ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

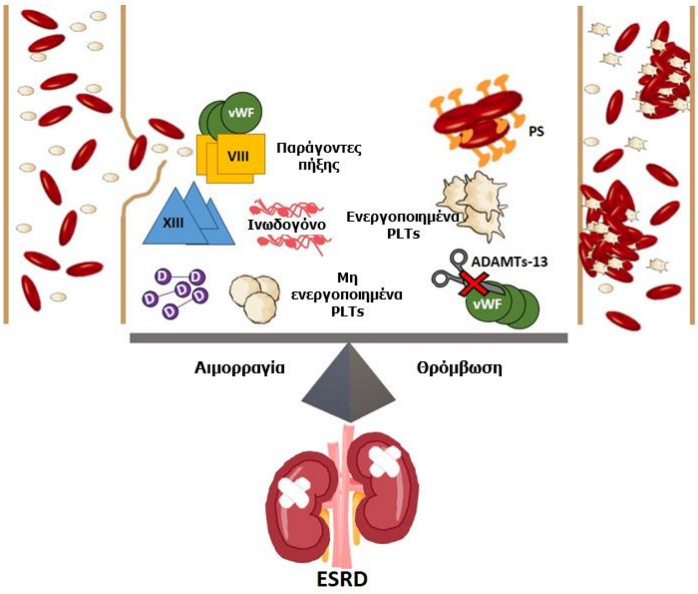
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία (HemQcR)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Διαταραχές αιμόστασης στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια: Γενεσιουργοί παράγοντες και κλινικές συσχετίσεις



Ευθυμία Γ. Παύλου

Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων

ΠΜΣ Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση

ΑΘΗΝΑ 2022

UNIVERSITY OF WEST ATTICA

SCHOOL OF HEALTH AND CARE SCIENCES

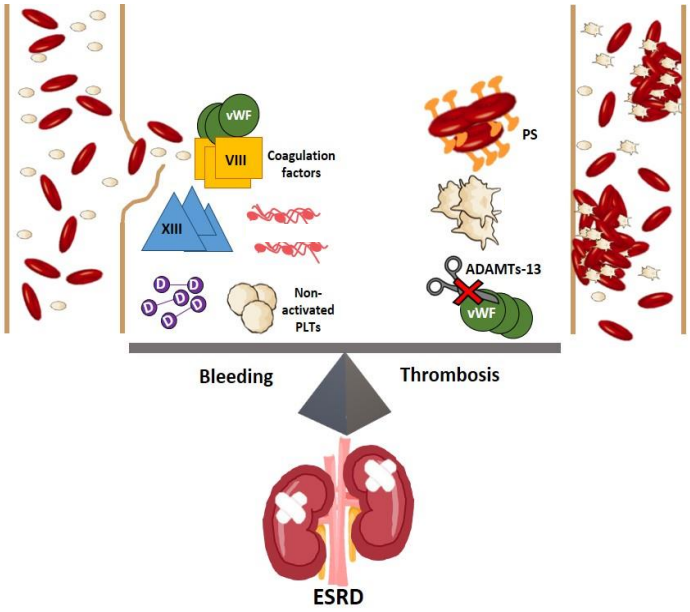
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology

(HemQcR)

DOCTORAL (PhD) THESIS

Hemostasis disorders in chronic renal failure: Causative factors and clinical correlates



Efthimia G. Pavlou

Medical laboratory Scientist

Master in Science, Biomedical Methods and Technology in Diagnosis

ATHENS 2022

Επιβλέπων

Αναστάσιος Κριεμπάρδης	Αναπληρωτής Καθηγητής	Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών	Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Αντωνέλου Μαριάννα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια	Τμήμα Βιολογίας	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθήνας
Βενετίκου Μαρία	Καθηγήτρια	Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών	Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Κριεμπάρδης Αναστάσιος	Αναπληρωτής Καθηγητής	Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών	Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αντωνέλου Μαριάννα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια	Τμήμα Βιολογίας	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθήνας
Βενετίκου Μαρία	Καθηγήτρια	Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών	Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Κριεμπάρδης Αναστάσιος	Αναπληρωτής Καθηγητής	Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών	Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Ξάνθος Θεόδωρος	Καθηγητής	Τμήμα Μαιευτικής	Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Παπαγεωργίου Ευσταθία	Καθηγήτρια	Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών	Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Χανιώτης Δημήτριος	Καθηγητής	Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών	Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Χατζηχρήστου Ελένη	Καθηγήτρια	Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών	Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Anastasios Kriempardis
Digitally signed by Anastasios Kriempardis
Date: 2022.11.23 12:37:48 +02'00'

Theodoros Xanthos
Digitally signed by Theodoros Xanthos
Date: 2022.11.23 13:59:08 +02'00'

Marianna Antonelou
23.11.2022 17:49

Dimitrios Chaniotis
Digitally signed by Dimitrios Chaniotis
Date: 2022.11.23 21:32:35 +02'00'

Eleni Chatzichristou
Digitally signed by Eleni Chatzichristou
Date: 2022.11.24 21:25:46 +02'00'

Efstathia Papageorgiou
Digitally signed by Efstathia Papageorgiou
Date: 2022.11.27 22:42:59 +02'00'

Αφιερωμένο

στο σύζυγο μου Νίκο

και στα παιδιά μου Μιχάλη, Βασιλική και Γιώργο

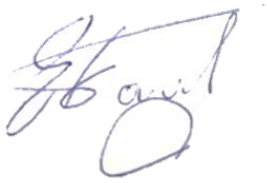
Δήλωση συγγραφέα διδακτορικής διατριβής

Η κάτωθι υπογεγραμμένη, Ευθυμία Παύλου του Γεωργίου, υποψήφια διδάκτορας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

Είμαι συγγραφέας και δικαιούχος των πνευματικών δικαιωμάτων επί της διατριβής και δεν προσβάλλω τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων. Για τη συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής δεν χρησιμοποίησα ολόκληρο ή μέρος έργου άλλου δημιουργού ή τις ιδέες και αντιλήψεις άλλου δημιουργού χωρίς να γίνεται αναφορά στην πηγή προέλευσης (βιβλίο, άρθρο από εφημερίδα ή περιοδικό, ιστοσελίδα κ.λπ.).

Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του διδακτορικού διπλώματος μου.

Η δηλούσα



Ευθυμία Γ. Παύλου

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα»,
Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παράγραφος 2

Πρόλογος

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο «Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία», του Τομέα Ιατρικών Εργαστηρίων, του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αναστάσιου Κριεμπάρδη το χρονικό διάστημα 2018-2022.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αντιπρύτανη Ακαδημαϊκών Υποθέσεων και Φοιτητικής Μέριμνας, Καθηγήτρια κα Ευσταθία Παπαγεωργίου, για την ευκαιρία και δυνατότητα που μου έδωσε να εργαστώ στο Ερευνητικό Εργαστήριο «Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία» στο οποίο ήταν Διευθύντρια το χρονικό διάστημα εκπόνησης αυτής της διατριβής. Την ευχαριστώ θερμά, επίσης, για τις συμβουλές και την ενθάρρυνσή της σε όλο αυτό το «ταξίδι».

Ευχαριστίες οφείλω στον Πρόεδρο του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών Καθηγητή κ. Δημήτριο Χανιώτη για την αμέριστη συμπαράστασή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή και τωρινό Διευθυντή του Ερευνητικού Εργαστηρίου «Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία» κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω το παρόν ερευνητικό πρωτόκολλο. Τον ευχαριστώ πολύ για την προτροπή, την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη του ώστε να εκπονηθεί η παρούσα διατριβή. Μέσα από αυτή μας τη συνεργασία, ενισχύθηκε μια πολύτιμη φιλία.

Ευχαριστίες οφείλω στην Καθηγήτρια κα Μαρία Βενετίκου και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Μαριάννα Αντωνέλου για την βοήθεια τους στον πειραματικό σχεδιασμό της μελέτης. Τις ευχαριστώ για τη συμμετοχή τους στη τριμελή συμβουλευτική επιτροπή και για το χρόνο που αφιέρωσαν για εύστοχες παρατηρήσεις και ουσιαστικές διορθώσεις του κειμένου της παρούσας διατριβής. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Μαριάννα Αντωνέλου καθώς αποτελεί βασικό και σημαντικό μέλος της ερευνητικής ομάδας και είναι πάντα πρόθυμη για ουσιαστικές συμβουλές.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Καθηγητή κ. Θεόδωρο Ξάνθο και Καθηγήτρια κα Ελένη Χατζηχρήστου για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην επιτροπή.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω το Διευθυντή της Μονάδας Τεχνικού Νεφρού του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών Ιπποκράτειο κ. Δημήτριο Πετρά και τη Διευθύντρια της Νοσοκομειακής Υπηρεσίας Αιμοδοσίας και Τμήματος Αιμόστασης και Αιμορροφιλικών Ασθενών κα Ευφροσύνη Νομικού. Η συμβολή τους σε επιστημονικό επίπεδο ήταν καθοριστική για την περάτωση αυτής της εργασίας.

Η συμμετοχή της Ακαδημαϊκού Υποτρόφου κας Χαράς Γεωργατζάκου και του Μεταδιδάκτορα κ. Σωτήριου Φόρτη ήταν πολύ σημαντική και ουσιαστική τόσο στην πορεία όσο και στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Τους ευχαριστώ καθώς ήταν και είναι πολύτιμοι συνεργάτες.

Ευχαριστίες σε όλα τα μέλη του Τομέα Ιατρικών Εργαστηρίων για τη φιλοξενία και βοήθεια που μου πρόσφεραν.

Επίσης, ευχαριστώ τους συνεργάτες μου κα Γιαννιώτη Αρετή, κα Δασκαλάκη Σταυρούλα και κα Σιουμάλα Μαρία για την ουσιαστική τους βοήθεια.

Τέλος, ευχαριστώ το σύζυγο μου Νίκο και τα παιδιά μου, Μιχάλη, Βασιλική και Γιώργο για τη συμπαράσταση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν.

Ευθυμία Γ. Παύλου

Νοέμβριος 2022

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα διδακτορικής διατριβής ..... **ix**

Πρόλογος ..... **xi**

Περίληψη ..... **xx**

Abstract ..... **xxii**

Συντομογραφίες ..... **xxiv**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ **1**

Α1. Ουροποιητικό Σύστημα **1**

Α1.1. Οι νεφροί **3**

Α1.1.1. Λειτουργίες των νεφρών **3**

Α1.1.2. Ανατομία **4**

Α1.1.3. Φυσιολογία **6**

Α1.1.3.1. Αιμάτωση 6
Α1.1.3.2. Παραγωγή ούρων 8
Α1.1.3.3. Επαναρρόφηση ουσιών 9
Α1.3.3.4. Η αγκύλη του Henle 10
Α1.3.3.5. Εξωκυττάριο υγρό 12
Α1.1.3.6. Ούρα 13

Α2. Νόσοι των Νεφρών **14**

Α2.1. Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια **14**

Α2.1.1. Αιτιοπαθογένεια **14**

Α2.1.2. Κλινική εικόνα **14**

Α2.1.3. Εργαστηριακά ευρήματα **15**

Α2.1.4. Διαφορική διάγνωση **16**

Α2.2. Νεφρική νόσος τελικού σταδίου **16**

Α2.2.1. Αιτιοπαθογένεια **16**

Α2.2.2. Κλινική εικόνα **17**

Α2.2.3. Εργαστηριακά ευρήματα **17**

Α2.2.4. Διαφορική διάγνωση **17**

Α2.2.5. Ταξινόμηση Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας-Σταδιοποίηση 18

Α2.2.6. Ουραιμικές τοξίνες 20

Α3. Αιμοκάθαρση 22

Α4. Αιμόσταση 25

Α4.1. Πρωτογενής αιμόσταση 27

Α4.2. Δευτερογενής αιμόσταση 29

Α4.2.1. Μηχανισμός πήξης του αίματος 29

Α4.2.2. Παράγοντες πήξης 31

Α4.2.2.1. Παράγοντας I 32
Α4.2.2.2. Παράγοντας II 32
Α4.2.2.3. Παράγοντας III 33
Α4.2.2.4. Παράγοντας IV 33
Α4.2.2.5. Παράγοντας V 34
Α4.2.2.6. Παράγοντας VII 35
Α4.2.2.7. Παράγοντας VIII 35
Α4.2.2.8. Παράγοντας IX 36
Α4.2.2.9. Παράγοντας X 36
Α4.2.2.10. Παράγοντας XI 36
Α4.2.2.11. Παράγοντας XII 37
Α4.2.2.12. Παράγοντας XIII 37

Α4.2.3. Άλλοι παράγοντες της αιμόστασης 38

Α4.2.3.1. ADAMTS-13 38
Α4.2.3.2. Παράγοντας von Willebrand 38
Α4.2.3.3. Πρωτεΐνη S 39
Α4.2.3.4. Πρωτεΐνη C 39
Α4.2.3.5. Αντιθρομβίνη III 40

Α4.3. Ινωδόλυση 40

Α4.4. Εργαστηριακή διερεύνηση της αιμόστασης 42

Α5. Αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων και αιμόστασης 44

Α5.1. Αιμοπετάλια και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου 44

Α5.2. Ο ρόλος της φωσφατιδυλοσερίνης 46

Α6. Αλληλεπίδραση ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμόστασης 48

Α6.1. Ερυθρά αιμοσφαίρια και οξειδωτικό στρες 53

Α6.2. Η συμβολή του οξειδωτικού στρες στο θάνατο των ερυθροκυττάρων 54

Α7. Επιδράσεις της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας και της αιμοκάθαρσης στα κύτταρα του αίματος 55

Α7.1. Επιδράσεις στα ερυθρά αιμοσφαίρια 55

Α7.2. Επιδράσεις στα αιμοπετάλια 61

Σκοπός της μελέτης 66

Κεφάλαιο Β. Υλικά και Μέθοδοι 67

Β1. Υλικά 67

Β1.1. Χημικά αντιδραστήρια 67

Β1.2. Εμπορικά διαθέσιμα κιτ αντιδράσεων 67

Β1.3. Αντισώματα 69

Β1.4. Αναλώσιμα 69

Β1.5. Όργανα – Συσκευές 69

Β2. Μέθοδοι 70

Β2.1. Ασθενείς και Μάρτυρες 70

Β2.2. Απομόνωση πλάσματος, ορού, ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων από περιφερικό αίμα 71

Β2.3. Έλεγχος αποκλεισμού παραγόντων κινδύνου για εκδήλωση θρομβωτικών επεισοδίων 72

Β2.4. Αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος 73

Β2.5. Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη Πλάσματος 73

Β2.6. Μέτρηση ενδοκυτταρικών επιπέδων δραστικών ριζών οξυγόνου 74

Β2.7. Μέτρηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ελεύθερου ασβεστίου 75

Β2.8. Μέτρηση P-σελεκτίνης και Φωσφατιδυλοσερίνης 75

Β2.9. Δοκιμασίες Λειτουργικότητας Αιμοπεταλίων 77

Β2.10. Έλεγχος διαλογής της αιμόστασης 78

Β2.11. Ανάλυση παραγόντων πήξης 78

Β2.12. Προσδιορισμός λειτουργικότητας της ADAMTS-13 και του ανασταλτή 80

Β2.13. Στατιστική ανάλυση και ανάλυση βιολογικών δικτύων 81

Κεφάλαιο Γ. Αποτελέσματα 82

Γ1. Ασθενείς - Δημογραφικά Στοιχεία 82

Γ2. Εργαστηριακός Έλεγχος Ασθενών 84

Γ2.1. Αιματολογικός Έλεγχος 84

Γ2.2. Βιοχημικός Έλεγχος 87

Γ3. Πρωτογενής Αιμόσταση – Αιμοπετάλια 92

Γ3.1. Λειτουργικότητα Αιμοπεταλίων 92

Γ3.2. Ενεργοποίηση Αιμοπεταλίων και Οξειδωτικό στρες 94

Γ4. Οξειδωτικό Στρες και Δείκτες Εκκαθάρισης στα Ερυθροκύτταρα 98

Γ5. Εργαστηριακός Έλεγχος της Αιμόστασης 100

Γ5.1. Δοκιμασίες Προσυμπτωματικού Ελέγχου– Screening test 100

Γ5.2.Παράγοντες Πήξης του Αίματος 103

Γ5.3. ADAMTS-13 106

Γ5.4. Ινωδολυτικό σύστημα και Φυσικοί Ανασταλτές της Αιμόστασης 107

Γ6. Βιολογικά Δίκτυα 109

Κεφάλαιο Δ. Συζήτηση 114

Αναφορές 133

Παράρτημα 151

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Ανατομία νεφρού 5

Εικόνα 2. Αιμάτωση Νεφρού. 7

Εικόνα 3. Η αγκύλη του Henle 12

Εικόνα 4. Νέος ορισμός και ταξινόμηση των ουραιμικών τοξινών 22

Εικόνα 5. Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης 25

Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση του καταρράκτη της πήξης και του ινωδολυτικού συστήματος 31

Εικόνα 7. Σχηματισμός των δυαλυτών μονομερών ινώδους 41

Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση των σχέσεων μεταξύ των λειτουργιών των αιμοπεταλίων (Platelets, PLTs) και της οξειδοαναγωγικής κατάστασης 46

Εικόνα 9. Πιθανοί μηχανισμοί συμμετοχής των φυσιολογικών και ανώμαλων ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) στην αρτηριακή και φλεβική θρόμβωση/εμβολή 52

Εικόνα 10. Σύνοψη της σηματοδότησης, της διάρκειας ζωής και του περιβάλλοντος οξειδοαναγωγής των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε υγιή άτομα (αριστερά) και σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (δεξιά) 58

Εικόνα 11. Αιτιολογικοί παράγοντες και εμπλεκόμενοι μηχανισμοί δυσλειτουργίας των αιμοπεταλίων στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια 62

Εικόνα 12. Τα επίπεδα ουρίας και κρεατινίνης στους ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση και στην ομάδα μαρτύρων 87

Εικόνα 13. Οι ασθενείς παρουσίασαν το τυπικό φλεγμονώδες πρότυπο της χρόνιας φλεγμονής, όπως αποδεικνύεται άμεσα από τα παθολογικά αυξημένα επίπεδα φερριτίνης και C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, είτε έμμεσα μέσω της διαταραχής του λόγου ουδετερόφιλων/λεμφοκυττάρων 90

Εικόνα 14. Βασικοί ηλεκτρολύτες ορού αίματος στους ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων 92

Εικόνα 15. Η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη των ανταγωνιστών διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) και επινεφρίνης (EPI) παρουσία κολλαγόνου (Col) στους ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση. 93

Εικόνα 16. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στην έκφραση P-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση 94

Εικόνα 17. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στην έκφραση P-σελεκτίνης και φωσφατιδυλοσερίνης στα αιμοπετάλια των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση 95

Εικόνα 18. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στην έκφραση ενδοκυττάριων ριζών οξυγόνου (ROS) και στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου (iCa^{+2}) στα αιμοπετάλια των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.....96

Εικόνα 19. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στην εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης (PS) και στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου (iCa^{+2}) στα ερυθροκύτταρα των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.....98

Εικόνα 20. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στην έκφραση ενδοκυττάριων ριζών οξυγόνου (ROS) στα ερυθρά αιμοσφαίρια των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.....100

Εικόνα 21. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στις δοκιμασίες προσυμπτωματικού ελέγχου (screening test) στην αιμόσταση.....101

Εικόνα 22. Παράγοντες πήξης του αίματος που αυξάνει η δραστικότητά τους από τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης.....104

Εικόνα 23. Παράγοντες πήξης του αίματος με χαμηλότερη δραστικότητα στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες.....105

Εικόνα 24. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στη δραστικότητα της ADAMTS-13.....106

Εικόνα 25. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στη συγκέντρωση του αναστολέα του ιστικού πλασμινογόνου (PAI).....107

Εικόνα 26. Ανάλυση βιολογικού δικτύου στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων βιοδεικτών ασθενών με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου πριν τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης.....110

Εικόνα 27. Ανάλυση βιολογικού δικτύου στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων βιοδεικτών ασθενών με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου μετά τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης.....112

Εικόνα 28. Διαγραμματική απεικόνιση των κύριων ευρημάτων της παρούσας μελέτης.....131

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Ταξινόμηση- σταδιοποίηση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (ΧΝΑ) 19

Πίνακας 2. Οι σημαντικότερες ουσίες που συμμετέχουν στην πρωτογενή αιμόσταση 28

Πίνακας 3. Επιδράσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων που σχετίζονται με τη θρόμβωση και την αιμόσταση και οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί 49

Πίνακας 4. Κύρια δημογραφικά στοιχεία των ασθενών και των μαρτύρων 83

Πίνακας 5. Αιματολογικά χαρακτηριστικά στους ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση και στην ομάδα των μαρτύρων 86

Πίνακας 6. Βιοχημικοί βιοδείκτες (Α) των ασθενών πριν την αιμοκάθαρση και (Β) της ομάδας των μαρτύρων 89

Πίνακας 7. Παράγοντες πήξης του αίματος που δε μεταβάλλονται από τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης. 103

Πίνακας 8. Ινωδολυτικό σύστημα και φυσικοί ανασταλτές της αιμόστασης που επηρεάζονται από τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης 108

Περίληψη

Οι διαταραχές της αιμόστασης στην παθολογία της χρόνιας νεφρικής νόσου συνδέονται με υψηλό κίνδυνο θρομβωτικών και αιμορραγικών επεισοδίων. Μαζί με την αναιμία, οι διαταραχές της πήξης αποτελούν σημαντικές αιματολογικές διαταραχές που παρατηρούνται στη νεφρική ανεπάρκεια. Η συσσώρευση ουραιμικών τοξινών σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (ESRD) προάγει την ανάπτυξη διαταραχών στα αιμοπετάλια, που θεωρείται ότι είναι υπεύθυνες για τον κίνδυνο αιμορραγιών που αντιμετωπίζουν οι περισσότεροι ασθενείς. Ωστόσο, υπάρχουν επιπρόσθετοι παράγοντες κινδύνου που δυνητικά οδηγούν σε θρομβωτικά επεισόδια σε αυτήν την ομάδα ασθενών, συμπεριλαμβανομένων των αιματολογικών διαταραχών, της φλεγμονής, των συννοσηροτήτων και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Η αιμοκάθαρση (HD) είναι η κύρια θεραπεία της νεφρικής υποκατάστασης που χρησιμοποιείται για την εξάλειψη των τοξικών υποπροϊόντων. Στο παρελθόν, η HD, έχει ενοχοποιηθεί για τη πυροδότηση της φλεβικής θρόμβωσης. Συνεπώς, οι υπάρχουσες μελέτες για τις διαταραχές της αιμόστασης στην ESRD περιλαμβάνουν αναφορές για αυξημένο κίνδυνο αιμορραγιών και θρομβωτικών επεισοδίων.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή στοχεύει στη διερεύνηση των διαταραχών της αιμόστασης που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση μεταξύ διαλυτών παραγόντων της πήξης, ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) και αιμοπεταλίων (PLTs) και των επιδράσεων της HD σε ασθενείς με ESRD. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν τριάντα δύο (32) ασθενείς με ESRD υπό θεραπεία HD και δεκαπέντε υγιείς μάρτυρες. Δείγματα ολικού αίματος συλλέχθηκαν από τους ασθενείς πριν και μετά τη συνεδρία HD. Η αξιολόγηση του μηχανισμού της αιμόστασης περιελάμβανε τον έλεγχο της πρωτογενούς και της δευτερογενούς αιμόστασης, των παραγόντων της πήξης, του ινωδολυτικού μηχανισμού, των έλεγχο των φυσικών ανασταλτών της αιμόστασης και της δραστικότητας του ενζύμου ADAMTS-13 (δισιντεγρίνη και μεταλλοπρωτεϊνάση με μοτίβο θρομβοσπονδίνης τύπου 1, της ομάδας 13) και του ανασταλτή της. Εξετάστηκαν επίσης, η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) και τα επίπεδα των ενδοκυτταρικών δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) στα RBCs και στα PLTs, μαζί με το δείκτη ενεργοποίησης τους, την P-σελεκτίνη. Η ανάλυση της λειτουργικότητας των

PLTs έδειξε παθολογικές τιμές σε ασθενείς με ESRD παρά τα αυξημένα επίπεδα δεικτών ενεργοποίησης (PS, P-σελεκτίνη, ROS). Η λειτουργικότητα των περισσότερων παραγόντων της αιμόστασης, του ινωδολυτικού μηχανισμού και των φυσικών ανασταλτών ήταν εντός του φυσιολογικού εύρους, αλλά η HD προκάλεσε αύξηση στους περισσότερους από αυτούς. Επιπλέον, η HD αύξησε περαιτέρω τα επίπεδα του ανασταλτή ADAMTS-13. Τέλος, βρέθηκαν παθολογικά επίπεδα PS και ROS στα RBCs.

Συνολικά, η μελέτη αυτή παρέχει στοιχεία για έναν σύνθετο φαινότυπο πήξης στην ESRD. Η αιμοκάθαρση φαίνεται να αυξάνει το προθρομβωτικό δυναμικό, ενώ τα δυσλειτουργικά αιμοπετάλια δύνανται να εξουδετερώνουν την αυξημένη προδιάθεση για θρομβωτικά συμβάντα μετά την αιμοκάθαρση. Η αλληλεπίδραση των RBCs με τα PLTs, τα σημεία ανάπτυξης θρόμβου, το ενδοθήλιο, τα διαλυτά συστατικά των μονοπατιών της πήξης και η συμβολή των εξωκυτταρικών κυστιδίων στην αιμόσταση, καθώς επίσης η ταυτοποίηση του άγνωστης προέλευσης ανασταλτή ADAMTS-13 χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης στην ουραιμία της χρόνιας νεφρικής νόσου.

Λέξεις κλειδιά: παράγοντες αιμόστασης, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, αιμοκάθαρση, ADAMTS-13, δυσλειτουργία αιμοπεταλίων, θρομβωτικός κίνδυνος, ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, αιμορραγία

Abstract

Coagulation abnormalities in the pathology of chronic kidney disease are associated with a higher risk of thrombotic and bleeding events. Along with anemia, coagulation disorders are important hematologic abnormalities in renal pathology. The accumulation of uremic toxins in patients with end-stage renal disease (ESRD) promotes the development of platelet abnormalities, which are thought to be responsible for the risk of bleeding that the majority of these patients face. However, there are additional risk factors that potentially lead to thrombotic complications in this group of patients, including hematologic disorders, inflammation, comorbidities, and endothelial dysfunction. At the same time, although hemodialysis (HD) is the primary renal replacement therapy for the clearance of toxic byproducts, it is also thought to trigger venous thromboembolism. Consequently, existing studies on hemostatic disorders in ESRD include reports of both increased risk of bleeding and thrombotic events.

This PhD thesis aims to investigate hemostatic abnormalities related to the interaction between soluble coagulation factors, red blood cells (RBCs) and platelets (PLTs) and the effects of HD in patients with ESRD. Thirty-two ESRD patients under HD therapy and fifteen healthy controls were included in the study. Whole blood samples were collected from the patients before and after the HD session. Evaluation of the coagulation state included the control of primary and secondary hemostasis, coagulation factors, fibrinolytic and inhibitory systems, and ADAMTS-13 enzyme activity. Phosphatidylserine (PS) exposure and the levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) in RBCs and PLTs, along with the activation marker of PLTs, CD62P, were also examined. Analysis of platelet function showed pathological values in ESRD patients despite elevated levels of activation markers (PS, CD62P, ROS). The activities of most factors of the coagulation, fibrinolytic and inhibitory systems were within the normal range, but HD caused an increase in half of them. In addition, HD further increased the levels of the ADAMTS-13 inhibitor. Finally, pathological levels of PS and ROS in RBCs were measured, in close correlation with variations in several coagulation factors and characteristics of PLTs.

Taken together, this study provides evidence for a complex coagulation phenotype in ESRD. HD appears to increase the prothrombotic potential, whereas dysfunctional platelets may counteract the increased predisposition to thrombotic events after HD. The interaction of RBCs with PLTs, thrombus sites, the endothelium, solute components of the coagulation system, and the contribution of extracellular vesicles to hemostasis, as well as the identification of the unknown origin ADAMTS-13 inhibitor require further investigation in uremia of chronic kidney disease.

Keywords: coagulation factors; chronic kidney disease; hemodialysis; ADAMTS-13; platelet dysfunction; thrombotic risk; red blood cells, platelets; haemorrhage

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	**Ελληνική ορολογία**
ΔΕΠ	Disseminated Intravascular Coagulation	Διάχυτη Ενδοαγγειακή Πήξη
ΧΝΑ	Chronic Kidney Disease	Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια
ADAMTS-13i	ADAMTS-13 inhibitor	Ανασταλτής της ADAMTS-13
ADAMTS-13	A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type 1 motif, member 13	Δισιντεγρίνη και μεταλλοπρωτεϊνάση με μοτίβο θρομβοσπονδίνης τύπου 1, της ομάδας 13
ADH	Anti-Diuretic Hormone	Αντιδιουρητική ορμόνη
ADMA	Asymmetric Dimethylarginine	Ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη
ADP	Adenosine Diphosphate	Διφωσφορική αδενοσίνη
AGEs	Advanced Glycation End-products	Τελικά προϊόντα προηγμένης γλυκοζυλίωσης
Alp	Alkalic phosphatase	Αλκαλική φωσφατάση
aPC	activated Protein C	Ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C
APC	Allophycocyanin	Αλλοφυκοκυανίνη
aPTT	activated Partial Thromboplastin Time	Χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης
AT	Antithrombin	Αντιθρομβίνη
ATP	Adenosine Triphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
b2micr	B2 microglobulin	β2 μικροσφαιρίνη
BSA	Bovine Serum Albumin	Βόεια λευκωματίνη ορού
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate	Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CaPLT	Platelet intracellular Calcium	Ενδοκυττάριο ασβέστιο αιμοπεταλίων
CaRBC	Red Blood Cell intracellular Calcium	Ενδοκυττάριο ασβέστιο ερυθροκυττάρων
cGMP	cyclic Guanosine Monophosphate	Κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη
Chol	Cholesterol	Χοληστερόλη
CML	Carboxymethyl lysine	Καρβοξυμεθυλ-λυσίνη
Col	Collagen	Κολλαγόνο
Creat	Creatinine	Κρεατινίνη
CRP	C-Reactive Protein	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
CX3CL1	C-X3-C motif chemokine Ligand 1	Προσδέτης χημειοκίνης (μοτίβο C-X3-C) 1
CXCL12	C-X-C motif chemokine Ligand 12	Προσδέτης χημειοκίνης (μοτίβο C-X-C) 12
DD	D-dimers	Δ-Διμερή ινώδους
DMA	Dimethylamine	Διμεθυλαμίνη
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor	Αγγειοδιασταλτικός παράγοντας ενδοθηλιακής προέλευσης

EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EFP	Effective Filtration Pressure	Δραστική πίεση διήθησης
EPI	Epinephrine	Επινεφρίνη
EPO	Erythropoietin	Ερυθροποιητίνη
ESRD	End Stage Renal Disease	Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου
EUTox	European Uremic Toxin work group	Ευρωπαϊκή ομάδα μελέτης ουραιμικών τοξινών
EV	Extracellular Vesicles	Εξωκυτταρικά κυστίδια
F	(Coagulation) Factor	Παράγοντας (πήξης)
FDPs	Fibrinogen Degradation Products	Προϊόντα αποδόμησης του ινωδογόνου
Fer	Ferritin	Φερριτίνη
FGF	Fibroblast Growth Factor	Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών
Fib	Fibrinogen	Ινωδογόνο
FITC	Fluorescein Isothiocyanate	Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη
FLC	Free Light Chain	Ελεύθερη ελαφριά αλυσίδα
FRET	Förster resonance energy transfer	Μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού
GFR	Glomerular Filtration Rate	Ρυθμός σπειραματικής διήθησης
GHS	Glutathione	Γλουταθειόνη
GP	Glycoprotein	Γλυκοπρωτεΐνη
Hb	Hemoglobin	Αιμοσφαιρίνη
HCO	High Cut-Off	Υψηλή διαλογή
Hct	Hematocrit	Αιματοκρίτης
Hcy	Homocysteine	Ομοκυστεΐνη
HD	Hemodialysis	Αιμοκάθαρση
HDF	Hemodiafiltration	Αιμοδιαδιήθηση
HDL	High Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
HDx	Expanded Hemodialysis	Διευρυμένη αιμοκάθαρση
HK	High-molecular weight Kininogen	Κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους
Hp	Haptoglobin	Απτοσφαιρίνη
hsCRP	High sensitivity C-Reactive Protein	Ευαίσθητη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
ICAM-4	Intracellular Adhesion Molecule 4	Ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης 4
IGF-1	Insulin Growth Factor 1	Αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης 1
IL	Interleukin	Ιντερλευκίνη
INR	International Normalised Ratio	Διεθνές κανονικοποιημένο πηλίκο
IS	Indoxyl Sulfate	Θειικό ινδοξύλιο
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes	Νεφρική νόσος: βελτιώνοντας τα παγκόσμια αποτελέσματα
LA	Lupus Anti-coagulant	Αντιπηκτικό λύκου
LDH	Lactate Dehydrogenase	Γαλακτική αφυδρογονάση

LDL	Low-Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
MCHC	Mean Corposcular Hemoglobin Concentration	Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ανά ερυθρό αιμοσφαίριο
MCO	Medium Cut-Off	Μεσαία διαλογή
MCV	Mean Corposcular Volume	Μέσος όγκος ερυθροκυττάρων
MetHb	Methemoglobin	Μεθαιμοσφαιρίνη
MFI	Mean Fluorescence Intensity	Μέση ένταση φθορισμού
MMA	Monomethyl amine	Μονομεθυλαμίνη
Mono	Monocytes	Μονοκύτταρα
MPV	Mean Platelet Volume	Μέσος όγκος αιμοπεταλίων
MV	Microvesicles	Μικροκυστίδια
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	Δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης
NADH	Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide	Ανηγμένο δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης
Neut	Neutrophils	Ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα
NO	Nitric Oxide	Μονοξείδιο του αζώτου
NOX	NADPH Oxidase	Οξειδάση του NADPH
P2Y12	ADP receptor	Υποδοχέας ADP
PAG	Phenylacetylglutamine	Φαινυλακετυλογλουταμίνη
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor	Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
PAR	Protease Activated Receptor	Ενεργοποιούμενος από πρωτεάση υποδοχέας
pCS	para-Cresyl Sulfate	Παρα-κρεζυλοθειικό
PE	Phycoerythrin	Φυκοερυθρίνη
PF4	Platelet Factor 4	Παράγοντας αιμοπεταλίων 4
PFA	Platelet Function Assay	Δοκιμασία λειτουργικότητας αιμοπεταλίων
PGI2	Prostacyclin	Προστακυκλίνη
Plasm	Plasminogen	Πλασμινογόνο
PLTs	Platelets	Αιμοπετάλια
Prot	Plasma Proteins	Ολικές πρωτεΐνες πλάσματος
PRP	Platelet-Rich Plasma	Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
PrSc	Protein S activity	Ενεργότητα πρωτεΐνης S
PrSf	Protein S activity (antigen-free)	Ενεργότητα πρωτεΐνης S ελεύθερης αντιγόνου
PS	Phosphatidylserine	Φωσφατιδυλοσερίνη
PT	Prothrombin Time	Χρόνος προθρομβίνης
PTH	Parathormone	Παραθορμόνη
r1/2PLT	Platelet ROS	Ενδοκυττάριες δραστικές ρίζες οξυγόνου στα αιμοπετάλια
r2RBC	RBC ROS	Ενδοκυττάριες δραστικές ρίζες οξυγόνου στα ερυθροκύτταρα
RBCs	Red Blood Cells	Ερυθρά αιμοσφαίρια

RDW	Red cell Distribution Width	Δείκτης ερυθροκυτταρικής ανισοκυττάρωσης
RES	Reticuloendothelial System	Δικτυοενδοθηλιακό σύστημα
rhEPO	recombinant human Erythropoietin	Ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη
RiCof	Ristosetin Cofactor	Συμπαράγοντας ριστοσετίνης
RNS	Reactive Nitrogen Species	Δραστικές ρίζες αζώτου
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές ρίζες οξυγόνου
RT	Room Temperature	Θερμοκρασία δωματίου
SIRPα	Signal Regulatory Protein alpha	Σηματοδοτική ρυθμιστική πρωτεΐνη άλφα
SMDA	Symmetric Dimethylarginine	Συμμετρική διμεθυλαργινίνη
SPSS	Statistical Package for Social Sciences	Στατιστικό πακέτο για κοινωνικές επιστήμες
sTNFR	soluble Tumor Necrosis Factor Receptor	Διαλυτός υποδοχέας παράγοντα νέκρωσης όγκων
tPA	tissue Plasminogen Activator	Ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
Tbil	Total bilirubin	Ολική χολερυθρίνη ορού αίματος
TF	Tissue Factor	Ιστικός παράγοντας
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor	Αναστολέας μονοπατιού του ιστικού παράγοντα
TIBC	Total Iron-Binding Capacity	Ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα
TM	Thrombomodulin	Θρομβομοντουλίνη
TMA	Trimethylamine	Τριμεθυλαμίνη
TMAO	Trimethylamine-N-oxide	Ν-οξείδιο τριμεθυλαμίνης
TNF-α	Tumor Necrosis Factor a	Παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα
TP	Thromboxane Prostanoid receptor	Υποδοχέας θρομβοξάνης
Trig	Triglycerides	Τριγλυκερίδια
TT	Thrombin Time	Χρόνος θρομβίνης
TTP	Thrombotic Thrombocytopenic Purpura	Θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα
TXA2	Thromboxane A2	Θρομβοξάνη Α2
uPA	urokinase Plasminogen Activator	Ενεργοποιητής ουροκινάσης πλασμινογόνου
vWF	von Willebrand Factor	Παράγοντας von Willebrand
YKL-40 (CHI3L1)	Chitinase-3-like protein 1	Πρωτεΐνη 1 που προσομοιάζει με τη χιτινάση 3

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α1. Ουροποιητικό Σύστημα

Ο ανθρώπινος οργανισμός λειτουργεί αδιάκοπα, παράγοντας συνεχώς ουσίες χρήσιμες για αυτόν και αποβάλλοντας όσες δεν είναι απαραίτητες. Για παράδειγμα, ουσίες όπως το διοξείδιο του άνθρακα, το νερό, η ουρία, το ουρικό οξύ, η κρεατινίνη, καθώς και οι ενώσεις του θείου και του φωσφόρου απομακρύνονται από τον οργανισμό καθώς η περίσσεια τους επηρεάζει την εύρυθμη λειτουργία του. Επιπλέον, ο άνθρωπος μέσα από την τροφή ή/και από φάρμακα προσλαμβάνει διάφορα ανόργανα ιόντα όπως το Κάλιο (K^+), το Νάτριο (Na^+), το Μαγνήσιο (Mg^{2+}), το Ασβέστιο (Ca^{2+}) και το Χλώριο (Cl^-), τα οποία αποβάλλονται μέσω του ουροποιητικού συστήματος με τα ούρα (1).

Το ουροποιητικό σύστημα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα οργανικά συστήματα του ανθρώπου. Τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται είναι οι νεφροί, η ουροδόχος κύστη, οι ουρητήρες και η ουρήθρα. Το ουροποιητικό σύστημα έχει ως στόχο την αποβολή των άχρηστων ουσιών από τον οργανισμό καθώς και όσων βρίσκονται σε περίσσεια, ουσίες οι οποίες είτε παράγονται από το ανθρώπινο σώμα μέσω του μεταβολισμού, είτε εισέρχονται με την τροφή. Επιπλέον, μέσω της αποβολής ουσιών διατηρείται σταθερό και το ισοζύγιο που πρέπει να υπάρχει μεταξύ της ποσότητας των ηλεκτρολυτών και του νερού στον οργανισμό. Λόγω της πολυπλοκότητας και της σημασίας των παραπάνω δραστηριοτήτων, υπάρχουν στο σώμα δυο νεφροί, ο ένας στη δεξιά και ο άλλος στην αριστερή πίσω πλευρά της κοιλιακής χώρας, μέσα στους οποίους γίνεται η παραγωγή των ούρων. Στη συνέχεια, μέσω των ουρητήρων τα ούρα διοχετεύονται στην ουροδόχο κύστη και από εκεί αποβάλλονται μέσω της ουρήθρας (2).

Εκτός όμως από τη βασική λειτουργία των νεφρών, παράλληλα, διεκπεραιώνονται πολλές ακόμα διεργασίες που σχετίζονται με το μεταβολισμό των πρωτεϊνών, την απορρόφηση ουσιών και την αιμάτωση του ιστού. Η αιμάτωση παίζει καταλυτικό ρόλο καθώς είναι αυτή που δίνει την απαραίτητη δύναμη για την ομαλή λειτουργία του ουροποιητικού συστήματος. Οι νεφροί, αιματώνονται μέσω της

νεφρικής αρτηρίας, η οποία διακλαδίζεται σε όλο το σύστημα σε μικρότερα αρτηρίδια και αγγεία προκειμένου να αιματώνεται πλήρως η περιοχή, με αποτέλεσμα το ουροποιητικό σύστημα να αποτελεί το δεύτερο σε αιμάτωση σύστημα μετά το καρδιαγγειακό (3).

Το ουροποιητικό σύστημα επηρεάζεται όπως είναι φανερό άμεσα από την κυκλοφορία του αίματος και την πηκτικότητά του. Η μελέτη των διαταραχών πήξης στη Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια (ΧΝΑ) έχει κερδίσει ξανά μεγάλο ενδιαφέρον καθώς νέες αντιπηκτικές ουσίες έχουν εισαχθεί στην κλινική πράξη. Συχνά ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια λαμβάνουν αντιπηκτική αγωγή, καθώς εμφανίζουν σημαντική συννοσηρότητα, συμπεριλαμβανομένων καρδιαγγειακών παθήσεων που απαιτούν θεραπεία. Μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια που λαμβάνουν νεότερης γενιάς αντιπηκτικά εμφανίζουν αιμορραγίες (4). Ωστόσο, η αιμόσταση έχει δειχτεί να παρουσιάζει διαταραχές στην ανεπάρκεια της νεφρικής λειτουργίας. Οι διαταραχές της πήξης, είτε αυτές εκδηλώνονται με επεισόδια σοβαρής αιμορραγίας είτε με θρόμβωση, αποτελούν σημαντική αιτία για τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα των ασθενών με ΧΝΑ (3).

Οι ασθενείς που πάσχουν από ΧΝΑ τελικού σταδίου, χαρακτηρίζονται από συσσώρευση ουραιμικών τοξινών. Αυτές οι τοξίνες ευθύνονται για τις διαταραχές στην αιμόσταση και στη δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων (platelets, PLTs). Διαταραχές στην αιμόσταση οδηγούν στην εμφάνιση αιμορραγιών επιδεινώνοντας την ήδη επιβαρυμένη από τη ΧΝΑ υγεία των ασθενών, καθώς και στην αύξηση του κινδύνου θρομβώσεων στο ουροποιητικό σύστημα. Μάλιστα, ασθενείς που έχουν αυξημένο φλεγμονώδες φορτίο και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου για θρομβώσεις ή/και αιμορραγίες (5).

Συμπερασματικά, έχει βρεθεί άμεση συσχέτιση των διαταραχών του ουροποιητικού συστήματος και συγκεκριμένα των νεφρών με το αγγειακό σύστημα και την αιμόσταση. Η αιμοκάθαρση έχει καθιερωθεί ως η πιο δραστική και αξιόπιστη μέθοδος θεραπείας για τη ΧΝΑ (6). Παρόλα αυτά, οι έρευνες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα δείχνουν πως η αιμοκάθαρση ευθύνεται για τα επεισόδια φλεβικής θρομβοεμβολής σε ασθενείς με ΧΝΑ ενώ έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση αιμορραγικών επεισοδίων (5).

Α1.1. Οι νεφροί

Α1.1.1. Λειτουργίες των νεφρών

Οι νεφροί αποτελούν τα κύρια όργανα του ουροποιητικού συστήματος, έχουν σχήμα φασολιού και βρίσκονται στο οπίσθιο μέρος της κοιλιακής κοιλότητας (οπισθοπεριτοναϊκή χώρα), εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης.

Οι βασικές λειτουργίες των νεφρών είναι οι εξής (1):

1) Αποβάλλουν τις άχρηστες και επιβλαβείς ουσίες από τον οργανισμό, με στόχο η τελική τους συγκέντρωση στο αίμα και συγκεκριμένα στον ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο χώρο να είναι σε φυσιολογικά – μη τοξικά επίπεδα.
2) Αποβάλλουν ανόργανα ανιόντα και κατιόντα, διατηρώντας την ισορροπία των ιόντων στον οργανισμό και συνεπώς, την ομαλή λειτουργία του.
3) Αποβάλλουν την περίσσεια αλκαλίων και οξέων, ώστε τα επίπεδα τους να παραμένουν εντός φυσιολογικών ορίων και να διατηρείται η οξεοβασική ισορροπία στο αίμα.
4) Αποβάλλουν οποιαδήποτε ξένη ουσία έχει εισέλθει στον οργανισμό και απειλεί τη φυσιολογική του λειτουργία.

Ο ρόλος, επομένως, της παρουσίας αυτών των οργάνων είναι να εξασφαλιστεί η ομοιόσταση του οργανισμού μέσα από την αποβολή των άχρηστων ουσιών και παράλληλα μέσα από την παραγωγή ουσιών απαραίτητων για τη λειτουργία του, όπως είναι η ερυθροποιητίνη (Erythropoietin, EPO), η ρενίνη και η 1,25 βιταμίνη D_3 (7).

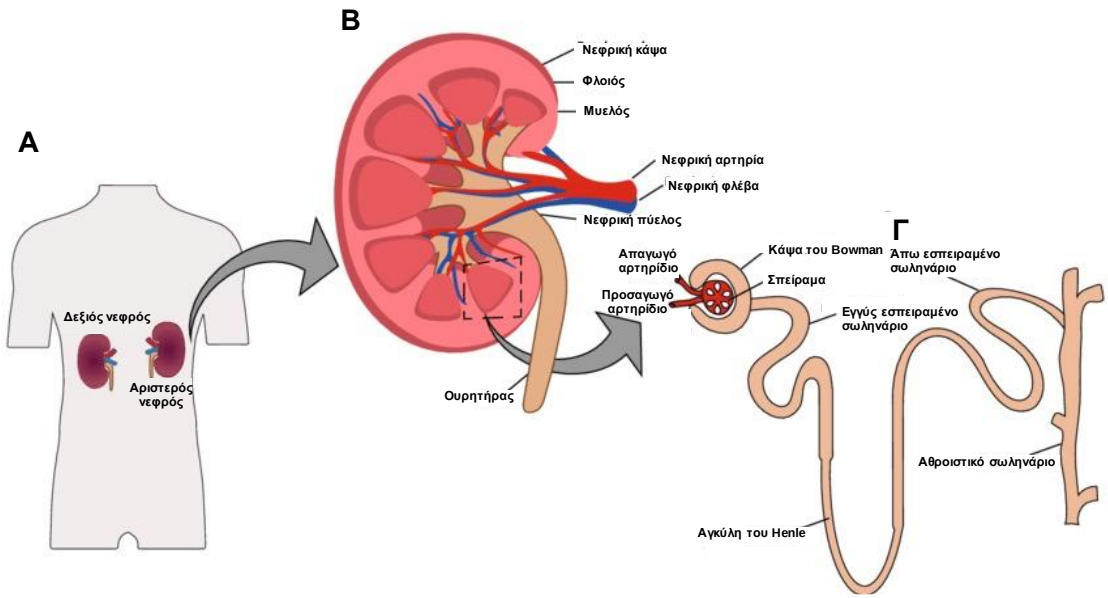
Σε περίπτωση που οι νεφροί σταματήσουν να λειτουργούν για 7 έως 20 ημέρες, τότε επέρχεται ο θάνατος του ατόμου λόγω εμφάνισης ουραιμικού κώματος. Το ουραιμικό κώμα περιλαμβάνει τρεις πολύ σημαντικές μεταβολές του οργανισμού, που το καθιστούν πολύ επικίνδυνο. Αρχικά, η ουραιμία αυξάνει τα επίπεδα αζώτου στο πλάσμα και κατ' επέκταση στο εσωτερικό των ιστών και των κυττάρων. Έπειτα, η καλιαιμία αυξάνει τα επίπεδα καλίου στο αίμα, που μαζί με την οξέωση ευθύνονται για τη μείωση του pH του αίματος λόγω της μη αποβολής των τοξικών οξέων (8). Για να αποφευχθεί ο θάνατος, οι ασθενείς παραμένουν στο νοσοκομείο με την

υποστήριξη τεχνητού νεφρού (αιμοκάθαρση) περιμένοντας για να βρεθεί κατάλληλο μόσχευμα για μεταμόσχευση (9).

A1.1.2. Ανατομία

Οι νεφροί αποτελούνται συνολικά από ένα εκατομμύριο λειτουργικές μονάδες, που ονομάζονατι νεφρώνες. Τα βασικά μέρη ενός νεφρού είναι δυο: τα μαλπιγγιανά σωμάτια και το ουροφόρο σωληνάριο. Στο μαλπιγγιανό σωμάτιο βρίσκεται η κάψα του Bowman μέσα στην οποία βρίσκεται το αγγειώδες σπείραμα. Το μαλπιγγιανό σωμάτιο μαζί με τα τμήματα των εσπειραμένων σωληναρίων και το αρχικό τμήμα των αθροιστικών σωληναρίων βρίσκονται στο εσωτερικό της φλοιώδους μοίρας του νεφρού. Στη παραμυελική μοίρα των νεφρώνων βρίσκονται όλα τα σωληνάρια που εξέρχονται από τα μαλπιγγιανά σωμάτια και συγκεκριμένα από την παραμυελική μοίρα. Τα ανιόντα και κατιόντα μέρη των νεφρώνων μαζί με την αγκύλη του Henle εισέρχονται στη μυελώδη μοίρα και φτάνουν μέχρι τις νεφρικές θηλές των πυραμίδων (10) **(Εικόνα 1)**.

Η κάψα του Bowman έχει σφαιροειδές σχήμα και αποτελεί το αρχικό τμήμα του ουροφόρου σωληναρίου. Το εσωτερικό της μέρος ονομάζεται ουροφόρος κοιλότητα και καλύπτεται από μια λεπτή στοίβα επιθηλιακού ιστού στο εσωτερικό της και μια πιο παχιά στοιβάδα επιθηλιακού ιστού στο εξωτερικό της. Η ουροφόρος κοιλότητα ενώνεται με το εγγύς εσπειραμένο τμήμα του ουροφόρου σωληναρίου (11). Η αιμάτωση της κάψας γίνεται μέσω του αγγειακού σπειράματος. Το προσαγωγόν αρτηρίδιο χωρίζεται σε 50 τριχοειδή αγγεία, ώστε να γίνεται καλύτερη αιμάτωση της περιοχής, ακόμα και στα πιο δύσκολα σε πρόσβαση σημεία. Η επανένωση των τριχοειδών αγγείων οδηγεί στη δημιουργία του απαγωγού αρτηριδίου, το οποίο εξέρχεται από το έλυτρο του Bowman (12).



Εικόνα 1. Ανατομία νεφρού (13)*. (Α) Εξωτερική όψη, όπου διακρίνονται οι δύο νεφροί του ανθρώπου. (Β) Εσωτερική όψη. Τα κύρια ανατομικά μέρη του νεφρού είναι η νεφρική κάψα, ο φλοιός, ο μυελός, η νεφρική πύελος. Ο νεφρός αιματώνεται από τη νεφρική αρτηρία και τη νεφρική φλέβα. Στην εικόνα διακρίνεται η αρχή του ουρητήρα. (Γ) Νεφρώνας (λειτουργική μονάδα). Η λειτουργική μονάδα του νεφρού αποτελείται από την κάψα του Bowman, το σπείραμα, το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, το άπω εσπειραμένο σωληνάριο και το αθροιστικό σωληνάριο.*

Η ουροφόρος κοιλότητα ενώνεται με το ουροφόρο σωληνάριο το οποίο φτάνει μέχρι το άπω εσπειραμένο σωληνάριο. Το ουροφόρο σωληνάριο αποτελείται από πέντε (5) μέρη:

1. το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο,
2. το κατιόν μέρος της αγκύλης του Henle,
3. την αγκύλη του Henle,
4. το ανιόν μέρος της αγκύλης του Henle και το
5. άπω εσπειραμένο σωληνάριο το οποίο ενώνεται με το αθροιστικό σωληνάριο.

Πιο αναλυτικά, το ουροφόρο σωληνάριο εισέρχεται στη μυελώδη μοίρα από όπου σχηματίζεται η αγκύλη του Henle και φτάνει μέχρι το ανιόν μέρος της αγκύλης, που συνδέεται με το άπω εσπειραμένο σωληνάριο και το αθροιστικό σωληνάριο. Το μήκος του ουροφόρου σωληναρίου φτάνει από 2 έως 4,5 cm. Το αθροιστικό

σωληνάριο σχηματίζεται από την ένωση πολλών μικρών αθροιστικών σωληναρίων που προέρχονται μέσα από τις πυραμίδες των νεφρών και συγκεκριμένα από τη νεφρική πύελο. Το επιθήλιο του τοιχώματος του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου είναι κυβοειδές προς κυλινδρικό ενώ του άπω εσπειραμένου σωληναρίου είναι μονόστιβο κυβοειδές προς κυλινδρικό με χαμηλού ύψους κυλινδρικά κύτταρα (14).

Το παρασπειραματικό σωληνάριο βρίσκεται στην αρχή του μαλπιγγιανού σωληναρίου και είναι γνωστό για τις ενδοκρινείς λειτουργίες του και συγκεκριμένα για την παραγωγή και την έκκριση της ρενίνης. Αποτελείται από τρία είδη κυττάρων τα κοκκιώδη, τα εξειδικευμένα κύτταρα και τα ακοκκιοκύτταρα. Τα κοκκιώδη κύτταρα βρίσκονται στο μέσο χιτώνα του προσαγωγού αρτηριδίου και είναι αυτά που περιέχουν τη ρενίνη. Τα εξειδικευμένα κύτταρα βρίσκονται στο άπω εσπειραμένο τμήμα και αποτελούν την πυκνωτική κηλίδα. Τέλος, τα ακοκκιοκύτταρα βρίσκονται μεταξύ της πυκνωτικής κηλίδας και της γωνίας που σχηματίζουν τα προσαγωγά και απαγωγά αρτηρίδια κοντά στη πύλη του μαλπιγγιανού σωματιδίου (15).

A1.1.3. Φυσιολογία

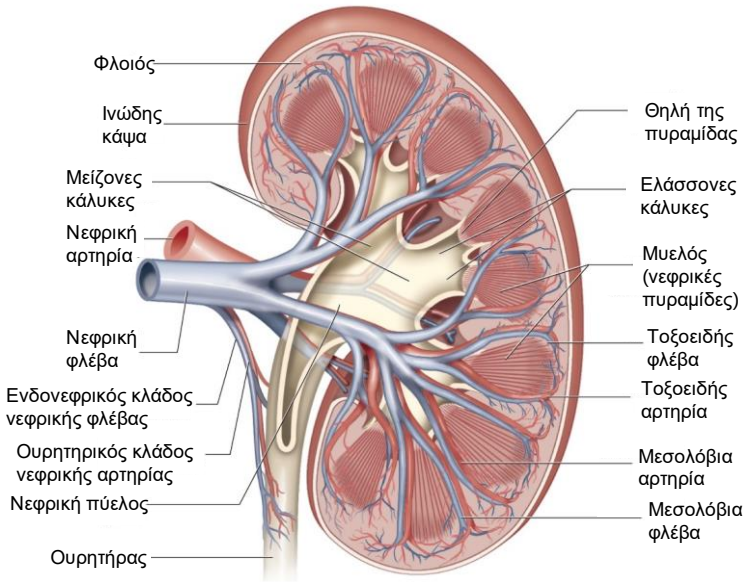
A1.1.3.1. Αιμάτωση

Το νεφρικό σύστημα είναι γνωστό για την ιδιάζουσα ανατομία του, η οποία σε συνδυασμό με το έργο που επιτελεί χρειάζεται περισσότερη αιμάτωση σε σύγκριση με άλλους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού.

Οι νεφροί αποτελούν δύο από τα βαρύτερα όργανα του σώματος, καθώς ζυγίζουν κοντά στα 300 γραμμάρια το κάθε ένα. Συνολικά αποτελούν το 0,4% του συνολικού βάρους ενός ατόμου και από αυτά διέρχονται περίπου 1.300mL αίμα ανά λεπτό. Συνολικά το 25% του αίματος που παράγει η καρδιά ανά λεπτό πηγαίνει στους νεφρούς. Η αιμάτωση των νεφρών είναι μεγάλη καθώς είναι αναγκαία για την παραγωγή των ούρων (16).

Η αιμάτωση των νεφρών πραγματοποιείται μέσα από τη νεφρική αρτηρία και τις διακλαδώσεις που κάνει στη μυελώδη και φλοιώδη μοίρα, ως τοξοειδής αρτηρία, από την οποία εκβάλουν οι μεσολόβιες αρτηρίες που εισέρχονται εντός της φλοιώδους μοίρας. Οι μεσολόβιες αρτηρίες οδηγούνται στα προσαγωγά αρτηρίδια,

που εισέρχονται στα μαλπιγγιανά σωμάτια και με τη σειρά τους διακλαδίζονται σε τριχοειδή αγγεία εντός του ελύτρου του Bowman, που είναι γνωστά ως αγγειώδες σπειραματικό δίκτυο, από το οποίο σχηματίζεται η προσαγωγός και απαγωγός αρτηρία (**Εικόνα 2**). Η απαγωγός αρτηρία με τη σειρά της διακλαδίζεται σε τριχοειδή σωληνάρια, τα οποία αιματώνουν το εγγύς και το άπω εσπειραμένο σωληνάριο και μερικά τμήματα των αθροιστικών σωληναρίων που βρίσκονται εντός της φλοιώδους μοίρας (2).



Εικόνα 2. ***Αιμάτωση Νεφρού (17).*** *Η αιμάτωση των νεφρών πραγματοποιείται μέσα από τη νεφρική αρτηρία και τις διακλαδώσεις που κάνει στη μυελώδη και φλοιώδη μοίρα, ως τοξοειδής αρτηρία, από την οποία εκβάλουν οι μεσολόβιες αρτηρίες που εισέρχονται εντός της φλοιώδους μοίρας. Οι μεσολόβιες αρτηρίες οδηγούνται στα προσαγωγά αρτηρίδια, που εισέρχονται στα μαλπιγγιανά σωμάτια και με τη σειρά τους διακλαδίζονται σε τριχοειδή αγγεία εντός του ελύτρου του Bowman, που είναι γνωστά ως αγγειώδες σπειραματικό δίκτυο, από το οποίο σχηματίζεται η προσαγωγός και απαγωγός αρτηρία. Η απαγωγός αρτηρία με τη σειρά της διακλαδίζεται σε τριχοειδή σωληνάρια, τα οποία αιματώνουν το εγγύς και το άπω εσπειραμένο σωληνάριο και μερικά τμήματα των αθροιστικών σωληναρίων που βρίσκονται εντός της φλοιώδους μοίρας* (2).

Τα απαγωγά αρτηρίδια που βρίσκονται στα παραμυελικά μαλπιγγιανά σωμάτια, διακλαδίζονται στα ευθεία αγγεία, τα οποία έχουν την ικανότητα να εισχωρούν βαθιά μέσα στη μυελώδη μοίρα. Τα ευθεία αγγεία βρίσκονται παράλληλα της αγκύλης του Henle και φτάνουν μέχρι τα μυελικά όρια, από όπου και εκβάλουν προς τις τοξοειδείς φλέβες. Κατά μήκος του ευθέος αγγείου δημιουργούνται τριχοειδή πλέγματα, τα οποία έρχονται σε άμεση επαφή με το τοίχωμα του ανιόντος και κατιόντος μέρους του ουροφόρου σωληναρίου. Τα ευθεία αγγεία μαζί με τα εσπειραμένα σωληνάρια που εκβάλουν εντός των τοξοειδών φλεβών, ενώνονται και σχηματίζουν τη νεφρική φλέβα (18).

Α1.1.3.2. Παραγωγή ούρων

Η παραγωγή των ούρων λαμβάνει χώρα στα μαλπιγγιανά σωμάτια. Αναλυτικά, η διήθηση του πλάσματος που πραγματοποιείται προς την ουροφόρο κοιλότητα οδηγεί στη παραγωγή υπερδιηθήματος του πλάσματος, το οποίο ρέει κατά μήκος του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου και μέσα από αυτό ο οργανισμός επαναρροφά ένα μεγάλο ποσοστό του νερού και των ηλεκτρολυτών που εμπεριέχεται μέσα σε αυτό. Ο διαχωρισμός των ουσιών που εμπεριέχονται στα ούρα πραγματοποιείται μέσα στο ουροφόρο σωληνάριο (19). Η οξεοβασική ρύθμιση πραγματοποιείται στα υπόλοιπα αθροιστικά σωληνάρια του συστήματος. Σημαντικό ρόλο σε όλη τη διαδικασία παίζουν τα κύτταρα των ουροφόρων και αθροιστικών σωληναρίων καθώς από αυτά εκκρίνονται και απορροφώνται σημαντικές για αυτήν τη διαδικασία ουσίες (20).

Το υπερδιήθημα του πλάσματος δημιουργείται εξαιτίας της διαφοράς της υδροστατικής πίεσης που υπάρχει μεταξύ των τριχοειδών αγγείων του αγγειώδους σπειράματος και της ουροφόρου κοιλότητας. Υπολογίζεται ότι η υδροστατική πίεση ανέρχεται στα 70mmHg εντός των τριχοειδών αγγείων, ενώ του υπερδιηθήματος εντός της ουροφόρου κοιλότητας υπολογίζεται στα 15mmHg. Ακόμα, η κολλοειδής ωσμωτική πίεση εντός του πλάσματος κυμαίνεται γύρω στα 25mmHg εξαιτίας της παρουσίας λευκωμάτων, με αποτέλεσμα σε αυτό να προσκολλώνται οι κρυσταλλοειδείς ουσίες. Ο όγκος του παραγόμενου διηθήματος εξαρτάται άμεσα από τα παραπάνω. Συνεπώς, η δραστική πίεση διήθησης (Effective Filtration Pressure, EFP) του υπερδιηθήματος του πλάσματος υπολογίζεται ότι είναι:

70mmHg – (25mmHg + 15mmHg) = 30mmHg (21)

Η αρτηριακή πίεση εντός του αγγειώδους σπειράματος κυμαίνεται σταθερά από 80 έως 200mmHg, εξαιτίας ενός μηχανισμού αυτορρύθμισης, ο οποίος ρυθμίζει το ρυθμό της συστολής ανάλογα με το ρυθμό της αρτηριακής πίεσης. Παρόλα αυτά πρέπει να αναφερθεί ότι η υδροστατική πίεση αυξάνεται όταν υπάρχει παρακώληση των ούρων μέσα στα ουροφόρα ή τα αποχετευτικά σωληνάρια, ενώ αντιθέτα μειώνεται όταν καταστρέφονται οι νεφρώνες λόγω διαφόρων παθήσεων. Συνολικά, ο ανθρώπινος οργανισμός παράγει 180L διήθημα μέσα σε μια ημέρα. Το 90% αυτού επαναρροφάται από το αίμα και τελικά παράγονται και αποβάλλονται από τον οργανισμό 1L έως 1,5L ούρα ημερήσια (22).

A1.1.3.3. Επαναρρόφηση ουσιών

Τα ουροφόρα σωληνάρια παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς σε αυτά γίνεται η παραγωγή του διηθήματος καθώς και η επαναρρόφηση πολλών από τις ουσίες που εμπεριέχονται σε αυτό. Η γλυκόζη, η κρεατινίνη, τα αμινοξέα, το ουρικό οξύ, τα λευκώματα, διάφορα ανόργανα ανιόντα και κατιόντα είναι οι ουσίες που περιέχονται στο διήθημα.

Η γλυκόζη αποτελεί ένα από τα βασικότερα συστατικά του οργανισμού καθώς η τιμή της επηρεάζει σημαντικά την ομοιόστασή του. Η συγκέντρωσή της στο αίμα παραμένει πάντα εντός των φυσιολογικών ορίων που έχουν οριστεί. Η γλυκόζη απορροφάται πλήρως από τα σωληνάρια με αποτέλεσμα να μην εμπεριέχεται στα ούρα. Από την άλλη πλευρά τα αμινοξέα επαναρροφώνται στο αίμα με τη βοήθεια ορισμένων ενζυμικών μηχανισμών. Ο μηχανισμός των αμινοξέων μοιάζει με εκείνον της γλυκόζης, καθώς και εδώ η επαναρρόφηση φτάνει στη μέγιστη τιμή, ενώ η αποβολή των αμινοξέων από τα ούρα γίνεται μόνο σε υπέρβαση των ορίων τους (23).

Σημαντικό ρόλο, επίσης, παίζει και η επαναρρόφηση των ανόργανων ανιόντων και κατιόντων, καθώς κάθε στοιχείο έχει τη δική του λειτουργία. Για παράδειγμα, η φωσφορική ρίζα ($PO_4 \cdot$), χρειάζεται να παραμένει σε σταθερά επίπεδα στο πλάσμα, για αυτό και όταν είναι σε υψηλές συγκεντρώσεις αποβάλλεται από τα ούρα. Η μείωση της παραθορμόνης και η αύξηση της καλσιτονίνης επηρεάζουν τα επίπεδα

του φωσφόρου, καθώς η πρώτη οδηγεί σε φωσφατουρία και η δεύτερη σε κατακράτηση του φωσφόρου από τον οργανισμό. Η θειική (SO_4·) και ανθρακική ρίζα (HCO_3^-·) μεταβάλλονται εξίσου και το ποσό που επαναρροφάται από εκείνες από το υπερδιήθημα είναι ανάλογο με τις ανάγκες που υπάρχουν στον οργανισμό, ώστε να επέλθει ισορροπία.

Από την άλλη πλευρά, η απορρόφηση του χλωρίου (Cl^-) εξαρτάται από το ποσοστό επαναρρόφησης του χλωριούχου νατρίου (NaCl) στο αίμα. Το νάτριο (Na) μαζί με το χλώριο παίζουν σημαντικό ρόλο στην ισοτονικότητα του αίματος, ενώ η περίσσεια ποσότητα του καλίου (K^+) απεκκρίνεται μέσα από τα ούρα με το μεγαλύτερο ποσοστό του να επαναρροφάται. Αντίστοιχα, η απορρόφηση των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) και μαγνησίου (Mg^{2+}) φτάνει το 50% με 60%. Το ακριβές ποσοστό του ασβεστίου που θα κατακρατηθεί από τον οργανισμό αλλά και που θα αποβληθεί μέσα από τα ούρα ρυθμίζεται από την παραθορμόνη. Τέλος, το ουρικό οξύ επαναρροφάται κοντά στο 90% και η ουρία κατά 50% (24).

A1.3.3.4. Η αγκύλη του Henle

Η αγκύλη του Henle (**Εικόνα 3**) έχει τέσσερις βασικές ιδιότητες:

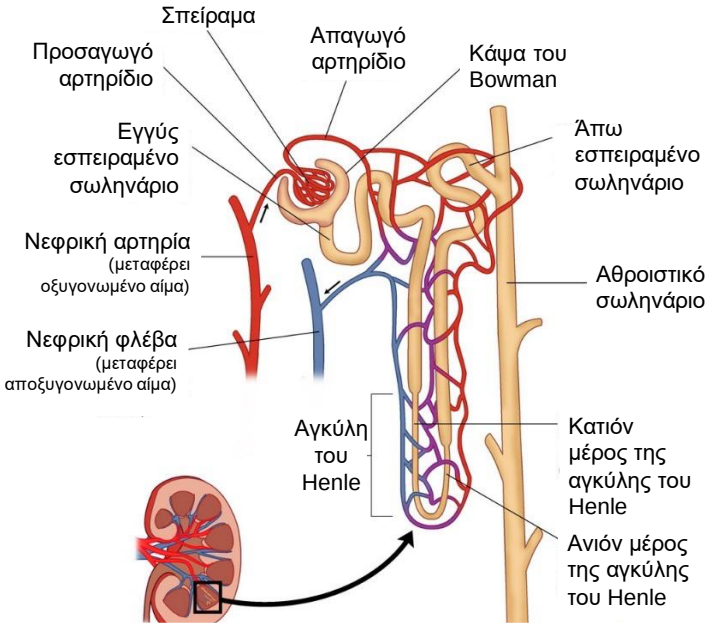
1. Τη συμπύκνωση/ αραίωση των ούρων
2. Την απέκκριση των ιόντων καλίου
3. Την επαναρρόφηση των ιόντων νατρίου
4. Τη ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας

Η συμπύκνωση/αραίωση των ούρων έχει ως στόχο την ισοτονικότητα των ούρων που αποβάλλονται από τον οργανισμό, δηλαδή την ύπαρξη σταθερής ωσμωτικής πίεσης στα 290mOsmol/L. Μέσα στην αγκύλη του Henle, παράγονται υπέρτονα, ισότονα ή υπότονα ούρα ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες. Η ρύθμιση της οσμωτικότητας επιτυγχάνεται μέσω των κυττάρων του τοιχώματος του ανιόντος μέρους της αγκύλης του Henle, τα οποία παρασύρουν προς την έξοδο ιόντα χλωρίου και νατρίου, με αποτέλεσμα το ενδοσωληναριακό υγρό να είναι υπότονο και το υπερσωληναριακό υπέρτονο, λόγω των ιόντων του NaCl και της ουρίας, που

βρίσκονται στο κατιόν μέρος της αγκύλης του Henle. Η παλίνδρομη κίνηση του NaCl και της ουρίας μέσα στην αγκύλη, έχουν ως αποτέλεσμα, το αίμα που βρίσκεται στην αρχή της καμπύλης να είναι υπέρτονο και το αίμα που καταλήγει στις τοξοειδείς φλέβες στο τέλος της καμπύλης να έχει φυσιολογική ωσμωτική πίεση, αποβάλλοντας τις μη χρήσιμες ουσίες (2).

Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η συμπύκνωσή των ούρων είναι ο εξής:
Τα υπέρτονα ούρα εκκρίνονται από τον οργανισμό μαζί με την ανάλογη ποσότητα αντιδιουρητικής ορμόνης (Anti-Diuretic Hormone, ADH), ώστε να υπάρχει ισορροπία στον οργανισμό. Τα ούρα ξεκινούν από το υπότονο περιβάλλον του άπω εσπειραμένου σωληναρίου και φτάνουν στο ισότονο υγρό που βρίσκεται στη φλοιώδη μοίρα με αποτέλεσμα να επέλθει ισοτονία στο υγρό. Στη συνέχεια, οδηγείται στο υπέρτονο περιβάλλον του περισωληναριακού υγρού, όπου επέρχεται η συμπύκνωση των ούρων λόγω της υπερ-έκκρισης της ADH, και συνεπώς λόγω της μεγάλης αύξησης της ωσμωτικής πίεσης του πλάσματος. Αντίστοιχα, η αραίωση των ούρων γίνεται ως εξής: Η ανάγκη του οργανισμού για τη δημιουργία υπότονων ούρων οδηγεί στη μειωμένη έκκριση της ADH. Έτσι, τα ούρα ξεκινούν από το υπότονο περιβάλλον του άπω εσπειραμένου σωληναρίου και καταλήγουν στο τέλος των σωληναρίων, ως υποτονικά ούρα τα οποία καταλήγουν στη νεφρική πύελο (19).

Κατά τη διάρκεια των παραπάνω διεργασιών παράλληλα, αποβάλλονται ιόντα καλίου και επαναρροφώνται ιόντα νατρίου. Αρχικά, το κάλιο απορροφάται πλήρως από το εγγύς εσπειραμένο δίκτυο. Ωστόσο, για να μπορέσει να υπάρξει ισορροπία σχετικά με την τελική ποσότητα του καλίου στο πλάσμα, τα άπω εσπειραμένα και τα αποχετευτικά σωληνάρια εκκρίνουν ιόντα καλίου ύστερα από την εντολή που δίνεται από τα αλατοκορτκοειδή που βρίσκονται στο φλοιό των επινεφριδίων. Το 70% του νατρίου απορροφάται από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, ενώ το υπόλοιπο 30% απορροφάται από το άνω σκέλος της καμπύλης του Henle εξαιτίας των ιόντων χλωρίου που υπάρχουν (22). Στη συνέχεια, το νάτριο επαναρροφάται από το άπω εσπειραμένο δίκτυο λόγω της ανταλλαγής που γίνεται με τα ιόντα καλίου και υδρογόνου. Τέλος, στα αθροιστικά σωληνάρια γίνεται η τελική επαναρρόφηση των ιόντων καλίου προς το εξωκυττάριο υγρό, ώστε να επέλθει η ισοτονικότητα, η οποία ελέγχεται από τα αλατοκορτικοειδή που βρίσκονται στο φλοιό των επινεφριδίων (7).



Εικόνα 3. Η αγκύλη του Henle (25). *Ανατομικά η αγκύλη του Henle αποτελείται από ένα λεπτό κατιόν και ένα παχύ ανιόν σκέλος. Τα δύο αυτά τμήματα πορεύονται παράλληλα. Στις μακριές αγκύλες (από τους παραμυελώδεις νεφρώνες) διακρίνεται και ένα λεπτό ανιόν σκέλος στη μυελώδη πλευρά του ανιόντος. Τα δύο σκέλη της αγκύλης του Henle έχει παρατηρηθεί να έχουν όχι μόνο μορφολογικές αλλά και λειτουργικές διαφορές. Ως αποτέλεσμα, το κατιόν είναι αδιαπέραστο σε ιόντα ενώ είναι διαπερατό στο νερό. Το αντίθετο συμβαίνει στο ανιόν. Οι παραπάνω ανατομικές και λειτουργικές διαφορές σε συνδυασμό με την παράλληλη πορεία τους έχουν κριτική σημασία στη λειτουργία των πολλαπλασιαστικών παλίνδρομων ρευμάτων που συμμετέχουν στη διαδικασία συμπύκνωσης και αραίωσης των ούρων. Το τελευταίο τμήμα του ανιόντος σκέλους (ακριβώς πριν τη μετάπτωση στο άπω εσπειραμένο) έρχεται σε στενή επαφή με το προσαγωγό και απαγωγό αρτηρίδιο και τα κύτταρά του έχουν ιδιαίτερη μορφολογία σχηματίζοντας την πυκνή κηλίδα.*

A1.3.3.5. Εξωκυττάριο υγρό

Ο τελικός όγκος του εξωκυττάριου υγρού εξαρτάται από το ποσοστό κατακράτησης και απέκκρισης του νατρίου και του νερού. Ειδικοί υποδοχείς, οι ταση οϋποδοχείς, της νεφρικής περιοχής συμβάλλουν σε αυτό, ώστε να αντιλαμβάνονται τις μεταβολές του όγκου του αίματος και του μεσοκυττάριου υγρού στην περιοχή.

Οι ταση οϋποδοχείς βρίσκονται στο εσωτερικό των αγγείων και ενεργοποιούνται όταν εκείνα διαστέλλονται και συστέλλονται. Οι υποδοχείς, δίνουν σήμα στις νευρικές ώσεις, που με τη σειρά τους μαζί με την αλδοστερόνη, ρυθμίζουν

την έκκριση της ADH και της φλοιοτρόπου ορμόνης, οι οποίες ρυθμίζουν τον τελικό όγκο του εξωκυττάριου υγρού (3).

A1.1.3.6. Ούρα

Τα ούρα που αποβάλλονται ημερήσια από τον οργανισμό είναι κατά μέσο όρο 1.500ml για τους άνδρες και 1.200ml για τις γυναίκες, υπό φυσιολογικές συνθήκες, με το ειδικό βάρος να κυμαίνεται από 1.015 έως 1.020. Όσον αναφορά την ωσμωτική πίεση αυτή είναι είτε μικρότερη, είτε μεγαλύτερη είτε ίση με την ωσμωτική πίεση του πλάσματος, ανάλογα με την ανάγκη που υπάρχει, ώστε να παραμείνει η ωσμωτικότητα του πλάσματος σταθερή.

Τα ούρα χαρακτηρίζονται ανάλογα με την ωσμωτική πίεση ως υπέρτονα, υπότονα, ή ισότονα. Το pH κυμαίνεται από 4 έως 8 και ανάλογα είναι ουδέτερο, αλκαλικό ή όξινο (26).

Τα οργανικά συστατικά που περιέχονται στα ούρα είναι συγκεκριμένα. Η ουρία είναι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, παράγεται ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού των λευκωμάτων και έχει μικρή τοξικότητα. Μια άλλη ουσία που συναντάται στα ούρα είναι η κρεατινίνη. Το ποσό της κρεατινίνης που αποβάλλεται καθημερινά είναι σταθερό καθώς εξαρτάται από τη μυϊκή μάζα του κάθε ατόμου. Το ουρικό οξύ που επίσης περιέχεται στα ούρα, αποτελεί προϊόν μεταβολισμού των πουρινών (αδενίνης και γουανίνης), γεγονός που σημαίνει ότι η ποσότητα παραγωγής και απέκκρισής του εξαρτάται από τα τρόφιμα που καταναλώνει ένας άνθρωπος και από τον καταβολισμό των πουρινών, την αποικοδόμηση του ριβονουκλεϊκού οξέος και του δεσοξυριβονουκλεϊνικού οξέος (27). Το ιππουρικό οξύ παράγεται από τους νεφρούς και έχει ως στόχο την εξουδετέρωση του βενζοϊκού οξέος, ενώ η παραγωγή του εξαρτάται από την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών. Η ινδικάνη παράγεται στο παχύ έντερο και έχει ως στόχο την εξουδετέρωση της ινδόλης, ενώ η τιμή της αυξάνεται με την υπερκατανάλωση κρέατος (26). Άλλα συστατικά που βρίσκονται συνηθώς σε φυσιολογικά επίπεδα είναι το λεύκωμα, τα αμινοξέα και το οξαλικό οξύ. Το γαλακτικό οξύ βρίσκεται σε αυξημένες ποσότητες μετά από έντονη μυϊκή άσκηση. Επιπλέον, στα ούρα βρίσκεται το ουροχολινογόνο και η ουροχολίνη, δυο ουσίες των

οποίων η αύξηση δείχνει την ύπαρξη ηπατικής ανεπάρκειας ή αιμολυτικού ίκτερου. Η γλυκόζη, η αιμοσφαιρίνη (Hemoglobin, Hb) και τα κετονοσώματα είναι υπαρκτά μόνο σε παθολογικές καταστάσεις. Τέλος, σε φυσιολογικές τιμές ανά εικοσιτετράωρο βρίσκονται τα εξής κατιόντα: νάτριο, κάλιο, μαγνήσιο, ασβέστιο, αμμωνία καθώς και τα ανιόντα: χλώριο, θειικό άλας, ανθρακικό οξύ, φωσφορικά ανιόντα (27).

Α2. Νόσοι των Νεφρών

Οι νόσοι των νεφρών παρουσιάζουν στον οργανισμό διάφορα συμπτώματα και κλινικά ευρήματα ανάλογα με το τμήμα που έχει επηρεαστεί. Συνήθως, η κλινική εικόνα ενός ασθενή επαρκεί για να γίνει η σωστή διάγνωση, ωστόσο τα ευρήματα των εργαστηριακών εξετάσεων είναι αυτά που την επιβεβαιώνουν.

Α2.1. Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια

Α2.1.1. Αιτιοπαθογένεια

Τα αίτια εμφάνισης της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας είναι πολλά συμπεριλαμβανομένης της σπειραματονεφρίτιδας, αγγειακής νόσου των νεφρών, χρόνιας πυελονεφρίτιδας, χρόνιας αποφρακτικής ουροπάθειας, σωληναριακής νόσου κ.ά. Τα εργαστηριακά ευρήματα και η κλινική εικόνα του ασθενή είναι αποτέλεσμα της απώλειας της λειτουργίας των νεφρώνων (28).

Α2.1.2. Κλινική εικόνα

Αρχικά, η κλινική εικόνα περιλαμβάνει το αίσθημα της αδυναμίας και κόπωσης, λήθαργο, ανορεξία και απότομη απώλεια βάρους. Η διάρροια, η ευερεθιστότητα και ο κνησμός εμφανίζονται εξίσου συχνά. Επιπλέον, μπορεί τα άτομα να παρουσιάσουν παραισθήσεις, αίσθηση καύσου, μειωμένη αντίδραση αντανακλαστικών, σπασμούς, κεφαλαλγίες και προβλήματα στην όραση. Σπάνια ο ασθενής εμφανίζει αιμορραγία της ρινικής κοιλότητας, εγκεφαλική αιμορραγία ή πνευμονικό οίδημα.

Ως αποτέλεσμα της απώλειας της λειτουργίας των νεφρώνων, οι νεφροί έχουν μειωμένη ικανότητα διατήρησης της οξεοβασικής ισορροπίας, της ωσμωτικότητας και της ποσότητας του νερού στον οργανισμό. Οι νεφρώνες αποκτούν αυξημένο φορτίο διαλυτών ουσιών που οδηγεί σε ωσμωτική διούρηση και μειωμένη ικανότητα απέκκρισης των ούρων οδηγώντας τον οργανισμό σε αφυδάτωση, με τους ασθενείς να εμφανίζουν συχνά αναιμία και υπέρταση.

Α2.1.3. Εργαστηριακά ευρήματα

Το νεφρικό σύστημα παρουσιάζει τόσο μορφολογικές, όσο και λειτουργικές αλλοιώσεις. Συγκεκριμένα, οι νεφροί μειώνονται σε μέγεθος, υπάρχει εκτεταμένη ουλοποίηση και υπερτροφία. Ο μέσος και ο έσω χιτώνας αυξάνονται σε όγκο, ενώ η ροή του αίματος στο σύστημα καθώς και η σπειραματική διήθηση μειώνονται. Το νεφρικό σύστημα καθίσταται ανεπαρκές ως προς τη διατήρηση των ηλεκτρολυτών. Αυτό οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των φωσφορικών, θειικών και των οργανικών οξέων στο αίμα. Τα επίπεδα του νατρίου μειώνονται λόγω της μειωμένης επαναρρόφησης του, σε συνδυασμό με τα επίπεδα του ασβεστίου, του μαγνησίου και της βιταμίνης D, ενώ η αύξηση των επιπέδων καλίου οδηγεί τον ασθενή σε υπερκαλιαιμία. Η μείωση της κάθαρσης οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της ουρίας, του ουρικού οξέος και της κρεατινίνης. Πολλές φορές ο ασθενής παρουσιάζει αναιμία λόγω της μειωμένης παραγωγής ερυθροποιητίνης που παράγουν οι νεφροί, η οποία χαρακτηρίζεται ως ορθόχρωμη ορθοκυτταρική, και του μειωμένου χρόνου επιβίωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Red Blood Cells, RBCs). Τα ούρα περιέχουν ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια καθώς και πρωτεΐνες, κοκκώδεις και κηρώδεις κυλίνδρους.

Στο υπερηχογράφημα των νεφρών παρατηρείται απόφραξη στον ουρητήρα και στην κύστη, ενώ η ακτινογραφία θώρακα πραγματοποιείται για τον έλεγχο της πιθανής ύπαρξης οιδήματος στο πνεύμονα (29).

Α2.1.4. Διαφορική διάγνωση

Η διαφορική διάγνωση είναι απαραίτητη, καθώς η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια παρουσιάζει παρόμοια συμπτώματα με τη χρόνια σπειραματονεφρίτιδα, τη πυελονεφρίτιδα, τη διαβητική νεφροπάθεια και την κακοήθη υπέρταση.

Έχει βρεθεί ότι η αύξηση του μεγέθους των νεφρών είναι αυτή που συμβάλλει στη διαφορική διάγνωση της νόσου (28).

Α2.2. Νεφρική νόσος τελικού σταδίου

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (End Stage Renal Disease, ESRD) αποτελεί το τελικό, μη αναστρέψιμο στάδιο της χρόνιας νεφρικής νόσου, όπου η νεφρική λειτουργία έχει μειωθεί σε σημείο που οι νεφροί δεν μπορούν πλέον να λειτουργήσουν αυτόνομα, δίχως τη μηχανική υποστήριξη (30).

Ασθενής με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου υποβάλλεται σε αιμοκάθαρση ή μεταμόσχευση νεφρού προκειμένου να επιβιώσει.

Α2.2.1. Αιτιοπαθογένεια

Μερικοί από τους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νεφρικής νόσου τελικού σταδίου, είναι ο διαβήτης, η υψηλή αρτηριακή πίεση, οι καρδιακές παθήσεις, η κατάχρηση φαρμάκων, η απόφραξη των ουροποιητικών σωληναρίων, το οικογενειακό ιστορικό, η ύπαρξη φλεγμονών και ορισμένες γενετικές διαταραχές (31).

Επιπλέον, η ύπαρξη χρόνιας νεφρικής νόσου και η μη σωστή και έγκαιρη αντιμετώπισή της μπορεί να προκαλέσει την εξέλιξή της σε νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου.

Α2.2.2. Κλινική εικόνα

Οι ασθενείς εμφανίζουν ποικιλία συμπτωμάτων, τα οποία περιλαμβάνουν κόπωση, υπνηλία, μείωση ή ανικανότητα ούρησης, ξηρό δέρμα, φαγούρα στο δέρμα, πονοκεφάλους, απώλεια βάρους, ναυτία, πόνο στα οστά, επιδεκτικότητα στη δημιουργία εκχυμώσεων (30). Κάποιοι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις πως χρειάζονται άμεσα την έναρξη αιμοκάθαρσης, λόγω της μη ελεγχόμενης υπέρτασης, ή της υπερκαλιαιμίας.

Α2.2.3. Εργαστηριακά ευρήματα

Τα εργαστηριακά ευρήματα δείχνουν συσσώρευση υγρών, μετάλλων, ηλεκτρολυτών και πολλών άλλων ουσιών στο αίμα. Η ανεπάρκεια των νεφρών μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια του ελέγχου της αρτηριακής πίεσης και της παραγωγής νέων RBCs καθώς και διαταραχή του οστικού μεταβολισμού. Η παρουσία του εκτιμώμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης (Glomerular Filtration Rate, GFR) κυμαίνεται σε επίπεδα κάτω των 15 mL/min με την τιμή 1,7 mL/min να θεωρείται ως το τελικό σημείο. Η κρεατινίνη ορού βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα της τάξης του 6,0 mg/dL (530 μmol/L) (32).

Α2.2.4. Διαφορική διάγνωση

Οι γιατροί μπορούν να διαγνώσουν την ασθένεια με εξετάσεις αίματος, εξετάσεις ούρων, υπερηχογράφημα νεφρών, βιοψία νεφρού και αξονική τομογραφία. Υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις όπου η ΧΝΑ τελικού σταδίου μπορεί να διαγνωστεί χωρίς ο ασθενής να έχει συμπτωματική ουραιμία ή να χρειάζεται χρόνια αιμοκάθαρση (5).

Α2.2.5. Ταξινόμηση Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας-Σταδιοποίηση

Η ΧΝΑ μπορεί να ταξινομηθεί ανάλογα με τη βαρύτητα, τη διάγνωση, τη θεραπεία και την πρόγνωση, βάσει των ακόλουθων οδηγιών (33):

1. Ταξινόμηση με βάση τη βαρύτητα. Υπήρξε συμφωνία με την αρχική ταξινόμηση που βασίζεται στο επίπεδο του GFR, χρησιμοποιώντας εξισώσεις εκτίμησης του GFR. Αυτή η αρχική ταξινόμηση είναι απλή, και μπορεί να συνδεθεί με τα «Σχέδια Δράσης». Λόγω της ανακρίβειας των εκτιμήσεων του GFR σε υψηλότερο εύρος GFR, μπορεί να είναι δύσκολο να διακριθούν τα στάδια 1 και 2. Εναλλακτικοί όροι όπως "στάδιο, τάξη ή βαθμός" μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με την τοπική διερμηνεία και τη γλώσσα.

2. Επιπρόσθετη ταξινόμηση με βάση τη θεραπεία αιμοκάθαρσης ή τη μεταμόσχευση. Αυτή είναι απαραίτητη για τη διασύνδεση με την κλινική περίθαλψη και την κλινική αρχή, ειδικά όσον αφορά την οικονομική αποζημίωση. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται η ακόλουθη σήμανση: «Μ» για όλους τους λήπτες μεταμόσχευσης νεφρού, με οποιαδήποτε τιμή GFR (στάδια ΧΝΑ 1 έως 5) και «Κ» για θεραπεία κάθαρσης, για ασθενείς σταδίου 5 που υποβάλλονται σε θεραπεία κάθαρσης. Ανεξάρτητα από το επίπεδο του GFR στο οποίο ξεκινά η θεραπεία, όλοι οι ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία κάθαρσης είναι ΧΝΑ σταδίου 5Δ.

3. Ενθαρρύνεται η περαιτέρω ανάπτυξη ομοφωνίας σχετικά με την ταξινόμηση κατά αιτία της νεφρικής νόσου. Η κλινική αξιολόγηση για τη ΧΝΑ περιλαμβάνει την αποσαφήνιση της αιτίας της νόσου. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αιτία της νόσου δε μπορεί να εξακριβωθεί σε όλες τις περιπτώσεις. Η ταξινόμηση με βάση την αιτία της νόσου θα ήταν επιθυμητή, αλλά απαιτεί την ανάπτυξη τυπικών κριτηρίων για τα αίτια της ΧΝΑ και μια ομοιόμορφη ταξινόμηση.

4. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να καταστεί δυνατή η ταξινόμηση με βάση την πρόγνωση. Η διαστρωμάτωση του κινδύνου για τις κύριες εκβάσεις της ΧΝΑ (απώλεια νεφρικής λειτουργίας και καρδιαγγειακή νόσος) βασίζεται εν μέρει, στο επίπεδο του GFR (στάδιο ΧΝΑ) και στην αιτία της νεφρικής νόσου (**Πίνακας 1**). Άλλοι

παράγοντες είναι επίσης σημαντικοί και λαμβάνονται υπόψη στη διαστρωμάτωση κινδύνου, όπως η έκταση της λευκωματουρίας. Είναι πιθανό ότι αυτοί και άλλοι παράγοντες κινδύνου συμβάλλουν σε διαφορετικό βαθμό στην πιθανότητα διαφορετικών εκβάσεων. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την αποσαφήνιση των παραγόντων κινδύνου και την ανάπτυξη εργαλείων πρόβλεψης κινδύνου για την εξέλιξη της ΧΝΑ και την καρδιαγγειακή νόσο. Τα συστήματα ταξινόμησης μπορεί να είναι απλά ή σύνθετα.

Πίνακας 1. Ταξινόμηση- σταδιοποίηση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (ΧΝΑ) (33).

Ταξινόμηση βάσει βαρύτητας νόσου				
Στάδιο	**Περιγραφή**	**GFR mL/min/1,73 m²**	**Σχετικοί όροι**	**Ταξινόμηση βάσει θεραπείας**
1	Νεφρική βλάβη με φυσιολογικό ή ↑ GFR	≥ 90	Λευκωματουρία, πρωτεϊνουρία, αιματουρία	Μ για μεταμόσχευση νεφρού
2	Νεφρική βλάβη με ήπια ↓ GFR	60-89	Λευκωματουρία, πρωτεϊνουρία, αιματουρία	
3	Μέτρια ↓ GFR	30-59	Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, πρώιμη νεφρική ανεπάρκεια	
4	Σοβαρή ↓ GFR	15-29	Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, όψιμη νεφρική ανεπάρκεια, προ-ESRD	
5	Νεφρική βλάβη	<15 (ή αιμοκάθαρση)	Νεφρική βλάβη, ουραιμία	
				Κ για κάθαρση (αιμοκάθαρση, περιτοναϊκή κάθαρση)

GFR: ρυθμός σπειραματικής διήθησης; ESRD: νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου.
Οι σχετικοί όροι για χρόνια νεφρική νόσο σταδίων 3 έως 5 δεν διαθέτουν συγκεκριμένους ορισμούς, εκτός από την ESRD

A2.2.6. Ουραιμικές τοξίνες

Η ουραιμία είναι ένας ευρύς όρος που έχει χρησιμοποιηθεί ποικιλοτρόπως για να περιγράψει τη συσσώρευση μεταβολικών αποβλήτων, όπως η ουρία, που σχετίζονται με περιορισμένη νεφρική λειτουργία. Μαζί με τη διατήρηση των μεταβολικών αποβλήτων, οι ασθενείς με προχωρημένη νεφρική νόσο παρουσιάζουν συνήθως μια σειρά συμπτωμάτων που μπορεί να περιλαμβάνουν ναυτία, έμετο, κόπωση, ανορεξία, μυϊκές κράμπες, κνησμό, αλλαγές νοητικής κατάστασης και άλλα, τα οποία οδηγούν σε ελαττωμένη ποιότητα ζωής και νοσηρότητα και θνησιμότητα. Δεδομένης της κατακράτησης μεταβολικών αποβλήτων στην προχωρημένη νεφρική νόσο, υπήρξε μεγάλο ενδιαφέρον για τη χρήση τεχνικών αιμοκάθαρσης που απομακρύνουν αυτές τις ουσίες, με στόχο τη βελτίωση των συμπτωμάτων.

Οι κατακρατούμενες ενώσεις, που θεωρούνται υπεύθυνες για το ουραιμικό σύνδρομο, χαρακτηρίζονται ως ουραιμικές τοξίνες. Προκειμένου μία κατακρατούμενη διαλυμένη ουσία να ταξινομηθεί ως ουραιμική τοξίνη πληροί ένα σύνολο προϋποθέσεων:

(1) θα πρέπει να έχει ταυτοποιηθεί χημικά και να είναι εφικτή η ακριβής ποσοτική ανάλυσή της σε βιολογικά υγρά,

(2) τα επίπεδά της στον οργανισμό και στο πλάσμα ουραιμικών ατόμων θα πρέπει να είναι υψηλότερα σε σύγκριση με μη ουραιμικά άτομα,

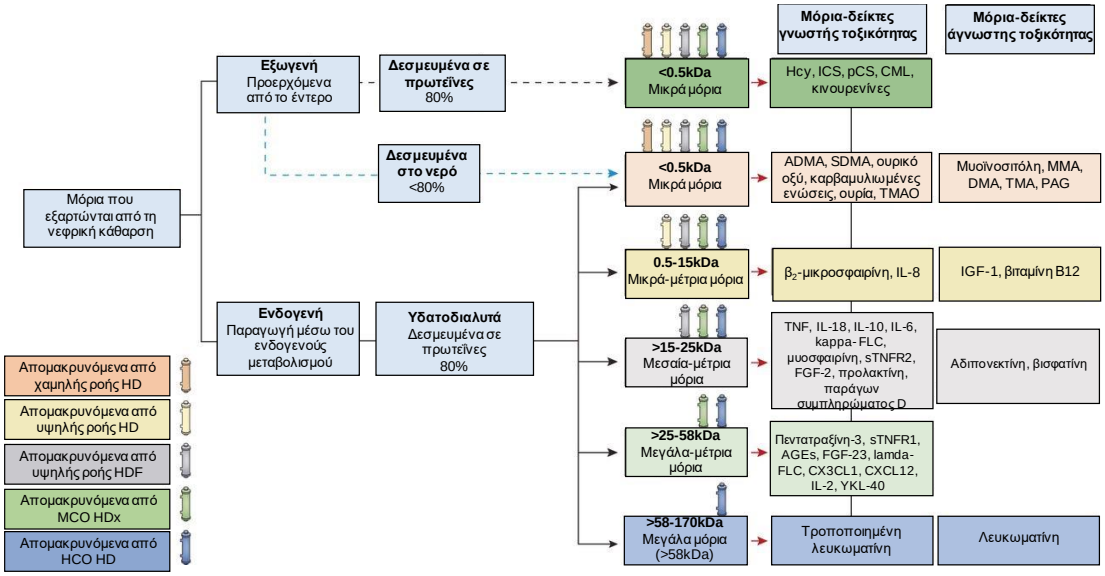
(3) οι υψηλές συγκεντρώσεις θα πρέπει να σχετίζονται με συγκεκριμένες ουραιμικές δυσλειτουργίες ή/και συμπτώματα που μειώνονται ή εξαφανίζονται όταν η συγκέντρωση μειώνεται,

(4) η βιολογική της δραστηριότητα, σύμφωνα με κλινικές αλλαγές που παρατηρούνται σε συνδυασμό με το ουραιμικό σύνδρομο, θα πρέπει να αποδεικνύεται σε μελέτες *in vivo*, *ex vivo* ή *in vitro*, και

(5) οι συγκεντρώσεις της σε αυτές τις μελέτες θα πρέπει να είναι σύμφωνες με εκείνες που βρέθηκαν στα σωματικά υγρά ή στους ιστούς ουραιμικών ασθενών (34).

Το 2003, η Ευρωπαϊκή ομάδα μελέτης ουραιμικών τοξινών (European Uremic Toxin Work Group, EUTox) πρότεινε ένα σύστημα ταξινόμησης των ουραιμικών τοξινών σε τρεις κατηγορίες με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες: (i) ελεύθερες υδατοδιαλυτές, μικρού μοριακού βάρους ουσίες (<500 Da), (ii) ουσίες δεσμευμένες

σε πρωτεΐνες και (iii) μεσαίου μεγέθους μόρια (≥500Da). Σημειώνεται ότι οι χαμηλές τιμές GFR δεν είναι ο μοναδικός λόγος για τη συσσώρευση τοξινών στη νεφρική ανεπάρκεια (35,36). Ωστόσο, ο Rosner και οι συνεργάτες του πρότειναν πρόσφατα ένα σύνολο βιοδεικτών που οριοθετούν ξεχωριστές κατηγορίες ουραιμικών τοξινών (37) (**Εικόνα 4**). Μικρά (<500Da) υδατοδιαλυτά μόρια και η ουρία (60Da) ανταποκρίνονται στα κριτήρια που αναφέρθηκαν παραπάνω και θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν στον πίνακα βιοδεικτών. Η κρεατινίνη (113Da) θα μπορούσε επίσης να θεωρηθεί βιοδείκτης μικρών υδατοδιαλυτών τοξινών, αλλά μόνο εάν ληφθούν υπόψη παράγοντες που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη συγκέντρωσή της, όπως η ηλικία, η μυϊκή μάζα, ο λόγος Kt/V και ο κανονικοποιημένος καταβολικός πρωτεϊνικός ρυθμός (38). Για την αξιολόγηση της κάθαρσης ουσιών μικρής-μέτριας μοριακής μάζας (0,5−15kDa), προτάθηκε η χρήση της παραθυρεοειδούς ορμόνης (9,5kDa) και της β_2-μικροσφαιρίνης (11,8kDa). Για την εκτίμηση της κάθαρσης ουσιών μεσαίας-μέτριας (>15−25kDa) και μέτριας-μεγάλης (>25−58kDa) μοριακής μάζας, προτάθηκε η ανάλυση των ελεύθερων ελαφριών αλυσίδων κ (22,5kDa) και λ (45kDa), αντίστοιχα (37). Η κάθαρση των διαλυμένων ουσιών που δεσμεύονται σε πρωτεΐνες εκτιμάται καλύτερα με αναλύσεις θειικού ινδοξυλεστέρα και θειικού παρακρεζυλεστέρα. Σημειώνεται ότι η υπολειπόμενη νεφρική λειτουργία πιθανά συμβάλει σημαντικά στην απομάκρυνση των διαλυμένων ουσιών για τις οποίες η δέσμευση σε πρωτεΐνες περιορίζει την απομάκρυνση με την αιμοκάθαρση.



Εικόνα 4. Νέος ορισμός και ταξινόμηση των ουραιμικών τοξινών (37). *Η τρίτη στήλη από τα δεξιά προς τα αριστερά υποδιαιρεί τα μόρια ανάλογα με την πρωτεϊνική τους συγγένεια και ακολουθείται από μια στήλη που περιγράφει το μοριακό τους βάρος. Στην κορυφή κάθε κουτιού της στήλης μοριακού βάρους, κάθε έγχρωμο σχέδιο αντιπροσωπεύει μία μέθοδο αιμοκάθαρσης και την αναμενόμενη ικανότητά της να αφαιρεί τις ουσίες με μοριακή μάζα εντός του εύρους που αναπαρίσταται στο κουτί από κάτω. Αν και όλοι οι τύποι διαλυτών αφαιρούν μικρές υδατοδιαλυτές ενώσεις και ενώσεις δεσμευμένες σε πρωτεΐνες, η απομάκρυνση των τελευταίων είναι λιγότερο διαδεδομένη. Η μαύρη διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει ότι πολλές ενώσεις με πρωτεϊνική δέσμευση ≥80% παράγονται εντερικά. Η μπλε διακεκομμένη γραμμή δείχνει ότι ορισμένες μικρές υδατοδιαλυτές ενώσεις μπορεί να παράγονται εντερικά. ADMA, ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη; AGEs, τελικά προϊόντα προηγμένης γλυκοζυλίωσης. CML, καρβοξυμεθυλ-λυσίνη; CXCL12, προσδέτης χημειοκίνης (μοτίβο C-X-C) 12; CX3CL1, προσδέτης χημειοκίνης (μοτίβο C-X3-C) 1; DMA, διμεθυλαμίνη; FGF, αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών; FLC, ελεύθερη ελαφριά αλυσίδα; HCO, υψηλή διαλογή; Hcy, ομοκυστεΐνη; HD, αιμοκάθαρση; HDF, αιμοδιαδιήθηση; HDx, διευρυμένη αιμοκάθαρση. IGF-1, αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης 1; IL, ιντερλευκίνη; IS, θειικό ινδοξύλιο; MCO, μεσαία διαλογή; MMA, μονομεθυλαμίνη; PAG, φαινυλακετυλογλουταμίνη; pCS, παρα-κρεζυλοθειικό; SMDA, συμμετρική διμεθυλαργινίνη; sTNFR, διαλυτός υποδοχέας παράγοντα νέκρωσης όγκων; TMA, τριμεθυλαμίνη; TMAO, N-οξείδιο τριμεθυλαμίνης; YKL-40, πρωτεΐνη 1 που προσομοιάζει με τη χιτινάση 3.*

Α3. Αιμοκάθαρση

Η αιμοκάθαρση αποτελεί ένα είδος αποκατάστασης της λειτουργίας των νεφρών, με στόχο την επιβράδυνση της εξέλιξης της νεφρικής ανεπάρκειας και τον περιορισμό των συμπτωμάτων. Οι γιατροί ενημερώνουν από την αρχή τους ασθενείς σχετικά με τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης, καθώς και με τις συνέπειες που έχει

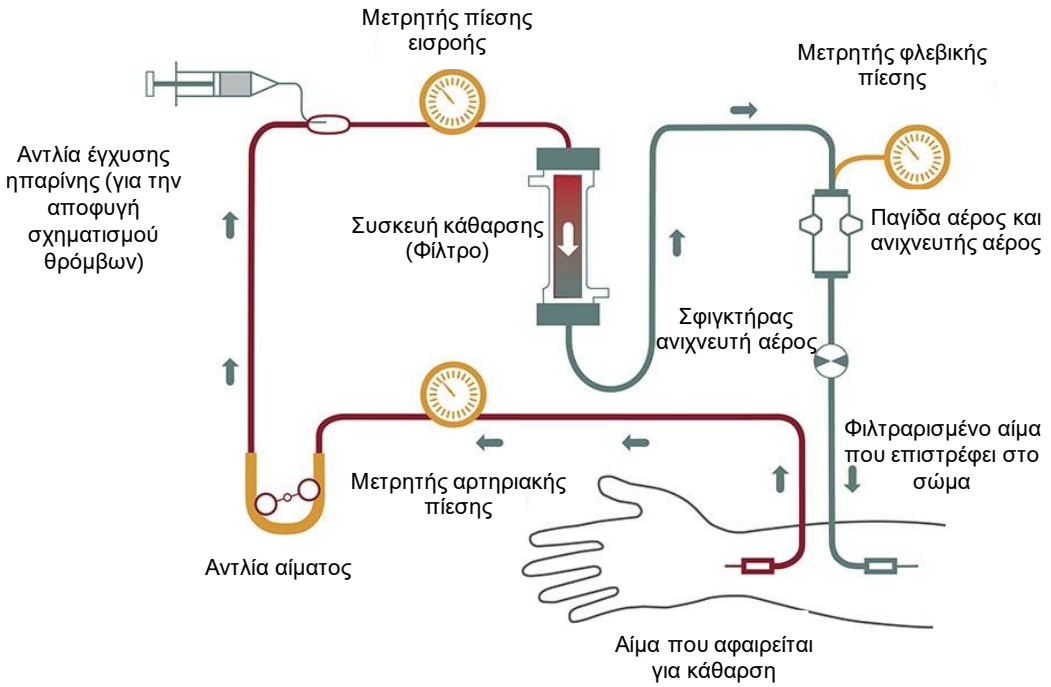
αυτό το είδος της θεραπείας. Στην περίπτωση που ο ασθενής συμφωνήσει, χρειάζεται να εφαρμοστεί μια ειδική προετοιμασία στη φλεβική αρτηρία με την τοποθέτηση μιας αρτηριοφλεβικής αναστόμωσης (fistula), για την αποφυγή μελλοντικών επιπλοκών.

Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης περιλαμβάνει την απομάκρυνση από το αίμα ανεπιθύμητων ουσιών και την επιστροφή του «καθαρισμένου» αίματος πίσω στον οργανισμό. Η παραπάνω διαδικασία γίνεται μέσω της διάχυσης ουσιών όπως η κυτταρίνη, η κουπροφάνη, η πολυσουλφόνη και το πολυακρυλονιτρίλιο από μία ημιδιαπερατή μεμβράνη. Πιο αναλυτικά, το αίμα περνά μέσα από τη μια πλευρά της μεμβράνης, ενώ από την άλλη πλευρά περνά το διάλυμα αιμοκάθαρσης. Με αυτό τον τρόπο βάσει τις διαδικασίας διάχυσης ή διήθησης αποβάλλονται από τον οργανισμό οι άχρηστες ουσίες. Η μέθοδος αυτή έχει παρομοιαστεί με τη σπειραματική διήθηση με την οποία λειτουργούν φυσιολογικά οι νεφροί. Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης κάνει τους ασθενείς με ανεπαρκή νεφρική λειτουργία, να ζουν για μεγάλο χρονικό διάστημα (39).

Η συσκευή με την οποία πραγματοποιείται η διαδικασία της αιμοκάθαρσης έχει τρία μέρη (**Εικόνα 5**). Το πρώτο μέρος είναι το σύστημα προσαγωγής του αίματος, το δεύτερο το σύστημα σύνθεσης του διαλύματος και το τρίτο το σύστημα προσφοράς του διαλύματος στο σώμα. Συγκεκριμένα, το αίμα αντλείται από τη φλεβική αρτηρία με την παροχή να κυμαίνεται σε φυσιολογικά επίπεδα από 300-350mL/min. Το διάλυμα της αιμοκάθαρσης τοποθετείται από μια ειδική δεξαμενή στο μηχάνημα, όπου και παράγεται το υγρό της αιμοκάθαρσης που διοχετεύεται στον οργανισμό μέσα από τη μεμβράνη, πάντα σε αντίθετη ροή από αυτή του αίματος, με ρυθμό 500mL/min. Το υγρό της αιμοκάθαρσης είναι παρόμοιας σύστασης με το πλάσμα αλλά είναι καθαρό από λευκώματα. Ωστόσο, τα συστατικά και οι ποσότητες του υγρού διαφέρουν σε κάθε ασθενή, ανάλογα με τις κλινικές του ανάγκες.

Για να είναι επιτυχής η διαδικασία της αιμοκάθαρσης χρειάζεται ο ασθενής να κάνει συνολικά 9 έως 12 ώρες την εβδομάδα. Το χρονικό διάστημα που θα διαρκέσει η διαδικασία εξαρτάται από το ποσοστό της νεφρικής λειτουργίας, τη φύση της πάθησης και τις επιπλοκές που πιθανόν να έχουν προκληθεί στον οργανισμό. Από τα παραπάνω εξαρτάται και το είδος του φίλτρου που θα χρησιμοποιηθεί καθώς και η ροή του διαλύματος και του αίματος.

Αξίζει, ωστόσο, να αναφερθούν και οι επιπλοκές που συμβαίνουν στους ασθενείς με χρόνια αιμοκάθαρση. Αρχικά, η αρτηριοφλεβική αναστόμωση οδηγεί σε λοιμώξεις, θρομβώσεις ή ακόμα στο σχηματισμό ανευρυσμάτων στην περιοχή. Παράλληλα καθίσταται υψηλός ο κίνδυνος εμφάνισης σηψαιμίας και σηπτικών εμβολών στην περιοχή. Ο συνήθης παθογόνος παράγοντας που ευθύνεται για λοιμώξεις είναι ο *Staphylococcus aureus.* Ακόμα, μπορεί να υπάρξει μεταβολή της ωσμωτικότητας ή των ηλεκτρολυτών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αρρυθμιών. Μια ακόμη συνήθης επιπλοκή είναι η υπόταση που οφείλεται στις μεταβολές της πίεσης του αίματος, του υπερδιηθήματος και της ωσμωτικότητας καθώς και στη χρήση των αντι-υπερτασικών παραγόντων. Οι δευτεροπαθείς επιπλοκές που εμφανίζονται είναι η άνοια και η οστεομαλακία. Τέλος, χρειάζεται να αναφερθεί και ο ψυχολογικός παράγοντας, ο οποίος είναι αρκετά σημαντικός. Πολλοί ασθενείς έχουν κατάθλιψη ή εμφανίζουν συναισθηματικές διακυμάνσεις εξαιτίας της επίπονης διαδικασίας της αιμοκάθαρσης (6).



Εικόνα 5. Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης (40). *Η συσκευή με την οποία πραγματοποιείται η διαδικασία της αιμοκάθαρσης έχει τρία μέρη. Το πρώτο μέρος είναι το σύστημα προσαγωγής του αίματος, το δεύτερο το σύστημα σύνθεσης του διαλύματος και το τρίτο το σύστημα προσφοράς του διαλύματος στο σώμα. Συγκεκριμένα, το αίμα αντλείται από τη φλεβική αρτηρία στο μηχάνημα από όπου και μετράται η παροχή και πίεση του, με την παροχή να κυμαίνεται σε φυσιολογικά επίπεδα από 300 – 350 mL/min. Το διάλυμα της αιμοκάθαρσης τοποθετείται από μια ειδική δεξαμενή στο μηχάνημα, όπου και παράγεται το υγρό της αιμοκάθαρσης που διοχετεύεται στον οργανισμό μέσα από τη μεμβράνη, πάντα σε αντίθετη ροή από αυτή του αίματος, με ρυθμό 500 mL/min. Το υγρό της αιμοκάθαρσης είναι παρόμοιας σύστασης με το πλάσμα αλλά είναι καθαρό από λευκώματα. Ωστόσο, τα συστατικά και οι ποσότητες που βρίσκονται τα συστατικά του υγρού διαφέρουν σε κάθε ασθενή, ανάλογα με τις κλινικές του ανάγκες.*

Α4. Αιμόσταση

Ταυτόχρονα με την ανάπτυξη ενός αγγειακού συστήματος με στόχο τη διανομή των θρεπτικών ουσιών και την απομάκρυνση των παραπροϊόντων, υπάρχει ένα σύστημα το οποίο είναι υπεύθυνο ώστε να διατηρεί την ακεραιότητα των αγγείων για την πρόληψη της αιμορραγίας. Αυτό το σύστημα διατηρεί ταυτόχρονα το αίμα σε ρευστή κατάσταση, έτσι ώστε η πρόληψη της αιμορραγίας να λαμβάνει χώρα μόνο όταν υπάρχει λύση του αγγείου (τραυματισμός) (41). Το σύστημα της αιμόστασης

βρίσκεται σε ισορροπία, δημιουργώντας στερεούς θρόμβους που αποτρέπουν τη διαρροή του αίματος όπου χρειάζεται, ενώ ταυτόχρονα το διατηρεί σε υγρή μορφή σε όλη την αρχιτεκτονική του αγγείου. Η αιμόσταση αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μηχανισμούς του οργανισμού. Συγκαταλέγεται στους αμυντικούς μηχανισμούς και κατά τη διάρκεια της δράσης του λαμβάνουν χώρα στον ίδιο χρόνο βιοχημικοί μηχανισμοί και μηχανισμοί αλληλεπίδρασης που περιλαμβάνουν τους παράγοντες πήξης και κύτταρα του αίματος και συγκεκριμένα PLTs και κύτταρα του ενδοθηλίου των αγγείων (42). Οι παραπάνω μηχανισμοί έχουν κοινό στόχο, την προστασία του οργανισμού από αιμορραγία ή θρόμβωση και αυτό το επιτυγχάνουν με τη διατήρηση του αίματος σε ρευστή μορφή μέσα στα αγγεία.

Το αιμοστατικό σύστημα είναι πολύπλοκο και περιλαμβάνει τα αγγεία, τα εξειδικευμένα κύτταρα του αίματος και διαλυτές πρωτεΐνες στο πλάσμα του αίματος. Αυτά τα στοιχεία συνεργάζονται έτσι ώστε το σύστημα πήξης να ενεργοποιείται μόνο όπου υπάρχει αγγειακή βλάβη και απαιτείται σχηματισμός θρόμβου. Η προέλευση της αγγειακής βλάβης μπορεί να είναι μηχανική, χημική ή βιολογική.

Ανεξάρτητα από το αίτιο έναρξης, η βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων προκαλεί εντοπισμένη πήξη του αίματος, η οποία ακολουθείται από ινωδόλυση και επιδιόρθωση του ιστού. Αυτές οι διεργασίες πραγματοποιούνται συνεχώς και σε ισορροπία, χωρίς αξιοσημείωτες συνέπειες όσον αφορά τόσο τη σημαντική απώλεια αίματος όσο και την αγγειακή θρόμβωση.

Οι διάφορες διεργασίες που σχετίζονται με την απόκριση στην αγγειακή βλάβη περιλαμβάνουν την έναρξη, τη διάδοση, τον τερματισμό, την εξάλειψη και την αποκατάσταση (43).

Τα στάδια της αιμόστασης είναι τρία (44):

1. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την πρωτογενή αιμόσταση, η οποία ενεργοποιείται σε περιπτώσεις μικροτραυματισμών των αγγείων. Σε αυτό το στάδιο, τα PLTs ενεργοποιούνται και προσκολλώνται στην τραυματισμένη επιφάνεια μέσω της βοήθειας διαφόρων παραγόντων όπως ο παράγοντας von Willebrand (von Willebrand Factor, vWF). Στην περίπτωση έλλειψης κάποιου παράγοντα τότε η πληγή δε μπορεί να ιαθεί και παρουσιάζεται αιμορραγία.

2. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τη δευτερογενή αιμόσταση, η οποία ενεργοποιείται σε μεγάλους τραυματισμούς των αγγείων. Σε αυτό το στάδιο, ενεργοποιούνται όλοι οι παράγοντες πήξης με στόχο τη δημιουργία θρόμβου και τη διακοπή της αιμορραγίας στη περιοχή.
3. Το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει την ινωδόλυση, η οποία ενεργοποιείται σε μεγάλους και πολλαπλούς τραυματισμούς, και έχει ως στόχο την αναστολή της δημιουργίας ενός πολύ μεγάλου θρόμβου στην τραυματισμένη περιοχή.

Α4.1. Πρωτογενής αιμόσταση

Η πρωτογενής αιμόσταση λαμβάνει χώρα εντός του αγγείου. Η ενδοαυλική επιφάνεια των αγγείων έχει αντιθρομβωτικό χαρακτήρα και προστατεύει τον οργανισμό από τις θρομβώσεις μέσω της αναστολής της ενεργοποίησης των PLTs και των λευκών αιμοσφαιρίων με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ο μηχανισμός της αγγειοδιαστολής. Μετά από έναν τραυματισμό, το αγγείο συστέλλεται ώστε να περιορίσει την απώλεια αίματος και να ξεκινήσει η διαδικασία της αιμόστασης. Η ενεργοποίηση του αγγειακού μηχανισμού γίνεται μέσω του αυτόνομου νευρικού συστήματος που δίνει σήμα στο μυϊκό ιστό των αγγείων μέσω των νευροδιαβιβαστών που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι η επινεφρίνη, η σεροτονίνη και η νοραδρεναλίνη. Ο αγγειακός αυτός μηχανισμός επαρκεί για να σταματήσει την αιμορραγία στα μικρά αγγεία αλλά όχι στα μεγάλα (45).

Τα PLTs ξεκινούν τη δράση τους αμέσως μετά τον τραυματισμό του αγγείου δημιουργώντας αιμοπεταλιακούς θρόμβους με στόχο την αναστολή της αιμορραγίας. Ωστόσο, οι αιμοπεταλιακοί θρόμβοι λόγω της ασταθούς σύστασής τους δεν επαρκούν για να σταματήσει η αιμορραγία. Επιπλέον, το μέγεθος των θρόμβων δεν πρέπει να είναι πολύ μεγάλο καθώς μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην κυκλοφορία του αίματος. Για το λόγο αυτό, ελέγχεται από την προστακυκλίνη και το κολλαγόνο (**Πίνακας 2**), τα οποία ενεργοποιούν την αγγειοδιαστολή και αναστέλλουν την ενεργοποίηση των PLTs.

Πίνακας 2. Οι σημαντικότερες ουσίες που συμμετέχουν στην πρωτογενή αιμόσταση (43).

Ουσία	**Ρόλος-Χαρακτηριστικά**
Κολλαγόνο	Εκκρίνεται στο υποενδοθήλιο
Αναστολέας της εξωγενούς οδού της πήξης (Exogenous Pathway Inhibitor)	Εκκρίνεται από το ενδοθήλιο
Αγγειοδιασταλτικός παράγοντας ενδοθηλιακής προέλευσης (Endothelium-Derived Relaxing Factor, EDRF)	Προκαλεί αγγειοδιαστολή
Προστακυκλίνη (Prostacyclin, PGI2)	Εμποδίζει τη συσσώρευση των αιμοσφαιρίων Ενεργοποιεί την αγγειοδιαστολή
Μιμητές ηπαρίνης	Εμποδίζουν την προσκόλληση των αιμοπεταλίων Συνεργασία με τα μόρια της αντιθρομβίνης Αναστολή της ενδογενούς οδού της πήξεως
Θρομβομοντουλίνη	Συνεργασία με τη θρομβίνη Ενεργοποίηση του αναστολέα της πήξεως, πρωτεΐνη C
Ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου	Ενεργοποίηση πλασμινογόνου και κατ' επέκταση αποδόμηση του ινώδους
Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου	Αναστέλλει τη δράση του tPA
Παράγοντας von Willebrand	Συμμετοχή στο μηχανισμό συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και επιπλέον πρωτεΐνη μεταφορέας του παράγοντα FVIII.

Η διαδικασία της δημιουργίας του αιμοπεταλιακού θρόμβου είναι η εξής:

1. Προσκόλληση των PLTs στο υποενδοθήλιο με τη βοήθεια του παράγοντα vWF. Ο vWF συνδέεται με το κολλαγόνο που βρίσκεται στο υποενδοθήλιο και με τον υποδοχέα της γλυκοπρωτεΐνης (Glycoprotein, GP) Ib που βρίσκεται στην επιφάνεια των PLTs, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους.
2. Απελευθέρωση κοκκίων από τα PLTs αμέσως μετά την ενεργοποίησή τους.
3. Συσσώρευση PLTs εξαιτίας του περιεχομένου των κοκκίων που απελευθερώθηκαν, τα οποία παίζουν το ρόλο του ενεργοποιητή συσσώρευσης στην παρούσα φάση.

4. Δημιουργία αιμοπεταλιακού θρόμβου μέσω της συσσωμάτωσης των ενεργοποιημένων PLTs, η οποία πραγματοποιείται με τη βοήθεια της βιτρονεκτίνης, της φιμπρονεκτίνης και του ινωδογόνου. Παράλληλα, η δράση των GPIb και GPIIb/IIIa που βρίσκονται στην επιφάνεια των PLTs, λειτουργεί συμπληρωματικά σε όλη τη διαδικασία της δημιουργίας του αιμοπεταλιακού θρόμβου (46).

Α4.2. Δευτερογενής αιμόσταση

Α4.2.1. Μηχανισμός πήξης του αίματος

Ο μηχανισμός της πήξης του αίματος λειτουργεί με τη βοήθεια πρωτεϊνών που βρίσκονται στο πλάσμα, συστατικών του ενδοθηλίου και των κυττάρων του αίματος. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα παραπάνω στοιχεία είτε κυκλοφορούν στα αγγεία σε ανενεργή μορφή είτε δεν κυκλοφορούν καθόλου. Ωστόσο, με το που συμβεί κάποιος τραυματισμός ενεργοποιείται ο μηχανισμός πήξης του αίματος, ο οποίος περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης. Ο καταρράκτης αποτελείται από την ενδογενή και εξωγενή οδό, στις οποίες εμπλέκονται τα παραπάνω στοιχεία. Ως καταρράκτης της πήξης ορίζεται ο μηχανισμός ενός συνόλου αντιδράσεων, που ενεργοποιούν τον καταλυτικό μηχανισμό που μετατρέπει το διαλυτό ινωδογόνο σε αδιάλυτο ινώδες και κατόπιν σε πλέγμα ινικής (42).

Η εξωγενής οδός ενεργοποιείται μέσω του ιστικού παράγοντα (Tissue factor, TF). Ο ιστικός παράγοντας είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται φυσιολογικά στα υπο-ενδοθηλιακά κύτταρα και στα κύτταρα που περιβάλλουν αγγεία. Σε περιπτώσεις φλεγμονής ή τραυματισμού, ο ιστικός παράγοντας συνδέεται με τον παράγοντα VII σχηματίζοντας συμπλέγματα TF/FVIIa στην επιφάνεια των κυττάρων. Τα συμπλέγματα αυτά ενεργοποιούν τον παράγοντα X (Xa) και τον παράγοντα IX (IXa), οι οποίοι συμβάλλουν στη δημιουργία του θρόμβου.

Η ενδογενής οδός ενεργοποιείται από τον παράγοντα XII που βρίσκεται στην ενδοθηλιακή και υπο-ενδοθηλιακή στοιβάδα. Ο παράγοντας XI, το κινινογόνο και η προκαλλικρεΐνη δημιουργούν ένα σύμπλεγμα στην επιφάνεια που υπάρχει βλάβη και μέσα από αυτό το σύμπλεγμα ενεργοποιείται ο παράγοντας XIIa, ο οποίος ευθύνεται

για την ενεργοποίηση του παράγοντα XI. Ο παράγοντας XIa συνδέεται με τον παράγοντα VIIIa ενώ ο παράγοντας IXa ενεργοποιεί τον παράγοντα X (Xa) με τη βοήθεια των ιόντων ασβεστίου και των φωσφολιπιδίων.

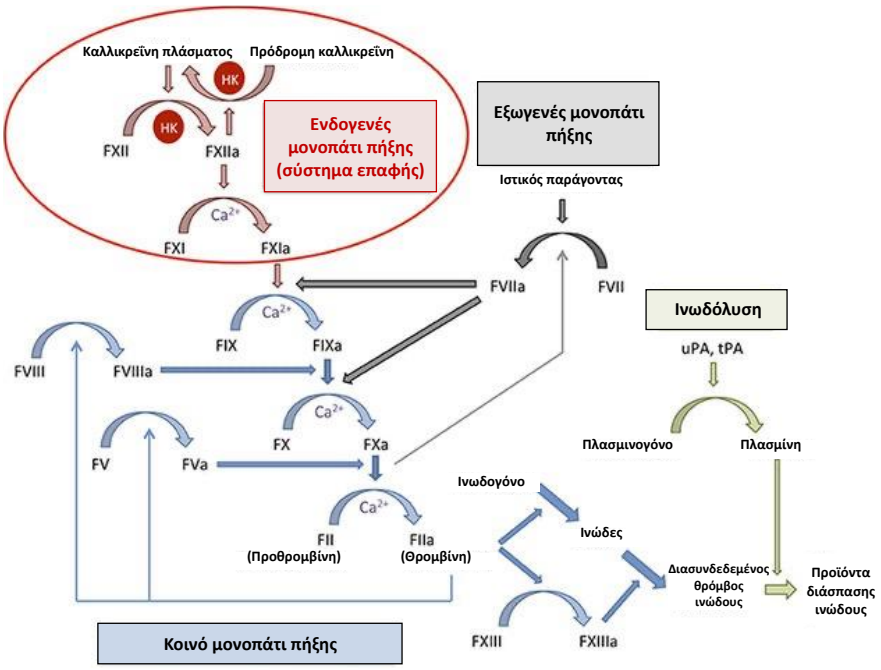
Η κοινή οδός ενεργοποιείται στην επιφάνεια των PLTs, όπου ο παράγοντας Xa σχηματίζει σύμπλεγμα με τον παράγοντα Va, οδηγώντας στην κατάλυση της προθρομβίνης και στο σχηματισμό της θρομβίνης με τη συμβολή των ιόντων ασβεστίου και φωσφολιπιδίων. Η θρομβίνη που σχηματίζεται έχει την ικανότητα να δημιουργεί τα ινωδοπεπτίδια A και B μέσω του ινωδογόνου και μέσα από αυτά να ενεργοποιεί τον παράγοντα XIII. Τα μονομερή ινώδη που παράγονται δημιουργούν έναν ασταθή θρόμβο στην παθούσα περιοχή που, μέσα από την επίδραση του παράγοντα XIII, μετατρέπεται σε αδιάλυτο θρόμβο ινώδους. Η ινωδόλυση και ο αναστολέας της ινωδόλυσης, είναι οι παράγοντες που προστατεύουν το θρόμβο (44).

Ο μηχανισμός της αιμόστασης ελέγχεται από φυσικούς ανασταλτές, ώστε ο θρόμβος να μην είναι ογκώδης και να μη δημιουργεί προβλήματα στην κυκλοφορία. Παράλληλα, η σύστασή του είναι τέτοια ώστε να μη λύεται κατά τη διάρκεια της αιμόστασης αλλά μόνο όταν το τραύμα επουλωθεί πλήρως.

Η παραπάνω διαδικασία ρυθμίζεται κυρίως μέσω της δράσης της θρομβίνης, η οποία με τη σειρά της ρυθμίζεται από δύο μηχανισμούς. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά στην αναστολή της δράσης των πρωτεασών της σερίνης και παράλληλα στην αναστολή της δράσης του ιστικού παράγοντα από ειδικό αναστολέα (Tissue Factor Pathway Inhibitor, TFPI). Η δράση της αντιθρομβίνης οδηγεί σε απενεργοποίηση των παραγόντων IXa, Xa, XIa, καθώς και της θρομβίνης (45). Η απενεργοποίηση αυτών οδηγεί στη δημιουργία συμπλέγματος και σε αναστολή της λειτουργίας του ιστικού παράγοντα. Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά στη δράση της πρωτεΐνης C και του συμπαράγοντά της, της πρωτεΐνης S. Η σύνδεση της θρομβομοντουλίνης (Thrombomodulin, TM) στη θρομβίνη ενεργοποιεί το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών C και S, απενεργοποιώντας παράλληλα τους παράγοντες Va και VIIIa (47).

Α4.2.2. Παράγοντες πήξης

Οι παράγοντες της πήξης ουσιαστικά είναι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη δημιουργία του αιμοπεταλιακού θρόμβου. Συνολικά, οι παράγοντες αυτοί είναι 12 και οι ονομασίες τους έχουν λατινική αρίθμηση από το I έως το XIII (**Εικόνα 6**). Οι ενεργοποιημένοι παράγοντες υποδηλώνονται με την προσθήκη του λατινικού γράμματος a, δίπλα από το λατινικό αριθμό. Οι παράγοντες χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: (i) τους παράγοντες που εξαρτώνται από τη βιταμίνη K (II, VII, IX, X, (ii) τους παράγοντες που είναι ευαίσθητοι στη θρομβίνη (I, V, VIII, XIII) και (iii) τους παράγοντες που ενεργοποιούνται με την επαφή (XII, XI) (48).



***Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση του καταρράκτη της πήξης και του ινωδολυτικού συστήματος* (49).** *Ο καταρράκτης της πήξης (μπλε βέλη) μπορεί να ενεργοποιηθεί κατά τη διαδικασία της αιμόστασης μέσω της ενδογενούς οδού (σύστημα επαφής, κόκκινα βέλη) ή της εξωγενούς οδού (γκρι βέλη) που τελικά συγκλίνουν στην κοινή οδό πήξης. Και οι δύο οδοί οδηγούν στην ενεργοποίηση του παράγοντα X και στη συνέχεια της θρομβίνης, που απαιτείται για τη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες και για την ενεργοποίηση του παράγοντα XIII. Ο θρόμβος ινώδους διασυνδέεται και σταθεροποιείται από τον παράγοντα XIII. Η ινωδόλυση (πράσινα βέλη) ενεργοποιείται ταυτόχρονα με το σύστημα της πήξης αλλά λειτουργεί πιο αργά και είναι σημαντική για τη ρύθμιση της αιμόστασης. Κατά τη διάρκεια της ινωδόλυσης, το πλασμινογόνο μετατρέπεται σε πλασμίνη που αποικοδομεί το δίκτυο του ινώδους. Οι παράγοντες πήξης υποδεικνύονται με "F" ακολουθούμενο από έναν λατινικό*

αριθμό, ενώ ένα επιπλέον "a" υποδηλώνει την ενεργοποιημένη μορφή. HK, κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους; uPA, ενεργοποιητής ουροκινάσης πλασμινογόνου; tPA, ενεργοποιητής ιστικού πλασμινογόνου.

Α4.2.2.1. Παράγοντας Ι

Ο παράγοντας Ι είναι γνωστός και ως ινωδογόνο και αποτελεί μία από τις πρωτεΐνες που παράγονται στο ήπαρ. Το ινωδογόνο αποτελεί κύριο υπόστρωμα της θρομβίνης, η οποία αποσπά από αυτό τα ινωδοπεπτίδια Α και Β, πολυμερίζοντάς το σε ινώδες. Δυσλειτουργίες στον παράγοντα αυτόν εμφανίζουν ασθενείς με κληρονομικές παθήσεις και ασθενείς με ηπατικές και νεφρικές δυσλειτουργίες. Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν παρατεταμένο χρόνο θρομβίνης και αιμορραγίες. Υψηλά επίπεδα προϊόντων αποδόμησης ινώδους μπορεί να δείξουν ψευδώς αυξημένα επίπεδα του παράγοντα Ι. Ασθενείς που έχουν για χρόνια αυξημένα επίπεδα του παράγοντα Ι μπορεί να εμφανίσουν αθηροσκλήρυνση. Ακόμη, αύξηση παρατηρείται σε ασθενείς με εγκαύματα, κακοήθειες και σε εγκύους, ενώ μείωση των επιπέδων του παράγοντα Ι παρουσιάζεται σε ασθενείς με ηπατική κίρρωση, αιμόλυση, ανεπάρκεια ινωδογόνου και δυσινωδογοναιμία (42).

Α4.2.2.2. Παράγοντας ΙΙ

Ο παράγοντας ΙΙ είναι γνωστός και ως προθρομβίνη και η παρουσία του εξαρτάται από τη βιταμίνη Κ, ενώ η παραγωγή του γίνεται στο ήπαρ. Η προθρομβίνη είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες καθώς συμμετέχει ενεργά στην κοινό οδό πήξης. Στην εξωγενή οδό πήξης ο παράγοντας VII ενεργοποιεί τον παράγοντα Χ και αυτός με τη σειρά του μετατρέπει την προθρομβίνη σε θρομβίνη, η οποία με τη σειρά της ευθύνεται για τη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες. Ο χρόνος προθρομβίνης επηρεάζει τη λειτουργία όλων των παραγόντων που συμμετέχουν στην εξωγενή οδό πήξης.

Αυξημένα επίπεδα του παράγοντα ΙΙ παρατηρούνται σε ασθενείς με ΔΕΠ (Διάχυτη Ενδοαγγειακή Πήξη), σε ασθενείς με ηπατικές νόσους, σε ασθενείς που εμφανίζουν ανεπάρκεια στη βιταμίνη Κ, και σε ασθενείς με υποϊνωδογοναιμία,

δυσινωδογοναιμία ή υπερινωδόλυση. Επιπλέον, η μετάλλαξη G20210A, η οποία επηρεάζει τη δράση της θρομβίνης και την ευαισθησία της, είναι η δεύτερη πιο συχνή αιτία κληρονομικής θρομβοφιλίας. Σχεδόν στο 20% των ασθενών με φλεβική θρόμβωση έχει βρεθεί η μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης, ενώ οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν συνήθως και ενεργή δράση του παράγοντα V- Leiden (50).

Α4.2.2.3. Παράγοντας ΙΙΙ

Ο παράγοντας ΙΙΙ είναι γνωστός και ως ιστικός παράγοντας ή θρομβοπλαστίνη (σύμπλοκο φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών) και βρίσκεται σε όλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα. Παρουσία τραυματισμού ενός αγγείου στο σώμα ξεκινά η παραγωγή της θρομβίνης κοντά στο σημείο της φλεγμονής. Η θρομβοπλαστίνη δημιουργείται την ώρα του τραυματισμού των αγγείων και των ιστών και ευθύνεται για την ενεργοποίηση του παράγοντα Χ. Σήμερα, στα εργαστήρια μετράται ένας παράγοντας της θρομβοπλαστίνης, ο χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (activated Partial Thromboplastin Time, aPTT) και αφορά στη λειτουργία της ενδογενούς οδού της πήξης και συγκεκριμένα την ομαλή λειτουργία των παραγόντων που συμμετέχουν σε αυτήν. Όταν ο παράγοντας ΙΙΙ είναι σε αυξημένα επίπεδα, υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης αιμορραγίας. Αυξημένα επίπεδα εμφανίζονται σε ασθενείς με καρδιακές νόσους, ηπατικές νόσους, ΔΕΠ, υποθερμία ή σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Από την άλλη πλευρά ασθενείς που εμφανίζουν συμπτώματα οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου έχουν μειωμένα επίπεδα του παράγοντα (51).

Α4.2.2.4. Παράγοντας ΙV

Ο παράγοντας IV, στην πραγματικότητα δεν είναι πρωτεΐνη, αλλά πρόκειται για τα ιόντα ασβεστίου που είναι απαραίτητα για τη δημιουργία του θρόμβου. Τα ιόντα ασβεστίου λειτουργούν ως ισοένζυμα που προσκολλώνται σε άλλους παράγοντες και τους ενεργοποιούν με αποτέλεσμα να ξεκινάει και να ολοκληρώνεται η διαδικασία της πήξης. Χαμηλά επίπεδα ανευρίσκονται σε ασθενείς με διαταραχές του

θυρεοειδούς και σε άτομα με προβλήματα διατροφής ή αλκοολισμού. Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή σε μικρά παιδιά που έχουν χαμηλά επίπεδα του παράγοντα IV, καθώς το ασβέστιο είναι απαραίτητο για τη σωστή ανάπτυξη των οστών. Οι αυξημένες ποσότητες ασβεστίου στο αίμα μπορούν να οδηγήσουν σε υπερασβεστιαιμία, η οποία εμφανίζεται συχνά σε καρκινοπαθείς εξαιτίας των συμπληρωμάτων και των φαρμάκων που παίρνουν. Ωστόσο, η υπερασβεστιαιμία μπορεί να ελαττώσει την απορρόφηση άλλων στοιχείων όπως είναι ο φώσφορος και το μαγνήσιο (45).

Α4.2.2.5. Παράγοντας V

Ο παράγοντας V ή αλλιώς προαξελερίνη- παράγοντας Β (ασταθής παράγοντας), παράγεται στο ήπαρ. Βοηθάει την προθρομβίνη να μετατραπεί σε θρομβίνη σε συνεργασία με το ένζυμο της προθρομβινάσης. Η πιο γνωστή μετάλλαξη είναι η Leiden (G1691A) που οδηγεί σε αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης θρόμβων (52). Η μοριακή μεταλλαγή V-Leiden αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μεταλλαγές του παράγοντα V και μελετάται για να διερευνηθούν πιθανές διαταραχές της πήξης στον ασθενή. Ωστόσο, δεν συνιστάται η μέτρηση σε ασθενείς που λαμβάνουν αντιπηκτική αγωγή και αγωγή με κουμαρινικά, καθώς και σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα των παραγόντων ΙΙ ή VIII (46). Συνήθως οι ασθενείς που εμφανίζουν ανεπάρκεια στον παράγοντα V εμφανίζουν και στον παράγοντα VIII. Ωστόσο, η ανεπάρκεια από μόνη της δε δύναται να αναδείξει το αίτιο έλλειψης και των άλλων παραγόντων. Χρειάζεται επομένως, συνεκτίμηση της κλινικής εικόνας και των κλινικών ευρημάτων για την εκτίμηση της κατάστασης του ασθενούς. Παρόλα αυτά, έρευνες έχουν δείξει πως χαμηλά επίπεδα ανευρίσκονται σε ασθενείς με ηπατικές νόσους, νεογνά, ασθενείς με ΔΕΠ, με μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα και σε άτομα που λαμβάνουν συστηματικά αναβολικά και στερεοειδή (53).

Α4.2.2.6. Παράγοντας VII

Ο παράγοντας VII είναι γνωστός και ως προκονβερτίνη και αποτελεί έναν σταθερό παράγοντας της πήξης. Είναι μια πρωτεάση σερίνης, δημιουργείται στο ήπαρ και η σύνθεσή της εξαρτάται από τη βιταμίνη Κ. Η ενεργοποίηση του παράγοντα εξαρτάται από τη δράση της ιστικής θρομβοπλαστίνης. Με την ενεργοποίηση του παράγοντα VII ενεργοποιείται σε ταυτόχρονο χρόνο και ο παράγοντας Χ, ο οποίος με τη σειρά του παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του παράγοντα IX. Ο παράγοντας VII συμμετέχει στην ενδογενή οδό της πήξης. Μειωμένα επίπεδα του παράγοντα VII εμφανίζουν ασθενείς με κληρονομική ανεπάρκεια, ασθενείς με ηπατικές νόσους, με ανεπάρκεια στη βιταμίνη Κ και νεογνά, αλλά και άτομα που λαμβάνουν στερεοειδή και ανδρογόνα. Από την άλλη, αυξημένα επίπεδα του παράγοντα παρουσιάζουν άτομα που λαμβάνουν αντισυλληπτικά, οιστρογόνα και αντιεπιληπτικά φάρμακα (45).

Α4.2.2.7. Παράγοντας VIII

Ο παράγοντας VIII ή αντιαιμορροφιλικός παράγοντας Α ή αντιαιμορροφιλική σφαιρίνη παράγεται στο ήπαρ και έχει ενεργό δράση στην ενδογενή οδό της πήξης. Στην κυκλοφορία του αίματος βρίσκεται πάντοτε ενωμένος με τον vWF, τον οποίο και προστατεύει από την πρωτεόλυση. Ο παράγοντας VIII ενεργοποιείται μέσω της θρομβίνης, η οποία αποκόπτει ένα μεγάλο πεπτίδιο από την πρόδρομη μορφή του. Ο παράγοντα VIII δραστηριοποιεί τα μόρια ασβεστίου και τα φωσφολιπίδια και έτσι ενεργοποιείται ο παράγοντας Χ μέσω της μετατροπής του σε Xa και τότε ο παράγοντας VIII ξεκινά και δρα ως συμπαράγοντας (VIIIa). Η έλλειψη του παράγοντα VIII οδηγεί στην εμφάνιση της αιμορροφιλίας Α, η σοβαρότητα της οποίας εξαρτάται από το ποσοστό μείωσης της δραστικότητας του παράγοντα στον οργανισμό. Αύξηση της δράσης του παράγοντα εμφανίζουν ασθενείς με ηπατικές νόσους, με αυξημένο στρες και άγχος και άτομα που λαμβάνουν οιστρογόνα και αντισυλληπτικά. Μειωμένη δράση έχουν τα άτομα με αιμορροφιλία, με αυτοάνοσες νόσους και άτομα με επίκτητη ή συγγενή ανεπάρκεια του παράγοντα VIII.

Α4.2.2.8. Παράγοντας IX

Ο παράγοντας IX, γνωστός και ως αντιαιμορροφιλικός παράγοντας Β, αποτελεί βασικό συστατικό της θρομβοπλαστίνης του πλάσματος. Ο παράγοντας IX, δημιουργείται στο ήπαρ, εξαρτάται από τη βιταμίνη Κ και δρα στην ενδογενή οδό της πήξης. Όταν ο παράγοντας ενεργοποιείται και μετατρέπεται σε IXa επηρεάζει τη δράση των ήδη ενεργοποιημένων παραγόντων VIIIa και XIa. Παράλληλα δρα και ως ένζυμο, καθώς ενώνεται με το συμπαράγοντα VIIIa και ευθύνεται για τη μετατροπή ενεργοποίησης του παράγοντα X σε Xa. Η έλλειψη του παράγοντα IX οδηγεί στην εκδήλωση της αιμορροφιλίας Β. Μειωμένη δράση του παράγοντα IX εμφανίζουν ασθενείς με ηπατικές νόσους και ασθενείς διαγνωσμένοι με τη νόσο Gaucher ή αμυλοείδωση, ενώ αυξημένα επίπεδα εμφανίζουν άτομα που λαμβάνουν αντισυλληπτικά φάρμακα και οιστρογόνα.

Α4.2.2.9. Παράγοντας X

Ο παράγοντας X (ή StuartPrower) έχει ενεργό δράση, τόσο στην ενδογενή όσο και στην εξωγενή οδό της πήξης. Η παραγωγή του γίνεται στο ήπαρ και εξαρτάται από την βιταμίνη Κ. Η ενεργοποίηση του στην ενδογενή οδό γίνεται μέσω του παράγοντα VIII, ενώ στην εξωγενή μέσω του παράγοντα IX. Αυξημένα επίπεδα του παράγοντα εμφανίζουν άτομα που λαμβάνουν οιστρογόνα, αντιεπιληπτικά, μεθυλοτεστοστερόνη, αντισυλληπτικά και συμπληρώματα βιταμίνης Ε, ενώ μειωμένα επίπεδα παρουσιάζονται σε ασθενείς με ανεπάρκεια βιταμίνης Κ, νεογνά, ασθενείς με ηπατικές νόσους, αμυλοείδωση και συγγενή ή επίκτητη ανεπάρκεια του παράγοντα X.

Α4.2.2.10. Παράγοντας XI

Ο παράγοντας XI ή αλλιώς πρόγονος της θρομβοπλαστίνης του πλάσματος, συντίθεται στο ήπαρ και έχει ενεργή δράση στην ενδογενή οδό της πήξης. Η δράση

του ενεργοποιεί το παράγοντα XII, μαζί με τον οποίο ευθύνονται για την ενεργοποίηση του παράγοντα IX. Μειωμένα επίπεδα του παράγοντα XI οδηγούν σε αιμορραγικά επεισόδια. Μειωμένα επίπεδα εμφανίζουν τα νεογνά, ασθενείς με αιμορροφιλία C, ασθενείς με ηπατικές νόσους και άτομα με συγγενή ή επίκτητη ανεπάρκεια του παράγοντα XI.

A4.2.2.11. Παράγοντας XII

Ο παράγοντας XII, παράγεται στο ήπαρ και δρα στην ενδογενή οδό της πήξης. Ουσιαστικά η ενεργοποίηση του είναι αυτή που δίνει το σήμα για την ενεργοποίηση της ενδογενούς οδού της πήξης, καθώς ο XIIa ελκύει το κολλαγόνο και πολυσακχαρίτες στο σημείο του τραυματισμού. Η ενεργοποίηση του παράγοντα XII, γίνεται μέσω των PLTs που ενώνονται με το υποενδοθηλιακό κολλαγόνο, ακολουθεί ενεργοποίηση του κινινογόνου και μέσα από μια σειρά αντιδράσεων ενεργοποιείται ο παράγοντας XII. Μειωμένη δράση αυτού του παράγοντα εμφανίζουν τα νεογνά, άτομα με επίκτητη ή συγγενή ανεπάρκεια, ασθενείς με ηπατικές νόσους ή μυελογενή λευχαιμία καθώς και άτομα διαγνωσμένα με νεφρωσικό σύνδρομο. Αύξηση του παράγοντα παρουσιάζουν άτομα που λαμβάνουν αντισυλληπτικά.

A4.2.2.12. Παράγοντας XIII

Ο παράγοντας XIII, ή γνωστός και ως παράγοντας σταθεροποίησης του ινώδους, παράγεται στο ήπαρ. Όταν είναι ανενεργός προσροφάται από τα μόρια ινώδους του οργανισμού, με τα οποία ενώνεται, ενεργοποιώντας τα μόρια του ασβεστίου και της θρομβίνης. Στην ενεργοποιημένη του μορφή, η δράση του επιταχύνεται μέσα από την βοήθεια των μορίων του ινώδους. Άτομα με χαμηλές συγκεντρώσεις του παράγοντα είναι επιρρεπή σε αιμορραγίες. Μειωμένες τιμές ανευρίσκονται σε ασθενείς με φλεβική θρόμβωση, σε ασθενείς που βρίσκονται σε μετεγχειρητικό στάδιο, σε ασθενείς με λευχαιμίες, εγκαύματα, ηπατικές νόσους, καθώς και σε άτομα με επίκτητη ή συγγενή ανεπάρκεια του παράγοντα XIII (53).

Α4.2.3. Άλλοι παράγοντες της αιμόστασης

Α4.2.3.1. ADAMTS-13

Η δισιντεγρίνη και μεταλλοπρωτεϊνάση με μοτίβο θρομβοσπονδίνης τύπου 1, της ομάδας 13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin type 1 motif, member 13, ADAMTS-13) είναι ένα ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ADAMTS-13*, το οποίο εντοπίζεται στο μικρό βραχίονα του 9ου χρωμοσώματος (9q34.2). Έχει συνολικά 32 εξώνια και η έκταση του στη γονιδιακή αλληλουχία είναι 37 kb. Η ADAMTS-13 είναι μία πρωτεΐνη που αποτελείται από 1427 αμινοξέα και το μοριακό της βάρος αγγίζει τα 145kDa. Σε μεταλλαγές του γονιδίου ευθύνεται η εμφάνιση της θρομβωτικής θρομβοπενίας και της πορφύρας και μπορεί να οφείλονται είτε σε συγγενείς είτε σε επίκτητες ανωμαλίες, λόγω αυτοάνοσων νοσημάτων, φλεγμονών ή λήψης φαρμάκων κυκλοπιδίνης και κλοπιδογρέλης. Ακόμα, η αύξηση των πολυμερών του παράγοντα vWF μπορεί επίσης να οδηγήσει σε τέτοιου είδους διαταραχές (41).

Α4.2.3.2. Παράγοντας von Willebrand

Ο παράγοντας von Willebrand αποτελεί ένα γονίδιο με 52 εξώνια, έκτασης 178 kb στη γονιδιωματική αλληλουχία, το οποίο εντοπίζεται στο 12ο χρωμόσωμα και συγκεκριμένα στην 13η θέση και αποτελείται από 2050 αμινοξέα. Κατά τη μετατόπιση του στο ενδοπλασματικό δίκτυο τα μόρια του παράγοντα σχηματίζουν διμερή, που με τη σειρά τους πολυμερίζονται στη συσκευή Golgi σε μεγαλύτερου μεγέθους πολυμερή, των οποίων η λειτουργικότητα και η δράση εξαρτάται από το μέγεθος. Τα μεγαλύτερα σε μέγεθος πολυμερή διαθέτουν ισχυρότερες αιμοστατικές και θρομβογόνες ιδιότητες εξαιτίας του μεγέθους τους. Τα πολυμερή της γλυκοπρωτεΐνης του vWF, που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία της αιμόστασης, διασπώνται με τη βοήθεια του ενζύμου ADAMTS-13. Συγκεκριμένα, η ADAMTS-13 αναστέλλει τη δράση των πολυμερών, προτού ξεκινήσει η δημιουργία θρόμβων. Ο vWF δρα στην πρωτογενή αιμόσταση, καθώς ευθύνεται για τη δέσμευση των PLTs στα συστατικά του ενδοθηλίου και του υποενδοθηλίου. Επιπλέον,

ευθύνεται για τη δημιουργία του πλέγματος ινώδους όταν αυτός δρα σε συνδυασμό με τον παράγοντα VII (54).

Α4.2.3.3. Πρωτεΐνη S

Η πρωτεΐνη S ανευρίσκεται στο αίμα σε δύο μορφές: τη δεσμευμένη και την αδέσμευτη μορφή. Οι ασθενείς με φλεβική θρόμβωση, πορφύρα και δερματική νέκρωση εμφανίζουν συχνά ανεπάρκεια της πρωτεΐνης S, η οποία λειτουργεί κυρίως ως συμπαράγοντας της πρωτεΐνης C. Η δραστικότητα και η συγκέντρωση του αντιγονικού πεπτιδίου S καθορίζουν το φαινότυπο και την ταξινόμηση των ασθενών σε έναν από τους ακόλουθους τρεις τύπους (55):

1. **Τύπος I:** Είναι ο συχνότερος. Εμφανίζονται μειωμένα επίπεδα αντιγόνου, ελεύθερου αντιγόνου και λειτουργικότητας.
2. **Τύπος II:** Εμφανίζονται φυσιολογικά επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης αλλά μειωμένη λειτουργικότητα αυτής.
3. **Τύπος III:** Εμφανίζονται φυσιολογικά επίπεδα του αντιγόνου, μειωμένα επίπεδα της ελεύθερης πρωτεΐνης και μειωμένη δραστικότητά της.

Α4.2.3.4. Πρωτεΐνη C

Η πρωτεΐνη C αποτελεί συμπαράγοντα της πρωτεΐνης S. Βασική της λειτουργία είναι η αδρανοποίηση των παραγόντων V και VIIIa, οι οποίοι δρουν για την ορθή παραγωγή της θρομβίνης στο αίμα και την παράλληλη ενεργοποίηση του παράγοντα X. Το 2 με 6% των ασθενών με φλεβική θρόμβωση εμφανίζουν ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C. Τα νεογνά που εμφανίζουν πλήρη ανεπάρκεια διαγιγνώσκονται συνήθως με οξεία πορφύρα. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη C εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2 (2q13-14). Έχουν βρεθεί δύο τύποι ανεπάρκειας της πρωτεΐνης C, που σχετίζονται με τη λειτουργικότητα της. Η ανεπάρκεια Τύπου I, είναι η πιο συνηθισμένη καθώς οι ασθενείς εμφανίζουν μειωμένη συγκέντρωσή της στο πλάσμα κατά 50%. Στην ανεπάρκεια Τύπου II, οι ασθενείς έχουν φυσιολογικά επίπεδα της πρωτεΐνης στο αίμα, όμως είναι μειωμένη η λειτουργικότητά της (42).

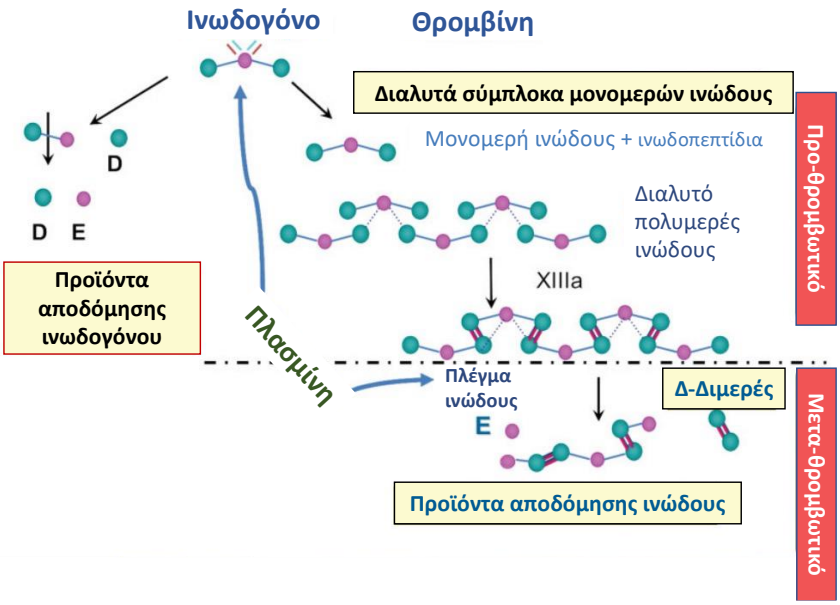
A4.2.3.5. Αντιθρομβίνη III

Η λειτουργία της αντιθρομβίνης (antithrombin, AT) III είναι να δεσμεύει και να αδρανοποιεί τη δράση της θρομβίνης και των παραγόντων Xa, IXa, XIa και XIIa. Όταν βρίσκεται σε μειωμένα επίπεδα ευθύνεται για την ανάπτυξη φλεβικών θρομβώσεων, κυρίως σε άτομα κάτω των 60 ετών. Πολλοί ασθενείς εμφανίζουν ανεπάρκεια στην ATIII, η οποία ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της χωρίζεται σε δύο βασικούς τύπους. Η ανεπάρκεια AT τύπου I (χαμηλή δραστικότητα και χαμηλά επίπεδα αντιγόνου) είναι μία ποσοτική διαταραχή που προκαλείται από μία μετάλλαξη και έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη σύνθεση και λειτουργική δραστικότητα της AT, ενώ η ανεπάρκεια AT τύπου II είναι μία ποιοτική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μειωμένη δραστικότητα της AT και φυσιολογικά αντιγονικά επίπεδα (56).

A4.3. Ινωδόλυση

Η ινωδόλυση αποτελεί το τελικό στάδιο του μηχανισμού της αιμόστασης. Το ινωδολυτικό σύστημα ανήκει στους αμυντικούς μηχανισμούς του οργανισμού, καθώς είναι αυτό που ευθύνεται για τη διάλυση των θρόμβων που δημιουργούνται κατά τη διαδικασία της πήξης και προστατεύει τον οργανισμό από τις εκτεταμένες θρομβώσεις. Στο μηχανισμό της ινωδόλυσης δρα κυρίως το πλασμινογόνο, που από ανενεργό προένζυμο μετατρέπεται στην ενεργό μορφή, την πλασμίνη, η οποία διασπά το ινώδες. Η ενεργοποίηση του πλασμινογόνου γίνεται από: (i) πλασματικούς ενεργοποιητές (παράγοντες XI και XII), (ii) τον ενεργοποιητή ουροκινάσης πλασμινογόνου (urokinase Plasminogen Activator, uPA) και (iii) τον ενεργοποιητή ιστικού πλασμινογόνου (tissue Plasminogen Activator, tPA) (41).

Όπως προαναφέρθηκε, όταν το πλασμινογόνο ενεργοποιηθεί μετατρέπεται σε πλασμίνη. Η πλασμίνη ευθύνεται για τη διάσπαση του ινωδογόνου στα D-μονομερή και E-μονομερή, καθώς και για τη διάσπαση του ινώδους στα E-μονομερή και τα Δ-διμερή, την ενεργοποίηση, δηλαδή, της ινωδόλυσης. Ακόμα, η πλασμίνη ευθύνεται για την αδρανοποίηση της δράσης των παραγόντων V, VIII και XIII (**Εικόνα 7**).



***Εικόνα 7. Σχηματισμός των δυαλυτών μονομερών ινώδους* (57).** *Οι δείκτες που σχετίζονται με το ινωδογόνο, όπως το ινώδες και τα προϊόντα αποδόμησης του ινωδογόνου, τα Δ-Διμερή ινώδους και το διαλυτό ινώδες, θεωρούνται χρήσιμοι βιοδείκτες για την εργαστηριακή διάγνωση της θρόμβωσης. Η θρομβίνη, η οποία είναι βασική πρωτεάση του συστήματος πήξης, δημιουργεί διαλυτά μονομερή ινώδους. Τα διαλυτά μονομερή ινώδους μπορούν να συνδυαστούν με το ινωδογόνο και να σχηματίσουν μη ομοιοπολικά συσχετισμένα σύμπλοκα διαλυτού μονομερούς ινώδους. Στα τελικά στάδια, τα μη ομοιοπολικά συσχετισμένα σύμπλοκα διαλυτού μονομερούς ινώδους πολυμερίζονται, μέσω διασύνδεσης του παράγοντα XIIIa (FXIIIa) και σχηματίζεται ένας θρόμβος. Η συγκέντρωση των διαλυτών μονομερών ινώδους αντανακλά τη δραστηριότητα της θρομβίνης και τα επίπεδά τους μπορούν να ανιχνευθούν νωρίτερα από τα Δ-Διμερή ινώδους. Τα διαλυτά μονομερή ινώδους μπορεί να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά για την αξιολόγηση της θρόμβωσης.*

Το ινωδογόνο αποτελείται από τρεις περιοχές, την Ε που βρίσκεται στο μέσο του μορίου και δύο D που βρίσκονται στα δυο άκρα του. Η πλασμίνη οδηγεί αρχικά σε διάσπαση του τριμερούς μορίου D – E – D και στη δημιουργία ενός διμερούς μορίου E – D, το οποίο στη συνέχεια διασπάται στα μονομερή μόρια D και E, που είναι γνωστά ως προϊόντα αποδόμησης του ινωδογόνου (Fibrinogen Degradation Products, FDPs). Εκτός από τα μονομερή μόρια E και D, τα τελικά προϊόντα που σχηματίζονται εξαιτίας της δράσης της πλασμίνης περιλαμβάνουν και τα διμερή μόρια D (53).

Ωστόσο, κατά τη διάρκεια του μηχανισμού της ινωδόλυσης δρουν παράλληλα και εξειδικευμένοι αναστολείς. Οι αναστολείς αυτοί, ανήκουν σε δυο κατηγορίες (44):

1. Αναστολείς που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου (Plasminogen Activator Inhibitor, PAI):
    - Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-1 (PAI-1) που αδρανοποιεί τη δράση του tPA.
    - Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου-2 (PAI-2), που αδρανοποιεί το uPA και το tPA.
2. Αναστολείς της πλασμίνης:
    - α_2 αντιπλασμίνη.

Α4.4. Εργαστηριακή διερεύνηση της αιμόστασης

Ο έλεγχος της λειτουργικής κατάστασης του αιμοστατικού μηχανισμού περιλαμβάνει την εξέταση της δράσης όλων των μηχανισμών και των μορίων που συμμετέχουν σε αυτόν. Τα αποτελέσματα των κλινικών ευρημάτων συνεξετάζονται με την κλινική εικόνα του ασθενή και το ιστορικό του, ενώ λαμβάνεται πάντοτε υπόψη και η ενδεχόμενη συννοσηρότητα.

Αρχικά, ελέγχεται η λειτουργία του αγγειακού συστήματος του ασθενή καθώς και ο αριθμός και η λειτουργικότητα των PLTs. Ο ακριβής αριθμός των PLTs δίνεται από τους αιματολογικούς αναλυτές. Ωστόσο, για να υπάρξει ακρίβεια στη μέτρηση είναι απαραίτητο να επιβεβαιωθεί μέσω της μικροσκόπησης του αίματος, καθώς οι αναλυτές πολλές φορές λόγω του μεγάλου αριθμού των κυττάρων και την ύπαρξη συσσωματωμάτων PLTs μπορεί να μη δίνουν ακριβείς μετρήσεις (53). Επιπλέον, η μικροσκόπηση δείχνει την ποιότητα των PLTs, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με τη λειτουργικότητα τους. Πιο αναλυτικά, τα PLTs μπορεί να εμφανίζουν ελλείψεις σε σημαντικές γλυκοπρωτεΐνες που θα έπρεπε να βρίσκονται στην επιφάνεια τους, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται λειτουργικές διαταραχές στην προσκόλληση τους. Πέρα από τη μικροσκόπηση χρειάζεται να γίνει έλεγχος των PLTs σε ειδικούς αναλυτές, που με τη βοήθεια αγωνιστών (κολλαγόνο, θρομβίνη, επινεφρίνη, διφωσφορική αδενοσίνη) ελέγχεται φωτομετρικά η λειτουργικότητά τους (42). Επιπρόσθετα, ελέγχεται η λειτουργικότητα και των υπόλοιπων μορίων που συμμετέχουν στο μηχανισμό της προσκόλλησης των PLTs και αυτό γίνεται με τη

βοήθεια της ριστοσετίνης. Στη συνέχεια ελέγχονται ποσοτικές ή/και λειτουργικές διαταραχές των παραγόντων της ενδογενούς και της εξωγενούς οδού πήξης (53).

Ο χρόνος προθρομβίνης (Prothrombin Time, PT) ελέγχει τη λειτουργικότητα της εξωγενούς οδού και της κοινής οδού της πήξης και παράλληλα επηρεάζεται άμεσα από τη δράση των παραγόντων VII, X, V και II. Ο PT αντιπροσωπεύει το χρόνο που απαιτείται από τον οργανισμό ώστε να δημιουργήσει πήγμα ύστερα από την ενεργοποίηση της δράσης της θρομβοπλαστίνης και του ασβεστίου. Η παραπάνω μέτρηση για να είναι ακριβής απαιτεί το ινωδογόνο να είναι σε φυσιολογικά επίπεδα και επειδή υπήρχαν μεγάλες διαφορές ανάμεσα στις θρομβοπλαστίνες που χρησιμοποιούνταν ως αντιδραστήρια και συνεπώς στις τελικές μετρήσεις, η μέτρηση του PT έχει πλέον αντικατασταθεί από τη μέτρηση του διεθνούς κανονικοποιημένου πηλίκου (International Normalised Ratio, INR) (45):

$$\text{INR} = \frac{\text{PT ασθενούς}}{\text{PT μάρτυρα}}$$

Ο aPTT αποτελεί έναν παράγοντα που ελέγχει την ενδογενή οδό της πήξης. Η μέτρησή του γίνεται με τη βοήθεια της καολίνης, ιόντων ασβεστίου και φωσφολιπιδίων, τα οποία ευθύνονται για τη δημιουργία του θρόμβου. Παράλληλα γίνεται έλεγχος και της δράσης των παραγόντων VIII, IX, XI και XII (45).

Η μέτρηση του ινωδογόνου γίνεται με σκοπό να ελεγχθεί η πηκτικότητα. Παρόλα αυτά, το ινωδογόνο μπορεί να δείξει αυξημένα επίπεδα αν υπάρχει κάποια λοίμωξη στον οργανισμό, παρότι η πηκτικότητα του αίματος του ασθενή μπορεί να βρίσκεται σε φυσιολογικά επίπεδα. Αυτός είναι ο λόγος που ως εξέταση δε μπορεί να δώσει ακριβή στοιχεία για την κατάσταση του ασθενή και πρέπει πάντα να εξετάζεται μαζί με τα υπόλοιπα εργαστηριακά ευρήματα και την κλινική εικόνα. Παρόλα αυτά, τα υψηλά επίπεδα είναι ένδειξη πιθανών μελλοντικών θρομβώσεων. Η μέτρηση του ινωδογόνου γίνεται μετά από αραίωση του πλάσματος και προσθήκη θρομβίνης σε αυτό (42).

Ο χρόνος θρομβίνης (Thrombin Time, TT) ελέγχει την τελική φάση του μηχανισμού της πήξης. Συγκεκριμένα, ελέγχει την αποτελεσματικότητα της μετατροπής του ινωδογόνου σε ινώδες με τη βοήθεια της θρομβίνης (45).

Ο προσδιορισμός των Δ-Διμερών (D-dimers) αφορά τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της ινωδόλυσης, καθώς τα Δ-Διμερή αποτελούν το τελικό προϊόν αυτής της διαδικασίας. Σε παθολογικές καταστάσεις, ιδιαίτερα σε αυξημένη δράση του μηχανισμού της πήξης, τα Δ-Διμερή ανιχνεύονται αυξημένα. Επίσης, αύξηση παρατηρείται σε ασθενείς με πνευμονική εμβολή, ΔΕΠ και φλεβική θρόμβωση. Η μέτρηση των Δ-Διμερών είναι απαραίτητη σε ασθενείς που λαμβάνουν αντιπηκτική αγωγή, καθώς το αποτέλεσμα καθορίζει τη δόση του θεραπευτικού σκευάσματος που θα χορηγηθεί. Τέλος, η μέτρηση του πλασμινογόνου γίνεται με βάση τη συγκέντρωση στην οποία βρίσκεται στο πλάσμα, δηλαδή μετράται η ποσότητα της ανενεργής μορφής του ενζύμου (45).

Α5. Αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων και αιμόστασης

Α5.1. Αιμοπετάλια και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

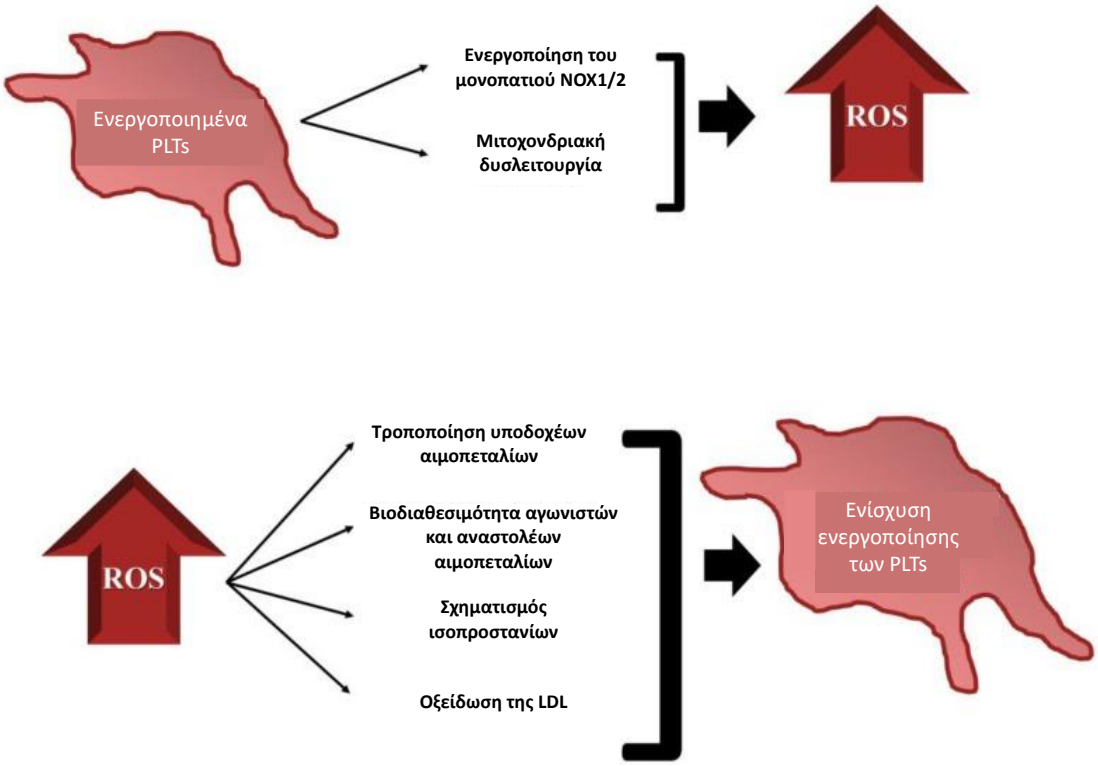
Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και οι δραστικές ρίζες αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) είναι μόρια υψηλής αντιδραστικότητας, που παράγονται ως απόκριση τόσο σε ενδογενή όσο και σε εξωγενή ερεθίσματα. Τα πιο σημαντικά κυτταρικά ROS/RNS περιλαμβάνουν μόρια με βάση το οξυγόνο, το ανιόν υπεροξειδίου ($O•_2$-), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), τη ρίζα υδροξυλίου (•OH) και το ανιόν υδροξυλίου (OH−), καθώς και μόρια με βάση το άζωτο, συμπεριλαμβανομένης της ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (•NO), της ρίζας του διοξειδίου του αζώτου ($•NO_2$) και του υπεροξυνιτρώδους ανιόντος (ONOO-) (58,59). Τα ROS παράγονται φυσιολογικά από την οξειδάση του NADPH (NADPH Oxidase, NOX), ένα ενζυματικό σύμπλοκο της κυτταρικής μεμβράνης, και από τα μιτοχόνδρια ως προϊόντα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και λειτουργούν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι που ρυθμίζουν διάφορες οδούς σηματοδότησης (60). Η κυτταρική συγκέντρωση των ROS ρυθμίζεται από ενζυματικά και μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά συστήματα για τη διατήρηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Η ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ROS και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, λόγω της αυξημένης παραγωγής ROS ή/και της

μειωμένης αντιοξειδωτικής δράσης, οδηγεί σε οξειδωτικό στρες που προάγει τη βλάβη των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA (61). Το οξειδωτικό στρες θεωρείται ως κοινός παθοφυσιολογικός μηχανισμός και έχει συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Τα PLTs είναι απύρηνα κύτταρα που προέρχονται από τα μεγακαρυοκύτταρα και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αιμόσταση, στο σχηματισμό θρόμβων, στην αθηροσκλήρωση, στη φλεγμονή και στην ανοσολογική απόκριση (62–64). Ο σωστός αριθμός και η λειτουργία των κυκλοφορούντων PLTs είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της αιμόστασης. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η αύξηση των PLTs (θρομβοκυττάρωση) και η ενεργοποίηση (υπεραντιδραστικότητα PLTs) συνδέονται συνήθως με υψηλότερο θρομβωτικό κίνδυνο (65), ο μειωμένος αριθμός PLTs (θρομβοπενία) και η αλλοιωμένη λειτουργία των PLTs, λόγω κληρονομικών ή επίκτητων ανωμαλιών, ενδέχεται να θέσουν σε κίνδυνο το μηχανισμό επούλωσης πληγών, με αποτέλεσμα αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας και αιμορραγικών διαταραχών (66). Παρά τις μεταπτώσεις στην κατάσταση οξειδοαναγωγής που συμβαίνουν φυσιολογικά κατά την ενεργοποίηση των PLTs, η εμφάνιση συνθηκών οξειδωτικού στρες τροποποιεί τη λειτουργία των PLTs και τα οδηγεί σε δύο κύρια παθολογικά αποτελέσματα: τοξικότητα και υπερενεργοποίηση. Με τη σειρά της, η τοξικότητα οδηγεί σε υπερβολική απόπτωση των PLTs και επομένως σε θρομβοπενία και αιμορραγία, ενώ η υπερενεργοποίηση οδηγεί σε υπερβολικό σχηματισμό θρόμβων και θρομβοεμβολικές επιπλοκές.

Το οξειδωτικό στρες έχει περιγραφεί σε διάφορες διαταραχές όπως η αθηροσκλήρωση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση, η παχυσαρκία και ο καρκίνος (67,68). Σε αυτές τις παθολογικές συνθήκες, το οξειδωτικό στρες είναι η δευτερεύουσα έκβαση των εν λόγω ασθενειών. Το αυξημένο οξειδωτικό φορτίο στην κυκλοφορία εκθέτει τα PLTs σε ένα προ-ενεργοποιητικό περιβάλλον, υπεύθυνο για τον προ-συγκολλητικό και προ-συσσωματωτικό φαινότυπο των PLTs, που με τη σειρά του οδηγεί σε θρομβοεμβολική τάση, κοινό χαρακτηριστικό όλων αυτών των ασθενειών. Με τη σειρά τους, τα PLTs που ενεργοποιούνται από το οξειδωτικό στρες είναι πηγή ROS, τα οποία συμβάλλουν περαιτέρω στο κυκλοφορούν οξειδωτικό στρες (**Εικόνα 8**). Αυτή η διαδικασία δημιουργεί έναν κύκλο ανατροφοδότησης, ικανό να

επηρεάσει και άλλους τύπους κυττάρων, συμβάλλοντας τελικά στην εξέλιξη της νόσου και στην εκδήλωση περαιτέρω επιπλοκών.



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση των σχέσεων μεταξύ των λειτουργιών των αιμοπεταλίων (Platelets, PLTs) και της οξειδοαναγωγικής κατάστασης (69). *Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παράγουν δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), μέσω ενεργοποίησης της σηματοδότησης NOX1/2 και μέσω πρόκλησης μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών. Τα ενδο- ή εξω-αιμοπεταλιακά ROS ενισχύουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω της ρύθμισης της λειτουργίας των υποδοχέων των αιμοπεταλίων, της βιοδιαθεσιμότητας των αγωνιστών ή των αναστολέων των αιμοπεταλίων, του σχηματισμού ισοπροστανίων και της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Low-Density Lipoprotein, LDL).*

Α5.2. Ο ρόλος της φωσφατιδυλοσερίνης

Διαφορετικές σηματοδοτικές οδοί έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό PLTs με προθρομβωτικό δυναμικό. Σε μία από αυτές, η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης (Phosphatidylserine, PS) στην κυτταρική επιφάνεια συμβαίνει ταχέως μέσω της ενεργοποίησης των PLTs από ισχυρούς αγωνιστές. Μια δεύτερη είναι η ενδογενής

οδός της απόπτωσης μέσω της οποίας η έκθεση της PS συμβαίνει πιο αργά (70,71). Σε μια πιο πρόσφατα περιγραφείσα τρίτη οδό που διαφέρει από τις προαναφερθείσες, η δέσμευση οξειδωμένης λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoprotein, LDL) στην GPIV της μεμβράνης των PLTs (CD36) και η σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού των MAP κινασών οδηγεί σε έκθεση της PS. Αυτή η οδός ενοχοποιείται για την εκδήλωση θρομβωτικών διαταραχών που συμβαίνουν στη δυσλιπιδαιμία (72).

Η έκθεση της PS στην επιφάνεια των PLTs μετά από διέγερση είναι μια ταχεία διαδικασία, που συμβαίνει μέσα σε δευτερόλεπτα έως μερικά λεπτά και συνοδεύεται από άλλα αποπτωτικά συμβάντα, συμπεριλαμβανομένης της διάτρησης και της εκπόλωσης της μιτοχονδριακής μεμβράνης, καθώς και μορφολογικών μεταβολών (blebbing) της πλασματικής μεμβράνης που οδηγούν στο σχηματισμό εξωκυτταρικών κυστιδίων (Extracellular Vesicles, EV). Η αναλογία των PLTs που εκθέτουν PS που σχηματίζονται εξαρτάται από τους αγωνιστές που χρησιμοποιούνται για τη διέγερση των PLTs, με το πιο ισχυρό *in vitro* ερέθισμα να είναι ο συνδυασμός κολλαγόνου/κονβουλξίνης/σχετιζόμενου με το κολλαγόνο πεπτιδίου (Collagen Related Peptide) μαζί με θρομβίνη. Σε αυτό το σχήμα, το σχετιζόμενο με το κολλαγόνο πεπτίδιο συνδέεται με την GPVI, ενώ η θρομβίνη διασπά τον ενεργοποιούμενο από πρωτεάση υποδοχέα (Protease Activated Receptor, PAR) 1 και 4, ώστε να τεθούν σε κίνηση οι οδοί σηματοδότησης που μεγιστοποιούν τα επίπεδα κυτταροπλασματικού ασβεστίου (73) που απαιτούνται για την έκθεση της PS σε σημαντικό ποσοστό PLTs.

Είναι γνωστό ότι τα PLTs, αν και απύρηνα, μπορούν να υποστούν απόπτωση. Αυτό συμβαίνει μέσω της εξαρτώμενης από τα μιτοχόνδρια ενδογενούς οδού, καθώς τα PLTs διαθέτουν τον απαραίτητο σχετικό κυτταροπλασματικό μηχανισμό, ενώ πιθανότατα δεν διαθέτουν τους υποδοχείς θανάτου που απαιτούνται για την ενεργοποίηση της εξωγενούς οδού. Η απόπτωση των PLTs μπορεί να ξεκινήσει *in vitro* από το ABT-737, ένα μικρό μόριο που αναστέλλει την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-xL της οικογένειας Bcl-2, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bak και Bax. Αυτές οι πρωτεΐνες στη συνέχεια επάγουν μιτοχονδριακή βλάβη, απελευθέρωση κυτοχρώματος c, ενεργοποίηση κασπασών, έκθεση της PS, αλλοίωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και σχηματισμό EV, όλα τα χαρακτηριστικά της απόπτωσης που επισυμβαίνει (74,75) στα εμπύρηνα κύτταρα.

Σε αντίθεση με την έκθεση της PS που επάγεται από αγωνιστές των PLTs και η οποία συμβαίνει ταχέως, η επαγόμενη από απόπτωση έκθεση της PS συμβαίνει πιο αργά, εντός μερικών ωρών (70,71,74). Αυτή η οδός της απόπτωσης εξαρτάται άμεσα από το Bak και το Bax, καθώς τα PLTs που δεν έχουν αυτές τις πρωτεΐνες δεν εξωτερικεύουν την PS όταν επωάζονται με ABT-737. Είναι επίσης εξαρτώμενη από κασπάσες, καθώς οι αποκρίσεις εξαλείφονται παρουσία αναστολέα κασπασών (74,76). Από την άλλη, αυτή η οδός δεν απαιτεί αυξήσεις στη δραστηριότητα του κυτταροπλασματικού ασβεστίου ή της καλπαΐνης, που είναι απαραίτητες για την επαγόμενη από αγωνιστή, έκθεση σε PS (74).

Α6. Αλληλεπίδραση ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμόστασης

Η μελέτη των ερυθροκυττάρων (RBCs), ήταν πάντα ένα σημαντικό επίκεντρο της αιματολογίας, όπως ήταν η αιμόσταση και η θρόμβωση, αλλά μόνο σχετικά πρόσφατα έγινε φανερό ότι τα RBCs έχουν σημαντική επίδραση στην πήξη του αίματος, την αιμόσταση και τη θρόμβωση, η οποία είναι κλινικά σημαντική (**Πίνακας 3, Εικόνα 9**). Σε αυτή την κατεύθυνση, παρατηρήσεις έδειξαν μειωμένη αιμορραγία σε άτομα με υψηλό αιματοκρίτη, ανεξάρτητα από τον αριθμό των PLTs, και από την άλλη, μία προδιάθεση για θρόμβωση που σχετίζεται με αύξηση του αριθμού των RBCs, με συγγενείς διαταραχές των RBCs και με διάφορες επίκτητες παθολογικές καταστάσεις που αλλάζουν τις φυσιολογικές ιδιότητες των RBCs. Η σχετικά υψηλή συχνότητα θρομβωτικών επιπλοκών μετά από μεταγγίσεις RBCs αποτελεί άλλο ένα ισχυρό επιχείρημα για τη συμμετοχή των RBCs σε διαταραχές πήξης του αίματος, αν και ο κίνδυνος θρόμβωσης θα μπορούσε επίσης να αποδοθεί στην υποκείμενη νόσο, η οποία μπορεί να μειώσει την αιτιότητα της μετάγγισης αίματος για θρόμβωση. Εκτός από τις κλινικές παρατηρήσεις και τις πειραματικές μελέτες, η υπολογιστική μοντελοποίηση της θρόμβωσης που εστιάζει στις επιδράσεις των RBCs, έχει παράσχει σημαντικές ποσοτικές και μηχανιστικές γνώσεις (77). Επιπλέον, διάφορες ποιοτικές αλλοιώσεις των RBCs, όπως το ανώμαλο μέγεθος, σχήμα ή ιξώδες έχουν συσχετιστεί με τη θρόμβωση και τα αυξημένα αγγειο-αποφρακτικά περιστατικά σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία (78).

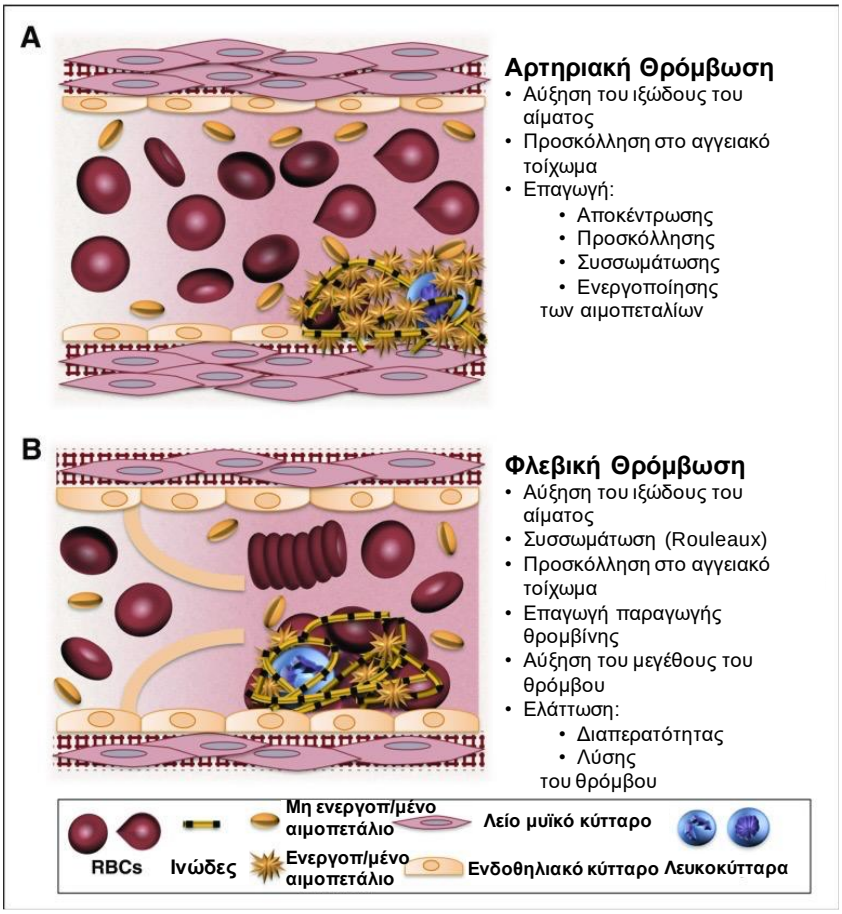
Πίνακας 3. Επιδράσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων που σχετίζονται με τη θρόμβωση και την αιμόσταση και οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί (79).

Επιδράσεις	Μηχανισμοί	Προ- ή Αντι-θρομβωτική δράση	Αναφορές
Διαταραχές στην αιμόσταση	Τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) αυξάνουν το ιξώδες του αίματος λόγω αύξησης του αιματοκρίτη, αύξησης της συσσώρευσης RBCs ή μείωσης της παραμορφωτικής ικανότητας των RBCs (αύξηση της αντίστασης ροής)	Προ-	(80–83)
	Αντίστροφα, η αναιμία σχετίζεται με χαμηλό ιξώδες αίματος και αιμορραγική τάση ως αποτέλεσμα της μειωμένης αποκέντρωσης των αιμοπεταλίων προς το ενδοθήλιο και της αυξημένης διαθεσιμότητας μονοξειδίου του αζώτου (NO)	Αντι-	(80–83)
	Τα RBCs υφίστανται αναστρέψιμη συσσωμάτωση που προκαλείται από τις πρωτεΐνες του πλάσματος (κυρίως ινωδογόνο και ανοσοσφαιρίνες) ή/και τοπική ωσμωτική διαβάθμιση	Προ-	(84–91)
	Τα RBCs με χαμηλή παραμορφωτικότητα αποφράσσουν τα μικρά αγγεία	Προ-	(92,93)
	Η παραμόρφωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων μειώνει την αντίσταση στη ροή λόγω τριβής	Αντι-	(92–95)
	Τα RBCs διατηρούν αμφίκοιλο σχήμα και υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο ως αποτέλεσμα του κυτταροσκελετού και της ισορροπίας ύδατος/ιόντων	Προ- ή Αντι-	(83)
	Τα RBCs μεταναστεύουν στο κέντρο της ροής του αίματος και ωθούν τα αιμοπετάλια προς το ενδοθήλιο με τρόπο που εξαρτάται από τον αιματοκρίτη και τη διάτρηση του αγείου	Προ-	(96–98)
Διαταραχές των αιμοπεταλίων	Τα RBCs αυξάνουν την προσκόλληση και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων με την απελευθέρωση της διφωσφορικής αδενοσίνης και της θρομβοξάνης A2	Προ-	(99,100)

Επιδράσεις	Μηχανισμοί	Προ- ή Αντι-θρομβωτική δράση	Αναφορές
	Τα RBCs σχηματίζουν συσσωματώματα με αιμοπετάλια μέσω συγκολλητικών μορίων (ICAM-4 και ινωδογόνο με αIIbβ3)	Προ-	(101–103)
	Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη που απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της αιμόλυσης μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα του NO που έχει δράση αναστολέα αιμοπεταλίων και αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες	Προ-	(104–107)
	Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη καταστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με την απελευθέρωση S-νιτροζοθειολών, λειτουργικών ισοδυνάμων του NO	Αντι-	(108,109)
Αλληλεπιδράσεις με το αγγειακό τοίχωμα	Τα RBCs συνδέονται απευθείας στο ενδοθήλιο μέσω συγκολλητικών μορίων (ιντεγκρίνη α4β1, CD36, ICAM-4, φωσφατιδυλοσερίνη, κ.λπ.)	Προ-	(110–112)
	Στην επαγόμενη από το χλωριούχο σίδηρο ($FeCl_3$) θρόμβωση, τα ερυθρά αιμοσφαίρια συνδέονται με το ενδοθήλιο μέσω άγνωστων μηχανισμών	Προ-	(113)
	Τα RBCs ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της απελευθέρωσης NO, ισοδυνάμων NO και τριφωσφορικής αδενοσίνης	Αντι-	(114,115)
Παραγωγή θρομβίνης	Η φωσφατιδυλοσερίνη εκτίθεται στα RBCs από την εξαρτώμενη από το Ca^{2+} σκρεμπλάση, ως απόκριση στην καταπόνηση υψηλής διάτμησης, προσβολή από συστατικά του συμπληρώματος, οξειδωτικό στρες, απόπτωση κ.λπ.	Προ-	(116–123)
	Τα RBCs απελευθερώνουν προπηκτικά μικροκυστίδια που προέρχονται από τη μεμβράνη και φέρουν φωσφατιδυλοσερίνη κατά τη διάρκεια της γήρανσης *in vivo* και της αποθήκευσης *in vitro*	Προ-	(124–129)
	Η μειζοθρομβίνη, ένας ενεργοποιητής της πρωτεΐνης C με χαμηλή δραστικότητα διάσπασης του ινωδογόνου, σχηματίζεται στα	Αντι-	(120)

Επιδράσεις	Μηχανισμοί	Προ- ή Αντι-θρομβωτική δράση	Αναφορές
	ερυθρά αιμοσφαίρια και απελευθερώνεται στο αίμα		
	Ο παράγοντας IX ενεργοποιείται απευθείας στη μεμβράνη των RBCs από ένα ένζυμο που προσομοιάζει στην ελαστάση	Προ-	
Δομή και ιδιότητες των θρόμβων	Τα RBCs καθιστούν το δίκτυο του ινώδους πιο πορώδες	Αντι-	(130–132)
	Η μεταβλητή παραμόρφωση των RBCs επηρεάζει τη μηχανική των θρόμβων του αίματος	Προ- ή Αντι-	
	Η κατακράτηση RBCs με τη μεσολάβηση του παράγοντα XIIIa αυξάνει το μέγεθος του θρόμβου	Προ-	(133–135)
Διαταραχές της ινωδόλυσης και της θρομβόλυσης	Τα RBCs μειώνουν τη διαπερατότητα του θρόμβου	Προ-	(136–138)
	Τα RBCs καταστέλλουν την επαγόμενη από το tPA ενεργοποίηση του πλασμινογόνου	Προ-	
	Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μειώνουν τη διάμετρο των ινών του ινώδους και αλλάζουν τη δομή του δικτύου, μειώνοντας έτσι την ευαισθησία στην ινωδόλυση	Προ-	
	Τα RBCs είναι πιθανοί μεταφορείς θρομβολυτικών φαρμάκων	Αντι-	(139)
Επιδράσεις στη συστολή του θρόμβου	Τα συμπιεσμένα RBCs σχηματίζουν αδιαπέραστο φραγμό	Προ- ή Αντι-	(140,141)
	Τα RBCs υφίστανται συμπιεστική παραμόρφωση (αλλαγή στο σχήμα)	Προ- ή Αντι-	(142,143)
	Τα RBCs ανακατανέμονται σε ομάδες προς το κέντρο	Προ- ή Αντι-	(140)
Αιμοστατικές επιδράσεις μεταγγίσεων RBCs	Η μετάγγιση RBCs σταματάει την αιμορραγία που σχετίζεται με αναιμία και θρομβοπενία	Προ-	(144,145)
	Η μετάγγιση RBCs βελτιώνει την ανταπόκριση των αιμοπεταλίων στη διέγερση	Προ-	
Επιπλοκές μεταγγίσεων RBCs	Η «αποθηκευτική βλάβη» των RBCs περιλαμβάνει: • οξειδωτικό στρες και βλάβη της μεμβράνης	Προ-	(109,114,125,127,139,145–153)

Επιδράσεις	Μηχανισμοί	Προ- ή Αντι-θρομβωτική δράση	Αναφορές
	• έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης • απελευθέρωση μικροκυστιδίων • αιμόλυση • αυξημένη ακαμψία μεμβράνης • απελευθέρωση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης • ενεργοποίηση συμπληρώματος • εξάντληση του NO και των λειτουργικών του ισοδυνάμων • απόπτωση (ερυθρόπτωση)		



Εικόνα 9. Πιθανοί μηχανισμοί συμμετοχής των φυσιολογικών και ανώμαλων ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) στην αρτηριακή και φλεβική θρόμβωση/εμβολή (154). *(A) Οι αρτηριακοί θρόμβοι αναπτύσσονται σε αγγεία με υψηλούς ρυθμούς διάτμησης, γεγονός που προάγει την ταχεία ανάπτυξη θρόμβων με πλήθος αιμοπεταλίων; (B) Οι φλεβικοί θρόμβοι αναπτύσσονται αργά και είναι πλούσιοι σε RBCs και ινώδες. Στις φλέβες, η συσσωμάτωση RBCs σε δομές στοίβας («rouleaux») αυξάνει το ιξώδες του αίματος. Μόλις εισέλθουν στους φλεβικούς θρόμβους, τα RBCs αυξάνουν το μέγεθος των θρόμβων ελαττώνοντας ταυτόχρονα τη διαπερατότητά τους και την ευαισθησία τους στη λύση.*

Α6.1. Ερυθρά αιμοσφαίρια και οξειδωτικό στρες

Είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες είναι συνέπεια της ζωής σε αερόβιες συνθήκες. Τα ROS απελευθερώνονται στους οργανισμούς υπό φυσιολογικές συνθήκες και λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια. Ωστόσο, η υπερπαραγωγή τους σε συνδυασμό με την ελλιπή λειτουργία του ενδογενούς αντιοξειδωτικού συστήματος μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες. Το πρόδρομο μόριο των ROS είναι η ρίζα ανιόντων υπεροξειδίου (O_2•-), η οποία είναι το προϊόν αναγωγής ενός ηλεκτρονίου από το μοριακό οξυγόνο. Το υπεροξείδιο σχηματίζεται συνήθως στο σώμα μέσω καταλυόμενων αντιδράσεων ή/και ως αποτέλεσμα τη μη ενζυματικής μεταφοράς ηλεκτρονίων (155).

Τα RBCs εκτίθενται μόνιμα σε υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου, η οποία προάγει την παραγωγή ROS. Μέσα σε 24 ώρες, το 3% της Hb οξειδώνεται και δημιουργείται μια ρίζα υπεροξειδίου. Επιπλέον, η ίδια η Hb είναι καταλύτης για αντιδράσεις ελεύθερων ριζών. Η ισορροπία της οξειδοαναγωγής διατηρείται λόγω της παρουσίας αντιοξειδωτικών ενζύμων και αναγωγικών παραγόντων με χαμηλό μοριακό βάρος. Οι οξειδωτικές αλλαγές στα συστατικά των ερυθροκυττάρων μπορεί να οδηγήσουν στην παραμόρφωσή τους, η οποία επηρεάζεται από τη ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης και το εσωτερικό ιξώδες των RBCs. Με τη σειρά της, η παραμόρφωση των RBCs έχει καίρια σημασία στη μικροκυκλοφορία, επειδή η διάμετρός τους είναι μεγαλύτερη από τη διάμετρο των τριχοειδών αγγείων. Η οξειδωτική βλάβη στη μεμβράνη των RBCs έχει αναφερθεί ότι έχει σημαντική επίδραση στην παραμόρφωση της μεμβράνης (156). Επιπλέον, η ρευστότητα της μεμβράνης είναι επίσης σημαντική για τη λειτουργία των RBCs και την απομάκρυνση των τοξικών μεταβολιτών από το κύτταρο. Η οξειδωτική βλάβη στην πλασματική μεμβράνη των ερυθροκυττάρων οδηγεί σε μειωμένη παροχή οξυγόνου και οδηγεί σε επιτάχυνση της γήρανσης των RBCs (157).

Τα RBCs μπορούν να υποστούν βλάβη τόσο από εσωτερικές όσο και από εξωτερικές πηγές. Ο κυρίαρχος παράγοντας του οξειδωτικού στρες στα RBCs είναι η Hb. Οι ελεύθερες ρίζες από παράγωγα οξυγόνου δημιουργούνται ως αποτέλεσμα της αυτο-οξείδωσης της Hb που σχετίζεται με την εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, και ειδικότερα με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (158). Το απελευθερωμένο ανιόν

υπεροξειδίου και το προϊόν της δισμουτίωσής του, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, οδηγούν στο σχηματισμό αιμοχρωμάτων και στην αποικοδόμηση της αίμης, απελευθερώνοντας ελεύθερο σίδηρο που καταλύει τις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss. Επιπλέον, το υπεροξείδιο του υδρογόνου οξειδώνει την Hb και τη μεθαιμοσφαιρίνη (Methemoglobin, MetHb) στη μορφή φερρυλίου και ρίζας φερρυλίου, αντίστοιχα. Η αιμοσφαιρίνη που απελευθερώνεται από τα ερυθροκύτταρα είναι τοξική και μπορεί να προκαλέσει αντιδράσεις οξείδωσης στο βιολογικό υλικό. Για να αποφευχθεί η βλάβη στις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και διάφορα άλλα μόρια δεσμεύονται στην Hb από την απτοσφαιρίνη (Haptoglobin, Hp), η οποία είναι μια πρωτεΐνη της οξείας φλεγμονώδους φάσης που μειώνει την οξειδωτική βλάβη. Ωστόσο, η δέσμευση της Hp στην Hb αυξάνει το επίπεδο σχηματισμού φερρυλίου κατά την καταλυόμενη από Hb υπεροξείδωση των λιπιδίων. Η ελεύθερη Hb που απελευθερώνεται στο πλάσμα δεσμεύεται από την Hp. Ωστόσο, σε υψηλό βαθμό ενδαγγειακής αιμόλυσης, το επίπεδο της Hp είναι πολύ χαμηλό για να δεσμευτεί όλη η απελευθερωμένη Hb. Τα διμερή Hb στη συνέχεια φιλτράρονται από τα σπειράματα και επαναρροφούνται μέσω του εγγύς σωληναρίου. Όταν κορεστεί η ικανότητα επαναρρόφησης, η αιμοσφαιρίνη εμφανίζεται στα ούρα (159).

Α6.2. Η συμβολή του οξειδωτικού στρες στο θάνατο των ερυθροκυττάρων

Όταν τα RBCs υποστούν εκτεταμένες βλάβες, για παράδειγμα λόγω υψηλού οξειδωτικού στρες, απομακρύνονται μέσω αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου ή ερυθρόπτωσης (eryptosis). Η διαδικασία της ερυθρόπτωσης χαρακτηρίζεται από μία ανακατανομή της κυτταρικής μεμβράνης που οδηγεί σε διάσπαση της ασυμμετρίας της και μετατόπιση της PS από το εσωτερικό στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης (160,161). Στα RBCs, οι δραστηριότητες των ενζύμων σκραμπλάση και φλιπάση (αμινοφωσφολιπιδική τρανσλοκάση) καθορίζουν την κατανομή της PS μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής μεμβράνης (161). Και τα δύο ένζυμα ρυθμίζονται από το Ca^{2+}, το οποίο αναστέλλει τη φλιπάση και ενεργοποιεί τη σκραμπλάση (162). Κατά την επαγωγή της ερυθρόπτωσης, μια αύξηση της

συγκέντρωσης του κυτοσολικού Ca^{2+} αναστέλλει τη φλιπάση και ενεργοποιεί τη σκραμπλάση, με αποτέλεσμα την έκθεση της PS στην επιφάνεια του ερυθροκυττάρων που αποπίπτουν. Η ανακατανομή της κυτταρικής μεμβράνης τυπικά παραλληλίζεται με τη συρρίκνωση των RBCs και με το σχηματισμό φυσαλίδων στην επιφάνειά τους. Τα RBCs απομακρύνονται γρήγορα από την κυκλοφορία (160,163), καθώς τα ερυθροκύτταρα που εκθέτουν φωσφατιδυλοσερίνη συνδέονται κυρίως με τους αντίστοιχους υποδοχείς των σπληνικών μακροφάγων και τα $CD207^+$ δενδριτικά κύτταρα, τα οποία ενσωματώνουν και καταστρέφουν τα κατεστραμμένα RBCs. Η ερυθρόπτωση μπορεί να προκληθεί από το οξειδωτικό στρες, το οποίο όχι μόνο διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην παθοφυσιολογία που σχετίζεται με την ερυθρόπτωση σε διάφορες ασθένειες, αλλά συμβάλλει επίσης στη διέγερσή της από ένα ευρύ φάσμα ξενοβιοτικών (164,165).

Α7. Επιδράσεις της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας και της αιμοκάθαρσης στα κύτταρα του αίματος

Α7.1. Επιδράσεις στα ερυθρά αιμοσφαίρια

Η αναιμία, δηλαδή η μείωση του αιματοκρίτη, της αιμοσφαιρίνης ή των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα, είναι η πιο συχνή αιματολογική επιπλοκή στη νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Αιτία της αναιμίας χρονίας νόσου στη νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου είναι η μειωμένη παραγωγή ερυθροποιητίνης από τους νεφρούς, που οδηγεί στη μειωμένη διάρκειας ζωής των RBCs στο ουραιμικό περιβάλλον του ασθενή και στη χρόνια φλεγμονή (166).

Για να αντιμετωπιστεί η αναιμία, οι ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια υποβάλλονται σε θεραπεία ερυθροποιητίνης λόγω αδυναμίας των νεφρών να παράγουν την απαιτούμενη ποσότητα, η οποία θα δώσει το σήμα της ερυθροποίησης. Σε ασθενείς με αντίσταση στην ερυθροποιητίνη, η μετάγγιση συμπυκνωμένων RBCs είναι η θεραπεία επιλογής (167).

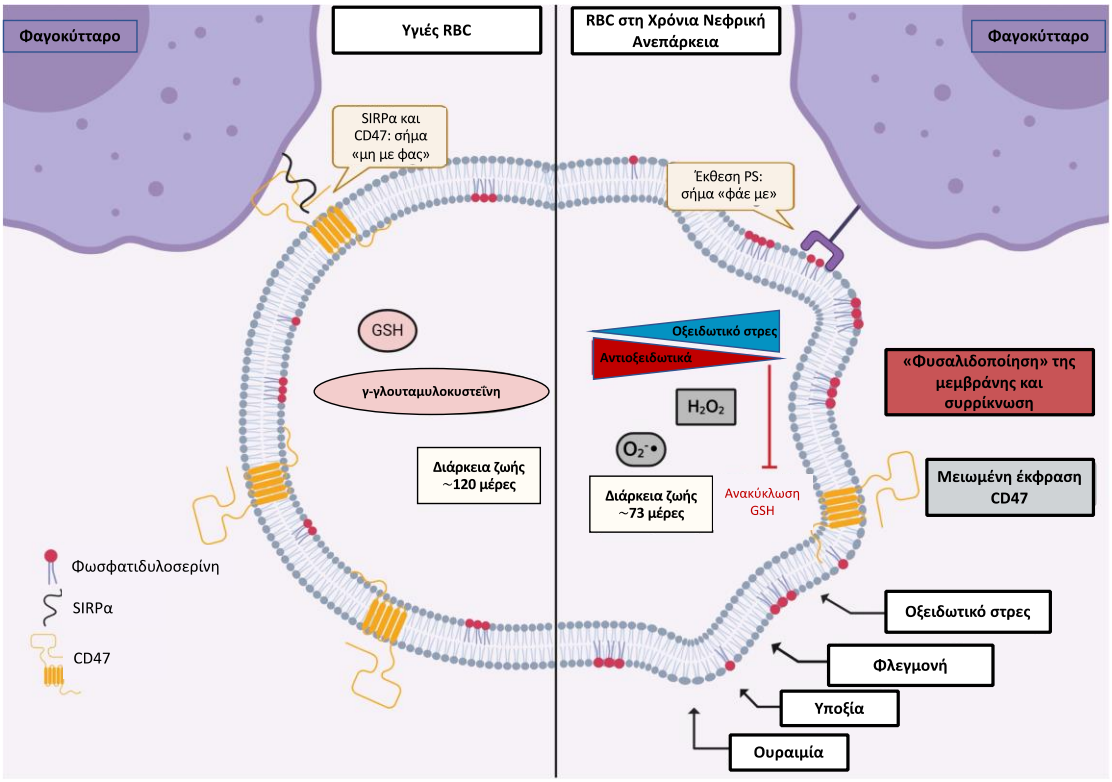
Έχει δειχθεί ότι οι ουραιμικές τοξίνες επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής των RBCs και τη μετάγγιση αίματος (167) στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (168–171).

Διάφοροι παράγοντες όπως η ουραιμία, η υποξία, η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες μπορούν να επάγουν σήματα κυτταρικής βλάβης και να προκαλέσουν καταστροφή των ερυθρών κυττάρων μέσω απόπτωσης ή, συχνότερα, μέσω ερυθρόπτωσης (**Εικόνα 10**).

Τα υψηλά επίπεδα ουραιμικών τοξινών στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου έχουν συσχετιστεί στο παρελθόν με αλλαγές στο σχήμα των ερυθροκυττάρων ως αποτέλεσμα της κακής ανταπόκρισης της αιμοκάθαρσης (168). Οι αλλαγές στην πρωτεϊνική σύσταση των RBCs, στην οξείδωση και απόπτωση έχει δειχτεί να σχετίζονται με την ανταπόκριση των ασθενών στην ερυθροποιητίνη. Οι ασθενείς που ανταποκρίνονται καλύτερα στη χορήγηση ερυθροποιητίνης είχαν λιγότερα κυτταρικά σήματα ερυθροκυτταρικής εκκαθάρισης, απόπτωσης και οξείδωσης (169). Επιπλέον, έχει αναφερθεί αυξημένο οξειδωτικό στρες τόσο στα RBCs όσο και στο πλάσμα των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και έχει προταθεί η χρήση αντιοξειδωτικών για την καλύτερη διαχείριση του οξειδωτικού στρες (170).

Η πλασματική μεμβράνη των RBCs σε ασθενείς με ΧΝΑ έχει βρεθεί να έχει μεγαλύτερη ρευστότητα, ύστερα από μετρήσεις λιπιδίων της μεμβράνης. Επιπλέον, η ρευστότητα των μεμβρανών αυξήθηκε με το χρόνο της αιμοκάθαρσης. Τα RBCs από ασθενείς με ΧΝΑ φαίνεται να είναι σημαντικά πιο ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες από τα RBCs υγιών ατόμων (172). Η αύξηση της ρευστότητας της μεμβράνης συνοδεύεται από βαθύτερες αλλαγές στον κυτταροσκελετό της μεμβράνης (172,173). Επιπλέον, οι πλασματικές μεμβράνες των RBCs των ασθενών με ΧΝΑ χαρακτηρίζονται από υψηλότερη οσμωτική ευθραυστότητα σε σύγκριση με τα RBCs υγιών ατόμων, η οποία αυξάνεται περαιτέρω παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (172). Η αιμοκάθαρση προάγει την οξειδωτική βλάβη στα ερυθροκύτταρα, οδηγώντας γρηγορότερα σε γήρανση και έκθεση της PS. Ενώ η διάρκεια ζωής ενός φυσιολογικού ερυθροκυττάρου είναι 120 ημέρες, αυτή περιορίζεται έως και στο 70% για τα RBCs ασθενών με ΧΝΑ (174,175) (**Εικόνα 10**). Το τοξικό ουραιμικό περιβάλλον και το οξειδωτικό στρες συντομεύουν το χρόνο επιβίωσης των RBCs, γεγονός που οδηγεί σε αναιμία στη χρόνια νεφρική νόσο. Στο αίμα των ασθενών κυριαρχούν μικρότερης ηλικίας ερυθρά αιμοσφαίρια, τα οποία είναι πιο ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες. Η ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες έχει

δειχτεί να συμβάλει στη μείωση του χρόνου επιβίωσης των νεαρών ερυθροκυττάρων σε ασθενείς με ΧΝΑ.



Εικόνα 10. Σύνοψη της σηματοδότησης, της διάρκειας ζωής και του περιβάλλοντος οξειδοαναγωγής των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε υγιή άτομα (αριστερά) και σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (δεξιά) (176). *Διάφοροι παράγοντες όπως η ουραιμία, η υποξία, η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες μπορούν να προκαλέσουν σήματα κυτταρικής βλάβης και τελικά ερυθρόπτωση. Το CD47 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων που αλληλεπιδρά με ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων, αποτρέποντας την ερυθροφαγοκυττάρωση (σήμα «μη με φας»). Στα υγιή άτομα, μετά από περίπου 120 ημέρες, η έκφραση του CD47 μειώνεται και τα ερυθρά αιμοσφαίρια απομακρύνονται από το σύστημα μονοκυττάρων-μακροφάγων, ειδικά στο σπλήνα. Η διάρκεια ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων μειώνεται στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ). Τα ερυθρά αιμοσφαίρια από ασθενείς με ΧΝΑ δείχνουν υπερπαραγωγή οξειδωτικών και μειωμένη ανακύκλωση αντιοξειδωτικών μορίων. Στη ΧΝΑ, τα κυκλοφορούντα ερυθρά αιμοσφαίρια αυξάνουν τη μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) από την εσωτερική μεμβράνη στην κυτταρική επιφάνεια. Τα προφλεγμονώδη μονοκύτταρα και τα μακροφάγα αναγνωρίζουν την PS και τα ερυθρά αιμοσφαίρια απομακρύνονται από την κυκλοφορία. RBC: ερυθρό αιμοσφαίριο, GHS: γλουταθειόνη, SIRPα: σηματοδοτική ρυθμιστική πρωτεΐνη άλφα.*

Όπως προαναφέρθηκε, η Hb που διαφεύγει από τα RBCs ως συνέπεια του οξειδωτικού στρες μπορεί να έχει τοξικές επιδράσεις. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη αιμόλυση κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης. Η αιμόλυση έχει συσχετιστεί με τη μηχανική βλάβη των RBCs από τις αντλίες αιμοκάθαρσης, όπως έχει δειχθεί από την παρουσία ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα ασθενών μετά την αιμοκάθαρση

(177,178). Τόσο η αιμοσφαιρίνη όσο και η μυοσφαιρίνη εμφανίζουν προ-οξειδωτική δράση. Εάν η απελευθερωμένη αίμη δεν δεσμευτεί από την αιμοπηξίνη, τότε ο κύκλος οξειδοαναγωγής του σιδήρου στην αίμη οδηγεί σε ρίζες σφαιρίνης που προκαλούν υπεροξείδωση λιπιδίων (179). Στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, πολλά οξειδωμένα λιπίδια έχουν τοξική επίδραση στα κύτταρα και τους ιστούς, ασκώντας προ-αποπτωτική και προφλεγμονώδη δράση, ιδιαίτερα στο καρδιαγγειακό σύστημα. Τα λιπίδια αυτά περιλαμβάνουν ισοπροστάνες, ιδιαίτερα ισοπροστάνη F2, της οποίας η συγκέντρωση αυξάνεται με την ανάπτυξη της νόσου. Η συσσώρευση και οι επιβλαβείς επιπτώσεις τους τις έχουν ταξινομήσει ως ουραιμικές τοξίνες. Στη ΧΝΑ, παρατηρούνται επίσης λιποπρωτεΐνες με οξειδωτική δράση, οι οποίες οδηγούν σε μειωμένη ενεργότητα της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (High Density Lipoprotein, HDL) και μπορεί να εμπλέκονται έντονα στην επιταχυνόμενη αθηροσκλήρωση σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (180). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η αιτία του αυξημένου κινδύνου θανάτου στους ασθενείς με ΧΝΑ είναι οι ουραιμικές τοξίνες, οι οποίες ευθύνονται για την αύξηση της καρδιαγγειακής θνησιμότητας (181).

Το οξειδωτικό στρες έχει αναφερθεί ότι συσχετίζεται αντιστρόφως με το ρυθμό σπειραματικής διήθησης (182,183), υποδεικνύοντας ότι οι ελεύθερες ρίζες συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία της νεφρικής ανεπάρκειας. Έχουν αναφερθεί υψηλότερα επίπεδα οξειδωμένης LDL και υδροϋπεροξειδίου των λιπιδίων του πλάσματος σε ασθενείς με ΧΝΑ από ότι σε υγιή άτομα (184). Επιπλέον, οι ασθενείς με ΧΝΑ εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών συστατικών όπως υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, υπεροξειδικής δισμουτάσης και θειόλης πλάσματος και μειωμένη ενδοκυττάρια γλουταθειόνη και καταλάση (183,185). Άλλες συν-νοσηρότητες που σχετίζονται συχνά με τη ΧΝΑ όπως η υπέρταση, η προχωρημένη ηλικία, η δυσλιπιδαιμία και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 μπορεί να επιδεινώσουν περαιτέρω το οξειδωτικό στρες (186,187). Ωστόσο, οι οξειδωτικές ρίζες μπορούν επίσης να προκαλέσουν άμεσα νεφρική ισχαιμία και σπειραματική βλάβη συμβάλλοντας στην εξέλιξη της ΧΝΑ (188). Η ίδια η αιμοκάθαρση αυξάνει επίσης το οξειδωτικό στρες με την ενεργοποίηση της οδού του συμπληρώματος και τη διέγερση των φλεγμονωδών διεργασιών (189). Το οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης επάγεται από την ίδια τη μεμβράνη αιμοκάθαρσης και

επιδεινώνεται περαιτέρω από την απώλεια αντιοξειδωτικών βιταμινών κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας (190). Ο νεφρός είναι σε θέση να παράγει πολλά αντιοξειδωτικά ένζυμα. Εάν ωστόσο αυτή η λειτουργία είναι ελλειπής, μπορεί να προκύψει δυσλειτουργία της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων, αυξημένη αιμόλυση και μειωμένη λειτουργία των PLTs (191). Ομοίως, το οξειδωτικό στρες εντός των ερυθροκυττάρων αυξάνεται στη ΧΝΑ, οδηγώντας τα RBCs σε αυξημένο αυτοκτονικό θάνατο σε ασθενείς με ESRD σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, που ενισχύεται περαιτέρω μετά από αιμοκάθαρση (192). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η ίδια η αιμοκάθαρση έχει καταστροφική επίδραση στα RBCs, οδηγώντας σε μειωμένη επιβίωσή τους στην κυκλοφορία του αίματος (193). Όχι μόνο σε ασθενείς που υφίστανται θεραπεία αιμοκάθαρσης, αλλά και σε ασθενείς σε περιτοναϊκή κάθαρση, το οξειδωτικό στρες έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται οδηγώντας σε διπλασιασμό του ποσοστού των κυκλοφορούντων νεκρών RBCs (194). Έτσι, αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η αναιμία στην ESRD οφείλεται, σε μεγάλο βαθμό, στην επιταχυνόμενη απόσυρση των κυκλοφορούντων ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος που προκύπτει από την αυξημένη διέγερση της ερυθρόπτωσης και παραμένει ανθεκτική στη θεραπευτική υπεραντιστάθμιση της ανεπάρκειας ερυθροποιητίνης (195).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι έχει παρατηρηθεί αυξημένη απελευθέρωση μικροκυστιδίων (Microvesicles, MV) από τα RBCs ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, η οποία αποδίδεται σε τροποποιημένη αλληλεπίδραση μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταροσκελετού (171). Οι οξειδωτικές και μηχανικές καταπονήσεις των RBCs, η χρόνια φλεγμονή και η απορρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου είναι στρεσογόνοι παράγοντες της απελευθέρωσης MV (196).

Οι διαλυμένες ουραιμικές ουσίες θειικό ινδοξύλιο και ινδολοξικό οξύ έχουν δειχθεί ότι επάγουν την έκθεση της PS και την απελευθέρωση MV από υγιή RBCs (197). Ο Gao και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η αναστολή της PS με τη λακταδερίνη μείωσε την απελευθέρωση MV, ενισχύοντας τη συμμετοχή της PS και της μικροκυστιδοποίησης στην ερυθρόπτωση. Η απελευθέρωση MV από τα RBCs δείχθηκε να εμπλέκεται στο σχηματισμό θρόμβου, ο οποίος μπορεί να επιδεινώσει τα καρδιαγγειακά συμβάντα στη ΧΝΑ (197). Τα MV μπορεί να επηρεάσουν την κλινική

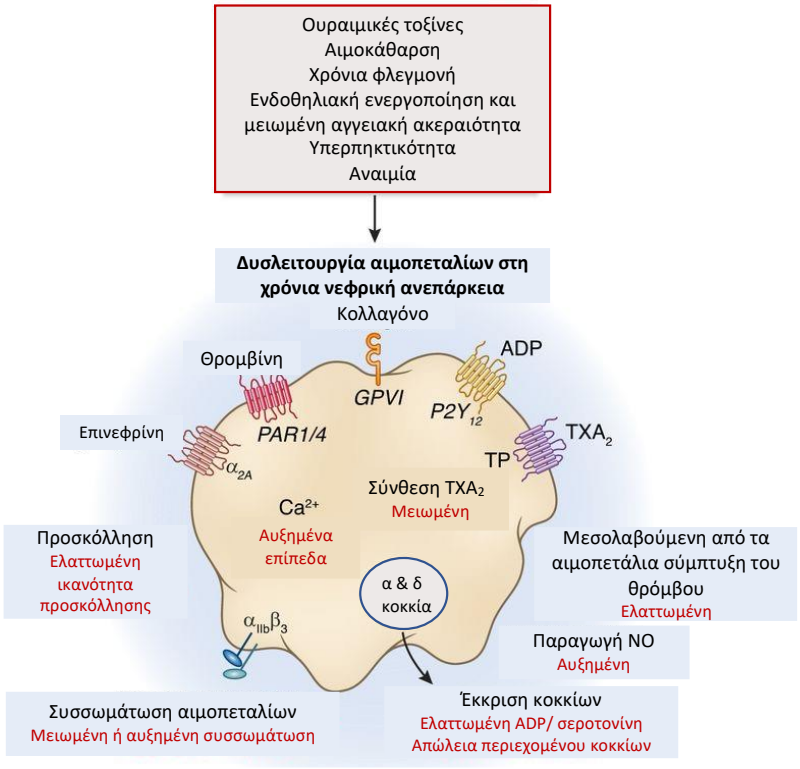
βαρύτητα των ασθενών γιατί είναι ικανά να μεταφέρουν κυτταρικά σήματα που προάγουν τη φλεγμονή, τη θρόμβωση και την απόπτωση των κυττάρων (196,198).

Α7.2. Επιδράσεις στα αιμοπετάλια

Οι ασθενείς με ESRD είναι επιρρεπείς να αναπτύξουν επιπλοκές στην αιμόσταση: την αιμορραγία και την πήξη. Η αιμορραγία εμφανίζεται σε ασθενείς με ESRD παρά ένα προφίλ πήξης που δείχνει φυσιολογικά ή αυξημένα επίπεδα των παραγόντων πήξης, υποδηλώνοντας ότι η τάση για αιμορραγικά επεισόδια οφείλεται σε δυσλειτουργία των PLTs (199).

Σε ασθενείς με ΧΝΑ που δεν υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, η πλειονότητα των μελετών δεν βρίσκει σημαντική μείωση στον αριθμό των PLTs (200). Σε ασθενείς με ESRD, ωστόσο, ο αριθμός των PLTs μπορεί να μειωθεί έως και κατά περίπου 20% (201–203). Αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα συνεχούς κατανάλωσης των PLTs μέσω συνεχούς ενεργοποίησης, π.χ. λόγω της επαναλαμβανόμενης αιμοκάθαρσης, η οποία μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση PLTs, έκκριση και σχηματισμό συσσωματωμάτων PLTs-λευκοκυττάρων (204,205) ή μπορεί να προκύπτει από μειωμένη παραγωγή PLTs από τα μεγακαρυοκύτταρα (206). Ο αριθμός των PLTs πρέπει να μειωθεί σημαντικά για να προκληθεί αυτόματη αιμορραγία ($<5\times10^9$/L σε ασθενείς που είναι κλινικά σταθεροί, μείωση >95%) (207). Επιπλέον, τα μοντέλα ποντικών με ΧΝΑ εμφανίζουν παρατεταμένο χρόνο αιμορραγίας χωρίς σημαντική μείωση στον αριθμό των PLTs (208). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι η μείωση του αριθμού των PLTs από μόνη της δεν φαίνεται να είναι αποκλειστικά υπεύθυνη για τις αιμορραγικές επιπλοκές στη ΧΝΑ.

Η αλλοιωμένη λειτουργία των PLTs στην προχωρημένη νεφρική ανεπάρκεια είναι αποτέλεσμα εγγενών ελαττωμάτων των PLTs που περιλαμβάνουν και μειωμένη προσκόλληση και μη φυσιολογική αλληλεπίδραση με το ενδοθήλιο (182) (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11. Αιτιολογικοί παράγοντες και εμπλεκόμενοι μηχανισμοί δυσλειτουργίας των αιμοπεταλίων στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (209). *Εκτός από τη μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ), έχουν περιγραφεί αλλοιώσεις στην επαγόμενη από διέγερση προσκόλληση αιμοπεταλίων, στη συσσώρευση, στην έκκριση κοκκίων, στην παραγωγή θρομβοξάνης Α2 (ΤΧΑ2) και στη σύμπτυξη του θρόμβου από τα αιμοπετάλια. Η ΧΝΑ μπορεί να επηρεάσει άμεσα τις αποκρίσεις των αιμοπεταλίων και το σχηματισμό θρόμβων μέσω συσσώρευσης ουραιμικών τοξινών και χρόνιας φλεγμονής χαμηλού βαθμού και έμμεσα μέσω της αιμοκάθαρσης, της αγγειακής φλεγμονής και της μειωμένης αγγειακής ακεραιότητας, της υπερπηκτικότητας και της αναιμίας. ADP, διφωσφορική αδενοσίνη; TXA_2, θρομβοξάνη Α2; GPVI, γλυκοπρωτεΐνη IV; $P2Y_{12}$, Υποδοχέας ADP; PAR1/4, ενεργοποιούμενος από πρωτεάση υποδοχέας 1/4; TP, υποδοχέας θρομβοξάνης; NO, μονοξείδιο του αζώτου.*

Τα φυσιολογικά PLTs κατά την ενεργοποίησή τους απελευθερώνουν κοκκία, τα οποία είναι απαραίτητα για το σχηματισμό συσσωματωμάτων PLTs (210). Η διφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine Disphospate, ADP) και η σεροτονίνη που εκκρίνονται από αυτά τα κοκκία διεγείρουν την έλξη περισσότερων PLTs προς τα κατεστραμμένα αγγειακά τοιχώματα. Επιπλέον, το ADP προωθεί περαιτέρω την ενεργοποίηση των PLTs και η σεροτονίνη αυξάνει την προπηκτική τους δραστηριότητα αυξάνοντας τη δέσμευση του ινωδογόνου και της θρομβοσπονδίνης στην επιφάνεια των PLTs (211). Στην προχωρημένη νεφρική ανεπάρκεια, η

περιεκτικότητα των κοκκίων σε σεροτονίνη και ADP ελαττώνονται και επίσης ελαττώνεται η απελευθέρωση τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine Triphosphate, ATP) ως απόκριση στη θρομβίνη (212). Έχει επίσης σημειωθεί ότι η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cyclic Adenosine Monophosphate, cAMP) που προκαλεί δυσλειτουργία των PLTs αλλάζοντας την κινητοποίηση του ασβεστίου, είναι αυξημένη σε ασθενείς με ESRD. Αυτή η ανισορροπία μεταξύ των αγωνιστών PLTs, της ADP και της σεροτονίνης, και του ανασταλτικού cAMP μπορεί να οδηγήσει σε ελαττωματική ενεργοποίηση (213). Η σύνθεση θρομβοξάνης Α2 από τα PLTs ως απόκριση στο ADP, το κολλαγόνο, τη θρομβίνη και το αραχιδονικό οξύ μειώνεται σε ασθενείς με ESRD (214,215). Πειράματα που διεξήχθησαν μετά τη μεταφορά PLTs από ουραιμικό πλάσμα σε φυσιολογικό πλάσμα και PLTs από φυσιολογικό πλάσμα σε ουραιμικό πλάσμα έδειξαν ότι τα υγιή PLTs έγιναν δυσλειτουργικά στο ουραιμικό πλάσμα, ενώ το φυσιολογικό πλάσμα διόρθωσε εν μέρει αυτή τη δυσλειτουργία (216). Πιστεύεται ότι ο συνδυασμός των τοξινών που συσσωρεύονται στο ουραιμικό πλάσμα, οι μεταβολικές διαταραχές και η ενεργοποίηση πρωτεολυτικών συστημάτων, όπως ο καταρράκτης της πήξης και η ινωδόλυση, συμβάλλουν στη δυσλειτουργία των PLTs (217,218). Εφόσον αυτές οι βλάβες διορθώνονται εν μέρει με την αιμοκάθαρση, είναι λογικό να συμπεράνουμε ότι οι παράγοντες που υπάρχουν στο ουραιμικό πλάσμα συμβάλλουν στη δυσλειτουργία των PLTs (219). Από την άλλη πλευρά, είναι πιθανό ότι η εξασθενημένη έκκριση συστατικών των PLTs μπορεί να οφείλεται σε επαναλαμβανόμενη ενεργοποίηση των PLTs που προκαλείται από την έκθεση του αίματος στις μεμβράνες και τους σωλήνες αιμοκάθαρσης. Σε PLTs από ουραιμικούς ασθενείς, οι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες ήταν ανεπαρκείς ακόμη και σε κατάσταση ηρεμίας, και αυτό επιδεινώθηκε μετά την ενεργοποίηση των PLTs από τη θρομβίνη. Τα διεγερμένα από θρομβίνη ουραιμικά PLTs έχουν βρεθεί ότι ελαττώνουν σημαντικά την ενσωμάτωση της ακτίνης στον κυτταροσκελετό σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (220). Αυτές οι αλλοιώσεις στο συσταλτικό σύστημα των PLTs μπορούν να συμβάλουν σε εξασθενημένη κινητικότητα και εκκριτική λειτουργία των PLTs στην προχωρημένη νεφρική ανεπάρκεια.

Ο ρόλος των ουραιμικών τοξινών στη δομή και τη λειτουργία των PLTs δεν είναι πλήρως κατανοητός. Έτσι, έχει προταθεί ότι οι ουραιμικές τοξίνες που συσσωρεύονται στο πλάσμα καθώς φθίνει η λειτουργία των νεφρών, μπλοκάρουν

την ενεργοποίηση των PLTs και προάγουν την αιμορραγία, ενώ άλλες μελέτες προτείνουν ότι αυτές οι τοξίνες αυξάνουν την ενεργοποίηση των PLTs και προάγουν τη θρόμβωση (221–223). Σε PLTs που λαμβάνονται από ασθενείς σε αιμοκάθαρση, οι υποδοχείς ινωδογόνου των PLTs παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα να υφίστανται αλλαγές διαμόρφωσης και να δεσμεύονται στον κατάλληλο υποδοχέα λόγω της παρουσίας πιθανών αναστολέων, όπως οι ουραιμικές τοξίνες. Η θεραπεία αιμοκάθαρσης αποδείχθηκε ότι διορθώνει εν μέρει την ανωμαλία με πιθανή αφαίρεση αυτών των υποτιθέμενων αναστολέων (224). Ωστόσο, απαιτούνται μηχανιστικές μελέτες για την κατανόηση αυτών των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων. Αφενός, μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι το θειικό ινδοξύλιο αυξάνει την έκφραση της P-σελεκτίνης και της ιντεγκρίνης αIIbβ3 με τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση και την ενεργοποίηση της οδού του κολλαγόνου (222,223). Από την άλλη πλευρά, απομονωμένα PLTs από ανθρώπους και κουνέλια παρουσιάζουν μείωση της ρύθμισης της οδού θρομβοξάνης A2 κατά την έκθεση στη θειική π-κρεσόλη (225).

Το μονοξείδιο του αζώτου προκαλεί βλάβη στη λειτουργία των PLTs αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ PLTs και επίσης την αλληλεπίδραση μεταξύ PLTs και αγγειακού τοιχώματος. Η αναστολή της αλληλεπίδρασης PLTs-PLTs από το μονοξείδιο του αζώτου διαμεσολαβείται από αυξημένη παραγωγή κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cyclic Guanosine Monophosphate, cGMP), τόσο στους λείους μυς των αγγείων όσο και στα PLTs (226,227). Υπερβολική παραγωγή και των δύο, μονοξειδίου του αζώτου και cGMP έχει αναφερθεί σε ασθενείς με ESRD (228).

Η αμινοφωσφολιπιδική φωσφατιδυλοσερίνη που υπάρχει στη μεμβράνη των PLTs έχει θρομβοφιλικές ιδιότητες. Η PS, όπως συμβαίνει και στα RBCs, περιορίζεται κυρίως στο εσωτερικό στρώμα της πλασματικής μεμβράνης των PLTs. Μετά την ενεργοποίηση μετατοπίζεται εξωτερικά, όπως συμβαίνει στη χρόνια αιμοκάθαρση (229). Η θρομβοφιλική τάση των ουραιμικών PLTs έχει αποδοθεί εν μέρει στη μετατόπιση της PS στην εξωτερική μεμβράνη λόγω χρόνιας ενεργοποίησης των PLTs σε ασθενείς σε χρόνια αιμοκάθαρση. Η ενεργοποίηση των PLTs έχει επίσης ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση μικροκυστιδίων με προπηκτική δράση (230). Η ποσότητα των MV από PLTs ήταν αυξημένη σε ασθενείς που εμφάνισαν θρομβωτικά επεισόδια σε σύγκριση με εκείνους χωρίς κανένα θρομβωτικό επεισόδιο (231). Η

θεραπεία με ερυθροποιητίνη έχει δειχθεί ότι προκαλεί σημαντικά αυξημένη απελευθέρωση MV σε ασθενείς σε αιμοκάθαρση και σε περιτοναϊκή κάθαρση.

Συνολικά, ο αυξημένος κίνδυνος αιματολογικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων των αιμορραγιών και των θρομβώσεων, που καταγράφονται σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, οφείλονται σε ένα σύνολο διαταραχών επί των κυττάρων του αίματος. Οι βασικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν αυξημένο οξειδωτικό στρες κυρίως λόγω της δράσης των ουραιμικών τοξινών και αυξημένη έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης τόσο στα RBCs όσο και τα PLTs. Παρόλα αυτά, περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την αποσαφήνιση του συνόλου τον εμπλεκόμενων μηχανισμών.

Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη του μηχανισμού της αιμόστασης και των κυττάρων του αίματος (αιμοπετάλια και ερυθρά αιμοσφαίρια) σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανέπαρκεια τελικού σταδίου πριν και μετά την αιμοκάθαρση.

Μελετήθηκε για πρώτη φορά η αλληλεπίδραση των διαλυτών παραγόντων της πήξης με τα κύτταρα του αίματος τα οποία συμμετέχουν στην ομοιόσταση της αιμόστασης στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου.

Κεφάλαιο Β. Υλικά και Μέθοδοι

Β1. Υλικά

Β1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Βόεια λευκωματίνη ορού (BSA), Sigma-Aldrich

Εστέρας CMH_2DCFDA (για ανίχνευση δραστικών ριζών οξυγόνου, ROS), Invitrogen, Molecular Probes

Εστέρας Fluo-4,AM, για μέτρηση ενδοκυττάριου ασβεστίου, Sigma-Aldrich

Μεθανόλη (CH_3OH), Sigma-Aldrich

Μονοβασικό μονοένυδρο φωσφορικό νάτριο ($NaH_2PO_4H_2O$), Sigma-Aldrich

Οξικό Νάτριο (CH_3COONa), Sigma-Aldrich

Οξικό Οξύ (CH_3COOH), Sigma-Aldrich

Όξινο ανθρακικό νάτριο ($NaHCO_3$), Sigma-Aldrich

Πυροσταφυλικό νάτριο ($C_3H_3NaO_3$), Sigma-Aldrich

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline tablets, PBS), Sigma-Aldrich

Υδροχλώριο (HCl), Sigma-Aldrich

Χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$), Sigma-Aldrich

Χλωριούχο κάλιο (KCl), Sigma-Aldrich

Χλωριούχο Μαγνήσιο ($MgCl_2$), Sigma-Aldrich

Χλωριούχο Νάτριο (NaCl), Sigma-Aldrich

D-γλυκόζη ($C_6H_{12}O_6$), Sigma-Aldrich

NeoPTimal, Diagnostica Stago

Pathromtin SL, Siemens Healthcare Diagnostics

PBS pH7.4, ThermoFisher Scientific

Thromborel S Reagent, Siemens Healthcare Diagnostics

Β1.2. Εμπορικά διαθέσιμα κιτ αντιδράσεων

AFINION™ CRP, Abbott Diagnostics

ATS-13® Activity Assay, Immucor GTI Diagnostics

Berichrome Factor XIII, Siemens Healthcare Diagnostics Inc

Berichrome PAI, Siemens Healthcare Diagnostics Inc

C.K. Prest, Diagnostica Stago

Dade PFA Collagen/ADP Test cartridge, Siemens Healthcare Diagnostics Inc

Dade PFA Collagen/EPI Test cartridge, Siemens Healthcare Diagnostics Inc

Hemos IL Liquid Antithrombin, Instrumentations Laboratory

Hemos IL protein S, Instrumentations Laboratory

Human Anti-Beta2 Glycoprotein I IgG/IgM ELISA Kit, Delta Biologicals Srl

Human Anti-Cardiolipin IgG/IgM ELISA Kit, Delta Biologicals Srl

Innovance D-Dimer, Siemens Healthcare Diagnostics Inc

Innovance VWF Ac, Siemens Healthcare Diagnostics Inc

Multifibren U, Siemens Healthcare Diagnostics Inc

PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences

STA Immunodef XII, Diagnostica Stago

STA Immunodef XII, Diagnostica Stago

STA-Deficient II, Diagnostica Stago

STA-Deficient IX, Diagnostica Stago

STA-Deficient V, Diagnostica Stago

STA-Deficient VII, Diagnostica Stago

STA-Deficient VIII, Diagnostica Stago

STA-Deficient X, Diagnostica Stago

STA-Immunodef XI, Diagnostica Stago

STA-Liatest Free Protein S, Diagnostica Stago

STA-Liatest vWF: Ag, Diagnostica Stago

STA-PTT A, Diagnostica Stago

STA-Stachrom, Diagnostica Stago

STA®-Staclot® APC-R, Diagnostica Stago

Zymuphen microparticles activity kit (ELISA Kit), HYPHEN BioMed

Β1.3. Αντισώματα

(APC)-conjugated anti-CD62P, BD Pharmingen

FITC-conjugated anti-glycophorin A-APC (CD235) (rabbit), BD Pharmingen

PE Cy5-CD41a, BD Biosciences

Β1.4. Αναλώσιμα

Ακροφύσια για πιπέτες, Gilson

Αντικειμενοφόρες πλάκες, VWR

Βελόνες αιμοληψίας, BD Biosciences

Καλυπτρίδες, VWR

Κυβέτες φασματοφωτομέτρου, SIGMA

Κυβέτες φθορισμομέτρου, Sigma-Aldrich

Σύριγγες, BD Biosciences

Σωληνάρια με 3,2% κιτρικού νατρίου, BD Vacutainer Blood Collection Tubes), BD Biosciences

Σωληνάρια με αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), (BD Vacutainer Blood Collection Tubes), BD Biosciences

Σωληνάρια με ζελώδη πηκτικό πράγοντα (BD Vacutainer SST™ Tubes), BD Biosciences

Σωληνάρια φυγοκέντρησης διαφόρων όγκων, BD Biosciences

Β1.5. Όργανα – Συσκευές

Αιματολογικός αναλυτής, Siemens Advia 2120i

Αναγνώστης μικροπλακών Fluoroskan™ Microplate Fluorometer, Thermofisher Scientific

Αναδευτήρας, Kisker Biotech

Αναλυτής αιμόλυσης ACL TOP, Instrumentations Laboratory

Αναλυτής αιμόστασης STAR DIAGNOSTICA STAGO, Diagnostica Stago

Αναλυτής λειτουργικότητας αιμοπεταλίων PFA-100, SIEMENS

Αναλυτής πήξης BCS XP, Siemens

Βιοχημικός αναλυτής, HITACHI 902

Βιοχημικός αναλυτής ηλεκτρολυτών (Elecsys Systems Analyzer), ROCHE

Βιοχημικός αναλυτής ARCHITECT C16000, Abbott

Επιτραπέζια φυγόκεντρος, Eppendorf 5410

Επωαστήρας (heatblock), Thermofisher Scientific

Ηλεκτρονικό πεχάμετρο, Thermofisher Scientific

Ηλεκτρονικός ζυγός, KERN PRS 320-3

Κλίβανος, Thermofisher Scientific

Κυτταρόμετρο, FACSCanto II, BD

Πιπέτες, Gilson

Φωτόμετρο, Jenway

Φωτόμετρο, ZEISS

Φωτόμετρο ELISA, ASYS Jupiter

Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος, Hettich

ACL TOP Hemostasis Analyzer, Instrumentation Laboratory

Vortex Genie 2, Scientific Industries

Β2. Μέθοδοι

Β2.1. Ασθενείς και Μάρτυρες

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν τριάντα δύο (32) ασθενείς με ESRD που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση συντήρησης και δεκαπέντε (15) υγιή άτομα (μάρτυρες ή ομάδα ελέγχου) αντίστοιχης ηλικίας και φύλου με φυσιολογικό αιματολογικό πρότυπο που δεν λάμβαναν φάρμακα ή συμπληρώματα διατροφής. Οι ασθενείς με ESRD υποβάλλονταν σε τακτική αιμοκάθαρση τρεις φορές την εβδομάδα (μέσος χρόνος αιμοκάθαρσης 41,3 ± 21,4 μήνες), χρησιμοποιώντας βιοσυμβατές μεμβράνες αιμοκάθαρσης υψηλής ροής (Deerfield, ΗΠΑ). Οι ασθενείς λάμβαναν ερυθροποιητίνη, rhEPO (Erythropoetin Alfa HEXAL, Sandoz GmbH, Kundl, Αυστρία) (κατά μέσο όρο 6.833,3 ± 3.588,7 IU/εβδομάδα) και ηπαρίνη (4.470 ± 1.243 IU/συνεδρία) και ήταν κλινικά σταθεροί τη στιγμή της έρευνας. Ασθενείς με

συννοσηρότητες και ασθενείς που έλαβαν μετάγγιση αίματος κατά τους τελευταίους 3 μήνες αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης, δείγματα ολικού αίματος από τα υγιή άτομα και από τους ασθενείς με ESRD πριν και αμέσως μετά το τέλος της αιμοκάθαρσης, συλλέχθηκαν σε σωληνάρια με αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), σε σωληνάρια χωρίς αντιπηκτικό και σε σωληνάρια περιεκτικότητας 3,2% κιτρικού νατρίου.

Η μελέτη έχει υποβληθεί και εγκριθεί από την Επιτροπή Δεοντολογίας της Έρευνας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής. Οι έρευνες διεξήχθησαν σύμφωνα με τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Ελήφθη γραπτή ενημερωμένη συγκατάθεση από όλους τους συμμετέχοντες.

Β2.2. Απομόνωση πλάσματος, ορού, ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων από περιφερικό αίμα

- **Πλάσμα σε EDTA**

Τα σωληνάρια με EDTA φυγοκεντρήθηκαν στις 1.000xg για 10min σε θερμοκρασία δωματίου (Room Temperature, RT). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 2.000xg για 10min σε RT.

- **Πλάσμα σε 3,2% κιτρικό νάτριο φτωχό σε αιμοπετάλια**

Τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν με τέσσερις (4) επαναλαμβνόμενες φυγοκεντρήσεις στις 2.000xg για 15min RT.

- **Πλάσμα σε 3,2% κιτρικό νάτριο**

Για την απομόνωση πλάσματος για τη μέτρηση των παραγόντων της αιμόστασης, η φυγοκέντρηση των σωληναρίων με 3,2% κιτρικό νάτριο έγινε στα 2.000xg για 15min RT.

- **Ορός αίματος**

Για την απομόνωση του ορού, τα σωληνάρια με πηκτικό παράγοντα (serum-seperating tube) φυγοκεντρήθηκαν στις 2.000xg για 15min σε RT.

Τα υπερκείμενα κάθε σωληναρίου συλλέχθηκαν και διαμοιράστηκαν σε σωληνάρια κατάλληλου όγκου για περαιτέρω αναλύσεις.

Β2.3. Έλεγχος αποκλεισμού παραγόντων κινδύνου για εκδήλωση θρομβωτικών επεισοδίων

Για τον αποκλεισμό της επίδρασης άλλων παραγόντων σε πιθανές ανωμαλίες των παραμέτρων της πήξης και της αιμόστασης, όλοι οι συμμετέχοντες στη μελέτη υποβλήθηκαν σε κατάλληλο έλεγχο και ήταν αρνητικοί για αντισώματα έναντι της b2-GPI, για αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης, για αντιπηκτικά του λύκου καθώς και για ανεπάρκεια του παράγοντα V Leiden.

Η ανίχνευση των αντιπηκτικών του λύκου (LA) στο πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια των ατόμων διεξήχθη χρησιμοποιώντας τις ποιοτικές δοκιμασίες HemosIL dRVVT Screen και HemosIL dRVVT Confirm σε αναλυτή αιμόστασης ACL TOP. Οι δοκιμασίες χρησιμοποιούν αραιωμένο δηλητήριο οχιάς Russell (Russell Viper Venom) για την ανίχνευση LA. Το HemosIL dRVVT Screen είναι ένα λυοφιλοποιημένο αντιδραστήριο που περιέχει χαμηλή συγκέντρωση φωσφολιπιδίων, αντι-ηπαρινικών παραγόντων, ασβεστίου, ρυθμιστικού διαλύματος, σταθεροποιητών και χρωστικής. Η χαμηλή συγκέντρωση φωσφολιπιδίων το καθιστά ευαίσθητο στα LA. Το HemosIL dRVVT Confirm έχει υψηλότερη συγκέντρωση φωσφολιπιδίων, η οποία εξουδετερώνει τα LA και δίνει συντομότερους χρόνους πήξης. Ταυτόχρονα, η προσθήκη του δηλητηρίου οχιάς Russell ενεργοποιεί άμεσα τον παράγοντα X. Σημειώνεται ότι και οι δύο δοκιμασίες χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα ως μέρος του προφίλ για την ανίχνευση αντιπηκτικών λύκου.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων έναντι της b2-GPI και των αντισωμάτων IgG/IgM έναντι της καρδιολιπίνης, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα κιτ ELISA της Delta Biologicals Srl σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Erba Diagnostics Inc., Pomezia, Roma, Ιταλία).

Η αξιολόγηση της αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (ανίχνευση παράγοντα V Leiden) πραγματοποιήθηκε με το κιτ STA®-Staclot® APC-R, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ειδικότερα, η δοκιμασία στηρίζεται στην επιλεκτική ενεργοποίηση του παράγοντα X του δείγματος από το δηλητήριο του φιδιού *Crotalus veridis helleri* και στη συνέχεια, στην αναστολή του ενεργοποιημένου παράγοντα V (συμπαράγοντα του FX), από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (activated Protein C, aPC). Για ένα φυσιολογικό δείγμα, η aPC αναστέλλει τον παράγοντα V, οπότε ο χρόνος πήξης είναι μεγαλύτερος από τον περιορισμό των 120 δευτερολέπτων. Για ένα δείγμα με ανεπάρκεια του παράγοντα V (V Leiden), το οποίο δεν είναι ευαίσθητο στη δράση της aPC, ο χρόνος πήξης μειώνεται κάτω από το όριο των 120 δευτερολέπτων.

Β2.4. Αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος

Πραγματοποιήθηκαν γενικές εξετάσεις αίματος με χρήση του αιματολογικού αναλυτή Siemens Advia 2120i. Για τη βιοχημική ανάλυση του ορού (ουρία, κρεατινίνη, ουρικό οξύ, παραθορμόνη, γλυκόζη, χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, ασβέστιο, φώσφορος, κάλιο, νάτριο, χλώριο, μαγνήσιο, σίδηρος, φερριτίνη, ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα, ολικές πρωτεΐνες, λευκωματίνη, β2 μικροσφαιρίνη, οξαλοξική τρανσαμινάση ορού, πυροσταφυλική τρανσαμινάση ορού, γ-γλουταμυλοτρανσφεράση, αλκαλική φωσφατάση, ολική χολερυθρίνη, έμμεση χολερυθρίνη, άμεση χολερυθρίνη, φωσφοκινάση κρεατίνης, αμυλάση, γαλακτική αφυδρογονάση και βιταμίνη D) χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος βιοχημικός αναλυτής ARCHITECT C16000. Τα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) προσδιορίστηκαν με το εμπορικά διαθέσιμο κιτ AFINION™ CRP στον αναλυτή Architect C8000.

Β2.5. Ελεύθερη Αιμοσφαιρίνη Πλάσματος

Η ελεύθερη Hb στο πλάσμα υπολογίστηκε φωτομετρικά με τη μέθοδο Harboe (232), αφού είχε προηγηθεί διαχωρισμός από τα ερυθροκύτταρα με φυγοκέντρηση στα 1.000xg. Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της οξυ-αιμοσφαιρίνης που έχει μέγιστο απορρόφησης τα 415nm. Όμως, στο ίδιο μήκος κύματος απορροφούν κι

άλλες ουσίες, όπως η χολερυθρίνη και η λευκωματίνη. Για το λόγο αυτό πραγματοποιείται μέτρηση και στα μήκη κύματος 380 και 450nm. Μέσω του ακόλουθου τύπου (διόρθωση κατά Allen (233)) μετατρέπεται η τιμή της απορρόφησης σε συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης:

$$Hb\ (mg/100ml) = [(167,2 \times A_{415}) - (83,6 \times A_{380}) - (83,6 \times A_{450})] \times 1/1000 \times \text{αραίωση (σε } dH_2O) \times 100,$$

όπου A_{415}, A_{380} και A_{450}, οι απορροφήσεις στα αντίστοιχα μήκη κύματος.

Β2.6. Μέτρηση ενδοκυτταρικών επιπέδων δραστικών ριζών οξυγόνου

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας το φθορίζοντα ανιχνευτή CMH_2DCFDA, ο οποίος έχει την ικανότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Ο ανιχνευτής CMH_2DCFDA διαχέεται παθητικά στα κύτταρα, όπου οι οξικές ομάδες του διασπώνται από ενδοκυτταρικές εστεράσες και η χλωρομεθυλική ομάδα του αντιδρά με την ενδοκυτταρική γλουταθειόνη και άλλες θειόλες. Η επακόλουθη οξείδωση αποδίδει ένα φθορίζον προϊόν προσθήκης που παγιδεύεται μέσα στο κύτταρο, διευκολύνοντας έτσι την ανίχνευση.

Τα RBCs αραιώθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)/ 5 mM D-γλυκόζης σε αιματοκρίτη 0,4% και επωάστηκαν με 20 μM CMH_2DCFDA για 60 λεπτά στους 37^oC, στο σκοτάδι.

Για τον προσδιορισμό των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS στα PLTs (PLTs), λήφθηκε πλάσμα πλούσιο σε PLTs (PRP) μετά από φυγοκέντρηση στα 200xg για 20 λεπτά, στους 24^oC. Το PRP στη συνέχεια αραιώθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes Tyrode (138 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 5,5 mM γλυκόζη, 5 mM Hepes/NaOH, 0,49 mM $MgCl_2$, 0,36 mM $NaH_2PO_4H_2O$, 12 mM $NaHCO_3$) που περιείχε 0,1% BSA και επωάστηκε με 10 μM CMH_2DCFDA για 30 λεπτά στους 37^oC, στο σκοτάδι.

Η μέση ένταση φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity, MFI) και το ποσοστό των θετικών σε ROS κυττάρων προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής σε

κυτταρόμετρο FACSCanto II (Έκθεση (Ex)/ Εκπομπή (Em0: ~492–495/517–527 nm). Η ανάλυση δεδομένων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD FACSDiva™. Λήφθηκαν κατ' ελάχιστον 30.000 γεγονότα για τα RBCs και 100.000 γεγονότα για τα PLTs, σε κάθε δείγμα.

Β2.7. Μέτρηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ελεύθερου ασβεστίου

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου (iCa^{2+}) ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας το φθορίζοντα ανιχνευτή Fluo-4,AM, ο οποίος έχει την ικανότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Οι επισημασμένοι δείκτες ασβεστίου είναι μόρια που εμφανίζουν αύξηση του φθορισμού κατά τη δέσμευση σε Ca^{2+}.

Τα RBCs αραιώθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 145 mmol/L NaCl, 7,5 mmol/L KCl, 10 mmol/L Hepes/NaOH, 1,8 mmol/L $CaCl_2$, 10 mmol/L γλυκόζη και 10 mmol/L πυροσταφυλικό νάτριο (pH 7,4) και επωάστηκαν με 1 μM Fluo-4,AM για 50 λεπτά στους 37°C, στο σκοτάδι.

Για τον προσδιορισμό των iCa^{2+} στα PLTs, το PRP αραιώθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes Tyrode πριν από την επώαση με 1 μM Fluo-4,AM για 30 λεπτά στους 37°C, στο σκοτάδι.

Το MFI και το ποσοστό των θετικών σε ασβέστιο κυττάρων προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής σε κυτταρόμετρο FACSCanto II (Ex/Em: 494/506 nm). Η ανάλυση δεδομένων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD FACSDiva™. Λήφθηκαν κατ' ελάχιστον 30.000 γεγονότα για τα RBCs και 100.000 γεγονότα για τα PLTs, σε κάθε δείγμα.

Β2.8. Μέτρηση P-σελεκτίνης και Φωσφατιδυλοσερίνης

Η ταυτοποίηση των RBCs πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα ειδικό FITC (ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη)-σημασμένο αντίσωμα έναντι του μορίου CD235 (γλυκοφορίνη Α), καθώς η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι χαρακτηριστική ερυθροκυτταρική πρωτεΐνη (ερυθροκυτταρικός δείκτης).

Ταυτόχρονα, η εξωτερίκευση PS στην επιφάνεια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης ανιχνεύθηκε με χρήση του ειδικού κιτ PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I. Η αννεξίνη V είναι ένας ευαίσθητος ανιχνευτής που συνδέεται με αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες φωσφολιπιδίων με υψηλότερη συγγένεια για την PS, από τα περισσότερα άλλα φωσφολιπίδια. Και οι δύο παραπάνω δοκιμασίες ταυτοποίησης αναλύθηκαν μέσω πολυχρωματικής κυτταρομετρίας ροής, όπως έχει περιγραφεί (234). Αναλυτικότερα, τα RBCs επωάστηκαν με το FITC-σημασμένο αντι-CD235 αντίσωμα και με αννεξίνη V σημασμένη με φυκοερυθρίνη (Phycoerythrin, PE) σε ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα ασβεστίου (Hepes/NaOH 0,01 M, NaCl 140 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM), με σκοπό τη δέσμευση των θετικών στην PS RBCs. Τα δείγματα παρέμειναν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και η αντίδραση διακόπηκε με προσθήκη περίσσειας διαλύματος που περιείχε ασβεστίο (Hepes/NaOH 0,01 M, NaCl 140 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM). Το εναιώρημα των RBCs διασταυρώθηκε με τη δέσμη Laser στο κυτταρόμετρο και οι δύο φθορίζουσες ουσίες μετρήθηκαν με πολυχρωματική ανάλυση (FITC: εκπομπή στα 520nm, PE: εκπομπή στα 580nm). Μέσω του προγράμματος Cell Quest Software (BD Biosciences) υπολογίστηκε το ποσοστό των θετικών στην PS ερυθροκυττάρων.

Για την ταυτοποίηση της ενεργοποίησης των PLTs μετρήθηκε η έκφραση της P-σελεκτίνης (CD62P) και της PS. Το PRP αραιώθηκε σε ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα ασβεστίου (Hepes/NaOH 0,01 M, NaCl 140 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM) και επωάστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι με συζευγμένο με αλλοφυκοκυανίνη (Allophycocyanin, APC) αντι-CD62P αντίσωμα και με αννεξίνη V σημασμένη με PE μαζί με το δείκτη PLTs PE Cy5-CD41a. Οι αντιδράσεις τερματίστηκαν με προσθήκη περίσσειας διαλύματος ασβεστίου (Hepes/NaOH 0,01 M, NaCl 140 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM) και οι δύο φθορίζουσες ουσίες μετρήθηκαν με πολυχρωματική ανάλυση (APC: εκπομπή στα 660nm, PE: εκπομπή στα 580nm). Μέσω του προγράμματος CellQuest Software υπολογίστηκε το ποσοστό των PS^+CD62P^+ PLTs.

Β2.9. Δοκιμασίες Λειτουργικότητας Αιμοπεταλίων

Η δοκιμασία λειτουργικότητας αιμοπεταλίων (Platelet Function Assay, PFA) μελετάται *in vitro* μετά την προσθήκη των αγωνιστών ADP και επινεφρίνης (Epinephrine, EPI), παρουσία κολλαγόνου (Collagen, Col). Αυτοί οι αγωνιστές μαζί με την υψηλή τάση διάτμησης, επάγουν την προσκόλληση των PLTs, την ενεργοποίηση και τη συσσώρευσή τους, οδηγώντας σε ταχεία απόφραξη του ανοίγματος και διακοπή της ροής του αίματος που ονομάζεται χρόνος σύγκλισης (CT) (235). Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις παραπάνω δοκιμασίες αξιολογούν την πρωτογενή αιμόσταση του ασθενή.

Οι λειτουργίες προσκόλλησης και συσσώρευσης των PLTs αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας τις κασέτες Dade PFA Collagen/EPI και Dade PFA Collagen/ADP, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, στον αναλυτή PFA-100. Ο PFA-100 (Platelet Function Assay ή Platelet Function Analyser) είναι ένας αναλυτής λειτουργίας των PLTs που αναρροφά το δείγμα αίματος *in vitro* σε αναλώσιμες κασέτες δοκιμής, επενδυμένες με μια βιολογικά ενεργή μεμβράνη που φέρει ένα μικροσκοπικό άνοιγμα. Η μεμβράνη είναι επικαλυμμένη με κολλαγόνο και ADP ή κολλαγόνο και EPI, επάγοντας τη συσσώρευση PLTs που κλείνει το άνοιγμα (236).

Το αποτέλεσμα της δοκιμής PFA εξαρτάται από τη λειτουργία των PLTs, τα επίπεδα του vWF στο πλάσμα, τον αριθμό των PLTs και του αιματοκρίτη. Η δοκιμή PFA πραγματοποιείται αρχικά με τη μεμβράνη κολλαγόνου/επινεφρίνης. Ένας κανονικός χρόνος Col/EPI (<142 δευτερόλεπτα) αποκλείει την παρουσία σημαντικής διαταραχής στη λειτουργία των PLTs. Εάν ο χρόνος Col/EPI παραταθεί (>142 δευτερόλεπτα), η δοκιμή Col/ADP εκτελείται αυτόματα. Εάν το αποτέλεσμα Col/ADP είναι φυσιολογικό (<102 δευτερόλεπτα), η επαγόμενη από την ασπιρίνη δυσλειτουργία των PLTs είναι πολύ πιθανή. Η παράταση και των δύο αποτελεσμάτων (Col/EPI>156 δευτερόλεπτα, Col/ADP >119 δευτερόλεπτα) μπορεί να υποδεικνύει σοβαρή βλάβη της αιμόστασης.

Β2.10. Έλεγχος διαλογής της αιμόστασης

Ο χρόνος προθρομβίνης προς το διεθνές κανονικοποιημένο πηλίκο (PT/INR) μετρήθηκε με χρήση του αντιδραστηρίου Thromborel S. Ο χρόνος προθρομβίνης που μετράται με το αντιδραστήριο Thromborel S είναι μία ταχεία ευαίσθητη εξέταση διαλογής για διαταραχές του εξωγενούς μονοπατιού της πήξης (Παράγοντες II, V, VII και X). Η διαδικασία της πήξης αρχίζει μέσω της επώασης του πλάσματος με τη βέλτιστη ποσότητα θρομβοπλαστίνης και ασβεστίου. Στη συνέχεια, μετράται ο χρόνος σχηματισμού θρόμβου ινώδους.

Το aPTT μετρήθηκε με το αντιδραστήριο Pathromtin SL. Το αντιδραστήριο Pathromtin SL επιτρέπει την ταχεία ανίχνευση διαταραχών του ενδογενούς συστήματος πήξης και ανιχνεύει με ευαισθησία τους παράγοντες VIII και IX, καθώς και τους παράγοντες επαφής. Η επώαση πλάσματος με τη βέλτιστη ποσότητα φωσφολιπιδίων και έναν επιφανειακό ενεργοποιητή οδηγεί στην ενεργοποίηση του ενδογενούς μονοπατιού της πήξης. Η προσθήκη ιόντων ασβεστίου εκκινεί τη διαδικασία πήξης. Στη συνέχεια, μετράται ο χρόνος σχηματισμού θρόμβου ινώδους.

Β2.11. Ανάλυση παραγόντων πήξης

Η θολομετρική ανάλυση της δραστικότητας του παράγοντα vWF (δοκιμασία συμπαράγοντα ριστοσετίνης, RiCof) πραγματοποιήθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο κιτ Innovance VWF Ac. Η δοκιμασία που χρησιμοποιεί το Innovance VWF Ac εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της δραστικότητας του vWF. Η δοκιμασία μιμείται τον τρόπο με τον οποίο ο vWF δεσμεύεται στη b2-GPI, την κύρια πρωτεΐνη-υποδοχέα του vWF στα PLTs (237). Το αντιγόνο του vWF μετρήθηκε ανοσοθολερομετρικά χρησιμοποιώντας το κιτ STA-Liatest VWF:Ag, σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή στον αναλυτή αιμόστασης STAR DIAGNOSTICA STAGO.

Το Berichrome Factor XIII χρησιμοποιήθηκε για το χρωμογόνο προσδιορισμό της δραστικότητας του παράγοντα XIII. Η δοκιμασία στηρίζεται στη μέτρηση της αμμωνίας που απελευθερώνεται από ένα συνθετικό υπόστρωμα λόγω της δράσης του παράγοντα XIII και χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της δραστικότητας του παράγοντα αυτού. Συνοπτικά, ο παράγοντας XIII ενεργοποιείται από τη θρομβίνη που

υπάρχει στο αντιδραστήριο και αντιδρά με το συνθετικό υπόστρωμα προς σχηματισμό αμμωνίας. Η αμμωνία που απελευθερώνεται αντιδράει με το δινουκλεοτίδιο της αδενίνης νικοτιναμιδίου (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD) προς παραγωγή του ανηγμένου NAD (reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NADH). Η διαφορά στην απορρόφηση στα 340 nm χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του παράγοντα XIII (238).

Το Berichrome PAI χρησιμοποιήθηκε για το χρωμογόνο προσδιορισμό της δραστικότητας του PAI, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του ινωδογόνου πραγματοποιήθηκε με το κιτ Multifibren U και τα προϊόντα αποικοδόμησης του ινώδους (Δ-Διμερή) με το κιτ Innovance D-Dimer, σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Το Multifibren™ U Reagent είναι ένα αντιδραστήριο που περιέχει βόεια θρομβίνη και χρησιμοποιείται στον τροποποιημένο κατά Clauss προσδιορισμό του ινωδογόνου (239). Το πλάσμα πήζει από περίσσεια θρομβίνης. Ο χρόνος πήξης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την περιεκτικότητα του δείγματος σε ινωδογόνο. Η δοκιμασία προσδιορισμού των Δ-Διμερών με το αντιδραστήριο Innovance D-Dimer είναι μια ενισχυμένη με σωματίδια ανοσοθολοσιμετρική δοκιμασία ποσοτικού προσδιορισμού των Δ-Διμερών (240).

Όλες οι προαναφερθείσες παράμετροι μετρήθηκαν στο σύστημα αναλυτή πήξης αίματος BCS XP.

Όλοι οι παράγοντες μετρήθηκαν με πηξιολογική μέθοδο. Τα κιτ STA-Deficient VIII, STA-Deficient IX και STA-Immunodef XI χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της δραστικότητας των παραγόντων VIII, IX και XI, αντίστοιχα, μαζί με το κιτ STA-PTT A, ενώ τα κιτ STA Immunodef XII και C.K. Prest χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της δραστικότητας του παράγοντα XII. Οι δραστικότητες των παραγόντων II, V, VII και X μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας τα κιτ STA-Deficient II, STA-Deficient V, STA-Deficient VII και STA-Deficient X, αντίστοιχα, με το αντιδραστήριο NeoPTimal. Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου 0,025 mol/L χρησιμοποιήθηκε επίσης για όλες τις μετρήσεις δραστικότητας.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της δραστικότητας του πλασμινογόνου και της πρωτεΐνης C πραγματοποιήθηκε με μέθοδο με χρωμογόνο υπόστρωμα χρησιμοποιώντας το κιτ αντιδραστηρίων πλασμινογόνου και πρωτεΐνης C, STA-

Stachrom. Όλες οι παραπάνω μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στον αναλυτή αιμόστασης STAR DIAGNOSTICA STAGO.

Ο αντιγονικός προσδιορισμός της ελεύθερης πρωτεΐνης S πραγματοποιήθηκε ανοσοθολερομετρικά με το κιτ STA-Liatest Free Protein S. Παρουσία του αντιγόνου της ελεύθερης S πρωτεΐνης, τα επικαλυμμένα με αντίσωμα σωματίδια του αντιδραστηρίου συγκολλούνται και σχηματίζονται συσσωματώματα διαμέτρου μεγαλύτερης από το μήκος κύματος του φωτός·κατά συνέπεια, το φως απορροφάται ανάλογα με το επίπεδο αντιγόνου που υπάρχει στο δείγμα. Δύο διακριτά μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού, και τα δύο ειδικά για την ελεύθερη πρωτεΐνη S, χρησιμοποιούνται για την αύξηση του φωτεινού σήματος (241) σε αναλυτή αιμόστασης STAR DIAGNOSTICA STAGO. Η δραστικότητα της πρωτεΐνης S προσδιορίστηκε με το κιτ HemosIL Protein S με μέτρηση του χρόνου πήξης, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ένας χρωμογόνος προσδιορισμός για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της ATIII χρησιμοποιώντας το κιτ Liquid Antithrombin, το οποίο βασίζεται σε ένα χρωμογόνο συνθετικό υπόστρωμα και στην απενεργοποίηση του παράγοντα Xa. Για τη μέτρηση των προαναφερόμενων παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε ένας αναλυτής αιμόλυσης ACL TOP.

Β2.12. Προσδιορισμός λειτουργικότητας της ADAMTS-13 και του ανασταλτή

Πραγματοποιήθηκαν ποσοτικές μετρήσεις της δραστικότητας της ADAMTS-13 και του ανασταλτή της με τη χρήση της δοκιμασίας ATS-13, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες λειτουργικού ανασταλτή μετά από ανάμιξη με φυσιολογικό πλάσμα. Συνοπτικά, 50μl βαθμονομητών (Calibrators) αναμιγνύονται με 50μl αραιωμένου πλάσματος και στη συνέχεια προστίθενται 50μl υποστρώματος. Απευθείας και μετά από 30 λεπτά πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της δραστικότητας της ADAMTS-13 (που βασίζεται στην τεχνολογία μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού- Förster resonance energy transfer FRET), καθώς και η παρουσία ανασταλτικών αντισωμάτων, με μέτρηση του

φθορισμού στον αναγνώστη μικροπλακών Fluoroskan™ Microplate Fluorometer (Ex/Em: 340/ 450 nm).

Β2.13. Στατιστική ανάλυση και ανάλυση βιολογικών δικτύων

Όλα τα παραπάνω πειράματα/μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν δύο φορές. Το στατιστικό πακέτο Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS Software), έκδοση 26.0 για Windows (IBM Corp.) χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση. Έγινε έλεγχος κανονικότητας Kolmogorov - Smirnov για όλες οι μεταβλητές. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων στις κανονικά κατανεμημένες μεταβλητές ελέγχθηκαν με τη δοκιμασία t-test ή ANOVA με τη διόρθωση Bonferroni, ενώ για μη κανονικά κατανεμημένες παραμέτρους χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Mann-Whitney U ή ο Kruskal-Wallis. Για τη συνεκτίμηση του αποτελέσματος της αιμοκάθαρσης (παράμετροι πριν και μετά την αιμοκάθαρση), τα «ζευγαρωμένα» δείγματα αξιολογήθηκαν με τη δοκιμή t-test ή τη δοκιμή Wilcoxon, για κανονικά ή μη κανονικά κατανεμημένες παραμέτρους, αντίστοιχα. Η συσχέτιση (r) μεταξύ των μετρήσεων ελέγχθηκε με τους συντελεστές Pearson και Spearman. Η στατιστική σημαντικότητα έγινε αποδεκτή σε $p < 0,05$. Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των μεταβλητών του ορού, του πλάσματος, των PLTs και των RBCs αντιπροσωπεύτηκαν τοπολογικά σε μη κατευθυνόμενα βιολογικά δίκτυα χρησιμοποιώντας την εφαρμογή Cytoscape, έκδοση 3.8.2 (242). Το μήκος κάθε ακμής ήταν αντιστρόφως ανάλογο της τιμής r (δηλαδή, όσο μικρότερο ήταν το μήκος της ακμής, τόσο μεγαλύτερη ήταν η τιμή r μεταξύ των δύο αλληλένδετων κόμβων).

Κεφάλαιο Γ. Αποτελέσματα

Γ1. Ασθενείς - Δημογραφικά Στοιχεία

Το πρωτόκολλο της παρούσας μελέτης εγκρίθηκε ύστερα από την υπ' αριθμό 9η/03-07-2020 απόφαση της Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας της Έρευνας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Στην παρούσα μελέτη, μετά από την έγγραφη συγκατάθεση, συμμετείχαν τριάντα δύο (32) ασθενείς με ESRD και δεκαπέντε (15) μάρτυρες. Από τους ασθενείς είκοσι (20) ήταν άντρες και δώδεκα (12) γυναίκες. Η πρωτοπαθής αιτία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας ήταν γνωστή μόνο σε δεκαοκτώ (18) ασθενείς ενώ δεκατέσσερις (14) ασθενείς είχαν αγνώστου αιτιολογίας νεφρική βλάβη. Συγκεκριμένα, έντεκα (11) ασθενείς παρουσίαζαν καρδιακή ανεπάρκεια σε συνδυασμό με υπερτασική νεφροπάθεια, πέντε (5) ασθενείς είχαν πολυκυστική νόσο των νεφρών και δύο (2) ασθενείς σπειραματονεφρίτιδα. Ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, ανεξέλεγκτη υπέρταση, ενεργές λοιμώξεις, κακοήθειες, αυτοάνοσες συστηματικές ασθένειες, αιματολογικές νόσους αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Επιπλέον, εξαιρέθηκαν από την παρούσα μελέτη οι ασθενείς που ήταν μεταγγισιοεξαρτώμενοι ή ασθενείς που χρειάστηκε να μεταγγιστούν με αίμα ή παράγωγα του αίματος τους τελευταίους τρεις (3) μήνες λόγω της αναιμίας χρόνιας νόσου και της χαμηλής αιμοσφαιρίνης. Όλοι οι ασθενείς με ESRD και τα άτομα ελέγχου (μάρτυρες) ελέγχθηκαν και ήταν αρνητικοί για αντισώματα κατά της b2-GPI, της καρδιολιπίνης καθώς και για LA. Τέλος, για να αποκλειστεί η ανεπάρκεια του παράγοντα V Leiden σε όλους τους συμμετέχοντες πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία αντίστασης ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C.

Στους ασθενείς πραγματοποιήθηκε αιμοληψία μικρής ποσότητας αίματος πριν και μετά την αιμοκάθαρση. Το σωληνάριο που περιείχε το αντιπηκτικό EDTA χρησιμοποιήθηκε για το βασικό αιματολογικό έλεγχο και την κυτταροβιολογική μελέτη των RBCs. Το σωληνάριο που περιείχε το αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο χρησιμοποιήθηκε για την κυτταροβιολογική μελέτη των PLTs και τον πλήρη εργαστηριακό έλεγχο της αιμόστασης και των παραγόντων που συμμετέχουν στην

πήξη του αίματος. Τέλος το σωληνάριο που δεν περιείχε αντιπηκτικό χρησιμοποιήθηκε για τον πλήρη εργαστηριακό έλεγχο των βιοχημικών εξετάσεων.

Οι ασθενείς και οι μάρτυρες είχαν παρόμοια ηλικία και βάρος. Οι ασθενείς είχαν μέση ηλικία τα 59,0±11,4 έτη και οι μάρτυρες τα 50,0±9,8 έτη. Το βάρος των ασθενών πριν την αιμοκάθαρση ήταν 82,2±11,1 κιλά και αμέσως μετά την αιμοκάθαρση ήταν 80,2±11,8 κιλά. Το βάρος των μαρτύρων που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη ήταν 85,6±13,2 κιλά. Οι ασθενείς υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση για μέσο χρονικό διάστημα 41,3±21,4 μηνών, τρεις φορές την εβδομάδα. Οι ασθενείς λάμβαναν 6.833,3±3.588,7 IU ερυθροποιητίνη εβδομαδιαίως λόγω της χρόνιας νεφρικής βλάβης (**Πίνακας 4**).

Όλοι οι ασθενείς λάμβαναν ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους *(4.470±1.243 IU ανά συνεδρία)* για την πρόληψη φλεβικών θρομβώσεων και πνευμονικών εμβολών που μπορεί να επισυμβούν κατά την εξωσωματική κυκλοφορία λόγω αιμοκάθαρσης.

Οι ασθενείς ήταν κλινικά σταθεροί την περίοδο της αιμοληψίας (πριν και μετά την αιμοκάθαρση). Στους ασθενείς δεν χορηγούνταν φάρμακα ή/και συμπληρώματα διατροφής κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Πίνακας 4. Κύρια δημογραφικά στοιχεία των ασθενών και των μαρτύρων. *Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν τριάντα δύο (32) ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και δεκαπέντε (15) μάρτυρες. Συντομογραφίες:* ***kg,*** *κιλά,* ***wk,*** *εβδομάδα.*

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

	Ασθενείς (n=32)		**Μάρτυρες (n=15)**
Χαρακτηριστικά	**Πριν την αιμοκάθαρση**	**Μετά την αιμοκάθαρση**	
Διάρκεια αιμοκάθαρσης (μήνες)	41,3±21,4	-	-
Ηλικία (έτη)	59±11,4	-	50,0±9,8
Δόση ερυθροποιητινης (IU/wk)	6.833,3±3.588,7	-	-
Βάρος (kg)	82,2±11,1	80,2±11,8	85,6±13,2

Γ2. Εργαστηριακός Έλεγχος Ασθενών

Γ2.1. Αιματολογικός Έλεγχος

Ο αιματολογικός έλεγχος ρουτίνας ή γενική εξέταση αίματος πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη μόνο πριν την αιμοκάθαρση. Η γενική αίματος μετά την αιμοκάθαρση δεν έχει καμία διαγνωστική αξία γιατί λόγω της αφαίρεσης νερού συμπυκνώνεται το αίμα και τα αποτελέσματα δεν είναι αξιόπιστα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο ολικός αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων *(ασθενείς=7.600±2.700/μl και μάρτυρες=7.100±1.800/μl)* καθώς και ο λευκοκυτταρικός τύπος ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων τόσο στους ασθενείς όσο και στους μάρτυρες (**Πίνακας 5**). Παρόλο που ο λευκοκυτταρικός τύπος ήταν φυσιολογικός πριν την αιμοκάθαρση, οι ασθενείς παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, σε σχέση με τους μάρτυρες, στην αναλογία των ουδετερόφιλων *(ασθενείς=64,7±8,3% και μάρτυρες=59,0±8,0%, p<0,05),* των λεμφοκυττάρων *(ασθενείς=20,7±6,3% και μάρτυρες=28,7±6,6%, p<0,01)* και των μονοκυττάρων *(ασθενείς=7,4±1,6% και μάρτυρες=6,1±1,6%, p<0,01).* Ως αποτέλεσμα, οι ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση παρουσίασαν μία στατιστικά σημαντική διαφορά στο λόγο ουδετερόφιλων/λεμφοκύτταρα *(ασθενείς=3,5±1,6 και μάρτυρες=1,9±0,6, p<0,01)* σε σχέση με τους μάρτυρες.

Οι ασθενείς με ESRD, είχαν τους αναμενόμενους δείκτες της αναιμίας χρόνιας νόσου. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς είχαν ερυθροπενία *(χαμηλό αριθμό ερυθροκυττάρων, p<0,01),* μειωμένο αιματοκρίτη *(p<0,01)* και μειωμένη τιμή αιμοσφαιρίνης *(p<0,01)* σε σχέση με τους μάρτυρες. Όπως είναι γνωστό, ένας από τους παραπάνω δείκτες να βρεθεί μειωμένος ο ασθενής χαρακτηρίζεται με αναιμία. Επιπλέον, οι ασθενείς της παρούσας μελέτης, σε συμφωνία με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες (243) είχαν ορθρόχρωμη ορθοκυτταρική αναιμία, όπως αποδεικνύεται από τους ερυθροκυτταρικούς δείκτες *(φυσιολογικός μέσος όγκος ερυθροκυττάρων και φυσιολογική μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης και μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης ανά ερυθροκύτταρο)*, ενώ ο δείκτης ερυθροκυτταρικής ανισοκυττάρωσης (Red Cell Distribution Width, RDW) ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων *(15,8±1,1%),* (**Πίνακας 5**).

Ο αριθμός PLTs των ασθενών, πριν την αιμοκάθαρση, ήταν φυσιολογικός *(240.800±82.000/μl)* και δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες *(250.100±40.600/μl).* Αξιοσημείωτο ήταν ότι τα PLTs των ασθενών ήταν μεγαλύτερα σε μέγεθος σε σχέση με τα PLTs των μαρτύρων όπως φάνηκε από το μέσο όγκο αιμοπεταλίων (Mean Platelet Volume, MPV) *(ασθενείς=10,0±0,6fl και μάρτυρες=7,8±1,3fl, p<0,01).*

Πίνακας 5. Αιματολογικά χαρακτηριστικά στους ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση και στην ομάδα των μαρτύρων. *Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση. Με έντονη γραφή διακρίνονται οι παθολογικές τιμές. *p<0,05 σε σχέση με τους μάρτυρες, ** p<0,01 σε σχέση με τους μάρτυρες, # p<0,05 ανάμεσα στους ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση.*

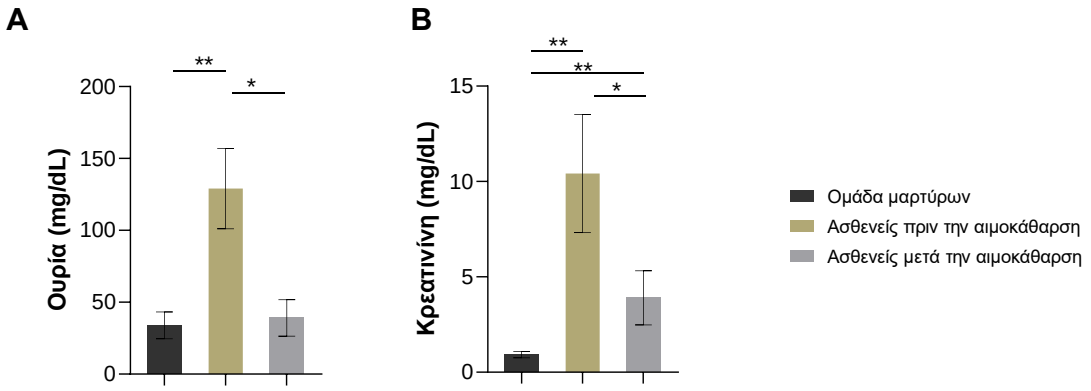
ΓΕΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΣ

	Ασθενείς (n=32)	**Μάρτυρες** (n=15)	**Φυσιολογικές τιμές**
Αριθμός λευκοκυττάρων (x10^3/μL)	7,6±2,7	7,1±1,8	5,2-12,4
Ουδετερόφιλα (%)	64,7±8,3*	59,0±8,0	40,0-74,0
Λεμφοκύτταρα (%)	20,7±6,3**	28,7±6,6	19,0-48,0
Μονοκύτταρα (%)	7,4±1,6**	6,1±1,6	3,4-9,0
Ηωσινόφιλα (%)	4,9±3,9	2,9±1,9	0,0 -7,0
Βασεόφιλα (%)	0,7±0,4	0,8±0,3	0,0-1,5
Ουδετερόφιλα/Λεμφοκύτταρα	**3,5±1,6****	1,9±0,6	1,3-3,5
Αριθμός ερυθροκυττάρων (x10^6/μL)	**3,80±0,59****	4,60±0,46	4,2-6,1
Αιμοσφαιρίνη (gr/dL)	**11,1±1,3****	13,5±1,6	12,0-18,0
Αιματοκρίτης (%)	**34,3±4,3****	40,6±4,4	37,0-52,0
Μέσος όγκος ερυθροκυττάρων (fL)	91,1±9,7	88,7±5,3	80,0-99,0
Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (pg)	29,4±3,4	30,5±2,0	27,0-31,0
Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (gr/dL)	**32,3±0,9***	34,4±0,7	33,0-37,0
Εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων %)	15,8±1,1	13,0±3,0	11,5-14,5
Αριθμός Αιμοπεταλίων (x10^3/μL)	240,8±82,0	250,1±40,6	130,0-400,0
Μέσος όγκος αιμοπεταλίων (fL)	10,0±0,6**	7,8±1,3	7,2-11,1

Γ2.2. Βιοχημικός Έλεγχος

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του βιοχημικού ελέγχου, το σάκχαρο, η χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια, ο ολικός αριθμών πρωτεϊνών, η βιταμίνη Β12, το φυλλικό οξύ, ο σίδηρος ορού αίματος, η ολική χολερυθρίνη ορού αίματος, η αμυλάση, η αλκαλική φωσφατάση, η γ-γλουταμιλοτρανσφεράση, η γαλακτική αφυδρογονάση και η κινάση της κρεατίνης των ασθενών ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων και δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες (**Πίνακας 6**). Σε αντίθεση, το ουρικό οξύ των ασθενών πριν την αιμοκάθαρση, παρόλο που ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων, παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τους μάρτυρες *(ασθενείς=6,1±1,0mg/dL και μάρτυρες=4,4±1,5mg/dL, p<0,01).*

Οι ασθενείς είχαν αυξημένη τιμή ουρίας (*129,3,±27,9mg/dL, p<0,01)* και κρεατινίνης *(10,42,±3,10mg/dL, p<0,01)* πριν την αιμοκάθαρση λόγω της ανεπάρκειας των νεφρών να αποβάλλουν αυτές τις τοξίνες. Η αιμοκάθαρση φάνηκε να έχει ευεργετική επίδραση στην ουρία, επειδή η τιμή της μετά την αιμοκάθαρση ήταν εντός φυσιολογικών ορίων, αλλά δεν φάνηκε να επιδρά στον ίδιο βαθμό στην κρεατινίνη η οποία μειώνεται με την αιμοκάθαρση αλλά παραμένει σε παθολογικά επίπεδα (p<0,01) (**Εικόνα 12**).



Εικόνα 12. Τα επίπεδα ουρίας και κρεατινίνης στους ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση και στην ομάδα μαρτύρων. *Τα επίπεδα της ουρίας και της κρεατινίνης παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± την τυπική απόκλιση. Α) Η μέση τιμή της ουρίας στην ομάδα μαρτύρων ήταν 33,9 ± 9,4mg/dL ενώ στους ασθενείς πριν και μετά τη θεραπεία η μέση τιμή ήταν 129,3 ± 27,9mg/dL και 39,1 ± 12,7mg/dL, αντίστοιχα. Β) Η μέση τιμή της κρεατινίνης*

*στην ομάδα μαρτύρων ήταν 0,92 ± 0,1mg/dL ενώ στους ασθενείς πριν και μετά τη θεραπεία η μέση τιμή ήταν 10,42 ± 3,10mg/dL και 3,90 ± 1,42mg/dL, αντίστοιχα. *p<0,05, ** p<0,01.*

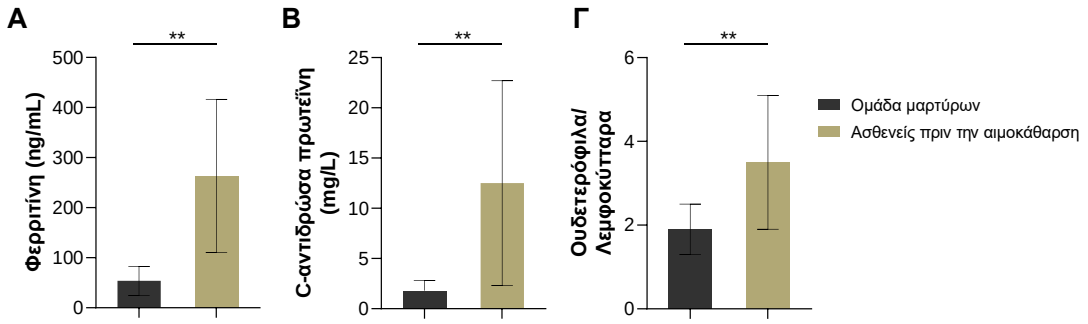
Επίσης, στους ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση, βρέθηκε συσσώρευση και άλλων ουραιμικών τοξινών, όπως η παραθορμόνη (PTH) και η β2-μικροσφαιρίνη. Η PTH παρουσίασε μέση τιμή 388,3±216,2pg/mL, και ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλή (p<0,01) σε σχέση με τους μάρτυρες *(49,7±15,5pg/mL).* Τέλος, σε συμφωνία με την PTH, η β2-μικροσφαιρίνη ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλή σε σχέση με τους μάρτυρες *(ασθενείς=33,3±11,4mg/L και μάρτυρες=1,4±0,5mg/L, p<0,01),* (**Πίνακας 6**).

Πίνακας 6. Βιοχημικοί βιοδείκτες (Α) των ασθενών πριν την αιμοκάθαρση και (Β) της ομάδας των μαρτύρων. *Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση. Με έντονη γραφή διακρίνονται οι παθολογικές τιμές. *p<0,05 σε σχέση με τους μάρτυρες, ** p<0.01 σε σχέση με τους μάρτυρες.*

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

	Ασθενείς (n=32)	**Μάρτυρες** (n=15)	**Φυσιολογικές τιμές**
Σάκχαρο αίματος (mg/dL)	86.8±22.2	89.5±12.1	70-105
Ουρία (mg/dL)	**129.3±27.9****	33.9±9.4	18.0-55.0
Κρεατινίνη (mg/dL)	**10,42±3,10****	0,92±0,16	0,72-1,25
Ουρικό οξύ (mg/dL)	6,1±1,0**	4,4±1,5	3,5-7,2
Χοληστερόλη (mg/dL)	170±42	178±42	0,0-200,0
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	126,7±52,8	115,2±61,1	0,0-150,0
Παραθορμόνη (pg/mL)	**388,3±216,2****	49,7±15,5	15,0-68,0
Ασβέστιο (mg/dL)	8,5±0,7**	9,5±0,2	8,4-10,2
Φώσφορος (mg/dL)	4,5±1,3**	3,1±0,5	2,4-4,7
Κάλιο (mmol/L)	4,95±0,61**	4,47±0,39	3,5-5,1
Νάτριο (mmol/L)	136,6±2,3**	139,3±2,3	136,0-145,0
Χλώριο (mmol/L)	102,2±2,9	102,1±2,8	98,0-107,0
Μαγνήσιο (mg/dL)	2,28±0,37*	2,02±0,02	1,60-2,60
Σίδηρος (mg/dL)	69,2±25,0	88,0±39,8	50-150 (γυναίκες), 60-160 (άντρες)
Φερριτίνη (ng/mL)	**263,3±153,3****	53,8±29,1	14,0-233,0 (γυναίκες), 16,4-293,3 (άντρες)
Ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα (mg/dL)	251,6±53,3**	342,0±50,7	225,0-480,0
B12 (pg/mL)	602,6±265,5	414,3±179,5	179,0-1.162,0
Φυλλικό οξύ (ng/mL)	14,60±12,50	5,30±2,60	2,5-17,0
Ολικές πρωτεΐνες (mg/dL)	6,90±0,60	6,80±0,60	6,40-8,30
Λευκωματίνη (gr/dL)	4,05±0,50**	4,47±0,33	3,50-5,00
β2 μικροσφαιρίνη (mg/L)	**33,3±11,4****	1,4±0,5	0,7-1,8
Οξαλοξική αμινοτρανσφεράση (U/L)	11,4±5,0**	18,1±5,9	5,0-34,0
Πυροσταφυλική αμινοτρανσφεράση (U/L)	12,00±4,06**	22,00±15,00	0,0-55,0
γ-Γλουταμυλοτρανσφεράση (U/L)	25,4±15,3	17,9±8,0	12,0-64,0
Αλκαλική φωσφατάση (U/L)	89,0±42,90	80,1±28,9	40,0-150,0
Ολική χολερυθρίνη (mg/dL)	0,50±0,20	0,40±0,30	0,20-1,20
Έμμεση χολερυθρίνη (mg/dL)	0,23±0,09**	0,15±0,06	0,01-0,90
Άμεση χολερυθρίνη (mg/dL)	**0,31±0,13****	0,13±0,10	0,00-0,30
Γαλακτική αφυδρογονάση (IU/L)	210,6±67,6	203,3±54,3	125,0-220,0
Κινάση της κρεατίνης (IU/L)	84,4±58,0	80,2±63,1	30,0-200,0
Αμυλάση (IU/L)	120,0±39,6	63,9±18,5	20,0-160,0
Βιταμίνη-D (ng/mL)	**11,6±6,5***	20,5±4,9	30,0-100,0
C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (mg/L)	**12,5±10,2****	1,8±1,0	0,0-5,0

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι ασθενείς με ESRD παρουσίασαν το τυπικό φλεγμονώδες πρότυπο χρόνιας φλεγμονής, όπως αποδεικνύεται άμεσα από τα παθολογικά αυξημένα επίπεδα της φερριτίνης (**Εικόνα 13Α**) και της CRP (**Εικόνα 13Β**), είτε έμμεσα μέσω της διαταραχής του λόγου ουδετερόφιλων/λεμφοκυττάρων (**Εικόνα 13Γ**).



Εικόνα 13. Οι ασθενείς παρουσίασαν το τυπικό φλεγμονώδες πρότυπο της χρόνιας φλεγμονής, όπως αποδεικνύεται άμεσα από τα παθολογικά αυξημένα επίπεδα φερριτίνης και C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, είτε έμμεσα μέσω της διαταραχής του λόγου ουδετερόφιλων/λεμφοκυττάρων. *Τα επίπεδα της φερριτίνης, της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και ο λόγος ουδετερόφιλων/λεμφοκυττάρων παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± την τυπική απόκλιση. Α) Η μέση τιμή της φερριτίνης στην ομάδα μαρτύρων ήταν 53,8 ± 29,1ng/mL, ενώ στους ασθενείς πριν τη θεραπεία η μέση τιμή ήταν 263,3 ± 153,3ng/mL. Β) Η μέση τιμή της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης στην ομάδα μαρτύρων ήταν 1,8 ± 1,0mg/L, ενώ στους ασθενείς πριν τη θεραπεία η μέση τιμή ήταν 12,5 ± 10,2mg/L. Γ) Η μέση τιμή του λόγου ουδετερόφιλων/ λεμφοκυττάρων στην ομάδα μαρτύρων ήταν 1,9 ± 0,6, ενώ για στους ασθενείς πριν τη θεραπεία η μέση τιμή του λόγου ήταν 3,5 ± 1,6. *p<0,05, ** p<0,01.*

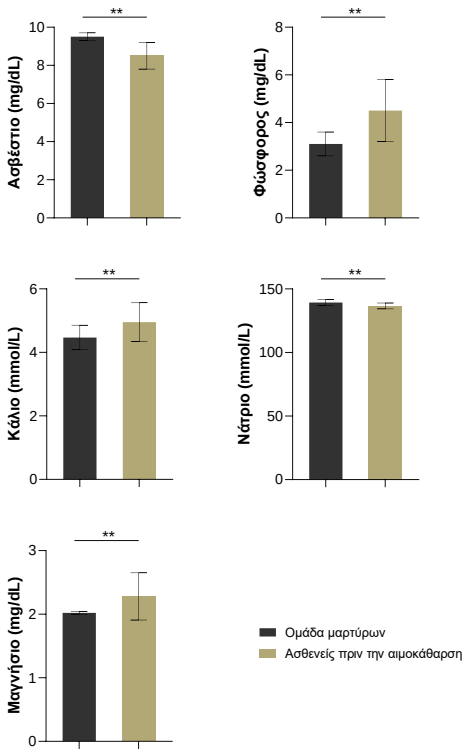
Οι κύριοι ηλεκτρολύτες ορού αίματος στους ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση, όπως το ασβέστιο *(8,5±0,7mg/dL, p<0,01),* ο φώσφορος *(4,5±1,3mg/dL, p<0,01),* το κάλιο *(4,95±0,61mmol/L, p<0,01),* το νάτριο *(136,6±2,3mmol/L, p<0,01)* και το μαγνήσιο *(2,28±0,37mg/dL, p<0,05)* βρέθηκε να διαφέρουν σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων αλλά οι τιμές τους ήταν εντός του φυσιολογικού εύρους (**Εικόνα 14**). Το ασβέστιο και το νάτριο ήταν μειωμένα ενώ ο φώσφορος, το κάλιο και το

μαγνήσιο αυξημένα (**Πίνακας 6**). Σε αντίθεση, το χλώριο δεν φάνηκε να διαφέρει ανάμεσα στην ομάδα των ασθενών και την ομάδα των μαρτύρων (**Πίνακας 6**).

Η μέση τιμή της βιταμίνης-D στους ασθενείς (*11,6±6,5ng/mL*) ήταν μειωμένη σε σχέση με αυτήν των μαρτύρων *(20,5±4,9ng/mL, p<0,05).*

Οι ασθενείς παρουσίασαν αύξηση στην τιμή της άμεσης χολερυθρίνης *(0,31±0,13mg/dL, p<0,01)* ενώ η τιμή της έμμεσης χολερυθρίνης, παρόλο που ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων, παρουσίασε μία στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες *(ασθενείς=0,23±0,09mg/dL και μάρτυρες=0,15±0,06mg/dL, p<0,01)* (**Πίνακας 6**).

Τέλος, η ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα *(251,6±53,3mg/dL),* οι τρανσαμινάσες (α) οξαλοξική *(11,4±5,0U/L)* και (β) πυροσταφυλική αμινοτρασφεράση *(12,00±4,06U/L)* και η λευκωματίνη *(4,05±0,50gr/dL)* είχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές (p<0,01) ανάμεσα στην ομάδα ασθενών και στην ομάδα μαρτύρων, αλλά οι τιμές τους ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων (**Πίνακας 6**).



Εικόνα 14. Βασικοί ηλεκτρολύτες ορού αίματος στους ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων. *Τα επίπεδα των ηλεκτρολυτών (Ασβέστιο, Φώσφορος, Κάλιο, Νάτριο και Μαγνήσιο) στην ομάδα μαρτύρων και στους ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ± την τυπική απόκλιση. Οι κύριοι ηλεκτρολύτες ορού αίματος, στους ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση, όπως το ασβέστιο (8,5 ± 0,7mg/dL, p<0,01), ο φώσφορος (4,5 ± 1,3mg/dL, p<0,01), το κάλιο (4,95 ± 0,61mmol/L, p<0,01), το νάτριο (136,6 ± 2,3mmol/L, p<0,01) και το μαγνήσιο (2,28 ± 0,37mg/dL p<0,05) βρέθηκε να διαφέρουν σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων, αλλά οι τιμές τους ήταν εντός του φυσιολογικού εύρους.*p<0,05, ** p<0,01.*

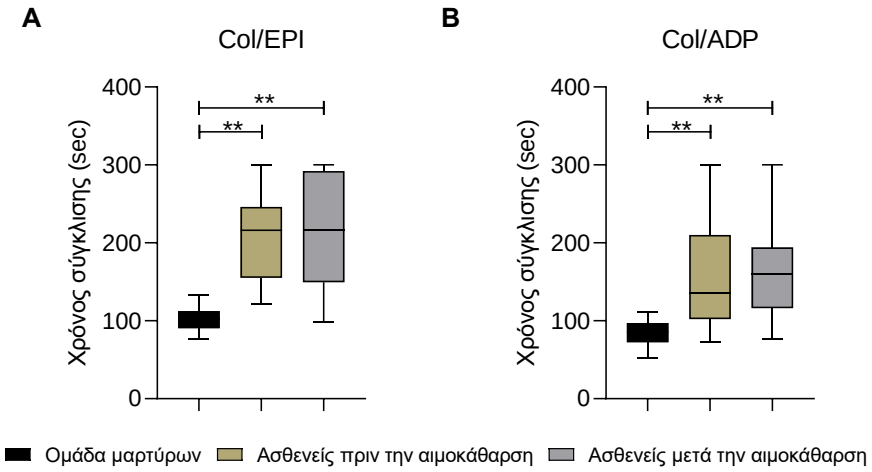
Γ3. Πρωτογενής Αιμόσταση – Αιμοπετάλια

Γ3.1. Λειτουργικότητα Αιμοπεταλίων

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ανωμαλίες στη λειτουργικότητα των PLTs στους ασθενείς με ESRD (244,245). Το PFA μελετάται *in vitro* μετά την προσθήκη των αγωνιστών, ADP και EPI. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις παραπάνω δοκιμασίες αξιολογούν την πρωτογενή αιμόσταση του ασθενή.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η πρωτογενής αιμόσταση πριν και μετά την αιμοκάθαρση μελετώντας τη λειτουργικότητα των PLTs μετά την προσθήκη των

αγωνιστών ADP και EPI, παρουσία Col. Και στις δύο δοκιμασίες (Col/EPI και Col/ADP) οι χρόνοι σύγκλισης βρέθηκαν σημαντικά παρατεταμένοι στους ασθενείς με ESRD (**Εικόνα 15**).



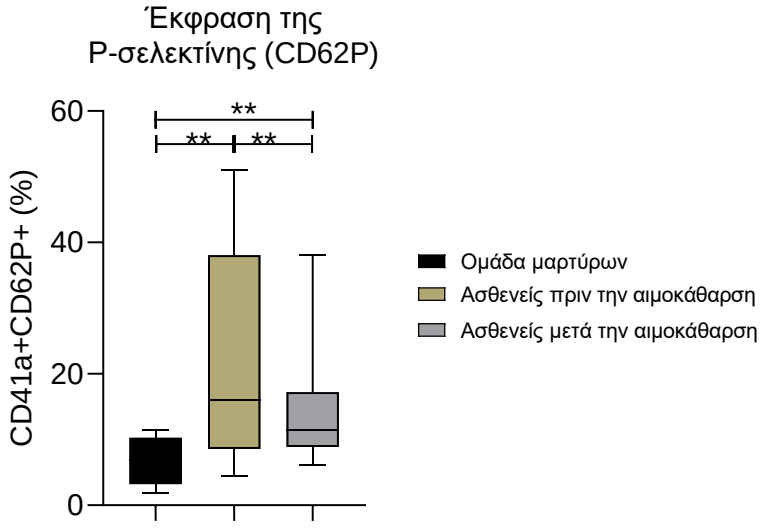
Εικόνα 15. Η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη των ανταγωνιστών διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) και επινεφρίνης (EPI) παρουσία κολλαγόνου (Col) στους ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση. *Και στις δύο δοκιμασίες (Col/EPI και Col/ADP) οι χρόνοι σύγκλισης βρέθηκαν σημαντικά παρατεταμένοι στους ασθενείς με ESRD. Στα θηκογράμματα (boxplots) απεικονίζεται ο χρόνος σύγκλισης που μετρήθηκε στη δοκιμασία λειτουργικότητας αιμοπεταλίων (Platelet Function Assay, PFA) στην ομάδα μαρτύρων και στους ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση, μετά την προσθήκη αγωνιστών. Α) Προσθήκη EPI παρουσία Col. Β) Προσθήκη ADP παρουσία Col. Η παράταση των χρόνων σύγκλισης βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη τόσο πριν (Col/EPI = 206,7 ± 58,8sec και Col/ADP = 169,3 ± 77,3sec, p<0,01) όσο και αμέσως μετά την αιμοκάθαρση (Col/EPI = 215,1 ± 70,6sec και Col/ADP = 154,5 ± 53,2sec, p<0,01) σε σύγκριση τους μάρτυρες της μελέτης (Col/EPI = 102,8 ± 17,2sec και Col/ADP = 88,4 ± 21,6sec, p<0,01) και το φυσιολογικό εύρος των τιμών (Col/EPI < 142sec, και Col/ADP < 102sec). **p < 0,01.*

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα βρέθηκε παράταση στους χρόνους σύγκλισης τόσο πριν (*Col/EPI=206,7±58,8sec και Col/ADP=169,3±77,3sec, p<0,01*) όσο και αμέσως μετά την αιμοκάθαρση (*Col/EPI=215,1±70,6sec και Col/ADP=154,5±53,2sec, p<0,01*) σε σύγκριση τους μάρτυρες της μελέτης (*Col/EPI=102,8±17,2sec και Col/ADP=88,4±21,6sec, p<0,01*) και το φυσιολογικό εύρος των τιμών (*Col/EPI<142sec, και Col/ADP<102sec*).

Τα αποτελέσματα δείχνουν πιθανή δυσλειτουργικότητα στα PLTs των ασθενών με ESRD με πιθανή συνέπεια να επηρεάζεται η αιμόσταση. Επιπρόσθετα, η αιμοκάθαρση δεν ήταν ικανή να διορθώσει την παράταση των χρόνων σύγκλισης όπως φάνηκε από τις μετρήσεις Col/EPI και Col/ADP (**Εικόνα 15**).

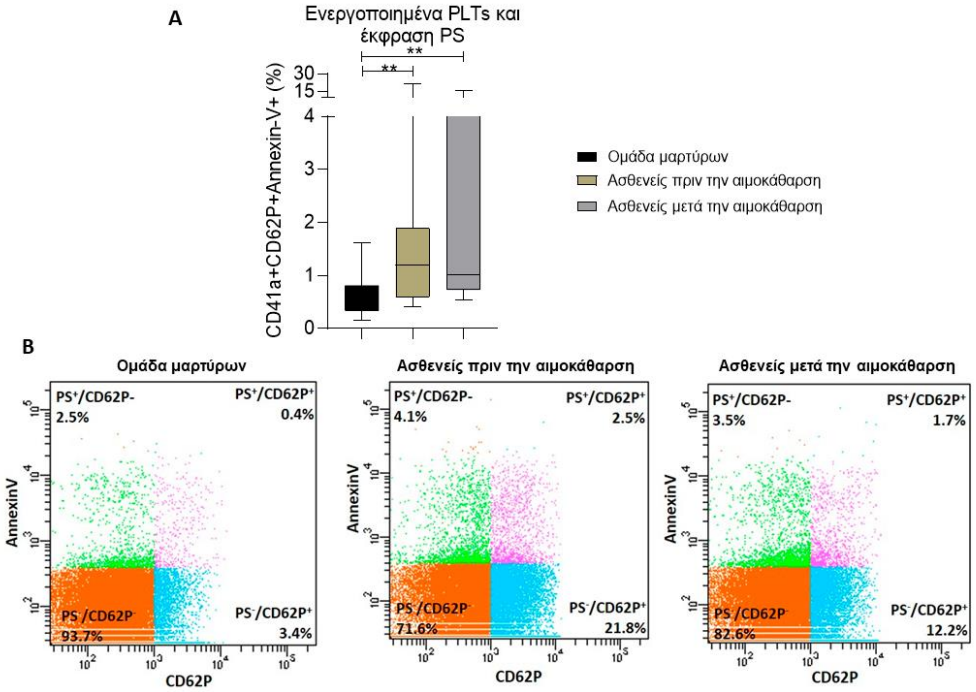
Γ3.2. Ενεργοποίηση Αιμοπεταλίων και Οξειδωτικό στρες

Η έκφραση της P-σελεκτίνης (CD62P), ενός δείκτη ενεργοποίησης των PLTs, ήταν υψηλότερη στα PLTs των ασθενών με ESRD σε σύγκριση με την ομάδα των υγιών μαρτύρων *(ασθενείς=21,6±15,8% και μάρτυρες=6,8±3,5%, p<0,01),* (**Εικόνα 16**). Μετά την αιμοκάθαρση μειώθηκε η έκφραση της P-σελεκτίνης *(15,1±10,3%),* (**Εικόνα 16**), αλλά παρέμεινε στατιστικά σημαντικά υψηλή σε σχέση με τους μάρτυρες (p<0,01).



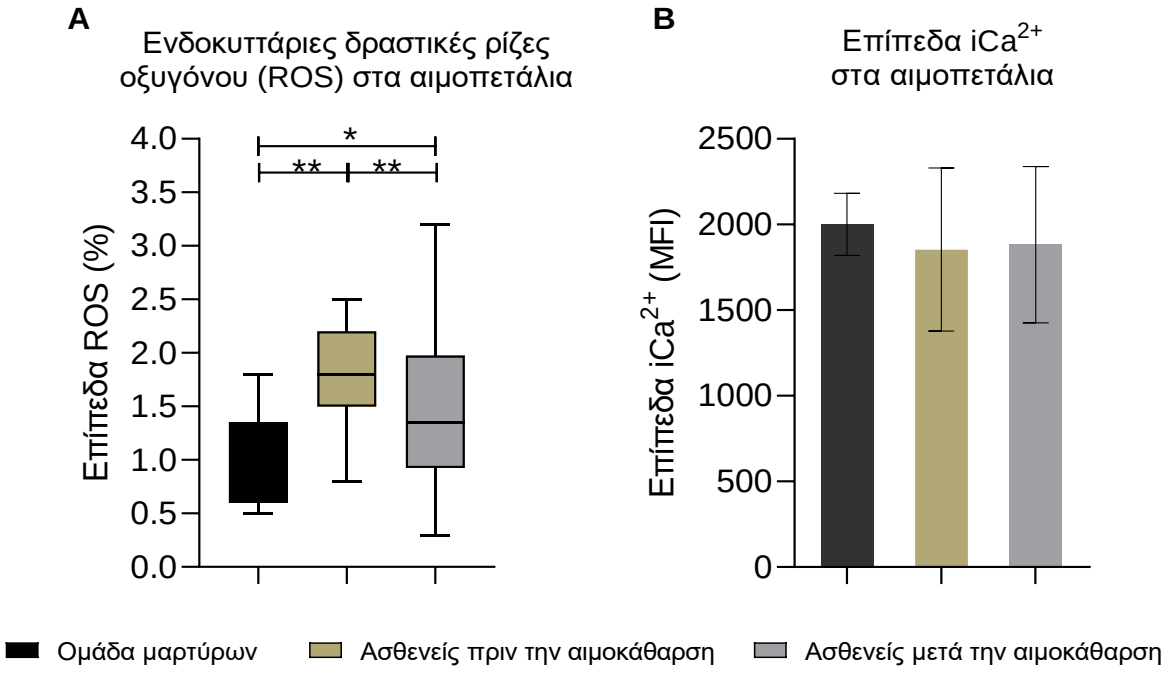
Εικόνα 16. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στην έκφραση P-σελεκτίνης στα αιμοπετάλια των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. *Στα θηκογράμματα (boxplots) απεικονίζεται η έκφραση της P-σελεκτίνης (CD62P) στα αιμοπετάλια των ασθενών με ESRD πριν (21,6 ± 15,8%) και μετά (15,1 ± 10,3%) την αιμοκάθαρση σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων (6,8 ± 3,5%). **p<0,01.*

Επιπλέον, ένα αυξημένο ποσοστό των ενεργοποιημένων PLTs (θετικά στην P-σελεκτίνη) παρουσίασε μία στατιστικά σημαντική αύξηση (p<0,01) στην έκφραση της PS πριν την αιμοκάθαρση (**Εικόνα 17Α**). Τα PLTs που συνεκφράζουν P-σελεκτίνη και PS στους μάρτυρες ήταν 0,4% ενώ πριν την αιμοκάθαρση ήταν 2,5% και μετά την αιμοκάθαρση 1,7%. Σε αντίθεση, τα PLTs που εκφράζουν μόνο PS στους μάρτυρες ήταν 2,5%, πριν την αιμοκάθαρση ήταν 4,1% και μετά την αιμοκάθαρση 3,5% (**Εικόνα 17Β**). Σύμφωνα με τα παραπάνω, η αιμοκάθαρση φάνηκε ότι μείωσε την ενεργοποίηση των PLTs (p<0,01) αλλά δεν είχε καμία επίδραση στην εξωτερίκευση της PS (**Εικόνα 16 και 17**).



Εικόνα 17. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στην έκφραση P-σελεκτίνης και φωσφατιδυλοσερίνης στα αιμοπετάλια των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. *Α) Παρουσιάζεται στα θηκογράμματα η έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (θετικά στην P-σελεκτίνη) στην ομάδα μαρτύρων και στους ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση. Ένα αυξημένο ποσοστό των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (θετικά στην P-σελεκτίνη) παρουσίασε μία στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση της PS πριν την αιμοκάθαρση. Τα αιμοπετάλια που συνεκφράζουν P-σελεκτίνη και PS στους μάρτυρες ήταν 0,4% ενώ πριν την αιμοκάθαρση ήταν 2,5% και μετά την αιμοκάθαρση 1,7%. Τα αιμοπετάλια που εκφράζουν μόνο PS στους μάρτυρες ήταν 2,5%, πριν την αιμοκάθαρση ήταν 4,1% και μετά την αιμοκάθαρση 3,5%. **p<0,01. Β) Αντιπροσωπευτικά στικτογράμματα (dot plots) κυτταρομετρίας ροής από τις τρεις ομάδες που ελέγχθηκαν για την εξωτερίκευση της PS στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.*

Τα αυξημένα επίπεδα ROS στα PLTs ήταν επίσης υψηλά στους ασθενείς με ESRD σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες *(ROS=1,91±0,68% και μάρτυρες ROS=0,91±0,44%, p<0,01).* Η αιμοκάθαρση οδηγεί σε σημαντική μείωση του ποσοστού των θετικών στα ROS PLTs, αν και παραμένουν σε παθολογικά υψηλά επίπεδα *(ROS=1,42±0,76%)* (**Εικόνα 18Α**).



Εικόνα 18. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στην έκφραση ενδοκυττάριων ριζών οξυγόνου (ROS) και στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου (iCa^{+2}) στα αιμοπετάλια των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. *Α) Τα ROS στα αιμοπετάλια ήταν υψηλά στους ασθενείς (1,91 ± 0,68%) με ESRD σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (0,91 ± 0,44%). Η αιμοκάθαρση οδηγεί σε σημαντική μείωση του ποσοστού των θετικών στα ROS αιμοπεταλίων, αν και παραμένουν σε παθολογικά υψηλά επίπεδα μετά την αιμοκάθαρση (1,42 ± 0,76%). Στα θηκογράμματα (boxplots) παρουσιάζονται τα επίπεδα ενδοκυττάριων ROS στα αιμοπετάλια των ασθενών με ESRD πριν και μετά την αιμοκάθαρση σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων. Β) Η μέση ένταση φθορισμού (MFI) στην κυτταρομετρία ροής, δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ενδοκυτταρικά αιμοπεταλιακά επίπεδα ασβεστίου πριν (1.854 ± 476MFI) ή μετά (1.883 ± 456 MFI) την αιμοκάθαρση σε σχέση με τους μάρτυρες (2.001±182 MFI). **p < 0,01.*

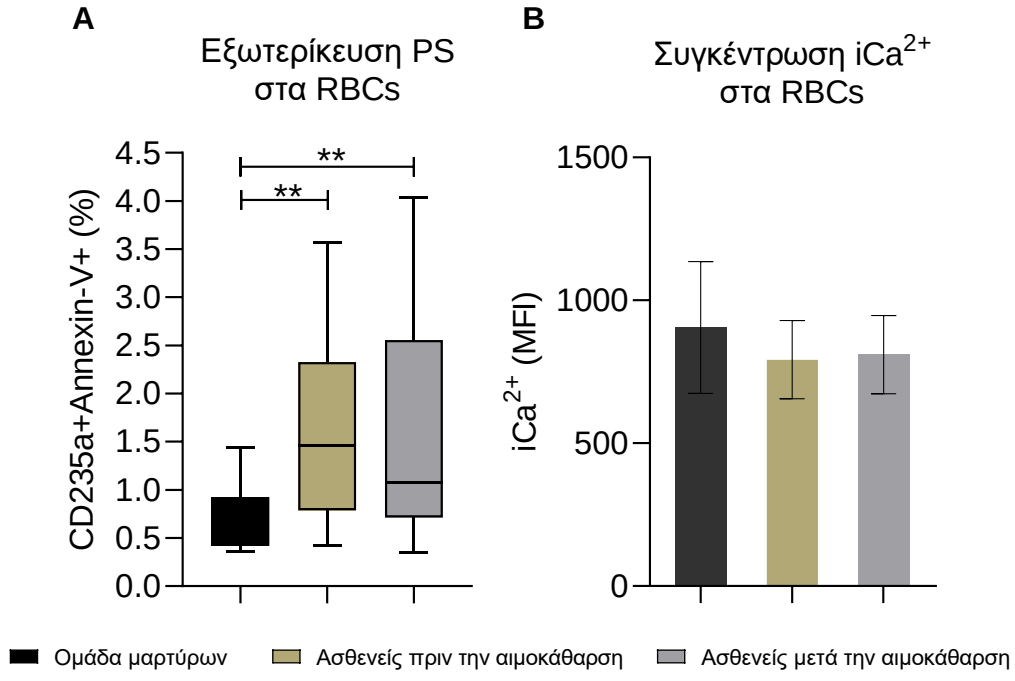
Τέλος, το MFI στην κυτταρομετρία ροής, δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ενδοκυτταρικά αιμοπεταλιακά επίπεδα ασβεστίου πριν

(1.854±476MFI) ή μετά *(1.883±456 MFI)* την αιμοκάθαρση σε σχέση με τους μάρτυρες *(2.001±182 MFI)* (**Εικόνα 18Β**).

Γ4. Οξειδωτικό Στρες και Δείκτες Εκκαθάρισης στα Ερυθροκύτταρα

Εκτός από τα PLTs, είναι γνωστή η συμμετοχή και των RBCs στο μηχανισμό της αιμόστασης (79). Επειδή τα ερυθροκύτταρα συμμετέχουν στην αιμόσταση, στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε εάν αυτά τα κύτταρα αλλοιώνονται στο ουραιμικό περιβάλλον των ασθενών με ESRD.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, βρέθηκε αυξημένο ποσοστό ερυθροκυττάρων που εκφράζουν PS στους ασθενείς σε σύγκριση με τους μάρτυρες *(ασθενείς=1,60±0,93% και μάρτυρες=0,69±0,30%, p<0,01)* τόσο πριν όσο και μετά *(1,60 ± 1,09%, p<0,01)* την αιμοκάθαρση (**Εικόνα 19Α**). Σε συμφωνία με τα PLTs (**Εικόνα 16 και 17**), η αιμοκάθαρση δεν επηρέασε την έκφραση PS στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων. Ως αποτέλεσμα, οι ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ποσοστό έκφρασης της PS.

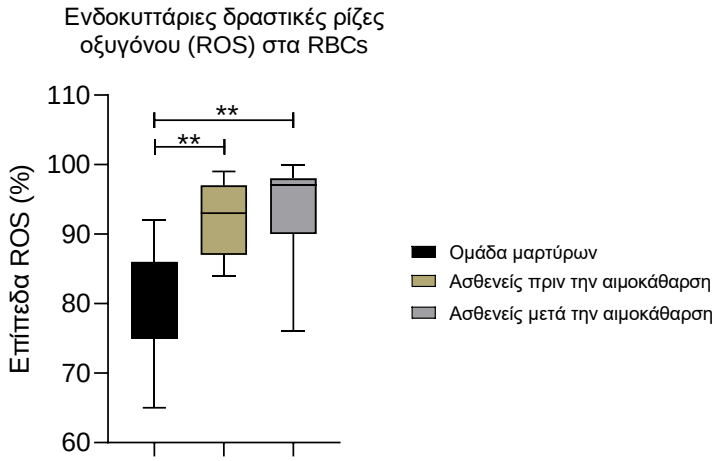


Εικόνα 19. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στην εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης (PS) και στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου (iCa^{+2}) στα ερυθροκύτταρα των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. *Α) Βρέθηκε αυξημένο ποσοστό ερυθροκυττάρων στους ασθενείς (1,60 ± 0,93%) που εκφράζουν PS σε σύγκριση με τους μάρτυρες (0,69 ± 0,30%) τόσο πριν όσο και μετά (1,60 ± 1,09%) την αιμοκάθαρση. Στα θηκογράμματα παρουσιάζεται η εξωτερίκευση της PS στα ερυθροκύτταρα στην ομάδα μαρτύρων και στους ασθενείς πριν και*

*μετά την αιμοκάθαρση. Β) Η συγκέντρωση ενδοκυττάριου ασβεστίου στα ερυθρά αιμοσφαίρια πριν την αιμοκάθαρση δεν παρουσίασε διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες (ασθενείς=792±137MFI και μάρτυρες=905±213MFI). Μετά την αιμοκάθαρση, το ενδοκυττάριο ασβέστιο, στα ερυθρά αιμοσφαίρια, βρέθηκε σε παρόμοια επίπεδα (810±137MFI) σε σχέση με αυτό που ανιχνεύτηκε πριν την αιμοκάθαρση. **p < 0,01.*

Επιπλέον, μεγαλύτερο ποσοστό των ερυθροκυττάρων των ασθενών με ESRD είχαν ROS *(92,3±5,3%)* σε σύγκριση με τα RBCs της ομάδας ελέγχου *(79,5±7,9%)* (**Εικόνα 20**). Σε αντίθεση με τα PLTs των ασθενών με ESRD (**Εικόνα 18**), η συνεδρία αιμοκάθαρσης δεν είχε καμία επίδραση στο ποσοστό των θετικών στα ROS ερυθροκυττάρων (**Εικόνα 20**).

Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου στα RBCs έχει αποδειχτεί στο παρελθόν ότι αυξάνει την εξωτερίκευση PS. Η συγκέντρωση ενδοκυττάριου ασβεστίου στα RBCs πριν την αιμοκάθαρση **(Εικόνα 19Β)** δεν παρουσίασε διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες (*ασθενείς=792±137MFI και μάρτυρες=905±213MFI*). Μετά την αιμοκάθαρση, το ενδοκυττάριο ασβέστιο, στα RBCs, βρέθηκε σε παρόμοια επίπεδα (*810±137MFI*) σε σχέση με αυτό που ανιχνεύτηκε πριν την αιμοκάθαρση (*792±137 MFI*).



Εικόνα 20. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στην έκφραση ενδοκυττάριων ριζών οξυγόνου (ROS) στα ερυθρά αιμοσφαίρια των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. *Τα ερυθροκύτταρα των ασθενών με ESRD είχαν περισσότερα ROS (92,3 ± 5,3%) σε σύγκριση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια της ομάδας ελέγχου (79,5 ± 7,9%). Η αιμοκάθαρση δεν είχε καμία επίδραση στο ποσοστό των θετικών στα ROS ερυθροκυττάρων. Στα θηκογράμματα (boxplots) παρουσιάζονται τα επίπεδα ενδοκυττάριων ROS στα ερυθροκύτταρα των ασθενών με ESRD πριν και μετά την αιμοκάθαρση σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων. **p < 0,01.*

Γ5. Εργαστηριακός Έλεγχος της Αιμόστασης

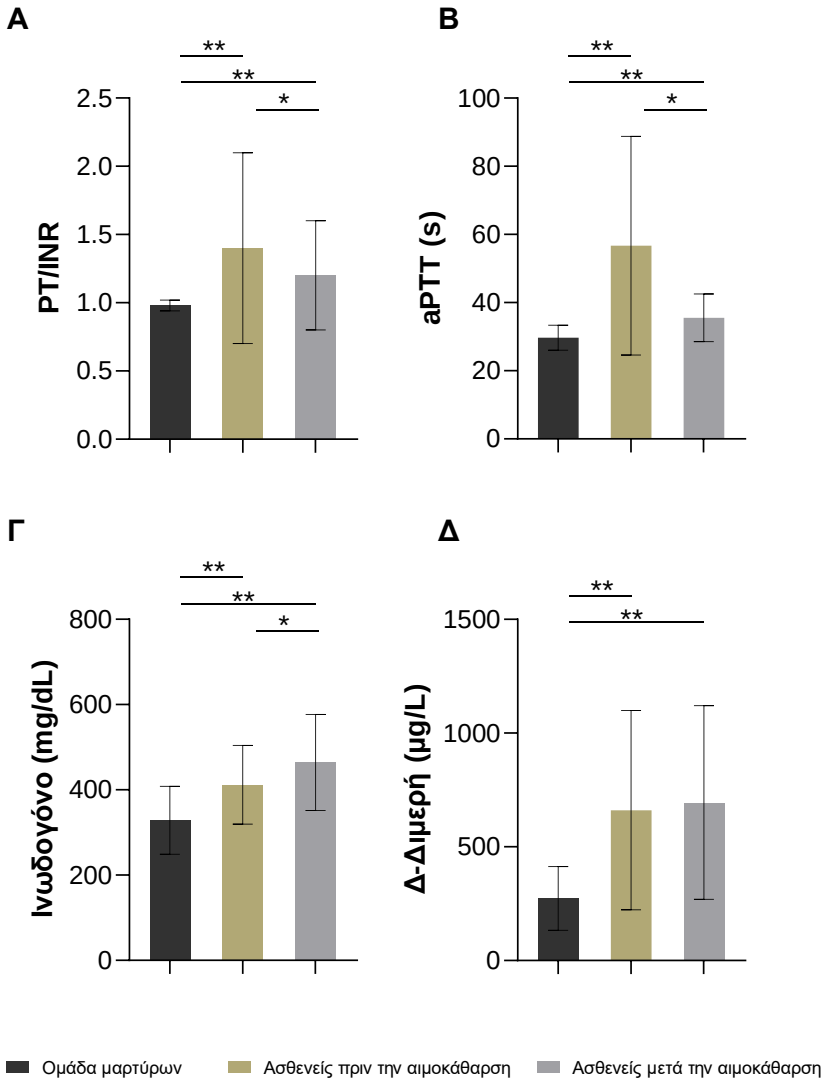
Γ5.1. Δοκιμασίες Προσυμπτωματικού Ελέγχου– Screening test

Οι εργαστηριακές δοκιμασίες προσυμπτωματικού ελέγχου (screening test) της αιμόστασης, σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες (246), είναι ο χρόνος προθρομβίνης (PT), ο χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT), τα Δ-Διμερή ινώδους και το ινωδογόνο. Είναι αποδεκτός ο λόγος PT προς το διεθνές κανονικοποιημένο πηλίκο (INR) ως δείκτης καλής λειτουργίας της εξωγενούς οδού της αιμόστασης (247), ελέγχοντας την ανεπάρκεια στους παράγοντες (F=Factors) FI, FII, FV, FVII, FX της πήξης. Το aPTT ελέγχει την ανεπάρκεια των FI, FII, FV, FVIII, FIX, FX, FXI, και FXII, καθώς και το ενδογενές μονοπάτι του καταρράκτη της πήξης (248).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, 24% των ασθενών πριν την αιμοκάθαρση παρουσίασαν υψηλό λόγο PT/INR *(ασθενείς=1,4±0,7 και μάρτυρες=0,98±0,04, p<0,01).* Σε συμφωνία με τον υψηλό λόγο PT/INR, το 65% των ασθενών πριν την

αιμοκάθαρση ανιχνεύτηκε με παρατεταμένο aPTT (*ασθενείς=56,7±32,1sec και μάρτυρες=29,7±3,7sec, p<0,01).* Η αιμοκάθαρση φάνηκε να διορθώνει τόσο την παράταση του aPTT όσο και το PT/INR, αλλά παρέμειναν παθολογικά σε σχέση με τους μάρτυρες (**Εικόνα 21Α-Β**).

Το ινωδογόνο *(ασθενείς=411,8±92,4mg/dL και μάρτυρες=328,4±79,6mg/dL)* και τα Δ-Διμερή ινώδους *(ασθενείς=661,2±438,6μg/L και μάρτυρες=272,7±140,2μg/L)* ήταν παθολογικά υψηλά στο 75% και 60% των ασθενών, αντίστοιχα (p<0,01). Σε αντίθεση με το aPTT και το λόγο PT/INR, η αιμοκάθαρση δεν είχε είτε καμία επίδραση ούτε στο ινωδογόνο ούτε και στα Δ-Διμερή ινώδους (**Εικόνα 21Γ-Δ**).



Εικόνα 21. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στις δοκιμασίες προσυμπτωματικού ελέγχου (screening test) στην αιμόσταση. *Παρουσιάζονται οι τιμές ως μέσοι όροι ± την τυπική απόκλιση για την ομάδα μαρτύρων, την ομάδα ασθενών πριν την αιμοκάθαρση και την*

*ομάδα ασθενών μετά την αιμοκάθαρση. Το 24% των ασθενών πριν την αιμοκάθαρση παρουσίασαν υψηλό λόγο PT/INR (1,4 ± 0,7) σε σχέση με τους μάρτυρες (0,98 ± 0,04). Σε συμφωνία με τον υψηλό λόγο PT/INR, το 65% των ασθενών πριν την αιμοκάθαρση ανιχνεύτηκε με παρατεταμένο χρόνο ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT) (56,7 ± 32,1sec) σε σχέση με του μάρτυρες (29,7 ± 3,7s). Η αιμοκάθαρση φάνηκε να διορθώνει την παράταση τόσο του aPTT όσο και του PT/INR αλλά παρέμειναν παθολογικά σε σχέση με τους μάρτυρες. Το ινωδογόνο (411,8 ± 92,4 mg/dL) και τα Δ-Διμερή ινώδους (661,2 ± 438,6 μg/L) στους ασθενείς ήταν παθολογικά υψηλά στο 75% και 60% των ασθενών σε σχέση με τους μάρτυρες (ινωδογόνο=328,4±79,6mg/dL και Δ-Διμερή ινώδους=272,7±140,2μg/L). Σε αντίθεση με το aPTT και το λόγο PT/INR, η αιμοκάθαρση δεν είχε καμία επίδραση ούτε στο ινωδογόνο ούτε και στα Δ-Διμερή ινώδους. Α) Ο λόγος χρόνου προθρομβίνης (PT) προς το διεθνές κανονικοποιημένο πηλίκο (INR), PT/INR, Β) ο χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (aPTT), Γ) το ινωδογόνο και Δ) τα Δ-Διμερή. *p<0,05, ** p<0,01.*

Γ5.2.Παράγοντες Πήξης του Αίματος

Η λειτουργικότητα των παραγόντων που συμμετέχουν στο δευτερογενές μονοπάτι της πήξης του αίματος έχει φυσιολογικό εύρος από 60-140%.

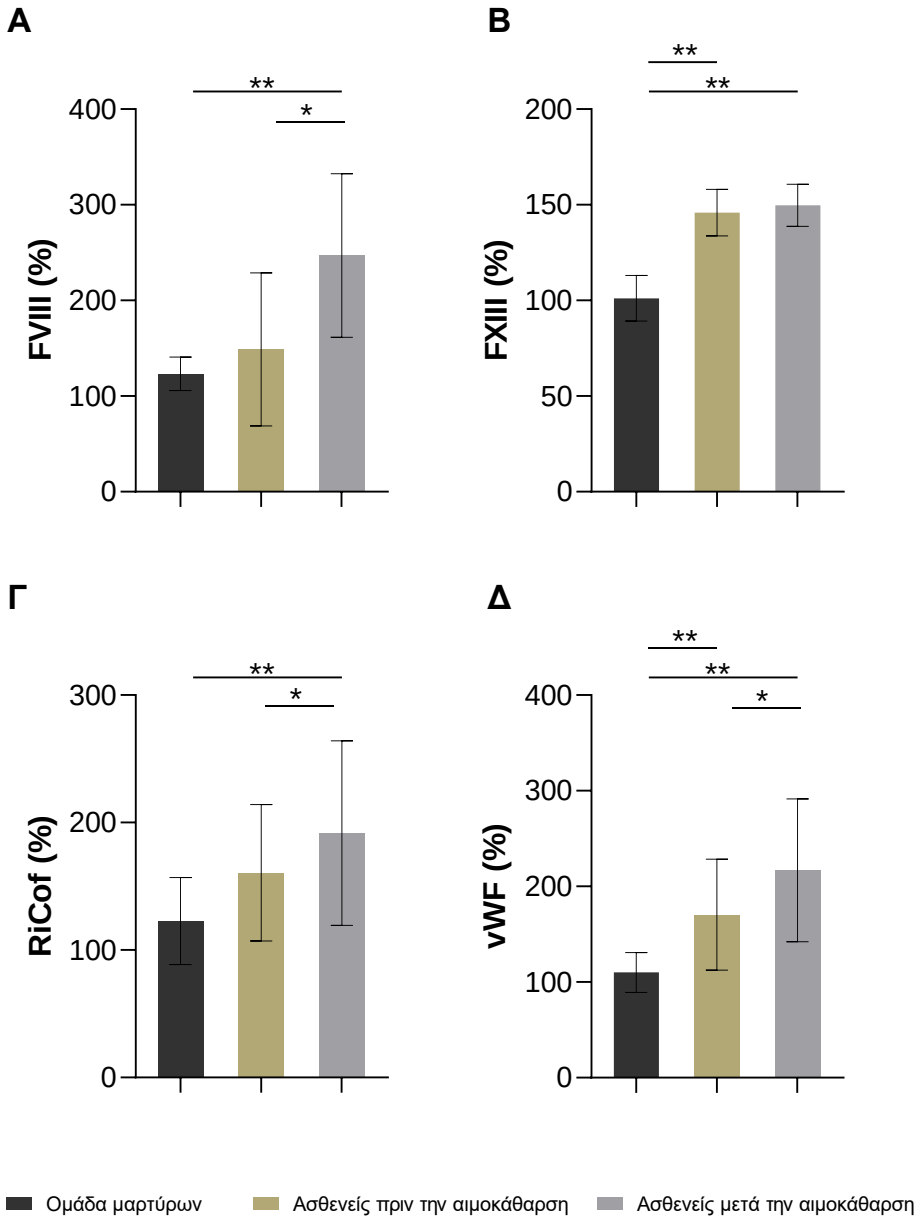
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στους ασθενείς με ESRD πριν από την αιμοκάθαρση δεν βρέθηκαν αυξημένες δραστικότητες στους FVII, FIX, FX και FXI σε σχέση με τους μάρτυρες. Μετά την αιμοκάθαρση ανιχνεύτηκε μία μικρή, αλλά όχι στατιστικά σημαντική, αύξηση της δραστικότητας στους FIX και FXI (**Πίνακας 7**).

Πίνακας 7. Παράγοντες πήξης του αίματος που δε μεταβάλλονται από τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης. *Με έντονη γραφή διακρίνονται οι παθολογικές τιμές των παραγόντων της πήξης, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντικές σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων.*

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΗΞΗΣ ΑΙΜΑΤΟΣ

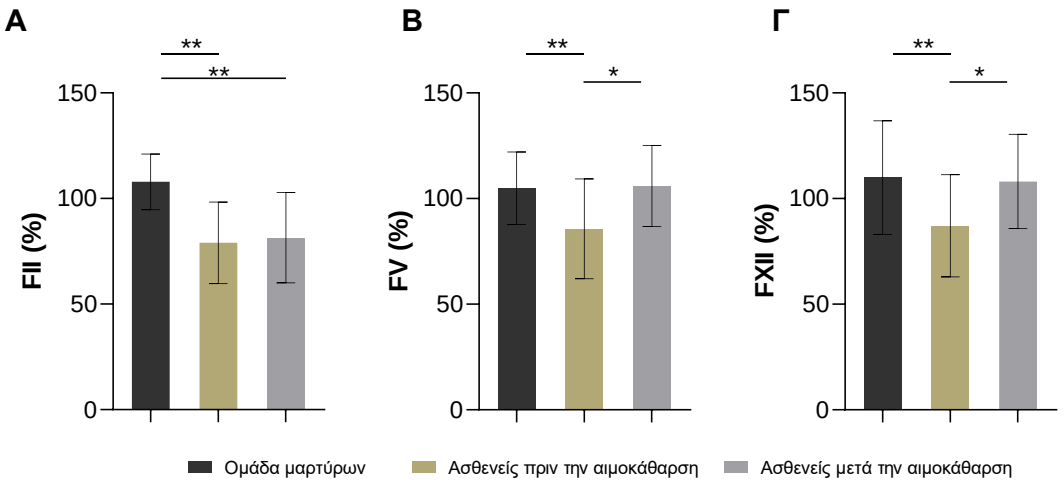
	Ασθενείς (n=32)		**Μάρτυρες** (n=15)	**Φυσιολογικές τιμές**
	Πριν την αιμοκάθαρση	**Μετά την αιμοκάθαρση**		
FVII (%)	105,9 ± 37,0	110,8 ± 39,2	116,0 ± 19,8	60–120
FIX (%)	115,2 ± 43,4	**123,0 ± 39,9**	115,9 ± 17,9	60–120
FX (%)	77,1 ± 27,0	82,0 ± 35,1	89,1 ± 15,8	60–120
FXI (%)	100,3 ± 49,6	**121,3 ± 50,6**	112,6 ± 16,1	60-120

Επιπλέον, οι ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση παρουσίασαν παθολογικά αυξημένες δραστικότητες στους παράγοντες FVIII (*ασθενείς=148,8±79,9% και μάρτυρες=123,3±17,6%*), FXIII (*ασθενείς=145,9±12,1% και μάρτυρες=101,1±11,9%, p<0,01*) και vWF (*ασθενείς=170,4±58,0% και μάρτυρες=110,0±20,8%, p<0,01*) αλλά και στον RiCof, (*ασθενείς=160,6±53,6% και μάρτυρες=122,7±34,1%*). Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης αύξησε σημαντικά τη δραστικότητα των παραγόντων FVIII, RiCof και vWF και οδήγησε τους ασθενείς με ESRD μετά την αιμοκάθαρση να έχουν υψηλότερες τιμές σε σχέση με τους μάρτυρες (παράδειγμα >80% για το FVIII, το Ricof και το vWF), (**Εικόνα 22**).



Εικόνα 22. Παράγοντες πήξης του αίματος που αυξάνει η δραστικότητά τους από τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης. *Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι ± την τυπική απόκλιση για την ομάδα μαρτύρων, την ομάδα ασθενών πριν την αιμοκάθαρση και την ομάδα ασθενών μετά την αιμοκάθαρση. Οι ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση παρουσίασαν παθολογικά αυξημένες δραστικότητες στους παράγοντες FVIII (148,8 ± 79,9% vs μάρτυρες = 123,3 ± 17,6%,), FXIII (145,9 ± 12,1% vs μάρτυρες = 101,1 ± 11,9%) και von Willebrand (170,4 ± 58,0% vs μάρτυρες = 110,0 ± 20,8%,) αλλά και στο συμπαράγοντα ριστοσετίνης αιμοπεταλίων (RiCof) (160,6±53,6% vs μάρτυρες = 122,7 ± 34,1%). Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης αύξησε σημαντικά τη δραστικότητα των παραγόντων FVIII, RiCof και vWF και οδήγησε τους ασθενείς με ESRD μετά την αιμοκάθαρση να έχουν παθολογικές τιμές σε σχέση με τους μάρτυρες. Α) Παράγοντας VIII (FVIII), Β) Παράγοντας XIII (FXIII), Γ) Συμπαράγοντας ριστοσετίνης αιμοπεταλίων (RiCof) και Δ) Παράγοντας von Willebrand (vWF). *p<0,05, ** p<0,01.*

Οι παράγοντες της πήξης FII *(ασθενείς=79,0±19,3% και μάρτυρες=107,9±13,2%, p<0,01),* FV *(ασθενείς=85,7±23,6% και μάρτυρες=104,9±17.2%, p<0,01),* και FXII *(ασθενείς=87,1±24,2% και μάρτυρες=109,9±26,9%, p<0,01)*, εμφάνισαν χαμηλότερη δραστικότητα σε σύγκριση με τις τιμές δραστικότητας των μαρτύρων (**Εικόνα 23**). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση στη δραστικότητα των παραγόντων FV και FXII μετά την αιμοκάθαρση (p<0,05) (**Εικόνα 23**).

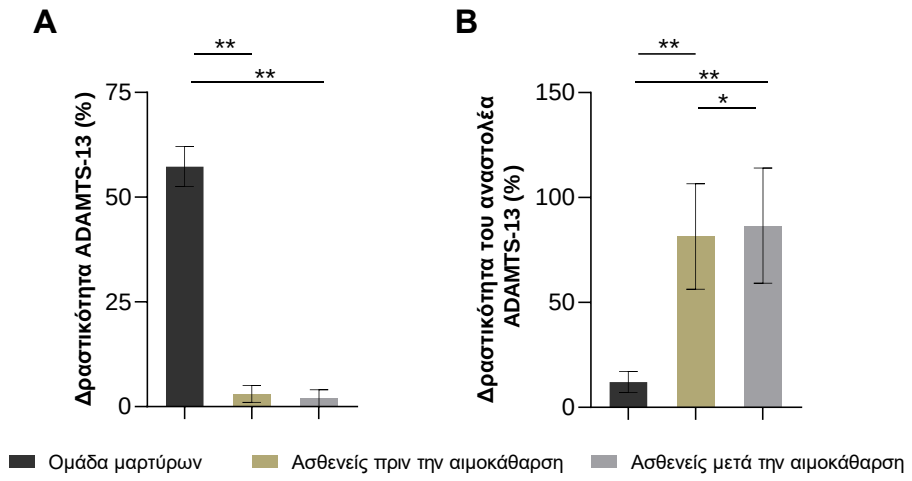


Εικόνα 23. Παράγοντες πήξης του αίματος με χαμηλότερη δραστικότητα στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες. *Οι παράγοντες της πήξης FII (79,0 ± 19,3% vs μάρτυρες =107,9 ± 13,2%), FV (85,7 ± 23,6% vs μάρτυρες = 104,9 ± 17.2 %), και FXII (87,1±24,2% vs μάρτυρες = 109,9 ± 26,9%), εμφάνισαν χαμηλότερη δραστικότητα σε σύγκριση με τις τιμές δραστικότητας των μαρτύρων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση στη δραστικότητα των παραγόντων FII, FV και FXII μετά την αιμοκάθαρση. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι ± την τυπική απόκλιση για την ομάδα μαρτύρων, την ομάδα ασθενών πριν την αιμοκάθαρση και την ομάδα ασθενών μετά την αιμοκάθαρση. Α) Παράγοντας ΙΙ (FII), Β) Παράγοντας V (FV), Γ) Παράγοντας XII (FXII)*p<0,05, ** p<0,01.*

Γ5.3. ADAMTS-13

Η ADAMTS-13 είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο υπεύθυνο για την απομάκρυνση των πολυμερών vWF υψηλού μοριακού βάρους από την κυκλοφορία του αίματος (249).

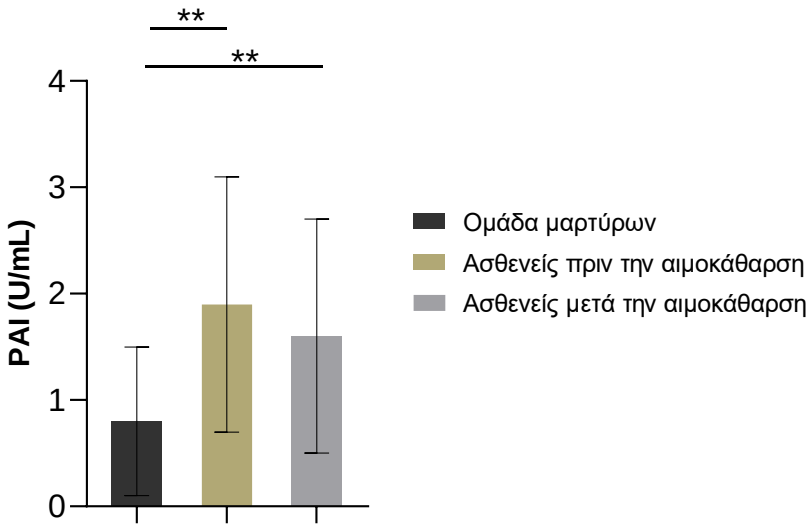
Τα αποτελέσματα έδειξαν χαμηλή δραστικότητα της ADAMTS-13 (*ασθενείς=<5% πριν και μετά την αιμοκάθαρση και μάρτυρες=57,3±4,8%, p<0,01*) και υψηλή δραστικότητα του ανασταλτή της ADAMTS-13 (*ασθενείς=81,4±25,1% πριν και μετά 86,6±11,5% την αιμοκάθαρση και μάρτυρες=12,0±5,0%, p<0,01*) πριν και μετά την αιμοκάθαρση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αιμοκάθαρση πυροδότησε περαιτέρω την αύξηση της δραστικότητας του ανασταλτή της ADAMTS-13 (**Εικόνα 24**).



Εικόνα 24. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στη δραστικότητα της ADAMTS-13. *Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα δραστικότητας της ADAMTS-13 (Α) και του ανασταλτή της (Β) στην ομάδα μαρτύρων και στους ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση. Τα αποτελέσματα έδειξαν χαμηλή δραστικότητα της ADAMTS-13 (<5% πριν και μετά την αιμοκάθαρση vs μάρτυρες =57,3 ± 4,8%) και υψηλή δραστικότητα του ανασταλτή της ADAMTS-13 (81,4 ± 25,1% πριν και μετά 86,6 ± 11,5% την αιμοκάθαρση vs μάρτυρες = 12,0 ± 5,0%) πριν και μετά την αιμοκάθαρση. Η αιμοκάθαρση πυροδότησε περαιτέρω την αύξηση της δραστικότητας του ανασταλτή της ADAMTS-13. *p<0,05, ** p<0,01.*

Γ5.4. Ινωδολυτικό σύστημα και Φυσικοί Ανασταλτές της Αιμόστασης

Η συγκέντρωση του PAI ήταν υψηλότερη τόσο πριν όσο και μετά την αιμοκάθαρση σε σχέση με τους μάρτυρες της παρούσας μελέτης (*ασθενείς=1,9±1,2U/mL πριν και μετά 1,6±1,1U/mL την αιμοκάθαρση σε σχέση με τους μάρτυρες=0,8±1,1U/mL, p<0,01*), (**Πίνακας 5**, **Εικόνα 25**).



Εικόνα 25. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στη συγκέντρωση του αναστολέα του ιστικού πλασμινογόνου (PAI)*. Η συγκέντρωση του αναστολέα PAI ήταν υψηλότερη τόσο πριν όσο και μετά την αιμοκάθαρση σε σχέση με τους μάρτυρες (ασθενείς = 1,9 ± 1,2U/mL πριν και μετά 1,6 ± 1,1U/mL την αιμοκάθαρση σε σχέση με τους μάρτυρες = 0,8 ± 1,1U/mL). Παρουσιάζεται ο μέσος όρος ± την τυπική απόκλιση του αναστολέα PAI στην ομάδα μαρτύρων και στους ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση. ** p<0,01.*

Παρόλο που η συγκέντρωση του πλασμινογόνου και η δραστικότητα των φυσικών ανασταλτών της πήξης, ATIII και πρωτεΐνης C, δεν παρουσίασαν διαφορές σε σχέση με τους μάρτυρες, η αιμοκάθαρση φάνηκε να πυροδοτεί την αύξηση τους (**Πίνακας 8**).

Η ενεργότητα της πρωτεΐνης S ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων και δεν φάνηκε να επηρεάζεται από την αιμοκάθαρση (**Πίνακας 8**). Το αντιγόνο της ελεύθερης πρωτεΐνης S ανιχνεύτηκε εντός των φυσιολογικών τιμών αλλά φαίνεται να μειώνεται η δραστικότητα του τόσο πριν όσο και μετά την αιμοκάθαρση (**Πίνακας 8**).

Πίνακας 8. Ινωδολυτικό σύστημα και φυσικοί ανασταλτές της αιμόστασης που επηρεάζονται από τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης. **p<0,05 σε σχέση με τους μάρτυρες, ** p<0,01 σε σχέση με τους μάρτυρες, # p<0,05 ανάμεσα στους ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση.*

ΙΝΩΔΟΛΥΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ				
	Ασθενείς (n=32)		**Μάρτυρες** (n=15)	**Φυσιολογικές τιμές**
	Πριν την αιμοκάθαρση	**Μετά την αιμοκάθαρση**		
PAI (U/mL)	1,9±1,2**	1,6±1,1**	0,8±1,1	<4
Πλασμινογόνο (ng/L)	100,5±15,3	112,8±17,4**#	108,1±8,8	80-120
ΦΥΣΙΚΟΙ ΑΝΑΣΤΑΛΤΕΣ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΤΑΣΗΣ				
Αντιθρομβίνη ΙΙΙ (%)	96,9±13,8**	105,6±14,5#	122,3±10,1	80-120
Πρωτεΐνη C (%)	80,8±18,8**	91,6±23,1**#	110,3±14,5	70-140
Ενεργότητα πρωτεΐνης S (%)	89,6±23,3	99,3±33,9	91,9±16,5	60-130
Αντιγόνο ελεύθερης πρωτεΐνης S (%)	95,6±69,9**	92,6±27,4**#	109,1±26,3	60-140

Γ6. Βιολογικά Δίκτυα

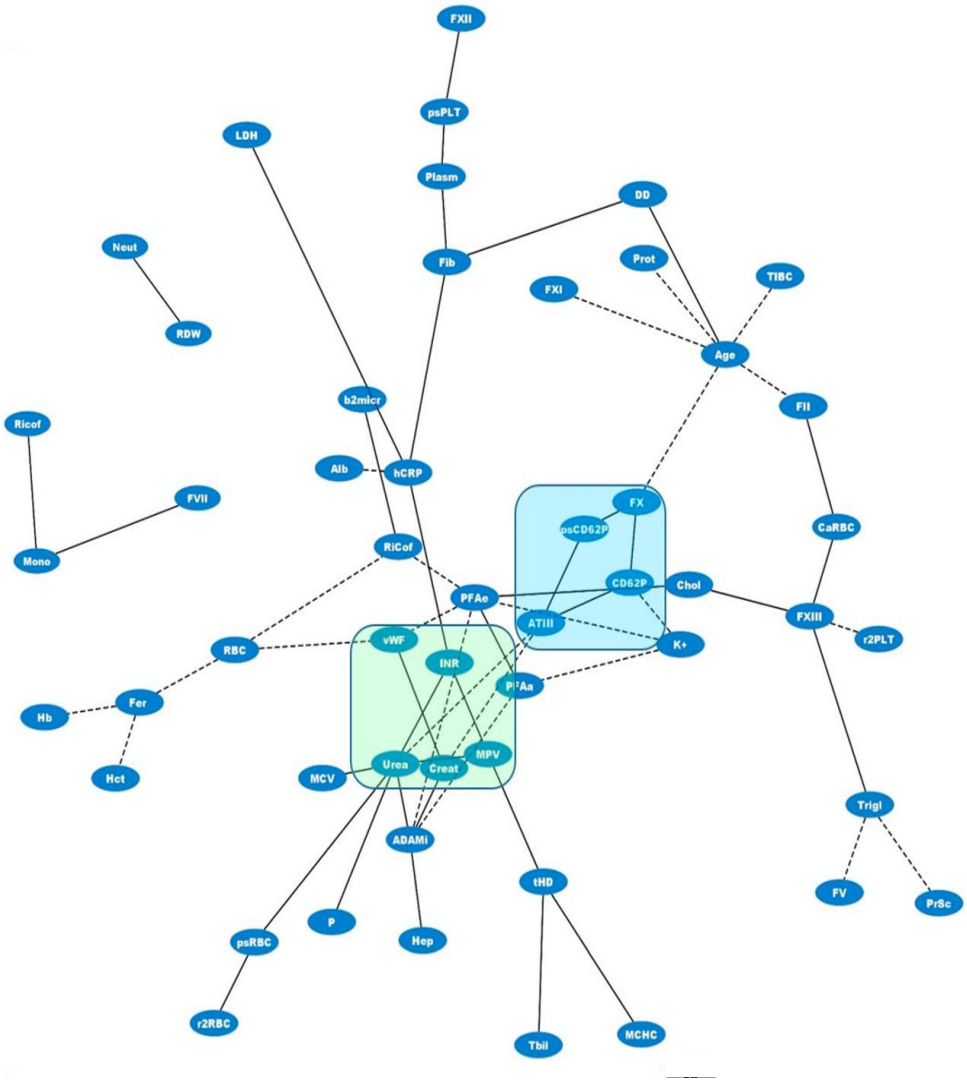
Τέλος στην παρούσα μελέτη, κατασκευάστηκαν βιολογικά δίκτυα για την απεικόνιση των στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων και συσχετίσεων μεταξύ των ουραιμικών τοξινών, των παραγόντων που συμμετέχουν στην αιμόσταση του αίματος και βιολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων του αίματος.

Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των ουραιμικών τοξινών και των παραγόντων που συμμετέχουν στην ομοιοστασία της αιμόστασης του αίματος. Για παράδειγμα, πριν την αιμοκάθαρση η ουρία και η κρεατινίνη, ως σημαντικοί βιοδείκτες της νεφρικής λειτουργίας, είχαν αντίστροφη συσχέτιση με την αντιθρομβίνη III (**Εικόνα 26**, ανοιχτό πράσινο τετράγωνο). Η ουρία και η κρεατινίνη, μετά την αιμοκάθαρση, φάνηκε να συσχετίζονται θετικά με τη μειωμένη εξωτερίκευση της PS που ανιχνεύτηκε στα RBCs, αλλά είχαν αντίστροφη συσχέτιση με τον FII και τον παράγοντα FV (**Εικόνα 27**, ανοιχτό πορτοκαλί ορθογώνιο).

Η συγκέντρωση ROS στα PLTs, μετά την αιμοκάθαρση, συσχετίστηκε θετικά με μια ποικιλία παραγόντων που εμπλέκονται στην αιμόσταση, όπως το ινωδογόνο (r= 0,579, p=0,019), το λόγο PT/INR (r=0,525, p=0,037), τα Δ-διμερή ινώδους (r= 0,526, p=0,036) και τα PLTs που συνεκφράζουν PS και P-σελεκτίνη (r=0,548, p =0,043).

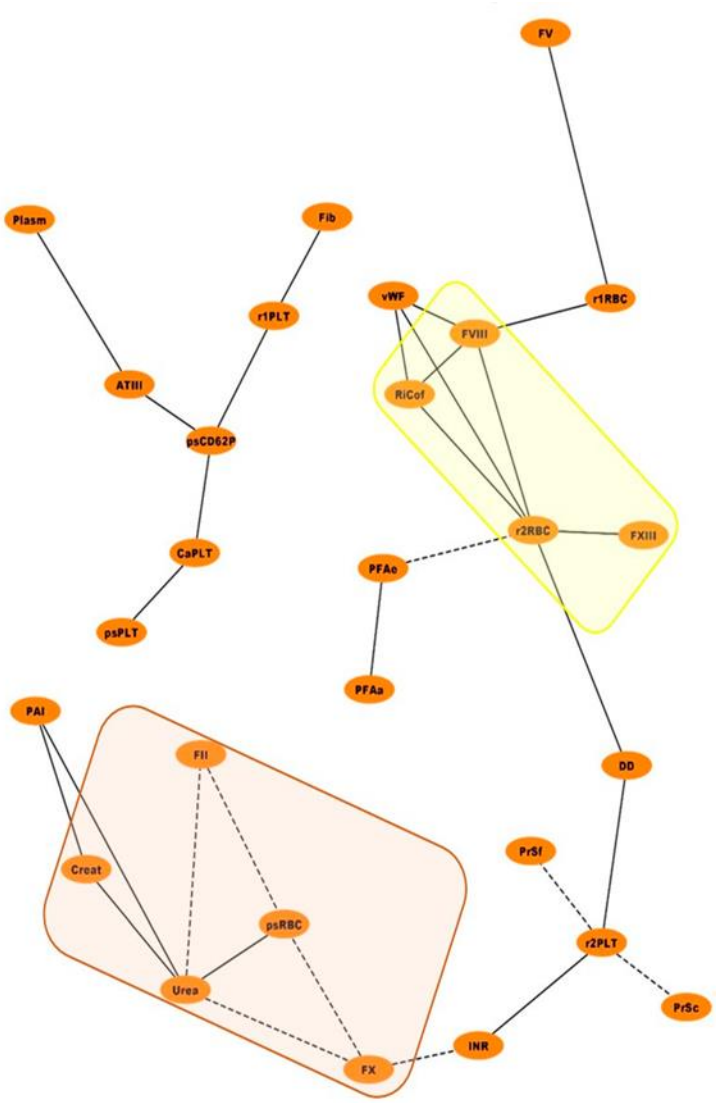
Τα RBCs που είχαν αυξημένες ενδοκυττάριες ρίζες οξυγόνου φαίνεται να αλληλεπιδρούν με κάποιους παράγοντες της πήξης του αίματος, συμπεριλαμβανομένων του RiCof (r=0,539, p=0,017), του FVIII (r=0,526, p=0,021) και του FXIII (r = 0,561, p = 0,012) (**Εικόνα 27**, κίτρινο ορθογώνιο).

Τέλος, το ποσοστό των PLTs που ήταν θετικά στην PS ή συνέκφραζαν PS και P-σελεκτίνη πριν την αιμοκάθαρση έδειξε θετικές συσχετίσεις με την ATIII (r=0,594, p=0,032), τα ενδοκυττάρια ιόντα ασβεστίου των PLTs (r=0,586, p= 0,028), τον FX (r=0.790, p= 0,007) και το πλασμινογόνο (r=0,835, p=0,001) (**Εικόνα 26**, γαλάζιο τετράγωνο).



Εικόνα 26. Ανάλυση βιολογικού δικτύου στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων βιοδεικτών ασθενών με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου πριν τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης. *Ανάλυση βιολογικού δικτύου στατιστικά σημαντικών (p<0,05) θετικών (μαύρων γραμμών) και αρνητικών (στικτών μαύρων γραμμών) συσχετίσεων μεταξύ διαλυτών παραγόντων που συμμετέχουν στο μηχανισμό της αιμόστασης και κύριων βιολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων αίματος που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Τα τετράγωνα και τα ορθογώνια τονίζουν σημαντικές συσχετίσεις. Όσο μικρότερο ήταν το μήκος της γραμμής, τόσο μεγαλύτερη ήταν η τιμή στατιστικής σημαντικότητας (r) μεταξύ των δύο αλληλένδετων παραμέτρων/κόμβων. Συντομογραφίες:* ***FXII****: Παράγοντας XII,* ***psPLT****: Αιμοπετάλια που εκφράζουν φωσφατιδυλοσερίνη,* ***Plasm****: Πλασμινογόνο,* ***LDH****: Γαλακτική αφυδρογονάση,* ***Fib****: Ινωδογόνο,* ***DD****: Δ-Διμερή ινώδους,* ***Prot****: Ολικές πρωτεΐνες πλάσματος,* ***TIBC****: Ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα,* ***FXI****: Παράγοντας XI,* ***Age****: Ηλικία σε έτη,* ***Neut****: Ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα,* ***RDW****: Δείκτης ερυθροκυτταρικής ανισοκυττάρωσης,* ***b2micr****: β2 μικροσφαιρίνη,* ***Ricof****: Συμπαράγοντας ριστοσετίνης αιμοπεταλίων,* ***Mono****: Μονοκύτταρα,* ***FVII****: Παράγοντας VII,* ***Alp****: Αλκαλική φωσφατάση,* ***hCRP****: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη,* ***RBC****: Ερυθρά αιμοσφαίρια,* ***FII****: Παράγοντας II,* ***FX****: Παράγοντας X,* ***Chol****: Χοληστερόλη,* ***K+****: Κάλιο ορού αίματος,* ***psCD62P****: Αιμοπετάλια που συνεκφράζουν P-σελεκτίνη και φωσφατιδυλοσερίνη,*

***CD62P**: Αιμοπετάλια που εκφράζουν P-σελεκτίνη, **ATIII**: Αντιθρομβίνη III, **CaRBC**: Ενδοκυττάριο ασβέστιο ερυθροκυττάρων, **FXIII**: Παράγοντας XIII, **Fer**: Φερριτίνη, **Hct**: Αιματοκρίτης, **Hb**: Αιμοσφαιρίνη, **r2PLT**: Ενδοκυττάριες δραστικές ρίζες οξυγόνου στα αιμοπετάλια (%), **Trig**: Τριγλυκερίδια, **FV**: Παράγοντας V, **PrSc**: Ενεργότητα πρωτεΐνης S, **PFAe**: Λειτουργικότητα αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη του ανταγωνιστή επινεφρίνη παρουσία κολλαγόνου, **vWF**: Παράγοντας von Willebrand, **INR**: Διεθνές κανονικοποιημένο πηλίκο, **PFAa**: Λειτουργικότητα αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη του ανταγωνιστή διφωσφωρική αδενοσίνη παρουσία κολλαγόνου, **MPV**: Μέσος όγκος αιμοπεταλίων, **Urea**: Ουρία, **Creat**: Κρεατινίνη, **MCV**: Μέσος όγκος ερυθροκυττάρων, **ADAMi**: Δραστικότητα του αναστολέα της ADAMTS-13, **Hep**: Δόση ηπαρίνης, **P**: Φώσφορος ορού αίματος, **psRBC**: Ερυθροκύτταρα που εκφράζουν φωσφατιδυλοσερίνη, **tHD**: Έναρξη αιμοκάθαρσης σε μήνες, **Tbil**: Ολική χολερυθρίνη ορού αίματος, **MCHC**: Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ανά ερυθρό αιμοσφαίριο.*



Εικόνα 27: ***Ανάλυση βιολογικού δικτύου στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων βιοδεικτών ασθενών με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου μετά τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης.*** *Ανάλυση βιολογικού δικτύου στατιστικά σημαντικών (p<0,05) θετικών (μαύρων γραμμών) και αρνητικών (στικτών μαύρων γραμμών) συσχετίσεων μεταξύ διαλυτών παραγόντων που συμμετέχουν στο μηχανισμό της αιμόστασης και κύριων βιολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων αίματος που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν από δείγματα αίματος ασθενών με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου μετά τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης. Τα τετράγωνα και τα ορθογώνια τονίζουν σημαντικές συσχετίσεις. Όσο μικρότερο ήταν το μήκος της γραμμής, τόσο μεγαλύτερη ήταν η τιμή στατιστικής σημαντικότητας (r) μεταξύ των δύο αλληλένδετων παραμέτρων/κόμβων. Συντομογραφίες:* ***FV****: Παράγοντας V,* ***Plasm****: Πλασμινογόνο,* ***Fib****: Ινωδογόνο,* ***r1RBC****: Ενδοκυττάριες δραστικές ρίζες οξυγόνου στα ερυθρά αιμοσφαίρια σε μέση ένταση φθορισμού, (MFI=Median, Fluorescence Intensity),* ***FVIII****: Παράγοντας VIII,* ***vWF****: Παράγοντας von Willebrand,* ***Ricof****: Συμπαράγοντας ριστοσετίνης αιμοπεταλίων,* ***r1PLT****: Ενδοκυττάριες δραστικές ρίζες οξυγόνου στα αιμοπετάλια σε μέση ένταση φθορισμού, (MFI=Median, Fluorescence Intensity),* ***ATIII****: Αντιθρομβίνη III,* ***psCD62P****: Αιμοπετάλια που συνεκφράζουν P-σελεκτίνη και φωσφατιδυλοσερίνη,* ***CaPLT****: Ενδοκυττάριο ασβέστιο αιμοπεταλίων,* ***psPLT****:*

Αιμοπετάλια που εκφράζουν φωσφατιδυλοσερίνη, ***r2RBC****: Ενδοκυττάριες δραστικές ρίζες οξυγόνου στα ερυθρά αιμοσφαίρια (%),* ***FXIII****: Παράγοντας XIII,* ***PFAe****: Λειτουργικότητα αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη του αγωνιστή επινεφρίνη παρουσία κολλαγόνου,* ***PFAa****: Λειτουργικότητα αιμοπεταλίων μετά την προσθήκη του αγωνιστή διφωσφωρική αδενοσίνη παρουσία κολλαγόνου,* ***DD****: Δ-Διμερή ινώδους,* ***PrSf****: Ενεργότητα πρωτεΐνης S (ελεύθερη αντιγόνου),* ***r2PLT****: Ενδοκυττάριες δραστικές ρίζες οξυγόνου στα αιμοπετάλια (%),* ***PrSc****: Ενεργότητα πρωτεΐνης S,* ***INR****: Διεθνές κανονικοποιημένο πηλίκο,* ***FX****: Παράγοντας X,* ***PAI****: Αναστολέας του ιστικού πλασμινογόνου,* ***FII****: Παράγοντας II,* ***Creat****: Κρεατινίνη,* ***psRBC****: Ερυθροκύτταρα που εκφράζουν φωσφατιδυλοσερίνη,* ***Urea****: Ουρία*.

Κεφάλαιο Δ. Συζήτηση

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (ESRD) χαρακτηρίζεται από ανωμαλίες στη δομή και/ ή τη λειτουργία των νεφρών, που επιμένουν για περισσότερο από τρεις μήνες (250). Σε παγκόσμιο επίπεδο, η ESRD υπολογίζεται ότι επηρεάζει το 8-16% του πληθυσμού, με τον επιπολασμό να αυξάνεται σταδιακά με την ηλικία (250,251). Βάσει των καθιερωμένων κατευθυντήριων οδηγιών (Kidney Disease: Improving Global Outcomes, KDIGO), η νόσος υποδιαιρείται σε πέντε κατηγορίες με βάση το GFR και σε τρεις κατηγορίες με βάση τα επίπεδα λευκωματουρίας· ειδικότερα, GFR<60 mL/ min/ 1,73 m^2, λευκωματουρία> 30 mg/ 24 h, ή παρουσία άλλων δεικτών νεφρικής βλάβης (συμπεριλαμβανομένων ανωμαλιών στα επίπεδα ηλεκτρολυτών ή ιστολογικών ανωμαλιών). Η παρουσία κάποιας από τις προηγούμενες ανωμαλίες για περισσότερο από τρεις μήνες υποδηλώνει ESRD (252). Η απώλεια της νεφρικής λειτουργίας στην ESRD είναι προοδευτική και μη αναστρέψιμη. Οι θεραπείες νεφρικής υποκατάστασης, συμπεριλαμβανομένης της αιμοκάθαρσης και της μεταμόσχευσης νεφρού, είναι απαραίτητες για τους ασθενείς με ESRD (GFR <15 mL/min/1,73 m^2). Οι ασθενείς με ESRD έχουν 3,6 φορές αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό, με τον κίνδυνο να αυξάνεται περαιτέρω σε 9 έως 12 φορές για ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση (253).

Έχει δειχθεί ότι η ουραιμία, δηλαδή η συσσώρευση αυξημένης ποσότητας ουρίας η οποία δεν μπορεί να απομακρυνθεί από τους νεφρούς, ευθύνεται για τις περισσότερες επιπλοκές της ESRD (254). Χωρίς την αιμοκάθαρση, η ουραιμία είναι απειλητική για τη ζωή του ασθενή. Αν και η αιμοκάθαρση παρατείνει σε μεγάλο βαθμό την επιβίωση των ασθενών με ESRD, δεν είναι σε θέση να μετριάσει πλήρως την ουραιμική κατάσταση, αφήνοντας στους ασθενείς αυτό που αναφέρεται ως «υπολειπόμενο σύνδρομο» (254). Μέχρι σήμερα, περισσότερες από 100 ουραιμικές τοξίνες έχουν ταυτοποιηθεί και ταξινομηθεί (255). Η Ευρωπαϊκή ομάδα μελέτης ουραιμικών τοξινών (EUTox) ταξινόμησε τις ουραιμικές τοξίνες με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες στις ακόλουθες κατηγορίες:

(i) ελεύθερες υδατοδιαλυτές, μικρού μοριακού βάρους ουσίες (<500 Da),

(ii) ουσίες δεσμευμένες σε πρωτεΐνες και

(iii) μεσαίου μεγέθους μόρια (≥500 Da) (255).

Οι αυξημένες ουραιμικές τοξίνες που ανιχνεύονται σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου σχετίζονται με αναιμία της χρόνιας νόσου, φλεγμονή και πολλές διαταραχές της αιμόστασης. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η συσσώρευση ουραιμικών τοξινών - ουρία, κρεατινίνη, παραθορμόνη και β2-μικροσφαιρίνη- στους ασθενείς της παρούσας μελέτης ήταν ανάλογη του τυπικού φλεγμονώδους προτύπου των ασθενών με ESRD, που ταυτοποιείται τόσο από τα παθολογικά αυξημένα επίπεδα φερριτίνης και C-αντιδρώσας πρωτεΐνης όσο και από τη διαταραχή του λόγου ουδετερόφιλων/ λεμφοκυττάρων. Στους ασθενείς μετά την αιμοκάθαρση υπήρξε συνολική βελτίωση στους περισσότερους ουραιμικούς δείκτες, αν και η κρεατινίνη παρέμεινε παθολογικά υψηλή. Επιπλέον, παρόλο που η αιμοκάθαρση - η τυπική συμπτωματική θεραπεία για τους ασθενείς με ESRD - βελτιώνει την αναιμία, δεν είναι σε θέση να εξαλείψει πλήρως ή ακόμα και να βελτιώσει τη φλεγμονή που παρατηρείται λόγω της χρονιότητας της νόσου.

Οι ασθενείς που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη ήταν αντιπροσωπευτικοί της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου, με κοινά χαρακτηριστικά την αναιμία και τη χρόνια φλεγμονή. Ειδικότερα, όλοι οι ασθενείς είχαν υψηλά επίπεδα ευαίσθητης C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (high-sensitivity C-reactive protein, hsCRP), υψηλά επίπεδα φερριτίνης ορού, διαταραγμένο λόγο ουδετερόφιλων/λεμφοκυττάρων (256,257) και αυξημένο ινωδογόνο ως δείκτες οξείας φάσης φλεγμονώδους αντίδρασης. Όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρήθηκαν θετικές συνδιακυμάνσεις μεταξύ αυτών των παραμέτρων [π.χ. μεταξύ ινωδογόνου και hsCRP ($r = 0,469$, $p = 0,028$)].

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα της φερριτίνης και της CRP βρίσκονταν σε συσχέτιση και με τα επίπεδα αναιμίας, καθώς βρέθηκαν αντίστροφα ανάλογα με τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, τον αιματοκρίτη και τον αριθμό των RBCs (258). Επιπλέον, τα επίπεδα σιδήρου (Fe), ήταν ελαττωμένα σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Οι παρατηρήσεις αυτές βρίσκονται σε συμφωνία με τα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι οι δύο βασικές αιτίες αναιμίας σε άτομα με ESRD είναι η ανεπαρκής

παραγωγή ερυθροποιητίνης λόγω της νεφρικής δυσλειτουργίας και/ή η ποσοτική ή λειτουργική ανεπάρκεια σιδήρου (259,260). Αξιοσημείωτο ήταν ότι, αν και τα επίπεδα φερριτίνης δε μετρήθηκαν μετά την αιμοκάθαρση, αναμένονται ακόμα πιο αυξημένα βάσει δημοσιευμένων επιστημονικών δεδομένων (261). Τα αυξημένα επίπεδα φερριτίνης στον ορό ασθενών με ESRD σχετίζονται τόσο με την αναιμία όσο και με τη φλεγμονώδη αντίδραση. Ο εμπλεκόμενος μηχανισμός είναι καλά μελετημένος (261). Σε συνθήκες όπου τα επίπεδα σιδήρου στον οργανισμό είναι φυσιολογικά, τα περισσότερα κύτταρα περιέχουν χαμηλές ποσότητες φερριτίνης, ενώ τα κύτταρα στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (Reticuloendothelial System, RES) μπορεί να περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες (262). Σε αυτά τα κύτταρα, μπορεί να υπάρχει μεγάλη ποσότητα αδρανούς αγγελιοφόρου ριβονουκλεϊκού οξέος (mRNA) φερριτίνης. Όταν ο σίδηρος εισέρχεται στο κύτταρο, αυτό το mRNA υποβάλλεται σε επεξεργασία και παράγονται ταχύτατα οι υπομονάδες H και L της φερριτίνης (263). Η διαδικασία ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ ειδικών μη κωδικών τμημάτων του mRNA (στοιχεία που αποκρίνονται σε Fe) και κυτταροπλασματικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών Fe (263). Κατά τη διάρκεια της απόκρισης οξείας φάσης, οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη (Interleukin, IL) 1β και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα (Tumor Necrosis Factor a, TNF-α) αυξάνουν τη σύνθεση και των δύο υπομονάδων H και L της φερριτίνης μέσω αυξημένου ρυθμού μετάφρασης του προσχηματισμένου mRNA της φερριτίνης (264–266). Ο Rogers και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η IL-1β επάγει την έκφραση του γονιδίου φερριτίνης μέσω μεταφραστικού ελέγχου του mRNA της, αλλά αυτή η φλεγμονώδης επαγωγή της σύνθεσης φερριτίνης είναι διαφορετική από την εξαρτώμενη από το σίδηρο έκφραση του γονιδίου της φερριτίνης, καθώς απαιτεί την παρουσία κυτταρικού σιδήρου (267). Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που εξηγούν την αυξημένη σύνθεση φερριτίνης υπό φλεγμονώδεις συνθήκες. Υποθετικά, υψηλότερες ποσότητες φερριτίνης μπορεί να παγιδεύσουν περισσότερο Fe και να δράσουν προστατευτικά έναντι των βακτηριακών μολύνσεων, η έναρξη των οποίων συνδέεται άρρηκτα με την πυροδότηση της φλεγμονής. Ως εκ τούτου, η επαγόμενη από φλεγμονή υπερφερριτιναιμία μπορεί να οδηγήσει σε μια λεγόμενη «λειτουργική ανεπάρκεια Fe», η οποία μπορεί να είναι χρήσιμη στην οξεία φάση της φλεγμονής μέσω του

περιορισμού του Fe στο RES, αλλά καθίσταται επιβλαβής στη φλεγμονή οδηγώντας σε ανθεκτική αναιμία, όπως στην ESRD και σε άλλες χρόνιες παθήσεις.

Κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης, σύμφωνα με τους Besarab et al. (268), παρατηρείται απώλεια σιδήρου (1-3g ετησίως). Επιπλέον έχει δειχτεί ότι οι ασθενείς έχουν αιμορραγική διάθεση λόγω δυσλειτουργίας των PLTs, των συχνών αιμοληψιών, της αιμόλυσης και της απώλειας αίματος λόγω της κατακράτησής του στα φίλτρα. Επιπλέον, οι ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση παρουσιάζουν μειωμένη διατροφική απορρόφηση σιδήρου (269,270), ενώ επίσης τα υψηλά επίπεδα CRP (>8 mg/L) έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με χαμηλότερη ικανότητα απορρόφησης σιδήρου (271). Σύμφωνα με μελέτες, η φλεγμονή ρυθμίζει την έκφραση και την παραγωγή της εψιδίνης ως απόκριση στα χαμηλά επίπεδα σιδήρου στο ήπαρ, την υποξία και την αναιμία, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα λειτουργική ανεπάρκεια σιδήρου ή ενισχυμένη παραγωγή φερριτίνης και μειωμένη παραγωγή τρανσφερίνης, και μετατόπιση και αποθήκευση σιδήρου στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα αντί για τη μεταφορά τους στα πρόδρομα RBCs (272–274). Η φλεγμονή που ενεργεί μαζί με την ουραιμική τοξικότητα και την εψιδίνη επιδεινώνει την αναιμία. Σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, η υποξαιμία και η συσσώρευση ουραιμικών τοξινών έχει δειχθεί ότι δρουν συνεργατικά και ελαττώνουν τη διάρκεια ζωής των RBCs (275). Τα παραπάνω έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν την έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια της μεμβράνης, διεγείρουν την κυτταρική συρρίκνωση και ενισχύουν την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου στα RBCs. Η ελαττωμένη διάρκεια ζωής των RBCs σε ασθενείς με ESRD έχει βρεθεί να σχετίζεται με μειωμένη παραμορφωσιμότητα των ερυθροκυττάρων, ανωμαλίες στην ασυμμετρία της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, του κυτταροσκελετού και την αυξημένη μικροκυστιδιοποίηση (171). Αυτές οι αλλοιώσεις αποδείχθηκε ότι επιταχύνονται από το ουραιμικό περιβάλλον, τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες (171,276,277). Ανωμαλίες στις πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και αυξημένο οξειδωτικό στρες των RBCs λόγω του ουραιμικού περιβάλλοντος ενοχοποιούνται για αυξημένη θνητότητα (mortality) στους ασθενείς με ESRD (166,168).

Αποτέλεσμα των παραπάνω διαταραγμένων μηχανισμών είναι η ριζική μεταβολή της λειτουργίας του συστήματος της αιμόστασης στους ασθενείς με

νεφρική ανεπάρκεια, καθιστώντας τους ιδιαίτερα επιρρεπείς τόσο σε επεισόδια παρατεταμένων αιμορραγιών όσο και στην ανάπτυξη θρομβωτικών επεισοδίων (213). Οι αιμορραγικές διαταραχές είναι αποτέλεσμα ανεπαρκούς λειτουργίας των PLTs, του καταρράκτη πήξης και/ή ενεργοποίησης του ινωδολυτικού συστήματος, ενώ η υπερπηκτικότητα είναι μάλλον αποτέλεσμα διαταραχών των ρυθμιστικών παραγόντων της πήξης καθώς και της υπεραντιδραστικότητας των PLTs (213,278). Και τα δύο προβλήματα είναι σημαντικής κλινικής σημασίας, καθώς ορισμένοι ασθενείς μπορεί να τεθούν σε κίνδυνο από θανατηφόρα αιμορραγικά επεισόδια, όπως παρατεταμένη αιμορραγία από αρτηριοφλεβικά συρίγγια, γαστρεντερική αιμορραγία ή εγκεφαλική αιμορραγία, ενώ άλλοι ασθενείς εμφανίζουν μία προθρομβωτική κατάσταση που σχετίζεται με αυξημένο αριθμό καρδιαγγειακών συμβάντων ή υποτροπιάζουσα θρόμβωση κατά την αιμοκάθαρση (278). Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανάπτυξη αυτών των διαταραχών είναι πολύπλοκοι και περιλαμβάνουν βλάβες στον καταρράκτη πήξης, στο ινωδολυτικό σύστημα, στα PLTs, στο ενδοθήλιο ή στο αγγειακό τοίχωμα, οι οποίες σχετίζονται σημαντικά με τις ουραιμικές τοξίνες και τις μεταβολικές ενώσεις που συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της νεφρικής ανεπάρκειας (279). Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, οι ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια υποφέρουν από ποικίλου βαθμού φλεγμονή, η οποία επηρεάζει επίσης την αιμόσταση. Συνεπώς, οι ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια έχουν μια πολύπλοκη διαταραχή του συστήματος της αιμόστασης, η οποία τους καθιστά επιρρεπείς σε σοβαρά αιμορραγικά ή θρομβοεμβολικά επεισόδια.

Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στην παθοφυσιολογία της αιμόστασης δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Παρά τη γνωστή, πλέον, συνεισφορά των RBCs στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης, καθώς διάφορες κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει παθολογικές (ποσοτικές/ ποιοτικές) αλλοιώσεις των RBCs με αυξημένο κίνδυνο τόσο αρτηριακής όσο και φλεβικής θρόμβωσης (154), η πιθανή σχέση τους με δυσλειτουργίες των PLTs και τη διαταραχή στις οδούς της αιμόστασης σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου και περιτοναϊκή κάθαρση δεν έχουν διευκρινιστεί επαρκώς μέχρι στιγμής.

Η αιμόσταση είναι μία κρίσιμη φυσιολογική διαδικασία που ρυθμίζεται από πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, των PLTs, του

παράγοντα vWF και διαφόρων παραγόντων πήξης. Η αιμόσταση ξεκινά από ένα σημείο βλάβης στο αγγειακό τοίχωμα, όπου συσσωρεύονται και προσκολλώνται ενεργοποιημένα PLTs. Παράλληλα, οι παράγοντες πήξης προσελκύονται και αλληλεπιδρούν με τα ενεργοποιημένα PLTs, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός δικτύου ινώδους. Η λειτουργία των PLTs και η πήξη αλληλεπιδρούν άμεσα, καθιστώντας αποτελεσματική την αιμόσταση. Διαταραχές που οδηγούν σε εξασθένηση αυτής της αλληλεπίδρασης μπορούν να οδηγήσουν σε αιμορραγικά επεισόδια, ενώ αντίθετα, η υπερενεργοποιημένη αλληλεπίδραση PLTs- παραγόντων πήξης επάγει υψηλό κίνδυνο θρομβώσεων.

Η διαδικασία της αιμόστασης μπορεί συνολικά να χωριστεί σε έξι στάδια (280). Τα τρία πρώτα στάδια περιλαμβάνουν κυρίως την προσέλκυση, προσκόλληση και συσσώρευση των PLTs, μέσω της αύξησης των επιπέδων διαφόρων αιμοστατικών παραγόντων και της αλληλεπίδρασής τους με τα PLTs. Έτσι, στο αρχικό στάδιο – εκείνο της αγγειοσυστολής –, οι εκτεθειμένες ίνες κολλαγόνου απελευθερώνουν ATP και άλλους φλεγμονώδεις μεσολαβητές για την προσέλκυση των μακροφάγων, ενώ παράλληλα προωθείται η προσκόλληση και η συσσώρευση PLTs. Τα ενεργοποιημένα PLTs προσκολλώνται στο σημείο της βλάβης και σχηματίζουν ένα σύμπλοκο, αποκλείοντας την τραυματισμένη περιοχή. Ο μηχανισμός προσκόλλησης των PLTs προωθείται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεμβρανικών υποδοχέων, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, υποδοχείς ιντεγκρινών, διαμεμβρανικοί υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνη και σελεκτίνες, και των πρωτεϊνών του πλάσματος. Έτσι, η προσκόλληση των PLTs επάγεται από τον παράγοντα vWF που συνδέεται με τη γλυκοπρωτεΐνη Ib-IX στη μεμβράνη των PLTs και η αλληλεπίδραση του vWF με άλλες πρωτεΐνες, όπως με τον παράγοντα VIII, στα σημεία του τραύματος προωθεί περαιτέρω τη διαδικασία της αιμόστασης. Για την ενεργοποίησή τους, τα προσκολλημένα PLTs υφίστανται αποκοκκίωση και εκκρίνουν κυτταροπλασματικά κοκκία που φέρουν σεροτονίνη, παράγοντες ενεργοποίησης PLTs και ADP, ενώ η σύνθεση και η έκκριση θρομβοξάνης A2 προάγει την αγγειοσυστολή και τη συσσώρευση μεγαλύτερων αριθμών PLTs. Παράλληλα, οι ιντεγκρίνες GPIIbIIIa και η P-σελεκτίνη μεταναστεύουν από τα α-κοκκία στη μεμβράνη των PLTs για να υποστηρίξουν τη συσσώρευσή τους, η οποία εκκινείται μέσω της σύνδεσης του υποδοχέα GPIIbIIIa με τον vWF ή το ινωδογόνο, και ενισχύεται

ακολούθως μέσω της μετατροπής της προθρομβίνης σε θρομβίνη από τον καταρράκτη της πήξης. Η συσσώρευση μεγάλου αριθμού PLTs προάγει το σχηματισμό ενός πλέγματος που σταθεροποιείται από το νεοσυντιθέμενο ινώδες, το οποίο τελικά διασυνδέει το πλάσμα, τα PLTs και άλλα κύτταρα του αίματος για να παραγάγει έναν σταθερό θρόμβο.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (244,245), τα PLTs από ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου δεν είναι λειτουργικά κάτι που αποδείχτηκε και στην παρούσα μελέτη μετά την προσθήκη των αγωνιστών ADP και επινεφρίνης. Η δοκιμασία λειτουργικότητας PLTs αξιολογεί τη λειτουργία των PLTs και κατ' επέκταση την πρωτογενή αιμόσταση, μέσω μέτρησης της ικανότητας συσσώρευσης των PLTs *in vitro* παρουσία ειδικών αγωνιστών. Μελέτες υποστηρίζουν συσχέτιση των ουραιμικών τοξινών με τη διαταραχή της λειτουργικότητας των PLTs (281), ωστόσο άλλοι ερευνητές δεν κατάφεραν να εξάγουν τα ίδια συμπεράσματα (282). Αιμορραγίες έχουν ανευρεθεί στο 40-60% των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (283) και η συμβολή των PLTs στα αιμορραγικά επεισόδια βρίσκεται υπό διερεύνηση. Μια επαρκώς αναγνωρισμένη διαταραχή στη φυσιολογία των PLTs που συμβάλλει στη δυσλειτουργία τους, σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια και αιμορραγικά επεισόδια είναι η διαταραχή των α-κοκκίων των PLTs (212,284). Τα α-κοκκία περιέχουν τον παράγοντα αιμοπεταλίων 4, τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού-β1, τον αυξητικό παράγοντα που προέρχεται από PLTs, φιμπρονεκτίνη, β-θρομβοσφαιρίνη, τον παράγοντα vWF, ινωδογόνο, σεροτονίνη και τους παράγοντες πήξης V και XIII. Σε ουραιμικούς ασθενείς, τα α-κοκκία έχουν αυξημένη αναλογία ATP/ADP και μειωμένη περιεκτικότητα σε σεροτονίνη. Επιπλέον, η απελευθέρωση ATP που προκαλείται από τη θρομβίνη μαζί με αυξημένη περιεκτικότητα σε ασβέστιο και διαταραγμένη ενδοκυτταρική ροή ασβεστίου σε διάφορα ερεθίσματα έχει συσχετιστεί με δυσλειτουργία των PLTs και αιμορραγία σε ουραιμικούς ασθενείς (212). Τα PLTs των ουραιμικών ασθενών εμφανίζουν επίσης διαταραχή στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος και της προσταγλανδίνης με μειωμένη σύνθεση και/ή απελευθέρωση θρομβοξάνης Α2 με αποτέλεσμα μειωμένη προσκόλληση και συσσώρευση PLTs με τις ακόλουθες αιμορραγικές διαταραχές, οι οποίες μπορούν να αντιστραφούν με την αιμοκάθαρση (212,214,285). Επιπλέον, τα υπερδιηθήματα που συλλέχθηκαν από ουραιμικούς ασθενείς ανέστειλαν τη σύνθεση

του παράγοντα ενεργοποίησης των PLTs, γεγονός που θα μπορούσε να ευθύνεται για τη μειωμένη δραστικότητα των PLTs (286). Παρά την αναμενόμενη θετική επίδραση της αιμοκάθαρσης στη λειτουργικότητα των PLTs (224,287) και προηγούμενες μελέτες που έχουν δείξει ότι η λειτουργία των PLTs βελτιώθηκε σημαντικά μετά την αιμοκάθαρση (288), δεν παρατηρήθηκε καμία βελτίωση μετά την αιμοκάθαρση στους ασθενείς της παρούσας μελέτης γεγονός που πιθανά εξηγείται από τα φυσιολογικά ή αυξημένα επίπεδα του παράγοντα vWF που επάγονται μετά τη θεραπεία. Η αύξηση της έκφρασης του παράγοντα vWF αποκλείει την ύπαρξη της νόσου von Willebrand (κληρονομική αιμορραγική διαταραχή).

Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν μια περίπλοκη παθοφυσιολογική βάση στις διαταραχές ή/και ανωμαλίες των PLTs στη νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, που πιθανά περιλαμβάνει ενδογενείς κυτταρικές διαταραχές των PLTs (289), όπως μεταξύ άλλων την εξασθενημένη σύνδεσή τους με το τοίχωμα των αγγείων και το ινωδογόνο, τον ελαττωματικό μεταβολισμό, τη μειωμένη περιεκτικότητα σε κοκκία και τη μειωμένη ενδοκυτταρική σηματοδότηση (290). Επιπλέον, ο παρατεταμένος χρόνος σύγκλισης Col/EPI έχει προηγουμένως συσχετιστεί με την αναιμία και τα χαμηλά επίπεδα αιματοκρίτη (291).

Πέρα από την επιβράδυνση στο χρόνο σύγκλισης, ο παρατεταμένος χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης επιβεβαίωσε τον αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας των ασθενών πριν από την αιμοκάθαρση, όπως είχε παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (244). Το aPTT αντιπροσωπεύει το χρόνο που απαιτείται για το σχηματισμό του ινώδους μετά την ανάμειξη του πλάσματος με υποκατάστατα των αιμοπεταλιακών φωσφολιπιδίων και χρησιμοποιείται ως μέθοδος ανίχνευσης αλλοιώσεων στον καταρράκτη της πήξης (292). Συνεπώς, η αύξηση στο aPTT, σε συνδυασμό με τον υψηλό λόγο χρόνου προθρομβίνης προς το διεθνές κανονικοποιημένο πηλίκο, είναι συμβατά με την εικόνα που περιλαμβάνει διαταραχές τόσο στην ενδογενή όσο και στην εξωγενή οδό του μηχανισμού της αιμόστασης. Άλλες ερευνητικές ομάδες βρήκαν αυξημένες τιμές aPTT και Δ-Διμερών ινώδους με ταυτόχρονη ελάττωση στα επίπεδα του ινωδογόνου μετά την αιμοκάθαρση (293,294). Επίσης, σε ασθενείς που λάμβαναν ηπαρίνη κατά την αιμοκάθαρση έχει σημειωθεί σημαντική μείωση του INR μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, η οποία αποδόθηκε στην ελάττωση του ελεύθερου κλάσματος ηπαρίνης

στο πλάσμα κατ' αναλογία με τις αυξήσεις στα επίπεδα αλβουμίνης ορού, λόγω του αυξημένου ρυθμού δέσμευσης της ηπαρίνης στην αλβουμίνη κατά την αιμοκάθαρση (295). Στη παρούσα μελέτη, η ομαλοποίηση της αναλογίας PT/INR καθώς και του aPTT στους ασθενείς αμέσως μετά την αιμοκάθαρση, πιθανά αποδίδεται εν μέρει στην ταυτόχρονη αύξηση της δραστηριότητας των παραγόντων της πήξης και των φυσικών ανασταλτών της. Η απομάκρυνση της περίσσειας νερού και άλλων υδατοδιαλυτών συστατικών, πιθανά να δικαιολογεί την ομαλοποίηση της αναλογίας PT/INR καθώς και του aPTT. Η αντίστροφα ανάλογη σχέση των επιπέδων της αντιθρομβίνης ΙΙΙ με την ουρία και τη κρεατινίνη που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη, συνηγορεί στο παραπάνω συμπέρασμα.

Μελέτες έχουν δείξει παθολογικά επίπεδα του παράγοντα FVIII, μίας αντι-αιμορροφιλικής πρωτεΐνης, ως μία άλλη κοινή διαταραχή της αιμόστασης στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (201,244,296). Ο παράγοντας FVIII αλληλεπιδρά με άλλους παράγοντες πήξης, μεταξύ των οποίων ο vWF, και οι IXa και X, μέσω του σχηματισμού ειδικών συμπλόκων (297). Στην παρούσα μελέτη οι ασθενείς πριν από την αιμοκάθαρση παρουσίασαν μεταβολή τόσο στον παράγοντα FVIII όσο και στο αντιγόνο vWF και τη δραστηριότητά του. Είναι γνωστό ότι ο παράγοντας vWF έχει διπλό ρόλο στην αιμόσταση, τόσο ως φορέας του παράγοντα FVIII όσο και ως μόριο – γέφυρα για διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ PLTs ή μεταξύ PLTs και υπο-ενδοθηλίου. Η αυξημένη δραστηριότητα που παρατηρήθηκε στον παράγοντα vWF δεν αντιστάθμισε το παρατεταμένο χρόνο σύγκλισης με συσσωρευτικές ουσίες των PLTs, επιβεβαιώνοντας την υπόθεση για ενδογενείς κυτταρικές διαταραχές των PLTs στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Σε αντίθεση με τους Casonato et al (296), αλλά σε συμφωνία με τους Holden et al (298), η διαδικασία της αιμοκάθαρσης αύξησε σημαντικά τον παράγοντα FVIII, τον RiCof και τον vWF, υποδηλώνοντας αρνητική επίδραση στην ακεραιότητα του ενδοθηλίου και πιθανά αυξημένο κίνδυνο θρομβωτικών επεισοδίων σε αυτούς τους ασθενείς (299–301).

Η αυξημένη δραστηριότητα του παράγοντα vWF πιθανά αποδίδεται στη συσσώρευση φλεγμονωδών κυτταροκινών (302) ή στην απότομη μείωση της δραστηριότητας της ADAMTS-13 (αλλιώς γνωστή ως πρωτεάση που διασπάει τον παράγοντα vWF) (<5% των φυσιολογικών τιμών στους ασθενείς της παρούσας

μελέτης). Η ADAMTS-13 είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο υπεύθυνο για την απομάκρυνση των πολυμερών vWF υψηλού μοριακού βάρους από την κυκλοφορία του αίματος. Η αντίστροφη συν-διακύμανση του παράγοντα vWF με την ADAMTS-13 έχει θεωρηθεί ως προθρομβωτική κατάσταση στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (303). Ειδικότερα, ο συνδυασμός χαμηλής δραστικότητας ADAMTS-13 με υψηλή συγκέντρωση vWF αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων και θανάτου, ενώ σοβαρή ανεπάρκεια της ADAMTS-13 θα μπορούσε να οδηγήσει σε μία κατάσταση γνωστή ως θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (Thrombotic Thrombocytopenic Purpura, TTP), η οποία είναι μια δυνητικά θανατηφόρα θρομβωτική διαταραχή (304). Υπάρχουν αρκετοί δυνητικοί ανασταλτές της δραστηριότητας της ADAMTS-13 μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται τα αυτοαντισώματα (305), η IL-6 πλάσματος (306), τα πεπτίδια ουδετερόφιλων (307), η θρομβοσπονδίνη-1 (308), η ελεύθερη Hb πλάσματος και ο παράγοντας αιμοπεταλίων 4 (Platelet Factor 4, PF4) (289), όμως μέχρι σήμερα ελάχιστα από αυτά έχουν μελετηθεί σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, γεγονός που υπογραμμίζει το σημαντικό κενό γνώσεων στον τομέα της αιμόστασης στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ανεπάρκεια ADAMTS-13 σε περιπτώσεις σοβαρής σήψης, διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης, και συστημικής φλεγμονής σε προχωρημένη κίρρωση (309,310). Μια προοπτική μελέτη σε 72 ασθενείς με σηπτική καταπληξία έδειξε ισχυρή συσχέτιση της χαμηλής δραστηριότητας της ADAMTS-13 με υψηλά επίπεδα IL-6 (311), ενώ σε μία μελέτη σε υγιή άτομα, τα χαμηλά επίπεδα ADAMTS-13 βρέθηκαν επίσης να συσχετίζονται με υψηλά επίπεδα CRP (312). Όλα τα παραπάνω στοιχεία υποδηλώνουν μία συσχέτιση μεταξύ ενός προφλεγμονώδους φαινοτύπου και της ανεπάρκειας ADAMTS-13. Οι ουραιμικές τοξίνες και η ίδια η θεραπεία αιμοκάθαρσης θα μπορούσαν να προκαλέσουν χρόνια μικρο-φλεγμονή, αυξάνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τον κίνδυνο εμφάνισης θρομβωτικών επεισοδίων.

Έχει δειχτεί ότι αύξηση ή μείωση των επιπέδων του ινωδογόνου οδηγούν είτε σε υπερ- ή σε υποϊνωδογοναιμία αντίστοιχα. Οι δύο αυτές παθολογικές καταστάσεις έχουν χαρακτηριστεί ως προθρομβωτικές πιθανά λόγω ενδογενών διαταραχών του ινωδογόνου (313–315). Αυτές οι διαταραχές πιθανά επηρεάζουν την ινωδόλυση, μια διαδικασία που περιλαμβάνει ενεργοποίηση του ενεργοποιητή του ιστικού πλασμινογόνου, η οποία ρυθμίζεται από τον αναστολέα του (316,317). Στην ομάδα

των ασθενών της παρούσας μελέτης, παρατηρήθηκε ένας μεικτός βιοχημικός φαινότυπος της ινωδόλυσης, ο οποίος περιλαμβάνει υπερινωδογοναιμία (201) ως πιθανό αποτέλεσμα της φλεγμονώδους κατάστασης (318) που προδιαθέτει για θρόμβωση (319) και ταυτόχρονα, παθολογικά αυξημένα Δ-Διμερή ινώδους που υποδηλώνουν αυξημένη δραστηριότητα πλασμίνης και υπερινωδόλυση. Όπως ήταν αναμενόμενο το ινωδογόνο παρουσίασε θετική συνδιακύμανση τόσο με τα επίπεδα πλασμινογόνου όσο και με αυτά των Δ-Διμερών ινώδους. Η έκφραση της P-σελεκτίνης σε ενεργοποιημένα PLTs είναι επίσης προδιαθεσικός παράγοντας θρόμβωσης, προάγοντας τη συσσώρευση (320), το σχηματισμό θρόμβου στη θέση της βλάβης του ενδοθηλίου και την αυξημένη ενσωμάτωση λευκοκυττάρων και ινώδους στο θρόμβο (321). Επίσης, στις ίδιες προθρομβωτικές διαδικασίες μπορούν να συμβάλουν και τα εξαιρετικά μεγάλα πολυμερή του παράγοντα vWF (322) και η εξωτερίκευση της PS. Η επιφανειακή έκφραση αυτού του αμινοφωσφολιπιδίου, της PS, σε ενεργοποιημένα PLTs προάγει τη συγκρότηση του συμπλόκου προθρομβινάσης παρουσία των παραγόντων FV, FX και ιόντων ασβεστίου (323). Επίσης, η PS είναι ισχυρός δείκτης προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, που συνδέεται με την εξαρτώμενη από iCa^{2+} αυξημένη ενεργοποιημένη κασπάση-3 (Caspase-3) (324). Στην παρούσα μελέτη, η θετική συσχέτιση των PLTs που εξωτερικεύουν PS με ή χωρίς τη συν-έκφραση της P-σελεκτίνης ($CD62P^{+}$) με τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου και των παραγόντων FX ή FXI πιθανά υποδηλώνει ότι τα PLTs έχουν ένα προ-αποπτωτικό ή/και προθρομβωτικό δυναμικό. Το προθρομβωτικό δυναμικό των PLTs πιθανά σε κάποιο βαθμό μετριάζεται από την αύξηση των πρωτεϊνών του ινωδολυτικού ή του ανασταλτικού συστήματος αιμόστασης, όπως υποδεικνύεται από τη θετική συσχέτιση τους με τα επίπεδα ATIII και πλασμινογόνου.

Μελέτες έχουν δείξει ότι κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης συμβαίνει ενεργοποίηση των PLTs (325). Ωστόσο άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι συχνά η αιμοκάθαρση μειώνει τους δείκτες ενεργοποίησης των PLTs (325,326). Σε συμφωνία με τις προηγούμενες μελέτες, η μελέτη έδειξε μείωση της P-σελεκτίνης των PLTs πιθανά ως αποτέλεσμα της αιμοκάθαρσης (327) ή της αυξημένης αιμοπεταλιακής μικροκυστιδιοποίησης (328). Οι εμμένουσες αυξημένες τιμές PFA ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που δεν επηρεάστηκαν κατά την αιμοκάθαρση, σε αντίθεση με

τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης της P-σελεκτίνης, υποδηλώνουν ότι η δυσλειτουργία των PLTs (που αντανακλάται στις αυξημένες τιμές PFA) είναι ανεξάρτητη από την έκφραση της P-σελεκτίνης στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, όπως έχει βρεθεί προηγούμενα σε παιδιά με σιδηροπενική αναιμία (329). Η σημαντική αύξηση των επιπέδων ινωδογόνου και παράγοντα vWF, δύο συστατικών των κοκκίων των PLTs που απελευθερώνονται μετά από τη διέγερσης τους, επίσης υποδηλώνει τη συνεχή ενεργοποίηση και αποκοκκίωση των PLTs κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης (330). Η επαγόμενη από την αιμοκάθαρση αποκοκκίωση των PLTs μπορεί επίσης να συμβάλλει στην αναστολή της ADAMTS-13 μέσω της απελευθέρωσης του αιμοπεταλιακού παράγοντα PF4 και της θρομβοσπονδίνης-1, όπως έχει περιγράφει και σε προηγούμενες μελέτες (257,308).

Τα αυξημένα επίπεδα ROS στα PLTs πιθανά να σχετίζονται με την ενεργοποίηση του υποδοχέα κολλαγόνου (331) και την τοξικότητα των ουραιμικών παραγόντων (223) καθώς μειώνονται σημαντικά μετά την αιμοκάθαρση. Η συσσωμάτωση των επαγόμενων από τη φλεγμονή ουδετερόφιλων και PLTs επάγει την παραγωγή ROS (332). Η αιμοκάθαρση προκαλεί μια προφλεγμονώδη κατάσταση με εκτεταμένες μικροαγγειακές τροποποιήσεις και αυξημένη παρουσία ουδετερόφιλων που μπορούν να αυξήσουν με τη σειρά τους την παραγωγή ROS από τα PLTs (333). Έχει δειχτεί ότι οι αυξημένες ενδοκυττάριες δραστικές ρίζες οξυγόνου λειτουργούν ως δείκτης ενεργοποίησης των PLTs. Επιπλέον, οι ROS είναι ικανές να ρυθμίζουν το σχηματισμό θρόμβων προκαλώντας προσκόλληση ινωδογόνου και απελευθέρωση των αιμοπεταλιακών κοκκίων (334). Στην πραγματικότητα, ο πιθανός αιμοστατικός ρόλος των PLTs με υψηλές ROS απεικονίζεται στις στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις τους με τις τιμές του ινωδογόνου, των Δ-Διμερών ινώδους και του INR. Αξίζει να αναφερθεί ότι η αυξημένη παραγωγή των ROS έχει συσχετιστεί και σε άλλες μελέτες με την έκφραση της P-σελεκτίνης (335), όπως και στους ασθενείς της παρούσας μελέτης. Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης, τα RBCs συμμετέχουν στο μηχανισμό ενεργοποίησης της αιμόστασης στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Μελέτες έχουν δείξει στο παρελθόν αυξημένα επίπεδα δραστικών ριζών οξυγόνου και έκφρασης φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που υποβάλλονται

σε αιμοκάθαρση (170). Τα υψηλά επίπεδα ROS προκαλούν βλάβες στη μεμβράνη των RBCs, κυρίως μεταβάλλοντας την κατανομή των λιπιδίων. Τέτοιου είδους μεταβολές τροποποιούν τη λειτουργία ανταλλαγής οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα και την ικανότητα παραμόρφωσης των RBCs ευνοώντας την ανάπτυξη θρομβώσεων.

Στις μέρες μας, τα RBCs θεωρούνται δυναμικοί ρυθμιστές του μηχανισμού της αιμόστασης, μέσω ποικίλων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της δέσμευσης μονοξειδίου του αζώτου, της απελευθέρωσης ADP και θρομβοξάνης A2 μετά από αιμόλυση, τη μικροκυστιδιοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και την άμεση αλληλεπίδραση με τα PLTs μέσω αλληλεπίδρασης Fas-FasL (μεμβρανικό μονοπάτι του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου) (79,99,336). Ειδικά όσον αφορά τη συσχέτιση με τα PLTs, τα RBCs επιδρούν τόσο επί των βιοφυσικών όσο και επί των βιοχημικών ιδιοτήτων των PLTs. Σε μεγάλα αγγεία με μεγάλο ρυθμό διάτμησης, τα RBCs επάγουν την αποκέντρωση των PLTs και τη συσσώρευσή τους στα αγγειακά τοιχώματα (337). Έχει δειχθεί ότι αυτή η μετακίνηση των PLTs συμβάλει σε αυξημένες αλληλεπιδράσεις με το αγγειακό τοίχωμα και ενισχύει την εναπόθεση PLTs στους θρόμβους ελαττώνοντας την απόσταση μεταξύ των κυκλοφορούντων PLTs και του σχηματισμένου θρόμβου και αυξάνοντας τη συχνότητα και τη δυναμική αυτών των αλληλεπιδράσεων (77,338). Επίσης, τα αιμολυμένα ή κατακερματισμένα RBCs απελευθερώνουν Hb και ADP, που ενισχύουν βιοχημικά την ενεργοποίηση και τη συσσώρευση των PLTs (100,104).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης βρέθηκε, ύστερα από στατιστική ανάλυση, θετική συσχέτιση στο ποσοστό των RBCs που είχαν αυξημένες δραστικές ρίζες οξυγόνου με την αυξημένη δραστικότητα αρκετών παραγόντων που συμμετέχουν στο μηχανισμό της αιμόστασης, συμπεριλαμβανομένων των παραγόντων vWF, Ricof, FVIII και FXIII. Σε αντίθεση, τα αποτελέσματα έδειξαν αρνητική συσχέτιση με το PFA/EPI μετά την αιμοκάθαρση. Όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν ενδεχόμενο λειτουργικό ρόλο των RBCs στην αιμόσταση στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.

Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν ενδείξεις που υποδηλώνουν τη δυναμική αλληλεπίδραση ανάμεσα στους παράγοντες FXIII και vWF και τα RBCs κατά τη διάρκεια του σχηματισμού θρόμβου (339). Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το γεγονός ότι παρόμοιες αλληλεπιδράσεις ανιχνεύθηκαν στα PLTs που βρέθηκαν με

αυξημένες ενδοκυττάριες ποσότητες ROS πριν τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης. Στα PLTs των ασθενών μετά την αιμοκάθαρση δεν ανιχνεύτηκαν αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάριων ROS, πιθανά λόγω της επιλεκτικής ευεργετικής επίδρασης της αιμοκάθαρσης στα PLTs αλλά όχι στα RBCs. Τέλος, τα RBCs που υπόκεινται σε οξειδωτικό στρες πιθανά συμμετέχουν στην προπηκτική κατάσταση των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια μέσω της απελευθέρωσης μικροκυστιδίων που είναι θετικά στην PS (169,198,340). Η PS που ανευρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη ορισμένων κυκλοφορούντων RBCs έχει δειχθεί ότι μπορεί να ενεργοποιήσει και να προάγει τη δημιουργία θρομβίνης *in vitro* (341). Επιπλέον, τα μικροκυστίδια που απελευθερώνονται από τα RBCs των ασθενών με ESRD έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες της βαρύτητας της νόσου, ενώ ενοχοποιούνται για την ανάπτυξη επιπλοκών μέσω μεταφοράς σημάτων κυτταρικού θανάτου και οξειδωτικού στρες (196).

Μία άλλη λειτουργία των RBCs που σχετίζεται με αυξημένη προπηκτική δράση είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν το ινωδογόνο γεγονός που συμβάλλει περαιτέρω στην προσκόλληση των RBCs στα αγγεία και στην αύξηση του ιξώδους του αίματος (133). Εντός του θρόμβου, τα RBCs μπορούν να επηρεάσουν τη δομή και τη σταθερότητά του, μέσω τροποποιήσεων στο δίκτυο του ινώδους και καταστολής της παραγωγής πλασμίνης (130). Επιπλέον, σε συνθήκες επαγόμενης από τα PLTs δημιουργίας θρόμβου, τα RBCs έρχονται κοντά μεταξύ τους και συσσωματώνονται, ελαττώνοντας τη διαπερατότητα στο σημείο του θρόμβου και εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την είσοδο θρομβολυτικών ενζύμων γεγονός που συνεπάγεται αύξηση του χρόνο που απαιτείται για τη ινωδόλυση (140). Κατά συνέπεια, το σημαντικά αυξημένο ινωδογόνο που παρατηρήθηκε μετά την αιμοκάθαρση στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια μπορεί να αλληλοεπιδράσει περαιτέρω με τα RBCs ή τα PLTs προάγοντας τη συσσωμάτωση των RBCs μεταξύ τους (RBCs-RBCs) ή συσσωμάτωση RBCs με PLTs (RBCs-PLTs) όπως έχει δειχτεί και από άλλες μελέτες (342,343).

Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη παρέχει επιπλέον στοιχεία για τον πολύπλοκο φαινότυπο του μηχανισμού της αιμόστασης στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Συγκεκριμένα αυτή η μελέτη έδειξε για πρώτη φορά την πιθανή αλληλεπίδραση των διαλυτών παραγόντων του πλάσματος που συμμετέχουν στην αιμόσταση και των κυττάρων του αίματος καθώς και τις αλληλεπιδράσεις τους. Επιπλέον, τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την επίδραση της αιμοκάθαρσης, ως θεραπεία των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, στην παθοφυσιολογία της αιμόστασης.

Οι ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου διατρέχουν κίνδυνο ισχαιμικών καρδιαγγειακών επιπλοκών και αγγειακής θρόμβωσης. Αυτές οι παρατηρήσεις έχουν οδηγήσει ποικίλες ερευνητικές ομάδες στη διερεύνηση των εμπλεκόμενων παθοφυσιολογικών μηχανισμών. Σε αυτές τις μελέτες χρησιμοποιούνται συνολικά ανοσολογικές και λειτουργικές δοκιμασίες για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων αντιγόνου πλάσματος και/ή των λειτουργικών δράσεων ποικίλλων παραμέτρων της αιμόστασης, συμπεριλαμβανομένων των παραγόντων XII, XI, IX, VIII, VII, X, II και XIII, του παράγοντα vWF, του ινωδογόνου, της φιμπρονεκτίνης, των Δ- διμερών ινώδους, της αντιθρομβίνης III, της πρωτεΐνης C, της πρωτεΐνης S, του πλασμινογόνου, του ενεργοποιητή ιστικού πλασμινογόνου, του αναστολέα ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, της α2-θρομβοξάνης, της α1-αντιθρυψίνης και της α2-μακροσφαιρίνης. Συγκεκριμένα, οι πηκτικές δραστηριότητες των παραγόντων XII, IX, X και II εμφανίζονται σημαντικά ελαττωμένες σε ασθενείς με ESRD. Οι εν λόγω ασθενείς εμφανίζουν επίσης υπερινωδογοναιμία και σημαντικές αυξήσεις των συγκεντρώσεων στο πλάσμα Δ-Διμερών ινώδους, παράγοντα von Willebrand, παράγοντα VII και παράγοντα XIII και μειωμένες συγκεντρώσεις της αντιθρομβίνης III, της ελεύθερης πρωτεΐνης S, του πλασμινογόνου και του ενεργοποιητή ιστικού πλασμινογόνου. Βάσει των παραπάνω δεδομένων, οι ασθενείς με ESRD εμφανίζουν πολυάριθμες διαταραχές σε διάφορα σημεία κατά μήκος του σηματοδοτικού καταρράκτη της αιμόστασης. Οι ακριβείς μηχανισμοί και η κλινική σημασία των παρατηρούμενων διαταραχών που εμπλέκονται στην παθογένεση των

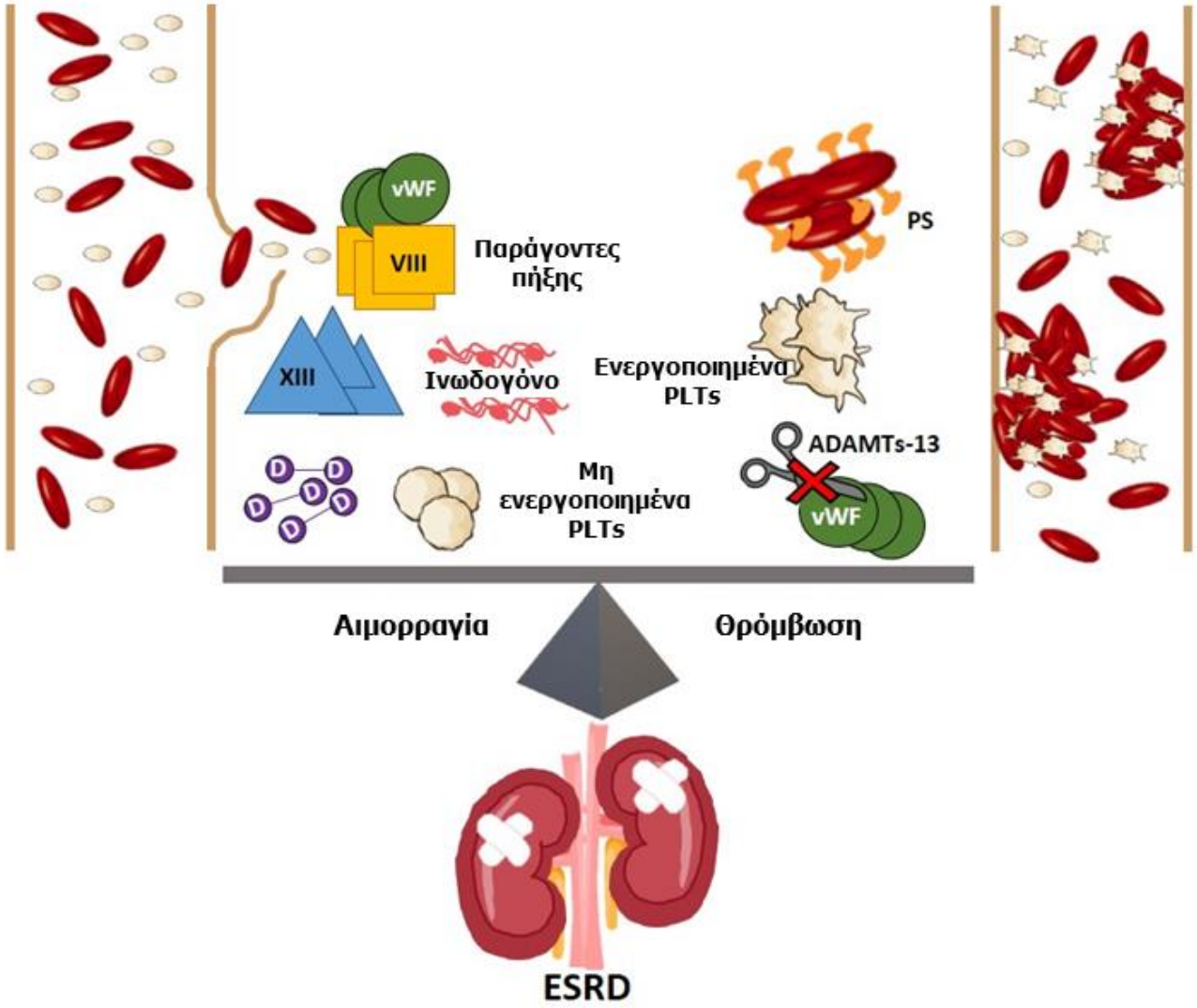
καρδιαγγειακών επιπλοκών και της αγγειακής θρόμβωσης, καθώς και οι επιδράσεις της αιμοκάθαρσης, βρίσκονται υπό διερεύνηση.

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης έδειξαν ότι οι ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση παρουσίασαν παράταση στο χρόνο προθρομβίνης και στο χρόνο μερικής θρομβοπλαστίνης μαζί με παρατεταμένο χρόνο ροής με συσσωρευτικές ουσίες, στοιχεία που χαρακτηρίζουν τους ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας. Επιπλέον, οι ίδιοι ασθενείς μετά την αιμοκάθαρση παρουσίασαν αυξημένους διαλυτούς παράγοντες του πλάσματος που συμμετέχουν στην αιμόσταση, όπως το ινωδογόνο, αυξημένη δραστηριότητα του παράγοντα vWF και μείωση της δραστηριότητας της ADAMTS-13, στοιχεία που χαρακτηρίζουν τους ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης. Το ενδιαφέρον εύρημα ήταν η αυξημένη έκφραση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη των PLTs και των RBCs, που μαζί με τα αυξημένα προϊόντα αποδόμησης του ινώδους (υπερινωδολυτική κατάσταση) και τα αυξημένα επίπεδα Δ-Διμερών ινώδους έχουν ενοχοποιηθεί για αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης.

Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης φαίνεται να αυξάνει το προθρομβωτικό δυναμικό των ασθενών μέσω της αύξησης της δραστικότητας αρκετών παραγόντων που συμμετέχουν στην αιμόσταση, όπως για παράδειγμα του ινωδογόνου και συγχρόνως της μείωσης της ADAMTS-13. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αιμοκάθαρση δρα ευεργετικά στην ενεργοποίηση των PLTs και μειώνει την παράταση του χρόνου προθρομβίνης και μερικής θρομβοπλαστίνης. Αυτή η δυσλειτουργία των PLTs μετά την αιμοκάθαρση πιθανά να δρα εξουδετερωτικά στην αυξημένη προδιάθεση για θρομβωτικά επεισόδια. Οι δυσλειτουργίες που ανιχνεύθηκαν στα RBCs ενισχύουν το προθρομβωτικό δυναμικό αυτών των ασθενών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η διαδικασία της αιμοκάθαρσης δε φαίνεται να αναιρεί τις βλάβες των RBCs.

Ο ανασταλτής ADAMTS-13 πιθανά να έχει λειτουργικό ρόλο στη διατήρησης της αιμόστασης στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Η πιθανή αλληλεπίδραση ενεργοποιημένων ή δυσλειτουργικών RBCs με τα PLTs, το θρόμβο, το ενδοθήλιο, και τα διαλυτά συστατικά της αιμόστασης, καθώς και η πρόσθετη συμβολή των μικροκυστιδίων στη διατήρηση της αιμόστασης χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για την αποσαφήνιση της αιμόστασης και τη

διακύμανσή της σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.



Εικόνα 28: Διαγραμματική απεικόνιση των κύριων ευρημάτων της παρούσας μελέτης (344). Οι ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (ESRD) χαρακτηρίζονται από έναν πολύπλοκο φαινότυπο αιμόστασης, που συνδυάζει προθρομβωτικά και αιμορραγικά χαρακτηριστικά. Η παρούσα μελέτη παρουσιάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαλυτών παραγόντων αιμόστασης και των κυττάρων του αίματος, καθώς και τις επιπτώσεις της αιμοκάθαρσης στο μηχανισμό της. Η επίδραση της αιμοκάθαρσης στην ενεργοποίηση αρκετών παραγόντων της πήξης πιθανά εξισορροπείται από τη σχετιζόμενη με τη νόσο δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων και τη μείωση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων που σχετίζεται με την αιμοκάθαρση. Οι ανωμαλίες των ερυθρών αιμοσφαιρίων φαίνεται επίσης να συμμετέχουν στο προθρομβωτικό δυναμικό των ασθενών με χρόνια νεφρική νόσο. **vWF**: Παράγοντας von Willebrand, **VIII**: Παράγοντας VIII, **XIII**: Παράγοντας XIII, **D-D**: D-διμερή, **PLTs:** Αιμοπετάλια, **PS:** Φωσφατιδυλοσερίνη, **ADAMTs-13**: Δισιντεγρίνη και μεταλλοπρωτεϊνάση με μοτίβο θρομβοσπονδίνης τύπου 1, της ομάδας 1

Αναφορές

1. Raghavendra M, Vidya M. Functions of kidney & artificial kidneys. Int J Innov Res. 2013;1(11):1–5.
2. Ogobuiro I, Tuma F. Physiology, Renal. In Treasure Island (FL); 2022.
3. Educational, Britannica. (2012) 2012. The Kidneys and the Renal System. [Edition missing]. Britannica Educational Publishing. https://www.perlego.com/book/1639338/the-kidneys-and-the-renal-system-pdf.
4. Lutz J, Menke J, Sollinger D, Schinzel H, Thürmel K. Haemostasis in chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. 2014 Jan 1;29(1):29–40.
5. Agarwal R. Defining end-stage renal disease in clinical trials: a framework for adjudication. Nephrol Dial Transplant. 2016 Jun 1;31(6):864–7.
6. Himmelfarb J, Ikizler TA. Hemodialysis. N Engl J Med. 2010 Nov;363(19):1833–45.
7. Koeppen BM, Stanton BA. Renal Physiology E-Book: Mosby Physiology Monograph Series. Elsevier Health Sciences; 2012.
8. Gueutin V, Deray G, Isnard-Bagnis C. Physiologie rénale. Bull Cancer. 2012;99(3):237–49.
9. Koushanpour E, Kriz W. Renal physiology: principles, structure, and function. Springer Science & Business media; 2013.
10. Klatte T, Ficarra V, Gratzke C, Kaouk J, Kutikov A, Macchi V, et al. A literature review of renal surgical anatomy and surgical strategies for partial nephrectomy. Eur Urol. 2015;68(6):980–92.
11. Natsis K, Piagkou M, Skotsimara A, Protogerou V, Tsitouridis I, Skandalakis P. Horseshoe kidney: a review of anatomy and pathology. Surg Radiol Anat. 2014;36(6):517–26.
12. Tortora GJ, Derrickson BH. Introduction to the human body. John Wiley & Sons; 2017.
13. Faria J, Ahmed S, Gerritsen KGF, Mihaila SM, Masereeuw R. Kidney-based in vitro models for drug-induced toxicity testing. Arch Toxicol. 2019;93(12):3397–418.
14. Taghavi K, Kirkpatrick J, Mirjalili SA. The horseshoe kidney: Surgical anatomy and embryology. J Pediatr Urol. 2016 Oct;12(5):275–80.
15. Wingerd B, Taylor PB. The human body: Concepts of anatomy and physiology. Jones & Bartlett Publishers; 2020.
16. Su W, Cao R, Zhang X, Guan Y. Aquaporins in the kidney: physiology and pathophysiology. Am J Physiol Physiol. 2020;318(1):F193–203.
17. Davis EM, Jones RM. Renal system. Patient Assessment in Pharmacy Practice. 2015. p. 293–307.
18. Verdecchia P, Gentile G, Angeli F, Reboldi G. Beyond blood pressure: evidence for cardiovascular, cerebrovascular, and renal protective effects of renin–angiotensin system blockers. Ther Adv Cardiovasc Dis. 2012;6(2):81–91.
19. Nocelli R, Cintra-Socolowski P, Roat T, Silva-Zacarin E, Malaspina O. Comparative physiology of Malpighian tubules: form and function. Insect Physiol. 2016;2016:13–23.
20. Beyenbach KW, Skaer H, Dow JAT. The developmental, molecular, and transport biology of Malpighian tubules. Annu Rev Entomol. 2010;55(1):351–74.
21. Gassee JP, Decoodt P, Verniory A, Lambert PP. Autoregulation of effective glomerular filtration pressure. Am J Physiol Content. 1974 Mar 1;226(3):616–23.
22. Stow LR, Gumz ML. The circadian clock in the kidney. J Am Soc Nephrol. 2011 Apr;22(4):598–604.
23. Sherwood L. Human physiology: from cells to systems. Cengage learning; 2015.
24. McLafferty E, Johnstone C, Hendry C, Farley A. The urinary system. Nurs Stand. 2014;28(27).
25. Nephron [Internet]. Available from:

https://www.teachmint.com/tfile/studymaterial/b-sc/science/nephron-parts-structure-diagramjpg/0d9597da-dbf8-49a8-aec1-afd9485c53dd
26. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C, et al. The human urine metabolome. PLoS One. 2013;8(9):e73076.
27. Rose C, Parker A, Jefferson B, Cartmell E. The characterization of feces and urine: a review of the literature to inform advanced treatment technology. Crit Rev Environ Sci Technol. 2015;45(17):1827–79.
28. Tangri N, Stevens LA, Griffith J, Tighiouart H, Djurdjev O, Naimark D, et al. A predictive model for progression of chronic kidney disease to kidney failure. Jama. 2011;305(15):1553–9.
29. Ortiz A, Covic A, Fliser D, Fouque D, Goldsmith D, Kanbay M, et al. Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure. Lancet. 2014;383(9931):1831–43.
30. Benjamin O, Lappin S. End Stage Renal Disease [Internet]. StatPearls [Internet]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499861/
31. Kazancioğlu R. Risk factors for chronic kidney disease: an update. Kidney Int Suppl. 2013 Dec;3(4):368–71.
32. Badve S V, Palmer SC, Hawley CM, Pascoe EM, Strippoli GFM, Johnson DW. Glomerular filtration rate decline as a surrogate end point in kidney disease progression trials. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 2016 Sep;31(9):1425–36.
33. Levey AS, Eckardt K-U, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Kidney Int. 2005 Jun;67(6):2089–100.
34. Vanholder R, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, et al. Uremic toxicity: present state of the art. Int J Artif Organs. 2001 Oct;24(10):695–725.
35. Castillo-Rodríguez E, Pizarro-Sánchez S, Sanz AB, Ramos AM, Sanchez-Niño MD, Martin-Cleary C, et al. Inflammatory cytokines as uremic toxins:"Ni son todos los que estan, ni estan todos los que son." Toxins (Basel). 2017;9(4):114.
36. Graboski AL, Redinbo MR. Gut-derived protein-bound uremic toxins. Toxins (Basel). 2020;12(9):590.
37. Rosner MH, Reis T, Husain-Syed F, Vanholder R, Hutchison C, Stenvinkel P, et al. Classification of uremic toxins and their role in kidney failure. Clin J Am Soc Nephrol. 2021;16(12):1918–28.
38. Vernaglione L, Marangi AL, Cristofano C, Giordano R, Chimienti S, Basile C. Predictors of serum creatinine in haemodialysis patients: a cross-sectional analysis. Nephrol Dial Transplant. 2003;18(6):1209–13.
39. Jansz TT, Noordzij M, Kramer A, Laruelle E, Couchoud C, Collart F, et al. Survival of patients treated with extended-hours haemodialysis in Europe: an analysis of the ERA-EDTA Registry. Nephrol Dial Transplant. 2020 Mar 1;35(3):488–95.
40. NIH: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Hemodialysis. [Internet]. Available from: https://www.niddk.nih.gov/health-information/kidney-disease/kidney-failure/hemodialysis
41. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. Indian J Anaesth. 2014;58(5):515.
42. Hews-Girard J, Guelcher C, Meldau J, McDonald E, Newall F. Principles and theory guiding development and delivery of patient education in disorders of thrombosis and hemostasis: Reviewing the current literature. Res Pract Thromb Haemost. 2017;1(2):162–71.
43. Davie EW, Hanahan DJ. Blood coagulation proteins. The plasma proteins. 2012;3:421–544.

44. Chang JC. Hemostasis based on a novel 'two-path unifying theory'and classification of hemostatic disorders. Blood Coagul Fibrinolysis. 2018;29(7):573–84.
45. Bang NU, Beller FK, Deutsch E. Thrombosis and bleeding disorders: theory and methods. Academic Press; 2014.
46. Wang Y, Carrim N, Ni H. Fibronectin orchestrates thrombosis and hemostasis. Oncotarget. 2015;6(23):19350.
47. Ikezoe T. Thrombomodulin/activated protein C system in septic disseminated intravascular coagulation. J Intensive Care. 2015;3(1):1.
48. Ogedegbe HO. An overview of hemostasis. Lab Med. 2002;33(12):948–53.
49. Loof TG, Deicke C, Medina E. The role of coagulation/fibrinolysis during Streptococcus pyogenes infection. Front Cell Infect Microbiol. 2014;4:128.
50. Momot AP, Nikolaeva MG, Yasafova NN, Zainulina MS, Momot KA, Taranenko IA. Clinical and laboratory manifestations of the prothrombin gene mutation in women of reproductive age. J Blood Med. 2019;10:255.
51. Suefuji H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Soejima H, Motoyama T, et al. Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction. Am Heart J. 1997 Aug;134(2 Pt 1):253–9.
52. Ornstein DL, Cushman M. Factor V Leiden. Circulation. 2003 Apr 22;107(15):e94–7.
53. Monroe DM, Hoffman M. Theories of blood coagulation: basic concepts and recent updates. Hemost Thromb. 2014;1.
54. De Pablo-Moreno JA, Serrano LJ, Revuelta L, Sánchez MJ, Liras A. The Vascular Endothelium and Coagulation: Homeostasis, Disease, and Treatment, with a Focus on the Von Willebrand Factor and Factors VIII and V. Vol. 23, International journal of molecular sciences. Department of Genetics, Physiology and Microbiology, School of Biology, Complutense University, 28040 Madrid, Spain.; 2022. p. 8283.
55. Gupta A, Tun AM, Gupta K, Tuma F. Protein S Deficiency. In Treasure Island (FL); 2022.
56. Acharya SS, Sarangi SN. Disorders of coagulation. In: Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology. Elsevier; 2016. p. 279–333.
57. Refaai MA, Riley P, Mardovina T, Bell PD. The clinical significance of fibrin monomers. Thromb Haemost. 2018;118(11):1856–66.
58. Chakrabarti S, Varghese S, Vitseva O, Tanriverdi K, Freedman JE. CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Nov;25(11):2428–34.
59. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Curr Biol. 2014 May;24(10):R453-62.
60. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo Y Do. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. Mol Cells. 2011 Dec;32(6):491–509.
61. Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Sci. 1999;65(18–19):1865–74.
62. Rondina MT, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets as cellular effectors of inflammation in vascular diseases. Circ Res. 2013 May;112(11):1506–19.
63. Ware J, Corken A, Khetpal R. Platelet function beyond hemostasis and thrombosis. Curr Opin Hematol. 2013 Sep;20(5):451–6.
64. Gobbi G, Carubbi C, Tagliazucchi GM, Masselli E, Mirandola P, Pigazzani F, et al. Sighting acute myocardial infarction through platelet gene expression. Sci Rep. 2019 Dec;9(1):19574.
65. Lippi G, Franchini M, Targher G. Arterial thrombus formation in cardiovascular disease. Nat Rev Cardiol. 2011 Jul;8(9):502–12.
66. Geraldo RB, Sathler PC, Lourenço AL, Saito MS, Cabral LM, Rampelotto PH, et al. Platelets: still a therapeutical target for haemostatic disorders. Int J Mol Sci. 2014 Oct;15(10):17901–19.

67. Freedman JE. Oxidative stress and platelets. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Mar;28(3):s11-6.
68. Eitan F, Mutaz D. Oxidative stress and platelet dysfunction. Thromb Haemost Res. 2018;2:1017.
69. Masselli E, Pozzi G, Vaccarezza M, Mirandola P, Galli D, Vitale M, et al. ROS in Platelet Biology: Functional Aspects and Methodological Insights. Int J Mol Sci. 2020 Jul;21(14).
70. Jackson SP, Schoenwaelder SM. Procoagulant platelets: are they necrotic? Blood. 2010 Sep;116(12):2011–8.
71. Bevers EM, Williamson PL. Getting to the Outer Leaflet: Physiology of Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane. Physiol Rev. 2016 Apr;96(2):605–45.
72. Yang M, Kholmukhamedov A, Schulte ML, Cooley BC, Scoggins NO, Wood JP, et al. Platelet CD36 signaling through ERK5 promotes caspase-dependent procoagulant activity and fibrin deposition in vivo. Blood Adv. 2018 Nov;2(21):2848–61.
73. Abbasian N, Millington-Burgess SL, Chabra S, Malcor J-D, Harper MT. Supramaximal calcium signaling triggers procoagulant platelet formation. Blood Adv. 2020 Jan;4(1):154–64.
74. Schoenwaelder SM, Yuan Y, Josefsson EC, White MJ, Yao Y, Mason KD, et al. Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. Blood. 2009 Jul;114(3):663–6.
75. Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. Blood Rev. 2012 Mar;26(2):51–63.
76. van Kruchten R, Mattheij NJA, Saunders C, Feijge MAH, Swieringa F, Wolfs JLN, et al. Both TMEM16F-dependent and TMEM16F-independent pathways contribute to phosphatidylserine exposure in platelet apoptosis and platelet activation. Blood. 2013 Mar;121(10):1850–7.
77. Wang W, Diacovo TG, Chen J, Freund JB, King MR. Simulation of platelet, thrombus and erythrocyte hydrodynamic interactions in a 3D arteriole with in vivo comparison. PLoS One. 2013;8(10):e76949.
78. Verduzco LA, Nathan DG. Sickle cell disease and stroke. Blood. 2009 Dec;114(25):5117–25.
79. Weisel JW, Litvinov RI. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. J Thromb Haemost. 2019 Feb;17(2):271–82.
80. Kroll MH, Michaelis LC, Verstovsek S. Mechanisms of thrombogenesis in polycythemia vera. Blood Rev. 2015 Jul;29(4):215–21.
81. Duke WW. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease: Description of a method for determining the bleeding time and coagulation time and report of three cases of hemorrhagic disease relieved by transfusion. J Am Med Assoc. 1910;55(14):1185–92.
82. Tokish JM, Kocher MS, Hawkins RJ. Ergogenic aids: a review of basic science, performance, side effects, and status in sports. Am J Sports Med. 2004;32(6):1543–53.
83. Barshtein G, Ben-Ami R, Yedgar S. Role of red blood cell flow behavior in hemodynamics and hemostasis. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2007;5(4):743–52.
84. Bäumler H, Neu B, Donath E, Kiesewetter H. Basic phenomena of red blood cell rouleaux formation. Biorheology. 1999;36(5–6):439–42.
85. Yu FTH, Armstrong JK, Tripette J, Meiselman HJ, Cloutier G. A local increase in red blood cell aggregation can trigger deep vein thrombosis: evidence based on quantitative cellular ultrasound imaging. J Thromb Haemost. 2011;9(3):481–8.
86. FÅHRAEUS R. The influence of the rouleau formation of the erythrocytes on the rheology of the blood. Acta Med Scand. 1958;161(2):151–65.
87. Spengler MI, Svetaz MJ, Leroux MB, Bertoluzzo SM, Carrara P, Van Isseldyk F, et al. Erythrocyte aggregation in patients with systemic lupus erythematosus. Clin

Hemorheol Microcirc. 2011;47(4):279–85.
88. Assayag E Ben, Bornstein N, Shapira I, Mardi T, Goldin Y, Tolshinski T, et al. Inflammation-sensitive proteins and erythrocyte aggregation in atherothrombosis. Int J Cardiol. 2005;98(2):271–6.
89. Lominadze D, Dean WL. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation. FEBS Lett. 2002;517(1–3):41–4.
90. Carvalho FA, Connell S, Miltenberger-Miltenyi G, Pereira SV, Tavares A, Ariëns RAS, et al. Atomic force microscopy-based molecular recognition of a fibrinogen receptor on human erythrocytes. ACS Nano. 2010;4(8):4609–20.
91. De Oliveira S, De Almeida VV, Calado A, Rosário HS, Saldanha C. Integrin-associated protein (CD47) is a putative mediator for soluble fibrinogen interaction with human red blood cells membrane. Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes. 2012;1818(3):481–90.
92. Barabino GA, Platt MO, Kaul DK. Sickle cell biomechanics. Annu Rev Biomed Eng. 2010 Aug;12:345–67.
93. Becatti M, Marcucci R, Gori AM, Mannini L, Grifoni E, Alessandrello Liotta A, et al. Erythrocyte oxidative stress is associated with cell deformability in patients with retinal vein occlusion. J Thromb Haemost. 2016 Nov;14(11):2287–97.
94. Diederich L, Suvorava T, Sansone R, Keller TCS 4th, Barbarino F, Sutton TR, et al. On the Effects of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide on Red Blood Cell Deformability. Front Physiol. 2018;9:332.
95. Huisjes R, Bogdanova A, van Solinge WW, Schiffelers RM, Kaestner L, van Wijk R. Squeezing for Life - Properties of Red Blood Cell Deformability. Front Physiol. 2018;9:656.
96. Dintenfass L. Inversion of the Fahraeus-Lindqvist phenomenon in blood flow through capillaries of diminishing radius. Nature. 1967 Sep;215(5105):1099–100.
97. Baskurt OK, Yalcin O, Ozdem S, Armstrong JK, Meiselman HJ. Modulation of endothelial nitric oxide synthase expression by red blood cell aggregation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Jan;286(1):H222-9.
98. Flamm MH, Diamond SL. Multiscale systems biology and physics of thrombosis under flow. Ann Biomed Eng. 2012 Nov;40(11):2355–64.
99. Klatt C, Krüger I, Zey S, Krott K-J, Spelleken M, Gowert NS, et al. Platelet-RBC interaction mediated by FasL/FasR induces procoagulant activity important for thrombosis. J Clin Invest. 2018 Aug;128(9):3906–25.
100. Reimers RC, Sutera SP, Joist JH. Potentiation by red blood cells of shear-induced platelet aggregation: relative importance of chemical and physical mechanisms. Blood. 1984 Dec;64(6):1200–6.
101. Sirachainan N. Thalassemia and the hypercoagulable state. Thromb Res. 2013;132(6):637–41.
102. Goel MS, Diamond SL. Adhesion of normal erythrocytes at depressed venous shear rates to activated neutrophils, activated platelets, and fibrin polymerized from plasma. Blood. 2002 Nov;100(10):3797–803.
103. White J, Lancelot M, Sarnaik S, Hines P. Increased erythrocyte adhesion to VCAM-1 during pulsatile flow: Application of a microfluidic flow adhesion bioassay. Clin Hemorheol Microcirc. 2015;60(2):201–13.
104. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. JAMA. 2005 Apr;293(13):1653–62.
105. Helms CC, Marvel M, Zhao W, Stahle M, Vest R, Kato GJ, et al. Mechanisms of hemolysis-associated platelet activation. J Thromb Haemost. 2013 Dec;11(12):2148–54.

106. Tran PL, Pietropaolo M-G, Valerio L, Brengle W, Wong RK, Kazui T, et al. Hemolysate-mediated platelet aggregation: an additional risk mechanism contributing to thrombosis of continuous flow ventricular assist devices. Perfusion. 2016 Jul;31(5):401–8.
107. Cubedo J, Suades R, Padro T, Martin-Yuste V, Sabate-Tenas M, Cinca J, et al. Erythrocyte-heme proteins and STEMI: implications in prognosis. Thromb Haemost. 2017 Oct;117(10):1970–80.
108. Gladwin MT, Lancaster JRJ, Freeman BA, Schechter AN. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. Nat Med. 2003 May;9(5):496–500.
109. Dubovoy T, Engoren M. Thrombotic Risks in Red Blood Cell Transfusions. Semin Thromb Hemost. 2016 Mar;42(2):102–11.
110. Wautier M-P, Héron E, Picot J, Colin Y, Hermine O, Wautier J-L. Red blood cell phosphatidylserine exposure is responsible for increased erythrocyte adhesion to endothelium in central retinal vein occlusion. J Thromb Haemost. 2011 May;9(5):1049–55.
111. Wautier J-L, Wautier M-P. Molecular basis of erythrocyte adhesion to endothelial cells in diseases. Clin Hemorheol Microcirc. 2013;53(1–2):11–21.
112. Du VX, Huskens D, Maas C, Al Dieri R, de Groot PG, de Laat B. New insights into the role of erythrocytes in thrombus formation. Semin Thromb Hemost. 2014 Feb;40(1):72–80.
113. Barr JD, Chauhan AK, Schaeffer G V, Hansen JK, Motto DG. Red blood cells mediate the onset of thrombosis in the ferric chloride murine model. Blood. 2013 May;121(18):3733–41.
114. Davenport RD. Pathophysiology of hemolytic transfusion reactions. Semin Hematol. 2005 Jul;42(3):165–8.
115. Camus SM, De Moraes JA, Bonnin P, Abbyad P, Le Jeune S, Lionnet F, et al. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. Blood. 2015 Jun;125(24):3805–14.
116. Shi J, Shi Y, Waehrens LN, Rasmussen JT, Heegaard CW, Gilbert GE. Lactadherin detects early phosphatidylserine exposure on immortalized leukemia cells undergoing programmed cell death. Cytom Part A J Int Soc Anal Cytol. 2006 Dec;69(12):1193–201.
117. Freikman I, Fibach E. Distribution and shedding of the membrane phosphatidylserine during maturation and aging of erythroid cells. Biochim Biophys Acta. 2011 Dec;1808(12):2773–80.
118. Whelihan MF, Mann KG. The role of the red cell membrane in thrombin generation. Thromb Res. 2013 May;131(5):377–82.
119. Kay JG, Grinstein S. Phosphatidylserine-mediated cellular signaling. Adv Exp Med Biol. 2013;991:177–93.
120. Whelihan MF, Mooberry MJ, Zachary V, Bradford RL, Ataga KI, Mann KG, et al. The contribution of red blood cells to thrombin generation in sickle cell disease: meizothrombin generation on sickled red blood cells. Vol. 11, Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2013. p. 2187–9.
121. Whelihan MF, Lim MY, Mooberry MJ, Piegore MG, Ilich A, Wogu A, et al. Thrombin generation and cell-dependent hypercoagulability in sickle cell disease. J Thromb Haemost. 2016 Oct;14(10):1941–52.
122. Whelihan MF, Zachary V, Orfeo T, Mann KG. Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation. Blood. 2012 Nov;120(18):3837–45.
123. Noubouossie D, Key NS, Ataga KI. Coagulation abnormalities of sickle cell disease: Relationship with clinical outcomes and the effect of disease modifying therapies. Blood Rev. 2016 Jul;30(4):245–56.
124. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, et al.

Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Dec;26(12):2594–604.
125. Rubin O, Crettaz D, Canellini G, Tissot J-D, Lion N. Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools. Vox Sang. 2008 Nov;95(4):288–97.
126. Morel O, Jesel L, Freyssinet J-M, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 Jan;31(1):15–26.
127. Kim Y, Xia BT, Jung AD, Chang AL, Abplanalp WA, Caldwell CC, et al. Microparticles from stored red blood cells promote a hypercoagulable state in a murine model of transfusion. Surgery. 2018 Feb;163(2):423–9.
128. Leal JKF, Adjobo-Hermans MJW, Bosman GJCGM. Red Blood Cell Homeostasis: Mechanisms and Effects of Microvesicle Generation in Health and Disease. Front Physiol. 2018;9:703.
129. van Beers EJ, Schaap MCL, Berckmans RJ, Nieuwland R, Sturk A, van Doormaal FF, et al. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. Haematologica. 2009 Nov;94(11):1513–9.
130. Gersh KC, Nagaswami C, Weisel JW. Fibrin network structure and clot mechanical properties are altered by incorporation of erythrocytes. Thromb Haemost. 2009 Dec;102(6):1169–75.
131. Tratar G, Blinc A, Podbregar M, Kralj E, Balazic J, Sabovic M, et al. Characterization of pulmonary emboli ex vivo by magnetic resonance imaging and ultrasound. Thromb Res. 2007;120(5):763–71.
132. Silvain J, Collet J-P, Nagaswami C, Beygui F, Edmondson KE, Bellemain-Appaix A, et al. Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 2011 Mar;57(12):1359–67.
133. Aleman MM, Byrnes JR, Wang J-G, Tran R, Lam WA, Di Paola J, et al. Factor XIII activity mediates red blood cell retention in venous thrombi. J Clin Invest. 2014 Aug;124(8):3590–600.
134. Byrnes JR, Duval C, Wang Y, Hansen CE, Ahn B, Mooberry MJ, et al. Factor XIIIa-dependent retention of red blood cells in clots is mediated by fibrin α-chain crosslinking. Blood. 2015 Oct;126(16):1940–8.
135. Kattula S, Byrnes JR, Martin SM, Holle LA, Cooley BC, Flick MJ, et al. Factor XIII in plasma, but not in platelets, mediates red blood cell retention in clots and venous thrombus size in mice. Blood Adv. 2018 Jan;2(1):25–35.
136. Wohner N, Sótonyi P, Machovich R, Szabó L, Tenekedjiev K, Silva MMCG, et al. Lytic resistance of fibrin containing red blood cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 Oct;31(10):2306–13.
137. Levin G, Sukhareva E, Lavrentieva A. Impact of microparticles derived from erythrocytes on fibrinolysis. J Thromb Thrombolysis. 2016 Apr;41(3):452–8.
138. Choi MH, Park GH, Lee JS, Lee SE, Lee S-J, Kim J-H, et al. Erythrocyte Fraction Within Retrieved Thrombi Contributes to Thrombolytic Response in Acute Ischemic Stroke. Stroke. 2018 Mar;49(3):652–9.
139. Villa CH, Pan DC, Johnston IH, Greineder CF, Walsh LR, Hood ED, et al. Biocompatible coupling of therapeutic fusion proteins to human erythrocytes. Blood Adv. 2018 Feb;2(3):165–76.
140. Cines DB, Lebedeva T, Nagaswami C, Hayes V, Massefski W, Litvinov RI, et al. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. Blood. 2014 Mar;123(10):1596–603.
141. Litvinov RI, Weisel JW. What Is the Biological and Clinical Relevance of Fibrin? Semin Thromb Hemost. 2016 Jun;42(4):333–43.
142. Ząbczyk M, Sadowski M, Zalewski J, Undas A. Polyhedrocytes in intracoronary thrombi

from patients with ST-elevation myocardial infarction. Vol. 179, International journal of cardiology. Netherlands; 2015. p. 186–7.
143. Leong L, Chernysh IN, Xu Y, Sim D, Nagaswami C, de Lange Z, et al. Clot stability as a determinant of effective factor VIII replacement in hemophilia A. Res Pract Thromb Haemost. 2017 Oct;1(2):231–41.
144. Jy W, Johansen ME, Bidot CJ, Horstman LL, Ahn YS. Red cell-derived microparticles (RMP) as haemostatic agent. Thromb Haemost. 2013 Oct;110(4):751–60.
145. Carson JL, Triulzi DJ, Ness PM. Indications for and Adverse Effects of Red-Cell Transfusion. N Engl J Med. 2017 Sep;377(13):1261–72.
146. Hess JR. Measures of stored red blood cell quality. Vox Sang. 2014 Jul;107(1):1–9.
147. Fischer D, Büssow J, Meybohm P, Weber CF, Zacharowski K, Urbschat A, et al. Microparticles from stored red blood cells enhance procoagulant and proinflammatory activity. Transfusion. 2017 Nov;57(11):2701–11.
148. Zecher D, Cumpelik A, Schifferli JA. Erythrocyte-derived microvesicles amplify systemic inflammation by thrombin-dependent activation of complement. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014 Feb;34(2):313–20.
149. Koch CG, Li L, Sessler DI, Figueroa P, Hoeltge GA, Mihaljevic T, et al. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. N Engl J Med. 2008 Mar;358(12):1229–39.
150. Goel R, Patel EU, Cushing MM, Frank SM, Ness PM, Takemoto CM, et al. Association of Perioperative Red Blood Cell Transfusions With Venous Thromboembolism in a North American Registry. JAMA Surg. 2018 Sep;153(9):826–33.
151. Liu C, Liu X, Janes J, Stapley R, Patel RP, Gladwin MT, et al. Mechanism of faster NO scavenging by older stored red blood cells. Redox Biol. 2014;2:211–9.
152. Gao Y, Lv L, Liu S, Ma G, Su Y. Elevated levels of thrombin-generating microparticles in stored red blood cells. Vox Sang. 2013 Jul;105(1):11–7.
153. Grimshaw K, Sahler J, Spinelli SL, Phipps RP, Blumberg N. New frontiers in transfusion biology: identification and significance of mediators of morbidity and mortality in stored red blood cells. Transfusion. 2011 Apr;51(4):874–80.
154. Byrnes JR, Wolberg AS. Red blood cells in thrombosis. Blood. 2017 Oct;130(16):1795–9.
155. Case AJ. On the origin of superoxide dismutase: an evolutionary perspective of superoxide-mediated redox signaling. Antioxidants. 2017;6(4):82.
156. Wang X, Wu Z, Song G, Wang H, Long M, Cai S. Effects of oxidative damage of membrane protein thiol groups on erythrocyte membrane viscoelasticities. Clin Hemorheol Microcirc. 1999;21(2):137–46.
157. Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. Front Physiol. 2014;5:84.
158. Rifkind JM, Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. Antioxid Redox Signal. 2013;18(17):2274–83.
159. Plewes K, Kingston HWF, Ghose A, Maude RJ, Herdman MT, Leopold SJ, et al. Cell-free hemoglobin mediated oxidative stress is associated with acute kidney injury and renal replacement therapy in severe falciparum malaria: an observational study. BMC Infect Dis. 2017;17(1):1–12.
160. Lang E, Lang F. Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. Semin Cell Dev Biol. 2015 Mar;39:35–42.
161. Pretorius E, du Plooy JN, Bester J. A Comprehensive Review on Eryptosis. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2016;39(5):1977–2000.
162. Weiss E, Cytlak UM, Rees DC, Osei A, Gibson JS. Deoxygenation-induced and Ca(2+) dependent phosphatidylserine externalisation in red blood cells from normal individuals and sickle cell patients. Cell Calcium. 2012 Jan;51(1):51–6.

163. Larsson A, Hult A, Nilsson A, Olsson M, Oldenborg P-A. Red blood cells with elevated cytoplasmic Ca(2+) are primarily taken up by splenic marginal zone macrophages and CD207+ dendritic cells. Transfusion. 2016 Jul;56(7):1834–44.
164. Lang F, Abed M, Lang E, Föller M. Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. Antioxid Redox Signal. 2014 Jul;21(1):138–53.
165. Mischitelli M, Jemaà M, Almasry M, Faggio C, Lang F. Ca2+ Entry, Oxidative Stress, Ceramide and Suicidal Erythrocyte Death Following Diosgenin Treatment. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2016;39(4):1626–37.
166. Georgatzakou HT, Antonelou MH, Papassideri IS, Kriebardis AG. Red blood cell abnormalities and the pathogenesis of anemia in end-stage renal disease. PROTEOMICS – Clin Appl. 2016 Aug 1;10(8):778–90.
167. Georgatzakou HT, Tzounakas VL, Velentzas AD, Papassideri IS, Kokkalis AC, Stamoulis KE, et al. Recipient's effects on stored red blood cell performance: the case of uremic plasma. Transfusion. 2019 Jun 1;59(6):1900–6.
168. Antonelou MH, Georgatzakou HT, Tzounakas VL, Velentzas AD, Kokkalis AC, Kriebardis AG, et al. Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study. J Proteomics. 2014;101:88–101.
169. Georgatzakou HT, Tzounakas VL, Kriebardis AG, Velentzas AD, Papageorgiou EG, Voulgaridou AI, et al. Pathophysiological aspects of red blood cells in end-stage renal disease patients resistant to recombinant human erythropoietin therapy. Eur J Haematol. 2017;98(6):590–600.
170. Georgatzakou HT, Tzounakas VL, Kriebardis AG, Velentzas AD, Kokkalis AC, Antonelou MH, et al. Short-term effects of hemodiafiltration versus conventional hemodialysis on erythrocyte performance. Can J Physiol Pharmacol. 2018 Mar;96(3):249–57.
171. Antonelou MH, Kriebardis AG, Velentzas AD, Kokkalis AC, Georgakopoulou S-C, Papassideri IS. Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. J Proteomics. 2011;74(11):2441–52.
172. Brzeszczynska J, Luciak M, Gwozdzinski K. Alterations of erythrocyte structure and cellular susceptibility in patients with chronic renal failure: effect of haemodialysis and oxidative stress. Free Radic Res. 2008;42(1):40–8.
173. Gwoździński K, Janicka M, Brzeszczyńska J, Luciak M. Changes in red blood cell membrane structure in patients with chronic renal failure. Acta Biochim Pol. 1997;44(1):99–107.
174. Ly J, Marticorena R, Donnelly S. Red blood cell survival in chronic renal failure. Am J Kidney Dis. 2004;44(4):715–9.
175. Vos FE, Schollum JB, Coulter C V, Doyle TCA, Duffull SB, Walker RJ. Red blood cell survival in long-term dialysis patients. Am J kidney Dis. 2011;58(4):591–8.
176. Dias GF, Grobe N, Rogg S, Jörg DJ, Pecoits-Filho R, Moreno-Amaral AN, et al. The Role of Eryptosis in the Pathogenesis of Renal Anemia: Insights From Basic Research and Mathematical Modeling. Front Cell Dev Biol. 2020;8.
177. Polaschegg H. Red blood cell damage from extracorporeal circulation in hemodialysis. In: Seminars in dialysis. Wiley Online Library; 2009. p. 524–31.
178. Sakota D, Sakamoto R, Sobajima H, Yokoyama N, Waguri S, Ohuchi K, et al. Mechanical damage of red blood cells by rotary blood pumps: selective destruction of aged red blood cells and subhemolytic trauma. Artif Organs. 2008;32(10):785–91.
179. Reeder BJ, Wilson MT. Hemoglobin and myoglobin associated oxidative stress: from molecular mechanisms to disease states. Curr Med Chem. 2005;12(23):2741–51.
180. Florens N, Calzada C, Lyasko E, Juillard L, Soulage CO. Modified lipids and lipoproteins in chronic kidney disease: a new class of uremic toxins. Toxins (Basel). 2016;8(12):376.

181. Sindhu KK. Uremic toxins: Some thoughts on acrolein and spermine. Ren Fail. 2016;38(10):1755–8.
182. Terawaki H, Yoshimura K, Hasegawa T, Matsuyama Y, Negawa T, Yamada K, et al. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. Kidney Int. 2004 Nov;66(5):1988–93.
183. Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A, et al. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. Am J kidney Dis Off J Natl Kidney Found. 2006 Nov;48(5):752–60.
184. Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubiña P, Lahera V, Luño J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. Kidney Int Suppl. 2008 Dec;(111):S4-9.
185. Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, Oubiña P, Cachofeiro V, Gómez-Campderá F, et al. Oxidative Stress in Uremia: The Role of Anemia Correction. J Am Soc Nephrol. 2006 Dec 1;17(12 suppl 3):S174 LP-S177.
186. Portaluppi F, Boari B, Manfredini R. Oxidative stress in essential hypertension. Curr Pharm Des. 2004;10(14):1695–8.
187. Diepeveen SHA, Wetzels JFM, Bilo HJG, van Tits LJH, Stalenhoef AFH. Cholesterol in end-stage renal disease: the good, the bad or the ugly? Neth J Med. 2008 Feb;66(2):53–61.
188. Modlinger PS, Wilcox CS, Aslam S. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. Semin Nephrol. 2004 Jul;24(4):354–65.
189. Mekki K, Taleb W, Bouzidi N, Kaddous A, Bouchenak M. Effect of hemodialysis and peritoneal dialysis on redox status in chronic renal failure patients: a comparative study. Lipids Health Dis. 2010 Sep;9:93.
190. Beigrezaei S, Nasri H. Oxidative stress in chronic kidney disease; an updated review on current concepts. J Ren Endocrinol. 2017;3(1):e01–e01.
191. Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T. Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. Vol. 45, Kidney international. United States; 1994. p. 1–9.
192. Abed M, Artunc F, Alzoubi K, Honisch S, Baumann D, Föller M, et al. Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease. J Mol Med (Berl). 2014 Aug;92(8):871–9.
193. Peuchant E, Carbonneau MA, Dubourg L, Thomas MJ, Perromat A, Vallot C, et al. Lipoperoxidation in plasma and red blood cells of patients undergoing haemodialysis: vitamins A, E, and iron status. Free Radic Biol Med. 1994 Mar;16(3):339–46.
194. Bissinger R, Artunc F, Qadri SM, Lang F. Reduced Erythrocyte Survival in Uremic Patients Under Hemodialysis or Peritoneal Dialysis. Kidney Blood Press Res. 2016;41(6):966–77.
195. Lang F, Bissinger R, Abed M, Artunc F. Eryptosis - the Neglected Cause of Anemia in End Stage Renal Disease. Kidney Blood Press Res. 2017;42(4):749–60.
196. Georgatzakou HT, Pavlou EG, Papageorgiou EG, Papassideri IS, Kriebardis AG, Antonelou MH. The Multi-Faced Extracellular Vesicles in the Plasma of Chronic Kidney Disease Patients . Vol. 8, Frontiers in Cell and Developmental Biology . 2020.
197. Gao C, Ji S, Dong W, Qi Y, Song W, Cui D, et al. Indolic uremic solutes enhance procoagulant activity of red blood cells through phosphatidylserine exposure and microparticle release. Toxins (Basel). 2015 Oct;7(11):4390–403.
198. Georgatzakou HT, Fortis SP, Papageorgiou EG, Antonelou MH, Kriebardis AG. Blood Cell-Derived Microvesicles in Hematological Diseases and beyond. Vol. 12, Biomolecules. 2022.
199. Bloom AL, Evans EP, Branch RA. Platelet function in chronic renal failure. Acta Univ Carol Med Monogr. 1972;53:333–8.
200. Baaten CC, Sternkopf M, Henning T, Marx N, Jankowski J, Noels H. Platelet function in CKD: A systematic review and meta-analysis. J Am Soc Nephrol. 2021;32(7):1583–98.

201. Huang M-J, Wei R-B, Wang Y, Su T-Y, Di P, Li Q-P, et al. Blood coagulation system in patients with chronic kidney disease: a prospective observational study. BMJ Open. 2017 Jun;7(5):e014294.
202. Lin S, Wu K, Chiu K, Lee C, Chiu Y, Chou Y, et al. Risk factors influencing the outcome of peptic ulcer bleeding in end stage renal diseases after initial endoscopic haemostasis. Int J Clin Pract. 2012;66(8):774–81.
203. Choi H-M, Kwon Y-E, Kim S, Oh D-J. Changes in FGF-23, neutrophil/platelet activation markers, and angiogenin in advanced chronic kidney disease and their effect on arterial stiffness. Kidney Blood Press Res. 2019;44(5):1166–78.
204. Daugirdas JT, Bernardo AA. Hemodialysis effect on platelet count and function and hemodialysis-associated thrombocytopenia. Kidney Int. 2012;82(2):147–57.
205. Lutz J. Platelets in advanced chronic kidney disease: two sides of the coin. In: Seminars in thrombosis and hemostasis. Thieme Medical Publishers; 2020. p. 342–56.
206. Gafter U, Bessler H, Malachi T, Zevin D, Djaldetti M, Levi J. Platelet count and thrombopoietic activity in patients with chronic renal failure. Nephron. 1987;45(3):207–10.
207. Slichter SJ. Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenic patients. Transfus Med Rev. 2004;18(3):153–67.
208. Makhloufi C, Crescence L, Darbousset R, McKay N, Massy ZA, Dubois C, et al. Assessment of thrombotic and bleeding tendency in two mouse models of chronic kidney disease: Adenine-diet and 5/6th nephrectomy. TH Open. 2020;4(02):e66–76.
209. Baaten CCFMJ, Schröer JR, Floege J, Marx N, Jankowski J, Berger M, et al. Platelet Abnormalities in CKD and Their Implications for Antiplatelet Therapy. Clin J Am Soc Nephrol. 2022 Jan 1;17(1):155 LP – 170.
210. Lüscher EF, Weber S. The formation of the haemostatic plug--a special case of platelet aggregation. An experiment and a survey of the literature. Thromb Haemost. 1993 Aug;70(2):234–7.
211. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. Semin Thromb Hemost. 2005;31(4):381–92.
212. Di Minno G, Martinez J, McKean ML, De La Rosa J, Burke JF, Murphy S. Platelet dysfunction in uremia. Multifaceted defect partially corrected by dialysis. Am J Med. 1985 Nov;79(5):552–9.
213. Boccardo P, Remuzzi G, Galbusera M. Platelet dysfunction in renal failure. Semin Thromb Hemost. 2004 Oct;30(5):579–89.
214. Smith MC, Dunn MJ. Impaired platelet thromboxane production in renal failure. Nephron. 1981;29(3–4):133–7.
215. Remuzzi G, Benigni A, Dodesini P, Schieppati A, Livio M, De Gaetano G, et al. Reduced platelet thromboxane formation in uremia. Evidence for a functional cyclooxygenase defect. J Clin Invest. 1983 Mar;71(3):762–8.
216. Castillo R, Lozano T, Escolar G, Revert L, López J, Ordinas A. Defective platelet adhesion on vessel subendothelium in uremic patients. Blood. 1986 Aug;68(2):337–42.
217. Mezzano D, Tagle R, Panes O, Pérez M, Downey P, Muñoz B, et al. Hemostatic disorder of uremia: the platelet defect, main determinant of the prolonged bleeding time, is correlated with indices of activation of coagulation and fibrinolysis. Thromb Haemost. 1996 Sep;76(3):312–21.
218. Larsson SO, Hedner U, Nilsson IM. ON COAGULATION AND FIBRINOLYSIS IN ACUTE RENAL INSUFFICIENCY. Acta Med Scand. 1971;189(1–6):443–51.
219. Escolar G, Díaz-Ricart M, Cases A. Uremic platelet dysfunction: past and present. Curr Hematol Rep. 2005 Sep;4(5):359–67.
220. Escolar G, Díaz-Ricart M, Cases A, Castillo R, Ordinas A, White JG. Abnormal cytoskeletal assembly in platelets from uremic patients. Am J Pathol. 1993 Sep;143(3):823–31.

221. Bazilinski N, Shaykh M, Dunea G, Mamdani B, Patel A, Czapek E, et al. Inhibition of platelet function by uremic middle molecules. Nephron. 1985;40(4):423–8.
222. Karbowska M, Kaminski TW, Marcinczyk N, Misztal T, Rusak T, Smyk L, et al. The uremic toxin indoxyl sulfate accelerates thrombotic response after vascular injury in animal models. Toxins (Basel). 2017;9(7):229.
223. Yang K, Du C, Wang X, Li F, Xu Y, Wang S, et al. Indoxyl sulfate induces platelet hyperactivity and contributes to chronic kidney disease-associated thrombosis in mice. Blood. 2017 May;129(19):2667–79.
224. Gawaz MP, Dobos G, Späth M, Schollmeyer P, Gurland HJ, Mujais SK. Impaired function of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in end-stage renal disease. J Am Soc Nephrol. 1994 Jul;5(1):36–46.
225. Chang M-C, Wang T-M, Yeung S-Y, Jeng P-Y, Liao C-H, Lin T-Y, et al. Antiplatelet effect by p-cresol, a uremic and environmental toxicant, is related to inhibition of reactive oxygen species, ERK/p38 signaling and thromboxane A2 production. Atherosclerosis. 2011 Dec;219(2):559–65.
226. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jul;87(13):5193–7.
227. Marietta M, Facchinetti F, Neri I, Piccinini F, Volpe A, Torelli G. L-arginine infusion decreases platelet aggregation through an intraplatelet nitric oxide release. Thromb Res. 1997 Oct;88(2):229–35.
228. Noris M, Benigni A, Boccardo P, Aiello S, Gaspari F, Todeschini M, et al. Enhanced nitric oxide synthesis in uremia: implications for platelet dysfunction and dialysis hypotension. Kidney Int. 1993 Aug;44(2):445–50.
229. Heemskerk JW, Vuist WM, Feijge MA, Reutelingsperger CP, Lindhout T. Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca2+ responses. Blood. 1997 Oct;90(7):2615–25.
230. Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, et al. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. Blood. 1996 Nov;88(9):3456–64.
231. Ando M, Iwata A, Ozeki Y, Tsuchiya K, Akiba T, Nihei H. Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients. Kidney Int. 2002 Nov;62(5):1757–63.
232. Fox SE, Akmatbekov A, Harbert JL, Li G, Quincy Brown J, Vander Heide RS. Pulmonary and cardiac pathology in African American patients with COVID-19: an autopsy series from New Orleans. Lancet Respir Med. 2020 Jul;8(7):681–6.
233. Han V, Serrano K, Devine D V. A comparative study of common techniques used to measure haemolysis in stored red cell concentrates. Vox Sang. 2010 Feb;98(2):116–23.
234. Tzounakas VL, Georgatzakou HT, Kriebardis AG, Voulgaridou AI, Stamoulis KE, Foudoulaki-Paparizos LE, et al. Donor variation effect on red blood cell storage lesion: a multivariable, yet consistent, story. Transfusion. 2016 Jun 1;56(6):1274–86.
235. A practical guide to haemostasis [Internet]. Available from: https://practical-haemostasis.com/Platelets/pfa.html
236. Glick M. Burket's oral medicine. PMPH USA; 2015.
237. Graf L, Moffat KA, Carlino SA, Chan AKC, Iorio A, Giulivi A, et al. Evaluation of an automated method for measuring von W illebrand factor activity in clinical samples without ristocetin. Int J Lab Hematol. 2014;36(3):341–51.
238. KANNO N, KANEKO M, SUZUKI A, YATOMI Y. Evaluation of Factor XIII Activity Using Berichrom FXIII Chromogenic Assay on the Fully-Automated Coagulation Analyzer CS-

2000i-Based on Comparisons with Universal Biochemical Analyzer and Antigen Method. Sysmex J Int. 2013;23(1).
239. CLAUSS A. [Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen]. Acta Haematol. 1957 Apr;17(4):237–46.
240. ARAI N, COLLINS A. Innovance® D-DIMER [Internet]. Available from: https://www.sysmex.co.jp/en/products_solutions/library/journal/vol18_no1/vol18_1_02.pdf
241. Deffert C, Esteve F, Grimaux M, Gouault-Heilmann M. A direct, automated, immuno-turbidimetric assay of free protein S antigen in plasma. Blood Coagul Fibrinolysis. 2001;12(2).
242. Assenov Y, Ramírez F, Schelhorn S-E, Lengauer T, Albrecht M. Computing topological parameters of biological networks. Bioinformatics. 2008 Jan;24(2):282–4.
243. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Am J kidney Dis Off J Natl Kidney Found. 2002 Feb;39(2 Suppl 1):S1-266.
244. Gäckler A, Rohn H, Lisman T, Benkö T, Witzke O, Kribben A, et al. Evaluation of hemostasis in patients with end-stage renal disease. PLoS One. 2019;14(2):e0212237.
245. van Bladel ER, de Jager RL, Walter D, Cornelissen L, Gaillard CA, Boven LA, et al. Platelets of patients with chronic kidney disease demonstrate deficient platelet reactivity in vitro. BMC Nephrol. 2012;13(1):127.
246. Baker P, Platton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, et al. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. Br J Haematol. 2020 Nov 1;191(3):347–62.
247. Yang R, Moosavi L. Prothrombin Time. In Treasure Island (FL); 2022.
248. Pavoni V, Gianesello L, Conti D, Ballo P, Dattolo P, Prisco D, et al. “In Less than No Time”: Feasibility of Rotational Thromboelastometry to Detect Anticoagulant Drugs Activity and to Guide Reversal Therapy. Vol. 11, Journal of Clinical Medicine. 2022.
249. Chung DW, Fujikawa K. Processing of von Willebrand Factor by ADAMTS-13. Biochemistry. 2002 Sep 1;41(37):11065–70.
250. Stevens PE, Levin A. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. Ann Intern Med. 2013 Jun;158(11):825–30.
251. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. JAMA. 2019 Oct;322(13):1294–304.
252. Levin A, Stevens PE, Bilous RW, Coresh J, De Francisco ALM, De Jong PE, et al. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. Kidney Int Suppl. 2013;3(1):1–150.
253. Neovius M, Jacobson SH, Eriksson JK, Elinder C-G, Hylander B. Mortality in chronic kidney disease and renal replacement therapy: a population-based cohort study. BMJ Open. 2014 Feb;4(2):e004251.
254. Meyer TW, Hostetter TH. Uremia. N Engl J Med. 2007 Sep;357(13):1316–25.
255. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. J Am Soc Nephrol. 2012 Jul;23(7):1258–70.
256. Kalantar-Zadeh K, Rodriguez RA, Humphreys MH. Association between serum ferritin and measures of inflammation, nutrition and iron in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 2004 Jan;19(1):141–9.
257. Nazy I, Elliott TD, Arnold DM. Platelet factor 4 inhibits ADAMTS13 activity and regulates

the multimeric distribution of von Willebrand factor. Br J Haematol. 2020 Aug;190(4):594–8.
258. Stenvinkel P. The role of inflammation in the anaemia of end-stage renal disease. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 2001;16 Suppl 7:36–40.
259. Fishbane S, Spinowitz B. Update on Anemia in ESRD and Earlier Stages of CKD: Core Curriculum 2018. Am J kidney Dis Off J Natl Kidney Found. 2018 Mar;71(3):423–35.
260. Babitt JL, Lin HY. Mechanisms of anemia in CKD. J Am Soc Nephrol. 2012 Oct;23(10):1631–4.
261. Kalantar-Zadeh K, Kalantar-Zadeh K, Lee GH. The Fascinating but Deceptive Ferritin: To Measure It or Not to Measure It in Chronic Kidney Disease? Clin J Am Soc Nephrol. 2006 Sep 1;1(Supplement 1):S9 LP-S18.
262. Fishbane S, Kalantar-Zadeh K, Nissenson AR. Serum ferritin in chronic kidney disease: reconsidering the upper limit for iron treatment. Vol. 17, Seminars in dialysis. United States; 2004. p. 336–41.
263. Thomson AM, Rogers JT, Leedman PJ. Iron-regulatory proteins, iron-responsive elements and ferritin mRNA translation. Int J Biochem Cell Biol. 1999 Oct;31(10):1139–52.
264. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochim Biophys Acta. 1996 Jul;1275(3):161–203.
265. Kwak EL, Larochelle DA, Beaumont C, Torti S V, Torti FM. Role for NF-κB in the Regulation of Ferritin H by Tumor Necrosis Factor-α (∗). J Biol Chem. 1995;270(25):15285–93.
266. Rogers JT, Bridges KR, Durmowicz GP, Glass J, Auron PE, Munro HN. Translational control during the acute phase response. Ferritin synthesis in response to interleukin-1. J Biol Chem. 1990;265(24):14572–8.
267. Rogers JT, Andriotakis JL, Lacroix L, Durmowicz GP, Kasschau KD, Bridges KR. Translational enhancement of H-ferritin mRNA by interleukin-1β acts through 5′ leader sequences distinct from the iron responsive element. Nucleic Acids Res. 1994;22(13):2678–86.
268. Bakkaloglu SA, Schaefer F. Diseases of the Kidney and Urinary Tract in Children. Brenner and Rector's The Kidney. 2012;2622–79.
269. Macdougall IC, Tucker B, Thompson J, Tomson CR, Baker LR, Raine AE. A randomized controlled study of iron supplementation in patients treated with erythropoietin. Kidney Int. 1996 Nov;50(5):1694–9.
270. Fudin R, Jaichenko J, Shostak A, Bennett M, Gotloib L. Correction of uremic iron deficiency anemia in hemodialyzed patients: a prospective study. Nephron. 1998;79(3):299–305.
271. Kooistra MP, Niemantsverdriet EC, van Es A, Mol-Beermann NM, Struyvenberg A, Marx JJ. Iron absorption in erythropoietin-treated haemodialysis patients: effects of iron availability, inflammation and aluminium. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 1998 Jan;13(1):82–8.
272. Eleftheriadis T, Liakopoulos V, Antoniadi G, Kartsios C, Stefanidis I. The role of hepcidin in iron homeostasis and anemia in hemodialysis patients. Semin Dial. 2009;22(1):70–7.
273. de Francisco ALM, Stenvinkel P, Vaulont S. Inflammation and its impact on anaemia in chronic kidney disease: from haemoglobin variability to hyporesponsiveness. NDT Plus. 2009 Jan;2(Suppl_1):i18–26.
274. Bowry SK, Gatti E. Impact of hemodialysis therapy on anemia of chronic kidney disease: the potential mechanisms. Blood Purif. 2011;32(3):210–9.
275. Tozoni SS, Dias GF, Bohnen G, Grobe N, Pecoits-Filho R, Kotanko P, et al. Uremia and

Hypoxia Independently Induce Eryptosis and Erythrocyte Redox Imbalance. Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol. 2019;53:794–804.
276. Bonomini M, Sirolli V. Uremic toxicity and anemia. J Nephrol. 2003;16(1):21–8.
277. Kruse A, Uehlinger DE, Gotch F, Kotanko P, Levin NW. Red blood cell lifespan, erythropoiesis and hemoglobin control. Contrib Nephrol. 2008;161:247–54.
278. Jalal DI, Chonchol M, Targher G. Disorders of hemostasis associated with chronic kidney disease. Semin Thromb Hemost. 2010 Feb;36(1):34–40.
279. Molino D, De Lucia D, Gaspare De Santo N. Coagulation disorders in uremia. Semin Nephrol. 2006 Jan;26(1):46–51.
280. Moake JL. Overview of hemostasis. The merck manual professional edition. 2013. [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 26]. Available from: http://www.merckmanuals.com/professional/hematology-and-oncology/hemostasis/overview-of-hemostasis.
281. Horowitz HI, Stein IM, Cohen BD, White JG. Further studies on the platelet-inhibitory effect of guanidinosuccinic acid and its role in uremic bleeding. Am J Med. 1970;49(3):336–45.
282. Linthorst GE, Avis HJ, Levi M. Uremic thrombocytopathy is not about urea. J Am Soc Nephrol. 2010 May;21(5):753–5.
283. Pavord S, Myers B. Bleeding and thrombotic complications of kidney disease. Blood Rev. 2011 Nov;25(6):271–8.
284. Eknoyan G, Brown CH 3rd. Biochemical abnormalities of platelets in renal failure. Evidence for decreased platelet serotonin, adenosine diphosphate and Mg-dependent adenosine triphosphatase. Am J Nephrol. 1981;1(1):17–23.
285. Bloom A, Greaves M, Preston FE, Brown CB. Evidence against a platelet cyclooxygenase defect in uraemic subjects on chronic haemodialysis. Br J Haematol. 1986 Jan;62(1):143–9.
286. Wratten ML, Tetta C, De Smet R, Neri R, Sereni L, Camussi G, et al. Uremic ultrafiltrate inhibits platelet-activating factor synthesis. Blood Purif. 1999;17(2–3):134–41.
287. Mekawy MA, Habashy DMM, Abd El-Mohsen WAM. Effect of hemodialysis on platelet function in end-stage renal disease Egyptian patients using in vitro closure time test (PFA-100 analyzer). Platelets. 2015;26(5):443–7.
288. Bilgin AU, Karadogan I, Artac M, Kizilors A, Bligin R, Undar L. Hemodialysis shortens long in vitro closure times as measured by the PFA-100. Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res. 2007 Mar;13(3):CR141-5.
289. Favaloro EJ. Utility of the von Willebrand factor collagen binding assay in the diagnosis of von Willebrand disease. Am J Hematol. 2017 Jan;92(1):114–8.
290. Jubelirer SJ. Hemostatic abnormalities in renal disease. Am J kidney Dis Off J Natl Kidney Found. 1985 May;5(5):219–25.
291. Spann AP, Campbell JE, Fitzgibbon SR, Rodriguez A, Cap AP, Blackbourne LH, et al. The Effect of Hematocrit on Platelet Adhesion: Experiments and Simulations. Biophys J. 2016 Aug;111(3):577–88.
292. Schmaier AH. Contact activation: a revision. Thromb Haemost. 1997 Jul;78(1):101–7.
293. Khalid A. Effect of Haemodialysis on Mean Prothrombin Time and Activated Partial Thromboplastin Time in Patients of End Stage Renal Disease. J Rawalpindi Med Coll. 2015 Dec 30;19(3 SE-Articles).
294. Ulusoy S, Ovali E, Aydin F, Erem C, Ozdemir F, Kaynar K. Hemostatic and fibrinolytic response to nasal desmopressin in hemodialysis patients. Med Princ Pract Int J Kuwait Univ Heal Sci Cent. 2004;13(6):340–5.
295. Abe M, Maruyama N, Suzuki H, Okada K, Soma M. International normalized ratio decreases after hemodialysis treatment in patients treated with warfarin. J Cardiovasc Pharmacol. 2012 Dec;60(6):502–7.

296. Casonato A, Pontara E, Vertolli UP, Steffan A, Durante C, De Marco L, et al. Plasma and platelet von Willebrand factor abnormalities in patients with uremia: lack of correlation with uremic bleeding. Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb. 2001 Apr;7(2):81–6.
297. Chavin SI. Factor VIII: structure and function in blood clotting. Am J Hematol. 1984 Apr;16(3):297–306.
298. Holden RM, Tuttle A, Burbidge T, Hegadorn C, Grabell J, Pruss C, et al. Quantitative and qualitative changes of von Willebrand factor and their impact on mortality in patients with end-stage kidney disease. Blood Coagul fibrinolysis an Int J Haemost Thromb. 2013 Oct;24(7):719–26.
299. Boneu B, Abbal M, Plante J, Bierme R. Letter: Factor-VIII complex and endothelial damage. Lancet (London, England). 1975 Jun;1(7922):1430.
300. Turner NA, Moake JL. Factor VIII Is Synthesized in Human Endothelial Cells, Packaged in Weibel-Palade Bodies and Secreted Bound to ULVWF Strings. PLoS One. 2015;10(10):e0140740.
301. van der Vorm LN, Visser R, Huskens D, Veninga A, Adams DL, Remijn JA, et al. Circulating active von Willebrand factor levels are increased in chronic kidney disease and end-stage renal disease. Clin Kidney J. 2020 Feb;13(1):72–4.
302. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong J. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. Blood. 2004 Jul;104(1):100–6.
303. Ocak G, Roest M, Verhaar MC, Rookmaaker MB, Blankestijn PJ, Bos WJW, et al. Von Willebrand factor, ADAMTS13 and mortality in dialysis patients. BMC Nephrol. 2021 Jun;22(1):222.
304. Tsai H-M. Thrombotic thrombocytopenic purpura: a thrombotic disorder caused by ADAMTS13 deficiency. Hematol Oncol Clin North Am. 2007;21(4):609–32.
305. Peyvandi F, Ferrari S, Lavoretano S, Canciani MT, Mannucci PM. von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) and ADAMTS-13 neutralizing autoantibodies in 100 patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol. 2004 Nov;127(4):433–9.
306. Nguyen TC, Liu A, Liu L, Ball C, Choi H, May WS, et al. Acquired ADAMTS-13 deficiency in pediatric patients with severe sepsis. Haematologica. 2007 Jan;92(1):121–4.
307. Pillai VG, Bao J, Zander CB, McDaniel JK, Chetty PS, Seeholzer SH, et al. Human neutrophil peptides inhibit cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13: a potential link of inflammation to TTP. Blood. 2016 Jul;128(1):110–9.
308. Novelli EM, Kato GJ, Hildesheim ME, Barge S, Meyer MP, Lozier J, et al. Thrombospondin-1 inhibits ADAMTS13 activity in sickle cell disease. Vol. 98, Haematologica. 2013. p. e132-4.
309. Schwameis M, Schörgenhofer C, Assinger A, Steiner MM, Jilma B. VWF excess and ADAMTS13 deficiency: a unifying pathomechanism linking inflammation to thrombosis in DIC, malaria, and TTP. Thromb Haemost. 2015;113(04):708–18.
310. Reuken PA, Kussmann A, Kiehntopf M, Budde U, Stallmach A, Claus RA, et al. Imbalance of von Willebrand factor and its cleaving protease ADAMTS 13 during systemic inflammation superimposed on advanced cirrhosis. Liver Int. 2015;35(1):37–45.
311. Peigne V, Azoulay E, Coquet I, Mariotte E, Darmon M, Legendre P, et al. The prognostic value of ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats, member 13) deficiency in septic shock patients involves interleukin-6 and is not dependent on disseminated intravascular coagulation. Crit care. 2013;17(6):1–10.
312. Enooku K, Kato R, Ikeda H, Kurano M, Kume Y, Yoshida H, et al. Inverse correlations between serum ADAMTS13 levels and systolic blood pressure, pulse pressure, and serum C-reactive protein levels observed at a general health examination in a Japanese

population: a cross-sectional study. Clin Chim Acta. 2013 Jun;421:147–51.
313. Simurda T, Zolkova J, Kolkova Z, Loderer D, Dobrotova M, Skornova I, et al. Comparison of clinical phenotype with genetic and laboratory results in 31 patients with congenital dysfibrinogenemia in northern Slovakia. Int J Hematol. 2020 Jun;111(6):795–802.
314. Taslimi R, Golshani K. Thrombotic and hemorrhagic presentation of congenital hypo/afibrinogenemia. Am J Emerg Med. 2011 Jun;29(5):573.e3-5.
315. Hayes T. Dysfibrinogenemia and thrombosis. Arch Pathol Lab Med. 2002 Nov;126(11):1387–90.
316. Simurda T, Vilar R, Zolkova J, Ceznerova E, Kolkova Z, Loderer D, et al. A Novel Nonsense Mutation in FGB (c.1421G>A; p.Trp474Ter) in the Beta Chain of Fibrinogen Causing Hypofibrinogenemia with Bleeding Phenotype. Biomedicines. 2020;8(12).
317. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. Blood Rev. 2015 Jan;29(1):17–24.
318. Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. Circulation. 2003 Jan;107(1):87–92.
319. Machlus KR, Cardenas JC, Church FC, Wolberg AS. Causal relationship between hyperfibrinogenemia, thrombosis, and resistance to thrombolysis in mice. Blood. 2011 May;117(18):4953–63.
320. Merten M, Thiagarajan P. P-Selectin Expression on Platelets Determines Size and Stability of Platelet Aggregates. Circulation. 2000;102(16):1931–6.
321. Théorêt J-F, Chahrour W, Yacoub D, Merhi Y. Recombinant P-selectin glycoprotein-ligand-1 delays thrombin-induced platelet aggregation: a new role for P-selectin in early aggregation. Br J Pharmacol. 2006 Jun;148(3):299–305.
322. Arya M, Anvari B, Romo GM, Cruz MA, Dong J-F, McIntire L V, et al. Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. Blood. 2002 Jun;99(11):3971–7.
323. Tracy PB, Mann KG. Prothrombinase complex assembly on the platelet surface is mediated through the 74,000-dalton component of factor Va. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Apr;80(8):2380–4.
324. Bonomini M, Dottori S, Amoroso L, Arduini A, Sirolli V. Increased platelet phosphatidylserine exposure and caspase activation in chronic uremia. J Thromb Haemost. 2004 Aug;2(8):1275–81.
325. Aggarwal A, Kabbani SS, Rimmer JM, Gennari FJ, Taatjes DJ, Sobel BE, et al. Biphasic effects of hemodialysis on platelet reactivity in patients with end-stage renal disease: a potential contributor to cardiovascular risk. Am J kidney Dis Off J Natl Kidney Found. 2002 Aug;40(2):315–22.
326. Mourikis P, Helten C, Dannenberg L, Hohlfeld T, Stegbauer J, Petzold T, et al. Platelet reactivity in patients with chronic kidney disease and hemodialysis. J Thromb Thrombolysis. 2020 Jan;49(1):168–72.
327. Sobol AB, Kaminska M, Walczynska M, Walkowiak B. Effect of uremia and hemodialysis on platelet apoptosis. Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb. 2013 Jun;19(3):320–3.
328. de Laval P, Mobarrez F, Almquist T, Vassil L, Fellström B, Soveri I. Acute effects of haemodialysis on circulating microparticles. Clin Kidney J. 2019 Jun;12(3):456–62.
329. Yıldırım ZK, Orhan MF, Büyükavcı M. Platelet function alterations and their relation to P-selectin (CD62P) expression in children with iron deficiency anemia. Blood Coagul fibrinolysis an Int J Haemost Thromb. 2011 Mar;22(2):98–101.
330. Schoorl M, Grooteman MPC, Bartels PCM, Nubé MJ. Aspects of platelet disturbances in haemodialysis patients. Clin Kidney J. 2013 Jun;6(3):266–71.

331. Qiao J, Arthur JF, Gardiner EE, Andrews RK, Zeng L, Xu K. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. Redox Biol. 2018 Apr;14:126–30.
332. Gawaz MP, Mujais SK, Schmidt B, Gurland HJ. Platelet-leukocyte aggregation during hemodialysis. Kidney Int. 1994;46(2):489–95.
333. Himmelfarb J, Ault KA, Holbrook D, Leeber DA, Hakim RM. Intradialytic granulocyte reactive oxygen species production: a prospective, crossover trial. J Am Soc Nephrol. 1993 Aug;4(2):178–86.
334. Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM, Buczyński A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. Platelets. 2002 May;13(3):175–82.
335. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet granule release is associated with reactive oxygen species generation during platelet storage: A direct link between platelet pro-inflammatory and oxidation states. Thromb Res. 2017 Aug;156:101–4.
336. Burton JO, Hamali HA, Singh R, Abbasian N, Parsons R, Patel AK, et al. Elevated levels of procoagulant plasma microvesicles in dialysis patients. PLoS One. 2013;8(8):e72663.
337. Fogelson AL, Neeves KB. Fluid Mechanics of Blood Clot Formation. Annu Rev Fluid Mech. 2015 Jan;47:377–403.
338. Walton BL, Lehmann M, Skorczewski T, Holle LA, Beckman JD, Cribb JA, et al. Elevated hematocrit enhances platelet accumulation following vascular injury. Blood. 2017 May;129(18):2537–46.
339. Smeets MWJ, Mourik MJ, Niessen HWM, Hordijk PL. Stasis Promotes Erythrocyte Adhesion to von Willebrand Factor. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017 Sep;37(9):1618–27.
340. Sudnitsyna J, Skverchinskaya E, Dobrylko I, Nikitina E, Gambaryan S, Mindukshev I. Microvesicle Formation Induced by Oxidative Stress in Human Erythrocytes. Antioxidants (Basel, Switzerland). 2020 Sep;9(10).
341. Peyrou V, Lormeau JC, Hérault JP, Gaich C, Pfliegger AM, Herbert JM. Contribution of erythrocytes to thrombin generation in whole blood. Thromb Haemost. 1999 Mar;81(3):400–6.
342. Goel S, Sahay P, Singhal D, Maharana PK, Titiyal JS, Sharma N. Intraoperative optical coherence tomography-guided release of lenticulo-corneal adhesion and lens aspiration in anterior dislocation of lens with corneal edema. Indian J Ophthalmol. 2020 Mar;68(3):510–2.
343. Semenov AN, Lugovtsov AE, Shirshin EA, Yakimov BP, Ermolinskiy PB, Bikmulina PY, et al. Assessment of Fibrinogen Macromolecules Interaction with Red Blood Cells Membrane by Means of Laser Aggregometry, Flow Cytometry, and Optical Tweezers Combined with Microfluidics. Biomolecules. 2020 Oct;10(10).
344. Pavlou EG, Georgatzakou HT, Fortis SP, Tsante KA, Tsantes AG, Nomikou EG, et al. Coagulation Abnormalities in Renal Pathology of Chronic Kidney Disease: The Interplay between Blood Cells and Soluble Factors. Biomolecules. 2021 Sep;11(9).

Παράρτημα

biomolecules

MDPI

Article

Coagulation Abnormalities in Renal Pathology of Chronic Kidney Disease: The Interplay between Blood Cells and Soluble Factors

Efthimia G. Pavlou [1,†], Hara T. Georgatzakou [1,†], Sotirios P. Fortis [1], Konstantina A. Tsante [1], Andreas G. Tsantes [1], Efrosyni G. Nomikou [2], Athanasia I. Kapota [3], Dimitrios I. Petras [3], Maria S. Venetikou [4], Effie G. Papageorgiou [1], Marianna H. Antonelou [5] and Anastasios G. Kriebardis [1,*]

[1] Laboratory of Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology (HemQcR), Department of Biomedical Sciences, School of Health & Caring Sciences, University of West Attica (UniWA), 12243 Egaleo, Greece; epavlou@uniwa.gr (E.G.P.); cgeorgatz@uniwa.gr (H.T.G.); sfortis@uniwa.gr (S.P.F.); bisc19678318@uniwa.gr (K.A.T.); andreas.tsantes@yahoo.com (A.G.T.); efipapag@uniwa.gr (E.G.P.)
[2] Blood Bank and Hemophilia Unit, Hippokration Hospital, 11527 Athens, Greece; efrosyni.nomikou@gmail.com
[3] Nephrology Department, Hippokration Hospital, 11527 Athens, Greece; nancy85kap@yahoo.gr (A.I.K.); petrasdim@hotmail.com (D.I.P.)
[4] Laboratory of Anatomy-Pathological Anatomy & Physiology Nutrition, Department of Biomedical Sciences, School of Health & Caring Sciences, University of West Attica (UniWA), 12243 Egaleo, Greece; mvenet@uniwa.gr
[5] Department of Biology, Section of Cell Biology & Biophysics, School of Science, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), 15784 Athens, Greece; manton@biol.uoa.gr
* Correspondence: akrieb@uniwa.gr; Tel.: +30-2105385813
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Coagulation abnormalities in renal pathology are associated with a high thrombotic and hemorrhagic risk. This study aims to investigate the hemostatic abnormalities that are related to the interaction between soluble coagulation factors and blood cells, and the effects of hemodialysis (HD) on it, in end stage renal disease (ESRD) patients. Thirty-two ESRD patients under HD treatment and fifteen healthy controls were included in the study. Whole blood samples from the healthy and ESRD subjects were collected before and after the HD session. Evaluation of coagulation included primary and secondary hemostasis screening tests, proteins of coagulation, fibrinolytic and inhibitory system, and ADAMTS-13 activity. Phosphatidylserine (PS) exposure and intracellular reactive oxygen species (iROS) levels were also examined in red blood cells and platelets, in addition to the platelet activation marker CD62P. Platelet function analysis showed pathological values in ESRD patients despite the increased levels of activation markers (PS, CD62P, iROS). Activities of most coagulation, fibrinolytic, and inhibitory system proteins were within the normal range, but HD triggered an increase in half of them. Additionally, the increased baseline levels of ADAMTS-13 inhibitor were further augmented by the dialysis session. Finally, pathological levels of PS and iROS were measured in red blood cells in close correlation with variations in several coagulation factors and platelet characteristics. This study provides evidence for a complex coagulation phenotype in ESRD. Signs of increased bleeding risk coexisted with prothrombotic features of soluble factors and blood cells in a general hyperfibrinolytic state. Hemodialysis seems to augment the prothrombotic potential, while the persisted platelet dysfunction might counteract the increased predisposition to thrombotic events post-dialysis. The interaction of red blood cells with platelets, the thrombus, the endothelium, the soluble components of the coagulation pathways, and the contribution of extracellular vesicles on hemostasis as well as the identification of the unknown origin ADAMTS-13 inhibitor deserve further investigation in uremia.

Keywords: coagulation factors; chronic kidney disease; hemodialysis; ADAMTS-13 inhibitor; platelet dysfunction; thrombotic risk; red blood cells

check for updates

Citation: Pavlou, E.G.; Georgatzakou, H.T.; Fortis, S.P.; Tsante, K.A.; Tsantes, A.G.; Nomikou, E.G.; Kapota, A.I.; Petras, D.I.; Venetikou, M.S.; Papageorgiou, E.G.; et al. Coagulation Abnormalities in Renal Pathology of Chronic Kidney Disease: The Interplay between Blood Cells and Soluble Factors. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1309. https://doi.org/10.3390/biom11091309

Academic Editor: Gregory Barshtein

Received: 13 August 2021
Accepted: 2 September 2021
Published: 4 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Along with anemia, coagulation disorders constitute major hematological abnormalities observed in renal pathology [1]. Uremic toxin accumulation in patients with end stage renal disease (ESRD) promotes platelet abnormalities which are considered to be responsible for the bleeding risk that most of these patients must face [2]. However, there are many additional risk factors potentially leading to thrombotic events in this group of patients, including blood abnormalities, inflammation, comorbidities, and endothelial dysfunction [3].

At the same time, even though hemodialysis is the main renal replacement therapy used for the elimination of toxic byproducts, it is also supposed to trigger venous thromboembolism [4]. So, the existing studies in hemostatic abnormalities in ESRD are complicated by reporting increased risk for bleeding along with ongoing thrombotic events.

The present study is the first one that investigates the crosstalk between soluble coagulation factors and blood cells, its association with the hemostatic abnormalities, and the effects of hemodialysis therapy on it in ESRD patients.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

Thirty-two ESRD patients under maintenance hemodialysis and fifteen age- and gender-matched healthy subjects exhibiting normal hematological profile and taking no medication or food supplements were included in the study. ESRD patients have been on regular hemodialysis thrice per week (mean time on dialysis 41.3 $\pm$ 21.4 months), using high-flux biocompatible dialyzer membranes (Deerfield, USA). They were receiving rhEPO (Epoetin Alfa HEXAL, Sandoz GmbH, Kundl, Austria) (on average 6833.3 $\pm$ 3588.7 IU/week and heparin 4470 $\pm$ 1243 IU/session) and were clinically stable at the time of investigation. The primary cause of renal failure was hypertensive nephropathy (n = 11), polycystic kidney disease (n = 5), glomerulonephritis (n = 2), and chronic renal failure of unknown etiology (n = 14). Patients with diabetes mellitus, uncontrolled hypertension, active infections, malignant, inflammatory, autoimmune or hematological diseases, or those who needed to get a blood transfusion over the past 3 months were excluded from the study. All ESRD patients and control subjects were negative for anti-b2-glycoprotein I (b2-GPI) and anti-cardiolipin antibodies as well as for lupus anticoagulants. Activated Protein C Resistance assay had been also performed to exclude Factor V Leiden deficiency in all participants.

Whole blood samples from healthy subjects and ESRD patients, before and immediately after the end of HD session, were collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 3.2% sodium citrate blood collection tubes (BD Vacutainer Blood Collection Tubes, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The study has been submitted and approved by the Research Ethics Committee of the Department of Biomedical Sciences/UNIWA. Investigations were carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all participants.

2.2. Material Supplies

All materials and common chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Munich, Germany), unless otherwise stated. Detection of lupus anticoagulants was performed by using qualitative HemosIL dRVVT Screen/dRVVT Confirm assays in ACL TOP Hemostasis Analyzer (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA). For the quantitative determination of anti-b2 glycoprotein and anti-cardiolipin IgG/IgM, Elisa kits by Delta Biologicals Srl were used according to manufacturer instructions (Erba Diagnostics Inc., Pomezia, Roma, Italy). Assessment of Activated Protein C Resistance was performed by STA-STACLOT APC-R (Diagnostica Stago, Parsippany, NJ, USA). Antibodies used for flow cytometry were obtained from BD Biosciences (San Jose, CA, USA).

2.3. Hematological and Serum Biochemical Analysis

General blood tests were performed by using a Siemens Advia 2120i Hematology Analyzer. For the biochemical analysis of serum components (urea, creatinine, uric acid, parathormone, glucose, cholesterol, triglycerides, calcium, phosphorus, potassium, sodium, chlorine, magnesium, iron, ferritin, total iron-binding capacity, proteins, albumin, b2-microglobulin, serum glutamyl oxalate transaminase, serum glutamyl pyruvate transaminase, gamma-glutamyl transferase, alkaline phosphatase, total bilirubin, indirect bilirubin, direct bilirubin, creatine phosphokinase, amylase, lactate dehydrogenase, and vitamin-D) the automatic Clinical Chemistry Analyzer ARCHITECT C16000 (Abbott, Illinois, IL, USA) was used. hs-CRP levels were determined with a commercial kit [Abbott Laboratories, Hellas (Greece)] in the Architect C8000 analyzer. Plasma free hemoglobin (fHb) was calculated by the method of Harboe [5].

2.4. Measurement of Intracellular ROS Levels

Intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) were detected by using the membrane-permeable fluorescent probe CMH_2DCFDA (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Briefly, red blood cells (RBCs) diluted at 0.4% hematocrit in PBS/5 mM D-glucose were loaded with 20 μM CM-H_2DCFDA for 60 min at 37 °C, in the dark. For the determination of the intracellular ROS levels in platelets (PLTs), platelet-rich plasma (PRP) was obtained after centrifugation at 200× *g* for 20 min, at 24 °C. PRP was then diluted in HEPES Tyrode's buffer (138 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 5.5 mM glucose, 5 mM Hepes/NaOH, 0.49 mM $MgCl_2$, 0.36 mM $NaH_2PO_4H_2O$, 12 mM $NaHCO_3$) containing 0.1% BSA and incubated with 10 μM CM- H_2DCFDA for 30 min at 37 °C in the dark. Mean fluorescence index and percentage of ROS-positive cells were determined by flow cytometry in a FACSCanto II Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data analysis was performed using the BD FACSDiva™ Software. A minimum of 30,000 events was acquired for RBCs and 100,000 events for platelets on each sample.

2.5. Measurement of Intracellular Free Calcium Levels ([iCa^{2+}])

Intracellular calcium levels were detected by using the membrane-permeable fluorescent probe Fluo-4, AM (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Briefly, RBCs diluted in a buffer containing 145 mmol/L NaCl, 7.5 mmol/L KCl, 10 mmol/L Hepes/NaOH, 1.8 mmol/L $CaCl_2$, 10 mmol/L glucose and 10 mmol/L sodium pyruvate (pH 7.4) were loaded with 1 μM reagent for 50 min at 37 °C in the dark. For the determination of the intracellular calcium levels in PLTs, PRP was diluted in HEPES Tyrode's buffer before incubation with 1 μM Fluo-4 AM for 30 min at 37 °C, in the dark. Mean fluorescence index of red blood cells and platelets was determined by flow cytometry, as mentioned above.

2.6. P-Selectin Expression and Phospatidylserine Exposure

Phenotyping of RBCs was performed by multicolor flow cytometry using phycoerythrin (PE)-Annexin V apoptosis kit and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD235 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), as previously described [6].

For the identification of platelet activation in PRP surface expression of P-selectin (CD62P) and phosphatidylserine (PS) were measured. Briefly, PRP diluted in Annexin V-binding buffer (Hepes/NaOH 0.01 M, NaCl 140 mM, $CaCl_2$ 2.5 mM) was incubated for 15 min at room temperature in the dark with allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD62P and PE-Annexin V apoptosis kit along with the platelet gating marker PE Cy5-CD41a (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Reactions were stopped with Annexin V-binding buffer and measurements were performed by flow cytometry.

2.7. Platelet Function Assays

Platelet adhesion and aggregation functions were evaluated by using the Dade PFA Collagen/EPI Test Cartridge and Dade PFA Collagen/ADP Test Cartridges, according to

the manufacturer's instructions (Siemens Healthcare Diagnostic, Erlangen, Germany), in the PFA-100 Analyzer (SIEMENS, Malvern, PA, USA).

2.8. Screening Test and Coagulation Factors Analysis

Prothrombin time-international normalized ratio (PT-INR) was measured with Thromborel S Reagent. Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT) was measured with Pathromtin SL Reagent (Siemens Healthcare Diagnostic, Erlangen, Germany). The turbidimetric measurement of von Willebrand activity (Ristocetin Cofactor assay, RiCof) was performed with Innovance VWF Ac kit (Siemens, Marburg, Germany). Berichrom Factor XIII and Berichrom PAI assays were used for chromogenic determination of Factor XIII and plasminogen activator inhibitor's activity, respectively (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany). Quantitative determination of fibrinogen was performed by Multifibren U kit and cross-linked fibrin degradation products by Innovance D-dimer kit (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany), according to the manufacturer's recommendations. All the above-mentioned parameters were measured in a blood Coagulation Analyzer BCS XP System (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany).

STA-Deficient VIII, STA-Deficient IX, and STA-Immunodef XI kits were used for measurement of factors' VIII, IX, and XI activity, respectively, along with the STA-PTT A kit, whereas STA Immunodef XII and C.K. Prest were used for the determination of FXII activity. Activities of factors II, V, VII, and X were measured using STA-Deficient II, STA-Deficient V, STA-Deficient VII, and STA-Deficient X kits, respectively, with the NeoPTimal reagent (Diagnostica Stago, Parsippany, NJ, USA). Calcium chloride solution 0.025 mol/L was also used for all the activity measurements (Diagnostica Stago, Parsippany, NJ, USA). Antigenic assay of free Protein S was performed by the STA-Liatest Free Protein S kit. Von Willebrand factor antigen was measured immuno-turbidimetrically by using the STA-Liatest VWF:Ag kit, according to the manufacturer's recommendations (Diagnostica Stago, Parsippany, NJ, USA). Quantitative determination of the plasminogen and Protein C activities was performed calorimetrically by using the STA-Stachrom Plasminogen and Protein C reagents kit. Those measurements were performed in the STAR STAGO hemostasis analyzer.

Protein S activity was determined with HemosIL Protein S activity kit by measuring clotting time (Instrumentations Laboratory, Bedford, MA, USA) as per manufacturer's instructions. A chromogenic assay was used for the determination of ATIII activity using the Liquid Antithrombin kit by Hemosil (Instrumentations Laboratory, Bedford, MA, USA). An ACL TOP Hemostasis Analyzer (Instrumentations Laboratory, Bedford, MA, USA) was used for the measurement of the above-mentioned parameters.

2.9. ADAMTS Activity and Inhibitor Test

Quantitative measurement of ADAMTS-13 activity and inhibitor tests were performed by using LIFECODES ATS-13 activity assay (Immucor GTI Diagnostics, Waukesha, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. Functional inhibitor assays were performed following mixing with normal plasma. The ATS-13 activity assay (that is based on the fluorescence resonance energy transfer technology-FRET) was performed in the Thermoscientific Fluoroskan microplate reader (Waltham, MA, USA).

2.10. Statistical and Network Analysis

All experiments were performed twice, unless otherwise stated. The Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS Software; version 26.0 for Windows IBM Corp., Armonk, NY, USA; administrated by UNIWA) was used for statistical analysis. All variables were tested for normal distribution profile. Between group differences in normally distributed parameters were evaluated by *t*-test using a Bonferroni correction (or Mann–Whitney U test for not normally distributed parameters). Paired samples were assessed by *t*-test or two-related samples test, for normally or not normally distributed parameters, respectively, for the consideration of hemodialysis effect (pre- versus post-hemodialysis parameters). Pearson's and Spearman's tests were performed to assess the correlation factor (r) between

measurements following normal or not normal distribution profiles, respectively. Significance was accepted at $p < 0.05$. Significant correlations of serum, plasma, PLT, and RBC variables were topologically represented in undirected biological networks by using the Cytoscape version 3.8.2 application [7]. The length of each edge was inversely proportional to the r value (namely, the shorter the edge length, the higher the r value between the two interrelated nodes was).

3. Results

3.1. Baseline Hematological and Serum Biochemical Profile

The main demographic, therapy-associated, and hematological characteristics are presented in Table 1. The hematological profile of ESRD patients showed the anticipated anemia markers, namely, low levels of RBC count (RBCs), hematocrit (Hct), hemoglobin concentration (Hb), and mean corpuscular Hb concentration (MCHC) (Table 1). Hematocrit levels did not differ significantly among patients. Despite being within normal range, patients had statistically significant higher neutrophils and monocytes but lower lymphocytes percentages compared to the co-studied cohort of healthy subjects. Mean platelet volume (MPV) was also higher than control.

Accumulation of uremic toxins (urea, creatinine, parathormone-PTH, and b2-microglobulin) went in parallel with the typical inflammatory profile of ESRD patients, as directly manifested by the pathologically increased ferritin and hsCRP levels, and indirectly through the aberrant neutrophils/lymphocytes ratio (Table 1). Serum cations including calcium, phosphorous, potassium, sodium, and magnesium were also significantly increased compared to the co-studied cohort of healthy subjects, though not at pathological levels (Table 1). Post-hemodialysis there was an overall improvement in the uremic indexes, though creatinine remained pathologically high (Table 1). The values of the other parameters were adjusted after dialysis session according to the fluid loss (data not shown).

Table 1. Demographic, therapy-associated, hematological, and serum biochemical characteristics of patients with ESRD and healthy subjects.

Characteristics	Patients (n = 32)		Controls (n = 15)	Normal Range
	Pre-HD	Post-HD		
HD treatment (months)	41.3 ± 21.4		-	-
Age (years)	59 ± 11.4		50 ± 9.8	-
EpO dose (IU/wk)	6833.3 ± 3588.7		-	-
Weight (kg)	82.2 ± 11.1	80.2 ± 11.8	85.6 ± 13.2	-
General blood test				
WBC ($\times 10^3/\mu L$)	7.60 ± 2.70	N/D	7.10 ± 1.80	5.2–12.4
Neutrophils (%)	64.7 ± 8.3 *	N/D	59.0 ± 8.0	40.0–74.0
Lymphocytes (%)	20.7 ± 6.3 **	N/D	28.7 ± 6.6	19.0–48.0
Monocytes (%)	7.4 ± 1.6 **	N/D	6.1 ± 1.6	3.4–9.0
Eosinophils (%)	4.9 ± 3.9	N/D	2.9 ± 1.9	0.0–7.0
Basophils (%)	0.7 ± 0.4	N/D	0.8 ± 0.3	0.0–1.5
Neutrophils/Lymphocytes ratio	**3.5 ± 1.6** **	N/D	1.9 ± 0.6	1.3–3.5
RBC ($\times 10^6/\mu L$)	**3.80 ± 0.59** **	N/D	4.60 ± 0.46	4.2–6.1
Hb (gr/dL)	**11.1 ± 1.3** **	N/D	13.5 ± 1.6	12.0–18.0
Hct (%)	**34.3 ± 4.3** **	N/D	40.6 ± 4.4	37.0–52.0
MCV (fL)	91.1 ± 9.7	N/D	88.7 ± 5.3	80.0–99.0
MCH (pg)	29.4 ± 3.4	N/D	30.5 ± 2.0	27.0–31.0
MCHC (gr/dL)	**32.3 ± 0.9** *	N/D	34.4 ± 0.7	33.0–37.0
RDW (%)	15.8 ± 1.1	N/D	13.0 ± 3.0	11.5–14.5
PLT ($\times 10^3/\mu L$)	240.8 ± 82.0	N/D	250.1 ± 40.6	130.0–400.0
MPV (fL)	10.0 ± 0.6 **	N/D	7.8 ± 1.3	7.2–11.1

Table 1. *Cont.*

Characteristics	Patients (n = 32) Pre-HD	Patients (n = 32) Post-HD	Controls (n = 15)	Normal Range
Serum biochemical analysis				
Glucose	86.8 ± 22.2	N/D	89.5 ± 12.1	70–105
Urea (mg/dL)	**129.3 ± 27.9** **	39.1 ± 12.7 #	33.9 ± 9.4	18.0–55.0
Creatinine (mg/dL)	**10.42 ± 3.10** **	**3.90 ± 1.42** **#	0.92 ± 0.16	0.72–1.25
Uric Acid (mg/dL)	6.1 ± 1.0 **	N/D	4.4 ± 1.5	3.5–7.2
Cholesterol (mg/dL)	170 ± 42	N/D	178 ± 42	0.0–200.0
Triglycerides (mg/dL)	126.7 ± 52.8	N/D	115.2 ± 61.1	0.0–150.0
PTH (pg/mL)	**388.3 ± 216.2** **	N/D	49.7 ± 15.5	15.0–68.0
Calcium (mg/dL)	8.5 ± 0.7 **	N/D	9.5 ± 0.2	8.4–10.2
Phosphorus (mg/dL)	4.5 ± 1.3 **	N/D	3.1 ± 0.5	2.4–4.7
Potassium (mmol/L)	4.95 ± 0.61 **	N/D	4.47 ± 0.39	3.5–5.1
Sodium (mmol/L)	136.6 ± 2.3 **	N/D	139.3 ± 2.3	136.0–145.0
Chlorine(mmol/L)	102.2 ± 2.9	N/D	102.1 ± 2.8	98.0–107.0
Magnesium (mg/dL)	2.28 ± 0.37 *	N/D	2.02 ± 0.02	1.60–2.60
Iron (mg/dL)	69.2 ± 25.0	N/D	88.0 ± 39.8	50–150 (females); 60–160 (males)
Ferritin (ng/mL)	**263.3 ± 153.3** **	N/D	53.8 ± 29.1	14.0–233.0 (females); 16.4–293.3 (males)
TIBC (mg/dL)	251.6 ± 53.3 **	N/D	342.0 ± 50.7	225.0–480.0
B12 (pg/mL)	602.6 ± 265.5	N/D	414.3 ± 179.5	179.0–1162.0
Folate (ng/mL)	14.60 ± 12.50	N/D	5.30 ± 2.60	2.5–17.0
Proteins (mg/dL)	6.90 ± 0.60	N/D	6.80 ± 0.60	6.40–8.30
Albumin (gr/dL)	4.05 ± 0.50 **	N/D	4.47 ± 0.33	3.50–5.00
b2-microglobulin (mg/L)	**33.3 ± 11.4** **	N/D	1.4 ± 0.5	0.71.8
SGOT (U/L)	11.4 ± 5.0 **	N/D	18.1 ± 5.9	5.0–34.0
SGPT (U/L)	12.00 ± 4.06 **	N/D	22.00 ± 15.00	0.0–55.0
γGT (U/L)	25.4 ± 15.3	N/D	17.9 ± 8.0	12.0–64.0
ALP (U/L)	89. ± 42.90	N/D	80.1 ± 28.9	40.0–150.0
Total Bilirubin (mg/dL)	0.50 ± 0.20	N/D	0.40 ± 0.30	0.20–1.20
Indirect Bilirubin (mg/dL)	0.23 ± 0.09 **	N/D	0.15 ± 0.06	0.01–0.90
Direct Bilirubin (mg/dL)	**0.31 ± 0.13** **	N/D	0.13 ± 0.10	0.00–0.30
LDH (IU/L)	210.6 ± 67.6	N/D	203.3 ± 54.3	125.0–220.0
CPK total (IU/L)	84.4 ± 58.0	N/D	80.2 ± 63.1	30.0–200.0
Amylase (IU/L)	120.0 ± 39.6	N/D	63.9 ± 18.5	20.0–160.0
Vitamin-D (ng/mL)	**11.6 ± 6.5** *	N/D	20.5 ± 4.9	30.0–100.0
hs CRP (mg/L)	**12.5 ± 10.2** **	N/D	1.8 ± 1.0	0.0–5.0

Values are presented as mean ± SD. Bold: pathological values; * $p < 0.05$ vs. controls; ** $p < 0.01$ vs. controls; # $p < 0.05$ pre- vs. post-HD. ALP, alkaline phosphatase; CPK, creatine phosphokinase, γGT, gamma-glutamyl transferase; EpO, erythropoietin; fHb, plasma hemoglobin, Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; hsCRP, high sensitivity C-Reactive Protein; LDH, lactate dehydrogenase; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; MPV, mean platelet volume; PLT, platelets; PDW, platelet distribution width; PTH, parathormone; RBC, red blood cells; RDW, RBC distribution width; SGOT, serum glutamyl oxalate transaminase; SGPT, serum glutamyl pyruvate transaminase; TIBC, total iron-binding capacity; WBC, white blood cells.

3.2. Functional Analysis of Platelets (PFA/EPI, PFA/ADP)

Platelet functionality towards primary hemostasis was then assessed following addition of the agonists ADP and epinephrine (EPI) in PLTs laid on collagen-coated (Col) cartridge membranes. In both assays the closure times were substantially prolonged in uremic patients (Col/EPI and Col/ADP, Figure 1), both before (206.7 ± 58.8 and 169.3 ± 77.3, respectively) and soon after (215.1 ± 70.6 and 154.5 ± 53.2 s, respectively) the HD session compared to the healthy control cohort of the study (102.8 ± 17.2 and 88.4 ± 21.6, respectively) and the normal range (Col/EPI < 142 s, Col/ADP < 102 s), revealing a clear defect of ESRD PLTs towards hemostasis. HD treatment did not affect any of those measurements (Figure 1).

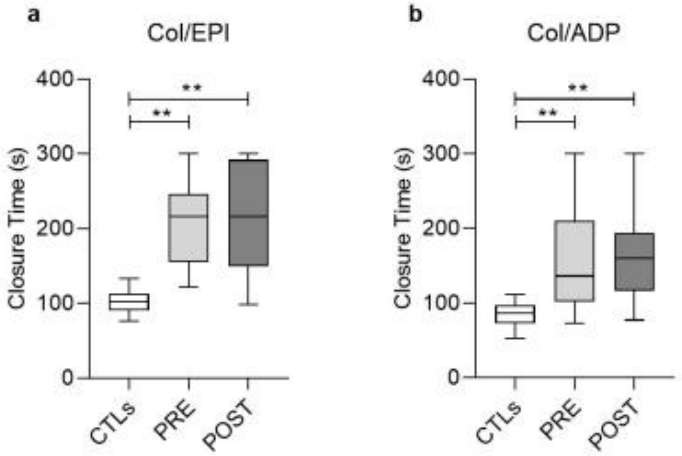


Figure 1. Boxplots showing the closure time measured in the Platelet Function Analysis of ESRD patients, pre-HD (PRE) and post-HD (POST), compared to healthy subjects (CTLs), after the addition of agonists. (**a**) Collagen with epinephrine, (**b**) Collagen with ADP. (**) $p < 0.01$ vs. controls. Col, Collagen; EPI, epinephrine; ADP, adenosine diphosphate.

3.3. *PLT Activation Signaling and Oxidative Stress*

Expression of P-selectin (CD62P), a marker of platelet activation, was higher in ESRD PLTs compared to controls before (21.6 ± 15.8 vs. 6.8 ± 3.5%) and after (15.1 ± 10.3%) HD (Figure 2a). Moreover, an increased percentage of the activated PLTs exhibited surface expression of phosphatidylserine (PS), independently of the HD session (Figure 2b). Hemodialysis decreased PLT activation but had no effect on PS exposure on them (Figure 2b,c). Intracellular ROS accumulation was also higher in uremic PLTs compared to healthy control (1.91 ± 0.68 vs. 0.91 ± 0.44 %, respectively). Dialysis treatment leads to a significant decrease in the percentage of ROS+ platelets, though they remain at pathologically high levels post-HD (1.42 ± 0.76%) (Figure 2a). In contrast to ROS accumulation, the intracellular calcium levels in resting ESRD PLTs before (1854 ± 476 MFI) and after (1883 ± 456 MFI) the HD session were similar to healthy PLTs (2001 ± 182 MFI).

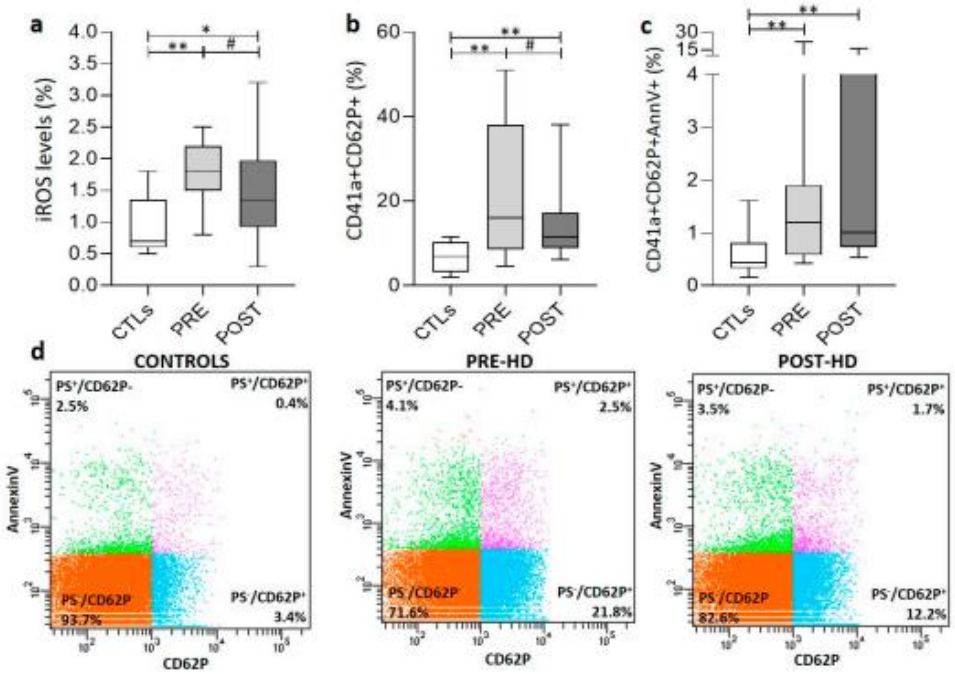


Figure 2. Variation in platelet characteristics in ESRD patients and healthy subjects (CTLs). (**a**) Percentage of ROS+ platelets (iROS). (**b**) Percentage of CD62P+-platelets. (**c**) Percentage of CD62P+/AnnV+ platelets. (**d**) Representative FACS plots of AnnV-PE and CD62P-APC labeled platelets from ESRD patients, before and after dialysis session, and healthy subjects. PRE, POST: ESRD patients pre-HD and post-HD, respectively (*) $p < 0.05$ vs. controls (**) $p < 0.01$ vs. controls, (#) $p < 0.01$ pre- vs. post-HD.

3.4. Stress Signaling in Red Blood Cells (RBCs)

We then sought to explore whether the RBCs in ESRD (that contribute by many pathways to the physiological coagulation [8]) were characterized by similar stress and activation signals with those detected in PLTs. Indeed, we found an increased percentage of ESRD RBCs exposing PS compared to controls (1.60 ± 0.93% vs. 0.69 ± 0.30%) before and after (1.60 ± 1.09%) HD (Figure 3b). In similarity with the ESRD PLTs (Figure 2b), the HD did not affect the PS surface exposure on RBCs, at least shortly after the session. In addition to that, the vast majority of the ESRD RBCs were ROS^+ (92.3 ± 5.3%), again, at higher levels compared to control RBCs (79.5 ± 7.9%) (Figure 3a). In contrast to the ESRD PLTs (Figure 2a), the HD had no effect on the percentage of ROS^+ RBCs. Finally, control levels of calcium accumulation were detected in ESRD RBCs before (792 ± 137 MFI) and after HD (810 ± 137 vs. 905 ± 213 MFI in control). In that case, however, the HD exerted a slight triggering effect ($p < 0.05$ pre- vs. post-HD).

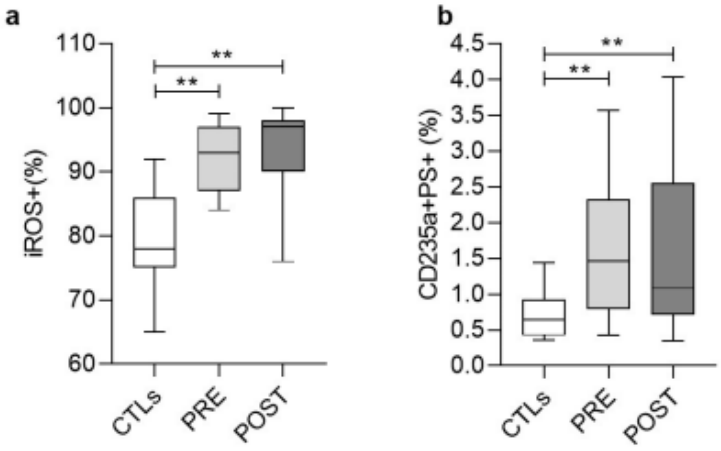


Figure 3. Variation in the percentages of ROS+ (**a**) and PS+ (**b**) RBCs in ESRD patients and healthy subjects (CTLs) measured by flow cytometry. PRE, POST: ESRD patients pre-HD and post-HD, respectively (**) $p < 0.01$ vs. controls.

3.5. Coagulation (Secondary Hemostasis) Screening Test

As reflected in the average fluctuations shown in Table 2, the aPTT and the PT-INR were pathologically increased in 65% and 24% of the ESRD patients, respectively. In most of the sessions, hemodialysis had an ameliorative effect on both parameters (Table 2). Fibrinogen and D-dimers concentrations were pathologically high in 75 and 60% of the patients, respectively, but in contrast to aPTT and PT-INR, HD had either no effect (D-dimers) or an aggravating effect (fibrinogen) on their levels (Table 2).

Table 2. Secondary hemostasis screening tests, coagulation, fibrinolytic and inhibitory proteins.

Characteristics	Patients (n = 32)		Controls (n = 15)	Normal Range
	Pre-HD	Post-HD		
Secondary hemostasis screening test				
aPTT (s)	**56.7 ± 32.1** **	35.5 ± 7.0 **#	29.7 ± 3.7	<36
D-Dimers (µg/L)	**661.2 ± 438.6** **	**694.8 ± 425.3** **	272.7 ± 140.2	<500
Fibrinogen (mg/dL)	**411.8 ± 92.4** **	**464.5 ± 112.7** **#	328.4 ± 79.6	180–350
PT/INR	**1.4 ± 0.7** **	1.2 ± 0.4 **#	0.98 ± 0.04	<1.2
Coagulation system				
Factor II (%)	79.0 ± 19.3 **	81.4 ± 21.4 **	107.9 ± 13.2	60–120
Factor V (%)	85.7 ± 23.6 **	106.0 ± 19.2 #	104.9 ± 17.2	60–120
Factor VII (%)	105.9 ± 37.0	110.8 ± 39.2	116.0 ± 19.8	60–120
Factor VIII (%)	**148.8 ± 79.9**	**247.1 ± 85.5** **#	123.3 ± 17.6	60–140
Factor IX (%)	115.2 ± 43.4	**123.0 ± 39.9**	115.9 ± 17.9	60–120
Factor X (%)	77.1 ± 27.0	82.0 ± 35.1	89.1 ± 15.8	60–120
Factor XI (%)	100.3 ± 49.6	**121.3 ± 50.6**	112.6 ± 16.1	60–120
Factor XII (%)	87.1 ± 24.2 **	108.1 ± 22.3 #	109.9 ± 26.9	60–120
Factor XIII (%)	**145.9 ± 12.1** **	**149.8 ± 11.0** **	101.1 ± 11.9	60–140
RiCof (%)	**160.6 ± 53.6**	**191.8 ± 72.4** **#	122.7 ± 34.1	60–140
vWF (%)	**170.4 ± 58.0** **	**216.8 ± 74.7** **#	110.0 ± 20.8	60–140
Fibrinolytic system				
PAI (U/mL)	1.9 ± 1.2 **	1.6 ± 1.1 **	0.8 ± 1.1	<4
Plasminogen (ng/L)	100.5 ± 15.3	112.8 ± 17.4 **#	108.1 ± 8.8	80–120

Table 2. *Cont.*

Characteristics	Patients (n = 32)		Controls (n = 15)	Normal Range
	Pre-HD	Post-HD		
		Inhibitory system		
Antithrombin III (%)	96.9 ± 13.8 **	105.6 ± 14.5 #	122.3 ± 10.1	80–120
Protein C (%)	80.8 ± 18.8 **	91.6 ± 23.1 **#	110.3 ± 14.5	70–140
Protein S activity (%)	89.6 ± 23.3	99.3 ± 33.9	91.9 ± 16.5	60–130
Protein Sf (%)	95.6 ± 69.9 **	92.6 ± 27.4 **#	109.1 ± 26.3	60–140
		ADAMTS-13		
ADAMTS13 activity (%)	**<5** **	**<5** **	57.3 ± 4.8	17–63
ADAMTS13 Inhibitor (%)	**81.4 ± 25.1** **	**86.6 ± 11.5** **#	12.0 ± 5.0	<30

Values are presented as mean ± SD. PT-INR, Prothrombin time—International Normalized Ratio; aPTT, Activated Partial Thromboplastin Time; RiCof, Platelet Ristocetin Cofactor; Protein Sf, Protein S Antigen free; PAI, Plasminogen Activator Inhibitor; ADAMTS, A Disintegrin, and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs. Bold: pathological values, ** $p < 0.01$ vs. controls, # $p < 0.05$ pre- vs. post-HD.

3.6. Functional Analysis of Factors Involved in the Coagulation Cascade and in Fibrinolysis

With the exceptions of factors VIII, XIII, and vW, the activities of coagulation factors were within the normal range in ESRD patients. In fact, the FII, FV, and FXII exhibited lower activity compared to the cohort of healthy subjects. Pathologically increased activities were measured for factors VIII, XIII, vW, and Ricof in most of the ESRD patients (eg. in 65% of them for vWF) before HD. Hemodialysis enhanced the activities of several factors (V, VIII, XII, RiCof, and vW) leading to pathological post-HD levels in many events (>80% for VIII, Ricof, and vW). In accordance with the increased activity of vWF, all the ESRD patients exhibited significantly low ADAMTS-13 and high ADAMTS-13 inhibitor activities before and after HD. Of note, HD further triggered the activity of ADAMTS-13 inhibitor (Table 2).

Regarding the fibrinolytic system, control levels of both PAI activity and plasminogen concentration were measured before and after the HD session, being, however, higher than the average value of healthy cohort. HD seemed to exert a slight triggering effect on plasminogen concentration. In the same context, the activities of the physiological inhibitors of coagulation antithrombin III (ATIII) and Protein C were within the normal range, despite enhancement by the HD session. The activity ranges of Protein S and plasma-free Protein S antigen were also within control levels, though the activity of the plasma free Protein S antigen was lower compared to that of healthy cohort, and further decreased by HD (Table 2).

3.7. Biological Networks

Biological networks were constructed for the visualization of statistically significant correlations among uremic toxins, coagulation factors, and blood cell characteristics (Figure 4). As expected, there were strong correlations between variations in uremic toxins and coagulation parameters. For example, urea and creatinine were reversibly related to ATIII pre-dialysis (Figure 4, light-green square). Post-dialysis, the levels of these toxins seemed to correlate positively with the decreased phosphatidylserine exposure in RBCs but inversely with II and V (Figure 4, light-orange rectangle). ROS concentration in PLTs post-dialysis was positively correlated with a variety of factors involved in hemostatic pathways such as fibrinogen (r = 0.579, p = 0.019), PT/INR (r = 0.525, p = 0.037), D-dimers (r = 0.526, p = 0.036), and PS/CD62P$^+$ PLTs (r = 0.548, p = 0.043). In the same direction, ROS$^+$ RBCs showed strong connections with several coagulation factors, including RiCof (r = 0.539, p = 0.017), FVIII (r = 0.526, p = 0.021), and FXIII (r = 0.561, p = 0.012) (Figure 4, yellow rectangle). Finally, before dialysis session percentage of PS$^+$ or PS$^+$/CD62P$^+$ PLTs showed positive correlations with ATIII (r = 0.594, p = 0.032), iCa^{2+} PLTs (r = 0.586, p = 0.028), FX (r = 0.790, p = 0.007), and plasminogen (r = 0.835, p = 0.001) (Figure 4, light-blue square).

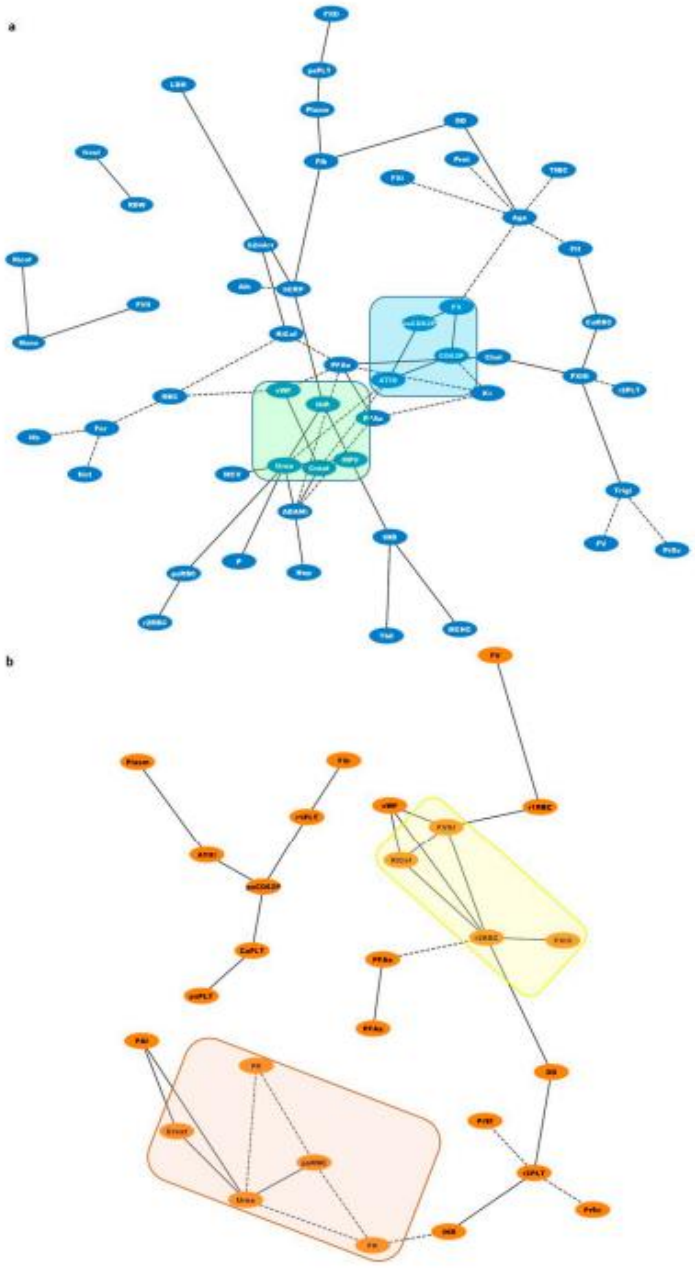


Figure 4. Network analysis of statistically significant ($p < 0.05$) positive (black lines) and negative (dotted black lines) correlations between soluble coagulation factors and blood cell features in end stage

renal disease (**a**) before (blue nodes) and (**b**) soon after (orange nodes) the dialysis session. Squares and rectangles highlight correlations of outmost importance discussed in Section 3.7. The shortest the edge length, the higher the r value between the two interrelated nodes was. Abbreviations: Age, age of patients (years); ADAMi, ADAMTS-13 inhibitor; Alb, albumin; ATIII, antithrombin III; b2micr, b2-microglobulin; CaPLT, platelet intracellular calcium (MFI); CaRBC, intracellular calcium RBCs (MFI), Chol, Cholesterol; Creat, creatinine, CD62P, CD62P^{+} PLTs (%); DD, D-dimers; Fer, Ferritin; Fib, Fibrinogen; Hb, Hemoglobin; Hct, Hematocrit; hCRP, highsensitivity C-Reactive Protein; Hep, Heparin dose; INR, Prothrombin time—International Normalized Ratio; K^{+}, serum potassium; LDH, lactate dehydrogenase; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; Mono, Monocytes (%); MPV, mean platelet volume (fL); Neutr, Neutrophils (%); P, serum phosphorous; PAI, Plasminogen Activator Inhibitor; PFAa, PFA Col/ADP; PFAe, PFA Col/EPI; Plasm, Plasminogen; Prot, Plasma proteins; PrSc, Protein S activity; PrSf, Protein S Antigen free; psCD62P, PS/CD62P+ PLTs (%); psPLT, PS^{+} PLTs; psRBC, PS^{+} RBS (%); RBC, RBC count; RDW, RBC distribution width; r1PLT, PLTs ROS (MFI); r1RBC, RBCs ROS (MFI); r2PLT, PLTs ROS (%); r2RBC, RBCs ROS (%); Tbil, total bilirubin; tHD, time under HD therapy (months); Trigl, Triglycerides.

4. Discussion

Uremic toxin accumulation in end stage renal disease is associated with anemia, inflammation, and coagulation disorders. Hemodialysis, the standard symptomatic therapy in ESRD, generally improves anemia but is not able to entirely relieve inflammation, whereas there are discrepancies in the field regarding its effect on the coagulation status. Despite the established contribution of RBCs to the coagulation cascade, their possible relation with platelet dysfunctions and the disturbed coagulation pathways reported in ESRD patients on HD have not been clarified so far.

Our patient cohort was representative of the disease, as characterized by anemia and inflammation signs, including hsCRP, serum ferritin, neutrophils/lymphocytes ratio [9,10], and fibrinogen, an acute phase reactant. As expected, positive co-variations were observed among those parameters (e.g., between fibrinogen and hsCRP (r = 0.469, p = 0.028)). Of note ferritin covaried with the anemia levels as it was found inversely correlated with the Hb concentration, the Hct, and the RBC count (Figure 4) [11].

In accordance with previous studies [1,12], the functional abnormalities of uremic platelets are reflected in the prolonged closure times observed after addition of the agonists, ADP, and epinephrine. There is evidence for a causal linkage with the uremic toxins [13], not supported, however, by other studies [14]. Despite the expected ameliorating effect of HD on platelet function [15,16], we did not observe any improvement post-HD in our patients who presented normal or increased vWF activity; thus ruling out the existence of von Willebrand disease. These data suggested a complex pathophysiological basis of platelet abnormalities in ESRD, probably involving intrinsic cell disturbances, [17] like impaired binding to vessel wall and fibrinogen, defective metabolism, decreased content of granules, and impaired intracellular signaling among others [18]. Moreover, the prolonged Col/EPI closure time has been previously related to the low Hct levels [19].

The prolonged activated Partial Thromboplastin Time (aPTT) confirmed the increased bleeding risk in our patient's pre-dialysis, as suggested by others [1]. In combination with the high PT/INR ratio, the whole picture included abnormalities in both intrinsic and extrinsic coagulation cascades. Normalization of PT/INR and aPPT soon after the HD session might be partially attributed to the concurrent increase in the activity of coagulation factors and natural inhibitors. This is a probable result of removing excess of water and dialyzable components. As shown in the interactomes of Figure 4, both urea and creatinine varied inversely with the ATIII levels.

Pathological levels of FVIII is another common disturbance in ESRD patients [1,20,21]. In our cohort, FVIII variation followed that of vWF antigen and activity pre-HD. vWF has a dual role in hemostasis, as both a carrier of FVIII and as a bridging molecule for

intercellular interactions between platelets or between platelets and sub-endothelium. The increased vWF activity obviously did not compensate for the prolonged PFA, confirming our hypothesis about endogenous cell disturbances in ESRD. In contrast to Casonato et al. [20], but in agreement with Holden et al. [22], hemodialysis significantly increased factors VIII, Ricof, and von Willebrand in our cohort of patients, suggesting a negative effect on endothelium integrity and probably on thrombotic risk [23–25].

Increased activity of vWF could be attributed to the accumulation of inflammatory cytokines [26] or to the sharp decline in ADAMTS-13 activity (<5% of normal values in our patients). ADAMTS-13 is a proteolytic enzyme responsible for the removal of high molecular weight vWF multimers from circulation. The inverse covariation of vWF with ADAMTS-13 has been considered a prothrombotic state in chronic kidney disease [27]. While many potential inhibitors of ADAMTS-13 activity have been proposed (e.g., autoantibodies [28], plasma IL-6 [29], human neutrophil peptides [30], thrombospondin-1 [31], cell-free plasma Hb, platelet factor 4 (PF4) [10]), none of them has been tested in ESRD, highlighting a significant knowledge gap in the field of hemostasis in uremia.

Abnormalities in fibrinogen levels lead either to hyper- or hypofibrinogenemia. Both of them carry a prothrombotic potential probably due to intrinsic fibrinogen disorders [32–34]. These disorders could also affect fibrinolysis, a process which includes activation of tissue plasminogen activator (t-PA) factor and regulation by Plasminogen Activator Inhibitor (PAI) [35,36]. In our patient cohort, a mixed biochemical phenotype regarding fibrinolysis was observed, which includes hyperfibrinogenemia [21] as a probable result of the inflammatory status [37] predisposing to thrombosis [38] and at the same time, pathologically increased D-dimers suggesting increased plasmin activity and hyperfibrinolysis. It was expected that fibrinogen positively covaried with both the plasminogen and D-dimers levels. Expression of P-selectin on activated platelets also predisposes to thrombosis by promoting aggregation [39], thrombus formation at site of endothelium damage, and increased incorporation of leukocytes and fibrin into the thrombus [40]. Ultra large multimers of vWF [41] and PS externalization could also contribute to these prothrombotic procedures. The surface expression of this aminophospholipid in activated platelets promotes the assembly of prothrombinase complex in the presence of FV, FX, and calcium ions [42]. PS is also a powerful apoptotic marker, linked to an iCa^{2+}-dependent increase in caspase-3 activation [43]. In our study, the positive correlation of PS^+ or $PS^+/CD62P^+$ PLTs with intracellular calcium and FX or FXI levels (Figure 4) probably signify the proapoptotic and prothrombotic dynamics of those platelets. This prothrombotic potential could probably be attenuated to some extent by an increase in proteins of fibrinolytic or inhibitory system of hemostasis, as it is indicated by their positive correlation with ATIII and plasminogen levels.

PLT activation might happen during the dialysis session [44]; however, dialysis often reduces the PLT activation markers [44,45]. This was also observed in our patients through decrease in the $CD62P^+$ PLTs, as a probable result of HD-induced cell clearance [46] or increased microvesiculation [47]. The persistently increased PFA values of ESRD patients that were not affected by the dialysis session in contrast to the P-selectin expression levels that were decreased, imply that platelet dysfunction (reflected in the PFA values) is independent of P-selectin expression in ESRD patients, as previously described in children with iron deficiency anemia [48]. The significant increase in fibrinogen and vWF levels, two components of platelet granules that are released following PLT stimulation, also implies an ongoing PLT activation and degranulation during HD [49]. The HD-induced PLT degranulation may also be contributing to ADAMTS inhibition through the release of PF4 and thrombospondin-1, as previously suggested [10,31].

The increased ROS levels in platelets may be associated with the activation of collagen receptor [50] and the toxicity of uremic factors [51] since they effectively decreased post-dialysis. As an additional marker of cellular activation, the ROS^+ PLTs can regulate thrombus formation by inducing fibrinogen adhesion and granule release [52]. Actually, the probable hemostatic role of ROS^+ PLTs is depicted in their significant correlations with fibrinogen, D-dimers, and INR values (Figure 4). Of note, increased generation

of intracellular ROS has been previously associated with P-selectin expression [53], as currently observed in our patient cohort (Figure 4, $r = 0.548$, $p = 0.043$).

Finally, according to our results, RBCs might represent another piece in the complex coagulation puzzle of ESRD. Increased intracellular ROS and PS exposure levels have been previously reported in the context of RBC pathology in anemic renal disease patients [54]. Nowadays, RBCs are considered dynamic regulators of the coagulation mechanisms, through NO scavenging, ADP and thromboxane A_2 release following hemolysis, membrane exovesiculation, and direct interaction with platelets through Fas-FasL linkages [8,55,56]. According to the biological networking analysis, the ROS^+ RBC percentage or the intracellular ROS levels positively covaried with the activities of several coagulation factors, including vWF:Ag, Ricof, FVIII, and FXIII and negatively with the PFA/EPI time post-dialysis, suggesting a similar functional role in ESRD. Actually, there is evidence for a dynamic interaction between FXIII, vWF, and RBCs during thrombus formation [57]. It is of interest that similar connections were detected with the ROS^+ PLTs pre-dialysis but not following it, probably due to the selective beneficial effect of HD on PLT (but not on RBC) ROS burden. Apart from these, RBCs subjected to oxidative stress could also contribute to the procoagulant status of ESRD patients through the release of PS^+ microvesicles [58,59]. The significantly increased fibrinogen observed post-HD in ESRD patients might further interact with RBCs promoting RBC-RBC and RBC-PLT aggregates [60,61].

5. Conclusions

This study provides evidence for a complex coagulation phenotype in ESRD that is configurated by soluble and corpuscular factors, their interactions, and the effect of dialysis therapy on both. Signs of increased bleeding risk at the pre-dialysis period, like the long aPTT, PT/INR, and PFA times, coexisted with soluble (e.g., fibrinogen, vWF/ADAMTS activity) and cellular (eg. activated PS^+RBCs, and PLTs) prothrombotic features in a general hyperfibrinolytic state (DD). Hemodialysis seems to augment the prothrombotic potential through increases in the activity of several coagulation factors, fibrinogen, and ADAMTS-13 inhibitor; however, it mitigates in part the activation state of platelets and normalizes the aPTT and PT/INR times. The persisted PLT dysfunction might counteract the increased predisposition to thrombotic events post-dialysis. RBCs abnormalities seem to participate in the prothrombotic potential of uremic blood, with no detected alleviating effect by the HD side. The identification of the unknown origin of ADAMTS-13 inhibitor may probably be the lost piece of the puzzle that will unveil the full picture of hemostasis in uremia. Apart from this, the possible interaction of activated or stressed RBCs with PLTs, the thrombus, the endothelium, and the soluble components of the coagulation pathways, as well as the additional contribution of extracellular vesicles on these procedures deserve further investigation for the elucidation of coagulation state and its variation in ESRD patients.

Author Contributions: Conceptualization, H.T.G., M.H.A. and A.G.K.; methodology, H.T.G., A.I.K. and D.I.P.; formal analysis, H.T.G.; investigation, H.T.G., E.G.P. (Efthimia G. Pavlou), S.P.F. and K.A.T.; resources, A.G.K. and D.I.P.; data curation, E.G.P. (Effie G. Papageorgiou); writing—original draft preparation, H.T.G., M.H.A. and A.G.K.; writing—review and editing, M.H.A., A.G.K., A.G.T., M.S.V. and E.G.N.; supervision, A.G.K. and M.H.A.; project administration, H.T.G., M.H.A. and A.G.K.; funding acquisition, H.T.G. and A.G.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research is co-financed by Greece and the European Union (European Social Fund-ESF) through the Operational Programme «Human Resources Development, Education and Lifelong Learning» in the context of the project "Reinforcement of Postdoctoral Researchers—2nd Cycle" (MIS-5033021), implemented by the State Scholarships Foundation (IKY).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of University of West Attica (protocol code 48208/07072020 and date 7 July 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All data presented in this study are available upon request.

Acknowledgments: The authors are grateful to all blood donors, patients, and healthy subjects who participated in the present study. Additionally, the authors would like to thank Artemis Voulgaridou for her valuable contribution in the construction of biological networks.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gäckler, A.; Rohn, H.; Lisman, T.; Benkö, T.; Witzke, O.; Kribben, A.; Saner, F.H. Evaluation of hemostasis in patients with end-stage renal disease. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0212237. [CrossRef]
2. Kaw, D.; Malhotra, D. Hematology: Issues in the Dialysis Patient: Platelet Dysfunction and End-Stage Renal Disease. *Semin. Dial.* **2006**, *19*, 317–322. [CrossRef]
3. Lu, H.-Y.; Liao, K.-M. Increased risk of deep vein thrombosis in end-stage renal disease patients. *BMC Nephrol.* **2018**, *19*, 1–9. [CrossRef]
4. Ocak, G.; Vossen, C.Y.; Rotmans, J.I.; Lijfering, W.M.; Rosendaal, F.R.; Parlevliet, K.J.; Krediet, R.T.; Boeschoten, E.W.; Verduijn, M.; Dekker, F.W. Venous and arterial thrombosis in dialysis patients. *Thromb. Haemost.* **2011**, *106*, 1046–1052. [CrossRef] [PubMed]
5. Harboe, M. A Method for Determination of Hemoglobin in Plasma by Near-Ultraviolet Spectrophotometry. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* **1959**, *11*, 66–70. [CrossRef]
6. Tzounakas, V.L.; Georgatzakou, H.T.; Kriebardis, A.G.; Voulgaridou, A.I.; Stamoulis, K.E.; Foudoulaki-Paparizos, L.E.; Antonelou, M.H.; Papassideri, I.S. Donor variation effect on red blood cell storage lesion: A multivariable, yet consistent, story. *Transfusion* **2016**, *56*, 1274–1286. [CrossRef]
7. Assenov, Y.; Ramírez, F.; Schelhorn, S.-E.; Lengauer, T.; Albrecht, M. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics* **2008**, *24*, 282–284. [CrossRef] [PubMed]
8. Weisel, J.W.; Litvinov, R.I. Red blood cells: The forgotten player in hemostasis and thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **2019**, *17*, 271–282. [CrossRef] [PubMed]
9. Kalantar-Zadeh, K.; Rodriguez, R.A.; Humphreys, M.H. Association between serum ferritin and measures of inflammation, nutrition and iron in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2004**, *19*, 141–149. [CrossRef] [PubMed]
10. Nazy, I.; Elliott, T.D.; Arnold, D.M. Platelet factor 4 inhibits ADAMTS13 activity and regulates the multimeric distribution of von Willebrand factor. *Br. J. Haematol.* **2020**, *190*, 594–598. [CrossRef]
11. Stenvinkel, P. The role of inflammation in the anaemia of end-stage renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2001**, *16* (Suppl. 7), 36–40. [CrossRef] [PubMed]
12. Van Bladel, E.R.; de Jager, R.L.; Walter, D.; Cornelissen, L.; Gaillard, C.A.; Boven, L.A.; Roest, M.; Fijnheer, R. Platelets of patients with chronic kidney disease demonstrate deficient platelet reactivity in vitro. *BMC Nephrol.* **2012**, *13*, 127. [CrossRef] [PubMed]
13. Horowitz, H.I.; Stein, I.M.; Cohen, B.D.; White, J.G. Further studies on the platelet-inhibitory effect of guanidinosuccinic acid and its role in uremic bleeding. *Am. J. Med.* **1970**, *49*, 336–345. [CrossRef]
14. Linthorst, G.E.; Avis, H.J.; Levi, M. Uremic Thrombocytopathy Is not about Urea: Table 1. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2010**, *21*, 753–755. [CrossRef] [PubMed]
15. Mekawy, M.A.; Habashy, D.M.; Abd El-Mohsen, W.A. Effect of hemodialysis on platelet function in end-stage renal disease Egyptian patients usingin vitroclosure time test (PFA-100 analyzer). *Platelets* **2014**, *26*, 443–447. [CrossRef]
16. Gawaz, M.P.; Dobos, G.; Späth, M.; Schollmeyer, P.; Gurland, H.J.; Mujais, S.K. Impaired function of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in end-stage renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1994**, *5*, 36–46. [CrossRef]
17. Favaloro, E.J. Utility of the von Willebrand factor collagen binding assay in the diagnosis of von Willebrand disease. *Am. J. Hematol.* **2017**, *92*, 114–118. [CrossRef]
18. Jubelirer, S.J. Hemostatic Abnormalities in Renal Disease. *Am. J. Kidney Dis.* **1985**, *5*, 219–225. [CrossRef]
19. Spann, A.P.; Campbell, J.E.; FitzGibbon, S.R.; Rodriguez, A.; Cap, A.P.; Blackbourne, L.H.; Shaqfeh, E.S. The Effect of Hematocrit on Platelet Adhesion: Experiments and Simulations. *Biophys. J.* **2016**, *111*, 577–588. [CrossRef]
20. Casonato, A.; Pontara, E.; Vertolli, U.; Steffan, A.; Durante, C.; de Marco, L.; Sartorello, F.; Girolami, A. Plasma and Platelet von Willebrand Factor Abnormalities in Patients with Uremia: Lack of Correlation with Uremic Bleeding. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **2001**, *7*, 81–86. [CrossRef]
21. Huang, M.-J.; Wei, R.-B.; Wang, Y.; Su, T.-Y.; Di, P.; Li, Q.-P.; Yang, X.; Li, P.; Chen, X.-M. Blood coagulation system in patients with chronic kidney disease: A prospective observational study. *BMJ Open* **2017**, *7*, e014294. [CrossRef] [PubMed]
22. Holden, R.M.; Tuttle, A.; Burbidge, T.; Hegadorn, C.; Grabell, J.; Pruss, C.; James, P.D. Quantitative and qualitative changes of von Willebrand factor and their impact on mortality in patients with end-stage kidney disease. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2013**, *24*, 719–726. [CrossRef]

23. Boneu, B.; Abbal, M.; Plante, J.; Bierme, R. Factor-VIII Complex and Endothelial Damage. *Lancet* **1975**, *305*, 1430. [CrossRef]
24. Turner, N.A.; Moake, J.L. Factor VIII Is Synthesized in Human Endothelial Cells, Packaged in Weibel-Palade Bodies and Secreted Bound to ULVWF Strings. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0140740. [CrossRef]
25. Van der Vorm, L.N.; Visser, R.; Huskens, D.; Veninga, A.; Adams, D.L.; Remijn, J.A.; Hemker, H.C.; Rensma, P.L.; van Horssen, R.; de Laat, B. Circulating active von Willebrand factor levels are increased in chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Clin. Kidney J.* **2020**, *13*, 72–74. [CrossRef]
26. Bernardo, A.; Ball, C.; Nolasco, L.; Moake, J.F.; Dong, J.-F. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell–derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood* **2004**, *104*, 100–106. [CrossRef]
27. Ocak, G.; Roest, M.; Verhaar, M.C.; Rookmaaker, M.B.; Blankestijn, P.J.; Bos, W.J.W.; Fijnheer, R.; Péquériaux, N.C.; Dekker, F.W. Von Willebrand factor, ADAMTS13 and mortality in dialysis patients. *BMC Nephrol.* **2021**, *22*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
28. Peyvandi, F.; Ferrari, S.; Lavoretano, S.; Canciani, M.T.; Mannucci, P.M. von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) and ADAMTS-13 neutralizing autoantibodies in 100 patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **2004**, *127*, 433–439. [CrossRef] [PubMed]
29. Nguyen, T.C.; Liu, A.; Liu, L.; Ball, C.; Choi, H.; May, W.S.; Aboulfatova, K.; Bergeron, A.L.; Dong, J.-F. Acquired ADAMTS-13 deficiency in pediatric patients with severe sepsis. *Haematologica* **2007**, *92*, 121–124. [CrossRef]
30. Pillai, V.G.; Bao, J.; Zander, C.B.; McDaniel, J.K.; Chetty, P.S.; Seeholzer, S.H.; Bdeir, K.; Cines, D.B.; Zheng, X.L. Human neutrophil peptides inhibit cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13: A potential link of inflammation to TTP. *Blood* **2016**, *128*, 110–119. [CrossRef]
31. Novelli, E.M.; Kato, G.; Hildesheim, M.E.; Barge, S.; Meyer, M.P.; Lozier, J.; Hassett, A.C.; Ragni, M.V.; Isenberg, J.S.; Gladwin, M.T. Thrombospondin-1 inhibits ADAMTS13 activity in sickle cell disease. *Haematologica* **2013**, *98*, e132–e134. [CrossRef] [PubMed]
32. Simurda, T.; Zolkova, J.; Kolkova, Z.; Loderer, D.; Dobrotova, M.; Skornova, I.; Brunclíkova, M.; Grendar, M.; Lasabova, Z.; Stasko, J.; et al. Comparison of clinical phenotype with genetic and laboratory results in 31 patients with congenital dysfibrinogenemia in northern Slovakia. *Int. J. Hematol.* **2020**, *111*, 795–802. [CrossRef]
33. Taslimi, R.; Golshani, K. Thrombotic and hemorrhagic presentation of congenital hypo/afibrinogenemia. *Am. J. Emerg. Med.* **2011**, *29*, 573.e3. [CrossRef] [PubMed]
34. Hayes, D.T. Dysfibrinogenemia and Thrombosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2002**, *126*, 1387–1390. [CrossRef]
35. Simurda, T.; Vilar, R.; Zolkova, J.; Ceznerova, E.; Kolkova, Z.; Loderer, D.; Neerman-Arbez, M.; Casini, A.; Brunclikova, M.; Skornova, I.; et al. A Novel Nonsense Mutation in FGB (c.1421G>A; p.Trp474Ter) in the Beta Chain of Fibrinogen Causing Hypofibrinogenemia with Bleeding Phenotype. *Biomedicines* **2020**, *8*, 605. [CrossRef]
36. Chapin, J.C.; Hajjar, K.A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* **2015**, *29*, 17–24. [CrossRef]
37. Shlipak, M.G.; Fried, L.F.; Crump, C.; Bleyer, A.J.; Manolio, T.A.; Tracy, R.P.; Furberg, C.D.; Psaty, B.M. Elevations of Inflammatory and Procoagulant Biomarkers in Elderly Persons with Renal Insufficiency. *Circulation* **2003**, *107*, 87–92. [CrossRef]
38. Machlus, K.R.; Cardenas, J.C.; Church, F.C.; Wolberg, A.S. Causal relationship between hyperfibrinogenemia, thrombosis, and resistance to thrombolysis in mice. *Blood* **2011**, *117*, 4953–4963. [CrossRef]
39. Merten, M.; Thiagarajan, P. P-Selectin Expression on Platelets Determines Size and Stability of Platelet Aggregates. *Circulation* **2000**, *102*, 1931–1936. [CrossRef]
40. Théorêt, J.-F.; Chahrour, W.; Yacoub, D.; Merhi, Y. Recombinant P-selectin glycoprotein-ligand-1 delays thrombin-induced platelet aggregation: A new role for P-selectin in early aggregation. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148*, 299–305. [CrossRef] [PubMed]
41. Arya, M.; Anvari, B.; Romo, G.M.; Cruz, M.A.; Dong, J.-F.; McIntire, L.V.; Moake, J.L.; López, J. Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: Studies using optical tweezers. *Blood* **2002**, *99*, 3971–3977. [CrossRef]
42. Tracy, P.B.; Mann, K.G. Prothrombinase complex assembly on the platelet surface is mediated through the 74,000-dalton component of factor Va. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 2380–2384. [CrossRef]
43. 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. [CrossRef]
44. Aggarwal, A.; Kabbani, S.S.; Rimmer, J.M.; Gennari, F.J.; Taatjes, D.J.; Sobel, B.E.; Schneider, D.J. Biphasic effects of hemodialysis on platelet reactivity in patients with end-stage renal disease: A potential contributor to cardiovascular risk. *Am. J. Kidney Dis.* **2002**, *40*, 315–322. [CrossRef]
45. Mourikis, P.; Helten, C.; Dannenberg, L.; Hohlfeld, T.; Stegbauer, J.; Petzold, T.; Levkau, B.; Zeus, T.; Kelm, M.; Polzin, A. Platelet reactivity in patients with chronic kidney disease and hemodialysis. *J. Thromb. Thrombolysis* **2020**, *49*, 168–172. [CrossRef]
46. Sobol, A.B.; Kamińska, M.; Walczynska, M.; Walkowiak, B. Effect of Uremia and Hemodialysis on Platelet Apoptosis. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **2012**, *19*, 320–323. [CrossRef]
47. De Laval, P.; Mobarrez, F.; Almquist, T.; Vassil, L.; Fellström, B.; Soveri, I. Acute effects of haemodialysis on circulating microparticles. *Clin. Kidney J.* **2018**, *12*, 456–462. [CrossRef]
48. Yldrm, Z.K.; Orhan, M.F.; Büyükavc, M. Platelet function alterations and their relation to P-selectin (CD62P) expression in children with iron deficiency anemia. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2011**, *22*, 98–101. [CrossRef] [PubMed]
49. Schoorl, M.; Grooteman, M.P.; Bartels, P.C.; Nubé, M.J. Aspects of platelet disturbances in haemodialysis patients. *Clin. Kidney J.* **2013**, *6*, 266–271. [CrossRef] [PubMed]

50. Qiao, J.; Arthur, J.F.; Gardiner, E.E.; Andrews, R.K.; Zeng, L.; Xu, K. Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 126–130. [CrossRef] [PubMed]
51. Yang, K.; Du, C.; Wang, X.; Li, F.; Xu, Y.; Wang, S.; Chen, S.; Chen, F.; Shen, M.; Chen, M.; et al. Indoxyl sulfate induces platelet hyperactivity and contributes to chronic kidney disease–associated thrombosis in mice. *Blood* **2017**, *129*, 2667–2679. [CrossRef] [PubMed]
52. Wachowicz, B.; Olas, B.; Zbikowska, H.M.; Buczyński, A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets* **2002**, *13*, 175–182. [CrossRef]
53. Ghasemzadeh, M.; Hosseini, E. Platelet granule release is associated with reactive oxygen species generation during platelet storage: A direct link between platelet pro-inflammatory and oxidation states. *Thromb. Res.* **2017**, *156*, 101–104. [CrossRef]
54. Georgatzakou, H.T.; Tzounakas, V.L.; Kriebardis, A.G.; Velentzas, A.D.; Kokkalis, A.C.; Antonelou, M.H.; Papassideri, I.S. Short-term effects of hemodiafiltration versus conventional hemodialysis on erythrocyte performance. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2018**, *96*, 249–257. [CrossRef]
55. Burton, J.O.; Hamali, H.A.; Singh, R.; Abbasian, N.; Parsons, R.; Patel, A.K.; Goodall, A.H.; Brunskill, N.J. Elevated Levels of Procoagulant Plasma Microvesicles in Dialysis Patients. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72663. [CrossRef] [PubMed]
56. Klatt, C.; Krüger, I.; Zey, S.; Krott, K.-J.; Spelleken, M.; Gowert, N.S.; Oberhuber, A.; Pfaff, L.; Lückstädt, W.; Jurk, K.; et al. Platelet-RBC interaction mediated by FasL/FasR induces procoagulant activity important for thrombosis. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*, 3906–3925. [CrossRef]
57. Smeets, M.W.J.; Mourik, M.J.; Niessen, H.W.M.; Hordijk, P.L. Stasis Promotes Erythrocyte Adhesion to von Willebrand Factor. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2017**, *37*, 1618–1627. [CrossRef]
58. Sudnitsyna, J.; Skverchinskaya, E.; Dobrylko, I.; Nikitina, E.; Gambaryan, S.; Mindukshev, I. Microvesicle Formation Induced by Oxidative Stress in Human Erythrocytes. *Antioxidants* **2020**, *9*, 929. [CrossRef] [PubMed]
59. Georgatzakou, H.T.; Tzounakas, V.L.; Kriebardis, A.G.; Velentzas, A.D.; Papageorgiou, E.G.; Voulgaridou, A.I.; Kokkalis, A.C.; Antonelou, M.H.; Papassideri, I.S. Pathophysiological aspects of red blood cells in end-stage renal disease patients resistant to recombinant human erythropoietin therapy. *Eur. J. Haematol.* **2017**, *98*, 590–600. [CrossRef]
60. Maharana, P.K.; Goel, S.; Sahay, P.; Singhal, D.; Titiyal, J.S.; Sharma, N. Intraoperative optical coherence tomography-guided release of lenticulo-corneal adhesion and lens aspiration in anterior dislocation of lens with corneal edema. *Indian J. Ophthalmol.* **2020**, *68*, 510–512. [CrossRef]
61. Semenov, A.N.; Lugovtsov, A.E.; Shirshin, E.A.; Yakimov, B.P.; Ermolinskiy, P.B.; Bikmulina, P.Y.; Kudryavtsev, D.S.; Timashev, P.S.; Muravyov, A.V.; Wagner, C.; et al. Assessment of Fibrinogen Macromolecules Interaction with Red Blood Cells Membrane by Means of Laser Aggregometry, Flow Cytometry, and Optical Tweezers Combined with Microfluidics. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1448. [CrossRef] [PubMed]

frontiers in Cell and Developmental Biology

MINI REVIEW
published: 15 April 2020
doi: 10.3389/fcell.2020.00227

The Multi-Faced Extracellular Vesicles in the Plasma of Chronic Kidney Disease Patients

*Hara T. Georgatzakou[1], Efthimia G. Pavlou[1], Effie G. Papageorgiou[1], Issidora S. Papassideri[2], Anastasios G. Kriebardis[1] and Marianna H. Antonelou[2]**

[1] Laboratory of Reliability and Quality Control in Laboratory Hematology (HemQcR), Department of Biomedical Sciences, School of Health & Welfare Sciences, University of West Attica, Athens, Greece, [2] Department of Biology, School of Science, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), Athens, Greece

Extracellular vesicles (EVs) are membrane-enclosed nanoparticles released by most cells in body fluids and extracellular matrix. They function as signal transducers in intercellular communication, contributing to the maintenance of cell and tissue integrity. EVs biogenesis is deregulated in various pathologies, in structural and functional connection to the pathophysiology of donor cells. Consequently, EVs are considered diagnostic and monitoring factors in many diseases. Despite consensus as to their activity in promoting coagulation and inflammation, there is evidence suggesting protective roles for EVs in stress states. Chronic kidney disease (CKD) patients are at high risk of developing cardiovascular defects. The pathophysiology, comorbidities, and treatment of CKD may individually and in synergy affect extracellular vesiculation in the kidney, endothelium, and blood cells. Oxidative and mechanical stresses, chronic inflammation, and deregulation of calcium and phosphate homeostasis are established stressors of EV release. EVs may affect the clinical severity of CKD by transferring biological response modifiers between renal, vascular, blood, and inflammatory cells. In this Review, we focus on EVs circulating in the plasma of CKD patients. We highlight some recent advances in the understanding of their biogenesis, the effects of dialysis, and pharmacological treatments on them and their potential impact on thrombosis and vascular defects. The strong interest of the scientific community to this exciting field of research may reveal hidden pieces in the pathophysiology of CKD and thus, innovative ways to treat it. Overcoming gaps in EV biology and technical difficulties related to their size and heterogeneity will define the success of the project.

Keywords: CKD, ESRD, extracellular vesicles, dialysis, biomarkers, therapy

OPEN ACCESS

Edited by:
Evangelia Dounousi, University Hospital of Ioannina, Greece

Reviewed by:
George Pissas, University of Thessaly, Greece
Kostas G. Stylianou, University Hospital of Heraklion, Greece

****Correspondence:***
Marianna H. Antonelou
manton@biol.uoa.gr

Specialty section:
This article was submitted to Molecular Medicine, a section of the journal Frontiers in Cell and Developmental Biology

Received: *13 December 2019*
Accepted: *17 March 2020*
Published: *15 April 2020*

Citation:
Georgatzakou HT, Pavlou EG, Papageorgiou EG, Papassideri IS, Kriebardis AG and Antonelou MH (2020) The Multi-Faced Extracellular Vesicles in the Plasma of Chronic Kidney Disease Patients. Front. Cell Dev. Biol. 8:227. doi: 10.3389/fcell.2020.00227

EXTRACELLULAR VESICLES: BIOVECTORS AND BIOMARKERS

Extracellular vesiculation is an evolutionary conserved fundamental activity of both normal and diseased cells (Gyorgy et al., 2011). As an integral part of cell growth, aging, or development (Johnstone et al., 1987), as a way to get rid of unneeded cellular material, or as a means of intercellular, interorgan, and interspecies crosstalk (Giricz et al., 2014), extracellular vesiculation is

a key homeostatic mechanism contributing to survival, function, remodeling, and repair processes (Bruno et al., 2009). As cells transfer materials inside or outside them by secretory and transport vesicles, absolutely healthy, stressed, or activated cells release nanosized membrane-enclosed extracellular vesicles (EVs) to the external environment. Within blood circulation, EVs have a short half-life (from a couple of minutes to a few hours), before being taken up by neighboring or distant cells.

The highly dynamic and omnipresent EV compartment consists of a heterogeneous group of small exosomes (typically <150 nm), medium sized microvesicles (MVs, or microparticles, typically <1 μm), large sized apoptotic bodies, and several other EV subtypes (Raposo and Stoorvogel, 2013). On a constitutive basis or in response to stimulation, a cell can produce a wide variety of EVs. Their phenotype, biophysical characteristics, and biogenesis may overlap so much between each other and with non-EV components (e.g., plasma protein aggregates) so EVs characterization or classification is often a brainteaser.

Release of membrane vesicles is not a stochastic process but rather a regulated, highly selective cellular ability. It may have negative effects when overactivated, for example, during inflammation. The EVs bear "real-time" molecular signatures of the physiological states of the parental cells and their microenvironment. Based on those compositional and functional correlations, EVs are considered noninvasive predictive, diagnostic, and biomonitoring factors for the development and propagation of several diseases, including cardiovascular events (Sinning et al., 2011) and structural renal injury (Zhou et al., 2006), among others.

Moreover, according to numerous *in vitro* and *in vivo* data, material delivered by plasma EVs to recipient cells may induce immunomodulation, inflammation, oxidative stress, thrombogenesis, and vascular senescence or dysfunction (Gyorgy et al., 2011; Burger et al., 2012; Zecher et al., 2014; Cai et al., 2015; Camus et al., 2015; Hosseinkhani et al., 2018). This is quite reasonable for competent carriers endowed by nature with a remarkable efficiency to preserve their cargo intact and active along their journeys. Secreted cytokines, for example, are more stable inside EVs than free in plasma (Fitzgerald et al., 2018). *Vice versa*, the levels of circulating EVs are increased in diseases associated with inflammation or coagulation (van Beers et al., 2009), while proinflammatory and procoagulant factors promote the extracellular vesiculation by healthy cells *in vitro*.

Cardiovascular abnormalities represent the leading cause of increased morbidity and mortality in patients with chronic kidney disease (CKD), which may result to end-stage kidney disease (ESKD) (Antonelou et al., 2014). The molecular mechanisms underlining CKD have been associated with a pathophysiological context of chronic inflammation, anemia, accumulation of uremic toxins, increased oxidative and metabolic stresses (Antonelou et al., 2011), deregulation of calcium and phosphate homeostasis, coagulation and vascular abnormalities, and chronic or acute [e.g., by hemodialysis (HD)] endothelial activation (Georgatzakou et al., 2016). Of note, all of these pathologies have also been related to EV biology, either as stress factors triggering EV release or as outcomes of EVs' effects on sensitive cell targets. Those bidirectional connections reflect the dual role of EVs as both biomarkers of cell dysfunction and vectors of bioactive molecules contributing to it (**Figure 1**). Not surprisingly, CKD patients have elevated concentration of EVs in body fluids (Amabile et al., 2005).

EVS IN THE PLASMA OF CKD PATIENTS: GENERAL OUTLINE OF OUR KNOWLEDGE

Endothelium and blood cells in CKD are characterized by increased rate of extracellular vesiculation. Significant proportion of EVs (in most studies, MVs) that are released following activation of the origin cells (Antonelou et al., 2011) expose phosphatidylserine (PS; Faure et al., 2006; Burton et al., 2013; Yu et al., 2018) and are prothrombotic, often more than the parent cells (Sinauridze et al., 2007), according to both morphological and biochemical evidence (Gao et al., 2015b; Yu et al., 2018). The intriguing finding that the platelet-derived MVs are less procoagulant than in other diseases (Trappenburg et al., 2012) (probably due to functional defects in platelets) does not break up the intimate relation of EVs with thrombosis in CKD, as uremic patients with thrombotic events have more MVs compared to those without events (Ando et al., 2002). Moreover, PS on plasma EVs may nucleate calcium phosphate, contributing to ectopic calcification reactions (Wu et al., 2013). Therefore, pharmacological blocking of the PS binding sites on cells and EVs or lipid lowering drugs (Almquist et al., 2016) have been considered as meaningful measures to prevent thrombosis and vascular calcification risk in CKD. Of note, CKD patients with vascular calcification have both more circulating endothelial MVs and less endothelial progenitor cells compared to patients without calcification. This looming imbalance in endothelial damage and repair processes is probably induced by the MV-mediated expression of osteocalcin (Soriano et al., 2014).

Several cross-talking factors seem to augment extracellular vesiculation in CKD (**Figure 1**). Uremic toxins constitute the central one. To support, the PS^+ EV levels *in vivo* are inversely correlated with the glomerular filtration rate (Almquist et al., 2016; Yu et al., 2018), but positively with uric acid and proteinuria levels (Yu et al., 2018). More procoagulant MVs are detected in diabetes mellitus patients with CKD compared to patients without it (Almquist et al., 2016), and in patients with extreme albuminuria than in those with lower or normal levels (Yu et al., 2018). To get a laboratory verification, incubation of normal endothelial cells or red blood cells (RBCs) with (i) patients' serum, (ii) uremic toxins at concentrations found in patients, or (iii) increased concentration of phosphate induce PS exposure on cells and EVs release (Faure et al., 2006; Abbasian et al., 2015; Gao et al., 2015a,b; Yu et al., 2018).

Another informative (inverse) correlation of endothelial MVs with shear stress is repeatedly detected in ESRD patients. It suggests that variations in shear-stress determinants and blood viscosity, including anemia and hemoconcentration arisen by the dialysis or erythropoietin (EpO) supplementation, may affect the vesiculation rate in the endothelium (Boulanger et al., 2007). Indeed, more endothelial cell-derived MVs have been

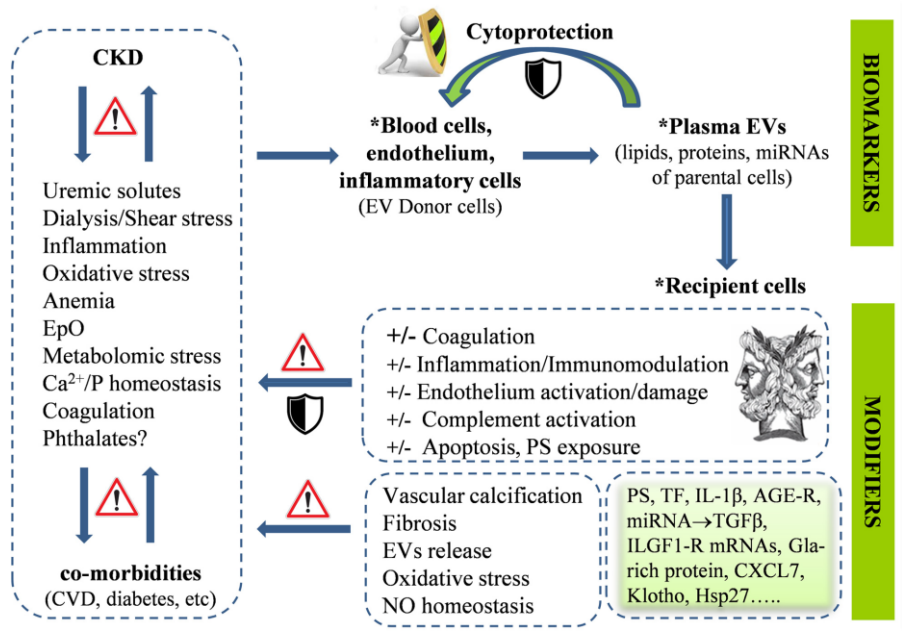


FIGURE 1 | The chronic kidney disease (CKD)-related pathophysiological factors, treatment modalities, and comorbidities affect the cellular stress and activation status of endothelium and blood cells, leading to augmented release of extracellular vesicles (EVs) in the plasma. EVs contain molecular components of parental cells, and thus, are considered biomarkers of disease phenotypes. EV release may represent a cytoprotective mechanism allowing, among other, removal of stress or death signals from donor cells. Interactions of plasma EVs with recipient cells and plasma components may be involved in the progress of the primary disease *per se* and its cardiovascular complications in both directions, either by transmitting and amplifying dangerous, cellular response modifiers or by counteracting them. The "Janus face" is a general feature of EVs functional potential, related to their complex biology, in both donor and recipient cells. Advances in EV research have provided sharper pictures of plasma EVs in CKD, identifying them as key parts of both problem and solution.

detected in child and adult dialysis patients with CKD, than in patients not getting dialysis (Dursun et al., 2009; Merino et al., 2010), but those findings may merely reflect the clinical severity of the disease. When comparing patients of similar clinical severity, both inflammation and repetitive mechanical stress, imposed on endothelium and blood cells by hemodialysis, still seem to augment vesiculation (Daniel et al., 2006). The same inducers modify the EV phenotypes and micro-RNA (miRNA) cargos, often in cell-specific (Faure et al., 2006; Trappenburg et al., 2012), or dialysis modal-specific ways (Cavallari et al., 2019). For instance, MV concentration is lower in patients treated by hemodiafiltration versus conventional hemodialysis (Georgatzakou et al., 2018). By examining the short-term effects of a single dialysis session on EV measurements, dialysis still triggers release of MVs but again, with marked differences between high-flux and low-flux dialyzers (de Laval et al., 2019). As to the accumulation of the PS-exposing MVs (Georgatzakou et al., 2018) and smaller EVs (Ruzicka et al., 2019), dialysis generally exerts a beneficial acute effect, mediated in part by EV absorbance to the dialysis membrane (Ruzicka et al., 2019), at least in patients with adequate response to EpO (Georgatzakou et al., 2017). Additionally, hemodialysis seems to be more effective in eliminating small compared to bigger EVs (Ruzicka et al., 2019). There is evidence that EpO affects platelet activation and promotes EV accumulation (Ando et al., 2002). This is quite interesting, because endothelium damage and cardiovascular disease appear more frequently in EpO resistance (Panichi et al., 2011). Despite that, several renal-protective EpO signaling pathways are proceeded through stimulating EV release by both mesenchymal stem cells (Wang et al., 2015) and bone marrow cells (Zhou et al., 2016). Finally, patients on hemodialysis are regularly exposed to considerable amounts of phthalates leaching by plastic tubing (Faouzi et al., 1999). Although the field is aware of the associated risks, the probable contribution of phthalates on comorbidities (Kataria et al., 2017) and extracellular vesiculation [extensively studied in stored blood (Serrano et al., 2016)], as well

as their probable dissemination to sensitive targets through EVs, have not been investigated so far in CKD.

WHAT IS THE MESSAGE OF CIRCULATING EVs IN CKD?

Like other pathologies, EVs represent phenotypic markers of cellular stress and activation in CKD. More importantly, their number and composition may also play a role in the pathophysiology of cardiovascular complications, and thus in mortality risk (Carmona et al., 2017a).

On one side, a wide panel of "incriminating" bioreactive phenotypes have been detected in plasma EVs of ESRD patients. Apart from PS, those phenotypes include platelet activation markers, tissue factor (TF), IL-1β, miRNAs (Shang et al., 2017), and advanced glycation end products (AGEs) receptor (Stinghen et al., 2016), which are potentially involved in coagulation, inflammation, oxidative stress, and endothelial activation/dysfunction (Stinghen et al., 2016; de Laval et al., 2019). Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and atherosclerosis are determinants of cardiovascular risk in patients with or without CKD. Flow cytometry, functional measurements, and Kaplan–Meier survival analysis have showed that the concentration of endothelium-derived MVs in ESRD selectively correlates with arterial dysfunction *in vivo* (Amabile et al., 2005; Dursun et al., 2009), and further predicts cardiovascular mortality (Amabile et al., 2012). MVs released by cells exposed to uremic substances promote functional loss in endothelial progenitor cells (marked by overexpression of NF-κB and p53 proteins) (Carmona et al., 2017b) and TGFβ-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells (Ryu et al., 2017), while isolated ESRD MVs can impair NO release and endothelium relaxation (Amabile et al., 2005). Endothelial dysfunction may be further related to activation of the alternative complement pathway and of note, endothelium-derived MVs in CKD do contain factor D and can activate the alternative pathway *in vitro* (Jalal et al., 2018).

Endothelial dysfunction and fibrosis may be promoted in CKD by EV-mediated miRNA transfer mechanisms (Xie et al., 2017). miRNA present in MVs induced by uremic toxins disturb signaling pathways involved in endothelial regeneration through oxidative stress and apoptosis (Carmona et al., 2017b). Indeed, a series of miRNAs that mostly target TGFβ signaling-related mRNAs in recipient cells have been found enriched or depleted in plasma and plasma-derived exosomes and MVs from patients with CKD (Muralidharan et al., 2017). miR-92a, for instance, is involved in atherosclerosis and cardiovascular disease as an effective suppressor of key endothelial-protective mRNAs. High serum levels of miR-92a have been associated with decreased kidney function. Moreover, endothelial MVs of uremic patients are enriched in miR-92a and uremic plasma upregulates its expression in cultured endothelial cells (Shang et al., 2017). Another miRNA, the miR-223 (which is abundant in resting platelets and further upregulated following platelet activation by pro-inflammatory factors), is enriched in platelet MVs of patients with nephritis, or atherosclerosis. It was found that miR-223 can promote apoptosis induced by AGEs in endothelial cells *in vitro* via targeting the insulin-like growth factor 1 receptor (Pan et al., 2014). Of note, a higher expression of miR-223 was found in the endothelial-derived exosomes and MVs of ESRD patients treated by bicarbonate hemodialysis compared to those treated by online hemodiafiltration and healthy subjects in close relation to variation in systemic inflammation markers (Cavallari et al., 2019).

Apart from the EV-delivered miR223, exosomes and MVs of ESRD patients with low levels of the Gla-rich protein (an anti-inflammatory factor and inhibitor of calcification in the cardiovascular system) can induce calcification in target vascular smooth muscle cells, by promoting osteogenic differentiation and inflammation (Viegas et al., 2018). There is evidence that monocyte and endothelial MVs induce podocyte phenotypic modifications *in vitro* [release of proinflammatory cytokines and vascular endothelial growth factor (VEGF)] typically associated with glomerular permeability and proteinuria (Eyre et al., 2011). Moreover, plasma platelet MVs can cause glomerular endothelial injury in animal models of diabetic nephropathy through transferring of chemokine ligand 7 (CXCL7) and activation of the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathway in glomerular target cells (Zhang et al., 2018). Finally, recent studies revealed that plasma EVs in ESRD also contain the Klotho protein (de Laval et al., 2019), a transmembrane component of the distal convoluted tubule of the kidney. Klotho expression declines with reducing renal function, and its deficiency has been speculated to contribute to vascular calcification (Hu et al., 2012).

On the other side, EVs release is also an "alarm button" pressed by cells facing life-threatening provocations. In RBCs, for example, extracellular vesiculation increases by aging, oxidative stress, and cold storage-associated lesions (Kriebardis et al., 2008). Proteomic analyses of those EVs have suggested activity toward disposal of abnormal, nonfunctional, or dangerous materials (e.g., complement) that could otherwise signal premature elimination of releasing cells (Willekens et al., 2008; Tzounakas et al., 2016). In a similar way, release of caspase 3-containing EVs by endothelial cells *in vitro* protects them from apoptosis and detachment (Abid Hussein et al., 2007), suggesting that a similar mechanism may contribute to endothelial cell survival in CKD (**Figure 1**). Consequently, it is reasonable to assume that increased release of PS^+ RBC-derived EVs in CKD may counterbalance erythrophagocytosis leading to anemia (Georgatzakou et al., 2017). Complete phenotyping of EVs under various clinical and treatment conditions would test the accuracy of this assumption.

In addition, certain EVs may well induce anti-inflammatory responses in recipient cells (Gasser and Schifferli, 2004), although these responses may vary in pathological conditions including hyperglycemia (Jansen et al., 2015). miR-222 (Jansen et al., 2015) and Hsp27 (Shi et al., 2019) laden plasma EVs, for example, were found to reduce tumor necrosis factor-alpha-induced ICAM-1 expression (and monocyte adhesion) and stimulate the release of IL-10 and NF-kappa in endothelial and B cells, respectively, both *in vitro* and *in vivo*. Moreover, plasma MVs that are released by the dysfunctional endothelium of patients with unstable angina are enriched in the miR-19b and exert antithrombotic function

by inhibiting TF expression in endothelial cells (Li et al., 2014). Several other miRNAs that are potentially encapsulated in plasma EVs, such as the miR-23b (Zhao et al., 2016), have been shown to alleviate fibrosis and albuminuria in diabetic nephropathy, and thus, their levels are pathologically low in the serum and kidney of the patients. It is worth studying the degree of encapsulation of those cytoprotective miRNAs into the plasma EVs. Recent reports in animal models of kidney disease showed that miRNA expression is lower in plasma-derived exosomes compared to the plasma and that the miRNA levels may widely vary in each disease context (Xie et al., 2017). To sum up, plasma EVs may counteract proinflammatory and procoagulant signals instead of transmitting and amplifying them (**Figure 1**), and thus, part of them may protect the vascular and kidney functions in CKD.

HOW CAN WE READ THE FULL MESSAGE AND MOVE FORWARD?

EVs represent an exciting chapter of contemporary biology and medicine. The disproportionally high ratio of reviews to research articles dealing with plasma EVs in CKD (**Figure 2A**) reflects a major interest for understanding a subject that is, however, difficult to be studied. Generally, research on EVs is a challenge for the scientific community, mainly due to their size, heterogeneity, artificial generation during the preanalytical stages, and lack of standardized methods of working with them (Doyle and Wang, 2019). Let alone studying them in CKD patients characterized by extreme variabilities in primary lesions, comorbidities, and treatments, which individually and in synergy affect both their release and composition (Carmona et al., 2017a).

Despite that, research on EVs is critical for CKD for many reasons. First of all, we are now aware that EVs are key figures in the frame of this disease. They have to be taken into consideration, for instance, when measuring plasma cytokine levels in patients, because EV-encapsulated cytokines may not be detected by standard cytokine assays (Fitzgerald et al., 2018). Second, EVs have been associated with most of the cardiovascular risk factors (Hosseinkhani et al., 2018) and with poor clinical outcomes in CKD as in many other diseases. Third, regular recording of clinical/laboratory data of CKD patients drives physicians to make individual, intervening decisions on treatments per short intervals of time. Consequently, availability of sensitive tools to support biomonitoring of the disease progression and identification of patients at risk are highly desirable. Finally, similar to their release, EVs uptake is also a specific and regulated process. Since EVs can cross the glomerular basement membrane, the possibility of using them as therapeutic vehicles targeting the kidney cells *per se* (Oosthuyzen et al., 2016) open new prospects for CKD management.

Plasma EVs may provide peripheral biomarkers easily available for clinical diagnosis. The first step toward that is discovery of a reliable marker (or panel of markers) being related to a particular disease state, complication, or pathological condition. The candidate biomarker should then be appropriately validated *in vivo*, in animal disease models at first, and then, in cohorts of patients by clinical studies. Last is bridging of those biomarkers' capabilities to clinical setting. Isolation of EVs, especially exosomes, is not a clinically friendly procedure; however, development of simple and quick innovative separation methods (like the microfluidic based techniques) provides candidates for potential use in the clinical setting.

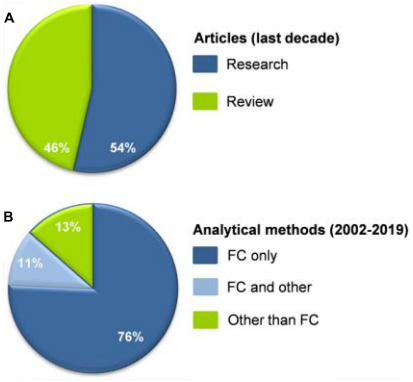


FIGURE 2 | **(A)** Percentage of research and review articles dealing with plasma EVs in CKD published in the last decade (*N* = 56). **(B)** The vast majority of research data on plasma EVs in CKD derived in the period from 2002 till today (*N* = 37) were based exclusively on flow cytometry (FC). Fewer studies combined FC with other methodologies (immunoblotting, nanoparticle tracking analysis, proteomics, Elisa, electron microscopy) or they did not use FC at all. References are shown in the **Supplementary Material.**

Biomarker mining presupposes availability of reliable EV metrical, compositional, physicochemical, and uptake (Zaborowski et al., 2015) data. First of all, analytical methods able to detect and characterize the entire vesicular population, including the smaller (<200 nm) EVs, must be used. The majority of data reported on plasma EVs in CKD have been extracted by flow cytometry, the "gold standard" analytical method for EVs characterization (**Figure 2B**). However, conventional cytometry cannot detect vesicles < 300 nm, the area that harbors the majority of EVs in human blood (Yuana et al., 2011; Arraud et al., 2014). Apart from that, it is now well established that only few blood EVs expose PS, namely, the most commonly used tag for flow cytometry (Connor et al., 2010; Arraud et al., 2014). Despite insights provided by immobilizing smaller EVs on bead surfaces, and advances in the detection limits of new nanoscale instruments (100–200 nm) (Dragovic et al., 2011; Gomes et al., 2018), the fact is that the biology and functions of smaller plasma EVs are largely unknown in CKD (Kapustin et al., 2015), in opposite to those of urinary exosomes (Erdbrugger and Le, 2016). Of note, however, comparative proteomic analysis of RBC membrane in ESRD patients with good or poor response to EpO administration suggested release of small and/or PS-negative EVs in responders that are undetectable by the conventional flow cytometry (Georgatzakou et al., 2017).

Assessment of vesiculation by the protein concentration of a vesicular pellet is not accurate because pellets contain both disease specific and unspecific protein profiles, and moreover, they are unavoidably contaminated by plasma components (Doyle and Wang, 2019). To get insight into EVs size and concentration, sophisticated physical methods like nanoparticle tracking (Dragovic et al., 2011; Burton et al., 2013) and tunable resistive pulse sensing analyses, in combination with cryo-electron microscopy, are currently used in the EV research field (Hosseinkhani et al., 2018). Compositional analyses are more appropriately performed by immunoblotting, the much informative omics techniques, and by microfluidic devices allowing capture of EVs on a chip's surface and then lysis and probing of lysate, for identification of both surface and lumen components (He et al., 2014). Thermophoretic enrichment and profiling has been successfully tested for cancer detection and classification as an alternative method to detect surface proteins of plasma EVs, following labeling with fluorescent aptamers (Liu et al., 2019). Under such integrative characterization of plasma EVs, lack of specific protein markers to distinguish between their subtypes becomes less important.

Compositional analyses of EVs are of critical importance to understand the hows and whys of their biogenesis, stimuli, targets, and effects. Global and targeted mass spectrometry-based proteomic analysis is best suitable to suggest biomarker candidates (Zhou et al., 2006), the cellular destinations of EVs, and thus, the most suitable therapeutic targets in a given patient or disease context. However, analysis of one data type by itself is often limited to correlations resulting by reactive processes rather than by causative modifications. Integration of multiomics (Hasin et al., 2017), electron microscopy and physical characterization data (Thery et al., 2018) would rather reveal hidden aspects of EV biology and functions, offering the opportunity to understand the flow of material and information in CKD.

In a similar way, simple enumeration of EVs is not enough to establish a pathophysiological mechanism. Instead of it, time, place, and means of interactions (ligand binding, membrane fusion, or uptake by endocytosis), as well as identification of the specific molecular content(s) that mainly account for any given biological effect on target cells, are most critically connected to their desirable or harmful bioreactivity. However, this is also the hardest part in EV assessment. Incorporation of the guidelines suggested by the International Society for Extracellular Vesicles (Thery et al., 2018) would greatly benefit the emerging contemporary area of research on CKD-related EVs.

CONCLUSION

Plasma EVs may have significant roles in CKD as disease biomarkers, risk factors for the development of complications, repair or protective factors diffusing harmful stress signals, and finally, therapeutic factors. They seem to be part of the problem and part of the solution. At times when advanced technologies for EVs assessment are still evolving, understanding of their biology, from biogenesis to ultimate effects on recipient cells, is of key importance to reveal their clinical relevance to CKD. Development of therapeutic interventions have already been oriented to both block their negative effects and take advantage of their beneficial properties. Regulation of EVs release or uptake by drugs, including statins, antioxidants, and actin depolymerizing agents, and removal from plasma by immunoadsorption have been reported (Karpman et al., 2017). Those interventions may allow prognosis, better diagnosis, and individualized treatments for CKD patients.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HG and MA conceived the concept, wrote the manuscript, and designed the figures. EPav, EPap, IP, and AK provided input and direction in structuring of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.00227/full#supplementary-material

REFERENCES

Abbasian, N., Burton, J. O., Herbert, K. E., Tregunna, B. E., Brown, J. R., Ghaderi-Najafabadi, M., et al. (2015). Hyperphosphatemia, phosphoprotein phosphatases, and microparticle release in vascular endothelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26, 2152–2162. doi: 10.1681/ASN.2014070642

Abid Hussein, M. N., Boing, A. N., Sturk, A., Hau, C. M., and Nieuwland, R. (2007). Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb. Haemost.* 98, 1096–1107. doi: 10.1160/th05-04-0231

Almquist, T., Mobarrez, F., Jacobson, S. H., Wallen, H., and Hjemdahl, P. (2016). Effects of lipid-lowering treatment on circulating microparticles in patients with diabetes mellitus and chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 31, 944–952. doi: 10.1093/ndt/gfv337

Amabile, N., Guerin, A. P., Leroyer, A., Mallat, Z., Nguyen, C., Boddaert, J., et al. (2005). Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 3381–3388. doi: 10.1681/ASN.2005050535

Amabile, N., Guerin, A. P., Tedgui, A., Boulanger, C. M., and London, G. M. (2012). Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 27, 1873–1880. doi: 10.1093/ndt/gfr573

Ando, M., Iwata, A., Ozeki, Y., Tsuchiya, K., Akiba, T., and Nihei, H. (2002). Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients. *Kidney Int.* 62, 1757–1763. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00627.x

Antonelou, M. H., Georgatzakou, H. T., Tzounakas, V. I., Velentzas, A. D., Kokkalis, A. C., Kriebardis, A. G., et al. (2014). Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study. *J. Proteomics* 101, 88–101. doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.009

Antonelou, M. H., Kriebardis, A. G., Velentzas, A. D., Kokkalis, A. C., Georgakopoulou, S. C., and Papassideri, I. S. (2011). Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. *J. Proteomics* 74, 2441–2452. doi: 10.1016/j.jprot.2011.04.009

Arraud, N., Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Pasquet, J. M., Mornet, S., et al. (2014). Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J. Thromb. Haemost.* 12, 614–627. doi: 10.1111/jth.12554

Boulanger, C. M., Amabile, N., Guerin, A. P., Pannier, B., Leroyer, A. S., Mallat, C. N., et al. (2007). In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension* 49, 902–908. doi: 10.1161/01.hyp.0000259667.22309.df

Bruno, S., Grange, C., Deregibus, M. C., Calogero, R. A., Saviozzi, S., Collino, F., et al. (2009). Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 1053–1067. doi: 10.1681/ASN.2008070798

Burger, D., Kwart, D. G., Montezano, A. C., Read, N. C., Kennedy, C. R., Thompson, C. S., et al. (2012). Microparticles induce cell cycle arrest through redox-sensitive processes in endothelial cells: implications in vascular senescence. *J. Am. Heart Assoc.* 1:e001842. doi: 10.1161/JAHA.112.001842

Burton, J. O., Hamali, H. A., Singh, R., Abbasian, N., Parsons, R., Patel, A. K., et al. (2013). Elevated levels of procoagulant plasma microvesicles in dialysis patients. *PLoS One* 8:e72663. doi: 10.1371/journal.pone.0072663

Cai, J., Guan, W., Tan, X., Chen, C., Li, L., Wang, N., et al. (2015). SRY gene transferred by extracellular vesicles accelerates atherosclerosis by promotion of leucocyte adherence to endothelial cells. *Clin. Sci* . 129, 259–269. doi: 10.1042/CS20140826

Camus, S. M., De Moraes, J. A., Bonnin, P., Abbyad, P., Le Jeune, S., Lionnet, F., et al. (2015). Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. *Blood* 125, 3805–3814. doi: 10.1182/blood-2014-07-589283

Carmona, A., Aguera, M. L., Luna-Ruiz, C., Buendia, P., Calleros, L., Garcia-Jerez, A., et al. (2017a). Markers of endothelial damage in patients with chronic kidney disease on hemodialysis. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 312, F673–F681. doi: 10.1152/ajprenal.00013.2016

Carmona, A., Guerrero, F., Buendia, P., Obrero, T., Aljama, P., and Carracedo, J. (2017b). Microvesicles derived from indoxyl sulfate treated endothelial cells induce endothelial progenitor cells dysfunction. *Front. Physiol.* 8:666. doi: 10.3389/fphys.2017.00666

Cavallari, C., Dellepiane, S., Fonsato, V., Medica, D., Marengo, M., Migliori, M., et al. (2019). Online hemodiafiltration inhibits inflammation-related endothelial dysfunction and vascular calcification of uremic patients modulating mir-223 expression in plasma extracellular vesicles. *J. Immunol.* 202, 2372–2383. doi: 10.4049/jimmunol.1800747

Connor, D. E., Exner, T., Ma, D. D., and Joseph, J. E. (2010). The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb. Haemost.* 103, 1044–1052. doi: 10.1160/th09-09-0644

Daniel, L., Fakhouri, F., Joly, D., Mouthon, L., Nusbaum, P., Grunfeld, J. P., et al. (2006). Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int.* 69, 1416–1423. doi: 10.1038/sj.ki.5000306

de Laval, P., Mobarrez, F., Almquist, T., Vassil, L., Fellstrom, B., and Soveri, I. (2019). Acute effects of haemodialysis on circulating microparticles. *Clin. Kidney J.* 12, 456–462. doi: 10.1093/ckj/sfy109

Doyle, L. M., and Wang, M. Z. (2019). Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells* 8:727. doi: 10.3390/cells8070727

Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J., Hole, P., et al. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using nanoparticle tracking analysis. *Nanomedicine* 7, 780–788. doi: 10.1016/j.nano.2011.04.003

Dursun, I., Poyrazoglu, H. M., Gunduz, Z., Ulger, H., Yykylmaz, A., Dusunsel, R., et al. (2009). The relationship between circulating endothelial microparticles and arterial stiffness and atherosclerosis in children with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 24, 2511–2518. doi: 10.1093/ndt/gfp066

Erdbrugger, U., and Le, T. H. (2016). Extracellular vesicles in renal diseases: more than novel biomarkers? *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 12–26. doi: 10.1681/ASN.2015010074

Eyre, J., Burton, J. O., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Topham, P. S., and Brunskill, N. J. (2011). Monocyte- and endothelial-derived microparticles induce an inflammatory phenotype in human podocytes. *Nephron. Exp. Nephrol.* 119, e58–e66. doi: 10.1159/000329575

Faouzi, M. A., Dine, T., Gressier, B., Kambia, K., Luyckx, M., Pagniez, D., et al. (1999). Exposure of hemodialysis patients to di-2-ethylhexyl phthalate. *Int. J. Pharm,* 180, 113–121. doi: 10.1016/s0378-5173(98)00411-6

Faure, V., Dou, L., Sabatier, F., Cerini, C., Sampol, J., Berland, Y., et al. (2006). Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J. Thromb. Haemost.* 4, 566–573. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01780.x

Fitzgerald, W., Freeman, M. L., Lederman, M. M., Vasilieva, E., Romero, R., and Margolis, L. A. (2018). System of cytokines encapsulated in extracellular vesicles. *Sci. Rep.* 8:8973. doi: 10.1038/s41598-018-27190-x

Gao, C., Ji, S., Dong, W., Qi, Y., Song, W., Cui, D., et al. (2015a). Indolic uremic solutes enhance procoagulant activity of red blood cells through phosphatidylserine exposure and microparticle release. *Toxins* 7, 4390–4403. doi: 10.3390/toxins7114390

Gao, C., Xie, R., Yu, C., Ma, R., Dong, W., Meng, H., et al. (2015b). Thrombotic role of blood and endothelial cells in uremia through phosphatidylserine exposure and microparticle release. *PLoS One* 10:e0142835. doi: 10.1371/journal.pone.0142835

Gasser, O., and Schifferli, J. A. (2004). Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* 104, 2543–2548. doi: 10.1182/blood-2004-01-0361

Georgatzakou, H. T., Antonelou, M. H., Papassideri, I. S., and Kriebardis, A. G. (2016). Red blood cell abnormalities and the pathogenesis of anemia in end-stage renal disease. *Proteomics Clin. Appl.* 10, 778–790. doi: 10.1002/prca.201500127

Georgatzakou, H. T., Tzounakas, V. L., Kriebardis, A. G., Velentzas, A. D., Kokkalis, A. C., Antonelou, M. H., et al. (2018). Short-term effects of hemodiafiltration versus conventional hemodialysis on erythrocyte performance. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 96, 249–257. doi: 10.1139/cjpp-2017-0285

Georgatzakou, H. T., Tzounakas, V. L., Kriebardis, A. G., Velentzas, A. D., Papageorgiou, E. G., Voulgaridou, A. I., et al. (2017). Pathophysiological aspects of red blood cells in end-stage renal disease patients resistant to recombinant human erythropoietin therapy. *Eur. J. Haematol.* 98, 590–600. doi: 10.1111/ejh.12875

Giricz, Z., Varga, Z. V., Baranyai, T., Sipos, P., Paloczi, K., Kittel, A., et al. (2014). Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles. *J. Mol. Cell Cardiol.* 68, 75–78. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.004

Gomes, J., Lucien, F., Cooper, T. T., Kim, Y., Williams, K. C., Liao, X., et al. (2018). Analytical considerations in nanoscale flow cytometry of extracellular vesicles to achieve data linearity. *Thromb. Haemost.* 118, 1612–1624. doi: 10.1055/s-0038-1668544

Gyorgy, B., Szabo, T. G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., et al. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol. Life Sci.* 68, 2667–2688. doi: 10.1007/s00018-011-0689-3

Hasin, Y., Seldin, M., and Lusis, A. (2017). Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol.* 18:83. doi: 10.1186/s13059-017-1215-1

He, M., Crow, J., Roth, M., Zeng, Y., and Godwin, A. K. (2014). Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology. *Lab Chip* 14, 3773–3780. doi: 10.1039/c4lc00662c

Hosseinkhani, B., Kuypers, S., van den Akker, N. M. S., Molin, D. G. M., and Michiels, L. (2018). Extracellular vesicles work as a functional inflammatory mediator between vascular endothelial cells and immune cells. *Front. Immunol* 9:1789. doi: 10.3389/fimmu.2018.01789

Hu, M. C., Kuro-o, M., and Moe, O. W. (2012). The emerging role of Klotho in clinical nephrology. *Nephrol. Dial. Transplant.* 27, 2650–2657. doi: 10.1093/ndt/gfs160

Jalal, D., Renner, B., Laskowski, J., Stites, E., Cooper, J., Valente, K., et al. (2018). Endothelial Microparticles and systemic complement activation in patients with Chronic kidney disease. *J. Am. Heart Assoc.* 7,:e007818. doi: 10.1161/JAHA.117.007818

Jansen, F., Yang, X., Baumann, K., Przybilla, D., Schmitz, T., Flender, A., et al. (2015). Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism. *J. Cell Mol. Med.* 19, 2202–2214. doi: 10.1111/jcmm.12607

Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., and Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma

membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262, 9412–9420.

Kapustin, A. N., Chatrou, M. L., Drozdov, I., Zheng, Y., Davidson, S. M., Soong, D., et al. (2015). Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ. Res.* 116, 1312–1323. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305012

Karpman, D., Stahl, A. L., and Arvidsson, I. (2017). Extracellular vesicles in renal disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 13, 545–562. doi: 10.1038/nrneph.2017.98

Kataria, A., Levine, D., Wertenteil, S., Vento, S., Xue, J., Rajendiran, K., et al. (2017). Exposure to bisphenols and phthalates and association with oxidant stress, insulin resistance, and endothelial dysfunction in children. *Pediatr. Res.* 81, 857–864. doi: 10.1038/pr.2017.16

Kriebardis, A. G., Antonelou, M. H., Stamoulis, K. E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L. H., and Papassideri, I. S. R. B. C. - (2008). derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. *Transfusion* 48, 1943–1953. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01794.x

Li, S., Ren, J., Xu, N., Zhang, J., Geng, Q., Cao, C., et al. (2014). MicroRNA-19b functions as potential anti-thrombotic protector in patients with unstable angina by targeting tissue factor. *J. Mol. Cell Cardiol.* 75, 49–57. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.06.017

Liu, C., Zhao, J., Tian, F., Cai, L., Zhang, W., Feng, Q., et al. (2019). Low-cost thermophoretic profiling of extracellular-vesicle surface proteins for the early detection and classification of cancers. *Nat. Biomed. Eng.* 3, 183–193. doi: 10.1038/s41551-018-0343-6

Merino, A., Portoles, J., Selgas, R., Ojeda, R., Buendia, P., Ocana, J., et al. (2010). Effect of different dialysis modalities on microinflammatory status and endothelial damage. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 5, 227–234. doi: 10.2215/CJN.03260509

Muralidharan, J., Ramezani, A., Hubal, M., Knoblach, S., Shrivastav, S., Karandish, S., et al. (2017). Extracellular microRNA signature in chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol* 312, F982–F991. doi: 10.1152/ajprenal.00569.2016

Oosthuyzen, W., Scullion, K. M., Ivy, J. R., Morrison, E. E., Hunter, R. W., Starkey Lewis, P. J., et al. (2016). Vasopressin regulates extracellular vesicle uptake by kidney collecting duct cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 3345–3355. doi: 10.1681/ASN.2015050568

Pan, Y., Liang, H., Liu, H., Li, D., Chen, X., Li, L., et al. (2014). Platelet-secreted microRNA-223 promotes endothelial cell apoptosis induced by advanced glycation end products via targeting the insulin-like growth factor 1 receptor. *J. Immunol.* 192, 437–446. doi: 10.4049/jimmunol.1301790

Panichi, V., Rosati, A., Bigazzi, R., Paoletti, S., Mantuano, E., Beati, S., et al. (2011). Anaemia and resistance to erythropoiesis-stimulating agents as prognostic factors in haemodialysis patients: results from the RISCAVID study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 26, 2641–2648. doi: 10.1093/ndt/gfq802

Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383. doi: 10.1083/jcb.201211138

Ruzicka, M., Xiao, F., Abujrad, H., Al-Rewashdy, Y., Tang, V. A., Langlois, M. A., et al. (2019). Effect of hemodialysis on extracellular vesicles and circulating submicron particles. *BMC Nephrol.* 20:294. doi: 10.1186/s12882-019-1459-y

Ryu, J. H., Park, H., and Kim, S. J. (2017). The effects of indoxyl sulfate-induced endothelial microparticles on neointimal hyperplasia formation in an ex vivo model. *Ann. Surg. Treat. Res.* 93, 11–17. doi: 10.4174/astr.2017.93.1.11

Serrano, K., Levin, E., Chen, D., Hansen, A., Turner, T. R., Kurach, J., et al. (2016). An investigation of red blood cell concentrate quality during storage in paediatric-sized polyvinylchloride bags plasticized with alternatives to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). *Vox. Sang.* 110, 227–235. doi: 10.1111/vox.12355

Shang, F., Wang, S. C., Hsu, C. Y., Miao, Y., Martin, M., Yin, Y., et al. (2017). MicroRNA-92a mediates endothelial dysfunction in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 28, 3251–3261. doi: 10.1681/ASN.2016111215

Shi, C., Ulke-Lemee, A., Deng, J., Batulan, Z., and O'Brien, E. R. (2019). Characterization of heat shock protein 27 in extracellular vesicles: a potential anti-inflammatory therapy. *FASEB J.* 33, 1617–1630. doi: 10.1096/fj.201800987R

Sinauridze, E. I., Kireev, D. A., Popenko, N. Y., Pichugin, A. V., Panteleev, M. A., Krymskaya, O. V., et al. (2007). Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb. Haemost.* 97, 425–434. doi: 10.1160/th06-06-0313

Sinning, J. M., Losch, J., Walenta, K., Bohm, M., Nickenig, G., and Werner, N. (2011). Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur. Heart J.* 32, 2034–2041. doi: 10.1093/eurheartj/ehq478

Soriano, S., Carmona, A., Trivino, F., Rodriguez, M., Alvarez-Benito, M., Martin-Malo, A., et al. (2014). Endothelial damage and vascular calcification in patients with chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol,* 307, F1302–F1311. doi: 10.1152/ajprenal.00114.2014

Stinghen, A. E., Massy, Z. A., Vlassara, H., Striker, G. E., and Boullier, A. (2016). uremic toxicity of advanced glycation end products in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 354–370. doi: 10.1681/ASN.2014101047

Thery, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., et al. (2018). 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. *J. Extracell. Vesicles* 7:1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750

Trappenburg, M. C., van Schilfgaarde, M., Frerichs, F. C., Spronk, H. M., ten Cate, H., de Fijter, C. W., et al. (2012). Chronic renal failure is accompanied by endothelial activation and a large increase in microparticle numbers with reduced procoagulant capacity. *Nephrol. Dial. Transplant.* 27, 1446–1453. doi: 10.1093/ndt/gfr474

Tzounakas, V. L., Kriebardis, A. G., Georgatzakou, H. T., Foudoulaki-Paparizos, L. E., Dzieciatkowska, M., Wither, M. J., et al. (2016). Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient subjects may be better "storers" than donors of red blood cells. *Free Radic. Biol. Med.* 96, 152–165. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.005

van Beers, E. J., Schaap, M. C., Berckmans, R. J., Nieuwland, R., Sturk, A., van Doormaal, F. F., et al. (2009). Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica* 94, 1513–1519. doi: 10.3324/haematol.2009.008938

Viegas, C. S. B., Santos, L., Macedo, A. L., Matos, A. A., Silva, A. P., Neves, P. L., et al. (2018). Chronic kidney disease circulating calciprotein particles and extracellular vesicles promote vascular calcification: a role for GRP (Gla-Rich Protein). *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* 38, 575–587. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.310578

Wang, Y., Lu, X., He, J., and Zhao, W. (2015). Influence of erythropoietin on microvesicles derived from mesenchymal stem cells protecting renal function of chronic kidney disease. *Stem Cell Res. Ther.* 6:100. doi: 10.1186/s13287-015-0095-0

Willekens, F. L., Werre, J. M., Groenen-Dopp, Y. A., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., de Pauw, B., and Bosman, G. J. (2008). Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Br. J. Haematol.* 141, 549–556. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07055.x

Wu, C. Y., Martel, J., Cheng, W. Y., He, C. C., Ojcius, D. M., and Young, J. D. (2013). Membrane vesicles nucleate mineralo-organic nanoparticles and induce carbonate apatite precipitation in human body fluids. *J. Biol. Chem.* 288, 30571–30584. doi: 10.1074/jbc.M113.492157

Xie, J. X., Fan, X., Drummond, C. A., Majumder, R., Xie, Y., Chen, T., et al. (2017). MicroRNA profiling in kidney disease: plasma versus plasma-derived exosomes. *Gene* 627, 1–8. doi: 10.1016/j.gene.2017.06.003

Yu, M., Xie, R., Zhang, Y., Liang, H., Hou, L., Yu, C., et al. (2018). Phosphatidylserine on microparticles and associated cells contributes to the hypercoagulable state in diabetic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 33, 2115–2127. doi: 10.1093/ndt/gfy027

Yuana, Y., Bertina, R. M., and Osanto, S. (2011). Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb. Haemost.* 105, 396–408. doi: 10.1160/TH10-09-0595

Zaborowski, M. P., Balaj, L., Breakefield, X. O., and Lai, C. P. (2015). Extracellular vesicles: composition. biological relevance, and methods of study. *Bioscience* 65, 783–797. doi: 10.1093/biosci/biv084

Zecher, D., Cumpelik, A., and Schifferli, J. A. (2014). Erythrocyte-derived microvesicles amplify systemic inflammation by thrombin-dependent activation of complement. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* 34, 313–320. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302378

Zhang, Y., Ma, K. L., Gong, Y. X., Wang, G. H., Hu, Z. B., Liu, L., et al. (2018). Platelet microparticles mediate glomerular endothelial injury in early diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 29, 2671–2695. doi: 10.1681/ASN.2018040368

Zhao, B., Li, H., Liu, J., Han, P., Zhang, C., Bai, H., et al. (2016). MicroRNA-23b targets ras GTPase-activating protein sh3 domain-binding protein 2 to alleviate fibrosis and albuminuria in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 2597–2608. doi: 10.1681/ASN.2015030300

Zhou, H., Pisitkun, T., Aponte, A., Yuen, P. S., Hoffert, J. D., Yasuda, H., et al. (2006). Exosomal fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int.* 70, 1847–1857. doi: 10.1038/sj.ki.5001874

Zhou, Y., Fang, L., Yu, Y., Niu, J., Jiang, L., Cao, H., et al. (2016). Erythropoietin protects the tubular basement membrane by promoting the bone marrow to release extracellular vesicles containing tPA-targeting miR-144. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 310, F27–F40. doi: 10.1152/ajprenal.00303.2015

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Georgatzakou, Pavlou, Papageorgiou, Papassideri, Kriebardis and Antonelou. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.