουργία [(Harlan, 1985; Ley, 2007).](#Harlan)

Η λευκοκυττάρωση είναι απαραίτητη και ενεργοποιείται πρώτη από όλους προκειμένου να προστατεύσει τον οργανισμό και τα ουδετερόφιλα, ο μεγαλύτερος πληθυσμός των λευκοκυττάρων του αίματος στους ενήλικες, παίζουν πρωταρχικό ρόλο. Είναι γνωστό ότι τα ουδετερόφιλα έχουν μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται για να καταστρέφουν εισβάλλοντες μικροοργανισμούς. Αυτά τα κύτταρα χρησιμοποιούν μια εξαιρετική σειρά από οξυγόνο-εξαρτώμενους μηχανισμούς καθώς και ανεξάρτητους απο το οξυγόνο για να καταστρέψουν και να αφαιρέσουν μολυσματικούς παράγοντες [(Witkó-Sarsat,-2000).](#Witko) Οι οξυγόνο-εξαρτώμενοι μηχανισμοί συμπεριλαμβάνουν την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), που μπορεί να είναι μικροβιοκτόνοι και που μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη του οξειδωτικού στρες. Οι μηχανισμοί ανεξάρτητοι του οξυγόνου περιλαμβάνουν την χημειοταξία, την φαγοκυττάρωση και την αποκοκκίωση. Η παραγωγή οξειδωτικών μικροβιοκτόνων από τα ουδετερόφιλα προκύπτει από την ενεργοποίηση ενός πολυπρωτεϊνικού ενζυμικού συμπλέγματος, που είναι γνωστή ως, μειωμένη νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεουτίδ-φωσφατική οξειδάση, η οποία καταλύει τον σχηματισμό του ανιόντος υπεροξειδίου (Ο2-).

Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα επίσης υφίστανται αποκοκκίωση, με την απελευθέρωση των διαφόρων συστατικών τους, δηλαδή, πρωτεάσες, όπως η ελαστάση και κατιονικές πρωτεΐνες, όπως η λακτοφερρίνη.

Η ελαστάση είναι μέρος της χυμοθρυψίνης που ανήκει στην κατηγορία των σερινών πρωτεϊνασών δηλαδή ενζύμων που διασπούν πεπτιδικούς δεσμούς σε πρωτεΐνες και εκφράζεται σε μονοκύτταρα και σε σιτευτικά κύτταρα, αλλά κυρίως εκφράζεται στα ουδετερόφιλα, όπου διαμερισματοποιείται στα πρωτογενή αζουρόφιλα κοκκία. Η ενδοκυτταρική λειτουργία αυτού του ενζύμου είναι η υποβάθμιση των ξένων μικροοργανισμών που φαγοκυτταρώνονται από το ουδετερόφιλο [(Brinkmann, 2004)](#Brinkmann). Η ελαστάση μπορεί να αναδιαμορφώσει ένα κατεστραμμένο ιστό και να διευκολύνει τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων εντός ή διαμέσου των ιστών. Επιπλέον, η ελαστάση διαμορφώνει επίσης την έκφραση των κυτοκινών στις επιθηλιακές και ενδοθηλιακές επιφάνειες, επαναρυθμίζοντας τη παραγωγή των κυτοκινών, όπως την IL-6, την IL-8, το ΤGF-β (αυξητικός μεταβολικός παράγοντας β) και το GM-CSF. Επίσης προωθεί την υποβάθμιση των κυτοκινών, όπως την IL-1, τον παράγοντα TNF-α και την IL-2.

Σύμφωνα με έρευνες, η ελαστάση φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην μεταβολή των πρωτεϊνών της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η οποία με τη σειρά της θεωρείται ένας από τους σημαντικούς παράγοντες μη ανταπόκρισης στη θεραπεία με rhEPO. Μια υπόθεση λέει ότι τα αυξημένα επίπεδα της ελαστάσης που βρέθηκαν στο πλάσμα στους αιμοκαθαρούμενους ασθενείς θα μπορούσαν να επάγουν ορισμένες μεταβολές στις πρωτεΐνες της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων, οδηγώντας στη μείωση της διάρκειας ζωής των ερυθροκυττάρων σε αυτούς τους ασθενείς, ιδιαίτερα πιο ενισχυμένη στους μη-ανταποκρινόμενος στη θεραπεία με rhEPO, και κατά συνέπεια, σε αύξηση στο βαθμό της αναιμίας, σε αυτούς τους ασθενείς Κατά την διάρκεια της αιμοδιάλυσης προκαλείται ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων και οι αλλαγές που προκαλούνται στη μεμβράνη των ερυθρών αποδίδονται στην ελαστάση που απελευθερώνεται κατά την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων. Μελετήθηκαν τόσο οι ανταποκριθέντες όσο και οι μη στη θεραπεία με rhEPO και παρατηρήθηκε ότι πριν την διαδικασία της αιμοδιάλυσης τα ερυθρά και των 2 ομάδων είναι πιο επιρρεπή στην πρωτεολυτική δράση της ελαστάσης πάνω στη μεμβράνη και αυτό είναι πιο έντονο στους μη ανταποκριθέντες. Μετά την διαδικασία της αιμοκάθαρσης η δομή της μεμβράνης των ερυθρών φαίνεται να μην παρουσιάζει αλλαγές καθώς τα πιο επιρρεπή ερυθρά αιμοσφαίρια αφαιρούνται κατά την διάρκεια της αιμοκάθαρσης. Επίσης η ελαστάση μπορεί να συμβάλλει στην αφαίρεση αυτών των κατεστραμμένων κυττάρων, ενισχύοντας τις πρωτεϊνικές αλλαγές στη μεμβράνη των ερυθρών και μειώνοντας το χρόνο ζωής αυτών στους ασθενείς που υπόκεινται αιμοκάθαρση και συγκεκριμένα στους μη ανταποκρινόμενους και συνεπώς οδηγεί στην αύξηση της αναιμίας [(Pereira, 2011)](#Pereira).

Όσον αφορά την λακτοφερρίνη πλάσματος, προέρχεται κυρίως από τα ουδετερόφιλα και η παρουσία της στους ειδικούς κόκκους χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό αυτών των τύπων των κόκκων. Η λακτοφερρίνη βρίσκεται επίσης και σε άλλους κόκκους, όπως στους τριτογενείς κόκκους, αν και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Η λακτοφερίνη είναι μια πολυλειτουργική γλυκοπρωτεΐνη σιδήρου, η οποία φαίνεται να ασκεί μια δράση ευρέως φάσματος στην πρωταρχική άμυνα ενάντια στα βακτηρίδια, στους μύκητες, στα πρωτόζωα και τους ιούς. Επίσης μπορεί να συνδεθεί με μεγάλες ποσότητες ελεύθερου σιδήρου. Ο σίδηρος συνδεδεμένος με την λακτοφερρίνη παραλαμβάνεται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, τα οποία εκφράζουν ειδικούς υποδοχείς λακτοφερρίνης. Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, αυτό προκαλεί στέρηση σιδήρου από τα πρόδρομα ερυθροκύτταρα, τα οποία δεν εκφράζουν υποδοχείς λακτοφερίνης [(Barany, 2001)](#Barany). Άλλοι μηχανισμοί στους οποίους εμπλέκεται η λακτοφερρίνη περιλαμβάνουν την αύξηση στα φυσιολογικά κύτταρα, στην πήξη, και ίσως στην κυτταρική προσκόλληση [(Levay και Viljoen, 1995).](#Levay)

Δεν υπάρχουν σαφείς δεδομένα όσον αφορά τη σχέση μεταξύ της ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων και της αντίστασης στη θεραπεία με rhEPO. Παρατηρήθκε ότι, ασθενείς υπο αιμοκάθαρση και συγκεκριμένα οι μη ανταποκρίσιμοι ασθενείς στην θεραπεία με rhEPO, παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα ελαστάσης στον ορό, συγκρινόμενοι με τους υγιείς μάρτυρες. Παρόλα αυτά η διαδικασία της αιμοκάθαρσης δεν εξηγεί τα υψηλά επίπεδα ελαστάσης στον ορό των μη ανταποκρινόμενων ασθενών. Ωστόσο βρέθηκε μεγάλη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της ελαστάσης και της CRP, δικαιολογώντας την αύξηση των επιπέδων της ελαστάσης ως μέρος της φλεγμονώδους διαδικασίας που παρατηρείται στους αιμοκαθαρούμενους ασθενείς και εβρισκόμενη πιο ενισχυμένη στους μη ανταποκρίσιμους ασθενείς.

**Α.2.2.2 Ενεργοποίηση ουδετερόφιλων**

Επίσης παρατηρήθηκε, ότι κατά την διαδικασία της αιμοκάθαρσης προκαλείται ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων. Σε μια πρόσφατη μελέτη, διαπιστώθηκε ότι ασθενείς υπο αιμοδιάλυση, ιδιαίτερα εκείνοι που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία με την rh-EPO, παρουσίασαν μειωμένη έκφραση των δεικτών CXCR1 που βρίσκονται στην επιφάνεια των ουδετεροφίλων [(Pereira, 2010)](#Pereira) και υψηλότερα επίπεδα ελαστάσης στο πλάσμα. Το CXCR1 είναι ένας υποδοχέας που αναγνωρίζει τις CXC χημειοκίνες, ιδιαίτερα την προφλεγμονώδη IL-8 [(Pay, 2006,](#Pay) [Sherry, 2008).](#Sherry) Η μειωμένη έκφραση αυτού του υποδοχέα στην επιφάνεια των ουδετερόφιλων σχετίζεται με την απελευθέρωση των συστατικών των κοκκίων των ουδετερόφιλων και αντανακλά την ανάγκη για ινοτροπική υποστήριξη. Πρόσφατα, φάνηκε ότι τα επίπεδα του υποδοχέα των ουδετερόφιλων CXCR1, είναι ελαφρώς μειωμένα σε παιδιατρικούς ασθενείς, με συνέπεια το τελικό στάδιο της νεφρικής νόσου, και ότι η περιοδική βακτηριακή λοίμωξη επιδεινώνει σημαντικά την απώλεια του CXCR1 από τα ουδετερόφιλα [(Sherry, 2008)](#Sherry). Αυτή η απώλεια του CXCR1 από τα ουδετερόφιλα μπορεί να οφείλεται σε ουραιμική κατάσταση, σε αλλαγές στην έκφραση των λευκοκυττάρων κατά την προσκόλληση τους ή και στην απευαισθητοποίηση αυτού του υποδοχέα, εξαιτίας προηγούμενης έκθεσης σε πολλά άλλα μη σχετικά χημειοελκτικά, συμπεριλαμβανομένου του Ν-φορμυλιωμένου πεπτιδίου και του προϊόντος διάσπασης του συμπληρώματος C5a. Χρόνια έκθεση των κυκλοφορούντων φλεγμονωδών κυττάρων σε αυτούς τους μεσολαβητές μπορεί να οδηγήσει επίσης σε απώλεια της έκφρασης και λειτουργίας του υποδοχέα χημειοκίνης μέσω απευαισθητοποίησης και διασταύρωσης με άλλα χημειοελκτικά.

Η διαδικασία αιμοδιάλυσης από μόνη της, φαίνεται να οδηγεί σε ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων όπως βρέθηκε σε ασθενείς υπο αιμοδιάλυση [(Costa, 2008c)](#Costac). Ωστόσο, η αύξηση σε προϊόντα ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων που παρατηρείται μετά τη διαδικασία της αιμοδιάλυσης δεν εξηγεί την υψηλότερη ενεργοποίηση ουδετερόφιλων που βρέθηκε σε μη αποκρινόμενους ασθενείς.

Η τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια προκαλεί επίσης μια κλινική κατάσταση ανοσοανεπάρκειας ως αιτία αυτής πιθανότατα να οφείλεται η επίπτωση των λοιμώξεων και η υψηλή θνησιμότητα που οφείλεται σε λοιμώδεις επιπλοκές. Αυτή η ανοσοανεπάρκεια χαρακτηρίζεται από μια ανεπάρκεια απόκρισης σε ορισμένα εμβόλια, δηλαδή για τον ιό της ηπατίτιδας Β. Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για αυτό το ανοσολογικό ελάττωμα είναι ακόμη άγνωστοι. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι η λεμφοπενία σχετίζεται με το τελικό στάδιο νεφρικής ανεπάρκειας και συγκεκριμένα με τα Β και Τ λεμφοκυττάρα, που θα μπορούσαν να σχετίζονται με αυξημένη αλλαγή των λεμφοκυττάρων, σε μια διαταραχή στην ομοιόσταση των λεμφοκυττάρων εξαιτίας κάποιας ουραιμίας, ή και σε αυξημένη απόπτωση των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος σχετίζόμενο με την ενεργοποίηση ενός ερεθίσματος [(Litjens et al, 2006).](#Litjens)

**Α.2.3 Σχέση σιδήρου και μη ανταπόκρισης στην θεραπεία με rhEPO**

**Α.2.3.1 Μεταβολισμός σιδήρου**

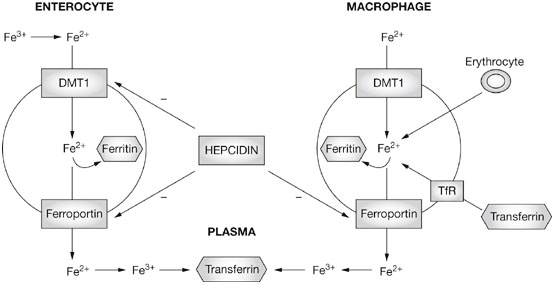
Ο σίδηρος είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο που απαιτείται για την ανάπτυξη των ζωντανών οργανισμών, αλλά μεγάλη συγκέντρωση του ελεύθερου σιδήρου μπορεί να καταστεί τοξική για το κύτταρο. Η εντερική απορρόφηση σιδήρου ρυθμίζεται από το επίπεδο των αποθεμάτων σιδήρου του σώματος και από την ποσότητα του σιδήρου που απαιτείται για την ερυθροποίηση [(Arth, 1999)](#Arth).

Σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, η απορρόφηση του σιδήρου είναι παρόμοια με εκείνη των υγιών ατόμων. Ωστόσο, όταν βρίσκονται υπό θεραπεία με rhEPO, η απορρόφηση του σιδήρου αυξάνεται κατά 5 φορές περισσότερο [(Skikne και Cook, 1992)](#Skikne). Αυτή η αυξημένη απορρόφηση του σιδήρου δεν είναι επαρκής για να αντισταθμίσει το σιδήρο που χάνεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της αιμοκάθαρσης καθώς και λόγω απώλειας αίματος των συγκεκριμένων ασθενών λόγω πολλαπλών εξετάσεων. Για το λόγο αυτό, η ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου έχει γίνει μια καθιερωμένη θεραπεία για τους περισσότερους ασθενείς που λαμβάνουν rhEPO. Για να αποφευχθεί η υπερφόρτωση σιδήρου, με δυνητικά επιβλαβείς συνέπειες, υπάρχει ανάγκη για την παρακολούθηση της θεραπείας σιδήρου με τη διενέργεια τακτικών εξετάσεων αίματος που αντικατοπτρίζουν τις αποθήκες σιδήρου του σώματος.

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν να επικεντρώνονται στην εψιδίνη που θεωρείται ως ένα σημαντικά συντηρητικός ρυθμιστής της διανομής του σιδήρου [(Nemeth, 2006).](#Nemeth) Αυτή η μικρή ορμόνη, που παράγεται από το ήπαρ θηλαστικών, έχει προταθεί ως κεντρικός μεσολαβητής στην απορρόφηση του σιδήρου. Υψηλά επίπεδα εψιδίνης βρέθηκαν να συνδέονται με μια μείωση τόσο στην πρόσληψη του σιδήρου από το λεπτό έντερο όσο και στην απελευθέρωση του σιδήρου από τα μακροφάγα. Επίσης παρατηρήθκε μειωμένη πλακουντιακή μεταφορά του σιδήρου [(Kulaksiz, 2004).](#Kulaksiz)

Η σύνθεση της εψιδίνης διεγείρεται από την φλεγμονή και από την υπερφόρτωση σιδήρου. Αυτή συντίθεται ως μια προγενέστερη μορφή της εψιδίνης, μια πρωτεΐνη με 84 αμινοξέα. Αυτό το πεπτίδιο διασπάται και οδηγεί στην προ-εψιδίνη με 60 αμινοξέα, το οποίο υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία, η οποία οδηγεί στα 25 αμινοξέα της πρωτεΐνης, που είναι η τελική μορφή της εψιδίνης [(Dallalio, 2003).](#Dallalio)

Η εψιδίνη συνδέεται με την φερροπορτίνη, η οποία είναι παρούσα στα μακροφάγα, στο βασεοπλευρικό χώρο των εντεροκυττάρων, καθώς επίσης και στα ηπατοκύτταρα. Έχει αποδειχτεί in vitro ότι η εψιδίνη επάγει την εσωτερικοποίηση και την μείωση της φερροπορτίνης, μια κρίσιμη πρωτεϊνη για την κυτταρική εξαγωγή του σιδήρου ([Domenico, 2007).](#Domenico) Με την μείωση ενός αποτελεσματικού αριθμού εξαγωγέων σιδήρου στη μεμβράνη των εντερικών κυττάρων και των μακροφάγων, η εψιδίνη καταστέλλει την πρόσληψη και την απελευθέρωση του σιδήρου, αντίστοιχα. Αυτός είναι ο φαινότυπος της νόσου σχετιζόμενη με την φερροπορτίνη, όπου η συσσώρευση σιδήρου παρατηρείται κυρίως σε μακροφάγα και συχνά συνδυάζεται με αναιμία.



Εικόνα 11: Η ομοιόσταση του Fe και ο ρόλος της εψιδίνης

Ο Fe3 + ανάγεται σε Fe2 + και κινείται μέσα στα εντερικά κύτταρα μέσω του DMT1. Μέσα στα εντερικά κύτταρα, ο σίδηρος μπορεί είτε να αποθηκευτεί ως φερριτίνη ή μπορεί να μεταφερθεί μέσω της φερροπορτίνης. Στο πλάσμα, ο Fe2 + οξειδώνεται σε Fe3 +,  ο οποίος μπορεί να συνδεθεί με την τρανσφερρίνη. Μακροφάγα λαμβάνουν τον σίδηρο από από την φαγοκυττάρωση των ερυθροκυττάρων, μέσω του DMT1, και από την τρανσφερρίνη μέσω του υποδοχέα τρανσφερρίνης. Στα μακροφάγα, ο σίδηρος αποθηκεύεται ως φερριτίνη ή μεταφέρεται στην κυκλοφορία μέσω της φερροπορτίνης. Η εψιδίνη ρυθμίζει αρνητικά την φερροπορτίνη στα εντεροκύτταρα και στα μακροφάγα, και την έκφραση του DMT1 μέσα στα εντερικά κύτταρα, οδηγώντας σε μειωμένη διαθεσιμότητα του σιδήρου στο πλάσμα.

**Ανατύπωση από:** Karien van der Putten et al, 2007 Nature Clinical Practice Nephrology

Η in vitro διέγερση των ανθρώπινων ηπατοκυττάρων από προφλεγμονώδη IL-6 έδειξε ισχυρή επαγωγή του mRNA της εψιδίνης, υποδεικνύοντας ότι αυτή η κυτοκίνη μπορεί να είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής της επαγωγής της εψιδίνης στην φλεγμονή (Fleming και Sly, 2001;[Nemeth, 2004).](#Nemeth04) Κατόπιν κάποιου φλεγμονώδους ερεθίσματος, η IL-6 απελευθερώνεται και δεσμεύεται σε ένα περίπλοκο υποδοχέα α της IL-6. Τα αποτελέσματα αλληλεπίδρασης της IL-6 με τον υποδοχέα έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μονοπατιών JAKs που φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες STAT και κυρίως τις STAT3. Αφού γίνει η φωσφορυλίωση στο υπόλειμμα τυροσίνης 705, οι STAT3 μετατοπίζονται μέσα στον πυρηνίσκο, όπου ρυθμίζει την μεταγραφή πολλών γονιδίων στόχων [(Carbia-Nagashima και Arzt, 2004),](#Carbia) συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου που σχετίζεται με την εψιδίνη.

Αυτή η αυξημένη έκφραση της εψιδίνης κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, εξηγεί την δέσμευση του σιδήρου στα μακροφάγα και την αναστολή της εντερικής απορρόφησης του σιδήρου, τα δύο χαρακτηριστικά της αναιμίας που προκύπτει από την φλεγμονή, η οποία είναι νορμοκυτταρική ή μικροκυτταρική. Αυτή η μειωμένη διαθεσιμότητα σε σίδηρο μπορεί να είναι ένας μηχανισμός άμυνας του ξενιστή κατά της εισβολής των μικροοργανισμών.

Η βιολογική σημασία του προδρόμου μορίου της εψιδίνης, που ονομάζεται προ-εψιδίνη στη ρύθμιση του μεταβολισμού του σιδήρου, είναι ακόμα απροσδιόριστη. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι τα επίπεδα της προεψιδίνης είναι ένας αξιόπιστος δείκτης των επιπέδων και της δραστηριότητας της εψιδίνης (Dallalio, 2003; [Kulaksiz, 2004).](#Kulaksiz)

Η σύνθεση της εψιδίνης ρυθμίζεται από την φλεγμονή, ένα συχνό εύρημα σε ασθενείς σε αιμοκάθαρση. Στην πραγματικότητα, αυξημένα επίπεδα της προ-εψιδίνης έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με ΧΝΑ υπό αιμοκάθαρση [(Nicolas 2002,](#Kulaksiz) Dallalio, 2003; [Kulaksiz, 2004)](#Kulaksiz).

Η αντίσταση στη θεραπεία με rhEPO έχει συσχετιστεί με διαταραχές στο μεταβολισμό του σιδήρου. Στην πραγματικότητα, η κύρια αιτία για την rhEPO αντοχής που περιγράφεται στη βιβλιογραφία σε ασθενείς υπο αιμοδιάλυση, είναι η ανεπάρκεια σιδήρου, η οποία εξακολουθεί να υφίσταται σε ορισμένους ασθενείς, ακόμα και μετά από συμπληρώματα σιδήρου. Αυτή η ανεπάρκεια σιδήρου μπορεί να είναι απόλυτη, με συγκέντρωση φερριτίνης ορού μικρότερη από 100 mg/dL, ή λειτουργική. Έχουν αναφερθεί πρόσφατα ότι οι μη ανταποκριθέντες ασθενείς στη θεραπεία με rhEPO παρουσιάζουν μια ήπια έως μέτριας βαρύτητας αναιμία, ακόμη και με τη χορήγηση υψηλότερων δόσεων rhEPO [(Costa, 2008δ)](#Costa89). Αυτή η αναιμία είναι υπόχρωμη (μειωμένη μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης και η μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης), και παρουσιάζεται με πιο έντονη ανισοκυττάρωση από ό,τι σε ασθενείς που ανταποκρίνονται καλά στη θεραπεία με rhEPO. Οι αιματολογικές μεταβολές στους μη αποκρινόμενους ασθενείς φαίνεται να αντανακλούν μια «λειτουργική» έλλειψη σιδήρου, αν και παρουσίασαν επαρκή αποθέματα σιδήρου, όπως ορίζεται με συμβατικά κριτήρια, και μια φαινομενική αδυναμία να κινητοποιήσουν το σίδηρο που χρειάζονται για την επαρκή υποστήριξη της ερυθροποίησης.

Στην πραγματικότητα, δεν είναι στατιστικά σημαντικές οι διαφορές του σιδηρού που βρέθηκαν στον ορό μεταξύ των ασθενών που ανταποκρίθηκαν και στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς, εκτός από το διαλυτό υποδοχέα τρανσφερρίνης (s-TfR), το οποίο ήταν σημαντικά υψηλότερο στους μη αποκρινόμενους ασθενείς. Τα επίπεδα αυτού του διαλυτού υποδοχέα μπορεί να αυξηθούν είτε σε περίπτωση αυξημένης ερυθροποιητικής δραστηριότητας είτε σε περίπτωση ανεπάρκειας σιδήρου (Atanasio, 2006). Παρατηρήθηκε σε ασθενείς υπο αιμοδιάλυση μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του s-TfR και της εβδομαδιαιάς δόσης της rhEPO/Kg, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο s-TfR είναι ένας δείκτης ερυθροποιητικού ερεθίσματος της διαχειριζόμενης rhEPO, και όχι ένας δείκτης της ανεπάρκειας σιδήρου του οργανισμού. Επιπλέον, δεν βρέθηκαν διαφορές για τον κορεσμό τρανσφερίνης, μεταξύ ανταποκριθέντων στη θεραπεία με rhEPO και μη, με εξαίρεση, ως εκ τούτου, την ανεπάρκεια σιδήρου ως την κύρια αιτία της αυξημένης s-TfR που βρέθηκε στους μη ανταποκριθέντες στη θεραπεία με rhEPO.

Αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ CRP και μέσου όγκου ερυθροκυττάρων, μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης, συγκέντρωσης σιδήρου στον ορό και κορεσμού τρανσφερίνης βρέθηκαν επίσης σε ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν, υποδηλώνοντας ότι η ανεπάρκεια σιδήρου μπορεί να σχετίζεται με την αυξημένη χρόνια φλεγμονή που βρέθηκε σε αυτούς τους ασθενείς. Στην πραγματικότητα, όπως προαναφέρθηκε προηγουμένως, η εψιδίνη μπορεί να κατέχει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην "αναιμία της φλεγμονής" περιορίζοντας τη διαθεσιμότητα του σιδήρου για την ερυθροποίηση και με αυτόν τον τρόπο, παρέχει μια άμεση σχέση μεταξύ της φλεγμονής και του μεταβολισμού του σιδήρου. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ασθενείς που υφίστανται αιμοκάθαρση, παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ορού προεψιδίνης και εψιδίνης [(Costa, 2008d)](#Costa89). Καθώς οι μη ανταποκρινόμενοι ασθενείς παρουσιάζουν υψηλούς φλεγμονώδεις δείκτες, θα αναμενόταν ότι τα επίπεδα της προεψιδίνης και της εψιδίνης ορού να αυξάνονταν στους μη αποκρινόμενους ασθενείς. Ωστόσο, σε μελέτες βρέθηκαν ότι οι μη ανταποκρινόμενοι ασθενείς στη θεραπεία με rhEPO παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα προεψιδίνης και μια τάση να μειώνουν τα επίπεδα της εψιδίνης, σε σύγκριση με τους ασθενείς που ανταποκρίνονταν. Τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να προκύψουν από την ρύθμιση της έκφρασης της εψιδίνης του ήπατος που προκαλείται από υψηλές δόσεις της rhEPO, ενεργώντας ως εκ τούτου και ως ανασταλτική ορμόνη της εψιδίνης. Δεδομένου ότι η μη-ανταποκρινόμενοι ασθενείς έλαβαν θεραπεία με πολύ υψηλότερες δόσεις της rhEPO, σε σχέση με τους ανταποκριθέντες, το χαμηλό επίπεδο προεψιδίνης και εψιδίνης μεταξύ των μη-ανταποκρινόμενων θα μπορούσε να εξηγηθεί από αυτή την ανασταλτική δράση της rhEPO. Τα δεδομένα που μελετήθηκαν, υποδηλώνουν ότι τα επίπεδα εψιδίνης ορού εξαρτώνται από το βαθμό του φλεγμονώδους ερεθίσματος και των θεραπευτικών δόσεων της rhEPO. Επιπλέον, η χρήση υψηλής δόσης της rhEPO, μπορεί να προκαλέσει αυξημένη χρήση του σιδήρου από τον μυελό των οστών, που μπορεί να οδηγήσει σε εξάντληση των αποθεμάτων σιδήρου και σε μία μείωση στη διαθεσιμότητα του σιδήρου για τα ερυθροκύτταρα, που με τη σειρά του θα προκαλέσει μια μείωση στα επίπεδα προεψιδίνης και εψιδίνης, προκειμένου να ευνοηθεί η απορρόφηση του σιδήρου (Costa, 2008d; [Costa, 2009).](#Costa09)

Υπάρχουν μια στενή αλληλεπίδραση μεταξύ φλεγμονής, κατάστασης του σιδήρου και επιπέδων εψιδίνης στον ορό, η οποία, εν τέλει, ρυθμίζει την ενδοκυτταρική απορρόφηση του σιδήρου και την διαθεσιμότητα του. Είναι επίσης αποδεκτό ότι η εψιδίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναιμία των ασθενών που κάνουν αιμοκάθαρση. Ωστόσο, είναι χρήσιμος ως ένας δείκτης της αντοχής στη θεραπεία rhEPO, λαμβάνοντας υπόψιν την διαφορά των επιπέδων εψιδίνης μεταξύ ανταποκριθέντων και μη ασθενών, καθώς και τις διάφορες επιρροές και τις διασυνδέσεις με άλλες ουσίες. Σαφώς, απαιτείται περισσότερη δουλειά για μια καλύτερη κατανόηση σχετικά με το ρόλο του μεταβολισμού του σιδήρου στην ανάπτυξη της αντίστασης στην θεραπεία με rhEPO και την παροχή χρήσιμων θεραπευτικών βιοδεικτών της αντίστασης.

Η πρόσληψη του σιδήρου που βρίσκεται στο πλάσμα, από τα ερυθροκύτταρα ρυθμίζεται από διαφορετικές πρωτεΐνες, όπως, τον υποδοχέα της τρανσφερίνης, τις πρωτεϊνες αιμοχρωμάτωσης (HFE) και την DMT1 (NRAMP2/DCT1). Έρευνες έχουν δείξει, ότι οι αλλαγές στο γονίδιο του υποδοχέα της τρανσφερίνης σχετίζονται με την HFE και οι μεταλλάξεις των γονιδίων της HFE σχετίζονται με τη μείωση του ποσού της rhEPO που είναι απαραίτητη για την υποστήριξη της ερυθροποίησης σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση (Valenti, 2008).

**Α.2.4 Οξειδωτικό στρες**

Το οξειδωτικό στρες και οι συναφείς βιολογικές επιδράσεις του έχουν παθολογική σημασία σε πολλές ασθένειες. Το οξειδωτικό στρες έχει οριστεί ως μια ισορροπία μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών, με αποτέλεσμα μια συνολική αύξηση στα κυτταρικά επίπεδα των ROS. Μπορεί να παραχθεί και από ενδογενείς και από εξωγενείς πηγές. Πιθανές ενδογενείς πηγές των ROS περιλαμβάνουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση, τον μεταβολισμό Ρ450 και την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων. Στις καταστάσεις που μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες περιλαμβάνονται: αυξημένα επίπεδα μετάλλων μετάπτωσης ή των δραστικών μορφών τους, εξάντληση της μη ενζυμικής αντιοξειδωτικής άμυνας λόγω διατρογικής ανεπάρκειας ή υπερβολικής κατανάλωσης αντιοξειδωτικών μεταβολισμός φαρμάκων, φλεγμονές που προκαλούνται απο διάφορες ασθένειες και τέλος η αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ελεύθερες ρίζες-μη ελεύθερες ρίζες) από ενεργοποίηση συγκεκριμένων ομάδων κυττάρων.

Η θεωρία των ελευθέρων ριζών διατυπώθηκε για πρώτη φορά το 1954 ισχυριζόμενη πως η διάρκεια ζωής ενός οργανισμού μπορεί να αυξηθεί, εάν μειωθεί ο ρυθμός έναρξης τυχαίων αντιδράσεων ελευθέρων ριζών. Ελεύθερη ρίζα ονομάζεται κάθε άτομο ή μόριο με ένα η περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα. Ελεύθερες ρίζες μπορούν να προέλθουν είτε απο αντιδράσεις οξειδοαναγωγής είτε από την διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού τα ηλεκτρόνια του οποίου, μετά απο την αντίδραση μοιράζονται από ένα σε κάθε ομάδα. Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει εξαιρετικά αποτελεσματικούς αμυντικούς μηχανισμούς ικανούς να ανταποκριθούν σε τυχόν αυξημένο οξειδωτικό στρες. Σε περίπτωση όπου αυτοί οι αμυντικοί μηχανισμοί υπερνικηθούν από τις ελεύθερες ρίζες, ανατρέπεται η προοξειδωτική/αντιοξειδωτική ισορροπία με την επικράτηση του πρώτου σκέλους και κατά συνέπεια την αύξηση του οξειδωτικού στρες με καταστροφικά για το κύτταρο αποτελέσματα.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν τόπο παραγωγής ελευθέρων ριζών. Πιο συγκεκριμένα στη διπλή στοιχειώδη μεμβράνη τους παράγονται ελεύθερες ρίζες οι οποίες μπορεί να έχουν καταστροφικές επιπτώσεις για τα κύτταρα και τα συστήματα του οργανισμού όπως το νευρικό και το ανοσοποιητικό. Παρόλα αυτά δεν υπάρχει ακόμη μέθοδος προσδιορισμού του ακριβούς ρόλου τους στην διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών –αντιοξειδωτικών συστημάτων.

Σε αντίθεση με τα μιτοχόνδρια έχει διερευνηθεί ο ρόλος των φαγοκυττάρων στη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Φαίνεται από έρευνες ότι αποτελούν έναν απο τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν την κυτταρική ισορροπία οξειδωτικών και προ-οξειδωτικών ιδιαίτερα σε καταστάσεις όπου η αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού έχει υποχωρήσει.

Κατόπιν έκθεσης σε διεγερτικούς παράγοντες στα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα κύτταρα και στα μακροφάγα παρατηρούνται αλλαγές οι οποίες οδηγούν στην ταχεία παραγώγη ελευθέρων ριζών. Μετά το σχηματισμό του το Ο2 μετατρέπεται σε Η2Ο2. Τόσο το Ο2 όσο και το Η2Ο2 δεν είναι επικύνδυνα για το κύτταρο, αλλά χρησιμοποιούνται από τα φαγοκύτταρα με αποτέλεσμα την παραγωγή πολύ ισχυρών οξειδωτικών τα οποία με την σειρά τους μπορεί να προκαλέσουν οξείδωση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών, αποικοδόμηση πρωτεϊνών και καταστροφή μορίων DNA.

Κατά τη διάρκεια του μιτοχονδριακού οξειδωτικού μεταβολισμού, η πλειονότητα του οξυγόνου που καταναλώνεται μειώνεται σε νερό. Ωστόσο, εκτιμάται ότι το 4% έως 5% του μοριακού οξυγόνου μετατρέπεται σε ROS, κυρίως ανιόντα υπεροξειδίου, που σχηματίζονται από μια αρχική αναγωγή ενός ηλεκτρονίου από το μοριακό οξυγόνο. Το υπεροξείδιο μπορεί να οξειδωθεί από την δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) για να αποδώσει υπεροξείδιο του υδρογόνου, λιγότερο αντιδραστικό και με μικρότερη ισχύ οξειδωτικού. Υπό την παρουσία μερικώς ελαττωμένων μεταλλικών ιόντων, και συγκεκριμένα του σιδήρου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου στη συνέχεια μετατρέπεται μέσω Fenton και Haber-Weiss αντιδράσεων σε μια ρίζα υδροξυλίου. Η ρίζα υδροξυλίου είναι εξαιρετικά αντιδραστική και μπορεί να αλληλεπιδράσει με νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια, και πρωτεΐνες [(Barber, 1994).](#Barber)

Τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα είναι μια επιπρόσθετη ενδογενή πηγή και είναι σημαντικοί παράγοντες για τα κυτταρικά ROS. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μακροφάγα, μέσω της αναπνευστικής οδού, προκαλούν μια ταχεία αλλά παροδική αύξηση στην πρόσληψη οξυγόνου που δίνει αφορμή για μια ποικιλία των ROS, συμπεριλαμβανομένου του ανιόντος υπεροξειδίου, του υπεροξειδίου του υδρογόνου, και του οξειδίου του αζώτου. Υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες, τα κύτταρα είναι ικανά να αντισταθμίσουν την παραγωγή των ROS με τα αντιοξειδωτικά. Ενδογενείς κυτταρικές αντιοξειδωτικές άμυνες είναι κυρίως ενζυματικές και περιλαμβάνουν την SOD, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και την καταλάση. Μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη Ε, η βιταμίνη C, το β-καροτένιο, η γλουταθειόνη, και το συνένζυμο Q στοχεύουν στο να μειώσουν τα ROS [(Vuillaume, 1987).](#Vuillaume) Όταν η ισορροπία οξειδοαναγωγής μετατοπίζεται υπέρ των οξειδωτικών των κυττάρων, η οξειδωτική βλάβη σε νουκλεϊνικά οξέα, λιπίδια, ή πρωτεΐνες μπορεί να οδηγήσει σε τροποποιήσεις στη λειτουργία των κυττάρων και την κυτταρική βιωσιμότητα.

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι τα ROS εμπλέκονται στην εξέλιξη της νεφρικής βλάβης και των ουραιμικών συμπτωμάτων. Το οξειδωτικό στρες φαίνεται να είναι πολυπαραγοντικό και πιστεύεται ότι προκαλείται μόνο εν μέρει από τη μειωμένη νεφρική λειτουργία (Sommerburg, 1998; [Spittle, 2001)](#SpittleMA). Οι διάφοροι παράγοντες που έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη του οξειδωτικού στρες σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, περιλαμβάνουν τη διαδικασία αιμοκάθαρσης, την ουραιμία, την φλεγμονή, διαταραχές στην ομοιόσταση του σιδήρου, και την μείωση των αντιοξειδωτικών συστημάτων άμυνας.

**Α.2.4.1 Οξειδωτικό στρές και αντιοξειδωτικά συστήματα σε νεφροπαθείς τελικού σταδίου**

Οι ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση βρίσκονται σε μια κατάσταση χρόνιας φλεγμονής και δείκτες όπως η C αντιδρώσα πρωτεϊνη εμφανίζουν πολύ αυξημένη τιμή (>10mg/L) σε ποσοστό περίπου 32% στο σύνολο των ασθενών. Η παρουσία χρόνιας φλεγμονής σε συνδυασμό με την αυξανόμενη παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορεί να οδηγήσουν σε αθηροσκλήρωση και σε αντίσταση στη δράση της ερυθροποιητίνης. Στοιχεία από πρόσφατες μελέτες δείχνουν υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών σε νεφροπαθείς τελικού σταδίου οι οποίοι υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, που φαίνεται να οφείλεται και στη χρόνια φλεγμονή αλλά και στη διαδικασία της αιμοκάθαρσης.

Σε νεφροπαθείς τελικού σταδίου η ισορροπία μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών συστημάτων διαταράσσεται με αποτέλεσμα την αύξηση του οξειδωτικού στρες. Ελλείψεις στα αντιοξειδωτικά συστήματα έχουν παρατηρηθεί, συμπεριλαμβανομένων των μειωμένων επιπέδων της βιταμίνης C λόγω περιορισμού της πρόσληψης φρούτων και λαχανικών καθώς και της μεγάλης απώλειας της βιταμίνης κατά την διάρκεια της αιμοκάθαρσης, των μειωμένων επιπέδων ενδοκυτταρικής βιταμίνης E, των μειωμένων επιπέδων σεληνίου και της ανεπαρκής λειτουργίας της GSH. Πιο συγκεκριμένα η αντιοξειδωτική ικανότητα του συστήματος της γλουταθειόνης φαίνεται να μειώνεται κατά τα πρώτα στάδια έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας ενώ σε ουραιμικούς και ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιάλυση η δράση της είναι πολύ περιορισμένη. Ταυτόχρονα με την εξασθένιση των αμυντικών μηχανισμών αυξάνεται η παραγωγή των προοξειδωτικών. Η αύξηση αυτή σχετίζεται με χαρακτηριστικά των νεφροπαθών όπως η μεγάλη ηλικία, η ύπαρξη διαβήτη, η χρόνια φλεγμονή και η ουραιμία.

Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης που υποβάλλονται οι ασθενείς αυτοί φαίνεται να προκαλεί συνεχόμενα επεισόδια οξειδωτικού στρες κυρίως μέσω των μεμβρανών που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία. Τα ουδετερόφιλα και τα φαγοκύτταρα αποτελούν τις κύριες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης. Η διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ξεκινάει απο τα πρώτα στάδια της έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας, αλλά φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αυξημένη στους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Στους ασθενείς αυτούς συχνά παρατηρούνται αυξημένες τιμές των δεικτών οξειδωτικού στρες και κατακόρυφη αύξηση της συγκέντρωσης ελευθέρων ριζών κατά την έναρξη της αιμοκάθαρσης. Τα επίπεδα στο αίμα προϊόντων οξείδωσης πρωτεϊνών και λιπών είναι πολύ αυξημένα, ενώ η συχνά παρατηρούμενη αιμόλυση αντανακλά καταστροφές στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων που οφείλεται στη δράση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου ή ROS ([Παπακωνσταντίνου, 2007)](#Παπακωνσταντίνου).

Μια μελέτη σχεδιάστηκε για να αξιολογήσει την οξειδωτική κατάσταση στρες των ερυθροκυττάρων και τη σχέση της με την κυτταρική υπερδομή και τις τροποποιήσεις της μεμβράνης σε ασθενείς με νεφρική νόσο τελικού σταδίου (ESRD) που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση (HD). Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν οι τροποποιήσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) σε δώδεκα μη-διαβητικούς ασθενείς ESRD που αποκρίνονταν στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη. Τα επίπεδα των ενδοκυτταρικών ROS μετρήθηκαν με φθορισμομετρία, η δομή των RBCs εξετάστηκε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ενώ η μεμβράνη πρωτεώματος με ηλεκτροφόρηση και ανοσοκηλίδωση. Σε σύγκριση με τα υγιή κοντρόλς, τα ουραιμικά ερυθροκύτταρα εμφάνισαν σημαντικά αυξημένη συσσώρευση των ROS. Η αιμοκάθαρση βελτίωσε εν μέρει τα βασικά επίπεδα των ROS, αλλά πυροδότησε την κυτταρική ευαισθησία στα εξωγενή οξειδωτικά ερεθίσματα. Η αφαίρεση των ουραιμικών τοξινών έχει ως αποτέλεσμα μια βελτιωτική δράση στη ακεραιότητα της μεμβράνικής δομής η οποία όταν συνδυάζεται με την ομαλοποίηση της ωσμοτικότητας του ορού υποδηλώνει την βελτιωμένη ωσμωτική ευθραυστότητα μετά την αιμοδιάλυση. Κοινές τροποποιήσεις στη μεμβράνη περιελάμβαναν, απώλεια, συνάθροιση, κατακερματισμό και καρβονυλίωση των κρίσιμων στοιχείων καθώς και υπερέκφραση των δεικτών στρες. Αυτές οι αλλαγές ειναι ενδεικτικές της κυτταρικής γήρανσης. Η αιμοδιάλυση (HD) συνέβαλε σημαντικά στην αναδιαμόρφωση του πρωτεώματος της μεμβράνης, ειδικά για την ακουαπορίνη-1, την peroxiredoxin-2 και ουβικουιτινωμένες πρωτεΐνες. Η ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση και οι στενά συνδεδεμένες τροποποιήσεις της μεμβράνης φάνηκε να σχετίζονται με την αστάθεια της μεμβράνης, την απώλεια της επιφάνειας μέσω κυστιδοποίησης, εχινοκύττωσης και στοματοκυττάρωσης. Τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ουραιμικών τοξινών, της σύνθεσης της μεμβράνης των RBCs και τις κυτταρικές τροποποιήσεις στο σχήμα των RBCs στους ESRD, που αναπτύσσεται γύρω από πολλαπλές προκλήσεις του οξειδωτικού στρες και των κυτταρικών αποκρίσεων. (Αntonelou [et](#Antonelou12) al, 2011)

**Α.2.5 Δομή ερυθροκυτταρικής μεμβράνης**

Η μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι ένα σύμπλοκο με περίπλοκη δομή που περιλαμβάνει μια λιπιδική διπλοστοιβάδα, διαμεμβρανικές ή ενσωματωμένες πρωτεΐνες, και περιφερικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού. Η διπλοστοιβάδα λιπιδίων αποτελεί το 40%, οι μεμβρανικές πρωτεϊνες το 52% και οι υδατάνθρακες το 8 %.

Διαμεμβρανικές πρωτεϊνες

* Ζώνη 3
* γλυκοφορίνη
* ακουαπορίνη

Περιφερειακές μεμβρανικές πρωτεϊνες

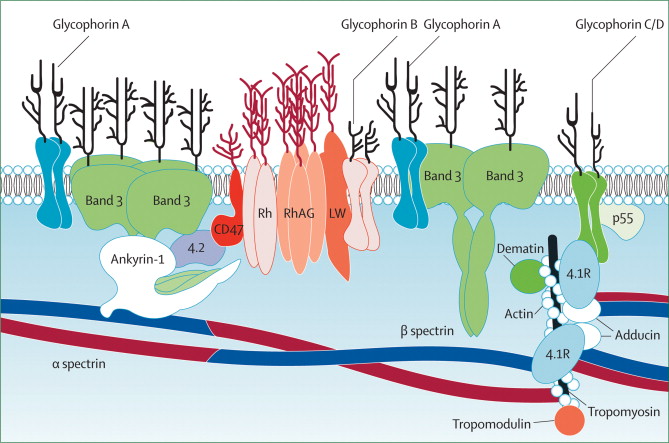
• σπεκτρίνη

• ακτίνη

• Πρωτεΐνη 4.1

• ζώνη 4.2

• αγκυρίνη



Εικόνα 12: Δομή ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

**Ανατύπωση από: Perrotta, 2008** http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(08)61588-3/fulltext#article\_upsell

Οι τροποποιήσεις στη σύνθεση της πρωτεϊνικής μεμβράνης των RBCs μπορεί να ευθύνεται για αλλαγές στην παραμορφωσιμότητα του κυττάρου, θέτοντας σε κίνδυνο την κυκλοφορία του και την επιβίωσή του. Η σπεκτρίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού (55-70%), και ως εκ τούτου, περισσότερο υπεύθυνη για το σχήμα των RBCs, την ακεραιότητα και την παραμόρφωση τους. Συνδέει τον κυτταρικό σκελετό με την λιπιδική διπλοστοιβάδα μέσω κάθετων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, την ζώνη 3 και την γλυκοφορίνη C. Στην κάθετη πρωτεϊνική αλληλεπίδραση της σπεκτρίνης με τη ζώνη 3 εμπλέκεται επίσης η αγκυρίνη (επίσης γνωστή ως ζώνη 2,1) και η πρωτεΐνη 4.2. Μια κανονική σύνδεση σπεκτρίνης με τις άλλες πρωτεΐνες της κυτταροσκελετού εξασφαλίζει ομαλές οριζόντιες αλληλεπιδράσεις και η σύνδεση τους με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες εξασφαλίζει κανονικές κάθετες αλληλεπιδράσεις [(Παπακωνσταντίνου, 2007)](#Παπακωνσταντίνου).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε για να αξιολογήσει την επίδραση της διαδικασίας της αιμοκάθαρσης στην σύνθεση των πρωτεϊνών της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) πριν και μετά την αιμοκάθαρση βρέθηκε πως πριν την αιμοδιάλυση, οι ασθενείς παρουσίαζαν αναιμία και πολύ σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση πρωτεϊνών της μεμβράνης, και συγκεκριμένα μια στατιστικώς σημαντική μείωση της σπεκτρίνης που σχετίζεται με μια σημαντική αύξηση στη ζώνη 6, καθώς και μεταβαλλόμενες μεμβρανικές πρωτεϊνες που αλληλεπιδρούν (πρωτεΐνη 4.1/σπεκτρίνη, πρωτεΐνη 4.1/ζώνη 3, πρωτεΐνη 4.2/ζώνη 3 και σπεκτρίνης/ζώνη 3). Μετά από την αιμοδιάλυση, βρέθηκε ότι οι ασθενείς έδειξαν μια στατιστικά σημαντική αύξηση των RBCs και της αιμοσφαιρίνης, καθώς και μια περαιτέρω στατιστικά σημαντική μείωση σπεκτρίνης, μια αύξηση στη ζώνη 3, και μια μεταβαλλόμενη αναλογία σπεκτρίνης/ζώνη 3. Βρέθηκε ότι οι ασθενείς που δεν ανταποκρίνονταν στην αυξημένη δόση της ερυθροποιητίνης σε σχέση με αυτούς που ανταποκρίνονταν είχαν μια τάση αυξημένης μείωσης της σπεκτρίνης. Αυτή η μείωση στη σπεκτρίνη αποδίδεται στην διαδικασία της αιμοδιάλυσης. Αυτή η ανεπάρκεια σπεκτρίνης μπορεί να οφείλεται σε μια φτωχή σύνδεση του κυτταροσκελετού με την μεμβράνη, ευνοώντας την κυστιδιοποίηση της μεμβράνης και πιθανώς τη μείωση της διάρκειας ζωής των RBCs των ασθενών υπό αιμοκάθαρση. Απο την έρευνα αυτή διαπιστώθηκε επίσης ότι οι μη-ανταποκρινόμενοι ασθενείς στην θεραπεία με ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη (rhEPO) που λάμβαναν υψηλές δόσεις rhEPO σε σύγκριση με τους ασθενείς που ανταποκρίνονταν, παρουσιάσαν μια τάση χαμηλότερων τιμών σπεκτρίνης και μια σημαντική αύξηση στην αγκυρίνη η οποία οδήγησε σε σημαντικές διαταραχές στις οριζόντιες και κάθετες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις [(Costa E et al 2008 a,b,c).](#Costa08) Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η διαδικασία αιμοκάθαρσης φαίνεται να συμβάλει στη μείωση της σπεκτρίνης, η οποία συνδέεται με μια μείωση στη παραμορφωσιμότητα των RBCs, όντας αυτή η μείωση σε σπεκτρίνη να είναι υψηλότερη στους μη ανταποκριθέντες ασθενείς

**Α.2.6 Kαταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων**

Το ερυθροκύτταρο, παρουσιάζοντας μια περιορισμένη ικανότητα βιοσύνθεσης, συσσωρεύει φυσικές ή και χημικές αλλαγές, οι οποίες γίνονται πιο έντονες με την γήρανση των κυττάρων και με κάθε ασυνήθιστη φυσική ή χημική διεργασία που αναπτύσσεται.

Η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων έχει μια σύνθετη δομή. Τα ερυθροκύτταρα επηρεάζονται φυσικά κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της αιμοκάθαρσης, αλλά και μεταβολικά από το δυσμενές πλαστικό και μη φυσικό τους περιβάλλον, λόγω της συσσώρευσης των μεταβολιτών, και από τον υψηλό ρυθμό αυτοοξείδωσης της αιμοσφαιρίνης, λόγω της αύξησης του κύκλου εργασιών της αιμοσφαιρίνης, που αποτελεί ένα φυσιολογικό μηχανισμό αντιστάθμισης που ενεργοποιείται σε περίπτωση αναιμίας [(Lucchi, 2000).](#Lucchi) Τα ερυθροκύτταρα συνεπώς, έρχονται συνεχώς αντιμέτωπα με την πρόκληση να διατηρήσουν την αιμοσφαιρίνη στη μειωμένη λειτουργική μορφή της, καθώς επίσης και να διατηρηθεί η ακεραιότητα και η παραμορφωσιμότητα της μεμβράνης.

Όταν η αιμοσφαιρίνη βρίσκεται εκτός τους φυσικού της περιβάλλοντος, αυτό οδηγεί στη σύνδεση της κυτταροπλασματικής περιοχής της ζώνης 3, προκαλώντας τη συσσωμάτωση του και οδηγώντας στο σχηματισμό των λιπιδικών τμημάτων της μεμβράνης, που συνδέονται ελαφρώς με τον κυτταροσκελετό. Αυτά τα κύτταρα είναι πιθανώς πιο επιρρεπή στο να υποστούν κυστιδιοποίηση (απώλεια των ελαφρώς συνδεδεμένων προϊόντων με τα τμήματα της μεμβράνης) κάθε φορά που πρέπει να κυκλοφορούν μέσα από τις μεμβράνες της αιμοκάθαρσης ή την κυκλοφορία. Η κυστιδοποίηση μπορεί επομένως, να επιφέρει τροποποιήσεις στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων των ασθενών με ΧΝΑ υπό αιμοκάθαρση [(Gallagher, 2005).](#Gallagher)

Τα ερυθροκύτταρα που αναπτύσσουν ενδοκυτταρικά ελαττώματα νωρίτερα κατά τη διάρκεια της ζωής τους, αφαιρούνται πρόωρα από την κυκλοφορία. Η απομάκρυνση των γηρασμένων ή κατεστραμμένων ερυθροκυττάρων φαίνεται να περιλαμβάνει την ανάπτυξη ενός γηρασμένου νεοαντιγόνου στην επιφάνεια της μεμβράνης του πλάσματος, σημαίνοντας το κύτταρο για κυτταρικό θάνατο. Αυτό το νεοαντιγόνο σχετίζεται ανοσολογικά με την ζώνη 3 [(Kay, 1994).](#Kay) Η επιδείνωση του μεταβολισμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων και οι αντιοξειδωτικές άμυνες του, μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη του οξειδωτικού στρες μέσα στο κύτταρο, επιτρέποντας την οξείδωση και τη σύνδεση της αιμοσφαιρίνης στην κυτταροπλασματική περιοχή της ζώνης 3, προωθώντας την συσσωμάτωση της, την πρόσδεση των φυσικών αυτοαντισωμάτων της ζώνης 3 με τα αυτοαντισώματα και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, σημαίνοντας τα ερυθροκύτταρα για κυτταρικό θάνατο.

Ένα ανώμαλο πρότυπο στην ζώνη 3 [η συσσωμάτωση υψηλού μοριακού βάρους (HMWAg), η μονομερή ζώνη 3 και τα πρωτεολυτικά θραύσματα (pFRAG)], έχει συσχετιστεί με τα νεότερα, κατεστραμμένα και γηρασμένα ερυθροκύτταρα. Τα παλαιότερα και τα κατεστραμμένα ερυθρά αιμοσφαίρια εμφανίζουν υψηλότερα HMWAg και χαμηλότερα pFRAG. Τα νεότερα ερυθροκύτταρα εμφανίζουν μειωμένη HMWAg και υψηλότερο pFRAG [(Santos-Silva, 1998).](#Santos) Επιπλέον, διάφορες ασθένειες, γνωστές ως φλεγμονώδεις καταστάσεις, παρουσίασαν ανώμαλο προφίλ στη ζώνη 3, αποδίδοντας το στην ανάπτυξη του οξειδωτικού στρες.

Βρέθηκαν επίσης κάποιες αλλαγές στη δομή των πρωτεϊνών της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων των αιμοκαθαιρούμενων ασθενών χρησιμοποιώντας υψηλής ροής πολυσουλφονική μεμβράνη αιμοκάθαρσης FX-τάξης της Fresenius, με σημαντικότερη αλλαγή, την μείωση της σπεκτρίνης. Αυτή η μείωση στην σπεκτρίνης μπορεί να ευθύνεται στη φτωχή σύνδεση των κυτταροσκελετού με την μεμβράνη, ευνοώντας την κυστιδιοποίηση της μεμβράνης, και επακολούθως, την μείωση της διάρκειας ζωής των ερυθροκυττάρων αυτών των ασθενών. Παρατηρήθκαν επίσης σημαντικές αυξήσεις στις πρωτεΐνες στις ζώνες 6 και 7, οι οποίες μπορεί να αντανακλούν κι αλλες μεταβολές στην αληλλεπίδραση των πρωτεϊνών της μεμβράνης και την αποσταθεροποίηση της δομής της μεμβράνης. Αυτή η αποσταθεροποίηση της μεμβράνης ενισχύεται περαιτέρω από τις σημαντικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην αναλογία σπεκτρίνης/ζώνη 3. Στους μη ανταποκριθέντες με rhEPO θεραπεία ασθενείς οι αλλαγές αυτές, ήταν πιο έντονες από ό,τι στους ασθενείς που ανταποκρίνονταν, παρουσιάζοντας μια τάση για χαμηλότερες τιμές της σπεκτρίνης και σημαντικά χαμηλότερες τιμές στις αναλογίες ανκυρίνη/ζώνη 3 και σπεκτρίνη/ανκυρίνη [(Costa, 2008).](#Costa08) Αυτές οι μεταβολές μπορεί να οφείλονται στην υψηλή καταπόνηση του ερυθροκυττάρου ή σε αλλαγές που προκύπτουν από τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης.

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προκαλεί αναιμία και μια σύντομη διάρκεια ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η ωσμωτική ευθραυστότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η αντίσταση των RBC στην αιμόλυση σε ωσμωτικές αλλαγές που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ευθρυπτότητας αυτών. Για να βρεθεί η αιτία της σύντομης επιβίωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ουραιμικούς ασθενείς, έγινε αξιολόγηση της ωσμωτικής ευθραυστότητας των RBCs σε 57 ασθενείς που κάνουν χρόνια αιμοκάθαρση. Κάθε ασθενής από αυτούς έκανε 12 ώρες αιμοκάθαρση ανά εβδομάδα συνεχώς πριν την πραγματοποίηση της μελέτης. Ως κοντρόλς χρησιμοποιήθηκαν δεκαεννέα υγιείς εθελοντές. Οι παράμετροι που εξεταστηκαν πριν και μετα τη συνεδρία αιμοκάθαρσης ήταν βιοχημικές εξετάσεις, η αιμοσφαιρίνη, οι ηλεκτρολύτες, η ωσμωτικότητα, η β2-μικροσφαιρίνη, και μια παραθυρεοειδής ορμόνη. Για να αξιολογήσουμε την ωσμωτική ευθραυστότητα των RBC, τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με ηπαρίνη. Η συγκέντρωση του ΝaCl στην οποία λύθηκαν 50% των RBCs θεωρήθηκε η διάμεση ωσμωτική ευθραυστότητα (Μean osmotic fragility, MOF). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η MOF ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε ασθενείς πριν την αιμοδιάλυση απ’ ό,τι στην ομάδα με τα κοντρόλς (0,41 +/- 0,03 έναντι 0.39 +/- 0,02%). Η ωσμωτική αντίσταση στην αιμόλυση καταγράφηκε επίσης και μετά την αιμοκάθαρση (MOF 0.38 +/- 0,03%). Άλλες παρόμοιες μελέτε έδειξαν ότι η μέση ωσμωτική ευθραυστότητα συσχετίστηκε σημαντικά με το άζωτο ουρίας, την ωσμωτικότητα του ορού, και την παραθυρεοειδούς ορμόνη. Επιπλέον, η ωσμωτική ευθραυστότητα ήταν υψηλότερη σε ασθενείς οι οποίοι είχαν την παραθυρεοειδούς ορμόνη σε επίπεδο>100 pg/dl πριν κάνουν αιμοκάθαρση. Το πόρισμα της μέλετης αυτής είναι ότι, η αιμοκάθαρση μπορεί να βελτιώσει την ωσμωτική ευθραυστότητα. Ο μηχανισμός που υπογραμμίζει τη βελτίωση αυτή μπορεί να είναι η απομάκρυνση των χαμηλού μοριακού βάρους των ουραιμικών τοξινών, καταλήγοντας σε ομαλοποίηση της ωσμωτικότητας του ορού. Τα αποτελέσματά αυτά δείχνουν επίσης ότι η παραθυρεοειδής ορμόνη είναι πιθανώς ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ωσμωτική ευθραυστότητα RBC σε κατάσταση χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. ([Wu](#Wu) et al, 1998)

**Α.2.7 Δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός**

Ο δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός παράλληλα με την ΧΝΑ επιδεινώνεται με τη σοβαρότητά της. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ανεπάρκεια της 1-25 VitD3 καθώς και σε αυξημένα ανόργανα επίπεδα φωσφορικών στον ορό και τα δύο εκ των οποίων διεγείρουν την υπερπλασία του παραθυρεοειδούς και αυξάνουν την σύνθεση της παραθυρεοειδούς ορμόνης, μια διαδικασία που ονομάζεται δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός. Ο δευτεροπαθης υπερπαραθυρεοειδισμός αυξάνει τον κύκλο εργασιών των οστών, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη των κύστεων των οστών και ίνωση του μυελού, αλλοιώνοντας τη λειτουργία του μυελού των οστών και στη συνέχεια αναιμία [(Hayat et al, 2008).](#Hayat) Ο δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός, εάν δεν παρακολουθείται, μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση στην ερυθροποιητίνη. Ως εκ τούτου, ο δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός, πρέπει να ελέγχεται τακτικά και να αντιμετωπίζονται σε ασθενείς με ΧΝΑ.

**Α.2.8 Διαδικασία αιμοκάθαρσης και αντίκτυπος στη μεμβράνη των RBCs**

Σε μία έρευνα εξετάστηκε η επίδραση της αιμοκάθαρσης στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων τόσο σε ορισμένους ασθενείς όσο και σε υγιή κοντρόλς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, οι ασθενείς είχαν χαμηλότερες τιμές παραμορφωσικότητας των ερυθροκυττάρων από εκείνη των υγιών κοντρόλς. Η διάμεση ωσμωτική ευθραυστότητα παρουσίασε σημαντική αύξηση στους ασθενείς που κάνουν αιμοκάθαρση από ότι η ομάδα με τα κοντρόλς. Η ωσμωτική αντίσταση στην αιμόλυση βελτιώθηκε μετά την αιμοκάθαρση. Η διαδικασία διαλυτοποίησης της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων έδειξε ότι η συγκέντρωση του απορρυπαντικού που απαιτείται για τη διαλυτοποίηση της μεμβράνης των RBCs για τους ασθενείς που κάνουν αιμοκάθαρση ήταν πολύ υψηλότερη από εκείνη της ομάδας με τα κοντρόλς. Οι ανωμαλίες των παρόντων αποτελεσμάτων για τις ιδιότητες της μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων σχετίζονται με την ρευστότητα της μεμβράνης, η οποία είναι ελαφρώς βελτιωμένη μετά την αιμοκάθαρση. Μια βιοχημική ανάλυση έδειξε μια πτωτική τάση στα ερυθρά αιμοσφαίρια, στο άζωτο ουρίας, στην κρεατινίνη και το κάλιο μετά την αιμοκάθαρση ([Ibrahim](#Ibrahim), 2002).

Υπάρχει μια διαμάχη σχετικά με την κλινική σημασία της παροχής αιμοκάθαρσης με βιοσυμβατές ή μη βιοσυμβατές μεμβράνες. Εξετάστηκαν τα αποτελέσματα τόσο της οξείας όσο και της χρόνιας αιμοκάθαρσης με μια βιοσυμβατή μεμβράνη (πολυακρυλονιτρίλιο, ΡΑΝ) και μιας μη-βιοσυμβατής μεμβράνης (cuprophane, CU) σχετικά με τις δομικές και λειτουργικές ιδιότητες των ανθρώπινων ερυθροκυττάρων. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν 27 ασθενείς οι οποίοι είχαν αυξημένη ωσμωτική ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων σε σύγκριση με τα κοντρόλς. Η μη συμβατή μεμβράνη CU μείωσε την μέση ωσμωτική ευθραστότητα (% λύση) κατά 13% χωρίς να μεταβάλλεται η χοληστερόλη των κυττάρων. Η συμβατή μεμβράνη (PAN) μείωσε την ωσμωτική ευθραστότηα, με μία σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα (24%) και σχετίστηκε με μείωση 20% της χοληστερόλης του κυττάρου. Η χρόνια χρήση της μεμβράνης PAN για 6 μήνες συνδέθηκε με μια σταθερή μείωση της ωσμωτικής ευθραυστότητας σε σύγκριση με τη χρόνια χρήση της μεμβράνης CU (μέση λύση 16% έναντι 45%). Μια ενιαία χρήση της μεμβράνης CU συσχετίστηκε με μειωμένη περιεκτικότητα της μεμβράνης σε σπεκτρίνη και ζώνης 3 και αυτό ήταν σημαντικά διαφορετικό από τις συνέπειες της μεμβράνης PAN. Μια ενιαία χρήση της μεμβράνης CU ή της μεμβράνης PAN δεν είχε σημαντική δράση στη μειωμένη γλουταθειόνη (GSH), αγκυρίνη, ακτίνη ή δραστηριότητας της αντλίας νατρίου. Η χρόνια χρήση αιμοδιάλυσης συσχετίστηκε με αυξημένη γλουταθειόνη (GSH), και μειωμένη ανγκυρίνη και τη πρετϊνική ζώνη 3 σε σύγκριση με τα κοντρόλς, αλλά τα αποτελέσματα για τη μεμβράνη CU και την PAN δεν ήταν διαφορετικά. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η δομική ακεραιότητα των ερυθροκυττάρων βελτιώνεται με την μεμβράνη PAN σε σχέση με την μεμβράνη CU, αλλά η διαφορά δεν μπορεί εύκολα να αποδοθεί σε δομικές αλλαγές των πρωτεϊνών, την ιοντική ομοιόσταση ή την κατάσταση οξείδωσης ([Martos](#Martos), 1997).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία μελετήθηκαν 858 ασθενείς που έκαναν αιμοδιαδιήθηση (hemodiafiltration, HDF) και ασθενείς που έκαναν αιμοκάθαρση υψηλής ροής (HD) για μια περίοδο 18 χρόνων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι την επικρατέστερη θεραπευτική δράση την είχε η αιμοδιαδιήθηση η οποία συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο θανάτου σε σχέση με την απλή αιμοδιάλυση υψηλής ροής ([Vilar](#Vilar), 2009).

Αν και η αιμοδιαδιήθιση έχει αποδειχτεί ότι παρέχει καλύτερη καρδιαγγειακή σταθερότητα για τους ασθενείς που κάνουν αιμοκάθαρση. Μελετήθηκαν 20 ασθενείς με σταθερή κατάσταση που έκαναν θεραπεία με αιμοδιάλυση και αιμοδιαδιήθηση για μια περίοδο 18 μηνών. Οι παράμετροι της αιμοδιάλυσης (σύνθεση υγρού διάλυσης και της ροής, η διάρκεια, η συσκευή διάλυσης) ήταν η ίδια και στις δύο περιόδους εκτός από την υψηλότερη ανεκτή ροή του αίματος στην HDF. Οι καρδιαγγειακές παράμετροι ήταν αξιοσημείωτα παρόμοια και στις δύο περιόδους θεραπείας, υποδεικνύοντας ότι οι σταθεροί ασθενείς δεν επωφελούνται από αυτήν την περαιτέρω θεραπεία από την άποψη αυτών των παραγόντων. Η κάθαρση της ουρίας βελτιώθηκε σημαντικά με την HDF. Η εκκαθάριση της βήτα 2-μικροσφαιρίνης επίσης βελτιώθηκε σημαντικά με την HDF σε σύγκριση με την HD. Έτσι, το όφελος του HDF σε σταθερούς ασθενείς σε αιμοκάθαρση είναι η βελτίωση της εκκαθάρισης των μικρών μορίων και της β 2-μικροσφαιρίνης, χωρίς αύξηση του χρόνου αιμοκάθαρσης ([Κerr](#Kerr), 1992).

Φαίνεται ότι ο τύπος του φίλτρου αιμοκάθαρσης καθορίζει την οξεία επίδραση της αιμοκάθαρσης στη λειτουργία του ενδοθηλίου και του οξειδωτικού στρες. Η ενδοθηλιακή λειτουργία των μεγάλων αρτηριών είναι μειωμένη σε ασθενείς που βρίσκονται σε χρόνια αιμοκάθαρση και το οξειδωτικό στρες που οφείλεται στην διαδικασία της αιμοκάθαρσης έχει προταθεί ως αιτιολογικός παράγοντας. Ωστόσο, δεν είναι σαφές κατά πόσον διαφορετικοί τύποι μεμβράνης διάλυσης επηρεάζουν την ενδοθηλιακή λειτουργία με διαφορετικό τρόπο. Μελετήθηκαν 12 ασθενείς που υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση (ηλικίας 55±3, χρόνος αιμοδιάλυσης 20±2 μήνες, μέση μεταβολή υγρού-1782 ± 21 ml, συστολική /διαστολική αρτηριακή πίεση 139/75 mmHg). Οι ασθενείς διαλέχτηκαν τυχαία ως προς τη μεμβράνη που ήταν είτε πολυσουλφόνη ή μεμβράνη cuprophane. Οι συγκεντρώσεις στον ορό της οξειδωμένης LDL (oxLDL) και της α-τοκοφερόλης ως δείκτες του οξειδωτικού στρες μετρήθηκαν πριν και μετά από κάθε συνεδρία αιμοκάθαρσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, οι συγκεντρώσεις της α-τοκοφερόλης μειώθηκαν σημαντικά μετά την αιμοκάθαρση με το φίλτρο cuprophane (αρχική τιμή 18,0 ± 2,3 μετά HD 16,6 ± 1,3 μg / ml, Ρ <0,05), ενώ τα επίπεδα α-τοκοφερόλης παρέμειναν αμετάβλητα όταν χρησιμοποιήθηκε η μεμβράνη πολυσουλφόνης. Από την εξής έρευνα συμπερασματικά προκύπτει ότι ο τύπος της μεμβράνης του φίλτρου καθορίζει την οξεία επίδραση της αιμοκάθαρσης για την αρτηριακή ενδοθηλιακή λειτουργία. Διαφορές στη βιοσυμβατότητα της μεμβράνης και του οξειδωτικού στρες μπορεί να ευθύνονται στην παρατηρούμενη απόκλιση των αποτελεσμάτων, δεδομένου ότι η μείωση της διαστολής του αγγείου για τη ροή του αίματος με κυτταρινική μεμβράνη cuprophane, αλλά όχι με μια συνθετική μεμβράνη πολυσουλφόνης, συνδέθηκε με μια μείωση της βιταμίνης Ε στον ορό ([Kosch](#Kosch), 2003).

**Α.2.9 Έλλειψη βιταμίνης Β12 και βιταμίνη Ε**

Μελέτες έχουν δείξει πως η αντίσταση στην ανθρώπινη ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη (rhEPO) προκαλείται και από ανεπάρκεια της βιταμίνης Β12 σε χρόνια αιμοκαθαρούμενους ασθενείς. Παρά το κανονικό επίπεδο Β12 πριν από τη θεραπεία με rhEPO, ακολούθησε ανθεκτική αναιμία μαζί με ένα χαμηλό επίπεδο Β12 και μεγαλοβλαστικό μυελό των οστών μετά από μόλις 8 μήνες θεραπείας με rhEPO. Υπήρξε μια ταχεία αντίδραση των δικτυοερυθροκυττάρων στα συμπληρώματα με Β12, καθώς και η ανάγκη για μετάγγιση μειώθηκε από τις 2 μονάδες μηνιαίως σε καθόλου. Λόγω της πτώσης των επιπέδων της Β12 μετά από 8 μήνες θεραπείας με rhEPO, αναλύθηκαν τα αποτελέσματα των επίπεδων της βιταμίνης Β12 που μετριούνται σε ρουτίνα σε 30 αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με rhEPO, και διαπιστώθηκε ότι τα μέσα επίπεδα Β12 ήταν αμετάβλητα πριν και μετά τη θεραπεία με rhEPO. Κάθε ασθενής με rhEPO αντοχή, θα πρέπει να ελέχγει τα επίπεδα Β12, λαμβάνοντας υπόψη τις δυνητικά σοβαρές επιπτώσεις της έλλειψης Β12 [(Zachee et al, 1992).](#Zachee)

Η βιταμίνη Ε θεωρείται ως ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό της μεμβράνης των RBCs η οποία βοηθάει στην παρεμπόδιση και μείωση του βαθμού της καταστροφής του νεφρού. Η θεραπεία μετην βιτμαίνη Ε θεωρείται σαν ένας τρόπος διόρθωσης των αντιοξειδωτικών στο πλάσμα και μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης καρδιανανπνευστικής ασθένειας που συνήθως συνοδεύει την νεφρική ανεπάρκεια.

Η διατήρηση της ακεραιότητας της σπειραματικής μεμβράνης είναι ζωτικής σημασίας για τη νεφρική λειτουργία και οι βιολογικές μεμβράνες προστατεύονται από την οξειδωτική φθορά από τη λιπόφιλη αντιοξειδωτική βιταμίνη Ε, κυρίως υπό τη μορφή της α-τοκοφερόλης. Η βιταμίνη Ε σταθεροποιεί επίσης τη διαπερατότητα της μεμβράνης και τη ρευστότητά της. Επιπρόσθετα μπορεί να αποτρέψει την απόπτωση που οφείλεται σε οξειδωτικό στρες. Μια άλλη μορφή της βιταμίνης Ε (γ- τοκοφερόλη) είναι επίσης απαραίτητη για την αντιοξειδωτική ευημερία των κυττάρων. Αυτή απαιτείται για την αποτοξίνωση των οξειδωτικών όπως τα οξείδια του αζώτου. Το νιτρικό οξείδιο είναι ένα ισχυρό αγγειοδιασταλτικό και εμπλέκεται σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια με σηπτική καταπληξία.

Μια συνδυασμένη ανεπάρκεια είτε βιταμίνη Ε με σελήνιο ή ανεπάρκεια γλουταθειόνης οδηγεί σε έντονη και προοδευτική οξειδωτική βλάβη στη νεφρική δομή και λειτουργία

Όσον αφορά τις αλλαγές που σχετίζονται με την ηλικία η νεφρική λειτουργία συνδέεται με την υπεροξείδωση των λιπιδίων και το οξειδωτικό στρες. Η νεφρική γήρανση συνοδεύεται από προοδευτική σπειραματοσκλήρυνση, μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και αγγειοσυστολή. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε αρουραίους βρέθηκε ότι τα νεφρά των ηλικιωμένων αρουραίων που βρίσκονταν σε μια δίαιτα ελέγχου που περιείχε 50IU/kg βιταμίνη Ε είχαν τρεις φορές υψηλότερα επίπεδα των αγγειοσυστολής, μια μείωση 60% στο ρυθμό σπειραματικής διήθησης και αυξημένα επίπεδα τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης, σε σχέση με τα νεαρά ζώα (3-4 μηνών) που τρέφονταν με την ίδια δίαιτα. Η συμπληρωματική διατροφή της ομάδας των ηλικιωμένων αρουραίων με υψηλά επίπεδα βιτμαίνης Ε (5000IU/kg για επιπλέον 9 μήνες αύξησε τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών στον ορό κατά 30% και ειδικότερα βελτίωσεω το ρυθμό σπειραματικής διήθησης κατά 50% και εξασθένησε τόσο τη σπειραματοσκλήρυνση όσο και την έκφραση του υποδοχέα της ηλικίας (Fryer, 2000).

**Α.3.1 Αντισώματα κατά της ερυθροποιητίνης**

Αντισώματα μπορούν να αναπτυχθούν σε διαφορετικούς βαθμούς κατά τη διάρκεια της θεραπείας με ανθρώπινες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της ινσουλίνης, της αυξητικής ορμόνης, του παράγοντα VIII, της ερυθροποιητίνης, και των ιντερφερονών. Αυτά τα αντισώματα μπορεί να μειώσουν την κλινική αποτελεσματικότητα αυτών των παραγόντων αναστέλλοντας ή εξουδετερώνοντας την βιολογική δραστικότητα τους και μπορεί να έχουν και άλλες βιολογικές επιδράσεις. Για παράδειγμα, αντισώματα αναπτύσσονται σε 20% έως 40% των ασθενών με σοβαρή αιμοφιλία και οι οποίοι λαμβάνουν ως θεραπεία τον ανθρώπινο παράγοντα VIII. Η παρουσία αυτών των αντισωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε ανοχή στις επιδράσεις πήξης αυτού του παράγοντα. Ομοίως, ένα ποσοστό των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με ιντερφερόνη άλφα ανέπτυξαν αντισώματα, τα οποία ανέστειλλαν την θεραπευτική του δράση. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να δοκιμαστεί για εξουδετερωτικά αντισώματα κατά τη διάρκεια της θεραπείας με αυτούς τους παράγοντες, ιδιαίτερα σε ασθενείς οι οποίοι δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία [(Neurol , 2004)](#Neurol).

Παρακάτω εξετάζονται οι περιπτώσεις ασθενών που ανέπτυξαν αντισώματα σε απόκριση προς ορισμένες από τις πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται συνήθως ως θεραπευτικοί παράγοντες.

H ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη (rHuEPO), χρησιμοποιείται εκτενώς σε ασθενείς με αναιμία και υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση ενώ θεωρείται πολύ ασφαλής και αποτελεσματική. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει αναφορά σχετικά με την ανάπτυξη αντισωμάτων προς την rHuEPO σε ασθενείς υπό θεραπεία με το φάρμακο αυτό. Σε μια έρευνα αναφέρεται ένας ασθενής που ανέπτυξε αντισώματα έναντι της rHuEPO και ως εκ τούτου ανέπτυξε αμιγή απλασία της ερυθράς σειράς. Ένας άντρας 63 ετών με τελικού σταδίου νεφρική νόσο και δευτεροβάθμια υπέρταση τοποθετήθηκε σε χρόνια θεραπεία αιμοκάθαρσης και με ανεκτή θεραπεία με rHuEPO, για δύο χρόνια. Μια ταχέως εξελισσόμενη αναιμία, τότε, σημειώθηκε η οποία δεν ρυθμιζόταν ακόμα και με μέγιστες δόσεις rΗιιΕΡΟ και ο ασθενής σύντομα χρειαζόταν μεταγγίσεις. Η εξέταση του μυελού των οστών αποκάλυψε σπάνια αρχέγονα κύτταρα ερυθρών. Μια λεπτομερής έρευνα για την αιτία αυτής της απλασίας της ερυθράς σειράς πραγματοποιήθηκε. Ελέγχτηκαν αντισώματα έναντι της rHuEPO με τη δοκιμασία της ραδιοανοσοκαταβύθιση και βρέθηκαν θετικά. Κατά τη διάρκεια αρκετών μηνών, ο τίτλος αντισωμάτων μειώθηκε αυθόρμητα σε αμελητέα επίπεδα με ταυτόχρονη βελτίωση της αναιμίας και επανεμφάνιση των ερυθρών προδρόμων κυττάρων στο μυελό των οστών. Αυτός ήταν και ο πρώτος ασθενής που αναφέρεται ότι σχημάτισε αντισώματα έναντι της rHuEPO και, κατά συνέπεια, ανέπτυξε αμιγή απλασία της ερυθράς σειράς. Έτσι προκύπτει, ότι αν και πολύ σπάνια, η παραγωγή αντισωμάτων προς της rHuEPO θα πρέπει να μην αποκλείεται σε ασθενείς με ανθεκτικότητα στη θεραπεία με rhEPO [(Prabhakar, 1997)](#Prabhakar).

Μια επίσης πολύ σημαντική μελέτη έδειξε ότι ακόμη 13 ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια παρουσίασαν αντισώματα κατά της rhEPO, στους οποίους κατέστη αναγκαία η μετάγγιση λόγω βαριάς αναιμίας μετά από μια αρχική αιματολογική ανταπόκριση στην ερυθροποιητίνη. Σε όλους τους ασθενείς, η αναιμία οφειλόταν σε αμιγή απλασία της ερυθράς σειράς σε συνδυασμό με εξουδετερωτικά αντισώματα αντιερυθροποιητίνης.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των 13 ασθενών ήταν παρόμοια. Όλοι οι ασθενείς είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με ερυθροποιητίνη δια της υποδόριας οδού, και η αναιμία που αναπτύχθηκε και ήταν ανθεκτική στην ερυθροποιητίνη είχε αναπτυχθεί σε όλους μετά από 3 με 67 μήνες θεραπείας. Δώδεκα ασθενείς έλαβαν εποετίνη άλφα τους τελευταίους λίγους μήνες πριν γίνουν ανθεκτικοί στη θεραπεία. Ένας ασθενής υποβλήθηκε αποκλειστικά σε θεραπεία με ερυθροποιητίνη βήτα και η αναιμία του έγινε επίσης ανθεκτική στη θεραπεία. Η διάγνωση της καθαρής απλασίας των ερυθρών κυττάρων βασίστηκε στην απουσία ερυθροειδών κυττάρων στον μυελό των οστών σε 12 ασθενείς και την απουσία κυκλοφορούντων δικτυοκυττάρων σε 1 ασθενή.

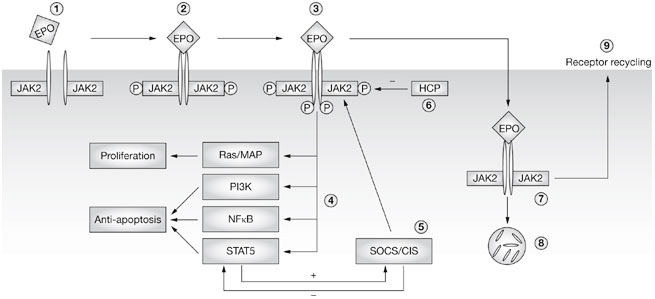
Σε δείγματα ορού που συλλέχτηκαν κατά το χρόνο της διάγνωσης της απλασίας των ερυθροκυττάρων, η ερυθροποιητίνη στον ορό ήταν μη ανιχνεύσιμη σε 10 ασθενείς και ήταν εντός φυσιολογικού εύρους σε 3 ασθενείς. Αυτό το εύρημα ήταν απρόβλεπτο, επειδή τα επίπεδα ερυθροποιητίνης στον ορό είναι συνήθως πολύ υψηλά σε ασθενείς με απλασία των ερυθροκυττάρων. Επειδή τα αντισώματα της αντιερυθροποιητίνης στον ορό μπορεί να παρεμβαίνουν στις μετρήσεις της ερυθροποιητίνης με σχηματισμό συμπλόκων από μόρια ερυθροποιητίνης, τα δείγματα ορού από αυτούς τους ασθενείς ελέγχθηκαν για την παρουσία αντισωμάτων κατά της ερυθροποιητίνης. Η θεραπεία με ερυθροποιητίνη διακόπηκε όταν επιβεβαιώθηκε η παρουσία των αντισωμάτων έναντι της ερυθροποιητίνης. Το Σεπτέμβριο του 2001, 6 από τους 13 ασθενείς είχαν ανακτήσει κάποια ερυθροποιητική λειτουργία μετά αφού έλαβαν ανοσοκατασταλτική θεραπεία ή νεφρικό αλλομόσχευμα. Δύο άλλοι ασθενείς μετά από μία παρακολούθηση άνω των δύο χρόνων, παραμένουν εξαρτώμενοι από τις μεταγγίσεις παρά την ανοσοκατασταλτική θεραπεία.

Αφού η θεραπεία με εποετίνη διεκόπη, υπήρξε μια αργή πτώση στους τίτλους αντισωμάτων σε όλους τους ασθενείς. Η ανοσοκατασταλτική θεραπεία φάνηκε να επιταχύνει την εξαφάνιση των αντισωμάτων και μπορεί να είχε τη δυνατότητα να ανακτήσει την ερυθροποίηση στα επίπεδα που υπήρχαν πριν από την έναρξη της θεραπείας με ερυθροποιητίνη.

Τα αντισώματα σε αυτούς τους 13 ασθενείς ήταν σε θέση να εξουδετερώσουν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις της εποετίνης και η συγγένεια τους για την ερυθροποιητίνη είναι περίπου παρόμοια με εκείνη του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης. Η αποτελεσματική εξουδετέρωση της ερυθροποιητίνης από αυτά τα αντισώματα πιθανότατα οφείλεται για την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ερυθροποίηση in vitro και in vivo [(Casadevall et al, 2002)](#Casadevall).

**Α.3.2 Αλληλεπιδράσεις υποδοχέων ΕPO**

H πρόσδεση της ΕΡΟ στον υποδοχέα της είναι απαραίτητη για την παραγωγή των ώριμων ερυθροκυττάρων. Ο υποδοχέας ΕΡΟ είναι ένας τύπος διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων αιμοποιητικής κυτοκίνης. Ο υποδοχέας που δεσμεύει την ερυθροποιητίνη είναι διμερής. Ωστόσο, υπάρχουν διάφορες απόψεις σχετικά με το αν, κατά την απουσία του συνδεούμενου, ο υποδοχέας ΕΡΟ είναι μονομερής ή ολιγομερής. Μια εκδοχή αναφέρει ότι δύο μονομερείς υποδοχείς γίνονται ένα διμερές μετά τη δέσμευση της ερυθροποιητίνης. Μια άλλη εκδοχή, περιγράφει μια διαδικασία κατά την οποία εμφανίζεται ο υποδοχέας της ερυθροποιητίνης στην κυτταρική επιφάνεια ως ένα προσχηματισμένο διμερές. Σήμερα θεωρείται ότι, η σύνδεση του συνδεούμενου, δηλαδή της ερυθροποιητίνης, αλλάζει τον υποδοχέα από μια ανενεργή σε μια ενεργή φάση. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα ΕΡΟ είναι παροδική και γρήγορα απενεργοποιείται με ανασταλτικούς μηχανισμούς.



Εικόνα 13: Επισκόπηση της ενεργοποίησης του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης και των ενδοκυττάριων οδών

**Ανατύπωση από:** Karien van der Putten et al,2007 Nature Clinical Practice Nephrology

**Α.3.3 Υποδοχείς ερυθροποιητίνης και σχέση με αντίσταση στην rhEPO**

Μηχανισμοί που θα μπορούσαν να διέπουν την ​​αντίσταση στην ερυθροποιητίνη είναι η ελαττωματική ενεργοποίηση του υποδοχέα ΕΡΟ. Έχει αποδειχθεί ότι η διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα ΕΡΟ έχει μια ισχυρή ανεξάρτητη ιδιότητα διμερισμού. Αν και ο ρόλος των προσχηματισμένων διμερών παραμένει ασαφής, θα μπορούσε η δραστικότητα διμερισμού του διαμεμβρανικού υποδοχέα ΕΡΟ να ευαισθητοποιεί τον υποδοχέα ΕΡΟ με τέτοιο τρόπο που να λειτουργεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις η ερυθροποιητίνη. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η απουσία αυτόματου διμερισμού του υποδοχέα ΕΡΟ μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση ΕΡΟ.

Ο υποδοχέας της ΕΡΟ μπορεί να ενεργοποιηθεί απουσία φυσικού συνδέτη της από ένα πεπτίδιο που προσδένεται σε έναν τομέα που διαφέρει από τις περιοχές δέσμευσης της ΕΡΟ. Πεπτίδια που μιμούνται την ερυθροποιητίνη προσδένονται στην θέση πρόσδεσης ΕΡΟ και ενεργοποιούν τις ίδιες οδούς σηματοδότησης όπως κάνει η EPO από μόνη της. Έτσι η αντίσταση στην EPO θα μπορούσε να προκληθεί από την παρουσία των ανταγωνιστικών αυτών πεπτιδίων τα οποία δεσμεύονται στον υποδοχέα της. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι η SH2 πρωτεΐνη που περιέχει κυτοκίνη επαγώγιμη συνδέεται άμεσα με την κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα ΕΡΟ και αναστέλλει τον εξαρτώμενο από την ΕPO πολλαπλασιασμό. Η παραγωγή των επαγώγιμων αυτών πρωτεϊνών επάγεται από κυτοκίνες όπως η IFN-γ, η IL-2 και η IL-6. Ως εκ τούτου, οι κυτοκίνες μπορούν να προκαλέσουν αντίσταση στην ΕΡΟ.

Μια άλλη πιθανή αιτία της μειωμένης απόκρισης στην θεραπεία με ΕΡΟ είναι μείωση του αριθμού των υποδοχέων ΕΡΟ​​. Η ΙFΝ-γ αναστέλλει τον αγγελιοφόρο RNA για την έκφραση του ΕΡΟ-υποδοχέα. Ο αριθμός των υποδοχέων ΕΡΟ ​​μπορεί επίσης να μειωθεί ως απόκριση στην εσωτερικοποίηση του υποδοχέα και της υποβάθμισης του, οι οποίοι είναι ελάχιστα κατανοητοί μηχανισμοί ρύθμισης. Η εσωτερικοποίηση του υποδοχέα ΕΡΟ φαίνεται να ρυθμίζεται ανεξάρτητα από τα σήματα που δέχεται απο την ΕPO. Μία αύξηση στο ρυθμό εσωτερίκευσης θα μπορούσε να μειώσει τον αριθμό των υποδοχέων ΕΡΟ ​​και να οδηγήσει σε αντίσταση. Τα μέσα με τα οποία γίνεται η εσωτερικοποίηση του ΕΡΟ-υποδοχέα και το κατά πόσο οι κυτοκίνες έχουν ένα ρόλο σε αυτή τη διαδικασία, παραμένει ακόμα άγνωστο [(Van der Putten et al, 2008)](#Van).

**Α.3.4 Σχέση διαφόρων ασθενειών με την μη ανταπόκριση στη rhEPO**

Η αντίσταση στην θεραπεία με rhEPO φαίνεται να σχετίζεται και με το είδος της ασθένειας που έχει ο κάθε ασθενής που βρίσκεται στο τελευταίο στάδιο νεφρικής ανεπάρκειας και κάνει αιμοκάθαρση. Σύμφωνα με μια έρευνα μελετήθηκαν διαβητικοί και μη διαβητικοί αναλογα αν είχαν καποια φλεγμονή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι διαβητικοί που έκαναν και αιμοκάθαρση είχαν λιγότερη απόκριση στην χροηγούμενη ερυθροποιητίνη [(Abe et al, 2011)](#Abe).

**Κεφάλαιο Β**

**Σκοπός της εργασίας**

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ασθενείς που βρίσκονταν στο τελικό στάδιο της νεφρικής ανεπάρκειας και οι οποίοι υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν πιθανές βλάβες των ερυθροκυττάρων με τα αίτια μη ανταπόκρισης στην θεραπεία με υψηλής δοσολογίας ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης ορισμένων ασθενών σε σύγκριση με τους ασθενείς που ανταποκρίνονται φυσιολογικά σε κανονική δόση στην ερυθροποιητίνη προκειμένου να βελτιωθεί η αναιμία που εμφανίζουν. Σημειώνεται ότι οι ασθενείς δεν είχαν σακχαρώδη διαβήτη ούτε ήταν μολυσμένοι με κάποιο μεταδοτικό νόσημα όπως HIV, HCV, HBV. Η παρούσα εργασία έγινε σε συνεργασία με το Ιώνιο Νεφρολογικό Κέντρο Αιμοκάθαρσης στη Νίκαια/Πειραιά, το τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθήνας και το τμήμα Ιατρικών εργασηρίων του ΤΕΙ Αθήνας.

**Β.Υλικά και μέθοδοι**

Αρχικά έγινε συλλογή **2** γενικών αίματος (ολικό αίμα με EDTA) για κάθε ασθενή και πραγματοποιήθηκε:

1.αφαίρεση ουραιμικών τοξινών

2.διατήρηση πλασμάτων με 3 διαφορετικές συνθήκες φυγοκέντρησης

*Α.1η ΓΕΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΣ*

Φυγοκεντρήθηκε στις 2000 στροφές για 10 λεπτά και διαχωρίστηκε το πλάσμα από τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs).

* Τα ερυθρά αιμοσφαίρια χρειάστηκαν για την διαδικασία της Κυτταρομετρίας ροής, επίσης φυλάχτηκαν 300 μl με 1:1 γλυκερόλη στην κατάψυξη στους -80οC.
* Το πλάσμα διαχωρίστηκε σε 5 eppendorfs και φυλάχτηκε στην κατάψυξη στους -80oC .

*Β.2η ΓΕΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΣ*

Διαχωρίστηκε το ολικό αίμα σε δύο μέρη για να φυγοκεντρηθεί σε διαφορετικές συνθήκες το καθένα μέρος.

Το πρώτο μέρος φυγοκεντρήθηκε στις 4730 στροφές (~2500 G) για 15 λεπτά και διαχωρίστηκε το πλάσμα από τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs).

* Το πλάσμα που διαχωρίστηκε από αυτή την διαδικασία ξανά φυγοκεντρήθηκε στις 4730 στροφές για 15 λεπτά και διαχωρίστηκε σε 5 διαφορετικά eppendorfs.
* Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που περίσσεψαν από αυτή την διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν σε άλλες διαδικασίες που θα αναλυθούν παρακάτω γι’αυτό το λόγο δεν χρειάστηκε να φυλλαχτούν στην κατάψυξη όπως έγινε παραπάνω.

Το δεύτερο μέρος φυγοκεντρήθηκε στις 3660 στροφές (~1500 G) για 15 λεπτά και διαχωρίστηκαν τα ερυθρά αιμοσφαίρια από το πλάσμα.

* Το πλάσμα ξανά φυγοκεντρήθηκε στις 10800 στροφές (13000 G) για 2 λεπτά και διαχωρίστηκε σε 5 διαφορετικά eppendorfs για να φυλαχτούν και αυτά στην κατάψυξη.
* Τα ερυθρά αιμοσφαιρία χρησιμοποιήθηκαν στις παρακάτω διαδικασίες.

Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόστηκε και στα δώδεκα δείγματα προκειμένου να ακολουθήσουν άλλες δοκιμασίες ώστε να βρεθούν τυχόν διαφορές μεταξύ των ασθενών που ανταποκρίνονταν καλά στην θεραπεία με rhEPO και αυτών που δεν ανταποκρίνονταν παρά την αυξανόμενη χορηγούμενη δόση ερυθροποιητίνης. Οτιδήποτε φυλάχτηκε στην κατάψυξη προοριζόταν για τυχόν επαναλήψεις. Στην συνέχεια με τα ερυθρά αιμοσφαίρια και το πλάσμα που έμεινε διαθέσιμο πραγματοποιήθηκαν οι εξής τεχνικές:

* Ομάδα Αίματος, Rhesus (CcDEe) και σύστημα Κ
* Επίστρωση αίματος και χρώση May-Grunwald Giemsa (η οποία χαρακτηρίζεται ως πανοπτική επειδή βάφει όλα τα κυτταρικά συστατικά)
* Ανίχνευση ΔΕΚ (Δικτυοερυθροκύτταρα)
* Αιματολογική Ανάλυση-Μικροσκόπιση των Επιστρώσεων
* Ωσμωτική Αντίσταση Ερυθροκυττάρων
* Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη πλάσματος

**Β.1 Πειραματικά πρωτόκολλα**

1. Προσδιορισμός ομάδας αίματος κατά ΑΒΟ (*ΑΑΒΒ manual 2012*)

**Αντιδραστήρια**

Anti-A, Anti-B, Anti-A,B (Προαιρετικά)

**Διαδικασία**

* Τοποθετείται 1 σταγόνα Anti-A πάνω σε μια καθαρή, επισημασμένη γυάλινη πλάκα.
* Τοποθετείται 1 σταγόνα Anti-B πάνω σε μια άλλη καθαρή επισημασμένη γυάλινη πλάκα.
* Προστίθεται 1 σταγόνα από το κάθε αντιδραστήριο πάνω στις πλάκες τις επισημασμένες και 1 σταγόνα σε κάθε πλάκα απο τα προς εξέταση ερυθροκύτταρα.
* Αναμιγνύονται καλά τα αντιδραστήρια με τα ερυθροκύτταρα, χρησιμοποιώντας ένα καθαρό στικ εφαρμογής για κάθε αντιδρασήριο και απλώνετε το μείγμα σε μια περιοχή περίπου 20-40mm.
* Η πλάκα γείρεται απαλά από την μια άκρη στην άλλη.
* Διαβάζονται και ερμηνεύονται τα αποτελέσματα.

**Ερμηνεία**

Έντονη συγκόλληση των ερυθροκυττάρων στην παρουσία οποιουδήποτε αντιδραστηρίου για τον προσδιορισμό κατά ΑΒΟ μαρτυρά θετικό αποτέλεσμα.

Σε περίπτωση που τα αποτελέσματα είναι υπό αμφισβήτηση, πρέπει να επαναλαμβάνονται.

1. Προσδιορισμός συστήματος Rhesus (*AABB manual2012*)

**Δείγμα**

Χρησιμοποιούνται ερυθροκύτταρα από σωληνάριο συλλογής ορού ή ολικό αίμα με αντιπηκτικό.

**Αντιδραστήριο**

Χρησιμοποιείται αντιδραστήριο Anti-D. Πρέπει να τηρούνται αυστηρά οι οδηγίες του κατασκευαστή πριν οποιαδήποτε χρήση.

**Διαδικασία**

* Τοποθετείται μια σταγόνα αντιδραστηρίου Anti-D σε μια επισημασμένη και καθαρή πλάκα.
* Τοποθετείται μια σταγόνα από τα προς εξέταση ερυθροκύτταρα στην πλάκα με το αντιδραστήριο και αναμιγνύονται για 1 λεπτό με ένα στικ.
* Παράλληλα μετακινείται η πλάκα από την μια πλευρά προς την άλλη για τυχόν συγκόλληση.

**Ερμηνεία**

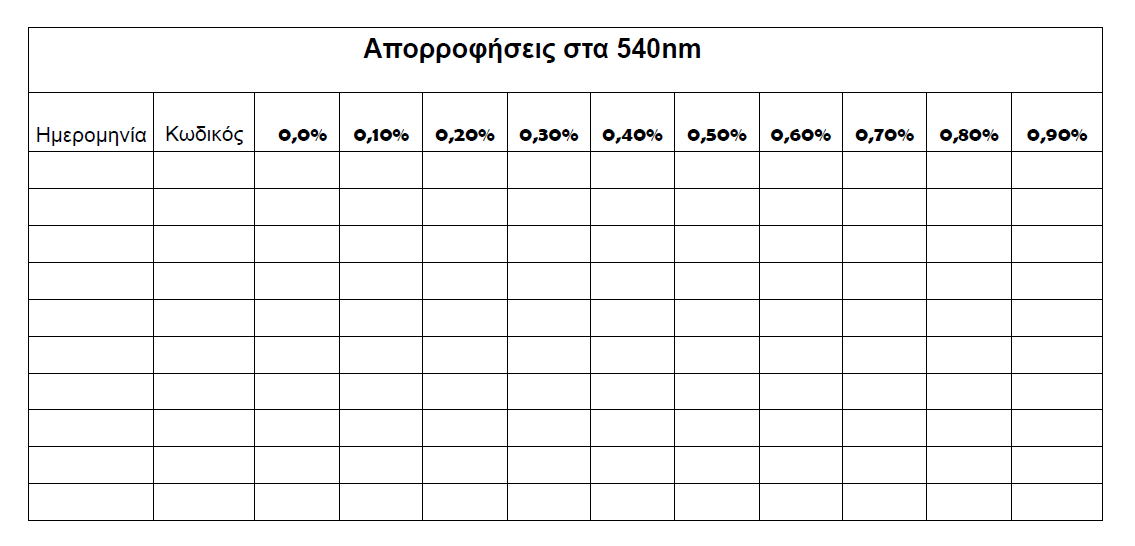
* Σε περίπτωση συγκόλλησης τότε το αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται ως θετικό. Δηλαδή Rhesus (+).
* Σε περίπτωση μη υπάρχουσας συγκόλλησης, τότε το αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται ως αρνητικό δηλαδή Rhesus (-).

1. Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων (*Kraus et al, 1997*)

* Φτιάχνονται συγκεντρώσεις διαλυμάτων από 0,9% NaCl σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 0,00  % | 0,10  % | 0,20  % | 0,30  % | 0,40  % | 0,50  % | 0,60  % | 0,70  % | 0,80  % | 0,90  % |

* Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 2,5ml κάθε διαλύματος και 25μl ολικού αίματος
* Ακολουθεί ήπια ανακίνηση σε vortex
* Γίνεται επώαση των διαλυμάτων για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
* Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 1500 rpm για 5 λεπτά.
* Μετράται με φωτόμετρο στα 540nm η απορρόφηση καθώς και η διαπερατότητα του κάθε δείγματος.
* Υπολογίζεται η αντίσταση του ερυθροκυττάρου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ωσμωτικών διαλυμάτων με τον μαθηματικό τύπο (O.D. εξεταστέου/ Ο.D. με 100% αιμόλυση x 100)
* Τέλος κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη.



Πίνακας 2: Πίνακας καταγραφής αποτελεσμάτων.

1. Υπολογισμός ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος (*Harboe, 1959*)

* Αραιώνεται το πλάσμα 1/10 (200μl πλάσμα σε 1800μl απιονισμένο H2O)
* Επωάζεται το δείγμα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
* Μέτρηση απορρόφησης δείγματος σε O.D. 380, 415, 450nm.
* Tέλος υπολογίζεται η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη με τον μαθηματικο τύπο:

**2 x O.D415 –O.D380-O.D450**

Πίνακας 3: Πίνακας καταγραφής αποτελεσμάτων ελεύθερης Hb πλάσματος.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Δείγμα** | **O.D 380** | **O.D 415** | **O.D 450** |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

1. Επίστρωση αίματος και χρώση May-Grunwald Giemsa (*Πάγκαλης, 2008*)

Η χρώση κατά May-Grunwald Giemsa χαρακτηρίζεται ως πανοπτική, επιεδή βάφει όλα τα κυττατικά συστατικά. Το όριο βέλτιστου pH είναι μεταξύ 6,5 και 6,8.

* Επίστρωση και ξήρανση του παρασκευάσματος
* Μονιμοποίηση με μεθανόλη για 10 λεπτά
* Βυθίζεται η αντικειμενοφόρος πλάκα με το επίχρισμα αίματος στο δοχείο με τη χρωστική May-Grunwald.
* Παραμονή 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.
* Προετοιμασία διαλύματος Giemsa: Διαλύονται 5 ml χρωστικής Giemsa σε 50ml απεσταγμένο νερόστο δοχείο χρώσης.
* Ξεπλένται το επίχρισμα βυθίζοντας το και ανακινώντας το σε νερό και μεταφέρεται στη συνέχεια στο δοχείο με τη διαλυμένη χρωστική Giemsa.
* Παραμονή 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.
* Ξεπλένται καλά με νερό (βυθίζοντας και ανακινώντας μέσα σε δοχείο νερού)
* Στεγνώνεται το παρασκεύασμα στον αέρα.
* Παρατηρείται το παρασκεύασμα στο μικροσκόπιο με καταδυτικό φακό (100x) κάτω από σταγόνα κεδρελαίου.

Στη χρώση αυτή βάφεται μπλέ το RNA, το κυτταρόπλασμα και οι πυρηνίσκοι. Το DNA και τα πρωτογενή κοκκία βάφονται κόκκινα και μώβ, καθώς και πορτοκαλί-κόκκινα η αιμοσφαιρίνη και τα ησωινοφιλικά κοκκία.

1. Μέτρηση ΔΕΚ (*Πάγκαλης, 2008*)

* Ανάμειξη ίσων ποσοστήτων πρόσφατου ολικού αίματος και διαλύματος χρωστικής
* Επώαση σε υδατόλουτρο στους 37ο C για 30 λεπτά
* Καλή ανακίνηση του μείγματος
* Επίστρωση
* Στέγνωμα
* Παρατήρηση με καταδυτικό φακό
* Μετρώνται ΔΕΚ και ερυθρά αιμοσφαίρια σε κάθε πεδίο
* Σταματάμε μόλις μετρήσουμε 1000 ερυθροκύτταρα
* Υπολογίζουμε τα ΔΕΚ με βάση τον παρακάτω τύπο:

**ΔΕΚ(%) = ΔΕΚ/1000 (RBCs) x 100**

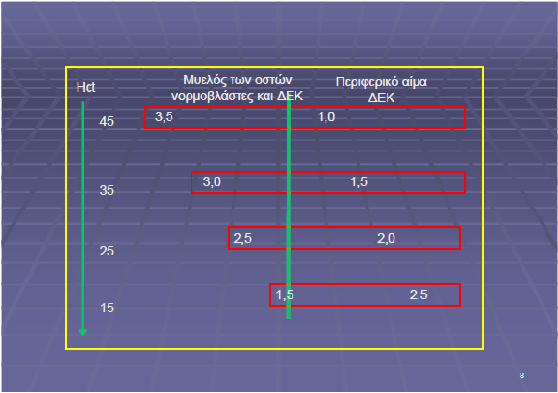
Πίνακας 4: Πίνακας καταγραφής αποτελεσμάτων ΔΕΚ.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Ημερομηνία** | **Κωδικός** | **ΔΕΚ/1000 RBCsx100(%)** |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

Με την βοήθεια του δείκτη παραγωγής των ΔΕΚ (RPI, reticulocyte roduction index) ερμηνεύονται καλύτερα τα αποτελέσματα. Η % των ΔΕΚ μπορεί να είναι αυξημένη είτε σε πρώιμη απελευθέρωση ΔΕΚ είτε σε μείωση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

**Υπολογισμός RPI : ΔΕΚ(%)x(HCT/45%)**

**Χρόνος ωρίμανσης**



Εικόνα 14: Διάγραμμα ωρίμανσης ΔΕΚ ανάλογα την παραμονή τους στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών.

Ανατύπωση από: Κριεμπάρδης , 2011.

Ο χρόνος ωρίμανσης εξαρτάται από τον αιματοκρίτη και το δίαστημα όπου παραμένουν τα ΔΕΚ στον μυελό των οστών κσι στο περιφερικό αίμα.

**RPI>3 μυελός των οστών επαρκής για απάντηση**

**RPI<2 ανεπαρκής απάντηση**

**Β.2 Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων**

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη προήλθαν από ασθενείς με νεφροπάθεια τελικού σταδίου που υπόκεινταν σε αιμοκάθαρση. Συλλέχτηκαν δείγματα πρίν και μετά την αιμοκάθαρση για να γίνει η μελέτη αυτών που ανταποκρίνονταν καλά στην δόση της ερυθροποιητίνης και αυτών που δεν ανταποκρίνονταν παρά την αυξημένη χορηγούμενη δόση ερυθροποιητίνης.

1. **Συλλογή:** Τα δείγματα συλλέχτηκαν σε σωληνάρια που είχουν EDTA και προορίζονταν για γενική αίματος. Συλλέχτηκαν 2 γενικές αίματος πριν και μετά την αιμοκάθαρση.
2. **Προετοιμασία:** Τα δείγματα επεξεργάζονται κατά τέτοιο τρόπο που αναγράφεται στα πρωτόκολλα που θα χρησιμοποιηθούν. Γίνεται διαχωριμσμός πλάσματος και έμμορφων συστατικών του αίματος.

**Β.3. Δότες και κριτήρια κατηγοριοποίησης**

**Σε αυτή την ενότητα φαίνονται τα κριτήρια με τα οποία έγινε η κατηγοριοποίηση των ασθενών. Τα κριτήρια αυτά παρουσιάζονται στους 3 παρακάτω πίνακες.**

Στον πίνακα 5 παρακάτω φαίνονται οι συμβολισμοί για κάθε ασθενή. Επίσης περιέχει ατομικά στοιχεία κάθε ασθενή όπως είναι οι ημέρες και οι ώρες κάθαρσης, ο τύπος του φίλρου, η δόση της ερυθροποιητίνης, η ηλικία καθώς και το βάρος του κάθε ασθενή το οποίο δεν πρέπει να μεταβάλλεται μετά από κάθε αιμοκάθαρση.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Συμβολισμοί ασθενών και κριτήρια κατηγοριοποίησης | | | | | | |
|  | ΗΜΕΡΕΣ | ΩΡΑ ΚΑΘΑΡΣΗΣ | HD-TYPE | ΔΟΣΗ  ΕΡΟ | ΕΤΩΝ | ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ (kg) |
| Α1 | ΔΕ-ΤΕ-ΠΑ | 6:00 | on line HDF από 22/11/13 | Φυσιολογική | 68 | 61,5 |
| A2 | ΔΕ-ΤΕ-ΠΑ | 6:00 | HDF | Φυσιολογική | 41 | 54 |
| A3 | ΤΡ-ΠΕ-ΣΑ | 6:00 | HDF | Φυσιολογική | 73 | 68 |
| A4 | ΔΕ-ΤΕ-ΠΑ | 6:00 | HDF | Φυσιολογική | 68 | 76 |
| A5 | ΔΕ-ΤΕ-ΠΑ | 6:00 | HDF | Φυσιολογική | 80 | 59 |
| A6 | ΔΕ-ΤΕ-ΠΑ | 6:00 | HDF | Φυσιολογική | 75 | 79,5 |
| A7 | ΤΡ-ΠΕ-ΣΑ | 6:00 | HD | Υψηλή | 82 | 50 |
| A8 | ΔΕ-ΤΕ-ΠΑ | 6:00 | HD | Υψηλή | 72 | 80 |
| A9 | ΔΕ-ΤΕ-ΠΑ | 16:00 | HD | Υψηλή | 79 | 79 |
| A10 | ΔΕ-ΤΕ-ΠΑ | 6:00 | HD | Υψηλή | 84 | 57 |
| A11 | ΔΕ-ΤΕ-ΠΑ | 16:00 | HD | Υψηλή | 76 | 82,5 |
| A12 | ΤΡ-ΠΕ-ΣΑ | 6:00 | HD | Υψηλή | 59 | 113,5 |

Στον πίνακα 6 παραθέτονται κάποια επιπλέον κριτήρια-στοιχεία για τον κάθε δότη. Οπως είναι το πότε ξεκίνησε την θεραπεία, τα επίπεδα δόσης της ερυθροποιητίνης (ανά εβδομάδα ή ανά ημέρες ανάλογα τον ασθενή) και τέλος την δόση του σιδήρου που μπορεί να λαμβάνουν (ανά εβδομάδα).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Συμβολισμοί ασθενών και κριτήρια κατηγοριοποίησης | | | |
| ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΣΘΕΝΗ | ΧΡΟΝΙΑ ΑΙΜΟΚΑΘΑΡΣΗΣ | ΕΠΙΠΕΔΑ ΔΟΣΗΣ EPO | ΣΙΔΗΡΟΣ |
| Α1 | από 24/09/09 | epoA Rec 8000/εβδομ | ΣΟΥΚΡΟΖΙΚΟΣ ΣΙΔΗΡΟΣ/ΕΒΔΟΜ |
| Α2 | από 15/06/11 | epoA Rec 6000/εβδομ | ΣΟΥΚΡΟΖΙΚΟΣ ΣΙΔΗΡΟΣ/ΕΒΔΟΜ |
| Α3 | από 03/02/10 | epoA Rec 6000/εβδομ | ΣΟΥΚΡΟΖΙΚΟΣ ΣΙΔΗΡΟΣ/ΕΒΔΟΜ |
| Α4 | από 13/05/10 | Darbepoetin 100/εβδομ | ΣΟΥΚΡΟΖΙΚΟΣ ΣΙΔΗΡΟΣ/ΕΒΔΟΜ |
| Α5 | από 14/03/11 | Darbepoetin 80/10 ημ | ΣΟΥΚΡΟΖΙΚΟΣ ΣΙΔΗΡΟΣ/ΕΒΔΟΜ |
| Α6 | από 24/10/09 | Darbepoetin 60/2 εβδομ | ~ |
| Α7 | από 04/03/11 | epoA Rec 30000/εβδομ | ΣΟΥΚΡΟΖΙΚΟΣ ΣΙΔΗΡΟΣ/ΕΒΔΟΜ |
| Α8 | από 27/12/12 | Darbepoetin 80/15 ημ | ΣΟΥΚΡΟΖΙΚΟΣ ΣΙΔΗΡΟΣ/ΕΒΔΟΜ |
| Α9 | από 01/06/12 | epoA Rec 18000/εβδομ | ΣΟΥΚΡΟΖΙΚΟΣ ΣΙΔΗΡΟΣ/ΕΒΔΟΜ |
| Α10 | από 19/09/03 | epoA Rec 30000/εβδομ | ΣΟΥΚΡΟΖΙΚΟΣ ΣΙΔΗΡΟΣ/ΕΒΔΟΜ |
| Α11 | από 02/08/12 | Darbepoetin 80/εβδομ | ΣΟΥΚΡΟΖΙΚΟΣ ΣΙΔΗΡΟΣ/ΕΒΔΟΜ |
| Α12 | από 02/08/13 | epoA Rec 30000/εβδομ | ΣΟΥΚΡΟΖΙΚΟΣ ΣΙΔΗΡΟΣ/ΕΒΔΟΜ |
|  |  |  | Φεριτήνη ? |

Στον πίνακα 7 φαίνονται τα φίλτρα τα οποία χρησιμοποιεί κάθε δότης κατά την αιμοκάθαρση και τις αιτίες που αναγκάστηκε να προβεί σε αιμοκάθαρση. Τέλος ως κριτήριο παρατίθεται και η πρόσληψη ή όχι της βιταμίνης Ε.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Συμβολισμοί ασθενών και κριτήρια κατηγοριοποίησης | | | |
| ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΣΘΕΝΗ | ΦΙΛΤΡΑ | ESRD ΑΙΤΙΑ | ΒΙΤΑΜΙΝΗ E |
| Α1 | Polyamide | Στένωση/απόφραξη νεφρ.αρτηριών | 400 mg/d |
| Α2 | polyacrilonitrile | Άγνωστη σπειραματονεφρίτιδα | ~ |
| Α3 | Polyamix | IgΑ Νεφροπάθεια | ~ |
| Α4 | Acrilonitrile | Χρόνια διάμεση νεφρίτιδα+ εστιακή σπειρ/ση | 300mg/d |
| Α5 | Polyamix | Άγνωστη | ~ |
| Α6 | Polyamix | Μικροσκοπική πολυαρτηρίτιδα | ~ |
| Α7 | Polyamix | Άγνωστη | ~ |
| Α8 | Polyamide | νεφροσκλήρυνση | ~ |
| Α9 | Polyamix | Πολυκυστική νόσο | ~ |
| Α10 | Polyamide | Άγνωστη(πιθανά) | ~ |
| Α11 | Polyamix | Άγνωστη νεφροσκλήρυνση | ~ |
| Α12 | Polyamide | RSGS??? Επί μονονέφρου | ~ |

Επιπλέον συμμετείχαν δότες οι οποίοι δεν ήταν αιμοκαθαιρόμενοι. Αυτοί οι δότες αποτελούν και τους μάρτυρες της μελέτης. Οι μάρτυρες, βοήθησαν στην σύγκριση των αποτελεσμάτων.

|  |  |
| --- | --- |
| ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Μάρτυρες | |
| ΚΩΔΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑ | ΦΥΛΟ ΜΆΡΤΥΡΑ |
| Φ1 | Άρρεν |
| Φ2 | Θήλυ |
| Φ3 | Άρρεν |
| Φ4 | Θήλυ |
| Φ5 | Θήλυ |
| Φ6 | Θήλυ |
| Φ7 | Θήλυ |
| Φ8 | Θήλυ |

**Κεφάλαιο 4**

3.Αποτελέσματα

Στα δείγματα των ασθενών έγινε προσδιορισμός της ομάδας αίματος κατά ΑΒΟ, του συστήματος Κell καθώς και του συστήματος Rhesus. Το σύστημα Rhesus, ελέγχεται από δυο γονίδια που εντοπίζονται στην ίδια θέση στο χρωμόσωμα 1. Το γονίδιο RHD (Rhesus D) που κωδικοποιεί ή δεν κωδικοποιεί το αντιγόνο D και το γονίδιο RHCE (Rhesus CE) το οποίο φέρει δύο αλληλόμορφα που προέρχονται από μετάλλαξη του γονιδίου RHCE και τα οποία κωδικοποιούν τα αντιγόνα Cc και Ee. Tα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **ΠΙΝΑΚΑΣ 5: ΟΜΑΔΕΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ** | | | | |
| **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ** | **ΚΩΔΙΚΟΣ** | **ΟΜΑΔΑ ΑΙΜΑΤΟΣ** | **ΤΥΠΟΣ RH (C c D E e)** | **ΣΥΣΤΗΜΑ Κ** |
| 14/1/2014 | Α3 | Ο | CcDEe | K |
| 14/1/2014 | Α7 | Ο | CcDEe | k |
| 14/1/2014 | Α12 | Ο | CcDee | k (θετικό σε k cellano) |
| 29/1/2014 | Α2 | Ο | CcDee | k (θετικό σε k cellano) |
| 29/1/2014 | Α9 | Α | CcDEe | K |
| 29/1/2014 | Α11 | Α | CCDee | k (θετικό σε k cellano) |
| 19/2/2014 | Α1 | Ο | CcDEe | k |
| 19/2/2014 | Α4 | ΑΒ | CcDEe | K |
| 19/2/2014 | Α5 | ΑΒ | CcDEe | K |
| 19/3/2014 | A10 | A | CcDEe | k |
| 19/3/2014 | A6 | A | CCDee | k |
| 19/3/2014 | A8 | A | ccDEe | k |
| 3/4/2014 | Φ1 | Ο | CcDee | K |
| 3/4/2014 | Φ2 | Ο | CcDEe | k |
| 3/4/2014 | Φ3 | Α | CcDEe | k |
| 3/4/2014 | Φ4 | Α | CcDEe | k |
| 4/4/2014 | Φ5 | B | CcDEe | k |
| 4/4/2014 | Φ6 | O | CcDee | K |
| 4/4/2014 | Φ7 | A | ccDEE | K |
| 4/4/2014 | Φ8 | A | CcDEe | k |

**Αιματολογική ανάλυση**

Η αιματολογική ανάλυση περιλαμβάνει την γενική εξέταση αίματος και πιο συγκεκριμένα την αρίθμηση των λευκών αιμοσφαιρίων, των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων, συμπεριλαμβανομένου των ερυθροκυτταρικών δεικτών, της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη. Τα αποτελέσματα χωρίστηκαν στα δείγματα των ασθενών που ανταποκρίνταν και σε αυτά που δεν ανταποκρίνονταν στην θεραπεία με rhEPO σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Ο χωρισμός αυτός των δειγμάτων βόηθησε την μελέτη τόσο πριν όσο και μετά την αιμοκάθαρση.

**Ερυθρά αιμοσφαίρια**

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν ως εύρος αναφοράς 4,2-5,4\*1012/μl. Από τα εξεταζόμενα δείγματα εξάγεται η μέση τιμή τόσο πριν την αιμοκάθαρση όσο και μετά την αιμοκάθαρση. Τα αποτελέσματα παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα:

**Αιμοσφαιρίνη και αιματοκρίτης**

Πολύ σημαντικός παράγοντας στην μελέτη μας υπήρξε η αιμοσφαιρίνη η οποία έχει ως εύρος αναφοράς 12,5-16 gr/dl και ο αιματοκρίτης 37-47%. Τα αποτελέσματα κατά την αιματολογική ανάλυση παρουσιάζονται παρακάτω:

**Ερυθροκυτταρικοί δείκτες**

Οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες είναι 4 και περιλαμαβάνουν το MCV, MCH, MCHC και RDW.

* MCV (Mean corpuscular volume, μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων)
* MCH (Mean corpuscular hemoglobin, μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης ανά ερυθροκύτταρο)
* MCHC (Μean corpuscular hemoglobin concentration, μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης ανά ερυθροκύτταρο)
* RDW (Red cell distribution width, εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων)

Οι τιμές που προέκυψαν κατά την αιματολογική ανάλυση παρουσιάζονται παρακάτω:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Πίνακας 6: Δημογραφικά και αιματολογικά χαρακτηριστικά ασθενών πριν την αιμοκάθαρση που ανταποκρίνονταν στην θεραπεία με rhEPO και αυτών που δεν ανταποκρίνονταν σε σύγκριση με τους μάρτυρες. | | | | |
| Χαρακτηριστικά | **Φ.Τ** | **Aνταποκριθέντες n=6** | **Mη ανταποκριθέντες n=6** | **Μάρτυρες**  **n=8** |
| Ηλικία | ~ | 67.5±19.5 | 75.3±12.5 | ~ |
| Φύλο (Α/Θ) | ~ | 5/1 | 3/3 | 2/6 |
| WBCs (x109/L) | 4,0-9,0 | 7.65±2.95 | 7.4±1.95 | 7.1±2 |
| RBCs (x1012/μl) | 3,8-5,30 | 3.75±0,33 | 3.9±1.2 | 4.6±0.6 |
| Hb (gr/dl) | 12,0-18,0 | 12.3±0.9 | 10.8±1.8 | 14.6±2.2 |
| Hct (%) | 36,0-56,0 | 36.6±3.75 | 33.4±4.75 | 42.1±6.4 |
| MCV (fl) | 80,0-100,0 | 97.2±5.45 | 88.4±17.2 | 92.2±8.15 |
| MCH (pg) | 27,0-32,0 | 32.5±2.5 | 28.7±6.35 | 32±3 |
| MCHC (gr/dl) | 27,0-32,0 | 33.5±1.65 | 32.4±1.5 | 34.6±1.25 |
| RDW (%) | 10,0-16,5 | 13.4±0.4 | 14.8±1.65 | 12.9±1.1 |
| PLTs | 120-380 | 266±99 | 205±78.5 | 334±125 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Πίνακας 7: Δημογραφικά και αιματολογικά χαρακτηριστικά ασθενών μετά την αιμοκάθαρση αιμοκάθαρση που ανταποκρίνονταν στην θεραπεία με rhEPO και αυτών που δεν ανταποκρίνονταν σε σύγκριση με τους μάρτυρες. | | | | |
| Χαρακτηριστικά | **Φ.Τ** | **Ανταποκριθέντες n=6** | **Mη ανταποκριθέντες n=6** | **Μάρτυρες n=8** |
| Ηλικία | ~ | 67.5±19.5 | 75.3±12.5 | ~ |
| Φύλο (Α/Θ) | ~ | 5/1 | 3/3 | 6/2 |
| WBCs (x109/L) | 4,0-9,0 | 6.8±1.7 | 6.2±1.4 | 7.1±2 |
| RBCs (x1012/μl) | 3,8-5,30 | 3.9±0.38 | 3.6±1.29 | 4.6±0.6 |
| Hb (gr/dl) | 12,0-18,0 | 12.9±2 | 10.4±1.95 | 14.6±2.2 |
| Hct (%) | 36,0-56,0 | 38.7±5.65 | 31.3±6.1 | 42.1±6.4 |
| MCV (fl) | 80,0-100,0 | 97.3±7 | 87.7±17.3 | 92.2±8.15 |
| MCH (pg) | 27,0-32,0 | 32.4±2.4 | 29.1±7.4 | 32±3 |
| MCHC (gr/dl) | 27,0-32,0 | 33.3±1.4 | 33±2.1 | 34.6±1.25 |
| RDW (%) | 10,0-16,5 | 13.5±1.1 | 14.7±1.15 | 12.9±1.1 |
| PLTs | 120-380 | 345±154 | 232±124 | 334±125 |

**Προσδιορισμός της ωσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων**

Στην δοκιμασία αυτή εξετάστηκε κατά πόσο τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν ανθεκτικότητα στην αιμόλυση αφού βρεθούν σε υπότονα διαλύματα NaCl 0.9%. Συγκεκριμένα μελετήθηκε σε ποιό διάλυμα NaCl διαφόρων συγκεντρώσεων θα ξεκινούσε η αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Διάγραμμα 1:Σε αυτό το διάγραμμα εμφανίζεται η μέση τιμή των αποτελεσμάτων κατά την δοκιμασία ωσμωτικής αντίστασης των ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά την ΠΡΟ ΜΤΝ φάση των ανταποκριθέντων ασθενών σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Διάγραμμα 2: Παρουσιάζεται η μέση τιμή των αποτελεσμάτων στην δοκιμασία της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθρών αιμοσφαιίων κατά την ΠΡΟ ΜΤΝ φάση των μη ανταποκριθέντων ασθενών σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Διάγραμμα 3: Παρουσιάζεται η μέση τιμή των ανταποκριθέντων ασθενών κατά την δοκιμασία της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην ΜΕΤΑ ΜΤΝ φάση σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Διάγραμμα 4: Παρουσιάζεται η μέση τιμή των μη ανταποκριθέντων ασθενών κατά την δοκιμασία της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην ΜΕΤΑ ΜΤΝ φάση σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

**Υπολογισμός ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος**

Το εύρος των τιμών αναφοράς για αυτή την δοκιμασία ήταν 0,001-0,160mg/dl. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Πίνακας 8: Ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος των 2 ομάδων ασθενών | | | | | |
|  | **Πριν την αιμοκάθαρση** | | **Μετά την αιμοκάθαρση** | |  |
| Φ.Τ | **Ανταποκριθέντες**  **n=6** | **Mη ανταποκριθέντες**  **n=6** | **Ανταποκριθέντες**  **n=6** | **Mη ανταποκριθέντες**  **n=6** | **Μάρτυρες**  **n=8** |
| Hb(mg/dl)  0,001-0,160mg/dl | 0.06 mg/dl | 0.1 mg/dl | 0.08 mg/dl | 0.07 mg/dl | 0,03 mg/dl |

**Mέτρηση δικτυοερυθροκυττάρων**

Μετρήθηκαν τα δικτυοερυθροκύτταρα πριν και μετά την αιμοκάθαρση. Οι φυσιολογικές τιμές για τα ΔΕΚ είναι 0-2%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Πίνακας 9: Δικτυοερυθροκύτταρα ασθενών | | | | |
| Πριν την αιμοκάθαρση | | **Μετά την αιμοκάθαρση** | |  |
| Ανταποκριθέντες  n=6 | **Μη ανταποκριθέντες**  **n=6** | **Ανταποκριθέντες**  **n=6** | **Μη αντπαοκριθέντες**  **n=6** | **Μάρτυρες**  **n=8** |
| A1=3.6% | A7=0.6% | A1=2.3% | A7=1.3% | Φ1=0,7% |
| A2=1.8% | A8=1.6% | A2=1.1% | A8=1.2% | Φ2=1,1% |
| A3=1.7% | A9=1.9% | A3=1.7% | A9=1.8% | Φ3=1,9% |
| A4=2.8% | A10=1,3% | A4=2.9% | A10=1.9% | Φ4=1,2% |
| A5=2.9% | A11=1.8% | A5=2.3% | A11=2.0% | Φ5=1,3% |
| A6=1.9% | A12=2.0% | A6=1.9% | A12=2.1% | Φ6=1,2% |
|  |  |  |  | Φ7=1,5% |
|  |  |  |  | Φ8=1,7% |

Παρακάτω παρουσιάζονται τα RPI των ασθενών πριν και μετά την αιμοκάθαρση.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ΠΙΝΑΚΑΣ 10: RPI ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ | | | |
| ΠΡΙΝ(RPI) | | ΜΕΤΑ(RPI) | |
| Α1 | **1.82** | **Α1** | **1.27** |
| Α2 | **0.92** | **Α2** | **1.00** |
| Α3 | **1.54** | **Α3** | **1.53** |
| Α4 | **1.41** | **Α4** | **1.66** |
| Α5 | **1.71** | **Α5** | **2.20** |
| Α6 | **0.98** | **Α6** | **0.88** |
| Α7 | **0.28** | **Α7** | **0.38** |
| Α8 | **0.90** | **Α8** | **0.56** |
| Α9 | **0.60** | **Α9** | **0.78** |
| Α10 | **1.51** | **Α10** | **0.56** |
| Α11 | **1.33** | **Α11** | **2.08** |
| Α12 | **1.23** | **Α12** | **0.92** |

|  |  |
| --- | --- |
| ΠΙΝΑΚΑΣ 11: RPI ΜΑΡΤΥΡΩΝ | |
| ΜΑΡΤΥΡΕΣ (RPI) | |
| Φ1 | **0.67** |
| Φ2 | **1.07** |
| Φ3 | **2.12** |
| Φ4 | **1.05** |
| Φ5 | **1.20** |
| Φ6 | **1.12** |
| Φ7 | **0.90** |
| Φ8 | **1.53** |

**Μικροσκόπηση και μέτρηση του λευκοκυτταρικού τύπου**

Στα δείγματα που εξετάστηκαν υπολογίστηκε ο λευκοκυτταρικός τύπος τόσο στα δείγματα που πάρθηκαν πριν την αιμοκάθαρση, όσο και στα δείγματα που πάρθηκαν μετά την αιμοκάθαρση. Μετά από τη μικροσκόπηση των δειγμάτων αυτών, έγινε εξαγωγή ορισμένων αποτελεσμάτων από τα οποία προέκυψε μια μέση τιμή για κάθε τύπο λευκών αιμοσφαιρίων ενώ το εύρος αναφοράς αυτών όπως και των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Πίνακας 12: Λευκοκυτταρικός τύπος ασθενών | | | | | |
|  | **Πριν την αιμοκάθαρση** | | **Μετά την αιμοκάθαρση** | |  |
| Τιμές αναφοράς | **Ανταποκριθέντες**  **n=6** | **Mη ανταποκριθέντες**  **ν=6** | **Ανταποκριθέντες**  **n=6** | **Mη ανταποκριθέντες**  **ν=6** | **Μάρτυρες**  **n=8** |
| Ουδετερόφιλα  42-85% | 73% | 72% | 76% | 73% | 61% |
| Λεμφοκύτταρα  11-49% | 18% | 18% | 16% | 18% | 29% |
| Μονοπύρηνα  2-9% | 8% | 9% | 7% | 7% | 6% |
| Ηωσινόφιλα  0-4% | 2% | 2% | 2% | 2% | 2% |
| Βασεόφιλα  0-2% | 1% | 0% | 0% | 0% | 1% |

**Μικροσκοπική παρατήρηση μορφολογίας, χρώματος και ανισοκυττάρωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων**

**Μορφολογία**

Από τα 12 δείγματα που εξετάστηκαν, δεν παρουσίασε κανένα από τα δείγματα μη φυσιολογική μορφολογία.

**Χρώμα**

Όσον αφορά το χρώμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων των ασθενών 3 ασθενείς παρουσίασαν φυσιολογικό χρώμα, 2 ασθενείς παρουσίασαν υποχρωμία και όλοι οι υπόλοιποι ασθενείς εμφάνισαν υπερχρωμία.

**Ανισοκυττάρωση**

Από τα δείγματα που εξετάστηκαν 3 μόνο παρουσίασαν ανισοκυττάρωση πριν την αιμοκάθαρση, ενώ 6 δείγματα εμφάνισαν ανισοκυττάρωση μετά την αιμοκάθαρση.

**Κεφάλαιο Δ**

**Δ. Συζήτηση**

Η θεραπεία της αναιμίας χρόνιας νόσου από νεφρική ανεπάρκεια, που είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα κατά το τελικό στάδιο της, με ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη αποτελεί το κατεξοχήν αποτελεσματικό τρόπο αντιμετώπισης της. Ωστόσο πολλοί ασθενείς με τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια που δεν ανταποκρίνονται σχεδόν καθόλου στην συγκεκριμένη θεραπεία με αποτέλεσμα να χειροτερεύει την κατάσταση τους και με την σειρά του αυτό οδηγεί σε αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας. Δώδεκα ασθενείς τελικού σταδίου νεφρικής ανεπάρκειας οι οποίοι βρίσκονταν υπο αιμοκάθαρση, μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία και κατατάχτηκαν σε δυο κατηγορίες με βάση την ανταπόκριση τους στην θεραπεία με ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη (rhEPO): στους ανταποκρινόμενους στην θεραπεία αυτή και στους μη ανταποκρινόμενους. Η μελέτη των συγκεκριμένων ασθενών έγινε σε σύγκριση με οχτώ υγιείς μάρτυρες. Οι δυο κατηγορίες ασθενών διέφεραν μεταξύ τους ως προς το τύπο αιμοκάθαρσης και ως προς την χορηγούμενη δόση ερυθροποιητίνης.Επιπλέον δύο εξ’αυτών λάμβαναν Βιταμίνη Ε, ενώ οι περισσότεροι λάμβαναν σίδηρο.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αιματολογική ανάλυση έδειξαν ότι τα λευκά αιμοσφαίρια, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες τόσο των ανταποκριθέντων όσο και των μη ανταποκριθέντων βρίσκονταν εντός φυσιολογικών τιμών. Δεν συνέβαινε το ίδιο όμως με την αιμοσφαιρίνη και τον αιματοκρίτη καθώς στους μη ανταποκριθέντες υπήρχε χαμηλή τιμή τόσο της αιμοσφαιρίνης όσο και του αιματοκρίτη σε σχέση με τους ανταποκριθέντες οι οποίοι οι τιμές τους βρίσκονταν εντός φυσιολογικών ορίων. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι οι ασθενείς αυτοί παρά την υψηλή χορηγούμνεη δόση rhEPO η αναιμία τους δεν διορθώνεται, δηλαδή παρουσιάζουν αντίσταση στην rhEPO.

Οι άλλοι όμως ασθενείς ανταποκρίνονται φυσιολογικά και για το λόγο αυτό τα επίπεδα της Hb και του Hct είναι βελτιωμένα. Όσον αφορά το RDW υπήρχε μια ελαφριά ανισοκυττάρωση κυρίως στα δείγματα των μη ανταποκριθέντων, πράγμα που επιβεβαιώνεται και από την μικροσκοπική μελέτη των επιχρισμάτων.

Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία ένας από τους σημαντικότερους λόγους που πιθανόν παρουσιάζεται η αντίσταση στη θεραπεία αυτή, είναι λόγω μεταβολής της δομής πολλών πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, η οποία επηρεάζεται κυρίως από την διαδικασία της αιμοκάθαρσης και το οξειδωτικό στρες (Αntonelou [et](#Antonelou12) al, [2011](#Antonelou12)). Μια από τις δοκιμασίες της εργασίας αυτής ήταν αυτή της ωσμωτικής ευθραυστότητας των RBCs όπου παρατηρήθηκε ότι στους ανταποκριθέντες ασθενείς η ωσμωτική ευθραυστότητα βελτιώνεται μετά την αιμοκάθαρση σε σύγκριση με τους μη ανταποκριθέντες όπου μένει η ίδια όπως ακριβώς και πριν την αιμοκάθαρση. Αυτό επιβεβαιώνεται από μια έρευνα των [Wu et al, 1998](#Wu), όπου μελετήθηκε η ωσμωτική ευθραυστότητα σε ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση και βρέθηκε ότι η αιμοκάθαρση μπορεί να βελτιώσει την ωσμωτική ευθραυστότητα, καθώς απομακρύνονται οι ουραιμικές τοξίνες και μειώνονται οι αλληλεπιδράσεις αυτών με τα συστατικά του αίματος ομαλοποιώντας με αυτόν τον τρόπο την ωσμωτικότητα των ερυθρώ αιμοσφαιρίων.

Διάγραμμα 5: Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της ωσμωτικής ευθραυστότητας ΠΡΟ ΜΤΝ

Διάγραμμα 6: Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της ωσμωτικής ευθραυστότητας ΜΕΤΑ ΜΤΝ

Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης και συγκεκριμένα το είδος της αιμοκάθαρσης φαίνεται να έχει ένα σημαντικό αντίκτυπο στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η αιμοδιαδιήθηση πλεονεκτεί σε πολλά σε σχέση με την απλή αιμοδιάλυση καθώς έχει καλύτερο συντελεστή υπερδιήθησης, έχει καλύτερη διαβατότητα και οδηγεί σε καλή απομάκρυνση τόσο των μεγάλων όσο και των μικρών μοριακού βάρους διαλυμένων ουσιών ([Karkar](#Karkar), 2013). Λαμβάνοντας υπόψιν την συγκεκριμένη μελέτη, διαπιστώνεται ότι οι ανταποκριθέντες ασθενείς χρησιμοποιούν το συγκεκριμένο είδος αιμοκάθαρσης σε σχέση με τους μη ανταποκριθέντες οι οποίοι χρησιμοποιούν την απλή αιμοδιάλυση, γεγονός που υποδηλώνει μια συσχέτιση του είδους της αιμοκάθαρσης και των συνεπειών που έχει αυτή που πιθανά οδηγεί στην αντίσταση στην rhEPO.

Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος βρέθηκε φυσιολογική τόσο πριν όσο και μετά την αιμοκάθαρση και στις δύο κατηγορίες ασθενών. Όσον αφορά τα δικτυοερυθροκύτταρα των ασθενών αυτών παρατηρήθηκε ότι οι ανταποκριθέντες τόσο πριν όσο και μετά την αιμοκάθαρση παρουσίασαν αυξημένα ποσοστά τα οποία αποδίδονται στο γεγονός ότι ανταποκρίνονται φυσιολογικά στην θεραπεία με ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη και κινειτοποείται ο μυελός των οστών για να διορθωθεί η αναιμία που προέκυψε. Γίνεται αντιληπτό ότι οι μη ανταποκριθέντες όπως προαναφέρθηκε παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη γεγονός που μαρτυρά την μη ανταπόκριση τους στην θεραπεί με ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη η οποία εκδηλώνεται με φυσιολογικά δεκ, ίσως και λίγο ελαττωμένα.

**Δ. Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές**

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, προκύπτει ότι, οι μη ανταποκριθέντες ασθενείς, οι οποίοι χρησιμοποιούν την απλή αιμοδιάλυση, σε σχέση με τους ανταποκριθέντες οι οποίοι χρησιμοποιούν την αιμοδιαδιήθηση, παρουσίασαν φυσιολογικά δικτυοερυθροκύτταρα τόσο πριν όσο και και μετά την αιμοκάθαρση πράγμα που υποδηλώνει ότι ο μυελός των οστών δεν ανταποκρίνεται στην θεραπεία με ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη διαφορετικά θα υπήρχε αύξηση των δικτυοερυθροκυττάρων όπως συνέβει με τους ανταποκριθέντες. Η αναιμία των ασθενών αυτών γίνεται αντιληπτή από τα χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη κατά την αιματολογική ανάλυση.

Μελετώντας την διεθνή βιβλιογραφία, και συμπεριλαμβανομένου της πειραματικής διαδικασίας που διεξήχθη, συμπεραίνεται ότι, η αιμοδιαδιήθηση πλεονεκτεί της αιμοδιάλυσης κι αυτό παρατηρείται μέσω της ωσμωτικότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όπου μετά την αιμοκάθαρση, στους ανταποκριθέντες βελτιώνεται η ωσμωτική αντίσταση των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε αντίθεση με τους μη ανταποκριθέντες όπου μένει στάσιμη. Αυτό προκύπτει λόγω μεταβολών που υπόκειται η δομή των πρωτεϊνών της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων η οποία φαίνεται να είναι πολύ σημαντικότερη στους μη ανταποκριθέντες ασθενείς. Φαίνεται ότι σημαντικό επίσης ρόλο στην αντίσταση στη θεραπεία με rhEPO παίζει η φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και η γρήγορη καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Ωστόσο η βιταμίνη Ε έχει πρωταρχικό ρόλο λόγω της αντιοξειδωτικής της δράσης, γεγονός που φαίνεται άλλωστε από τους ανταποκριθέντες ασθενείς από τους οποίους οι δύο λάμβαναν βιταμίνη Ε.

Χρήζει διερεύνησης, ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζεται η μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η δόση και ο τύπος της ερυθροποιητίνης που λαμβάνει ο κάθε ασθενής καθώς και ο τύπος της μεμβράνης των φίλτρων αιμοκάθαρσης. Υπάρχουν μελλοντικές προοπτικές για νέα εξέλιξη της μεμβράνης των φίλτρων όπου θα έχουν μεγαλύτερη βιοσυμβατότητα για τον κάθε ασθενή. Επίσης συνίσταται περαιτέρω μελέτη για τις εξελιγμένες ανασυνδυασμένες ερυθροποιητίνες σε σχέση με τον χρόνο ημιζωής.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε**

**Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. **Ιωαννίδης Ι. ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ Ι**. ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΥΡΩΝ. ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΓΙΑΧΟΥΔΗ 2004. ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, ΙSBN: 960-7425-42-1 SET 960-7425-43-X
2. **Schilling RF**. Anemia of chronic disease: a misnomer. Ann Inter Med 1991; 115: 572
3. **Hematology : clinical principles and applications** (3. ed. ed.). Philadelphia: Saunders. 2007. p. 220. ISBN 9781416030065.
4. **Χανιώτης Φ, Χανιώτης Δ**. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ. ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΛΙΤΣΑΣ 2009. ΑΘΗΝΑ, ISBN 978-960-372-1239
5. **Ney PA. (2006).** Gene expression during terminal erythroid differentiation. CurrOpin Hematol,13: 203-208
6. **Sawada K, Krantz SB, Kans JS, et al. (1987).** Purification of human erythroid colony-forming units and demonstration of specific binding of erythropoietin. J Clin Invest, 80: 357–366
7. **Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B,PapayannopoulouT.(1991).**

Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. Blood, 77: 2583–2590

1. **Means RT.** Advances in the anemia of chronic disease. Int J Hematol 1999; 70:7
2. **Papadaki HA et al**. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor- a mediated effect. Blood 2002; 99:1610
3. **Papadaki HA et al**. Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-a antibody therapy. Blood 2002; 100:474
4. **Means RT et al**. Progress in understading the pathogenesis of the anemia of chronic disease. Blood 1992; 80:1639
5. **Blake DR et al.** Assessment of iron stores in inflammation by assay of serum ferritin concentrations. Br Med J 1981; 283:1147
6. **Fitzsimons EJ et al**. Erythroblast iron metabolism and serum soluble transferrin receptor values in the anemia of rheumatoid arthritis. Arthr Rheum 2000; 43:1016
7. **Wians FH et al**. Discriminating between iron deficiency anemia and anemia of chronic disease using traditional indices of iron status vs transferring receptor concentration. Am J Clin Pathol 2001; 115:112
8. **Davidson's "*Παθολογία***", ιατρικές εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, 19η έκδοση, 2005. (συμπτωματα αναιμιας)
9. **Revised European Best Practice Guidelines** for the Management of Anaemia in Patients with Chronic Renal Failure. NDT vol. 19 Suppl. 2 May 2004
10. **NHS,National Institute for Health and Clinical Excellence,Anaemia** management in people with chronic kidney disease, ISSUE Date September 1, 2006, NICE Clinical Guideline39
11. **Cazzola MC et al.** Use of recombinant human erythropoietin outside thesetting of uremia. Blood 1977; 89:4248
12. **Schriber SH et al**. Recombinant erythropoietin for the treatment of anemia in inflammatory bowel disease. N Engl J Med 1996; 334:619
13. **Henry DH et al**. Recombinant human erythropoietin in the treatment of anemia associated HIV infections and zidovudine therapy. Ann Inter Med 1992; 117:739
14. **Spivac JL.** Recombinant human erythropoirtin and the anemia of cancer. Blood 1994; 84:997
15. **Glaspy JA**. the impact of Epoietin alpha on quality of life during cancer chemotherapy. Sem Hematol 1997; 34:20
16. **Haroon ZA, Amin K, Jiang X, Arcasoy MO (September 2003).** "A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response". *Am. J. Pathol.* **163** (3): 993–1000. doi:10.1016/S0002-9440(10)63459-1
17. **Lopez-Gomez McGonigle RJS, Boineau FG, Beckman B et al**. Erythropoietin and inhibitors of in vitro erythropoiesis in the development of anemia in children with renal failure. J Lab Clin Med 1985; 105: 449-458. )
18. **Lasne F, de Ceaurriz J. (2000).** Recombinant erythropoietin in urine. Nature, 405: 635-636
19. **Martin KJ. (2007).** The first human cell line-derived erythropoietin, epoetin delta (Dynepo), in the management of anemia in patients with chronic kidney disease. Clin Nephrol, 68: 26–31
20. **Jolling K, Ruixo JJ, Hemeryck A, Piotrovskij V, Greway T. (2004).** Population pharmacokinetic analysis of pegylated human erythropoietin in rats. J Pharm Sci,93: 3027–3038
21. **Br J Haematol. 1998** Jan;100(1):79-89.Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties.
22. **Elliott S, Lorenzini T, Asher S, et al. (2003).** Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. Nat Biotechnol, 21: 414–421
23. **Tolman C, Richardson D, Bartlett C, Will E. (2005).** Structured conversion from thrice weekly to weekly erythropoietic regimens using a computerized decision-support system: a randomized clinical study. J Am Soc Nephrol, 16:1463–1470
24. **Abels RI.** Use of recombinant human erythropoietin in the treatment of anemia in patients who have cancer. Sem Oncol 1992; 19: 29-35.
25. **Eschbach JW, Davidson RC.** Red blod cell mass/eryuropoietin and blood pressure: Lessons from patients with renal disease. In Laragh JH, Brener BM (eds): Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. 24. (ed. 2nd) New York, NY, Raven Press, Ltd. 1995, pp 389-398.
26. **Ajay K. Singh,** M.B., B.S., Lynda Szczech, M.D., Kezhen L. Tang, Ph.D., Huiman Barnhart, Ph.D., Shelly Sapp, M.S., Marsha Wolfson, M.D., and Donal Reddan, M.B., B.S. for the CHOIR InvestigatorsN Engl J Med 2006; 355:2085-2098 Correction of Anemia with Epoetin Alfa in Chronic Kidney Disease
27. **ROLSTON M,GARDNER P.W., PATERSON R and GUTCH C.F.** μετάφραση Αγραφιώτης Θ,Συριγκάνης Χ, Ζηρογιάννης Π (2003) Η αιμοκάθαρση στην κλινική πράξη:Ο ρόλος της υγειονομικής ομάδας.Τεχνόγραμμα, Αθήνα, p 68-98
28. **STONER M**. H μετάφραση Αγραφιώτης Θ, Συριγκάνης Χ, Ζηρογιάννης Π (2003) Η αιμοκάθαρση στην κλινική πράξη: Ο ρόλος της υγειονομικής ομάδας. Τεχνόγραμμα, Αθήνα, p 123-128.
29. **Ayman Karkar, (2013).** Advances in Hemodialysis Techniques
30. **Γριβέας Ι, Παπαδοπούλου Δ, (2008)**. Συνθετικές μεμβράνες αιμοκάθαρσης: το παράδειγμα της πολυακριλονιτίλης.
31. **Bradley A Warady, Franz Schaefer, Steven R Alexander (2012).** Pediatric dialysis.
32. **Ceciliani F, Giordano A, Spagnolo V. (2002)**. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Curr Pharm Des* 9:211-23.
33. **Kushner I, Rzewnicki D. (1999)**. Acute phase response, pp. 317-29. In Gallin JI, Snyderman R, Fearon DT, Haynes BF, Nathan C [eds.], Inflammation: basic prin­ciples and clinical correlates, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
34. **Gunnell J, Yeun JY, Depner TA, Kaysen GA. (1999)**. Acute-phase response predicts erythropoietin resistance in hemodialysis and peritoneal dialysis pa­tients. *Am J Kidney Dis* 33:63-72.
35. **Macdougall IC, Cooper AC. (2002)**. Erythropoietin resistance: the role of in­flammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 17 (Suppl 11): 39-43.
36. **Schindler R, Senf R, Frei U. (2002)**. Influencing the inflammatory response of hemodialysis patients by cytokine elimination using large-pore membranes. *Nephrol Dial Transplant* 17: 17-9.
37. **Cooper AC, Mikhail A, Lethbridge MW, Kemeny DM, Macdougall IC. (2003)**. Increased expression of erythropoiesis inhibiting cytokines (IFN-γ, TNF-α, IL-10, and IL-13) by T cells in patients exhibiting a poor response to erythropoietin therapy. *J Am Soc Nephrol* 14:1776-84.
38. **Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT, Roux-Lombard P, Zingraff J, Moynot A, Verger C, Dahmane D, Groote D, Jungers P, Dayer JM. (1995)**. Balance between IL-1β, TNF-α, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis. *J Immunol* 154:882-92.
39. **Allen DA, Breen C, Yaqoob MM, Macdougall IC. (1999)**. Inhibition of CFU-E colony formation in uremic patients with inflammatory disease: role of INF-γ and TNF-α. *J Invest Med* 47:204-11.
40. **Means RT Jr, Krantz SB. (1996)**. Inhibition of human erythroid colony form­ing units by interferons α and β: differing mechanisms despite shared receptor. *Exp Haematol* 24: 204-8.
41. **Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE. (1996)**. The impact of anemia on cardiomyopathy morbidity and mortality in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 28:53-61.
42. **Waltzer WC, Bachvaroff RJ, Raisbeck AP, Egelandsdal B, Pullis C, Shen L, Rapaport FT. (1984)**. Immunological monitoring in patients with end-stage renal disease. *J Clin Immunol* 4: 364-8.
43. **Muller WA. (1999)**. Leukocyte-endothelial cell adhesion molecules in transen­dothelial migration, pp. 585-592. *In* Gallin JI, Snyderman R, Fearon DT, Haynes BF and Nathan C [eds.], Inflammation: basic principles and clinical correlates, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
44. **Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J. (2000)**. The role of inflammation in vascular diseases. *J Leukoc Biol* 67: 591-602.
45. **Harlan JM. (1985)**. Leukocyte-endothelial interactions. *Blood* 65:513-25.
46. **Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. (2007)**. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Rev Immunol* 7: 678-89.
47. **Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mec­arelli L. (2000)**. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological as­pects. *Lab Invest* 80, 617-53.
48. **Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. (2004)**. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-5.
49. **Pereira R, Rocha S, Borges A, Nascimento H, Reis F, Miranda V, Sameiro Faria M, Quintanilha A, Belo L, Costa E, Santos-Silva A. (2011)**. Elastase release during the hemodialysis procedure seems to induce changes in red blood cell membrane proteins.Hemodialysis International 15:429-431
50. **Barany P. (2001)**. Inflammation, serum C-reactive protein, and erythropoietin resistance. *Nephrol Dial Transplant* 16:224-7.
51. **Levay PF, Viljoen M. (1995)**. Lactoferrin: a general review. *Haematologica* 80: 252-67.
52. **Pay, S.; Musabak, U.; Simşek, I.; Pekel, A.; Erdem, H.; Dinç, A. & Sengül, A. (2006).** Expression of CXCR-1 and CXCR-2 chemokine receptors on synovial neutrophils in inflammatory arthritides: does persistent or increasing expression of CXCR-2 contribute to the chronic inflammation or erosive changes? Joint Bone Spine, vol. 73, pp. 691-6, ISSN 1778-7254
53. **Sherry, B.; Dai, W.W.; Lesser, M.L. & Trachtman, H. (2008).** Dysregulated chemokine receptor expression and chemokine-mediated cell trafficking in pediatric patients with ESRD. Clin J Am Soc Nephrol, vol. 3, pp. 397-406, ISSN 1555-9041
54. **Costa, E.; Rocha, S.; Rocha-Pereira, P.; Nascimento, H.; Castro, E.; Miranda, V.; Faria, M.S.;Loureiro, A.; Quintanilha, A.; Belo, L. & Santos-Silva, A. (2008c).** Neutrophil activation and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in hemodialysis patients. Am J Nephrol, vol. 28, pp. 935-940, ISSN 1046-6673
55. **Litjens NHR, van Druninger CJ, Betjes MGH. (2006)**. Progressive loss of renal function is associated with activation and depletion of naïve T lymphocytes. *Clin Immunol* 118: 83-91.
56. **Arth RH. (1999)**. Iron metabolism in end-stage renal disease. *Seminars in Dialysis* 12:224-30.
57. **Skikne BS, Cook JD. (1992)**. Effect of enhanced erythropoiesis on iron absor­tion. *J Lab Clin Med* 120: 746-51.
58. **Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. (2003)**. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is type IIacute-phase protein. *Blood* 101: 2461-3.
59. **Kulaksiz H, Gehrke SG, Janetzko A, Rost D, Bruckner T, Kallinowski B, Stremmel W. (2004)**. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insuf­ficiency, and renal anemia. *Gut* 53: 735-43.
60. **Dallalio G, Fleury T, Means RT. (2003)**. Serum hepcidin in clinical specimens. *Br J Haematol* 122:996-1000.
61. **Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI, Ganz T, Musci G, Kaplan J. (2007)**. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 18:2569-78.
62. **Fleming RE, Sly WS. (2001)**. Hepcidin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc Nath Acad USA* 98:8160-2.
63. **Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. (2004)**. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113: 1271-6.
64. **Carbia-Nagashima A, Arzt E. (2004)**. Intracellular proteins and mechanisms involved in the control of gp130/JAK/STAT cytokine signaling. *IUBMB Life* 56:83-8.
65. **Costa, E.; Pereira, B.J.G.; Rocha-Pereira, P.; Rocha, S.; Reis, F.; Castro, E.; Teixeira, F.Miranda, V.; Sameiro- Faria, M.; Loureiro, A.; Quintanilha, A.; Belo, L. & Santos-Silva, A. (2008d).** Role of prohepcidin, inflammatory markers and iron status in resistance to rhEPO therapy in hemodialysis patients. Am J Nephrol, vol. 28, pp. 677-683, ISSN 1046-6673
66. **Atanasio, V.; Manolescu, B. & Stoian, I. (2006).** Hepcidin – central regulator. Eur J Haematol, vol. 78, pp. 1-10, ISSN 0902- 4441
67. **Costa, E.; Swinkels, D.W.; Laarakkers, C.M.; Rocha-Pereira, P.; Rocha, S.; Reis, F.; Teixeira, F.; Miranda, V.; Sameiro-Faria, M.; Loureiro, A.; Quintanilha, A.; Belo, L. & Santos-Silva, A. (2009).** Hepcidin serum levels and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in haemodialysis patients. Acta Haematol, vol. 122, pp. 226229, ISSN 0001-5792
68. **Valenti L, Valenti G, Como G, Santorelli G, Dongiovanni P, Rametta R, Fracanzani AL, Tavazzi D, Messa PG, Fargion S. (2008)**. HFE Genotype Influences Erythropoiesis Support Requirement in Hemodialysis Patients: A Pro­spective Study. *Am J Nephrol* 28: 311-316.
69. **Barber DA, Harris SR. (1994)**. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharm* NS34:26-35.
70. **Vuillaume M. (1987).** Reduced oxygen species, mutation, induction and câncer initiation. *Mutat Res* 186: 43-72.
71. **Spittle MA, Hoenich NA, Handelman GJ, Adhikarla R, Homel P, Levin NW. (2001)**. Oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 38:1408-13.
72. **Sommerburg O, Grune T, Hampl H, Riedel E, van Kuijk FJ, Ehrich JHH, Siems WG. (1998)**. Does long-term treatment of renal anaemia with recombi­nant erythropoietin influence oxidative stress in haemodialysed patients? *Nephrol Dial Transplant* 13: 2583-7.
73. **Παπακωνσταντίνου Θ. 2007**. Διατροφική παρέμβαση με μαστίχα Χίου σε νεφροπαθείς κατά την αιμοκάθαρση.
74. **Costa E , Rocha S, Rocha-Pereira P, Castro E, Miranda V, Sameiro Faria M, Loureiro A, Quintanilha A, Belo L, Santos-Silva, (2008a).** Band 3 Profile as a Marker of Erythrocyte Changes in Chronic KidneyDisease Patients
75. **Costa E , Rocha S, Rocha-Pereira P, Castro E, Miranda V, Sameiro Faria M, Loureiro A, Quintanilha A, Belo L, Santos-Silva, (2008b**). Changes in Red Blood Cells Membrane Protein Composition durinh Hemodialysis Procedure.
76. **Costa E , Rocha S, Rocha-Pereira P, Castro E, Miranda V, Sameiro Faria M, Loureiro A, Quintanilha A, Belo L, Santos-Silva, (2008c).**  Altered Erythrocyte Membrane Protein Composition in Chronic Kidney Disease Stage 5 Patients under Haemodialysis and RecombinantHuman Erythropoietin Therapy.
77. **Lucchi L, Bergamini S, Botti B, Rapanà R, Ciuffreda A, Ruggiero P, Ballestri M, Tomasi A, Albertazzi A. (2000)**. Influence of different hemodialysis membrane on red blood cell susceptibility of oxidative stress. *Artif Organs* 24:1-6.
78. **Gallagher PG. (2005)**. Red cell membrane disorders. Hematology. *Am Soc Hema­tol Educ Program*:13-8.
79. **Kay MM, Wyant T, Goodman J. (1994)**. Autoantibodies to band 3 during ag­ing and disease and aging interventions. *Ann N Y Acad Sci* 719: 419-47.
80. **Santos-Silva A, Castro EMB, Teixeira NA, Guerra FC, Quintanilha A. (1995)**. Altered erythrocyte membrane band 3 profile as a marker in patients at risk for cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 116: 199-209.
81. **Hayat A, Haria D, Salifu M. (2008)**. Erythropoietin stimulating agents in the management of anemia of chronic kidney disease. Patient Prefernece and Adherence 195-200.
82. **Michael J FRYER (2000).** Vitamin E as a protective antioxidant in progressive renal failure
83. **Zachee P,  Chew S.L.  Daelemans R. Lins R.L. (1992).** Erythropoietin Resistance due to Vitamin B12 Deficiency. University of Leuven, Belgium
84. **Neurol J. (2004).** Immunogenicity of recombinant human proteins: causes and consequences.
85. **Prabhakar SS, Muhlfelder T, (1997).** Antibodies to recombinant human erythropoietin causing pure red cell aplasia.
86. **Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian J, Dupont F,  Michaud P, Papo T, Ugo V, Teyssandier I, Varet B, Mayeux P. (2002).** Pure red cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin.
87. **Abe M, Okada K, Maruyama T, Maruyama N, Matsumoto K, Soma M. (2011).** Relationship between erythropoietin responsiveness, insulin resistance and malnutrition-inflammation-atherosclerosis (MIA) syndrome in hemodialysis patients with diabetes.
88. **Van der Putten K, Braam B, Kim e Jie, Carlo AJM Gaillard. (2008).** Mechanisms of disease: erythropoietin resistance in patients with both heart and kidney failure.
89. **Ibrahim FF, Ghannam MM, Ali Fm (2002).** Effect of dialysis on erythrocyte membrane of chronically hemodialyzed patients
90. **Martos MR, Hendry BM, Rodriquez-Puyol M, Dwight J, Diez-Marques ML. (1997).** Haemodialyser biocompatibility and erythrocyte structure and function.
91. **Vilar E, Fry AC, Wellsted D, Tattersall JE, Greenwood RN, Farrington K. (2009).** Long-term outcomes in online hemodiafiltration and high-flux hemodialysis: a comparative analysis.
92. **Kerr PB, Argiles A, Flavier JL, Canaud B, Mion CM, (1992).** Comparison of hemodialysis and hemodiafiltration: a long-term longitudinal study
93. **Kosch M, Levers A, Fobker M, Barenbrock M, Schaefer R, Rahn K, Hausberg M, (2003).** Dialysis filter type determines the acute effect of haemodialysis on endothelial function and oxidative stess.
94. **Wu SG, Jenq FR, Wei SY, Su CZ, Chung TC, Chang WJ, Chang HW, (1998).** Red blood cell osmotic fragility in chronically hemodialyzed patients
95. **Antonelou MH, Kriebardis AG, Velentzas AD, Kokkalis AC, Georgakopoulou SC, Papassideri IS, (2011).** Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis.
96. **Antonelou MH, Georgatzakou HT, Tzounakas VL, Velentzas AD, Kokkalis AC, Kriebardis AG, Papassideri IS, (2014).** Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study