



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση

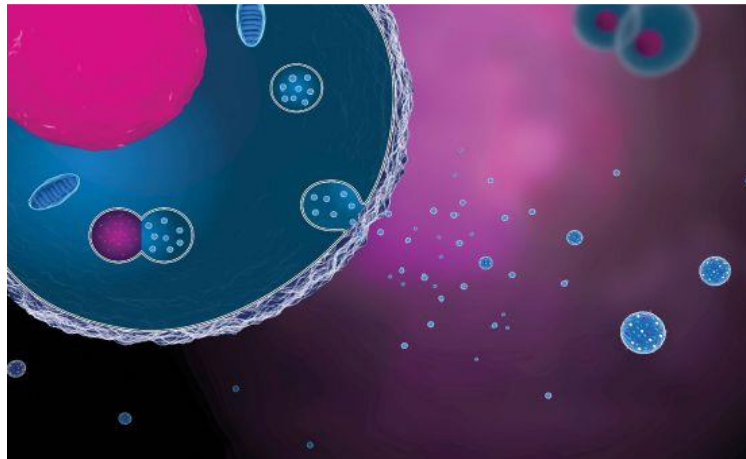


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη εξωκυτταρικών κυστιδίων πλάσματος σε
ασθενείς με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια και κλινική
συσχέτιση με τη θρόμβωση**

POST GRADUATE THESIS

**Study of extracellular plasma vesicles in patients with Chronic Renal
Failure and clinical association with thrombosis**



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/ NAME OF STUDENT
ΚΑΤΕΡΙΝΑ ΝΕΡΡΗ
KATHERINE NERRIS

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR
ΧΑΡΑ ΓΕΩΡΓΑΤΖΑΚΟΥ
CHARA GEORGATZAKOU

ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ 2022



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

Study of extracellular plasma vesicles in patients with Chronic Renal Failure and clinical association with thrombosis

KATHERINE NERRIS

18011

kcancer22@hotmail.com

FIRST SUPERVISOR

CHARA GEORGATZAKOU

SECOND SUPERVISOR

ANASTASIOS KRIEBARDIS

AIGALEO 2022

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κατερίνα Νέρρη του Αντωνίου, με αριθμό μητρώου 18011 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Κατερίνα Νέρρη

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του ΜΠΣ «Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση». Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου και μεταδιδακτορική ερευνήτρια στον Τομέα Ιατρικών εργαστηρίων του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, Χαρά Γεωργατζάκου για την στήριξη, τη βοήθεια και τις γνώσεις που μου παρείχε για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τους φίλους μου για την συμπαράσταση και στήριξη σε όλο το διάστημα της μεταπτυχιακής μου φοίτησης και εκπόνησης της διπλωματικής μου.

Αφιέρωσεις

Στους γονείς μου Αντώνη και Μίνα

Περίληψη

Τα εξωκυτταρικά κυστίδια είναι μικρές εξωκυτταρικές δομές που οριοθετούνται από μια διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων, απελευθερώνονται υπό φυσιολογικών συνθηκών, όπως η ωρίμανση, η γήρανση και ενεργοποίηση κυττάρων, και παίζουν ένα σημαντικό ρόλο σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Τα εξωκυτταρικά κυστίδια πλάσματος απελευθερώνονται κυρίως από ερυθροκύτταρα και από αιμοπετάλια. Αρχικά τα εξωκυτταρικά κυστίδια θεωρήθηκαν ως μέσο για την απόρριψη των κυτταρικών αποβλήτων, όμως θεωρούνται πλέον ως οχήματα διακυτταρικής επικοινωνίας που επηρεάζουν διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Οι ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, οι οποίοι υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση υποφέρουν από αναιμία, μειωμένη ερυθροποίηση και διαταραχές στην αιμόσταση, που συχνά εκδηλώνεται με αιμορραγικά επεισόδια. Φαίνεται πως τα εξωκυτταρικά κυστίδια, λόγω της προπηκτικής επιφάνειας τους, την φωσφατιδυλοσερίνη, την έκφραση υποδοχέων και του κυτταροπλασματικού περιεχομένου τους, παίζουν σημαντικό ρόλο στην πήξη, στη συσσώρευση αιμοπεταλίων και τη θρόμβωση.

Λέξεις κλειδιά: Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, Εξωκυτταρικά κυστίδια, ερυθροκυτταρικά εξωκυτταρικά κυστίδια, αιμοπεταλιακά μικροκυστίδια, φωσφατιδυλοσερίνη, αιμόσταση

Abstract

Extracellular vehicles are small extracellular structures encompassed by a phospholipid bilayer that are released under normal conditions, such as cell maturation, aging, and activation, and play an important role in a variety of pathological conditions including chronic kidney disease. Extracellular plasma vesicles are mainly released by erythrocytes and platelets. Extracellular vehicles were originally considered as a means of disposing of cellular waste, but are now considered as intercellular communication vehicles that affect various physiological and pathological processes. Patients with end-stage chronic kidney disease, who undergo dialysis, suffer from anemia, reduced erythropoiesis, and coagulation disorders, which often present with bleeding episodes. It seems that extracellular vehicles, due to their coagulation surface, phosphatidylserine, their receptor expression and their cytoplasmic content, play an important role in coagulation, platelet aggregation and thrombosis.

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	4
Ευχαριστίες.....	6
Αφιερώσεις.....	8
Περίληψη.....	10
Abstract	12
Συντομογραφίες.....	15
Εισαγωγή	18
1. Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια	18
1.1 Επιδημιολογία	18
1.2 Ορισμός	18
1.3 Λειτουργία.....	19
1.4 Αίτια.....	19
1.5 Επιπλοκές σε Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια.....	20
1.5.1. Αναιμία.....	20
1.5.2. Ουραιμικές τοξίνες.....	22
1.6 Αιμοκάθαρση ως Θεραπεία (Renal Replacement).....	23
2. Εξωκυτταρικά κυστίδια	23
2.1 Εισαγωγή	23
2.2 Ταξινόμηση.....	24
2.2.1 Σύσταση και Δημιουργία Εξωσωμάτων	26
2.2.2 Σύσταση και δημιουργία μικροκυστιδίων	27
2.3 Κυστιδιοποίηση Ερυθροκυττάρων.....	29
2.3.1 Μηχανισμοί κυστιδιοποίησης των ερυθροκυττάρων.....	31
2.3.1.1 Οξειδωτικό Στρες.....	32
3. Κυστιδιοποίηση Αιμοπεταλίων (PLT)	33
3.1 Σχηματισμός εξωκυτταρικών κυστιδίων από αιμοπετάλια (PLT).....	34
3.2 Δομή και Σύνθεση	36
4. Διαταραχές Πήξης στην ΧΝΑ	36
4.1 Καταρράκτης της Πήξης	37
5. Ρόλος των ερυθροκυτταρικών και αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων στην αιμόσταση .	40
6. Η συμβολή των μικροκυστιδίων στις διαταραχές πήξης στη ΧΝΑ	41
Αναφορές.....	43

Συντομογραφίες

XNA		Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια
ESRD	End-stage kidney disease	Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου
GFR	Glomerular filtration rate	Ρυθμός σπειραματικής διήθησης
HD	Hemodialysis	Αιμοκάθαρση
HDF	Hemodiafiltration	Αιμοδιαδίθηση
KDIGO	Kidney disease: Improving global outcomes	Οδηγίες για την βελτίωση της νεφρικής νόσου
RRT	Renal replacement therapy	Θεραπείες νεφρικής αποκατάστασης
RBC	Red blood cells	Ερυθρά αιμοσφαίρια
PLT	Platelets	Αιμοπετάλια
RBC-EVs	Red blood cell-derived extracellular vesicles	Ερυθροκυτταρικά εξωκυτταρικά κυστίδια
PEVs	Platelet-derived extracellular Vesicles	Αιμοπεταλιακά εξωκυτταρικά κυστίδια
RBC-MVs	Red blood cell-derived microvesicles	Ερυθροκυτταρικά μικροκυστίδια
PMVs	Platelet-derived microvesicles	Αιμοπεταλιακά μικροκυστίδια
MVBs	Multi-vesicular bodies	Πολυκυστιδιακά σωματίδια
ESCRT	Endosomal sorting complex Required for transport	Σύμπλεγμα ενδοσωμικής διαλογής
PS	Phosphatidylserine	Φωσφατιδυλοσερίνη
PE	Phosphatidylethanolamine	Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη
PC	Phosphatidylcholine	Φωσφατιδυλοχολίνη
SM	Sphingomyelin	Σφιγγομυελίνη
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδικής αδενίνης

ADP	Adenosine diphosphate	Διφωσφορική αδενοσίνη
ATP	Adenosine triphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
ROS	Reactive oxygen species	Δραστικές ρίζες οξυγόνου
Pt-INR	Prothrombin time	Χρόνος προθρομβίνης
aPTT	Activated partial thromboplastin time	Χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης
vWf	Von Willebrand factor	Παράγοντας von Willebrand
Ricof	Ristocentin cofactor	Συμπαράγοντας ριστοκετίνης
PFA	Platelet function assay	Δοκιμασία για λειτουργικότητα αιμοπεταλίων
IgGs	Immunoglobulin G	Αιμοσφαιρίνη Γ

Εισαγωγή

1. Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια

1.1 Επιδημιολογία

Η χρόνια νεφρική νόσος (ΧΝΝ) ή χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ) είναι μια πολύπλοκη ασθένεια που επηρεάζει περισσότερα από είκοσι εκατομμύρια άτομα στις Ηνωμένες Πολιτείες και περισσότεροι από 500.000 άνθρωποι ζουν με νεφρική νόσο τελικού σταδίου (ESRD). ¹Χωρίς αμφιβολία, είναι μια εξουθενωτική ασθένεια και τα πρότυπα ιατρικής περίθαλψης συνιστούν μία επιθετική παρακολούθηση για την εξέλιξη της νόσου και έγκαιρη παραπομπή σε ειδικούς για αιμοκάθαρση ή πιθανή μεταμόσχευση νεφρού. ¹

Αν και η ΧΝΑ μπορεί να είναι ασυμπτωματική στα πρώιμα στάδια, μπορεί να σχετίζεται με μια σειρά από σοβαρές επιπλοκές, όπως αυξημένη συχνότητα καρδιαγγειακών παθήσεων, υπερλιπιδαιμία, αναιμία, αλλαγές στους ηλεκτρολύτες, και μεταβολική νόσο των οστών.

1.2 Ορισμός

Οι οδηγίες για τη βελτίωση της νεφρικής νόσου (KDIGO) ορίζουν τη ΧΝΝ ή ΧΝΑ χρησιμοποιώντας δείκτες νεφρικής βλάβης, τα οποία καθορίζουν την πρωτεϊνουρία και το ρυθμό σπειραματικής διήθησης. Η παρουσία και των δύο αυτών παραγόντων (ρυθμός σπειραματικής διήθησης [eGFR] μικρότερος από 60 mL/min και λευκωματίνη μεγαλύτερη από 30 mg ανά γραμμάριο κρεατινίνης), παρουσία νεφρικής βλάβης, που επιμένει για 3 μήνες ή περισσότερο, ανεξάρτητα από τα αίτια, σημαίνει χρόνια νεφρική νόσο. ¹

Ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης (GFR) είναι μια δοκιμή που χρησιμοποιείται για να ελέγξει πόσο καλά λειτουργούν τα νεφρά. Με άλλα λόγια, υπολογίζει πόσο αίμα περνά από τα σπειράματα κάθε λεπτό, τα οποία είναι τα μικροσκοπικά φίλτρα στα νεφρά που φιλτράρουν τα απόβλητα από το αίμα. Ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης υπολογίζεται συνήθως χρησιμοποιώντας έναν μαθηματικό τύπο που συγκρίνει το βάρος, την ηλικία, το φύλο και τη φυλή ενός ατόμου με τα επίπεδα κρεατινίνης ορού.

Η ΧΝΑ είναι μια κατάσταση προοδευτικής απώλειας της νεφρικής λειτουργίας που οδηγεί τελικά στην ανάγκη θεραπείας νεφρικής υποκατάστασης (αιμοκάθαρση ή μεταμόσχευση). Η νεφρική νόσος τελικού σταδίου ορίζεται ως GFR μικρότερος από 15 mL/min.

Το Εθνικό Ίδρυμα Νεφρού ανέπτυξε κριτήρια ώστε να διευκολυνθεί η αξιολόγηση της βαρύτητας της ΧΝΝ, και να ταξινομηθούν οι ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ανάλογα με τα στάδια βαρύτητας: ²

- Στάδιο 1: Νεφρική βλάβη με φυσιολογικό GFR (άνω των 90 ml/min).
- Στάδιο 2: Ήπια μείωση του GFR (60-89 mL/min).
- Στάδιο 3α: Μέτρια μείωση του GFR (45 έως 59 mL/min).
- Στάδιο 3β: Μέτρια μείωση του GFR (30 έως 44 mL/min).
- Στάδιο 4: Σοβαρή μείωση του GFR (15 έως 29 mL/min).
- Στάδιο 5: Νεφρική ανεπάρκεια (GFR λιγότερο από 15 mL/min) ή Νεφρική νόσος τελικού σταδίου (ESRD) (End Stage Renal Disease).

1.3 Λειτουργία

Η κύρια λειτουργία των νεφρών είναι η διατήρηση της ομοιόστασης, που αφορά την ρύθμιση του όγκου (εξωκυττάριου) υγρού, την ρύθμιση της ωσμωτικότητας και την ηλεκτρολυτική, οξεοβασική ισορροπία. Τα νεφρά συμμετέχουν στην απέκκριση των αζωτούχων προϊόντων του μεταβολισμού και επίσης, παράγουν ένζυμα, ορμόνες και βιταμίνες, όπως την ερυθροποιητίνη, την ρενίνη και τη 1,25-διυδροξυβιταμίνη D3. Πιο συγκεκριμένα, η ερυθροποιητίνη διεγείρει την ερυθροποίηση, δηλαδή την παραγωγή και την ωρίμανση των ερυθρών στο μυελό των οστών. Τέλος, από τους νεφρούς αποβάλλονται όλα τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού, καθώς επίσης τα φάρμακα και άλλες τοξίνες που μπαίνουν στην αιματική κυκλοφορία. Όταν κάποιος πάσχει από χρόνια νεφρική ανεπάρκεια οι νεφροί παύουν να λειτουργούν σωστά, οι άχρηστες ουσίες (ουραιμικές τοξίνες) συσσωρεύονται στο αίμα, πολλές ορμόνες δεν παράγονται επαρκώς και τα ούρα δεν σχηματίζονται προκαλώντας έτσι με αρνητικές επιπτώσεις σε σχεδόν κάθε σύστημα οργάνων, αν και κυρίως στο καρδιαγγειακό.³

1.4 Αίτια

Οι δύο κύριες αιτίες της χρόνιας νεφρικής νόσου είναι ο σακχαρώδης διαβήτης (30-50%) και η υψηλή αρτηριακή πίεση (27%). Ο διαβήτης εμφανίζεται όταν το σάκχαρο στο αίμα σας είναι πολύ υψηλό, προκαλώντας βλάβη σε πολλά όργανα στο σώμα σας. Κάθε νεφρό αποτελείται από εκατομμύρια μικροσκοπικά φίλτρα που ονομάζονται νεφρώνες.

Με την πάροδο του χρόνου, το υψηλό σάκχαρο στο αίμα μπορεί να βλάψει τα αιμοφόρα αγγεία και τους νεφρώνες, με αποτέλεσμα να μην λειτουργούν τα νεφρά όπως θα έπρεπε. Η υψηλή αρτηριακή πίεση, η οποία μπορεί επίσης να βλάψει τα νεφρά, συχνά αναπτύσσεται παράλληλα με τον διαβήτη. Αν η υπέρταση είναι ανεξέλεγκτη, αυξάνεται η πίεση στα αιμοφόρα αγγεία, και μπορεί να είναι η αιτία για καρδιακών προσβολών, εγκεφαλικών επεισοδίων και χρόνιας νεφρική ανεπάρκεια. Επίσης, η χρόνια νεφρική νόσος μπορεί να προκαλέσει από μόνη της υψηλή αρτηριακή πίεση.⁴

Άλλες καταστάσεις που επηρεάζουν τα νεφρά είναι:

- ❖ σπειραματονεφρίτιδα: προκαλεί φλεγμονή και βλάβες στις μονάδες φιλτραρίσματος των νεφρών και είναι ο τρίτος πιο κοινός τύπος νεφρικής νόσου.
- ❖ κληρονομικές ασθένειες όπως η πολυκυστική νόσος των νεφρών, η οποία προκαλεί τη δημιουργία μεγάλων κύστεων στα νεφρά και καταστρέφει τον περιβάλλοντα ιστό.
- ❖ δυσπλασίες που εμφανίζονται καθώς το μωρό αναπτύσσεται ακόμη στη μήτρα. Για παράδειγμα, μπορεί να εμφανιστεί στένωση που εμποδίζει την κανονική ροή ούρων και τα ούρα ρέουν πίσω στο νεφρό, προκαλώντας λοιμώξεις.
- ❖ λύκος και άλλες ασθένειες που επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα.
- ❖ αποφράξεις που προκαλούνται από προβλήματα όπως πέτρες στα νεφρά, όγκοι ή διόγκωση του προστάτη στους άνδρες.
- ❖ επαναλαμβανόμενες ουρολοιμώξεις.
- ❖ φάρμακα.

1.5 Επιπλοκές σε Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια

1.5.1. Αναιμία

Η αναιμία ορίζεται ως η μείωση σε μία ή περισσότερες από τις κύριες μετρήσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων, την συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, ο αιματοκρίτης ή ο αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων. Μια νορμοχρωμική, νορμοκυτταρική αναιμία συνήθως συνοδεύει την προοδευτική ΧΝΑ, περίπου στο 50%, καθώς η αναιμία μπορεί να υπάρχει σε ασθενείς σε οποιοδήποτε στάδιο, υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της αναιμίας και τη σοβαρότητα της ΧΝΑ. Το ένα τέταρτο των ασθενών με σταδίου 1, οι μισοί από αυτούς ταξινομούνται σε ΧΝΑ στάδια 2, 3 και 4 και τα τρία τέταρτα των ασθενών με ΧΝΑ που ξεκινούν αιμοκάθαρση πάσχουν από αναιμία.²

Ενώ η αναιμία στη ΧΝΝ μπορεί να προκύψει από πολλαπλούς μηχανισμούς (ανεπάρκεια σιδήρου, φυλλικού οξέος ή βιταμίνης Β12, γαστρεντερική αιμορραγία, σοβαρός υπερπαραθυρεοειδισμός, συστηματική φλεγμονή και μειωμένη επιβίωση ερυθρών αιμοσφαιρίων), η πιο σημαντική αιτιολογία που σχετίζεται με την αναιμία φαίνεται να είναι η μειωμένη σύνθεση ερυθροποιητίνης.

Η ερυθροποιητίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη και ορμόνη που εκκρίνεται από τους διάμεσους ινοβλάστες των νεφρών και είναι υπεύθυνη για την διέγερση του μυελού των οστών για την παραγωγή και διαφοροποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στη ΧΝΑ τελικού σταδίου, η σωληναριακή ατροφία προκαλεί σωληναριακή ίνωση, η οποία οδηγεί πάντα σε αναιμία η οποία έχει προκληθεί κυρίως με μειωμένη απελευθέρωση ερυθροποιητίνης από τους ελαττωματικούς νεφρούς με περαιτέρω διαταραχή της ερυθροποίησης.²

Ωστόσο, η υποκατάσταση της ερυθροποιητίνης αναστρέφει μόνο εν μέρει την αναιμία υποδεικνύοντας ότι εμπλέκονται και άλλοι μηχανισμοί. Όπως φαίνεται πιο πρόσφατα, η αναιμία της ESRD είναι πράγματι σε μεγάλο βαθμό αποτέλεσμα επιταχυνόμενης απώλειας ερυθροκυττάρων λόγω κυτταρικού θανάτου ή μειωμένη επιβίωση που χαρακτηρίζεται από συρρίκνωση του ερυθρού και αναδιαμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης, που θα συζητηθεί αναλυτικά παρακάτω. Τα ερυθροκύτταρα εν τέλει εκθέτουν φωσφατιδυλοσερίνη και φαγοκυτταρώνονται, και έτσι απομακρύνονται γρήγορα από την κυκλοφορία του αίματος. Εάν η απώλεια των ερυθροκυττάρων δεν μπορεί να αντισταθμιστεί πλήρως με ενισχυμένη ερυθροποίηση, τότε η ώθηση σε κυτταρικό θάνατο ή ερυθρόπτωση θα οδηγήσει οπωσδήποτε σε αναιμία.⁵

Η αναιμία στην ESRD οδηγεί σε μειωμένη επιβίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και ανεπάρκεια ερυθροποιητίνης (Epo), λόγω της καταπόνησης των κυττάρων όταν υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Με άλλα λόγια, δημιουργείται στρες στα ερυθρά κατά τη ροή του αίματος μέσω της συσκευής αιμοκάθαρσης, και επίσης, μεταβολικό στρες από το δυσμενές περιβάλλον πλάσματος που περιέχει βλαβερές τοξίνες (μεταβολιτών) και απώλεια γλυκόζης.⁶

Η αναιμία τελικά αυξάνει τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα από καρδιαγγειακές επιπλοκές όπως στηθάγχη, υπερτροφία αριστερής κοιλίας και επιδείνωση της καρδιακής ανεπάρκειας, η οποία επιδεινώνει περαιτέρω τη νεφρική βλάβη και δημιουργεί έναν

φαύλο κύκλο που ονομάζεται «σύνδρομο καρδιονεφρικής αναιμίας», που σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.²

1.5.2. Ουραιμικές τοξίνες

Το ουραιμικό σύνδρομο σε ασθενείς με ΧΝΝ ή ΧΝΑ είναι κατά κύριο λόγο αποτέλεσμα της ανεπαρκούς απομάκρυνσης και της επακόλουθης συσσώρευσης οργανικών προϊόντων στο αίμα, που σε φυσιολογικές συνθήκες μεταβολίζονται και τέλος απεκκρίνονται από τους νεφρούς. Η κατακράτηση των ουραιμικών τοξινών οδηγεί σε ένα δυσμενές περιβάλλον που χαρακτηρίζεται από μία πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ διάφορα κατακρατούμενα μόρια και την αρνητική τους επίδραση σε πολλά συστήματα οργάνων.³

Το πιο συχνό τρόπο ταξινόμησης αυτών των τοξινών βασίζεται στις φυσικοχημικές ιδιότητές τους που επηρεάζουν την απομάκρυνσή τους κατά την διαδικασία αιμοκάθαρσης:

- μικρά, υδατοδιαλυτά μόρια: Το μοριακό βάρος (MW) αυτών των ενώσεων είναι γενικά ≤ 500 Da. Αυτές οι ενώσεις μπορεί να εμφανίζουν ή όχι έντονη τοξική δράση. Αυτά τα μόρια περιλαμβάνουν την ουρία και η κρεατινίνη απομακρύνονται εύκολα με αιμοκάθαρση.
- μεσαία μόρια: Αυτές οι ενώσεις έχουν MW > 500 Da και αφαιρούνται μόνο μέσω αιμοκάθαρσης με χρήση μεμβρανών μεγάλων πόρων. Πολλές ενώσεις σε αυτήν την ομάδα είναι πεπτίδια που είναι τοξικά για πολλαπλά συστήματα οργάνων, όπως η $\beta 2$ μικροσφαιρίνη και η λεπτίνη.
- μόρια συνδεδεμένα με πρωτεΐνες: Οι περισσότερες ενώσεις αυτής της ομάδας έχουν χαμηλό MW, αλλά μερικές έχουν χαρακτηριστικά παρόμοια με τα μεσαία μόρια. Αυτές οι ενώσεις προέρχονται από το μεταβολισμό των αμινοξέων. Πολλές από αυτές τις ενώσεις είναι τοξικές και δύσκολα αφαιρούνται μέσω της αιμοκάθαρσης.³

Η συσσώρευση ουραιμικών τοξινών ως αποτέλεσμα της επιδείνωσης της σπειραματικής διήθησης (GFR) έχει βλαβερή επίδραση σε διάφορες λειτουργίες του σώματος και οδηγεί σε καρδιακή ανεπάρκεια, υπέρταση και υπερφόρτωση υγρών.³

1.6 Αιμοκάθαρση ως Θεραπεία (Renal Replacement)

Ο πληθυσμός των ασθενών με νεφρική νόσο τελικού σταδίου (ESRD) αυξάνεται συνεχώς, και περισσότεροι από 500.000 άνθρωποι μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες ζουν με νεφρική νόσο τελικού σταδίου (ESRD). Η ανάπτυξη και η εξέλιξη αυτής της καταληκτικής νόσου συνεπάγεται με κακή ποιότητα ζωής και πρόωρη θνησιμότητα.¹

Χάρη σε διαφορετικές μορφές θεραπειών νεφρικής υποκατάστασης (RRTs), υπολογίζεται ότι >1 εκατομμύριο ασθενείς με ESRD μπορούν να επιβιώσουν. Σε άτομα με ESRD, η αιμοκάθαρση είναι η κύρια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη διάχυτη κάθαρση των ουραιμικών τοξινών χαμηλού μοριακού βάρους, τα «απόβλητα του οργανισμού», και την απομάκρυνση το περίσσεια υγρών από τον οργανισμό όταν τα νεφρά αδυνατούν να το κάνουν. Η αιμοκάθαρση είναι εξαιρετικά αποτελεσματική στην απομάκρυνση μικρών, υδατοδιαλυτών ενώσεων, ολοένα και πιο αποτελεσματική με μόρια μεσαίου μοριακού βάρους, αλλά λιγότερο αποτελεσματική στην απομάκρυνση των (protein-bound) δεσμευμένων με πρωτεΐνη ουραιμικών τοξινών.⁷

Οι μέθοδοι αιμοκάθαρσης (HD) μπορούν να υποδιαιρεθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες: αιμοκάθαρση χαμηλής ροής (low flow-HD), αιμοκάθαρση υψηλής ροής (highflow-HD) και αιμοδιαδιήθηση (HDF). Ο μηχανισμός που εμπλέκεται στην αιμοκάθαρση είναι η διάχυση για την αποκατάσταση του ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού υγρού χρησιμοποιώντας μια μεμβράνη με μικρούς πόρους και χαμηλό συντελεστή υπερδιήθησης. Το ποσοστό θνησιμότητας των ασθενών εξακολουθεί να είναι 15-25% ετησίως και η νοσηρότητα είναι πολύ μεγάλη, επηρεάζοντας έτσι την ποιότητα ζωής.⁷ Αν και αφαιρεί αποτελεσματικά μόρια μικρού μοριακού βάρους, δυσκολεύεται να αφαιρέσει άλλα συστατικά, όπως τα μόρια που συνδέονται με πρωτεΐνες, ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους). Επιπλέον, η αιμοκάθαρση συχνά προκαλεί οξειδωτικό και/ή αιμοδυναμικό στρες που οδηγεί σε καταστάσεις που μπορεί να αυξήσουν τον σχηματισμό εξωκυτταρικών κυστιδίων, όπως θα δούμε παρακάτω.

2. Εξωκυτταρικά κυστίδια

2.1 Εισαγωγή

Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (EV's) είναι εξωκυτταρικές δομές που οριοθετούνται από μια διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων και απελευθερώνονται από διαφορετικούς τύπους

κυττάρων σε διάφορα σωματικά υγρά, δηλαδή στο αίμα και σε άλλα σωματικά υγρά, όπως του σάλιου, του μητρικού γάλακτος, των ούρων, του σπέρματος, των πτυέλων, του εγκεφαλονωτιαίου υγρού κλπ. Τα EVs απελευθερώνονται υπό φυσιολογικών συνθηκών, όπως η ωρίμανση, η γήρανση και η ενεργοποίηση των κυττάρων, διαδικασία που επιδεινώνεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις.⁸

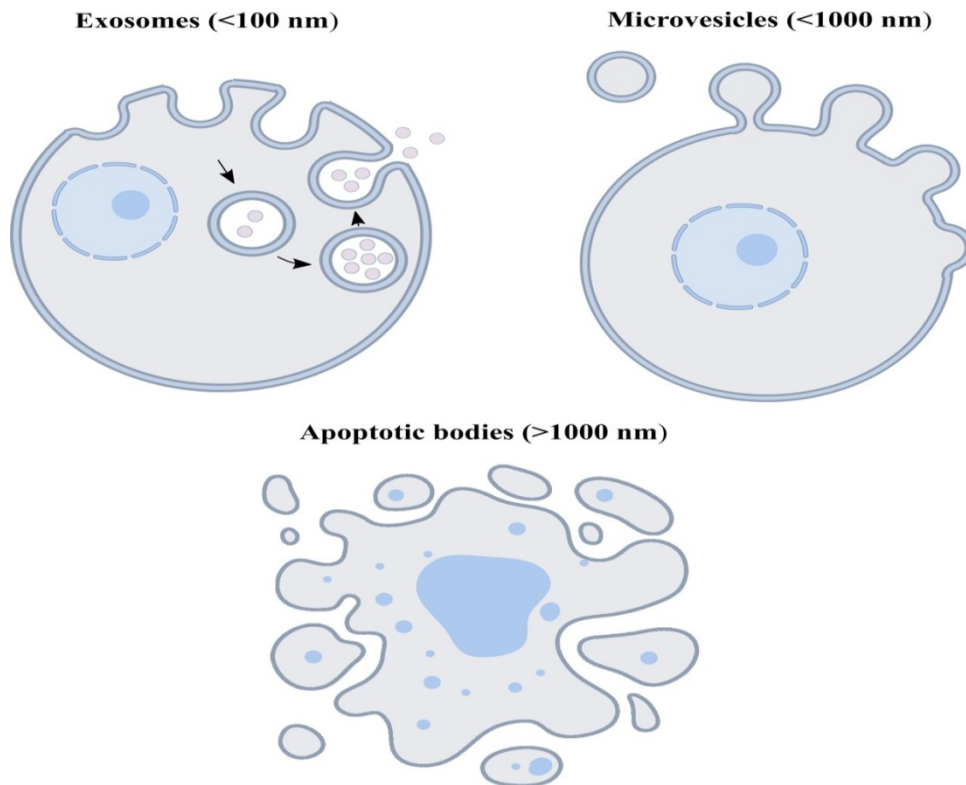
Το 1967, ο Peter Wolf αναγνώρισε για πρώτη φορά μικρά προπηκτικά σωματίδια που προέρχονται από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια στο ανθρώπινο αίμα, και τα ονόμασε «αιμοπεταλιακή σκόνη». Αυτό το εύρημα ήταν πολύ σημαντικό για την έρευνα των EV, διότι επέτρεψε την περαιτέρω μελέτη σχετικά με το ρόλο και τη λειτουργία τους σε διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.⁸

2.2 Ταξινόμηση

Τα EV είναι μικρά μεμβρανικά σωματίδια τα οποία προέρχονται από διάφορα κύτταρα και μπορεί να κυμαίνονται σε μέγεθος από 30 nm έως 5.000 nm. Οι πιο πρόσφατες οδηγίες από τη Διεθνή Εταιρεία για τα Εξωκυτταρικά Κυστίδια (ISEV) συνέστησαν τη χρήση του όρου «εξωκυτταρικά κυστίδια» ως «γενικός όρος για τα σωματίδια που απελευθερώνονται φυσικά από το κύτταρο που οριοθετούνται από μια διπλή στοιβάδα λιπιδίων και δεν μπορούν να αναπαραχθούν».⁹

Τα EVs ιστορικά ταξινομούνται σε τρεις (3) κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος, τη βιογένεση και τα βιολογικά τους χαρακτηριστικά, όπως φαίνεται και στην εικόνα παρακάτω:

- **εξωσώματα**, το μικρότερο από τα κυστίδια (30-100 nm) που απελευθερώνεται από τη σύντηξη πολυκυστιδιακών σωμάτων (multi-vesicular bodies),
- **μικροκυστίδια** (0.1-1.0 μm), αποβάλλονται από την εξωτερική στοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης,
- **αποπτωτικά σωματίδια**, τα οποία είναι μεγάλου μεγέθους κυστίδια που σχηματίζονται κατά τα τελευταία στάδια της απόπτωσης και απελευθερώνονται από τα αποπτωτικά κύτταρα¹⁰.



ΕΙΚΟΝΑ 2. Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει το μέγεθος των εξωσωμάτων, μικροκυστιδίων και αποπτωτικών σωμάτων: Τα εξωσώματα είναι κυστίδια που προέρχονται από τα ενδοσώματα, τα μικροκυστίδια προέρχονται από την εκβλάση της μεμβράνης και τα αποπτωτικά σώματα προκύπτουν από τη φυσαλιδοποίηση της αποπτωτικής κυτταρικής μεμβράνης.¹¹

Δυστυχώς, δεν υπάρχει συμφωνία μεταξύ των επιστημών σχετικά με την ονοματολογία των εξωκυτταρικών κυστιδίων, κυρίως λόγω της δυσκολίας προσδιορισμού του μηχανισμού βιογένεσης. Η διεθνής εταιρεία για τα εξωκυτταρικά κυστίδια δεν έχει ακόμη καταλήξει σε συγκεκριμένους δείκτες για κάθε κατηγορία, αλλά έχει προτείνει οδηγίες για τον ορισμό τους ανάλογα με:

- Φυσικά χαρακτηριστικά όπως μέγεθος (<200nm μικρό ή >200nm μεσαίο ή μεγάλο) ή πυκνότητα,
- βιοχημική σύνθεση(δείκτες επιφάνειας) (CD 63+, CD81+),
- κυτταρική προέλευση (υποξικά EV, αποπτωτικά σώματα)

Τα EVs ταξινομούνται συχνότερα χρησιμοποιώντας (σύμφωνα με) την κυτταρική τους προέλευση και διακρίνονται οι ακόλουθες κατηγορίες :

Μικροκυστίδια αιμοπεταλίων (Platelet-derived MVs, PMVs), μικροκυστίδια ερυθροκυττάρων (Red blood cell-MVs)(RBC-MVs), μικροκυστίδια ενδοθηλιακών κυττάρων και μικροκυστίδια κυττάρων προερχόμενων από όγκους. Τα ογκοσώματα είναι ένας άλλος τύπος EV, τα οποία είναι πολύ μεγαλύτερα (1-10 μm) από τα μικροκυστίδια, και προέρχονται από μεταναστευτικά κύτταρα όγκου.⁸ Ωστόσο, στην παρούσα εργασία αναλύονται μόνο τα κυστίδια των ερυθροκυττάρων και των αιμοπεταλίων.

2.2.1 Σύσταση και Δημιουργία Εξωσωμάτων

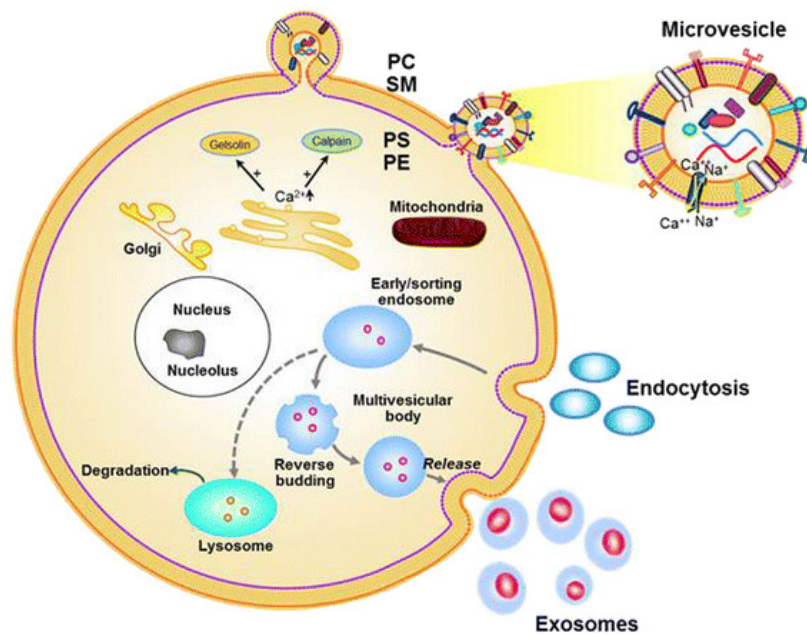
Οι κύριες κατηγορίες μη αποπτωτικών EVs είναι τα εξωσώματα και τα μικροκυστίδια, και αυτά θα αναλυθούν κυρίως καθώς υπάρχει μεγάλη διαφορά στην βιογένεση τους. Τα εξωσώματα είναι σχετικά ομοιογενή σφαιρικά θραύσματα που προέρχονται από είσοδο εξωκυττάρου υλικού, επεξεργασία, και σύντηξη των πολυκυστιδιακών σωμάτων και περιέχουν πρωτεΐνες, mRNA, microRNA και λιπίδια. Το 1987, περιγράφηκαν από τον Johnstone για πρώτη φορά εξωσώματα προερχόμενα από τα δικτυοερυθροκύτταρα.⁸ Περαιτέρω μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη δεκαετία του '80 κατέδειξαν το ρόλο τους σε φυσιολογικές διεργασίες, όπως τη συμμετοχή τους στην ωρίμανση των ερυθροκυττάρων με την αποβολή ορισμένων υποδοχέων των ερυθροκυττάρων.⁸

Τα εξωσώματα εκκρίνονται από σχεδόν όλα τα κύτταρα, (όπως τα αιμοπετάλια, τα λεμφοκύτταρα, τα αστροκύτταρα, τους ινοβλάστες και τα νεοπλασματικά κύτταρα) και επίσης έχουν βρεθεί στο πλάσμα, στα ούρα, στο σπέρμα, στο σάλιο, στο βρογχικό υγρό, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), στο μητρικό γάλα, στο αμνιακό υγρό, στο αρθρικό υγρό, στα δάκρυα, στη λέμφο, στη χολή και στο γαστρικό οξύ.¹² Τα εξωσώματα μπορούν ταξινομηθούν ανάλογα με τις λειτουργίες τους, καθώς ορισμένα συμμετέχουν στην παρουσίαση αντιγόνου και διεγείρουν την ανοσολογική απόκριση, ενώ αυτά που περιέχουν RNA εμπλέκονται στη διακυτταρική επικοινωνία.⁸

Τα εξωσώματα προέρχονται από το ενδοσωμικό διαμέρισμα, δηλαδή από την εκβλάστηση προς τα μέσα της πλασματικής μεμβράνης, για να σχηματίσουν τα πρώιμα ενδοσώματα. Το μέγεθος τους κυμαίνεται περίπου από 40 έως 150 nm και το περιεχόμενό τους αποθηκεύεται σε πολυκυστιδιακά σωματίδια (MVBs-multi vesicular bodies) τα οποία δημιουργούνται στο όψιμο ενδόσωμα. Η σύντηξη με την κυτταρική μεμβράνη έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση του περιεχόμενό τους υπό την μορφή εξωσωμάτων.¹³ Ο σχηματισμός αυτών των ενδοαυλικών σωματιδίων, όπως

αλλιώς ονομάζονται, ρυθμίζεται μέσω του συμπλέγματος ενδοσωμικής διαλογής (ESCRT), που αποτελείται από 4 σύμπλοκα πρωτεϊνών, καθώς απαιτείται για τη μεταφορά και καθοδήγηση του ενδοκυτταρικού φορτίου. Τέλος, το ESCRT δημιουργεί σπείρες που προκαλούν την εκβλάστηση προς τα μέσα, και τη σχάση των κυστιδίων για να σχηματίσουν τα MVBs, όπως φαίνεται στην εικόνα παρακάτω.¹⁴

Η απελευθέρωση και η πρόσληψη των εξωσωμάτων είναι μια ομοιοστατική διαδικασία για πολλά κύτταρα, εκτός από τα ώριμα ερυθρά που στερούνται το ενδοκυτταρικό μηχανισμό. Μόνο οι πρόδρομες μορφές της ερυθράς σειράς και τα κυκλοφορούντα δικτυοερυθροκύτταρα περιέχουν συστατικά των συμπλεγμάτων ESCRT που απαιτούνται για τη βιογένεση των εξωσωμάτων.¹⁵



ΕΙΚΟΝΑ 3. Βιογένεση EVs: (μεταξύ 0,1-1 μm σε μέγεθος, μικροκυστίδια από τη πλασματική μεμβράνη και εξωσώματα (~30-100 nm) από πολυκυστιδιακά σώματα) από κύτταρα σε φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες.¹⁶

Συντομογραφίες: PC: φωσφατιδυλοχολίνη, SM: σφιγγομυελίνη, PS: φωσφατιδυλοσερίνη, PE: φωσφατιδυλαιθανολαμίνη

2.2.2 Σύσταση και δημιουργία μικροκυστιδίων

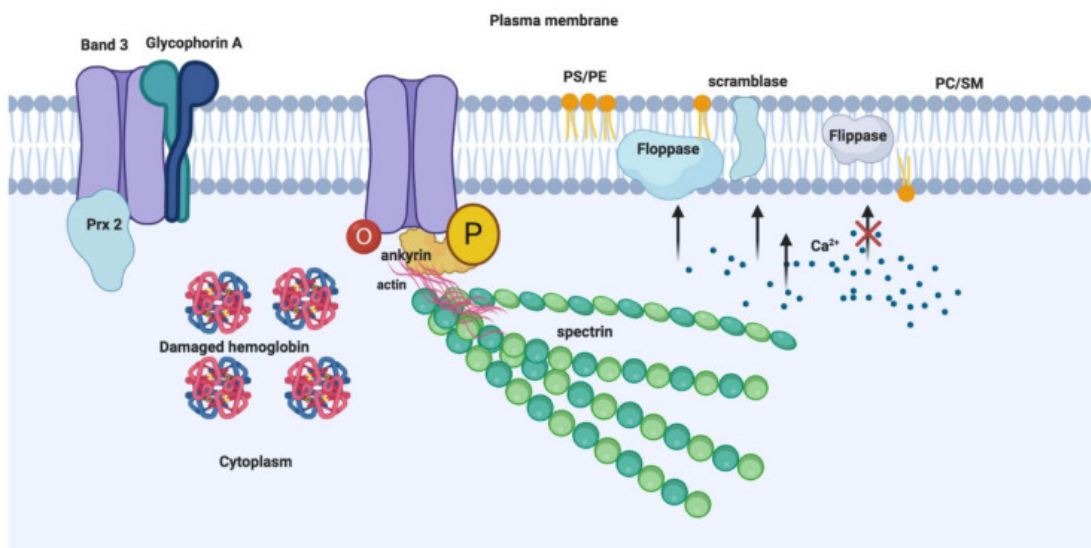
Τα μικροκυστίδια (MVs), από την άλλη πλευρά, είναι μεγαλύτερα από τα εξωσώματα και αντιπροσωπεύουν έναν πιο ετερογενή πληθυσμό κυστιδίων που προέρχονται από την εκβλάστηση προς τα έξω της πλασματικής μεμβράνης, με άλλα λόγια σχηματίζονται

απευθείας από την κυτταρική μεμβράνη, όπως φαίνεται στην εικόνα 3. ¹⁴Τα μικροκυστίδια (MVs) που κυκλοφορούν στο αίμα είναι κυστίδια διαμέτρου 100–1.000 nm που προέρχονται από την φυσαλιδοποίηση της μεμβράνης, και προέρχονται από αιμοπετάλια, ενδοθηλιακά κύτταρα, λευκοκύτταρα και ερυθρά αιμοσφαίρια.

Η κυτταρική μεμβράνη των ζωικών κυττάρων αποτελείται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων, όπου σε φυσιολογικές συνθήκες, φωσφολιπίδια που απαρτίζουν την πλασματική μεμβράνη είναι ασύμμετρα κατανομημένα. Τα ανιονικά φωσφολιπίδια όπως την φωσφατιδυλοσερίνη (Phosphat PS) και την φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) εντοπίζονται στην εσωτερική στοιβάδα, ενώ η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και η σφιγγομυελίνη (SM) εντοπίζονται στην εξωτερική στοιβάδα. Μία ομάδα ενζύμων, όπως η φλιπάση (flippase), η φλοπάση (floppase) και η σκραμπλάση (scramblase) συμμετέχουν στον έλεγχο και διατήρηση της ασυμμετρίας.¹⁷ Η ασύμμετρη κατανομή των λιπιδίων της μεμβράνης και η ελεγχόμενη κίνηση τους παίζει μεγάλο ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως της απόπτωσης, της πήξης του αίματος (δηλαδή την ενεργοποίηση αιμοπεταλίων) και της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης.¹⁸ Πιο συγκεκριμένα, σε κατάσταση αύξησης των ενδοκυττάρων ιόντων ασβεστίου, επηρεάζεται η δράση αυτών των ενζύμων, μέσω μιας διαδικασίας που εξαρτάται από μόρια ATP.¹⁴ Η αύξηση των ενδοκυττάρων ιόντων ασβεστίου ενεργοποιεί την φλοπάση (η οποία επιτρέπει τη μετακίνηση των λιπιδίων στην εξωτερική μεμβράνη) και τη σκραμπλάση, ενώ η φλιπάση (η οποία επιτρέπει την μετακίνηση των λιπιδίων στην εσωτερική μεμβράνη) απενεργοποιείται. Αυτός ο μηχανισμός έχει αποτέλεσμα το «flip-flopping» ή τη μετατόπιση του αρνητικά φορτισμένου φωσφολιπιδίου, την φωσφατιδυλοσερίνη (PS), από την εσωτερική στην εξωτερική στοιβάδα της πλασματικής μεμβράνης.¹⁰(Εικόνα 4)

Η διαδικασία της κυστιδιοποίησης επίσης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της καλπαίνης, μια ευαίσθητης στο ασβέστιο πρωτεάσης, η οποία με την σειρά της διασπά αρκετά συστατικά του κυτταροσκελετού, όπως την ακτίνη, την αγκυρίνη, την πρωτεΐνη 4.1 και την σπεκτρίνη. Η αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου έχει σαν αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του υπομεμβρανικού κυτταροσκελετού.¹⁷Κάτα την διάρκεια της αποδιάταξης του κυτταροσκελετού, οι πρωτεΐνες της μεμβράνης χάνουν τη σύνδεση με τις σκελετικές πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα τη φυσαλιδοποίηση της πλασματικής μεμβράνης και παραγωγή κυστιδίων.^(10,8)

Αυτή η διαδικασία ρυθμίζεται επίσης σε συγκεκριμένες δομικές περιοχές μικροδιαμερισματοποίησης των λιπιδίων, όπου επιτρέπεται ή εμποδίζεται η συμμετοχή πρωτεϊνών με σκοπό τη μετάδοση σημάτων ενεργοποίησης της διαδικασίας, και οι οποίες ονομάζονται λιπιδικές σχεδίες.^{10,19}



ΕΙΚΟΝΑ 4. Μηχανισμοί βιογένεσης RBC-MV (εξωκυτταρικών κυστιδίων ερυθροκυττάρων): Η δημιουργία εξωκυτταρικών κυστιδίων στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων πυροδοτείται από οξειδωμένη αιμοσφαιρίνη, την οξείδωση άλλων πρωτεϊνών και τη σχετιζόμενη με τη γήρανση αποικοδόμηση της ζώνης 3 που επηρεάζει τη κυτταροσκελετική σύνδεση με την αγκυρίνη που οδηγεί σε κυστιδιοποίηση. Ένας άλλος μηχανισμός αφορά τις αλλαγές στην κατανομή των φωσfolιπιδίων στη λιπιδική διπλοστιβάδα. Μέσω των καναλιών κατιόντων, τα ένζυμα όπως η σκραμπλάση και η καλπαΐνη ενεργοποιούνται από την οξειδωτική βλάβη ή την εισροή Ca^{2+} που οδηγεί σε αναστολή της φλιπάσης (flippase), με αποτέλεσμα την εξωτερίκευση της PS, την αποικοδόμηση του υπομεμβρανικού κυτταροσκελετού και τη συσσωμάτωση της ζώνης-3, διαδικασίες που επάγουν την αποβολή κυστιδίων.¹⁵

2.3 Κυστιδιοποίηση Ερυθροκυττάρων

Η βιογένεση των MV προερχόμενων από ερυθροκύτταρα (red blood cells, RBC) (RBC-MV), (Εικόνα 4), περιλαμβάνει σημαντική αναδιάρθρωση της μεμβράνης των κυττάρων, η οποία αποτελείται από φωσfolιπίδια και μεμβρανικές πρωτεΐνες που υπάρχουν ως μακρομοριακά σύμπλοκα με κύριο σύμπλοκο αυτό της πρωτεΐνης ιοντοανταλλάκτη, ζώνης-3. Ο υπομεμβρανικός κυτταροσκελετός περιλαμβάνει κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, όπως η σπεκτρίνη, η ακτίνη, η τροπομουσίνη, τροπομοδουλίνη, η αδουσίνη, η δεματίνη, η πρωτεΐνη 4.1R και η αγκυρίνη, μεταξύ άλλων.¹⁵

Η αλληλεπίδραση του υπομεμβρανικού κυτταροσκελετού των ερυθροκυττάρων με τη μεμβράνη προσδίδει ανθεκτικότητα και μεγάλη ικανότητα παραμόρφωσης στο ερυθροκύτταρο το οποίο είναι απαραίτητο να επιβιώσει στην κυκλοφορία, όπου δέχεται πολλές μηχανικές πιέσεις.²⁰ Ο κυτταροσκελετός των ερυθροκυττάρων αποτελείται από ένα εξαγωνικό δίκτυο το οποίο αποτελείται από τα σύμπλοκα ζεύξης στις γωνίες και στο κέντρο του εξαγώνου, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μέσω των ινιδίων σπεκτρίνης. Η αγκυρίνη συνδέει τα τετραμερή σπεκτρίνης με τη μεμβράνη μέσω σύνδεσης με τη ζώνη-3 (σύμπλοκο της ζώνης-3), και η πρωτεΐνη 4.1R σχηματίζει το δεύτερο κύριο σύμπλοκο αγκυροβόλησης του υπομεμβρανικού δικτύου σπεκτρίνης στη μεμβράνη μέσω σύνδεσης με την ακτίνη και τη ζώνη-3.^{20,21}

Τα ερυθροκύτταρα έχουν διάρκεια ζωής περίπου 120 μέρες και σταδιακά καθώς γερνούν υφίστανται πολλές αλλαγές, οι οποίες περιλαμβάνουν τη μείωση της δραστηριότητας ενζύμων, τη συσσώρευση οξειδωτικών βλαβών, την ανακατανομή ιόντων, την απώλεια μεμβράνης, με αποτέλεσμα αλλαγές στην ικανότητα παραμόρφωσης, στον όγκο και στη πυκνότητα των κυττάρων.²¹

Η δημιουργία εξωκυτταρικών κυστιδίων, τα οποία προέρχονται από ερυθρά, αποβάλλονται από την πλασματική μεμβράνη,²² και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της ομοιόστασης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC). Η διαδικασία της κυστιδιοποίησης είναι υπεύθυνη για την απώλεια του 20% της αιμοσφαιρίνης και της κυτταρικής μεμβράνης κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής γήρανσης των RBC in vivo. Η αποβολή συστατικών από κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες μέσω της κυστιδιοποίησης αποτρέπει την πρόωρη απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία.²³ Η γήρανση των RBC παρατηρήθηκε για πρώτη φορά κατά την αποθήκευση των RBC σε τράπεζα αίματος. Κατά τη διάρκεια της ζωής τους, τα ερυθροκύτταρα χάνουν σχεδόν το 20% του όγκου τους μέσω της απελευθέρωσης κυστιδίων, ενώ η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης αυξάνεται κατά 14%.^{21,24} και σημαντικό ποσοστό της υφίσταται μη αναστρέψιμη γλυκοζυλίωση (HbA1c και HbA1e2).

Όσο αφορά την κυστιδιοποίηση, φαίνεται ότι είναι ένας τρόπος με τον οποίο τα ερυθροκύτταρα μπορούν να απαλλαγούν από επιβλαβείς παράγοντες, όπως η αποδιαταγμένη (μη λειτουργική) αιμοσφαιρίνη, τα νέο-αντιγόνα γήρανσης της ζώνης-3 και οι ανοσοσφαιρίνες G (IgGs) που φαίνεται να συσσωρεύονται στην επιφάνειά των κυττάρων και επάγουν τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης.²³ Επομένως, η

απελευθέρωση κυστιδίων, παρά την απώλεια σημαντικού μέρους της μεμβράνης τους, έχει έναν «αυτοπροστατευτικό ρόλο» στα ερυθροκύτταρα καθώς τους επιτρέπει να απομακρύνουν τα επιβλαβή μόρια και να εμποδίζουν την πρόωμη απομάκρυνσή τους από την κυκλοφορία του αίματος.²⁵

Ένας άλλος μηχανισμός που ρυθμίζει την ερυθροφαγοκυττάρωση είναι μέσω του μορίου CD47, το οποίο είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη «εαυτού» για τα ερυθροκύτταρα, επιτρέποντάς τους να αναγνωρίζονται από τα μακροφάγα, εμποδίζοντας την ερυθροφαγοκυττάρωσή τους. Τα γηρασμένα ή κατεστραμμένα ερυθροκύτταρα εμφανίζουν διαταραχές στο μόριο CD47, με αποτέλεσμα να μην μπορούν πλέον να αναγνωριστούν ως «μόρια εαυτού», και να απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω των μακροφάγων.²³

2.3.1 Μηχανισμοί κυστιδιοποίησης των ερυθροκυττάρων

Τα δύο κύρια μοντέλα κυστιδιοποίησης που έχουν προταθεί και σύμφωνα με τα οποία ενεργοποιείται η απελευθέρωση κυστιδίων από τα RBC, είναι το μοντέλο «ερυθρόπτωσης» και το μοντέλο συσσωμάτωσης της ζώνης 3.

- Το μοντέλο της «ερυθρόπτωσης» είναι ένας μηχανισμός παρόμοιος με τον μηχανισμό της «απόπτωσης» των εμπύρηνων κυττάρων ως απόκριση σε διάφορα είδη στρες, αλλά αφορά τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η ερυθρόπτωση ξεκινά αρχικά με αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου, που περιλαμβάνει μια διαταραχή της ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων και τέλος την εξωτερίκευση της PS. Η έκθεση της PS προάγει την αναγνώριση από τα μακροφάγα και την εκκαθάριση των γηρασμένων ή μη φυσιολογικών ερυθρών από τον σπλήνα. Δεν δρα μόνο ως σήμα «φάε με» (eatme) για τα μακροφάγα, αλλά επίσης ενισχύει την πήξη, όπως θα συζητηθεί παρακάτω.²³
- Το μοντέλο συσσωμάτωσης της ζώνης-3 περιλαμβάνει την οξειδωση της αιμοσφαιρίνης, η οποία οδηγεί στον σχηματισμό αιμοχρωμάτων (hemichrome), δηλαδή οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης, (met-Hb) τα οποία συνδέονται στην κυτταροπλασματική περιοχή πρωτεϊνών της μεμβράνης, προκαλούν συσώρευση και συσσωμάτωση της ζώνης-3, με αποτέλεσμα τη δημιουργία του νεο-αντιγόνου γήρανσης.²³

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης αίματος σε μονάδες συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων, μοντέλο που αποτελεί έναν επιταχυνόμενο φαινότυπο γήρανσης, η αναδιαμόρφωση της μεμβράνης σχετίζεται με τη δημιουργία RBC-MVs:

- 1) που συσσωρεύουν οξειδωμένη και συσσωματωμένη ζώνη-3 και ακτίνη, αλλά όχι όρια σπεκτρίνης,
- 2) που περιέχουν οξειδωμένη αιμοσφαιρίνη,
- 3) που εξωτερικεύουν PS στην επιφάνειά τους,
- 4) που περιέχουν ακετυλοχολινεστεράση και CD55, καθώς και στοματίνη και φλοτιλίνες²¹.

2.3.1.1 Οξειδωτικό Στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι ένας όρος που περιγράφηκε για πρώτη φορά πρόσφατα το 1985 από τον Seis και ορίζεται ως η βλάβη των ιστών που προκύπτει από μια ανισορροπία μεταξύ υπερβολικής παραγωγής οξειδωτικών ενώσεων και ανεπαρκών αντιοξειδωτικών μηχανισμών.²⁶ Η αύξηση του οξειδωτικού στρες κατά τη γήρανση των ερυθρών, επάγει τη δέσμευση της αιμοσφαιρίνης στη ζώνη-3, την ενεργοποίηση των καναλιών ιόντων ασβεστίου, τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών και τη συσσώρευση της ζώνης-3, με αποτέλεσμα την κυστιδιοποίηση.²³ Τα ερυθροκύτταρα έχουν έναν εκτεταμένο αντιοξειδωτικό μηχανισμό, ο οποίος έχει σχεδιαστεί για να εξουδετερώνει τις επιβλαβείς δραστικές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS).²¹ Έτσι η αύξηση του οξειδωτικού στρες σημαίνει είτε αύξηση των ROS, είτε μείωση της αντιοξειδωτικής άμυνας λόγω της χαμηλότερης δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως της υπεροξειδικής δισμουτάσης, της καταλάσης, της αφυδρογονάσης της γλυκόζης-6-φωσφορικής και της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης. Τα δύο τελευταία ένζυμα είναι ιδιαίτερα σημαντικά διότι εμπλέκονται στο σχηματισμό μορίων αντιοξειδωτικής γλουταθειόνης και NADPH.

Στα ερυθροκύτταρα, το οξειδωτικό στρες φαίνεται να οδηγεί στη συσσωμάτωση της ζώνης-3 εξαιτίας δύο μηχανισμών:

Πρώτον, οι ROS ενεργοποιούν τις κινάσες τυροσίνης Src, οδηγώντας στη φωσφορυλίωση της ζώνης-3. Ως εκ τούτου, κατά τη γήρανση και αποθήκευση των RBC, η υπερφωσφορυλίωση της ζώνης-3 προκαλεί απομάκρυνσή της από τον κυτταροσκελετό και δημιουργία συσσωματωμάτων.²¹

Δεύτερον, οι ROS προκαλούν οξείδωση της αιμοσφαιρίνης σε αιμοχρώματα, τα οποία δεν μπορούν να δεσμεύσουν τον οξυγόνο, αλλά δεσμεύονται στην κυτταροπλασματική περιοχή της ζώνης-3, που επάγει επίσης τη συσσώρευσή της και την αποκόλλησή της από τον κυτταροσκελετό, οδηγώντας σε κυστιδιοποίηση.²¹

Με τη δημιουργία συσσωματωμάτων της ζώνης-3, όχι μόνο προάγεται η δέσμευση αυτόλογων ανοσοσφαιρινών G (IgGs) αλλά ξεκινάει και η φαγοκυτταρική απομάκρυνση των γηρασμένων ερυθρών από την κυκλοφορία του αίματος. Μάλιστα, η συμμετοχή του οξειδωτικού στρες στην απελευθέρωση κυστιδίων υποστηρίζεται από την ιδέα ότι μια θεραπεία με αντιοξειδωτικά έχει την ικανότητα να μειώσει τον σχηματισμό MVs.²¹

Σε μια μελέτη των Stowell et.al, για παράδειγμα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο σχηματισμό εξωκυτταρικών κυστιδίων με την προσθήκη ασκορβικού οξέος στα ερυθροκύτταρα κατά την αποθήκευσή τους, γεγονός το οποίο αποδεικνύει την θεωρία του οξειδωτικού στρες. Τα EVs δεν παρατηρούνται μόνο κατά αποθήκευση των ερυθροκυττάρων αλλά και σε διάφορες αιμοσφαιρινοπάθειες, όπως στη δρεπανοκυτταρική αναιμία, όπου η ανώμαλη αιμοσφαιρίνη S οδηγεί σε αστάθεια της μεμβράνης και συνεπώς αυξημένη κυστιδιοποίηση.²³ Ομοίως, τα κυστίδια από το αίμα ασθενών με θαλασσαιμία περιέχουν επίσης υψηλές συγκεντρώσεις οξειδωμένων, αποδιαταγμένων αλυσίδων άλφα σφαιρίνης, κάτι που επίσης υποστηρίζει το γεγονός ότι η προσθήκη αντιοξειδωτικών μπορεί να αναστείλει τη βιογένεση των μικροκυστιδίων.²⁷

3. Κυστιδιοποίηση Αιμοπεταλίων (PLT)

Είναι ευρέως αποδεκτό πλέον ότι τα αιμοπετάλια είναι η κύρια πηγή εξωκυτταρικών κυστιδίων στην κυκλοφορία του αίματος, παρά το γεγονός ότι ο αριθμός τους και τα ακριβή ποσοστά τους στην κυκλοφορία ως προς το σύνολο των κυστιδίων, ακόμη διερευνώνται. Εξωκυτταρικά κυστίδια προερχόμενα από αιμοπετάλια (PEVs) απελευθερώνονται κατά τη διέγερση των αιμοπεταλίων, ενώ τα κυστίδια προερχόμενα από μεγακαρυοκύτταρα απελευθερώνονται από τα μεγακαρυοκύτταρα στον μυελό των οστών και στη συνέχεια στο αίμα.²⁸

Τα PEVs εντοπίστηκαν αρχικά σε πλάσμα χωρίς αιμοπετάλια, αλλά το γεγονός ότι είναι πλούσια σε αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, τους προσέδωσε την ικανότητα να συμμετέχουν στη διαδικασία της πήξης.²⁹ Ενώ όμως έχουν μελετηθεί ευρέως *in vitro*, υπάρχει ελάχιστη κατανόηση κατά πόσο τα PEVs που παράγονται *ex vivo*

είναι παρόμοια με αυτά *in vivo* (δηλαδή στην κυκλοφορία), όσο αφορά τη σύνθεση και τη λειτουργία τους³⁰

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα PEVs συνήθως δημιουργούνται με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από αγωνιστές, το αιμοδυναμικό στρες, τη γήρανση και σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, και έχουν συσχετιστεί τόσο με μη λοιμώδεις χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους (π.χ. αθηροσκλήρωση, σακχαρώδη διαβήτη, στεφανιαία νόσο, υπέρταση) όσο και με λοιμώδεις νόσους (π.χ. γρίπη, COVID-19). Όσο αφορά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων ως απόκριση στη διέγερση από διαλυτού αγωνιστή (όπως την θρομβίνη, την ADP και του κολλαγόνο) ή ως απόκριση στις υψηλές πιέσεις που υφίστανται λόγω της κυκλοφορίας του αίματος,³¹ έχει παρατηρηθεί παρατεταμένη αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, η οποία προκαλεί την διατάραξη ή απώλεια της ασυμμετρίας της πλασματικής μεμβράνης, καθώς και την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, και τελικά την δημιουργία των κυστιδίων.³²

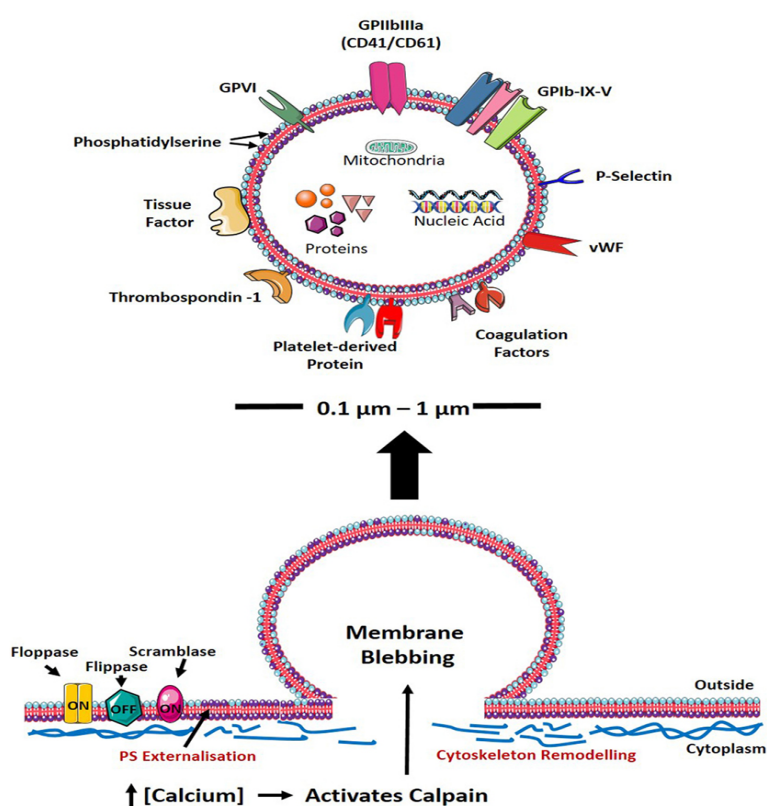
3.1 Σχηματισμός εξωκυτταρικών κυστιδίων από αιμοπετάλια (PLT)

Τα φωσφολιπίδια στην πλασματική μεμβράνη οργανώνονται σε δύο στοιβάδες, με τη φωσφατιδυλοχολίνη (PC) στην εξωτερική στοιβάδα και τη φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και τη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) στην εσωτερική στοιβάδα. Τα αιμοπετάλια μπορούν να ενεργοποιηθούν κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής αιμοστατικής απάντησης, με την PS και την PE να μετακινούνται στην εξωτερική στοιβάδα, δημιουργώντας μια αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια στην μεμβράνη που υποστηρίζει το σχηματισμό πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, τα οποία εμπλέκονται στον καταρράκτη της πήξης.³⁰

Η έκθεση αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων, όπως της φωσφατιδυλοσερίνης (PS), στην εξωτερική στοιβάδα της πλασματικής μεμβράνης ρυθμίζεται από την διαμεμβρανική πρωτεΐνη σκραμπλάση. Αντίστοιχα, και η καλπαΐνη, μια εξαρτώμενη από το ασβέστιο πρωτεάση, παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της ασυμμετρίας και της κυτταροσκελετικής αναδιοργάνωσης διευκολύνοντας έτσι την αποβολή των PEVs. Όπως φαίνεται στην εικόνα (5) παρακάτω, απαιτείται αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού για το σχηματισμό μεγάλου αριθμού PEVs, που οδηγεί στη φυσαλιδοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης σε συγκεκριμένες περιοχές πλούσιες σε λιπίδια, η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον πολυμερισμό των ινιδίων ακτίνης και τη διάσπασή τους από την δράση της καλπαΐνης.³³

Η απομάκρυνση του μεγάλου μεγέθους PEVs από την κυκλοφορία έχει βρεθεί ότι προκαλείται επίσης από την έκθεση της PS, η οποία όχι μόνο επιτρέπει τη δέσμευση των παραγόντων πήξης, αλλά προάγει επίσης την εκκαθάρισή τους από την κυκλοφορία μέσω των υποδοχέων που έχουν τα μακροφάγα για την PS.³⁴

Αντίθετα, τα μη διεγερμένα αιμοπετάλια έχουν δείξει ότι δημιουργούν PMVs μέσω σηματοδότησης στην οποία εμπλέκεται το μόριο GPIIb/IIIa, η οποία αποσταθεροποιεί τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των PEVs απουσία διέγερσης από διαλυτό αγωνιστή, δηλαδή την θρομβίνη, την ADP και το κολλαγόνο.³⁵



Εικόνα 5. Σχηματισμός αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων (PMV) και τα χαρακτηριστικά τους: Κατά την κυτταρική ενεργοποίηση, η αύξηση του ασβεστίου αναστέλλει τη φλιπάση (flippase), ενώ ενεργοποιεί τη φλοπάση (floppase) και τη σκραμπλάση (scramblase), με αποτέλεσμα την εξωτερίκευση της αρνητικά φορτισμένης φωσφατιδυλσερίνης (PhosphatPS) (το μωβ φωσφολιπίδιο). Το αυξημένο ασβέστιο οδηγεί σε αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ενεργοποιώντας την καλπαΐνη, αποβάλλοντας (κόβοντας) έτσι τα PMV στην κυκλοφορία. Επίσης, μοιράζονται πολλές επιφανειακές πρωτεΐνες με τα αιμοπετάλια, όπως τις ιντεγκρίνες, σελεκτίνες, υποδοχείς προσκόλλησης, vWF, παράγοντες πήξης, κλπ. Τα PMV περιέχουν νουκλεϊκά οξέα (mRNA, miRNA και RNA) και μιτοχόνδρια.³⁶
 PMV: αιμοπεταλιακά κυστίδια, PS: φωσφατιδυλοσερίνη, vWF: παράγοντας von Willebrand, RNA: ριβονουκλεϊκόξύ, mRNA: αγγελιαφόρο RNA, miRNA: microRNA.

3.2 Δομή και Σύνθεση

Γενικά, τα PEVs είναι κυστίδια διαμέτρου περίπου 30 έως 800 nm, των οποίων το μέγεθος και η ποσότητα καθιστούν δύσκολη την απομόνωση και τον σωστό χαρακτηρισμό τους.

Τα PEVs φέρουν τις περισσότερες πρωτεΐνες και υποδοχείς που εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη, και περιέχουν περισσότερες από 40 γλυκοπρωτεΐνες που είναι χαρακτηριστικές των αιμοπεταλίων, όπως οι δείκτες επιφανείας GPIIb/IIIa (CD41) και GPIa/IIa (CD49b/CD29), P-σελεκτίνη, GP53 (CD63), καθώς και έναν υποδοχέα που βρίσκεται στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (ο υποδοχέας ενεργοποιημένης γλυκοπρωτεΐνης IIb/IIIa PAC-1). Κατά την ενεργοποίηση, τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν πολλές βιοδραστικές ουσίες, που συνήθως αποθηκεύονται στα πυκνά α κοκκία τους.

Τα μεγάλα κυστίδια, με διάμετρο 400 έως 600 nm, από την άλλη πλευρά, φέρουν το σύμπλεγμα προθρομβινάσης και τον παράγοντα V (από τα α κοκκία) και επιπλέον, εκφράζουν υποδοχείς όπως τον υποδοχέα ινωδογόνου αIIb/β3, τον υποδοχέα του παράγοντα von Willebrand, GPIb και την P-selectin.³⁷ Επιπλέον, τα PMVs όχι μόνο εκφράζουν πρωτεΐνες στην κυτταρική επιφάνεια, αλλά και στο κυτταρόπλασμά τους, που περιλαμβάνει RNA, miRNA και πιθανώς DNA, που μπορούν να μεταφερθούν σε κύτταρα στόχους.³³ Έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν ποικίλο φορτίο (π.χ. RNA, λιπίδια, πρωτεΐνες) σε όργανα και ιστούς που δεν είναι προσβάσιμα στα αιμοπετάλια. Ενώ τα αιμοπετάλια δεν μπορούν να διασχίσουν τους ιστικούς φραγμούς, τα κυστίδια μπορούν να εισέλθουν στο μυελό των οστών, στη λέμφο και στο αρθρικό υγρό, που σημαίνει ότι μπορεί να συμβάλλουν σε πιο απομακρυσμένη κυτταρική επικοινωνία.³⁸

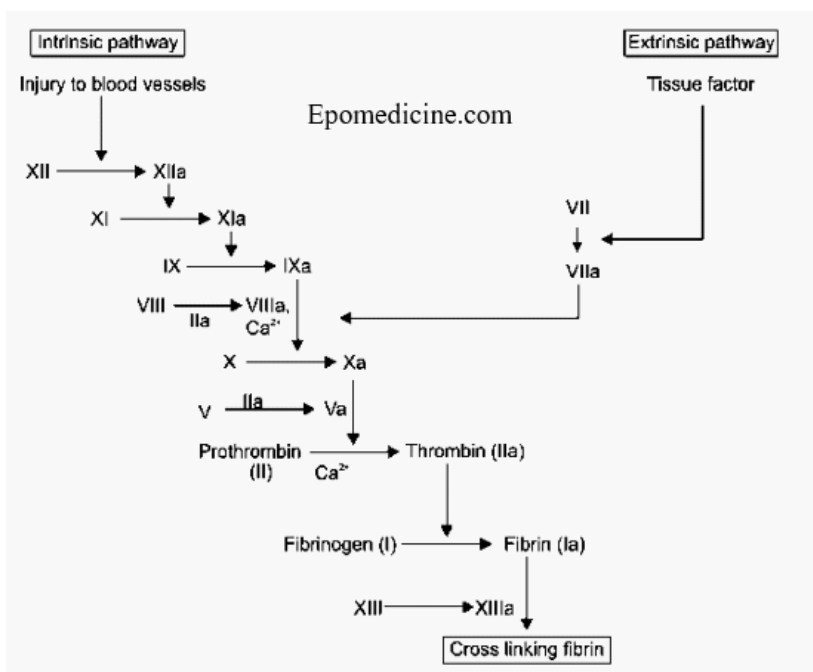
4. Διαταραχές Πήξης στην ΧΝΑ

Ο κίνδυνος για αιμορραγία με διαταραχές στη πήξη, καθώς και αναιμία, αποτελούν σε μεγάλο βαθμό μέρος της παθολογίας των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Σε ασθενείς με ΧΝΑ, η αναιμία επηρεάζει άμεσα τον χρόνο αιμορραγίας,³⁹ ωστόσο μελέτες έδειξαν παθολογικά αυξημένες τιμές, δηλαδή παρατεταμένους χρόνους, στις δοκιμασίες aPTT και PT-INR, που δηλώνουν ανωμαλίες στην ενδογενή και εξωγενή οδού του καταρράκτη της πήξης.

4.1 Καταρράκτης της Πήξης

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το κλασσικό μοντέλο της πήξης περιγράφεται ως έναν «καταρράκτη» από αντιδράσεις, που αποτελούν την διαδοχική ενεργοποίηση των διαφόρων παραγόντων της πήξης μέσω δύο ξεχωριστών οδών. Αυτό το μοντέλο αντιπροσωπεύει την διαδικασία της πήξης ως μια σειρά πρωτεολυτικών αντιδράσεων όπου κάθε πρωτεάση διασπά και ενεργοποιεί την επόμενη πρωτεάση. Η πλειοψηφία των σταδίων πραγματοποιούνται σε επιφάνειες μεμβρανών φωσφολιπιδίου (φωσφατιδυλσερίνη), η οποία παρέχεται από κύτταρα όπως τα αιμοπετάλια.⁴⁰

Ο καταρράκτης της πήξης αποτελείται από δύο διαφορετικούς καταρράκτες που συγκλίνουν στο σημείο ενεργοποίησης του παράγοντα FX και αυτοί ονομάζονται ενδογενής και εξωγενής οδός. Κάθε οδός μπορεί να ενεργοποιήσει τον παράγοντα FX σε FXa, η οποία με τη σειρά της (με τον συμπαράγοντα FVa) οδηγεί στην ενεργοποίηση της προθρομβίνης σε θρομβίνη, η οποία στη συνέχεια διασπά το ινωδογόνο για να σχηματίσει το ινώδες, και τελικά το σταθερό αιμοπεταλιακό θρόμβο, όπως φαίνεται στο διάγραμμα παρακάτω.⁴⁰



ΕΙΚΟΝΑ 6. Ο καταρράκτης της πήξης: η ενδογενής και εξωγενής οδός⁴¹

Επομένως, οι παρατεταμένοι χρόνοι των PT/INR, aPTT και PFA, επιβεβαιώνει την αυξημένη τάση για αιμορραγία σε ασθενείς με ΧΝΑ, πριν από την έναρξη της αιμοκάθαρσης. Οι συγκεντρώσεις του ινωδογόνου και D-διμερών επίσης παρουσιάζουν παθολογικά υψηλές τιμές. Ενώ η αιμοκάθαρση μπορεί να εξισορροπήσει τα επίπεδα του aPTT και του PT-INR, ωστόσο στις συγκεντρώσεις του ινωδογόνου και D-διμερών δεν έχει καμία επίδραση, πιθανόν λόγω της ταυτόχρονης αύξησης των παραγόντων πήξης και φυσικούς αναστολείς από την ενεργοποίηση που προκαλεί η ίδια η αιμοκάθαρση.

Επιπλέον διαταραχές στην αιμόσταση για τους ασθενείς με ΧΝΑ τελικού σταδίου, αποτελούν τα υψηλά επίπεδα του παράγοντα FVIII, η αυξημένη ενεργότητα των παραγόντων von Willebrand factor (vWf), FV, FVIII, FXII και Ricof, μετά την αιμοκάθαρση. Μελέτες έδειξαν χαμηλά επίπεδα ADAMTS-13, ένα ένζυμο υπεύθυνο για την απομάκρυνση των υψηλού μοριακού βάρους πολυμερών vWF από την κυκλοφορία, καθώς και υψηλά επίπεδα του αναστολέα του ADAMTS-13, σε συνδυασμό με αυξημένη δράση vWf ειδικά μετά την αιμοκάθαρση.⁴² Έχει δειχθεί επίσης ότι η αντιστρόφως ανάλογη σχέση της χαμηλής δραστηριότητας ADAMTS-13 με την υψηλή συγκέντρωση vWF πιθανό να συμβάλλει σε μία προθρομβωτική κατάσταση με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων και θάνατο στους ασθενείς υπό αιμοκάθαρση,⁴³ η οποία φαίνεται να προάγει την προθρομβωτική τάση λόγω της αύξησης της δραστηριότητας αρκετών παραγόντων πήξης, του ινωδογόνου και του αναστολέα του ADAMTS-13.⁴²

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με ΧΝΑ που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση φαίνεται επίσης να είναι αποτέλεσμα της θεραπείας αιμοκάθαρσης, η οποία προκαλεί αιμοδυναμικό (μηχανικό) ή/και οξειδωτικό στρες λόγω της καταπόνησης των κυττάρων.⁴⁴ Επίσης, τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μπορεί να συμβάλλουν στην ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου στους ασθενείς με ΧΝΑ λόγω του σχηματισμού θρόμβων μετά τη προσρόφηση τους στις μεμβράνες αιμοκάθαρσης.^{44,45} Όσον αφορά τα αιμοπετάλια από ουραιμικούς ασθενείς, μελέτες δείχνουν μία σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα στην συμμετοχή του μηχανισμού πήξης σε σχέση με τα αιμοπετάλια από τον φυσιολογικό πληθυσμό. Αυτή η αυξημένη δραστηριότητα οφείλεται εν μέρει στην ενισχυμένη έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στη εξωτερική στοιβάδα των μεμβρανών των αιμοπεταλίων, και σε μια διαδικασία που εμπλέκεται η κασπάση-3. Η κασπάση-3 έχει πιο ισχυρή δράση, και με την αναστολή που προκαλεί, μειώνει την έκθεση της PS, τονίζοντας τον κεντρικό ρόλο της κασπάσης-3 στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και

συνεπώς, στην παθογένεση της καρδιαγγειακής νόσου,⁴⁵ η οποία παραμένει μια από τις μεγαλύτερες αιτίες θνησιμότητας και νοσηρότητας σε ασθενείς με ΧΝΑ υπό θεραπεία νεφρικής υποκατάστασης.

Σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, μια καλά αναγνωρισμένη ανωμαλία που εμπλέκεται στη δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων με προβλήματα αιμορραγίας είναι η διαταραχή που προέρχεται από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων, τα οποία περιέχουν τον παράγοντα αιμοπεταλίου 4, τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού-β1, έναν αυξητικό παράγοντα προερχόμενο από τα αιμοπετάλια, την ινονεκτίνη, την Β-θρομβοσφαιρίνη, τον παράγοντα von Willebrand, το ινωδογόνο, τη σεροτονίνη και τους παράγοντες πήξης V και XIII.³⁹ Στα α-κοκκία επίσης παρατηρείται μία αυξημένη αναλογία ATP/ADP και μειωμένα επίπεδα σεροτονίνης σε ουραιμικούς ασθενείς. Επιπλέον, η απελευθέρωση ATP (από τη θρομβίνη) μαζί με αυξημένο ασβέστιο, καθώς και μια διαταραγμένη ενδοκυτταρική ροή ασβεστίου, από διάφορα ερεθίσματα, έχει συσχετιστεί με δυσλειτουργικά αιμοπετάλια και επομένως αιμορραγία.³⁹ Τα αιμοπετάλια εμφανίζουν επίσης απορυθμισμένο μεταβολισμό αραχιδονικού οξέος και προσταγλανδίνης με μειωμένη σύνθεση θρομβοξανθίνης-A₂, που οδηγεί σε μειωμένη πρόσφυση και συσσώρευση αιμοπεταλίων, και επομένως, την εκδήλωση αιμορραγικών επεισοδίων. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης, μια επιπλέον ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων εντός του φίλτρου αιμοκάθαρσης συμβάλλει στον αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης λόγω της συνεχούς ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων στην μεμβράνη αιμοκάθαρσης. Ωστόσο, από την άλλη πλευρά, οι αιμορραγικές διαταραχές μπορούν να αντιστραφούν με την αιμοκάθαρση με αποτέλεσμα μειωμένο κίνδυνο αιμορραγίας λόγω της απομάκρυνσης των ουραιμικών τοξινών.³⁹

Τέλος, τα δυσλειτουργικά αιμοπετάλια εκδηλώνουν μειωμένη προσκόλληση στο αγγειακό υποενδοθήλιο μέσω της μειωμένης έκφρασης της γλυκοπρωτεΐνης GP-Ib. Παρατηρείται επίσης ανεπαρκής δέσμευση του vWF και του ινωδογόνου στα αιμοπετάλια γεγονός που πιθανά ευθύνεται για τη μειωμένη δράση του συμπλέγματος GPIIb/IIIa, λόγω των ουραιμικών τοξινών. Επίσης, τα κυκλοφορούντα θραύσματα του ινωδογόνου οδηγούν σε δυσλειτουργία του συμπλόκου GPIIb-IIIa, καθώς δεσμεύονται ανταγωνιστικά με τον υποδοχέα της γλυκοπρωτεΐνης (GP) IIb/IIIa με αποτέλεσμα μειωμένη προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο.⁴⁶

5. Ρόλος των ερυθροκυτταρικών και αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων στην αιμόσταση

Αρχικά, τα εξωκυττάρια κυστίδια θεωρήθηκαν ως μέσο για την απόρριψη των κυτταρικών αποβλήτων, όμως τα τελευταία χρόνια θεωρούνται πλέον ως οχήματα διακυτταρικής επικοινωνίας που επηρεάζουν διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες.¹⁵

Ίσως δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι τα αιμοπεταλιακά εξωκυττάρια κυστίδια, και συγκεκριμένα τα μικροκυστίδια (PMV), αναγνωρίζονται ευρύτερα για το ρόλο τους στη μεσολάβηση της αιμόστασης λόγω της ομοιότητας που μοιράζονται με το μητρικό τους κύτταρο - το αιμοπετάλιο. Ασθένειες που επηρεάζουν την απελευθέρωση των PMVs στην κυκλοφορία έχουν δείξει ότι μπορούν να ρυθμίσουν την αιμόσταση, όπως οι ασθενείς με νόσο Castaman, όπου τα αιμοπετάλια αδυνατούν να δημιουργήσουν MVs και εμφανίζουν έναν αιμορραγικό φαινότυπο.⁴⁷ Ομοίως, το σύνδρομο Scott, όπου τα αιμοπετάλια δεν μπορούν να εξωτερικεύσουν το PS, σχετίζεται με έντονη αιμορραγική διάθεση, που τονίζουν τη σημασία των PMV στη μεσολάβηση της αιμόστασης.^{47,36}

Ένα από τα κρίσιμα σημεία στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων είναι η έκθεση της PS στην κυτταρική τους επιφάνεια, όπως και στα ερυθρά. Επομένως, και οι δύο αυτοί τύποι κυστιδίων εμπλέκονται στη πήξη διότι λειτουργούν ως φορείς αρνητικά φορτισμένης PS και έχουν την ικανότητα να ενεργοποιήσουν τον καταρράκτη της πήξης. Μόλις αλλάξει θέση από την εσωτερική στην εξωτερική στοιβάδα της πλασματικής μεμβράνης, η PS λειτουργεί ως σημείο δέσμευσης για τους παράγοντες πήξης II, Va και Xa. Έτσι ενισχύεται η σύνδεση μεταξύ των παραγόντων Xa και Va, που οδηγεί στην περαιτέρω μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη.⁴⁸ Επομένως, τα αρνητικά φορτισμένα PEVs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετες επιφάνειες όπου μπορούν να συναρμολογηθούν τα σύμπλοκα του καταρράκτη της πήξης, δηλαδή τα σύμπλοκα της τενάσης και της προθρομβινάσης.³⁰

Επιπλέον, παρατηρούνται υψηλά επίπεδα PEVs σε ασθενείς με μικροαγγειοπάθειες και χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, δηλαδή ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση και περιτοναϊκή κάθαρση. Αυξημένα επίπεδα PMVs και RBC-MVs επίσης παρατηρούνται στη ΧΝΑ μετά το τέλος μίας συνεδρίας αιμοκάθαρσης,

πιθανώς λόγω της επαγόμενης από τη μεμβράνη ενεργοποίησης του συμπληρώματος και των βιολογικών επιδράσεων των διαλυτών.¹⁹

Λόγω της προπηκτικής επιφάνειάς τους, την έκφραση υποδοχέων και του κυτταροπλασματικού περιεχομένου τους, στοιχεία από μελέτες υποστηρίζουν την ιδέα ότι τα εξωκυτταρικά μικροκυστίδια (MVs) παίζουν σημαντικό ρόλο στην πήξη, στη συσσώρευση αιμοπεταλίων και τη θρόμβωση. Κλινικά στοιχεία υποδηλώνουν ότι σε ασθενείς με ιδιοπαθούς θρομβοπενική πορφύρα τα PMVs θα μπορούσαν να προστατεύσουν από αιμορραγία, και να αναπληρώσουν το κενό που υπάρχει στην αιμόσταση από τα πολύ χαμηλά επίπεδα αιμοπεταλίων.⁵⁰

Η PS, η οποία μπορεί επίσης να υπάρχει σε μεμβράνες των μικρού μεγέθους εξωκυττάρων κυστιδίων (εξωσωμάτων), όχι μόνο διευκολύνει τη δημιουργία των συμπλεγμάτων που εμπλέκονται στη πήξη, αλλά ενισχύει σημαντικά τη προπηκτική δραστηριότητα του ιστικού παράγοντα (TissueFactor), γεγονός το οποίο μπορεί να εκκινήσει την εξωγενή οδό της πήξης ενεργοποιώντας τον Παράγοντα VII.⁵¹

Αυτό που έχει μεγάλο ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι τα κυστίδια που προέρχονται από αιμοπετάλια έχουν υψηλότερη προπηκτική δράση σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, πιθανώς λόγω της υψηλότερης επιφανειακής τους πυκνότητα σε PS, γλυκοπρωτεΐνη IIb/IIIa, παράγοντα Xa και P-σελεκτίνες.⁵²

In vitro μελέτες σε MVs από αιμοπετάλια και ερυθρά έχουν υποδείξει την αντιπηκτική τους δράση, καθώς δεσμεύουν το φυσικό αντιπηκτικό, την πρωτεΐνη S, έναν συμπαράγοντα για την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, η οποία ενισχύει την αποικοδόμηση των παραγόντων VIIIa και Va, και αναστέλλει τα σύμπλοκα της τενάσης και της προθρομβινάσης που οδηγεί στη λύση του θρόμβου ή στην ινωδολύση.^{53,54}

6. Η συμβολή των μικροκυστιδίων στις διαταραχές πήξης στη ΧΝΑ

Την τελευταία δεκαετία, παρατηρείται μια τεράστια αύξηση σε ερευνητικές μελέτες στον τομέα των εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs). Τα EVs έχουν αναγνωρισθεί ως μεσολαβητές της διακυτταρικής επικοινωνίας, ως βιοδείκτες και πιθανώς ρυθμιστές των παθολογικών διεργασιών στη νεφρική νόσο. Λαμβάνοντας υπόψη κάποιες πολλά υποσχόμενες προοπτικές όχι μόνο στη διάγνωση αλλά και στη θεραπεία της ΧΝΑ, φαίνεται ότι βλέπουμε μόνο την κορυφή του παγόβουνου, και ότι υπάρχουν πολλά ακόμη να

αποκαλυφθούν όσο αφορά την λειτουργικότητα και των δυνατοτήτων των εξωκυτταρικών κυστιδίων.

Μεταξύ των κυστιδίων που υπάρχουν στο αίμα υγιείς ατόμων, τα πιο άφθονα είναι αυτά που προέρχονται από τα αιμοπετάλια. Τα κυστίδια αυτά, όπως και τα αιμοπετάλια, εμπλέκονται και υποστηρίζουν τον καταρράκτη της πήξης. Έτσι, λόγω των ομοιοτήτων τους με το μητρικό τους κύτταρο, το αιμοπετάλιο, τα κυστίδια είναι σε θέση να συνεισφέρουν στην ιατρική και στην έρευνα επειδή μπορούν να λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο και να τα μιμηθούν. Αυτό σημαίνει ότι ίσως μπορούν να αναπληρώσουν τις απώλειες από χαμηλά επίπεδα ή δυσλειτουργικά αιμοπετάλια και να φέρουν ομοιόσταση στην πήξη του οργανισμού, όπως για παράδειγμα στη νόσο Castaman και σύνδρομο Scott. Ώστωσο στο μέλλον μπορεί να υπάρξει ένας εύκολος τρόπος απομόνωσης και *in vitro* καλλιέργειας κυστιδίων, ώστε κάποια μέρα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά σε ασθενείς με ΧΝΑ ή σε αυτούς που υποβάλλονται συστηματικά σε μετάγγιση PLT.

Με την προοδευτική γνώση σχετικά με τους υποπληθυσμούς EV, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι η επεξεργασία παθολογικών EVs στο αίμα όπως με την αφαίρεσή τους με κάποιο μόριο αναστολής, μπορεί να παρέχει μια εναλλακτική προσέγγιση στην θεραπεία. Τα EVs μπορούν να φορτωθούν με διαφορετικά θεραπευτικά μόρια και να μεταφερθούν στα κύτταρα στόχους με μικρή επιπλοκή από το ανοσοποιητικό σύστημα, ανοίγοντας νέες δυνατότητες θεραπείας σε διάφορα κλινικά περιβάλλοντα⁵⁵ Τελευταία, έχει προκύψει μία καινούργια κατηγορία RBC-MVs, λόγω της πρακτικότητας της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μεταφορά φαρμάκων (*drug delivery systems*).⁵⁶

Πριν από μερικά χρόνια, προτάθηκε μια μέθοδος για την απομάκρυνση των EVs από το αίμα που μπορεί εύκολα να ενσωματωθεί στη συσκευή της αιμοκάθαρσης, και επομένως εύκολα να εφαρμοστεί σε ασθενείς με υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας, όμως με πολλά μειονεκτήματά.⁵⁷ Ώστωσο, προκειμένου να προωθηθεί η ταχέως εξελισσόμενη γνώση σχετικά με το ρόλο και τη συμβολή των μικροκυστιδίων στη ΧΝΑ σε κλινικά επιτυχημένες θεραπείες, η κατανόηση της βιολογίας των EVs φαίνεται να είναι εξαιρετικά σημαντική. Φαίνεται ότι οι πρόσφατες εξελίξεις και οι καινούργιες ιδέες ενθαρρύνουν τους ειδικούς, στη νεφρική και καρδιαγγειακή βιολογία, στην πρωτεομική, στη λιπιδιομική και στη νανοτεχνολογία, ώστε στο μέλλον να ενώσουν τις δυνάμεις τους

μαζί με τους κλινικούς, προκειμένου να βελτιστοποιήσουν τη χρήση των EVs σε περίπλοκες ασθένειες όπως η ΧΝΑ (ESRD).⁵⁷

Αναφορές

- 1) Benjamin O, Lappin SL. End-Stage Renal Disease. [Updated 2021 Sep 16]. In: Stat Pearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499861/>
- 2) Thomas, Robert et. Al. “Chronic Kidney Disease and Its Complications” Primary Care 2008; 35: 329-viidoi: [10.1016/j.pop.2008.01.008](https://doi.org/10.1016/j.pop.2008.01.008)
- 3) Moradi, H et al. “Cardiovascular Burden Associated with Uremic Toxins in Patients with Chronic Kidney Disease” American Journal of Nephrology 2013; 38: 136-148. <https://doi.org/10.1159/000351758>
- 4) <https://www.cdc.gov/diabetes/managing/diabetes-kidney-disease.html>
- 5) Lang, Florian et al. “Eryptosis - the Neglected Cause of Anemia in End Stage Renal Disease”. Kidney Blood Press Res 2017; 42: 749-760. doi: [10.1159/000484215](https://doi.org/10.1159/000484215).
- 6) Eckardt KU. Pathophysiology of renal anemia. Clin Nephrol 759 2000; 53: S2–8. 760
- 7) Locatelli, Francesco et al. “Haemodialysis or haemodiafiltration: that is the question”. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2018; 33 (11) 1896–1904. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy035>
- 8) Zmigrodzka, M. et al. “The biology of extracellular vesicles with focus on platelet microparticles and their role in cancer development and progression”. *Tumor Biology* 2016; 37: 14391-14401.
- 9) Thery, Clotilde et al. “Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines”. *Journal of extracellular vesicles* 2018; 7(1)
- 10) Stahl, Anne-lie et al. “Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases”. *Pediatric Nephrology* 2019; 34: 11-30.
- 11) Εικόνα Yue et al. “Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNAs in skeletal muscle myogenesis” *Cell proliferation* 2020; <https://doi.org/10.1111/cpr.12857>

- 12) Doyle, Laura M, and Michael Zhuo Wang. "Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis." *Cells* vol. 8,7 727. 15 Jul. 2019 doi: 10.3390/cells8070727
- 13) Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009 Aug;9(8): 581-93. doi: 10.1038/nri2567. Epub 2009 Jun 5. PMID: 19498381
- 14) Pomatto, Margherita et al. "Extracellular vesicles in renal pathophysiology". *Front Mol Bioscience* 2017;4: 37-<https://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2017.00037>
- 15) Thangaraju, K et. al. "Extracellular Vesicles from Red Blood Cells and Their Evolving Roles in Health, Coagulopathy and Therapy" *International J Mol Sci* 2021; 22: 153-doi: [10.3390/ijms22010153](https://doi.org/10.3390/ijms22010153)
- 16) Ευκόνα Jayachandran, Muthuvel et al. "Extracellular vesicles in urine of women with but not without kidney stones manifest patterns similar to men: a case control study." *Biology of sex differences* vol. 6 2. 24 Feb. 2015, doi: 10.1186/s13293-015-0021-2
- 17) Taylor, Jack et al. "Ca²⁺ mediates extracellular vesicle biogenesis through alternate pathways in malignancy". *Journal of Extracell Vesicles* 2020; 9
- 18) Fan, Jet al. "Membrane Asymmetry and Phospholipid Translocases in eukaryotic cells" *.Advance in Membrane Proteins* 2018; 47-76.
- 19) Fateme, Shamekhi Amiriet al. "Microparticles in kidney diseases: focus on kidney transplantation. " *Renal Replacement Therapy* 2017; 3:
- 20) Lux, Samuel et al. "Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions". *Blood* 2016; 127
- 21) Pollet, Helene et al. "Plasma membrane lipid domains as platforms for vesicle biogenesis and shedding?". *Biomolecules* 2018; 8(3): 94-
- 22) Raposo, Graca et al. "Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends". *Journal of Cell Biology* 2013; 200: 273-283.
- 23) Tissot, Jean-Daniel et al. "Blood Microvesicles: From Proteomics to Physiology". *Translational Proteomics/Elsevier*, 2013; 1: 38-52.
- 24) Antonelou, M et al. "Update on extracellular vesicles inside red blood cell storage units: Adjust the sails closer to the new wind". *Transfus Apher Sci* 2016; 55(1): 92-104.

- 25) Willekens, F et al. "Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism?". *B. J. Haematology* 2008; 141(4): 549-556.
- 26) Kao, M et al. "Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options". *Journal of Human Hypertension* 2010; 24: 1-8.
- 27) Stowell, S et al. Addition of ascorbic acid solution to stored murine red blood cells increases posttransfusion recovery and decreases microparticles and alloimmunization. *Transfusion* 2013; 53 (10): 2248-2257. <https://doi.org/10.1111/trf.12106>
- 28) Flaumenhaft, R et al. "Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles." *Blood*. 2009 Jan 29; 113(5): 1112-21.
- 29) Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* 13, 269–288 (1967).
- 30) Ferreira, P.M., Bozbas, E., Tannetta, S.D. *et al.* Mode of induction of platelet-derived extracellular vesicles is a critical determinant of their phenotype and function. *Sci Rep* 10, 18061 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73005-3>
- 31) Connor, DE et al " The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib." *ThrombHaemost.* 2010 May; 103(5): 1044-52.
- 32) Pasquet JM et al. "Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets." *Eur J Biochem.* 1996 Aug 1; 239(3): 647-54.
- 33) Burger, D., Schock, S., Thompson, C. S., Montezano, A. C., Hakim, A. M., Touyz, R. M. (2013). Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin. Sci.* 124, 423–441. doi: 10.1042/CS20120309
- 34) Lee, K. D., Hong, K., Papahadjopoulos, D. (1992). Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density. *Biochim. Biophys. Acta* 1103, 185–97. doi: 10.1016/0005-2736(92)90086-2
- 35) Cauwenberghs S et al. "Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton". *FEBS Lett.* 2006 Oct 2; 580(22): 5313-20.
- 36) (eikona) Zaldivia, Maria T K et al. "Platelet-Derived Microvesicles in Cardiovascular Diseases." *Frontiers in cardiovascular medicine* vol. 4 74. 21 Nov. 2017, doi: 10.3389/fcvm.2017.00074

- 37) Mustard, J. F., Kinlough-Rathbone, R. L., Packham, M. A. (2002). "History of platelets," in *Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders*, eds. Gresele, P., Page, C. P., Fuster, V., Vermylen, J. (Cambridge: Cambridge University Press), 3–24. doi: 10.1017/CBO9780511545283.002
- 38) Puhm, Florian et al. "Platelet Extracellular Vesicles: Beyond the Blood." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* vol. 41,1 (2021): 87-96. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314644
- 39) Di Minno G et al. Platelet dysfunction in uremia. Multifaceted defect partially corrected by dialysis, *Am J Med*, 1985, vol. 79 (pg. 552-559) [10.1016/0002-9343\(85\)90051-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(85)90051-8)
- 40) Smith Stephanie A. The Cell-Based Model of Coagulation. *J Vet Emerg Crit Care* 2009; 19(1): 3-10.
- 41) Shrestha SK. Simple Coagulation Cascade with Mnemonics [Internet]. Epomedicine; 2017 Jan 17 [cited 2022 Feb 11]. Available from: <https://epomedicine.com/medical-students/simple-coagulation-cascade-mnemonics/>.
- 42) Pavlou, Efthimia G et al. "Coagulation Abnormalities in Renal Pathology of Chronic Kidney Disease: The Interplay between Blood Cells and Soluble Factors." *Biomolecules* vol. 11,9 1309. 4 Sep. 2021, doi: 10.3390/biom11091309
- 43) Ocak, G., Roest, M., Verhaar, M.C. et al. Von Willebrand factor, ADAMTS13 and mortality in dialysis patients. *BMC Nephrol* 22, 222 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12882-021-02420-z>
- 44) Miyazaki, Y., Nomura, S., Miyake, T., Kagawa, H. et al., High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* 1996, 88, 3456–3464
- 45) Bonomini M, Dottori S, Amoroso L, Arduini A, Sirolli V: Increased platelet phosphatidylserine exposure and caspase activation in chronic uremia. *J Thromb Haemost* 2004;2: 1275-1281.
- 46) Thekkedath UR et al. Elevated fibrinogen fragment levels in uremic plasma inhibit platelet function and expression of glycoprotein IIb–IIIa, *Am J Hematol* 2006; 81: 915-926.
- 47) Castaman G, et al. "A bleeding disorder characterised by isolated deficiency of platelet microvesicle generation." *Lancet*. 1996 Mar 9; 347(9002): 700-1

- 48)Mazzariol, Martina et al. "Extracellular Vesicles Tune the Immune System in Renal Disease: A Focus on Systemic Lupus Erythematosus, Antiphospholipid Syndrome, Thrombotic Microangiopathy and ANCA-Vasculitis." *International journal of molecular sciences* vol. 22,8 4194. 18 Apr. 2021, doi: 10.3390/ijms22084194
- 49) Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J. &Toti, F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 15–26 (2011).
- 50)Wenche, J. Y., Horstman, L. L., Arce, M. &Ahn, Y. S. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *J. Lab. Clin. Med.* 119, 334–345 (1992).
- 51) Owens AP, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* (2011) 108(10): 1284–97. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233056
- 52) Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV, Ataulakhanov FI. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *ThrombHaemost.* 2007 Mar;97(3): 425-34. PMID: 17334510.
- 53)Koshiar RL et al.Erythrocyte-derived microparticles supporting activated protein C-mediated regulation of blood coagulation.PLoS One. 2014; 9(8): e104200.
- 54)Levin, G.Y.; Sukhareva, E.G. Antithrombin Activity of Erythrocyte Microvesicles. *BullExpBiolMed* 2017, 162, 718-721, doi: 10.1007/s10517-017-3696-z.
- 55)Zhang, Daniel et al. "The Biology and Therapeutic Applications of Red Blood Cell Extracellular Vesicles". *Erythrocyte*, edited by Anil Tombak, IntechOpen, 2018. 10.5772/intechopen.81758.
- 56)Malhotra S, Dumoga S, Singh N. Red blood cells membrane-derived nanoparticles: Applications and key challenges in their clinical translation. *Wiley Interdiscip Rev NanomedNanobiotechnol.* 2022 Feb 1: e1776. doi: 10.1002/wnan.1776. Epub ahead of print. PMID: 35106966.
- 57)Behrens, Felix et al."Extracellular vesicles as regulators of kidney function and disease". *Intensive care medicine experimental* 2020; 8(1)