

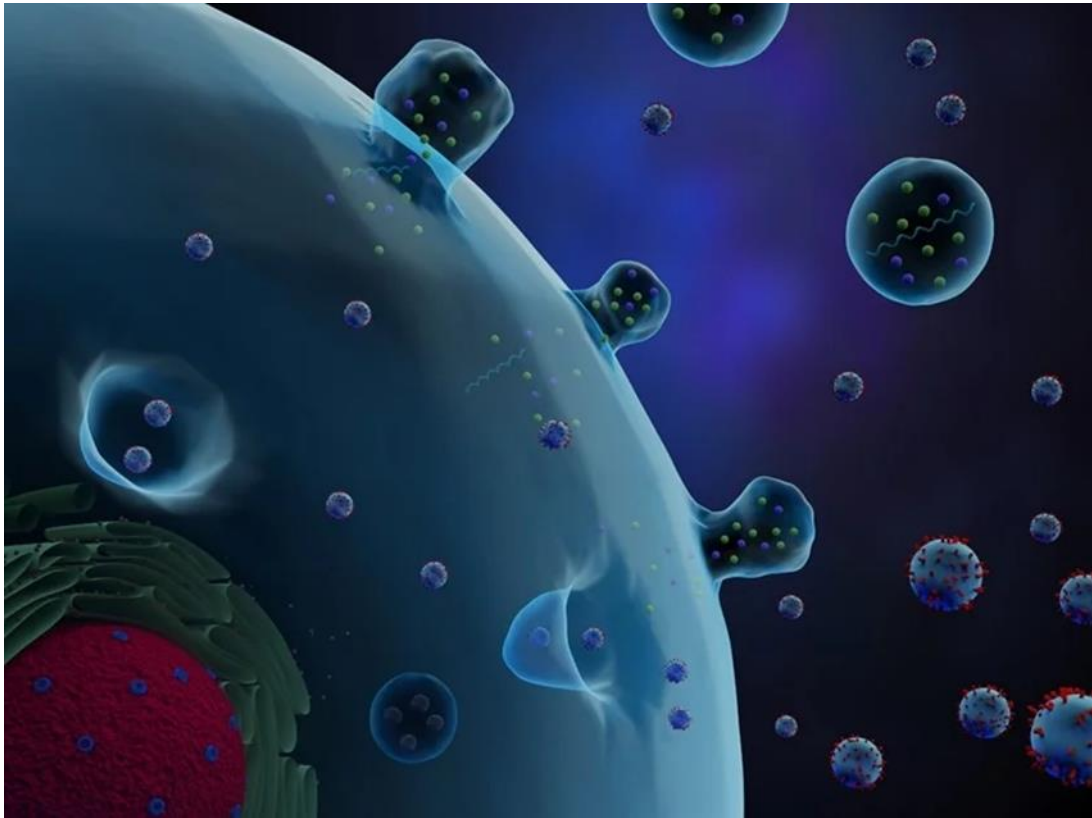


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στην χρόνια νεφρική ανεπάρκεια



Βασιλική Πανταζάτου

A.M. 19678232

Εισηγητής

Αναστάσιος Κριεμπάρδης, Καθηγητής

Αθήνα 2023



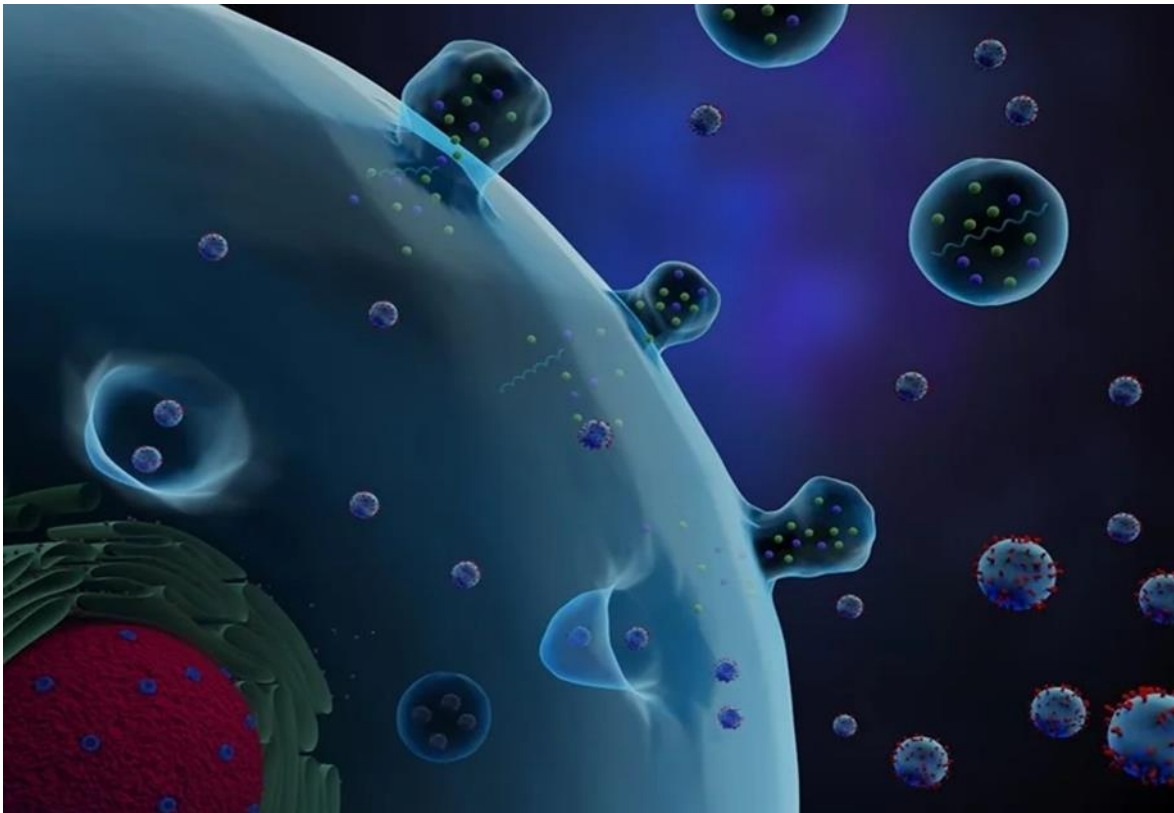
UNIVERSITY OF WEST ATTICA



**FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
DIVISION OF MEDICAL LABORATORIES**

DISSERTATION

The roll of microvesicles in chronic kidney disease



Vasiliki Pantazatou

C.N. 19678232

Supervisor

Anastasios Kriebardis, Professor

Athens 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στην χρόνια νεφρική ανεπάρκεια

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΙΣΗΓΗΤΗ

Όνοματεπώνυμο	Βαθμίδα	Υπογραφή
Αναστάσιος Κριεμπάρδης	Καθηγητής	
Ευθυμία Παύλου	Ακαδημαϊκή Υπότροφος	
Βασίλειος Μπίρτσας	Ακαδημαϊκός Υπότροφος	

Δήλωση Συγγραφέα Διπλωματικής Εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Βασιλική Πανταζάτου του Γεωργίου με αριθμό μητρώου 19678232 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα



Εισηγητής: Αναστάσιος Κριεμπάρδης

Περιεχόμενα	
Περίληψη.....	ix
Abstract	x
Πίνακας Συντομογραφιών.....	xi
Κατάλογος Εικόνων	xiii
1. Εισαγωγή	1
1.1. Οι νεφροί	1
1.1.1. Ανατομία των νεφρών	1
1.1.2. Λειτουργία των νεφρών	1
1.2. Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια.....	2
1.2.1. Ορισμός.....	2
1.2.2. Επιδημιολογία.....	2
1.2.3. Αίτια	3
1.2.4. Ταξινόμηση	3
1.2.5. Επιπλοκές της νόσου.....	4
1.2.5.1. Ουραιμικές τοξίνες.....	4
1.2.5.2. Αναιμία	5
1.2.6. Αιμοκάθαρση	6
1.3. Εξωκυτταρικά Κυστίδια	8
1.3.1. Εισαγωγή.....	8
1.3.2. Ταξινόμηση	8
1.3.3. Εξωσώματα	9
1.3.4. Αποπτωτικά Σωματίδια	10
1.4. Μικροκυστίδια.....	10
1.4.1. Βιογένεση	11
1.4.2. Λειτουργία.....	12
1.4.3. Φορτίο	13
1.5. Κυστίδια του αίματος	14
1.5.1. Κυστιδιοποίηση Ερυθρών Αιμοσφαιρίων.....	14
1.5.2. Κυστιδιοποίηση Αιμοπεταλίων	16
1.6. Μικροκυστίδια στην Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια.....	18
1.7. Αιμόσταση.....	21
1.7.1. Καταρράκτης της πήξης	21

1.7.2. Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στην αιμόσταση	22
1.7.3. Διαταραχές της αιμόστασης σε ασθενής με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια	23
2. Σκοπός της μελέτης	24
3. Υλικά και μέθοδοι.....	25
3.1. Nanoparticle Tracking Analysis	25
3.2 Πορεία εργασίας.....	27
3.2.1. Υλικά και αναλώσιμα	27
3.2.2. Όργανα- συσκευές	28
3.2.3. Προετοιμασία αναλώσιμων και δειγμάτων	28
3.2.4. Έναρξη της συσκευής NTA	29
3.2.5. Ανάλυση δειγμάτων στην συσκευή NTA	29
3.2.6. Καθαρισμός και κλείσιμο του NTA	31
4. Αποτελέσματα	32
5. Συζήτηση.....	35
6. Συμπέρασμα	37
7. Βιβλιογραφία.....	38

Περίληψη

Οι νεφροί αποτελούν βασικά όργανα για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Όταν υπάρχει σοβαρή και παρατεταμένη δυσλειτουργία των νεφρών οι ασθενείς πάσχουν από χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, μια σοβαρή νόσο που υποβιβάζει το βιοτικό επίπεδο και οδηγεί μέχρι και θάνατο. Οι ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο εμφανίζουν σοβαρές επιπλοκές όπως το ουραιμικό σύνδρομο και την αναιμία, που επιβαρύνουν περαιτέρω την υγεία τους. Η προβλεπόμενη θεραπεία είναι η αιμοκάθαρση και σε προχωρημένο στάδιο στην νεφρική νόσο τελικού σταδίου η μεταμόσχευση. Φαίνεται ότι τα μικροκυστίδια τα οποία αυξάνονται σε πληθώρα νόσων, αυξάνονται και σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Η αύξηση τους πολλές φορές προκαλεί και αυτή βλάβη, επιβαρύνοντας την είδη υπάρχουσα ασθένεια. Το μεγαλύτερο μέρος των μικροκυστιδίων στο αίμα παράγεται από τα αιμοπετάλια, όμως και τα υπόλοιπα κύτταρα του αίματος αποβάλλουν μικροκυστίδια από την πλασματική τους μεμβράνη. Τα μικροκυστίδια αποτελούν υποκατηγορία των εξωκυττάρων κυστιδίων και προέρχονται από την πλασματική μεμβράνη, όταν λόγω διάφορων ερεθισμάτων αυξάνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{2+} και επάγεται η διαταραχή στην ισορροπία των φωσφολιπιδίων στην μεμβράνη και στον κυτταρικό σκελετό, με αποτέλεσμα να αποβάλλονται μικροκυστίδια. Τα μητρικά κύτταρα προέλευσης καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό το φορτίο στην μεμβράνη τους και του εσωτερικού τους, που έχουν αντίκτυπο στη λειτουργία τους. Μερικές από τις βασικές λειτουργίες των μικροκυστιδίων είναι η αποβολή βλαβερών για το κύτταρο ουσιών και η συμβολή στη διακυτταρική επικοινωνία. Στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τα μικροκυστίδια αυξάνονται λόγω των επιπλοκών της νόσου και έχουν κατηγορηθεί για την συμβολή τους στην εξέλιξη της καρδιαγγειακής νόσου που αποτελεί την κυριότερη αιτία θανάτου στους ασθενείς αυτούς και της διαταραχής της αιμόστασης. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο πληθυσμός των μικροκυστιδίων στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια καθώς και αν η αιμοκάθαρση έχει επιρροή σε αυτών.

Λέξης Κλειδιά: Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, μικροκυστίδια, αιμοκάθαρση, φωσφατιδυλοσερίνη, εξωκυτταρικά κυστίδια

Abstract

The kidneys are essential organs for maintaining homeostasis. When there is severe and prolonged kidney dysfunction, patients suffer from chronic kidney disease, a serious disease that lowers the standard of living and leads to death. Patients suffering from this disease experience serious complications such as uremic syndrome and anemia, which further burden their health. The prescribed treatment is hemodialysis and, in end stage renal disease, transplantation. It appears that microvesicles, which are increased in multitude diseases, are also increased in patients with chronic renal failure. Their increase often causes damage as well, burdening the already existing disease. Most of the microvesicles in the blood are produced by platelets, but other blood cells also shed microvesicles from their plasma membrane. Microvesicles are a subcategory of extracellular vesicles and originate from the plasma membrane, when, due to various stimuli, the intracellular Ca^{2+} concentration increases and induces a disturbance in the balance of phospholipids in the membrane and the cell skeleton, resulting in microvesicles being shed. Microvesicle parent cells largely determine their membrane and interior load, which impacts their function. Some of the basic functions of microvesicles are the elimination of substances harmful to the cell and the contribution to intercellular communication. In chronic kidney disease, microvesicles increase due to the complications of the disease and have been blamed for their contribution to the development of cardiovascular disease, which is the main cause of death in these patients and the disturbances of hemostasis. In the present thesis, the population of microvesicles in chronic renal failure was studied, as well as whether hemodialysis has an influence on them.

Key words: Chronic renal disease, microvesicles, hemodialysis, phosphatidylserine, extracellular vesicles

Πίνακας Συντομογραφιών

ALB	Albumin	Αλβουμίνη
CBD	Global Burden of Disease	Παγκόσμιος Οργανισμός Φορτίου Ασθένειας
CCD	Charged-coupled device	Ευαίσθητη στο φως φορτισμένη συσκευή σύζευξης
CMOS	Complementary metal–oxide–semiconductor	Συμπληρωματικός μέταλλο-οξειδωτικός-ημιαγωγός
DT	Detection Threshold	Όριο ανίχνευσης
EC	Endothelial cell	Ενδοθηλιακά κύτταρα
EPO	Erythropoietin	Ερυθροποιητίνη
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport	Σύμπλεγμα ενδοσωμικής διαλογής της μεταφοράς
ESRD	End Stage Renal Disease	Νεφρική νόσος τελικού σταδίου
ETS	Electron transport system	Σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων
EV	Extracellular vesicles	Εξωκυτταρικό κυστίδιο
F	Factor	Παράγοντας
GFR	Glomerular filtration rate	Ρυθμός σπειραματικής διήθησης
GP	Glycoprotein	Γλυκοπρωτεΐνη
Hb	Hemoglobin	Αιμοσφαιρίνη
HD	Haemodialysis	Αιμοκάθαρση
hf-HD	Low flux hemodialysis	Υψηλής ροής αιμοκάθαρση
HIF-1a	Hypoxia-inducible factor 1-alpha	Παράγοντας παρακίνησης της υποξίας 1α
If-HD	High flux hemodialysis	Χαμηλής ροής αιμοκάθαρση
IV	Intraluminal vesicles	Ενδοκυττάριο Κυστίδιο
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes	Παγκόσμιος Οργανισμός Βελτίωσης Νεφρικής Νοσου
LVTC	Low volume top cell	Κυψελίδα ροής χαμηλού όγκου
MDV	Mitochondria derived vesicle	Κυστίδια προερχόμενα από τα μιτοχόνδρια
miRNA	Micro ribonucleic acid	Μικρό ριβονουκλεϊκό οξύ
MP	Microparticles	Μικροσωματίδια
mRNA	Messenger ribonucleic acids	Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ
MW	Molecular weight	Μοριακό βάρος
NO	Nitric oxide	Νιτρικό οξύ
NTA	Nanoparticle tracking analysis	
ORTP	O-ring top plate	Πλάκα O-ring
OXPPOS	Mitochondria oxidative phosphorylation system	Σύστημα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των μιτοχονδρίων
PBS	Phosphate buffered saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος

PLT	Platelet	Αιμοπετάλιο
Prx 2	Peroxiredoxin 2	Περοξειρεδοξίνη 2
PS	Phosphatidylserine	Φωσφατιδυλοσερίνη
RBC	Red blood cell	Ερυθρά αιμοσφαίρια
ROS	Reactive oxygen species	Ενεργές ρίζες οξυγόνου
TCA	Tricarboxylic acid	Τρικαρβοξυλικό οξύ
VSMC	Vascular smooth muscle cell	Αρτηριακό λείο μυϊκό κύτταρο
WFI	Water for Injection	
MV	Microvesicle	Μικροκυστίδιο
PE	Phosphatidyl-ethanolamine	Φωσφατιδυλεθανολαμίνη
XNA	Chronic kidney disease	Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 0. Εξώφυλλο από Shutterstock.com/ Meletios Verras.....	
Εικόνα 1. Ανατομία του νεφρού. Μακροσκοπική αναπαράσταση του νεφρού με έμφαση στην αιμάτωση του νεφρού. Οι νεφροί αποτελούνται από τη φλοιώδη, την παραμυελική και την μυελική μοίρα. Ο κάθε νεφρός περιβάλλεται από κάψα. Η αιμάτωση τους πραγματοποιείται από την νεφρική αρτηρία, η οποία διακλαδίζεται πολλές φορές μέχρι να σχηματιστούν η απαγωγός και η προσαγωγός αρτηρίες. Το αίμα εξέρχεται από τους νεφρούς με τη νεφρική φλέβα. Ανατύπωση από (2).....	1
Εικόνα 2. Περιοχές και χώρες όπου η Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια ήταν μέσα στις 10 πιο συχνές αιτίες θανάτου το 2013. Δεδομένα από έρευνα του GBD το 2013. Οι Ελλάδα βρίσκεται μέσα στις χώρες υψηλού εισοδήματος που πλήττονται από τη ΧΝΑ. Τροποποιημένη από (5).....	3
Εικόνα 3. Η χορήγηση αποκλειστικά μόνο της EPO δεν είναι θεραπεία για την αναιμία στην ESRD. Η EPO μπλοκάρει τα κανάλια των κατιόντων στα RBC αλλά δεν μπορεί να μειώσει τον αυξημένο ρυθμό απόπτωσης στην ESRD. Η μεγάλη χορήγηση EPO έχει βλαπτική επίδραση στα τριχοειδή αγγεία γιατί η μεγάλη παραγωγή RBCs μαζί με τον επιταχυνόμενο ρυθμό ερυθρόπτωσης μπορεί να φράξει τα αγγειακά τοιχώματα. Ανατύπωση από (14)..	6
Εικόνα 4. Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης. Η συσκευή αιμοκάθαρσης καθαρίζει το αίμα από ουραιμικές τοξίνες, περίσσεια νερού και ρυθμίζει στοιχεία όπως το κάλιο τα ασβέστιο και ο φώσφορος. Το αίμα αντλείται από τη συσκευή αιμοκάθαρσης περνάει από της κυρτές ίνες του φίλτρου και γυρνάει πίσω στην κυκλοφορία του ασθενούς. Κάθε συσκευή έχει μέχρι και 15.000 ίνες. Τροποποιημένη από (19).....	7
Εικόνα 5. Διαφορετικά είδη εκκρινόμενων κυστιδίων. Κατηγοριοποίηση και τρόπος παραγωγής. Όταν διενεργείται ενδοκυττάρια μεταφορά προς την πλασματική μεμβράνη για απέκκριση στα εξωκυττάρια χώρο τα EVs περιέχουν κομμάτια προερχόμενα από το εσωτερικό του κυττάρου όπως τα εξωσώματα. Όταν η έκκριση γίνεται κατευθείαν από την πλασματική μεμβράνη και τα κυστίδια συνδέονται απευθείας με τον εξωκυττάρια χώρο τότε αυτά δεν περιέχουν κομμάτια από το κυτταρόπλασμα όπως στα MVs. Τροποποιημένη από (23). ..	9
Εικόνα 6. Ένζυμα που συμμετέχουν στη δημιουργία MVs. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες σκραμπλάση, φλοπάση και τρανσολοκάση και τα ένζυμα γελσολίνη και καλπαΐνη είναι βασικά για την διατήρηση την λιπιδικής ισορροπίας στην πλασματική μεμβράνη και επηρεάζονται από την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του Ca^{2+} . Ανατύπωση από (21).....	12
Εικόνα 7. Το φορτίο των MVs. Τα MVs περιέχουν λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Οι πρωτεΐνες τους είναι διαμεμβρανικές αλλά και κυτοσολικές. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν υποδοχείς, μεταφορείς, μόρια σύνδεσης, κυτταροκίνες και αντιγονοπαρουσιαστικά μόρια. Στο εσωτερικό τους περιέχουν ποικιλία νουκλεϊκών οξέων όπως DNA, miRNA, mRNA. Το φορτίο τους εξαρτάται από τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται και από την κατάσταση των κύτταρων αυτών. Τροποποιημένη από (36). ..	14
Εικόνα 8. Μηχανισμοί κυστιδιοποίησης των RBC. Βλάβες στα RBCs κινητοποιούν διάφορους οδούς δημιουργίας MVs. Η κατεστραμμένη Hb, η οξειδωση πρωτεϊνών, η αλλοίωση της ζώνης 3 λόγω γήρανσης του κυττάρου και η διαταραχή της δομής της	

φωσφολιπιδικής μεμβράνης αποτελούν ενεργοποιητές της κυστιδιοποίησης. Η οξείδωση και η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου Ca^{2+} επάγουν μέσω μη ειδικών καναλιών ιόντων την λειτουργία ενζύμων όπως η σκραμπλάση και η καλπαΐνη και αναστέλλουν την λειτουργία της φλιπάσης. Με αυτόν τον τρόπο επάγεται η κυστιδιοποίηση λόγω εξωτερίκευσης της PS και διαταραχής του κυτταρικού σκελετού. Ανατύπωση από (39)..... 15

Εικόνα 9. Διαδικασία ενεργοποίησης των PLTs. Οι διάφοροι παράγοντες διαταράσσουν τη μορφολογία και λειτουργία των PLTs και ως αποτέλεσμα αυτά αποβάλλουν κυστίδια. Οι παράγοντες αυτοί είναι οι διαλυτοί αγωνιστές, η ενεργοποιητές δεύτερων αγγελιοφόρων, οι φυσικοί αγωνιστές, η γήρανση, η απόπτωση, η αποδόμηση θρόμβου και η μεγακαρυοκυττάρωση. Τροποποιημένη από (47). 17

Εικόνα 10. Ο ρόλος των EVs στην αγγειακή βλάβη στους ασθενείς με νεφρική νόσο. Τα κύτταρα επηρεασμένα από διάφορους παθολογικούς παράγοντες της ΧΝΑ παράγουν τροποποιημένα EVs και σε αντίθεση με τα EVs σε μη παθολογικές συνθήκες βλάπτουν το ενδοθήλιο. Έτσι αυξάνεται η απόπτωση, μειώνεται η αγγειογένεση, προκαλείται ασβέστωση λόγω διαταραχής των αρτηριακών λειών μυϊκών κυττάρων (vascular smooth muscle cells ,VSMCs) και μειώνεται το NO που δηλώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία. Υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της παθογένειας αυτής και της συγκέντρωσης των ενδοθηλιακών EVs (endothelial cells – extracellular vesicle, EC-EV). Τροποποιημένη από (60)..... 19

Εικόνα 11. Ο ρόλος των EVs στον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό της ΧΝΑ. Λόγω διάφορων ερεθισμάτων τα κύτταρα αποβάλλουν EVs που όταν μεταφερθούν σε άλλα κύτταρα δέκτες προκαλούν βλάβες. Ο παράγοντας HIF-1a ,που αυξάνεται λόγω της ισχαιμίας και της αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης, και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ,λόγω του στρες, έχουν βλαπτική επίδραση στα νεφρικά κύτταρα. Έτσι, επάγεται η κυστιδιοποίηση και τα αποβαλλόμενα κυστίδια έχουν βλαπτική επίδραση σε άλλα απομακρυσμένα κύτταρα στον νεφρό. Ανατύπωση από (61). 20

Εικόνα 12. Ο καταρράκτης της πήξης. Ο καταρράκτης της πήξης (μπλε βέλη) μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε με την ενδογενή (κόκκινα βέλη) είτε με την εξωγενή οδό (γκρι βέλη). Οι δύο αυτές οδοί καταλήγουν σε ένα κοινό μονοπάτι και πιο συγκεκριμένα στην ενεργοποίηση του παράγοντα X (factor, F). Ο FX ενεργοποιεί θρομβίνη που είναι βασική για τον σχηματισμό του ινωδογόνου από την ινική και την ενεργοποίηση του XIII, που μαζί με την ινική ενώνονται και σταθεροποιούνται. Ταυτόχρονα, με αργότερους ρυθμούς ενεργοποιείται η ινωδολύση (πράσινα βέλη) κατά την οποία το πλασμινογόνο μετατρέπεται σε πλασμίνη και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αιμοστατική ισορροπία. Ανατύπωση από (68)..... 22

Εικόνα 13. Η οπτική διάταξη του NTA. Στο σύστημα του NTA χρησιμοποιείται ακτίνα laser συγκεκριμένου μήκους που προσπίπτει στο δείγμα σε συγκεκριμένη και ακριβώς προσδιορισμένη γωνία. Όταν η ακτίνα προσπίπτει πάνω στα σωματίδια αυτά σκεδάζουν φως το οποία ανιχνεύεται από το μικροσκόπιο και στη συνέχεια από τη κάμερα. Τροποποιημένη από (76). 26

Εικόνα 14. Οι κυψελίδες του NS300 πάνω στη μονάδα laser. Α) το ORTP χρησιμοποιείται για δείγματα που δεν είναι υδατικά, που είναι παχύρευστά ή που περιέχουν μεγάλα σωματίδια ικανά να φράξουν τη LVFC. Β) η LVFC χρησιμοποιείται για την ανάλυση

υδατικών, ουδέτερων και μη εφέλκων διαλυμάτων. Οι κυψελίδες βιδώνονται πάνω στην μονάδα laser και πάνω τους εφαρμόζονται τα σωληνάκια για τη χορήγηση του δείγματος και την αποβολή των αποβλήτων. Τροποποιημένη από (79). 27

Εικόνα 15. Παραδείγματα στιγμιότυπων από βίντεο στο NTA. Για την πραγματοποίηση σωστών μετρήσεων πρέπει να υπάρχει η επιθυμητή συγκέντρωση και εστίαση. Α) Καλή εικόνα βίντεο. Υπάρχει η σωστή συγκέντρωση ώστε να μπορεί το πρόγραμμα να διεξάγει σωστά την ανάλυση και να μην υπάρχουν αλληλοεπικαλύψεις. Η εστίαση είναι καλή, παρότι υπάρχουν μερικά κυστίδια με άλω δεν είναι αρκετά έντονη ώστε να επηρεάσει τη μέτρηση. Β) Πολύ μεγάλη συγκέντρωση. Σε αυτό το οπτικό πεδίο βρίσκονται παρά πολλά κυστίδια με αποτέλεσμα να μη μπορεί να γίνει καλή εστίαση και να αλληλοεπικαλύπτονται τα κυστίδια μεταξύ του. Στην περίπτωση αυτή πραγματοποιείται περαιτέρω αραίωση. Γ) Μη σωστή εστίαση. Η εστίαση δεν είναι καλή με αποτέλεσμα να μη διακρίνονται τα κυστίδια. Θα πρέπει να διορθωθεί η εστίαση και πιθανών το 'Camera Level' και 'Screen Gain' 30

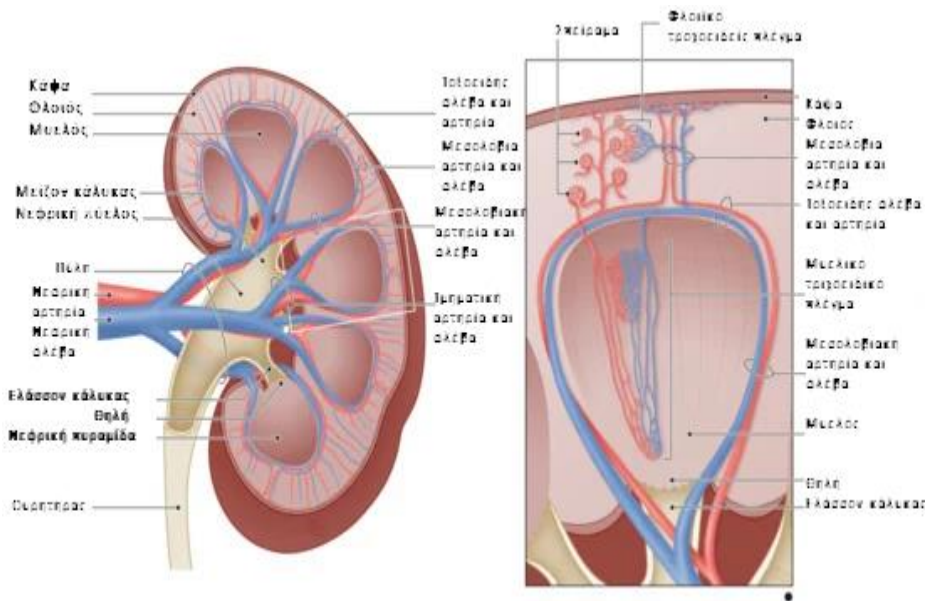
Εικόνα 16. Καμπύλες συγκέντρωσης κυστιδίων σε σχέση με το μέγεθος τους. Α) Καμπύλη με κακή επαναληψιμότητα. Οι πέντε καμπύλες (διαφορετικά χρώματα) από την κάθε μέτρηση δεν συμπίπτουν ακριβώς η μία πάνω στην άλλη, στην αρχή της καμπύλης υπάρχει πολύ θόρυβος και μερικές καμπύλες επεκτείνονται πιο πολύ από ότι άλλες. Β) Καμπύλη με καλή επαναληψιμότητα. Όλες οι καμπύλες συμπίπτουν η μία πάνω στην άλλη, δεν υπάρχει πολύ θόρυβος στα μικρότερα nm και δεν υπάρχουν καμπύλες που να επεκτείνονται πολύ. Οι καμπύλες της κάθε μέτρησης πρέπει να είναι συμπίπτουν αφού προέρχονται από την μέτρηση του ίδιου δείγματος. 31

1. Εισαγωγή

1.1. Οι νεφροί

1.1.1. Ανατομία των νεφρών

Η ανατομική θέση των νεφρών βρίσκεται στην οπισθοπεριτοναϊκή χώρα, αριστερά και δεξιά την σπονδυλικής στήλης αντίστοιχα. Ο κάθε νεφρός αποτελείται από τα μαλπιγγιανά σωμάτια, στα οποία εδράζει η κάψα του Bowman και μέσα σε αυτήν το αγγειώδες σπείραμα, και τα ουροφόρα σωληνάκια. Επιπλέον, οι νεφρώνες αποτελούν την βασική λειτουργική μονάδα των νεφρών και αριθμούνται στους ένα εκατομμύριο στον καθένα. Οι μοίρες των νεφρών είναι τρεις: η φλοιώδη, η παραμυελική και η μυελική μοίρα (1). Η αιμάτωση των νεφρών πραγματοποιείται από τη νεφρική αρτηρία και το αίμα εξέρχεται από τους νεφρούς με τη νεφρική φλέβα (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Ανατομία του νεφρού. Μακροσκοπική αναπαράσταση του νεφρού με έμφαση στην αιμάτωση του νεφρού. Οι νεφροί αποτελούνται από τη φλοιώδη, την παραμυελική και την μυελική μοίρα. Ο κάθε νεφρός περιβάλλεται από κάψα. Η αιμάτωση τους πραγματοποιείται από την νεφρική αρτηρία, η οποία διακλαδίζεται πολλές φορές μέχρι να σχηματιστούν η απαγωγός και η προσαγωγός αρτηρίες. Το αίμα εξέρχεται από τους νεφρούς με τη νεφρική φλέβα. Ανατύπωση από (2).

1.1.2. Λειτουργία των νεφρών

Οι νεφροί διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Σε καθημερινή βάση υπολογίζεται ότι από το ουροποιητικό σύστημα φιλτράρονται 200

λίτρα υγρών. Η βασική λειτουργία των νεφρών είναι να παράγουν ούρα. Τα νεφρά με τη διαδικασία αυτή έχουν την ικανότητα χωρίς να αφαιρούν απαραίτητες ουσίες από την κυκλοφορία του αίματος να απομακρύνουν τοξίνες, ανωφέλη προϊόντα του μεταβολισμού και περίσσεια ιόντων από αυτήν. Παράλληλα, παράγουν ουσίες εξαιρετικής σημασίας όπως η ερυθροποιητίνη (erythropoietin, EPO), η βιταμίνη 1,25 D και η ρενίνη (2).

1.2. Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια

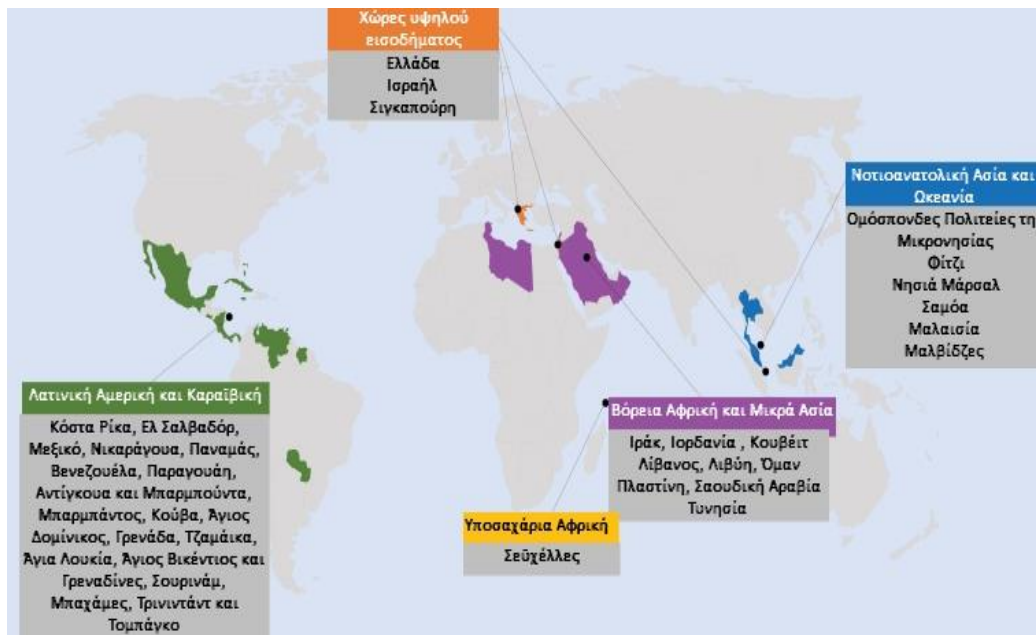
1.2.1. Ορισμός

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ) είναι μια σοβαρή ασθένεια που απαιτεί εντατική φροντίδα και συχνό έλεγχο για την διαπίστωση χειροτέρευσης του ασθενούς, ενώ μπορεί να οδηγήσει και στη μεταμόσχευση νεφρού. Σύμφωνα με τον οργανισμό Παγκόσμιας Βελτίωσης Νεφρικής Νόσου (Kidney Disease Improving Global Outcomes, KDIGO) για να γίνει η διάγνωση της ΧΝΑ η τιμή ρυθμού σπειραματικής διήθησης (glomerular filtration rate, GFR) πρέπει να είναι κάτω από 60 mL/min και αλβουμίνης (albumin, ALB) πάνω από 30mg ανά γραμμάριο κρεατινίνης σε συνδυασμό με παθολογικά ευρήματα στη λειτουργία των νεφρών για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των τριών μηνών.

Με την πάροδο του χρόνου η ΧΝΑ μπορεί να επιδεινωθεί σε βαθμό τέτοιο ώστε τα νεφρά να μην επιτελούν πλέον τη λειτουργία τους και οι ασθενείς να χρειάζονται αιμοκάθαρση και μεταγγιση. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται Νεφρική Νόσος Τελικού Σταδίου (End Stage Renal Disease, ESRD) και σύμφωνα με τον KDIGO σε αυτήν ο GFR είναι < 15 mL/min (3).

1.2.2. Επιδημιολογία

Ο επιπολασμός της ΧΝΑ είναι δύσκολο να υπολογιστεί λόγω της ασυμπτωματικής φύσης της ασθένειας αυτής που μπορεί να υπάρχει στα πρώτα στάδια εμφάνισης της. Πρόσφατες εκτιμήσεις επιδεικνύουν ότι το 10 με 14% του γενικού πληθυσμού πάσχει από ΧΝΑ (4). Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό φορτίου ασθένειας (Global Burden of Disease, CBD) η ΧΝΑ αποτελεί αναδυόμενη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Αφορά πάνω από 800 εκατομμύρια ανθρώπους με μεγαλύτερη συχνότητα στα άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, γυναίκες, φυλετικές μειονότητες, ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη και υπέρταση. Σε γεωγραφικό επίπεδο πλήττει κυρίως χώρες με μεσαία και χαμηλά εισοδήματα όπου υπάρχουν ελλείψεις πόροι αντιμετώπισης. Οι χώρες οι οποίες πλήττουν από ΧΝΑ φαίνονται πιο λεπτομερώς στην (Εικόνα 2) (5).



Εικόνα 2. Περιοχές και χώρες όπου η Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια ήταν μέσα στις 10 πιο συχνές αιτίες θανάτου το 2013. Δεδομένα από έρευνα του GBD το 2013. Οι Ελλάδα βρίσκεται μέσα στις χώρες υψηλού εισοδήματος που πλήττονται από τη ΧΝΑ. Περισσότερες περιπτώσεις ΧΝΑ φαίνεται να υπάρχουν στις αναπτυσσόμενες χώρες και πιο συγκεκριμένα σε χώρες της Λατινικής Αμερικής, της Καραϊβικής, της Βόρειας Αφρικής, της Μικράς Ασίας, της Νοτιοανατολικής Ασίας και της Ωκεανίας. Τροποποιημένη από (5).

1.2.3. Αίτια

Τα πιο κοινά αίτια απόκτησης ΧΝΑ είναι ο σακχαρώδης διαβήτης και η υπέρταση και ακολουθούν αίτια όπως λοιμώξεις των νεφρών, κυρίως σπειραματονεφρίτιδα, η λανθασμένη χρήση νεφροτοξικών φαρμάκων και το χαμηλό βάρος κατά τη γέννηση και ποικίλες γενετικές ασθένειες (αυτοσωμική πολυκυστική νεφροπάθεια, ποδοκυτταροπάθειες κ.α.). Η ΧΝΑ αφορά τη βλάβη των νεφρώνων, οι οποίοι αν και ανταπεξέρχονται σε ως ένα βαθμό στην αυξημένη διήθηση υγρών χωρίς να επέλθουν δομικές αλλαγές, σε περίπτωση μεγάλης αυξήσεως της μάζας σώματος όπως στην παχυσαρκία και την εγκυμοσύνη αυτοί παθαίνουν υπερτροφία και δημιουργούνται βλάβες στους νεφρώνες. Τα πρόωρα νεογνά και τα νεογνά χαμηλού βάρους πολλές φορές αδυνατούν να ολοκληρώσουν την ανάπτυξη του νεφρού σωστά. Λόγω αυτού αυξάνεται η επικινδυνότητα εμφάνισης ΧΝΑ σε οποιαδήποτε ηλικία του ατόμου (6). Ακόμα, η υπεργλυκαιμία από τον σακχαρώδη διαβήτη προάγει το οξειδωτικό στρες και την φλεγμονή επιφέροντας πολλές φορές την ίνωση του ιστού των νεφρών (7).

1.2.4. Ταξινόμηση

Το στάδια εξέλιξης της ΧΝΑ ταξινομούνται βάση του GFR, της αλβουμινουρίας και της θεραπείας.

Η ταξινόμηση βάσει της GFR έχει πέντε στάδια (8) :

- ❖ Στάδιο I : GFR \geq 90 mL/min (νεφρική βλάβη με φυσιολογικό ή αυξημένο GFR)
- ❖ Στάδιο II : GFR 60-89 mL/min (νεφρική βλάβη με ήπια μείωση GFR)
- ❖ Στάδιο IIIA : GFR 45-59 mL/min (νεφρική βλάβη με ελαφρά της μέτρια μειωμένο GFR)
- ❖ Στάδιο IIIB : GFR 30-44 mL/min (νεφρική βλάβη με μέτρια της σοβαρά μειωμένο GFR)
- ❖ Στάδιο IV : GFR 15-29 mL/min (νεφρική βλάβη με σοβαρά μειωμένο GFR)
- ❖ Στάδιο V : GFR \leq 15 mL/min (νεφρική ανεπάρκεια)

Η ταξινόμηση βάσει της αλβουμινουρίας αποτελείται από τρία στάδια (8) :

- ❖ Στάδιο A1 : 24ώρη αλβουμινουρία mg/24h $<$ 30 (φυσιολογικό)
- ❖ Στάδιο A2 : 24ώρη αλβουμινουρία mg/24h 30-300 (μέτριο)
- ❖ Στάδιο A3 : 24ώρη αλβουμινουρία mg/24h $>$ 300 (σοβαρό)

Η ταξινόμηση βάσει της θεραπείας έχει δύο στάδια (9) :

- ❖ Στάδιο M : Μεταμόσχευση (Αντιστοιχεί σε οποιοδήποτε στάδιο κατά GFR έχει πραγματοποιηθεί μεταμόσχευση νεφρού)
- ❖ Στάδιο K : Αιμοκάθαρση (Αντιστοιχεί στο στάδιο V με βάση την ταξινόμηση της GFR τιμής)

1.2.5. Επιπλοκές της νόσου

1.2.5.1. Ουραιμικές τοξίνες

Το ουραιμικό σύνδρομο αναπτύσσεται λόγω της ανικανότητας των νεφρών να λειτουργήσουν σωστά με αποτέλεσμα την συσσώρευση παραπροϊόντων που προκαλούν σύνολο βλαβών στον οργανισμό. Οι ουραιμικές τοξίνες σε άτομα με φυσιολογική λειτουργία των νεφρών μεταβολίζονται και δεν προκαλούν βλάβες. Οι διαταραχές που δημιουργούνται από της ουραιμικές τοξίνες επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το καρδιαγγειακό σύστημα, οδηγούν σε χρόνια φλεγμονή, οξειδωτικό στρες και επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας, ενώ μπορούν να προκαλέσουν και θνησιμότητα (10).

Οι ουραιμικές τοξίνες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (molecular weight, MW) ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες (11):

1. Μικρά υδατοδιαλυτά μόρια (MW \leq 500 Da): Στα μόρια αυτά κατατάσσονται η ουρία και η κρεατινίνη και μπορεί να μην σημειώνουν τοξική δράση
2. Μεσαία μόρια (MW $>$ 500 Da): Η απομάκρυνση των μορίων αυτών γίνεται μόνο με αιμοκάθαρση που περιέχει μεμβράνες μεγάλων πόρων και περιλαμβάνουν εύρος πεπτιδίων που προσβάλλουν πολλά συστήματα στον οργανισμό

3. Μόρια συνδεόμενα με πρωτεΐνες: Τα περισσότερα μόρια σε αυτήν την κατηγορία έχουν μικρό MW με κάποιες εξαιρέσεις. Είναι πολύ τοξικά και παρουσιάζεται δυσκολία στην απομάκρυνση τους με την αιμοκάθαρση.

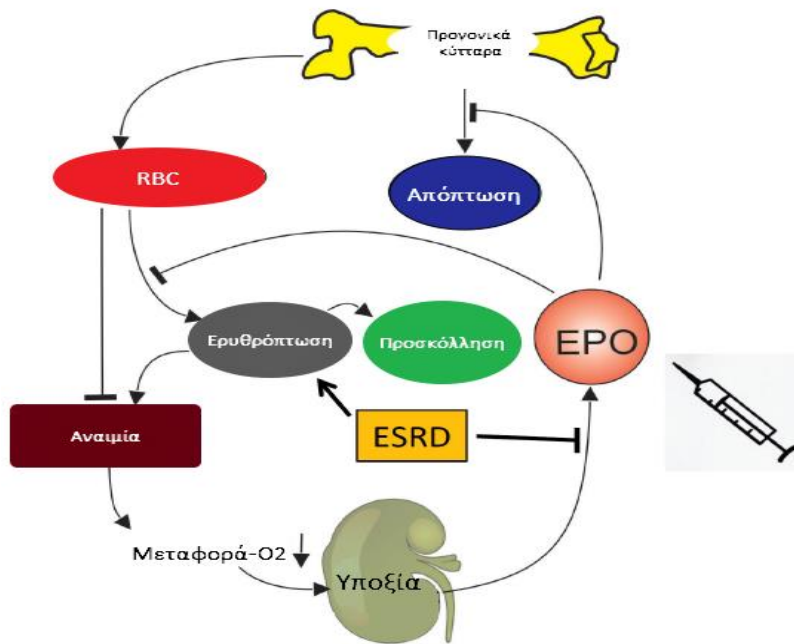
1.2.5.2. Αναιμία

Η αναιμία είναι συχνή επιπλοκή της ΧΝΑ με αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής των ασθενών, αυξάνει την νοσηρότητα και επιταχύνει τον ρυθμό εξέλιξης της νεφρικής βλάβης. Ο βασικότερος παράγοντας της αναιμίας αυτής είναι η ανεπαρκής παραγωγή ΕΡΟ από τους νεφρούς. Η λειτουργία της ΕΡΟ είναι να προάγει τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (red blood cell, RBC). Άλλα αίτια της αναιμίας στην ΧΝΑ είναι η μειωμένη ανταπόκριση του μυελού των οστών στην ΕΡΟ λόγω ουραιμικών τοξινών, η μείωση βασικών βιταμινών για την ερυθροποίηση (σίδηρος, βιταμίνη Β12, φυλλικό οξύ), η φλεγμονή και η αύξηση της εψιδίνης.

Η απόκτηση αναιμίας μπορεί να συμβεί στα αρχικά στάδια της νόσου. Η αιμοσφαιρίνη πολλές φορές αρχίζει να μειώνεται στα στάδια 2 και 3 βάσει της GFR αλλά είναι πιο πιθανή στο στάδιο 4 όπου το 90% των ασθενών εμφανίζουν αναιμία. Η αναιμία στη ΧΝΑ είναι νορμοχρωμική και νορμοκυτταρική με φυσιολογικά επίπεδα σιδήρου. Αν δεν τηρεί αυτά τα κριτήρια πρέπει να διερευνηθεί αν κάποιο άλλο αίτιο προκαλεί την αναιμία (12).

Η γλυκοπρωτεΐνη ΕΡΟ παράγεται από τους διάμεσους ινοβλάστες των νεφρών. Στη ΧΝΑ τα κύτταρα αυτά παθαίνουν ίνωση λόγω της σωληναριακής ατροφίας και έτσι επηρεάζεται η σύνθεση της ΕΡΟ. Λόγω της αναιμίας οι ασθενείς έχουν πιο μεγάλες πιθανότητες να υποστούν βλάβες στο καρδιαγγειακό τους σύστημα και ως αποτέλεσμα αυξάνεται η νοσηρότητα τους. Τα καρδιαγγειακά προβλήματα επιδεινώνουν την ήδη επιβαρυσμένη νόσο των νεφρών και ως αποτέλεσμα του κύκλου αυτού οι ασθενείς αποκτούν καρδιονεφρικό αναιμικό σύνδρομο.

Η επιλεγόμενη θεραπεία για την αναιμία στη ΧΝΑ είναι η χορήγηση ανασυνδυασμένης ΕΡΟ και έχει αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό την ανάγκη για μετάγγιση αίματος (13). Η χορήγηση ΕΡΟ όμως δεν είναι πάντα η λύση επειδή οι ασθενείς με ESRD δεν ανταποκρίνονται στη συγκεκριμένη θεραπεία. Τα ερυθρά από μόνα τους επάγουν ερυθρόπτωση βγάζοντας στην επιφάνεια τους την φωσφατιδυλοσερίνη (phosphatidylserine, PS) και αυτή με την σειρά της οδηγεί σε φαγοκυττάρωση των RBCs. Ο κύριος παράγοντας που οδηγεί στην απόπτωση των RBCs είναι οι ουραιμικές τοξίνες και υπάρχουν ενδείξεις ότι η αιμοκάθαρση μπορεί λόγω του στρες που προκαλεί στα RBCs να ευθύνεται για την αναιμία. Ο κύκλος της αναιμίας στην ΧΝΑ αναπαριστάτε και στην Εικόνα 3 (14).



Εικόνα 3. Η χορήγηση αποκλειστικά μόνο της EPO δεν είναι θεραπεία για την αναιμία στην ESRD. Η EPO μπλοκάρει τα κανάλια των κατιόντων στα RBC αλλά δεν μπορεί να μειώσει τον αυξημένο ρυθμό απόπτωσης στην ESRD. Η μεγάλη χορήγηση EPO έχει βλαπτική επίδραση στα τριχοειδή αγγεία γιατί η μεγάλη παραγωγή RBCs μαζί με τον επιταχυνόμενο ρυθμό ερυθρόπωσης μπορεί να φράξει τα αγγειακά τοιχώματα. Ανατύπωση από (14).

1.2.6. Αιμοκάθαρση

Η αιμοκάθαρση (haemodialysis, HD) είναι μια τεχνική αντικαταστάσεις της νεφρικής λειτουργίας σε ασθενείς σε σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια. Υπολογίζεται ότι έχει κάνει εφικτή την επιβίωση πάνω από ένα εκατομμύριο ασθενών που πάσχουν από ESRD. Κατά την διάρκεια της HD το αίμα φιλτράρεται και απομακρύνονται τοξικές ουσίες και περίσσεια νερού από αυτό. Στόχος είναι η αποτροπή της συσσώρευσης ουραιμικών τοξινών και των συμπτωμάτων που προκαλεί το ουραιμικό σύνδρομο. Με τον τρόπο αυτό διατηρείται το ενδοκυτταρικό και εξωκυτταρικό περιβάλλον που σε φυσιολογικές συνθήκες διατηρούν οι νεφροί.

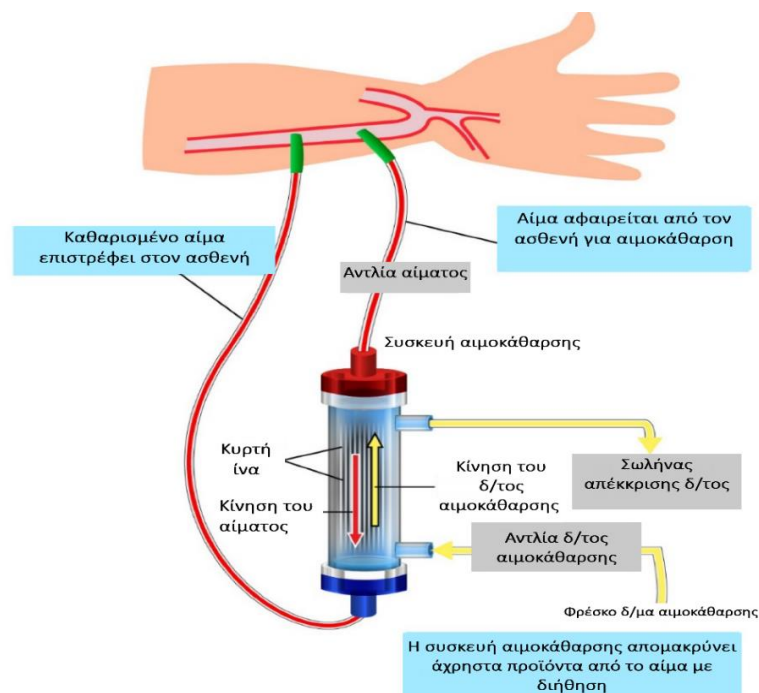
Δεν απομακρύνονται όλες οι ουσίες από το αίμα με τον ίδιο ρυθμό και τρόπο. Μικρά μόρια όπως η ουρία διηθούνται ταχύτερα από μεγάλα μόρια όπως η ALB. Εκτός από τη διήθηση το αίμα διαπερνά και μεμβράνες μια διαδικασία που ονομάζεται υπερφιλτράρισμα, το οποίο χρησιμοποιεί την υδροστατική πίεση και συμβάλει στην απομάκρυνση περιττού νερού από την κυκλοφορία.

Πριν την HD η κατάσταση της υγείας του ασθενούς πρέπει να αξιολογηθεί για να υπάρχει μέγιστο αποτέλεσμα της θεραπείας ανάλογα με την ανάγκη. Από την υγεία του ασθενούς εξαρτάτε η χρονική διάρκεια, η συχνότητα και η καταλληλότητα της HD, βάση την μέτρηση της κάθαρσης της ουρίας. Η συχνότητα της θεραπείας είναι συνήθως τρεις φορές την εβδομάδα και ο χρόνος που διαρκεί κάθε φορά είναι ανάλογος της σοβαρότητας της

νόσου (15). Φαίνεται ότι ο παρατεταμένος χρόνος HD πάνω από έξι ώρες βελτιώνει την επιβίωση των ασθενών (16).

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες HD, η αιμοκάθαρση χαμηλής ροής (low flux hemodialysis, lf-HD), η αιμοκάθαρση υψηλής ροής (high flux hemodialysis, hf-HD) και η αιμοδιήθηση (hemodiafiltration, HDF). Η lf-HD βασίζεται στη διάχυση με τη χρήση μεμβρανών μικρών πόρων και χαμηλό συντελεστή υπερφιλτραρίσματος. Αυτός ο τύπος της HD εμφανίζει υψηλή θνησιμότητα και για αυτό χρησιμοποιείται κυρίως η αιμοκάθαρση υψηλής ροής. Σε σύγκριση με την lf-HD, η hf-HD διαθέτει μεμβράνες με μεγαλύτερους πόρους που μπορούν να απομακρύνουν στοιχεία με μεγαλύτερο MW. Επιπλέον η hf-HD φαίνεται να μειώνει το οξειδωτικό στρες και τη χρόνια φλεγμονή. Για την HDF δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα που να στηρίζουν τη χρησιμότητα της. Η τεχνική αυτή συνδυάζει τη χρήση θερμαγωγής και διήθησης για την απομάκρυνση ουσιών (17).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4 κατά την διάρκεια της HD, στο χέρι του ασθενούς τοποθετούνται δύο βελόνες. Από την μια βελόνα το αίμα περνάει από τον ασθενή στη συσκευή αιμοκάθαρσης και μέσω της άλλης βελόνας γυρνάει φιλτραρισμένο στην κυκλοφορία. Το φίλτρο της συσκευής HD έχει κυρτές ίνες η οποίες κατακρατάνε το αίμα καθώς περνάει και το υγρό της HD περνάει από την αντίθετη κατεύθυνση εξωτερικά των ινών με τέτοιο τρόπο ώστε οι άχρηστες ουσίες από το αίμα περνάνε στο υγρό της HD (18).



Εικόνα 4. Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης. Η συσκευή αιμοκάθαρσης καθαρίζει το αίμα από ουραιμικές τοξίνες, περίσσεια νερού και ρυθμίζει στοιχεία όπως το κάλιο τα ασβέστιο και ο φώσφορος. Το αίμα αντλείται από τη συσκευή αιμοκάθαρσης περνάει από της κυρτές ίνες του φίλτρου και γυρνάει πίσω στην κυκλοφορία του ασθενούς. Κάθε συσκευή έχει μέχρι και 15.000 ίνες. Τροποποιημένη από (19).

1.3. Εξωκυτταρικά Κυστίδια

1.3.1. Εισαγωγή

Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (extracellular vesicles, EVs) είναι δομές περιβαλλόμενες φωσφολιπιδιακή διπλοστιβάδα. Βρίσκονται στα σωματικά υγρά όλων των ανθρώπων ανεξάρτητα της ύπαρξης νόσου αφού απελευθερώνονται από της φυσιολογικές διαδικασίες της γήρανσης και της ωρίμανσης, άλλα φαίνεται ότι αυξάνονται και σε πολλές ασθένειες. Όσο αναφορά το αίμα ο κύριος πληθυσμός EVs είναι τα μικροκυστίδια (microvesicles, MVs) προερχόμενα από αιμοπετάλια (platelets, PLTs). Άλλοι κυτταρικοί πληθυσμοί επίσης αποβάλουν EVs όπως τα λευκοκύτταρα και τα RBCs. Το είδος και η λειτουργία του κυττάρου από όπου προέρχονται καθορίζει τον τρόπο δημιουργίας τους και την σύσταση των βιοχημικών μορίων που αποτελούνται. Φέρουν αντιγονικά χαρακτηριστικά των κυττάρων από όπου προέρχονται και έχουν κομβική σημασία στη διακυτταρική επικοινωνία λόγω της δυνατότητας τους να μεταφέρουν μόρια όπως πρωτεΐνες, αγγελιοφόρα ριβονουκλεϊκά οξέα (messenger ribonucleic acids, mRNAs) και μικρά ριβονουκλεϊκά οξέα (micro ribonucleic acids, miRNAs) (20).

Τα EVs πρώτη φορά παρατηρήθηκαν το 1967 από τον Peter Wolf ο οποίος πρώτος αναγνώρισε μικρές πηκτικές δομές προερχόμενες από ενεργοποίηση PLTs και τις ονόμασε «αιμοπεταλιακή σκόνη» (21).

1.3.2. Ταξινόμηση

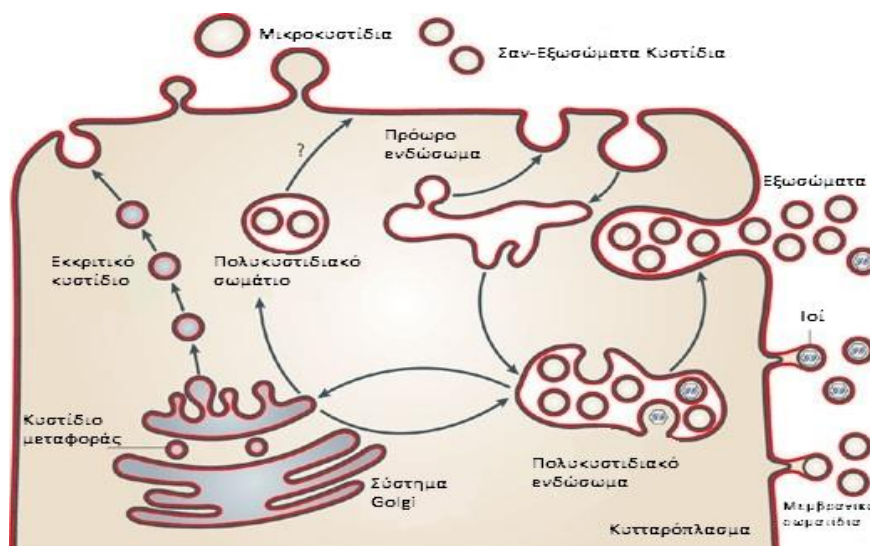
Οι βασικές κατηγορίες EVs είναι τα εξωσώματα και τα MVs. Αυτή η κατηγοριοποίηση πολλές φορές δεν αρκεί και έτσι τα EVs έχουν ταξινομηθεί σε περισσότερες κατηγορίες ανάλογα την προέλευση τους και βάση της κατηγορίας αυτής κατέχουν διαφορετικά βιοχημικά χαρακτηριστικά και δομή.

Τα MVs έχουν μεγάλο μέγεθος 100-1000nm και δημιουργούνται από την αποβολή κομματιών πλασματικής μεμβράνης διαφόρων κυττάρων, φέρουν στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης του PS και έχουν μη ομοιόμορφο σχήμα (22). Τα εκτοσώματα είναι MVs τα οποία έχουν το επιπλέον χαρακτηριστικό ότι είναι πλούσια σε χοληστερόλη και διακυλογλυκερόλη. Επιπλέον, οι ιοί με έμβολο όταν βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο μπορούν να θεωρηθούν ως μια ιδιάζουσα κατηγορία EVs.

Όταν τα κυστίδια προέρχονται από το εσωτερικό του κυττάρου και κυρίως από το ενδόσωμα ονομάζονται εξωσώματα και έχουν μέγεθος 50-100nm. Τα εξωσώματα περιέχουν λιπιδικές σχεδίες από την πλασματική μεμβράνη. Αυτό τα διαφοροποιεί από μια άλλη κατηγορία EVs τα σαν-εξωσώματα κυστίδια (exosome-like vesicles) τα οποία έχουν μέγεθος 20-50nm και δεν έχουν συστατικά της πλασματικής μεμβράνης.

Κύτταρα από πληγέντες πληθυσμούς με αυξημένους ρυθμούς απόπτωσης απομακρύνουν από της κυτταρικές του μεμβράνες τα αποπτωτικά κυστίδια διαμέτρου 50-500nm με ετερογενές σχήμα. Πιο αναλυτικά περισσότερα για την κατηγοριοποίηση των EVs φαίνονται στην Εικόνα 5 (23).

Τέλος τα αποπτωτικά σωματίδια έχουν μέγεθος μεγαλύτερο των 1000nm και δημιουργούνται από την εκβλάστηση της κυτταρική μεμβράνης (24).



Εικόνα 5. Διαφορετικά είδη εκκρινόμενων κυστιδίων. Κατηγοριοποίηση και τρόπος παραγωγής. Όταν διενεργείται ενδοκυττάρια μεταφορά προς την πλασματική μεμβράνη για απέκκριση στα εξωκυττάριο χώρο τα EVs περιέχουν κομμάτια προερχόμενα από το εσωτερικό του κυττάρου όπως τα εξωσώματα. Όταν η έκκριση γίνεται κατευθείαν από την πλασματική μεμβράνη και τα κυστίδια συνδέονται απευθείας με τον εξωκυττάριο χώρο τότε αυτά δεν περιέχουν κομμάτια από το κυτταρόπλασμα όπως στα MVs. Τροποποιημένη από (23).

1.3.3. Εξωσώματα

Τα εξωσώματα αποτελούνται από λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Η πυκνότητα τους είναι χαρακτηριστικά μεταξύ 1,13 και 1,19g/mL και το εύρος της εξαρτάται από τα κύτταρα προέλευσης των εξωσωμάτων. Λόγω του μικρού τους μεγέθους δεν μπορούν να ανιχνευτούν με την συμβατικές τεχνικές του φωτεινού μικροσκοπίου ή της κυτταρομετρίας ροής αλλά η ανίχνευση τους απαιτεί πιο ειδικές τεχνικές (25).

Τα εξωσώματα εκκρίνονται από όλα τα είδη κυττάρων και έχουν βρεθεί σε πολλά βιολογικά υγρά όπως ο όρος, το πλάσμα, τα ούρα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, το σπέρμα, την χολή, το αμνιακό υγρό, τα δάκρυα, το μητρικό γάλα κ.α.

Τα κύτταρα χρησιμοποιούν τα εξωσώματα ως τρόπο αποβολής άχρηστων ουσιών αλλά και για την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων, τη διατήρηση του κυττάρου και έχουν την ικανότητα να επάγουν ανοσολογική αντίδραση λόγω αντιγόνων που φέρουν στην επιφάνειά τους. Ακόμα, σε περίπτωση ύπαρξης όγκου τα εξωσώματα επηρεάζουν την πρόγνωση της ασθένειας (26).

Η βιογένεση των εξωσωμάτων λαμβάνει χώρα όταν κομμάτια του ενδοσώματος εγκοιλώνονται μέσα στην ενδοκυττάρια κοιλότητα όπου σχηματίζουν τα πρώιμα ενδοσώματα. Έτσι δημιουργούνται τα πολυκυστιδιακά σωμάτια τα οποία είναι πλούσια σε ενδοκυττάρια κυστίδια (intraluminal vesicles, IVs). Για την απελευθέρωση των IVs έξω από το κύτταρο η μεμβράνη των πολυκυστιδιακών σωματίων συντήκεται με αυτήν της πλασματικής μεμβράνης και τα IVs περνούν εξωκυττάρια και πλέον χαρακτηρίζονται ως εξωσώματα. Λόγω της σύντηξης αυτής το κάθε εξώσωμα περιέχει συστατικά τόσο από το εσωτερικό του κυττάρου όσο και από την πλασματική μεμβράνη. Ο κυτταρικός σκελετός και το μικροσωληναριακό σύστημα έχουν βασικό ρόλο σε αυτή την μεταφορά. Επιπλέον το σύμπλεγμα ενδοσωμικής διαλογής της μεταφοράς (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT), το οποίο αποτελείται από πέντε συμπλέγματα (ESCRT-0, -I, -II, -III και Vps4), είναι ένα σύστημα απαραίτητο για την κατασκευή κυστιδίων και τον καθορισμό του φορτίου που το καθένα φέρει (27).

1.3.4. Αποπτωτικά Σωμάτια

Στον άνθρωπο κάθε μέρα 50 δισεκατομμύρια κύτταρα αποπίπτουν με σκοπό να διατηρηθεί η ομοιόσταση στους ιστούς του σώματος. Κατά την διαδικασία αυτή, η οποία ονομάζεται και προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, τα κύτταρα συρρικνώνονται, η χρωματίνη συμπυκνώνεται και η πλασματική μεμβράνη αποβάλλει φυσαλίδες. Με τον τρόπο αυτό από τα κύτταρα αποβάλλονται τα αποπτωτικά σωμάτια (28). Τα κλειστά αυτά κυστίδια έχουν μέγεθος 500-4000nm και έχουν το χαρακτηριστικό να περιέχουν οργανίδια στο εσωτερικό τους. Τα αποπτωτικά σωμάτια παράγονται μόνο κατά την απόπτωση. Στην απόπτωση όμως δημιουργούνται και άλλα είδη μικρότερων κυστιδίων μη ειδικών για αυτήν. Τα αποπτωτικά σωμάτια αναγνωρίζονται ειδικούς υποδοχείς των φαγοκυττάρων πιο συχνά των μακροφάγων και φαγοκυτταρώνονται. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται από την κυκλοφορία (29).

1.4. Μικροκυστίδια

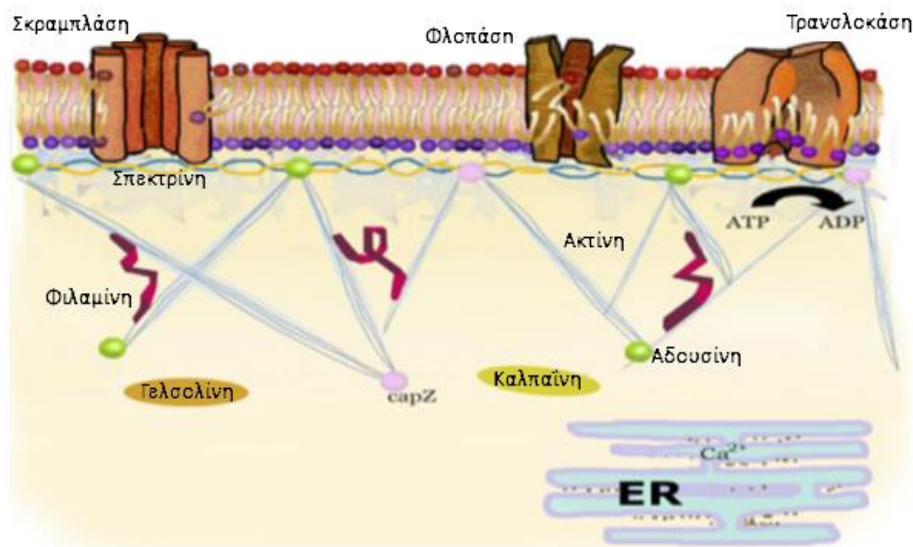
Τα MVs αναφέρονται στην βιβλιογραφία και ως μικροσωματίδια (microparticles, MPs) ή εκτοσώματα. Είναι κυστίδια ακέραια, μικρού μεγέθους και πλούσια σε φωσφολιπίδια τα οποία απελευθερώνονται από πολλά διαφορετικά είδη κυττάρων υπό κάποια μορφή ενεργοποίησης όπως η απόπτωση, η παράγοντες αύξησης και η δράση διάφορων κυτταροκινών (30).

1.4.1. Βιογένεση

Ποικιλία ερεθισμάτων έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία MVs. Τα ερεθίσματα αυτά είναι η απόπτωση, αλλά και άλλοι παράγοντες από βιολογικά μόρια όπως οι κυτταροκίνες, διάφορες τοξίνες και φυσικά ερεθίσματα όπως η τάση μεταξύ των κυττάρων.

Η ενεργοποίηση από τα προαναφερόμενα ερεθίσματα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{2+} στο ενδοκυττάριο χώρο. Σε φυσιολογικές τιμές Ca^{2+} τα εξαρτώμενα από τη συγκέντρωση Ca^{2+} ένζυμα συμβάλουν ώστε η PS και φωσφατιδυλεθανολαμίνη (phosphatidyl-ethanolamine, PE) να παραμένουν στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων (31).

Η αυξημένη συγκέντρωση Ca^{2+} στο κυτοσόλιο διαταράσσει την ισορροπία του κυτταροσκελετού και της λιπιδικής ισορροπίας της μεμβράνης με την συμβολή πέντε ενζύμων τη σκραμπλάση, τη φλοπάση, την τρανσλοκάση, τη γελσολίνη και την καλπαΐνη (30). Τα ένζυμα αυτά σε φυσιολογικές συνθήκες διατηρούν τη φυσιολογική δομή και λειτουργία της πλασματικής μεμβράνης τοποθετώντας τα φωσφολιπίδια στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης και τα αμινο-φωσφολιπίδια στην εσωτερική. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7 οι πρωτεΐνες σκραμπλάση, φλοπάση και τρανσλοκάση είναι διαμεμβρανικές. Η τρανσλοκάση, και πιο συγκεκριμένα η αμινο-φωσφολιπιδική τρανσλοκάση, πραγματοποιεί την εξαρτώμενη από τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate, ATP) μεταφορά PS και PE εσωτερικά της πλασματικής μεμβράνης. Η δράση της αναστέλλεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις Ca^{2+} . Η φλοπάση είναι και αυτή ATP εξαρτώμενη διαμεμβρανική πρωτεΐνη και μεταφέρει λιπίδια από μέσα προς τα έξω και λειτουργεί συνεργατικά με την τρανσλοκάση. Η σκραμπλάση ανευρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη των PLTs και επιτρέπει τη μεταφορά λιπιδίων πάνω στην μεμβράνη. Η καλπαΐνη ενεργοποιείται με την αύξηση της συγκέντρωσης του Ca^{2+} στο κυτοσόλιο και επάγει την ενεργοποίηση και άλλων ενδοκυττάρων ενζύμων. Όσο αφορά στην δημιουργία MVs, ο ρόλος της καλπαΐνης είναι να καταστρέφει τα νημάτια του κυτταρικού σκελετού, να προωθή την κυστιδιοποίηση της μεμβράνης και να ενεργοποιεί της απόπτωση. Η εύρεση της γελσολίνη απαντάται μόνο στα PLTs και η ενεργοποίηση της επάγεται, όπως και στην περίπτωση της καλπαΐνης, από αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} . Αφαιρεί της πρωτεΐνες που καλύπτουν το τελικό κομμάτι της ακτίνης, με αποτέλεσμα η ακτίνη, η οποία είναι μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, να αποκτά τη δυνατότητα να απενεργοποιεί τα PLTs (21).



Εικόνα 6. Ένζυμα που συμμετέχουν στη δημιουργία MVs. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες σκραμπλάση, φλοπάση και τρανσολοκάση και τα ένζυμα γελοσολίνη και καλπαΐνη είναι βασικά για την διατήρηση την λιπιδικής ισορροπίας στην πλασματική μεμβράνη και επηρεάζονται από την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του Ca^{2+} . Ανατύπωση από (21).

Η αλλαγή αυτή στην λειτουργία των ενζύμων με την αύξηση της συγκέντρωσης το Ca^{2+} έχει ως αποτέλεσμα διαταραχή της δομής της διπλοστιβάδας φωσfolιπιδίων στην πλασματική μεμβράνη. Ως αποτέλεσμα η PS μεταφέρεται στο εξωτερικό της μεμβράνης και ταυτόχρονα αποδομείται, μέσω πρωτεασών, ο κυτταρικός σκελετός. Με αυτόν τον τρόπο τα MVs δημιουργούνται και απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο (32). Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι και κάποιες GTPάσες (Τριφωσφορική γουανοσίνη, GTP) έχουν βασικό ρόλο, όπως οι Rho και οι ARF, διότι δεσμεύουν κινάσες και ρυθμίζουν την αυξημένη απελευθέρωση MVs (31).

Αν και ο ακριβής μηχανισμός σχηματισμού των MVs δεν έχει ακόμα κατανοηθεί πλήρως, υπάρχουν ενδείξεις ότι στον σχηματισμό των MVs εμπλέκονται στοιχεία του κυτταροσκελετού (ακτίνη και μικροσωληνίσκοι), μόρια μετακίνησης (κινάσες και μιοσίνη) και μόρια που λειτουργούν συντήκοντας τη μεμβράνη (παράγοντες σύνδεσης). Το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην δημιουργία MVs χρειάζονται ενέργεια και για τον λόγο αυτό με την πτώση της θερμοκρασίας μειώνεται και ο ρυθμός σχηματισμού των MVs (26).

1.4.2. Λειτουργία

Τα MVs έχουν πολλούς ρόλους όπως η απόρριψη περίσσειας και άχρηστων ουσιών από το κύτταρο, η ικανότητα επαγωγής άμεσης επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων και η ενεργοποίησή τους. Μερικοί επιπλέον ρόλοι της κυκλοφορίας των MVs είναι η προώθηση της ανάπτυξης, η αναδιάταξη και αναδιοργάνωση της πλασματικής μεμβράνης με σκοπό την αποτροπή της απόπτωσης (33).

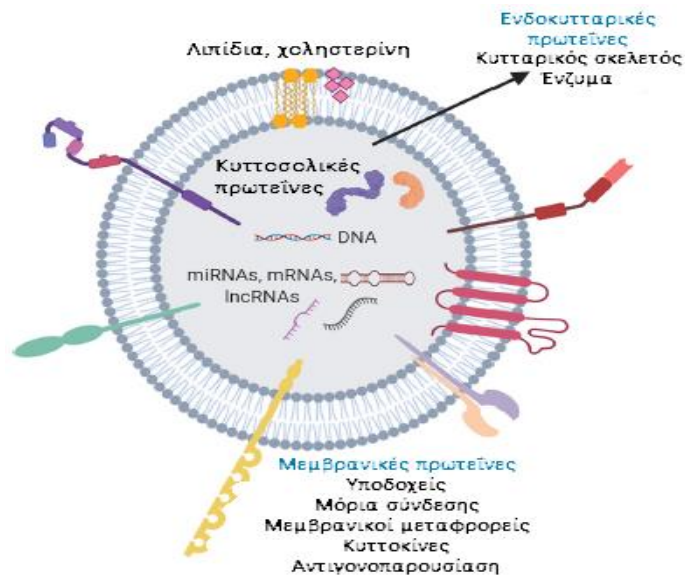
Το φορτίο των MVs είναι καθοριστικό για την λειτουργικότητα τους και ειδικά στη διακυτταρική επικοινωνία. Τα MVs έχουν διαφορετικούς τρόπους με τους οποίους συμβάλουν στην επικοινωνία μεταξύ κυττάρων. Στην επιφάνεια τους εντοπίζονται σύμπλοκα που έχουν την δυνατότητα σύνδεσης με τα κύτταρα στόχους μέσω υποδοχέων στην εξωτερική μεμβράνη. Η σύνδεση αυτή οδηγεί σε ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών. Ακόμα, τα MVs μπορούν να συντηχθούν με την πλασματική μεμβράνη στο κύτταρο δέκτη. Με τον τρόπο αυτό το κύτταρο δέκτης αποκτά στοιχεία της μεμβράνης του κυττάρου δότη και στο εσωτερικό του απελευθερώνεται το περιεχόμενο του MV. Επιπλέον, με εγκόλπωση τα MVs μεταφέρονται στο εσωτερικό των κυττάρων. Σε όλες τις περιπτώσεις ως αποτέλεσμα επέρχονται αλλαγές στο κύτταρο δέκτη (34).

Εκτός από τα φυσιολογικά επίπεδα MVs, μπορεί να παρατηρηθεί και αύξηση τους, η οποία αντανακλά μια εικόνα για την κατάσταση επιβίωσης των κυττάρων, τη σωστή λειτουργία τους και τον κυτταρικό θάνατο. Σε πληθώρα ασθενειών τα MVs αυξάνονται οδηγώντας σε διάφορες επιπλοκές όπως η διαταραχή της καρδιακής λειτουργίας και διαταραχές της πήξης του αίματος (35).

1.4.3. Φορτίο

Το κάθε είδος κυττάρου έχει την δυνατότητα να αποβάλλει διαφορετικά MVs ανάλογα με της συνθήκες που επικρατούν και αντιστρόφως, διαφορετικά κύτταρα στις ίδιες συνθήκες μπορούν να αποβάλλουν ίδια MVs (34). Τα MVs φέρουν μεγάλη ποικιλία μορίων από την πλασματική μεμβράνη και από το ενδοκυττάριο χώρο. Τα φορτία αυτά είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα, κυτταροκίνες, χημειοκίνες, υποδοχείς παραγόντων αύξησης και μεταβάλλονται ανάλογα με το είδος του μητρικού κυττάρου (31).

Όλα τα MVs στην επιφάνεια τους έχουν PS, άλλα μεμβρανικά λιπίδια και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Υπάρχουν και πολλά μόρια ειδικά του κυττάρου προέλευσης των MVs. Για παράδειγμα τα MVs προερχόμενα από αιμοπετάλια έχουν αιμοπεταλιακή μεμβρανική πρωτεΐνη Ib, αιμοπεταλιακό μόριο ενδοθηλιακής προσκόλλησης 1, p-σελεκτίνη και CD36 και τα MVs από T κύτταρα έχουν υποδοχείς T κυττάρων. Στο εσωτερικό τους, τα MVs περιέχουν πυρηνικές πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα όπως δεσοξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ και RNA από τον πυρήνα αλλά και miRNA (Εικόνα 7). Κατά την αποβολή των MVs αυτά παγιδεύουν στο εσωτερικό τους νουκλεϊκά οξέα και τα προστατεύουν, κατά την μεταφορά τους σε άλλα κύτταρα, από τις νουκλεάσες (34).



Εικόνα 7. Το φορτίο των MVs. Τα MVs περιέχουν λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Οι πρωτεΐνες τους είναι διαμεμβρανικές αλλά και κυττοσολικές. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν υποδοχείς, μεταφορείς, μόρια σύνδεσης, κυτταροκίνες και αντιγονοπαρουσιαστικά μόρια. Στο εσωτερικό τους περιέχουν ποικιλία νουκλεϊκών οξέων όπως DNA, miRNA, mRNA. Το φορτίο τους εξαρτάται από τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται και από την κατάσταση των κύτταρων αυτών. Τροποποιημένη από (36).

1.5. Κυστίδια του αίματος

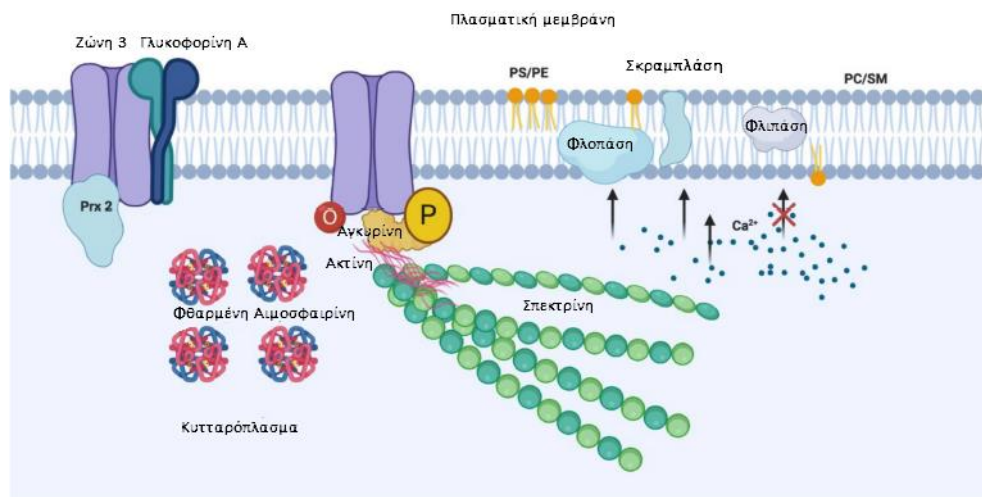
1.5.1. Κυστιδιοποίηση Ερυθρών Αιμοσφαιρίων

Τα RBC κυκλοφορούν στο αίμα για 120 ημέρες. Σε αυτό το χρονικό διάστημα υφίστανται πληθώρα αλλαγών στη λειτουργικότητα των ενζύμων τους, βλάβες λόγω οξειδωσης και διαταραχής ιόντων και απώλεια μέρους της μεμβράνης τους (37). Το επίκεντρο της οργάνωσης της μεμβράνης των RBC είναι το κανάλι ιονταλλαγής που ονομάζεται ζώνη 3. Γύρω από αυτήν οι υπόλοιπες πρωτεΐνες δημιουργούν μακρομοριακά σύμπλοκα. Ο κυτταρικός σκελετός των RBC αποτελείται από σπεκτρίνη, ακτίνη, πρωτεΐνη 4,1R, αγκυρίνη και της σχετιζόμενες με την ακτίνη πρωτεΐνες, οι οποίες συνδέονται στο εσωτερικό μέρος της πλασματικής μεμβράνης με τη ζώνη 3, παρέχοντας στη μεμβράνη ελαστικότητα και αντοχή, απαραίτητα στοιχεία για να επιβιώσει το RBC κατά την κυκλοφορία στο αίμα (38).

Η κυστιδιοποίηση στα RBC συμβάλει σημαντικά στην αποβολή ανεπιθύμητων κομματιών των RBC που με την παραμονή τους θα δημιουργούσαν σοβαρές βλάβες λόγω αιμοστατικών και ανοσολογικών αντιδράσεων. Επομένως, η βιογένεση των MVs από RBCs είναι αναπόσπαστο κομμάτι της φυσιολογίας τους και της διατήρησης της ομοιόστασης. Κατά την ωρίμανση των RBCs, η κυστιδιοποίηση είναι χρήσιμη όχι μόνο για την απόρριψη άχρηστων ουσιών, αλλά μεταβάλει τον όγκο και την επιφάνεια του κυττάρου με αποτέλεσμα να αναδιατάσσεται η πλασματική μεμβράνη. Επιπλέον, η αναδιάταξη της μεμβράνης από τα MVs κατά την ωρίμανση πραγματοποιείται και με την αποβολή

ακετυλοχολινεστεράσης, μεμβρανικών πρωτεϊνών, μεταφορέων γλυκόζης και μεταφορέων αμινοξέων. Κατά τη γήρανση των RBCs αποβάλλεται μέχρι και το 20% της αιμοσφαιρίνης (hemoglobin, Hb) και μέσω κυστιδιοποίησης, κομμάτι της πλασματικής μεμβράνης μειώνεται. Με αυτόν τον τρόπο ελαττώνεται ο όγκος του RBC με ταυτόχρονη μείωση της πυκνότητας.

Γενικότερα, η δημιουργία κυστιδίων στα RBCs έχει αντίκτυπο στην δομή της μεμβράνης τους και επάγεται από φθαρμένη Hb, οξειδωμένες πρωτεΐνες και ανεπαρκούς σύνδεσης μεταξύ της ζώνης 3 στην μεμβράνη και της αγκυρίνης στον κυτταρικό σκελετό. Οι αλλαγές στην κατανομή των φωσφολιπιδίων προκαλούν και αυτές αποβολή κυστιδίων. Τα ένζυμα σκραμπλάση, καλπαΐνη και διάφορες πρωτεάσες ενεργοποιούνται σε συνθήκες οξείδωσης ή αύξησης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} , οδηγώντας στην αναστολή της φλιπάσης και την διατήρηση της PS στο εσωτερικό του κυττάρου. Με τον τρόπο αυτό το κυτοσόλιο αποδομείται, η ζώνη 3 συσσωματώνεται και το RBC αποβάλλει MVs από την μεμβράνη του. Η περοξειρεδοξίνη 2 (Peroxiredoxin 2, Prx 2) συνδέεται στο αμινοτελικό άκρο της ζώνης 3 και την φωσφορυλιώνει (Εικόνα 9) (39).



Εικόνα 8. Μηχανισμοί κυστιδιοποίησης των RBC. Βλάβες στα RBCs κινητοποιούν διάφορους οδούς δημιουργίας MVs. Η κατεστραμμένη Hb, η οξείδωση πρωτεϊνών, η αλλοίωση της ζώνης 3 λόγω γήρανσης του κυττάρου και η διαταραχή της δομής της φωσφολιπιδικής μεμβράνης αποτελούν ενεργοποιητές της κυστιδιοποίησης. Η οξείδωση και η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου Ca^{2+} επάγουν μέσω μη ειδικών καναλιών ιόντων την λειτουργία ενζύμων όπως η σκραμπλάση και η καλπαΐνη και αναστέλλουν την λειτουργία της φλιπάσης. Με αυτόν τον τρόπο επάγεται η κυστιδιοποίηση λόγω εξωτερίκευσης της PS και διαταραχής του κυτταρικού σκελετού. Ανατύπωση από (39).

Τα MVs από RBCs αποτελούνται από διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων και έχουν διάμετρο 100-200nm. Είναι πλούσια σε φωσφολιπίδια (PS και PE), πρωτεΐνες (ζώνη 3, γλυκοφορίνη), χοληστερόλη, λιπιδικές σχεδίες, Hb και ακετυλοχολινεστεράση. Έχουν διαφορές σχετικά με το μητρικό τους κύτταρο όπως η απουσία πρωτεϊνών του κυτταρικού σκελετού και η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης (40). Στα MVs των RBCs απουσιάζουν όλες οι βασικές πρωτεΐνες του κυτταρικού σκελετού

εκτός από την ζώνη 3 και την ακτίνη. Πάνω στα MVs έχει ανιχνευθεί μια τροποποιημένη μορφή της ζώνης 3, η οποία έχει σχετιστεί με τη γήρανση των RBCs. Η ανίχνευση αυτή αποτελεί ένδειξη ότι η ζώνη 3 έχει σημαντικό ρόλο στην κυστιδιοποίηση των RBCs (41). Στο εσωτερικό τους φαίνεται να περιέχονται διάφορες μορφές αλλοιωμένων αιμοσφαιρινών και οξειδοαναγωγικά ένζυμα (42). Τα MVs στην εξωτερική τους επιφάνεια έχουν μόρια που επάγουν την αναγνώριση τους από το ανοσοποιητικό σύστημα και την απομάκρυνση τους από την κυκλοφορία.

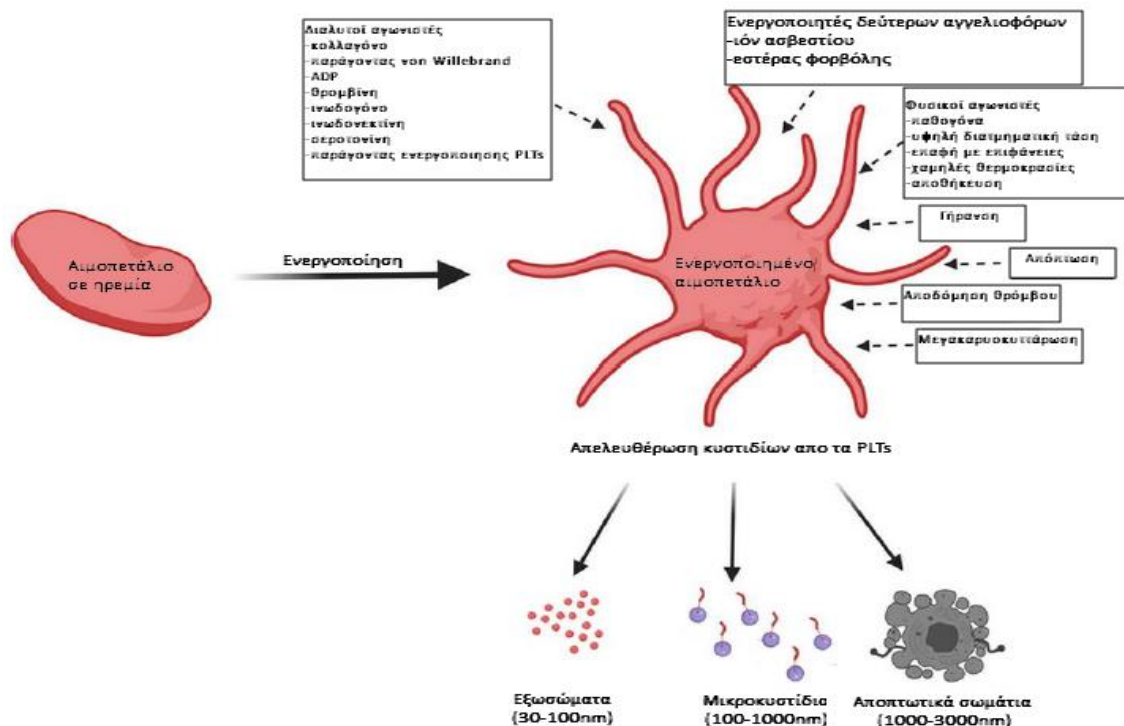
Η κυστιδιοποίηση γίνεται με αργό ρυθμό κατά την φυσιολογική γήρανση των RBCs, μπορεί όμως να επιταχυνθεί σε αιμολυτικές διαταραχές ή σε ερυθρά αιμοσφαίρια αποθηκευμένα για μετάγγιση. Ο αριθμός των MVs αυξάνεται και σε έλλειψη ενέργειας (ATP) και όταν υπάρχει αυξημένη μηχανική πίεση των RBC (40). Σε πολλές αιματολογικές ασθένειες όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία και η θαλασσαιμία τα MVs των RBCs αυξάνονται σε αριθμό. Η συστηματική φλεγμονή επίσης τα αυξάνει με πιθανές επιπλοκές στην αιμόσταση και στην αναιμία (43).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα MVs των RBCs δρουν στην αιμόσταση με πρωτοπαθή και δευτεροπαθή τρόπο. Είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τον παράγοντα XIIa επάγοντας έτσι την δημιουργία θρομβίνης και κατά επέκταση τον σχηματισμό θρόμβου, αλλά έχουν και αντυπηκτική δράση βοηθώντας το σύστημα της πρωτεΐνης C (44).

1.5.2. Κυστιδιοποίηση Αιμοπεταλίων

Η πλασματική μεμβράνη των PLTs αποτελείται από φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα η οποία δομείται εσωτερικά από PS και άλλα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια και εξωτερικά από σφιγγομυελίνη και φωσφατιδυλοχολίνη. Η διαταραχή αυτής της κατανομής έχει ως αποτέλεσμα την αποβολή κυστιδίων (45). Τα EVs από PLTs είναι τα κυρίαρχα μέσα στο αίμα με ποσοστό 60-90%. Πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, σχετιζόμενων με την ενεργοποίηση των PLTs, αυξάνουν τον αριθμό των MVs από PLTs ενώ ταυτόχρονα ο υποπληθυσμός των MVs προερχόμενος από ενεργοποιημένα PLTs έχει παθογόνο δράση (46).

Πολλοί παράγοντες και μηχανισμοί μπορούν να επάγουν την ενεργοποίηση των PLTs με αποτέλεσμα την δημιουργία κυστιδίων από αυτά (Εικόνα 10). Το είδος της ενεργοποίησης καθορίζει το φορτίο των μικροκυστιδίων και είναι υπεύθυνο για την ετερογένεια τους, η οποία καθορίζει και τη λειτουργικότητά τους (47). Επιπλέον είναι και διαφορετικός ο τρόπος σχηματισμού τους, για παράδειγμα η ενεργοποίηση από διαλυτούς αγωνιστές ή από διατμηματική τάση συμβαίνει λόγω αυξημένης ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{2+} , ενώ από διαλυτούς αγωνιστές με αποσταθεροποίηση του κυτταρικού σκελετού ακτίνης (46). Όταν εμπλέκεται η αυξημένη συγκέντρωση Ca^{2+} , ενεργοποιείται η πρωτεΐνη σκραμπλάση και δρα μεταφέροντας στην εξωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης την PS (48).



Εικόνα 9. Διαδικασία ενεργοποίησης των PLTs. Οι διάφοροι παράγοντες διαταράσσουν τη μορφολογία και λειτουργία των PLTs και ως αποτέλεσμα αυτά αποβάλλουν κυτίδια. Οι παράγοντες αυτοί είναι οι διαλυτοί αγωνιστές, η ενεργοποιητές δευτέρων αγγελιοφόρων, οι φυσικοί αγωνιστές, η γήρανση, η απόπτωση, η αποδόμηση θρόμβου και η μεγακαρουκυττάρωση. Τροποποιημένη από (47).

Τα MVs των PLTs έχουν στην επιφάνεια τους χαρακτηριστικούς δείκτες. Αυτοί είναι κυρίως γλυκοπρωτεΐνες (glycoprotein, GP) των PLTs όπως GPIIb (CD41) και GPIIb ενώ έχουν και P-σελεκτίνη (49). Τα μεγακαρουκύτταρα αποβάλλουν και αυτά MVs. Τα MVs που προέρχονται από μεγακαρουκύτταρα και από PLTs εκφράζουν στην επιφάνεια τους το CD41, όμως μόνο MVs από τα PLTs φέρουν στην επιφάνεια τους p-σελεκτίνη και PS. Σε υγιή άτομα κυκλοφορούν πολλά MVs στο αίμα προερχόμενα από μεγακαρουκύτταρα του μυελού των οστών. Τα MVs από PLTs αυξάνονται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως η χρόνια φλεγμονή και σε παθήσεις με χαρακτηριστικό την ενεργοποίηση PLTs όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, κακοήθειες και αυτοάνοσα νοσήματα (συστηματικός ερυθματώδης λύκος, ρευματοειδής αρθρίτιδα) (50), σακχαρώδης διαβήτης και σοβαρές οργανικές βλάβες (51).

Τα MVs προερχόμενα από PLTs εμφανίζουν ετερογένεια και στα εσωτερικά συστατικά τους. Φαίνεται ότι περιέχουν ηκτικούς παράγοντες, μεσολαβητές του ανοσοποιητικού συστήματος, ενεργά ένζυμα και προερχόμενες από τα PLTs κυτταροκίνες, νουκλεϊκά οξέα και παράγοντες μεταγραφής. Το μέγεθος τους σχετίζεται με την εσωτερική τους σύσταση καθώς μικρότερα MVs είναι πιο πλούσια σε πρωτεΐνες των α-κοκκιδίων και μεγαλύτερα MVs πλούσια σε λιπιδιακούς μεσολαβητές και μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Ακόμα, κατά την ενεργοποίηση των PLTs αποβάλλονται τα μιτοχόνδρια και άλλα οργανίδια και ως αποτέλεσμα αυτά ανευρίσκονται στα MVs (48).

Τα EVs των PLTs έχουν και πηκτική και αντιπηκτική δράση. Κατέχουν την δυνατότητα μείωσης του χρόνου σχηματισμού θρόμβου και της δημιουργίας θρομβίνης. Στη δράση αυτήν εμπλέκονται τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια της επιφάνειας των MVs. Η αντιπηκτική τους δράση σχετίζεται με την ενεργοποίηση της προθρομβίνης και τη δέσμευση στην πρωτεΐνη S. Η δέσμευση αυτή απενεργοποιεί τον παράγοντα Va με τον αναστολέα πήξης C. Η ικανότητα να επάγουν την πήξη τροποποιείται ανάλογα τον παράγοντα ενεργοποίησης των PLTs. Για παράδειγμα, τα MVs των PLTs που απελευθερώνονται υπό την επίδραση κολλαγόνου, θρομβίνης και ασβεστίου έχουν μεγάλη πηκτική δράση, ενώ τα MVs που εκκρίνονται με την επίδραση της διφωσφορικής αδενοσίνης και της επινεφρίνης έχουν μικρότερη πηκτική δράση (50).

Η κυστιδιοποίηση των PLTs διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στη φυσιολογία. Αυτό φαίνεται διότι σε αδυναμία δημιουργίας τους υπάρχει αιμορραγική διάθεση. Το σύνδρομο αυτό ονομάζεται Scott και συμβαίνει όταν η σκραμπλάση αδυνατεί να μεταφέρει την PS στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης ώστε να γίνει κυστιδιοποίηση (20).

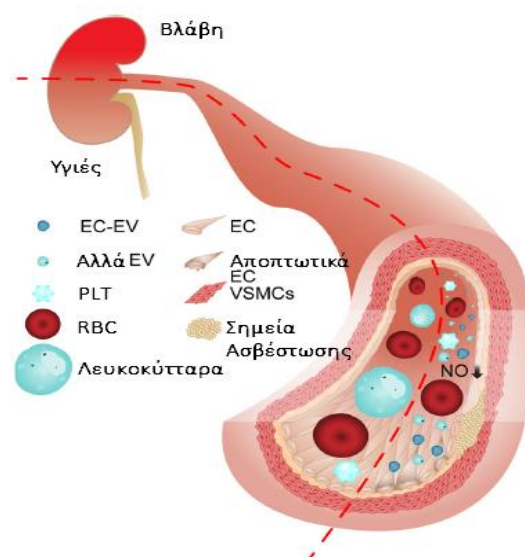
1.6. Μικροκυστίδια στην Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια

Τα EVs προκειμένου να διατηρήσουν την ομοιότητα των ιστών διεξάγουν τη διακυτταρική επικοινωνία μεταξύ διαφορετικών κυττάρων στους νεφρούς αλλά και μεταξύ των νεφρών και άλλων οργάνων. Επιπλέον, τα EVs έχουν ενοχοποιηθεί για στοιχεία παθογένειας της ΧΝΑ όπως η ίνωση και η ESRD. Η απελευθέρωση τους στο πλάσμα και τα ούρα μπορεί να χρησιμεύσει ως βιοδείκτης για τις νόσους των νεφρών, ειδικά όταν σε αυτά ανιχνεύονται συγκεκριμένα μοριακά στοιχεία. Η πλειοψηφία των νεφρικών κυττάρων αποβάλλει EVs, όμως αυτά λόγω της δομής του σπειράματος, του μηχανισμού φιλτραρίσματος και του νεφρικού φραγμού δεν είναι δυνατόν σε φυσιολογικές συνθήκες να περάσουν στην κυκλοφορία του αίματος και έτσι τα EVs των ούρων προέρχονται κυρίως από νεφρικά κύτταρα (52).

Βασική αιτία θανάτου στη ΧΝΑ αποτελούν τα καρδιαγγειακά επεισόδια. Πολλά από τα συμπτώματα της ΧΝΑ όπως η αναιμία, η χρόνια φλεγμονή, οι ουραιμικές τοξίνες και το οξειδωτικό στρες είναι αιτίες ενεργοποίησης των κυττάρων ώστε να εκκρίνουν EVs (53). Η μεταφορά των EVs μέσω της κυκλοφορίας του αίματος έχει επιρροή στους νεφρούς καθώς μπορούν σε παθολογικές καταστάσεις να προκαλέσουν υποξία, νεφροτοξικότητα, και πρωτεϊνουρία με αποτέλεσμα τα κύτταρα των νεφρών να αποβάλλουν EVs και αυτά με την σειρά τους να προκαλέσουν περαιτέρω βλάβες στα κύτταρα που λαμβάνουν τα EVs (54, 55). Τα MVs κατέχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονής και του ανοσοποιητικού συστήματος στη νεφρική ανεπάρκεια (56).

Σε διαβητικούς ασθενείς με ΧΝΑ ανιχνεύονται αυξημένα EVs λόγω της υπεργλυκαιμίας και του οξειδωτικού στρες. Φαίνεται ότι τα EVs όταν είναι θετικά σε PS στους ασθενείς αυτούς μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές διαταραχές της αιμόστασης με αποτέλεσμα να παθαίνουν φλεβικές θρομβώσεις και μικροαγγειακές επιπλοκές (57). Επιπλέον, στην ESRD τα κυκλοφορούντα EVs επηρεάζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα μειώνοντας τη λειτουργία

τους και τη συγκέντρωση νιτρικού οξέος (nitric oxide, NO) σε αυτά. Έτσι οι ασθενείς με ESRD έχουν μεγαλύτερη συχνότητα καρδιαγγειακών επιπλοκών ενώ στους ουραιμικούς ασθενείς η αρτηριακή νόσος εξελίσσεται με ραγδαίους ρυθμούς. Η αρτηριοσκλήρυνση ή αθηρωμάτωση επηρεάζεται από την κατάσταση των ενδοθηλιακών κυττάρων και τα επίπεδα του νιτρικού οξέος, επιβαρύνοντας έτσι το καρδιαγγειακό σύστημα των ατόμων με ESRD (52, 58). Τα MVs σε φυσιολογικές συνθήκες φέρουν παράγοντες που αναστέλλουν την ασβέστωση. Στην ΧΝΑ η συγκέντρωση των παραγόντων αυτών πάνω στα MVs μειώνεται και με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ασβέστωση των τοιχωμάτων των αρτηριών για την οποία ευθύνονται τα MVs (59). Η επιρροή των EVs της ΧΝΑ στο ενδοθήλιο φαίνεται στην Εικόνα 10.



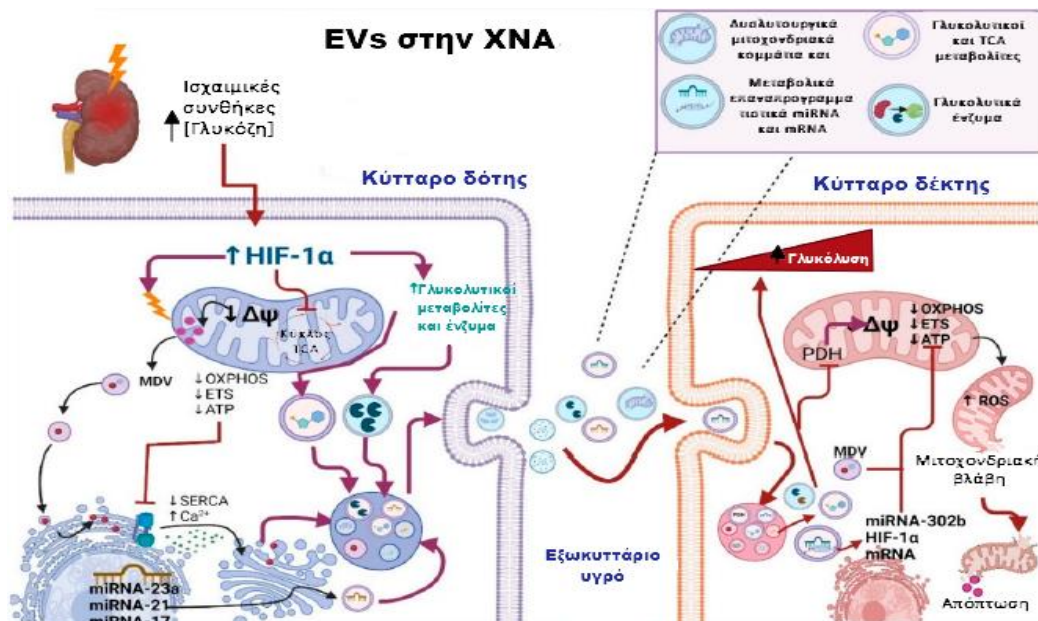
Εικόνα 10. Ο ρόλος των EVs στην αγγειακή βλάβη στους ασθενείς με νεφρική νόσο. Τα κύτταρα επηρεασμένα από διάφορους παθολογικούς παράγοντες της ΧΝΑ παράγουν τροποποιημένα EVs και σε αντίθεση με τα EVs σε μη παθολογικές συνθήκες βλάπτουν το ενδοθήλιο. Έτσι αυξάνεται η απόπτωση, μειώνεται η αγγειογένεση, προκαλείται ασβέστωση λόγω διαταραχής των αρτηριακών λειών μυϊκών κυττάρων (vascular smooth muscle cells, VSMCs) και μειώνεται το NO που δηλώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία. Υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της παθογένειας αυτής και της συγκέντρωσης των ενδοθηλιακών EVs (endothelial cells – extracellular vesicle, EC-EV). Τροποποιημένη από (60).

Η αιμοκάθαρση αυξάνει τον αριθμό των EVs και κυρίως MVs από τα ενδοθηλιακά κύτταρα λόγω της πίεσης που δέχονται κατά τη διαδικασία, χωρίς όμως να επιβαρύνει την κλινική εικόνα. Αυτό βεβαίως εξαρτάται και από το είδος της αιμοκάθαρσης καθώς στην HDF ο αριθμός των MVs που ανιχνεύεται είναι μικρότερος από ότι στην συμβατική αιμοκάθαρση. Τα φίλτρα της συσκευής αιμοκάθαρσης είναι πιο ικανά στην απομάκρυνση μικρότερων EVs (53).

Στην εξέλιξη και την επιδείνωση της ΧΝΑ τα EVs διαδραματίζουν βασικό ρόλο. Το φορτίο των EVs έχει ικανότητα επαναπρογραμματισμού του μεταβολισμού και της ενέργειας στα κύτταρα δέκτες αναστέλλοντας το σύστημα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των μιτοχονδρίων (mitochondria oxidative phosphorylation system, OXPHOS) και αυξάνοντας τη γλυκόλυση. Επιπρόσθετα, το φορτίο των EVs μπορεί να επάγει την αναστολή του

μιτοχονδριακού μεταβολισμού επηρεάζοντας το σύστημα σήμανσης της οξειδοαναγωγής. Το οξειδωτικό στρες και ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός είναι σημαντικά για τη ΧΝΑ διότι διαταράσσουν τη νεφρική λειτουργία ωθώντας σε διαταραχή της επικοινωνίας μεταξύ των μιτοχονδρίων και του ενδοπλασματικού δικτύου όπως και της οξείδωσης με την ίνωση.

Τα EVs συμβάλουν στον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό στη ΧΝΑ. Παθολογικοί παράγοντες όπως ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1α (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1α) ενεργοποιούνται στη ΧΝΑ λόγω των ισχαιμικών συνθηκών και της αυξημένης συγκέντρωσης της γλυκόζης. Ο HIF-1α επηρεάζει τα μιτοχόνδρια μειώνοντας τη μιτοχονδριακή μεμβρανική δυναμική ($\Delta\psi$ m), το OXPHOS, το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων (electron transport system, ETS) και μειώνοντας τη μεταφορά ATP. Τα παραπάνω δημιουργούν στρες στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα αυτά να αποβάλλουν κυστίδια προερχόμενα από τα μιτοχόνδρια (mitochondria derived vesicles, MDVs) που στην συνέχεια εισέρχονται σε πολυκυστιδιακά σωμάτια και εξέρχονται από το κύτταρο ως εξωσώματα. Τα MDVs περιέχουν κομμάτια κατεστραμμένου μιτοχονδρίου και μεταβολίτες τρικαρβοξυλικών οξέων (tricarboxylic acid ,TCA). Ο HIF-1α προκαλεί αύξηση των γλυκολυτικών ένζυμων και των μεταβολιτών, τα οποία εναποθέτονται πάνω στα EVs πριν την έξοδο τους από το κύτταρο. Ο HIF-1α συνεργεί με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ώστε τα EVs να μεταφέρουν mRNA και μεταβολικά ρυθμιστικά microRNAs (miRNAs). Ως αποτέλεσμα όλων των παραπάνω, τα EVs στα κύτταρα δέκτες ενεργοποιούν το γλυκολυτικό μονοπάτι και την καταστρέφουν τα μιτοχόνδρια αυξάνοντας της ενεργές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και καταστρέφονται με αυτόν τον τρόπο κύτταρα και σε πιο απομακρυσμένα σημεία του νεφρώνα (Εικόνα 11) (61).



Εικόνα 11. Ο ρόλος των EVs στον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό της ΧΝΑ. Λόγω διάφορων ερεθισμάτων τα κύτταρα αποβάλλουν EVs που όταν μεταφερθούν σε άλλα κύτταρα δέκτες προκαλούν βλάβες. Ο παράγοντας HIF-1α ,που αυξάνεται λόγω της ισχαιμίας και της αυξημένης συγκέντρωσης γλυκόζης, και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ,λόγω του στρες, έχουν βλαπτική επίδραση στα νεφρικά κύτταρα. Έτσι, επάγεται η κυστιδιοποίηση και τα αποβαλλόμενα κυστίδια έχουν βλαπτική επίδραση σε άλλα απομακρυσμένα κύτταρα στον νεφρό. Ανατύπωση από (61).

1.7. Αιμόσταση

Η αιμόσταση είναι μια δυναμική διαδικασία που σκοπό έχει να διατηρήσει την ακεραιότητα των αγγείων και να αποτρέψει την αιμορραγία (62). Στο σύστημα της αιμόστασης συμμετέχουν το αγγειακό σύστημα, το ινωδογονολυτικό σύστημα, το σύστημα της πήξης, τα PLTs, οι αναστολής σερίνης κ.α. Κατά τη διαταραχή του ενδοθηλίου λόγω μηχανικού τραύματος ή χημικού τραύματος το σύστημα αυτό ενεργοποιείται για τη δημιουργία θρόμβου που σκοπό έχει να σταματήσει την αιμορραγία. Ο θρόμβος μέσω της ινωδόλυσης με την πάροδο του χρόνου αποδομείται. Η διαταραχή αυτής της ισορροπίας μπορεί να οδηγήσει στην αιμορραγία και στην ανεξέλεγκτη δημιουργία θρόμβων (63).

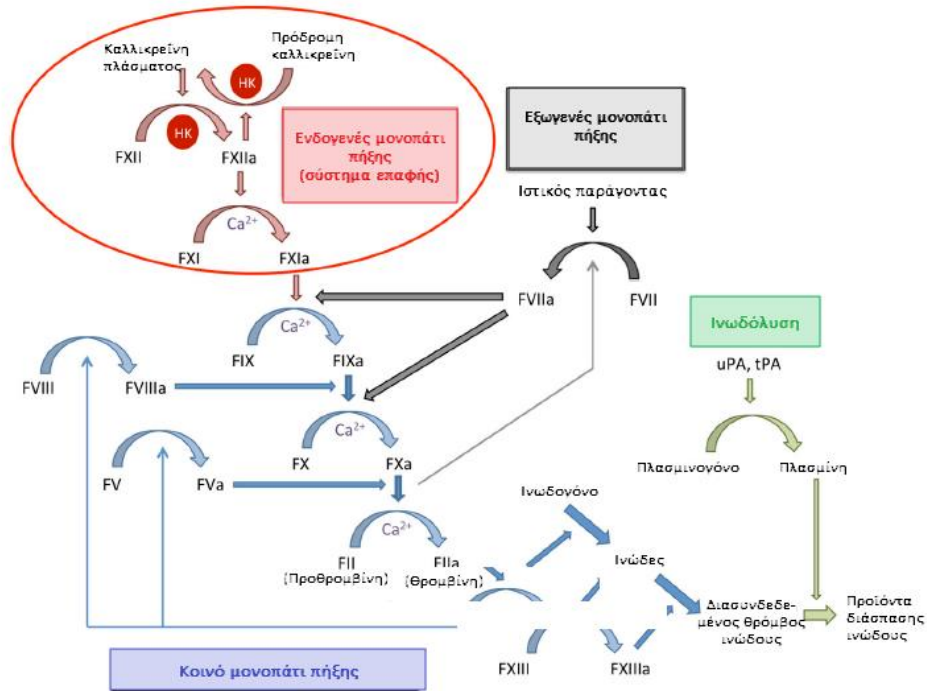
Το εξωτερικό τοίχωμα των αγγείων απαρτίζεται από ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία αποτρέπουν τη δημιουργία θρόμβου, σε αντίθεση με την υποενδοθηλιακή στιβάδα που είναι πλούσια σε κολλαγόνο, παράγοντα von Willebrand και άλλες πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τα PLTs (64). Τα PLTs έχουν βασικό ρόλο στην αιμόσταση γιατί σχηματίζουν το αιμοπεταλιακό βύσμα που η επιφάνεια του δίνει τη δυνατότητα στους παράγοντες να δράσουν και να δημιουργήσουν την ινική. Έτσι με την δημιουργία την ινικής τα PLTs συσσωματώνονται και δημιουργείται ο θρόμβος (65).

Η αιμόσταση χωρίζεται σε τρία στάδια την πρωτογενή, τη δευτερογενή και την ινωδόλυση. Η πρωτογενής αιμόσταση αφορά στην αντίδραση των PLTs κατά τον τραυματισμό αγγείων και για την ενεργοποίηση της είναι απαραίτητη η παρουσία του παράγοντα von Willebrand και των αιμοπεταλιακών υποδοχέων. Όταν συμβαίνουν τραυματισμοί σε μικρά αγγεία όπου τα αγγεία βρίσκονται σε επαφή, τα PLTs κινητοποιούνται, δημιουργούν συσσωματώματα και βοηθούν το υποενδοθήλιο ώστε να διορθωθεί η βλάβη. Τα PLTs που βρίσκονται στο σημείο της βλάβης αποβάλουν το περιεχόμενο των κοκκίων τους και έτσι προσελκύονται και άλλα PLTs, επεκτείνοντας έτσι το συσσωμάτωμα, που σταθεροποιείται με τη βοήθεια του ινωδογόνου. Η δευτερογενής αιμόσταση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της πήξης σε αγγειακές βλάβες μεγαλύτερης έκτασης. Ο σκοπός της δευτερογενούς αιμόστασης είναι η δημιουργία θρόμβου (63). Η τριτογενής αιμόσταση είναι η ινωδόλυση που καταστέλλει την δημιουργία μεγάλων θρόμβων στις πληγές και με αυτόν τον τρόπο συμβάλει στην ισορροπία της αιμόστασης (66).

1.7.1. Καταρράκτης της πήξης

Ο καταρράκτης της πήξης αποτελεί μια διαδικασία που αποτελείται από ενεργοποίηση των παραγόντων της πήξης διαδοχικά. Κατά τη διαδικασία αυτή λαμβάνουν χώρα πρωτεολυτικές αντιδράσεις όπου η κάθε πρωτεάση ενεργοποιεί την επόμενη. Ο καταρράκτης περιλαμβάνει δύο οδούς την ενδογενή και την εξωγενή οδό που καταλήγουν στην ενεργοποίηση της κοινής οδού κατά την οποία ο παράγοντας X μετατρέπεται σε Xa. Με την ενεργοποίηση αυτή και τη δημιουργία του παράγοντα Va από τον παράγοντα V, παρουσία Ca^{2+} , η προθρομβίνη μετατρέπεται σε θρομβίνη. Η θρομβίνη στην συνέχεια μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινική και με την ενεργοποίηση του παράγοντα XIII σε XIIIa

δημιουργείται η διασύνδεση της ινικής. Το ενδογενές μονοπάτι ενεργοποιείται όταν τραυματιστούν τα αγγεία και εκτίθεται κολλαγόνο. Στην εξωγενή οδό λόγω αγγειακής βλάβης ενεργοποιείται ο ιστικός παράγοντας. Αναλυτικότερα ο καταρράκτης της πήξης αναπαριστάτε στην Εικόνα 12 (67).



Εικόνα 12. Ο καταρράκτης της πήξης. Ο καταρράκτης της πήξης (μπλε βέλη) μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε με την ενδογενή (κόκκινα βέλη) είτε με την εξωγενή οδό (γκρι βέλη). Οι δύο αυτές οδοί καταλήγουν σε ένα κοινό μονοπάτι και πιο συγκεκριμένα στην ενεργοποίηση του παράγοντα X (factor, F). Ο FX ενεργοποιεί θρομβίνη που είναι βασική για τον σχηματισμό του ινωδογόνου από την ινική και την ενεργοποίηση του XIII, που μαζί με την ινική ενώνονται και σταθεροποιούνται. Ταυτόχρονα, με αργότερους ρυθμούς ενεργοποιείται η ινωδολύση (πράσινα βέλη) κατά την οποία το πλασμινογόνο μετατρέπεται σε πλασμίνη και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αιμοστατική ισορροπία. Ανατύπωση από (68).

1.7.2. Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στην αιμόσταση

Όπως έχει προαναφερθεί τα MVs φέρουν πάνω τους μόρια προερχόμενα από το μητρικό τους κύτταρο, όπως την P-σελεκτίνη αν προέρχονται από PLTs ή τον ιστικό παράγοντα. Η επιφάνεια ενός κυττάρου μπορεί να γίνει έδαφος ώστε να υπάρξει προπηκτική δραστηριότητα, το ίδιο ισχύει και τα MVs εκκρινόμενα από κύτταρα με προπηκτικές μεμβράνες (67). Επιπλέον, τα MVs περιέχουν εξωτερικευμένα ανιοντικά φωσφολιπίδια, πολλές φορές σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τα μητρικά τους κύτταρα. Το πιο σημαντικό από αυτά είναι η PS που έχει την δυνατότητα να ενισχύει την ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης, αφού πάνω της μπορούν να συνδεθούν οι παράγοντες IXa, Va, Xa και VIII. Τα MVs που έχουν στην επιφάνεια τους ιστικό παράγοντα είναι επίσης πολύ προπηκτικά γιατί ο ιστικός παράγοντας παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για τους παράγοντες VII και VIIa. Υπάρχουν και τα MVs που είναι θετικά ταυτόχρονα για PS και για

ιστικό παράγοντα, τα οποία παρουσιάζουν πολύ μεγάλη προπηκτική ικανότητα (69). Ανεξάρτητα από τους δείκτες στην επιφάνεια των MVs φαίνεται ότι η αυξημένη συγκέντρωση τους μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία αιμοπεταλιακού βύσματος στα αγγεία (70).

Τα MVs έχουν και αντιπηκτική δράση. Τα MVs εκκρινόμενα από RBCs συμβάλουν αντιπηκτική στη δράση της πρωτεΐνης C. Η πρωτεΐνη C στην ενεργοποιημένη της μορφή δρα μαζί με τον συνπαράγοντα της, την πρωτεΐνη S, και μαζί αποικοδομούν τους παράγοντες Va και VIIIa (71).

1.7.3. Διαταραχές της αιμόστασης σε ασθενής με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια

Οι ασθενείς με ESDR εμφανίζουν διαταραχές στην πήξη και στην αιμορραγία. Τα παθολογικά στοιχεία της ΧΝΑ άμεσα επηρεάζουν και την αιμόσταση στους ασθενείς αυτούς. Για παράδειγμα, η αναιμία που είναι μια συνήθης διαταραχή της ESRD φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα αιμορραγιών. Οι ουραιμικές τοξίνες είναι επίσης βλαπτικές στη λειτουργία των PLTs (72). Μείζον ρόλο στην αιμορραγική διάθεση των ασθενών αυτών παίζει η δυσλειτουργία των PLTs, τα οποία δυσκολεύονται να συσσωρευτούν και δεν αλληλοεπιδρούν σωστά με το ενδοθήλιο. Για την διαταραχή των PLTs ευθύνονται κυρίως οι ουραιμικές τοξίνες όπου η παρουσία τους στο πλάσμα αποδιοργανώνει των μεταβολισμό των PLTs και ενεργοποιεί πρωτεολυτικά σύμπλοκα που εμποδίζουν τη δράση τους. Η αιμοκάθαρση συσχετίζεται με συχνές θρομβώσεις στα αγγεία ειδικά προς το τέλος της διαδικασίας αυτής, λόγω συσσώρευσης των PLTs (73). Η αιμοκάθαρση μπορεί να βοηθάει στη βελτίωση του προβλήματος διότι αφαίρει ουραιμικές τοξίνες από την κυκλοφορία του αίματος, όμως ταυτόχρονα τα PLTs καταπονούνται από την επαφή τους με τα φίλτρα της αιμοκάθαρσης (74). Άλλοι παράγοντες που συμβάλουν στον αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης είναι η φλεγμονή, διάφορες αιματολογικές διαταραχές, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και υποκείμενα νοσήματα (75). Η αναιμία επιδεινώνεται λόγω της συχνής αιμορραγίας στην ESRD. Τα RBCs βοηθούν τα PLTs ωθώντας τα προς το τοίχωμα των αγγείων και εκκρίνουν ADP βοηθώντας έτσι την αιμόσταση. Η βελτίωση της αναιμίας με την χορήγηση EPO μειώνει τον χρόνο αιμορραγίας και αυξάνει ταυτόχρονα τον αιματοκρίτη (73).

Ο εργαστηριακός έλεγχος της αιμόστασης στους ασθενής με ΧΝΑ συχνά εμφανίζει αυξημένους χρόνους PT/INR (prothrombin time test/international normalized ratio), aPTT (activated partial thromboplastin time) και PFA (platelet function assay) που υποδηλώνουν αυξημένο κίνδυνο για αιμορραγία. Επιπλέον, παρουσιάζονται αυξημένες τιμές του ινωδογόνου και D-διμερών. Στη ΧΝΑ η συγκέντρωση πολλών παραγόντων της πήξης είναι αυξημένη. Μια κατάσταση η οποία μπορεί να προάγει την δημιουργία καρδιαγγειακών παθήσεων είναι η μειωμένη συγκέντρωση του παράγοντα ADAMTS-13, που ανασταλεί τη δράση του παράγοντα von Willebrand. Τα μειωμένα επίπεδα του παράγοντα ADAMTS-13 οδηγούν σε αύξηση της συγκέντρωσης του παράγοντα von Willebrand, που είναι ιδιαίτερα εμφανής μετά το τέλος της αιμοκάθαρσης (75).

2. Σκοπός της μελέτης

Οι ασθενείς με ΧΝΑ εμφανίζουν αυξημένη συγκέντρωση μικροκυστιδίων στο πλάσμα η οποία λόγω της ικανότητας τους να μεταφέρουν διάφορα μόρια σε άλλα κύτταρα και να επάγουν την διακυτταρική επικοινωνία, ενδέχεται να επηρεάσουν την υγεία των ασθενών αυτών. Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στη μέτρηση MVs σε δείγματα πλάσματος του αίματος ασθενών με ΧΝΑ. Τα δείγματα συγκρίθηκαν πριν και μετά την αιμοκάθαρση και με φυσιολογικούς μάρτυρες. Για τον σκοπό αυτόν μετρήθηκαν τα μικροκυστίδια σε 57 δείγματα με τη τεχνική Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Τα δείγματα αυτά προέρχονταν από 22 ασθενείς με ΧΝΑ οι οποίοι υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση (43 δείγματα) και από 14 υγιείς μάρτυρες.

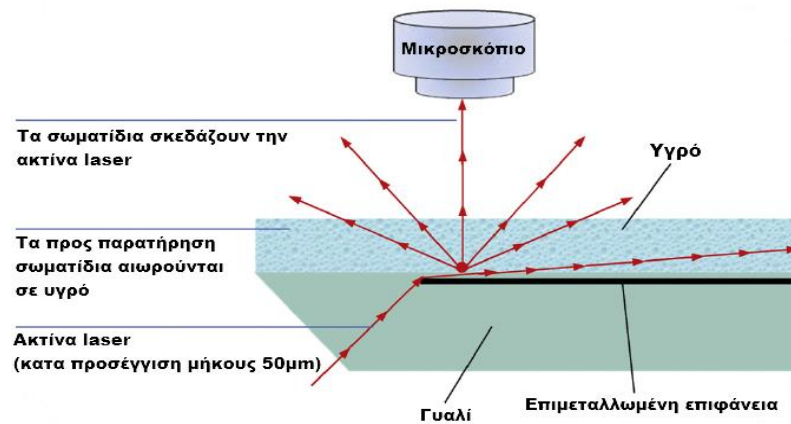
3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Nanoparticle Tracking Analysis

Το NTA είναι μια μέθοδος για άμεση, πραγματικού χρόνου οπτικοποίηση και ανάλυση νανοσωματιδίων σε διάφορα υγρά. Η μέθοδος αυτή δίνει λύση για πολλά προβλήματα άλλων παλιότερων μεθόδων, για παράδειγμα μπορεί και ανιχνεύει κυστίδια μικρού μεγέθους <300nm, δηλαδή πέρα του ορίου ανίχνευσης της κοινής κυτταρομετρίας ροής (76). Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της τεχνικής NTA είναι ότι το κάθε σωματίδιο ανιχνεύεται μεμονωμένα και με αυτόν τον τρόπο αντλούνται πληροφορίες για τη συγκέντρωση και τη διασπορά του μεγέθους. Μια παρόμοια τεχνική η διαφορική σκέδαση φωτός, η οποία λειτουργεί και αυτή με τη μέτρηση του σκεδασμού του φωτός, έχει το μειονέκτημα ότι λαμβάνει την ολική διασπορά από όλα τα σωματίδια, με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύονται εύκολα μικρότερα σωματίδια. Επομένως, το NTA προτιμάται ειδικά όταν πρόκειται για πολύπλοκα δείγματα όπως τα βιολογικά υγρά (77).

Μια τυπική συσκευή NTA αποτελείται από μια μονάδα laser, ένα μικροσκόπιο συνδεδεμένο μια ευαίσθητη στο φως φορτισμένη συσκευή σύζευξης (charged-coupled device, CCD) ή με μια κάμερα συμπληρωματικού μέταλλο-οξειδωτικού-ημιαγωγού (complementary metal-oxide-semiconductor, CMOS), μια υδραυλική αντλία και έναν θάλαμο μέτρησης (78).

Για τον καθορισμό του συνόλου της διασποράς του μεγέθους των σωματιδίων και της συγκέντρωσής τους στο εναιώρημα, το NTA χρησιμοποιεί της ιδιότητες του σκεδασμού του φωτός και της κίνησης Brown των σωματιδίων. Τα σωματίδια μέσα στο υγρό σκεδάζουν το laser και το μικροσκόπιο ανιχνεύει αυτόν τον σκεδασμό (Εικόνα 13). Η ακτίνα laser είναι συγκεκριμένου μήκους κύματος και προσπίπτει στο υγρό με τέτοιο τρόπο ώστε να συμπίπτει με την εστίαση του μικροσκοπίου και να δημιουργείται ο μικρότερος δυνατός θόρυβος, με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται σωματίδια πολύ μικρού μεγέθους (79). Έτσι ο σκεδασμός του φωτός από τα σωματίδια οπτικοποιείται εύκολα στο κοινό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 20x. Η κάμερα είναι τοποθετημένη σε γωνία 90° πάνω από το δείγμα και για την παραγωγή του βίντεο της κίνησης των σωματιδίων λαμβάνει 30 στιγμιότυπα το δευτερόλεπτο (80). Επομένως, κατά την παραγωγή του βίντεο το υγρό δείγμα ρέει στην κυψελίδα ενώ πάνω του προσπίπτει μια ακτίνα laser. Η εικόνα που φτάνει στην κάμερα είναι αποτέλεσμα του σκεδασμού και όχι η άμεση εικόνα των κυστιδίων, άρα δεν διακρίνεται το σχήμα τους (79).



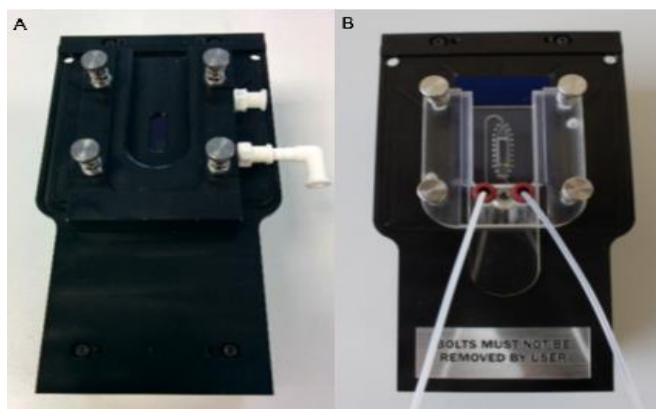
Εικόνα 13. Η οπτική διάταξη του NTA. Στο σύστημα του NTA χρησιμοποιείται ακτίνα laser συγκεκριμένου μήκους που προσπίπτει στο δείγμα σε συγκεκριμένη και ακριβώς προσδιορισμένη γωνία. Όταν η ακτίνα προσπίπτει πάνω στα σωματίδια αυτά σκεδάζουν φως το οποίο ανιχνεύεται από το μικροσκόπιο και στη συνέχεια από τη κάμερα. Τροποποιημένη από (76).

Το πρόγραμμα NanoSight NTA αναλύει το βίντεο εντοπίζοντας τη κίνηση Brown του κάθε σωματιδίου μεμονωμένα και έτσι υπολογίζεται το μέγεθος και η συγκέντρωση (76). Η σταθερή ροή ρυθμίζεται μέσω της υδραυλικής αντλίας. Από το βίντεο της ροής του υγρού το κάθε σωματίδιο εντοπίζεται και υπολογίζεται η μέση τετραγωνική μετατόπιση το κάθε σωματιδίου ξεχωριστά και με τον τύπο Stokes-Einstein ($D_t = K_B \cdot T / 6\pi\eta r_h$), η μετατόπιση αυτή μετατρέπεται στο μέγεθος του σωματιδίου. Αναλυτικότερα, το κέντρο του κάθε σωματιδίου εντοπίζεται ξεχωριστά από το πρόγραμμα, τα σωματίδια οπτικοποιούνται και ανιχνεύονται μεμονωμένα το καθένα μέσω του σκεδασμού που ανιχνεύει η ψηφιακή κάμερα. Η κίνηση του κάθε σωματιδίου ανιχνεύεται στο κάθε καρέ του βίντεο και ο ρυθμός με τον οποίο κινείται το καθένα σχετίζεται μέσω της εξίσωσης Stokes-Einstein με την υδροδυναμική διάμετρος και έτσι υπολογίζεται η διάμετρος του κάθε σωματιδίου και η συγκέντρωση (ολική και ανά nm) (81).

Το NTA έχει τη δυνατότητα να εντοπίζει κυστίδια από 10nm, εξαρτώμενο από το τύπο των σωματιδίων και την ευαισθησία της κάμερας, μέχρι και 2000nm, ανάλογα τη κίνηση Brown των σωματιδίων και το ιξώδες του δείγματος. Οι συγκεντρώσεις που μετράει είναι από 10^6 σωματίδια/mL μέχρι 10^{10} σωματίδια/mL, όμως πρέπει να αποφεύγεται η μέτρηση στα όρια αυτά γιατί στα χαμηλότερα όρια της συγκέντρωσης επηρεάζετε αρνητικά η στατιστική ανάλυση από το πρόγραμμα NanoSight ενώ στα μέγιστα όρια δεν αναλύονται μεμονωμένα τα σωματίδια γιατί αλληλεπικαλύπτονται μεταξύ τους (79). Επιπρόσθετος, στα δείγματα μπορούν να προστεθούν σημασμένα αντισώματα ή ουσίες που φθορίζουν. Με τον τρόπο αυτό, ειδικά στα βιολογικά δείγματα, δίνεται η δυνατότητα να ανιχνευτούν κυστίδια με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά βάση ειδικών δεικτών πάνω στην επιφάνεια τους (77).

Για την ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί η κυψελίδα ροής χαμηλού όγκου (low volume top cell, LVTC) για υδατικά διαλύματα με ουδέτερο pH και μη εύφλεκτα ή η πλάκα O-ring (O-ring top plate, ORTP) για μη υδατικά, παχύρευστα ή με μεγάλα σωματίδια που μπορεί να φράξουν την LVFC σωματίδια (Εικόνα 14). Επίσης, ο χρήστης μπορεί να επιλέξει και την

μονάδα laser. Στο NTA διατίθενται τέσσερις μονάδες laser σε διαφορετικά μήκη κύματος (κόκκινο, πράσινο, μπλε, μωβ) και το χρώμα που χρησιμοποιείται πρέπει να επιλεγεί από το 'Hardware' στο πρόγραμμα NanoSight. Η μονάδα laser περιέχει θερμοηλεκτρικά στοιχεία Peltier για να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία που μπορεί να ρυθμιστεί από το πρόγραμμα του NTA και να παραμείνει σταθερή σε όλη τη διάρκεια της ροής του δείγματος. Η σύσταση των δειγμάτων πρέπει να είναι υγρή και σε μερικά δείγματα μπορεί να απαιτείται η χρήση υπερήχων ή φιλτράρισμα πριν την αναλυθούν στο NTA. Επιπλέον, τα δείγματα δεν πρέπει να είναι πολύ πυκνά και πρέπει να έχουν διαυγή σύσταση, άλλα ούτε να είναι πολύ αραιά. Ο σκοπός είναι να εμφανίζονται ανά καρέ του βίντεο 10-100 σωματίδια. Σημαντικό είναι, αφού τελειώσει το βίντεο να οριστεί το κατάλληλο όριο ανίχνευσης (Detection threshold, DT). Το DT καθορίζει τη μικρότερη φωτεινότητα των κυστιδίων που ανιχνεύονται. Όλα τα ορατά κυστίδια πρέπει να έχουν σταυρό πάνω τους, οι κόκκινοι σταυροί υποδηλώνουν την έγκυρη ανίχνευση σωματιδίων και οι μπλε την ανίχνευση κοντά στο DT, άρα δεν πρέπει να υπάρχουν πάνω από 5-8 μπλε σταυροί ανά καρέ του βίντεο (79).



Εικόνα 14. Οι κυψελίδες του NS300 πάνω στη μονάδα laser. Α) το ORTP χρησιμοποιείται για δείγματα που δεν είναι υδατικά, που είναι παχύρρευστά ή που περιέχουν μεγάλα σωματίδια ικανά να φράξουν τη LVFC. Β) η LVFC χρησιμοποιείται για την ανάλυση υδατικών, ουδέτερων και μη εφέλκων διαλυμάτων. Οι κυψελίδες βιδώνονται πάνω στην μονάδα laser και πάνω τους εφαρμόζονται τα σωληνάκια για τη χορήγηση του δείγματος και την αποβολή των αποβλήτων. Τροποποιημένη από (79).

3.2 Πορεία εργασίας

3.2.1. Υλικά και αναλώσιμα

- Water for injection (WFI)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος pH 7.4 (phosphate buffered saline, PBS) 10x
- Αιθανόλη 99%
- Eppendorf 1,5 mL
- Πιπέτες

- Ακροφύσια για πιπέτες
- Falcon 50mL
- Φίλτρα για σύριγγα 0,22μm
- Σύριγγες 1mL

3.2.2. Όργανα- συσκευές

- Vortex
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος
- NTA NS300

3.2.3. Προετοιμασία αναλώσιμων και δειγμάτων

Πριν τη μέτρηση θα πρέπει να ετοιμαστούν τα απαραίτητα αντιδραστήρια για τη μέτρηση. Τα αναλώσιμα αυτά ετοιμάζονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα και φυλάσσονται για να χρησιμοποιηθούν κατά τη μέτρηση.

- Το PBS χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων ορού και αραιώνεται με WFI ώστε από 10x να γίνει διάλυμα 1x. Εκτός από αυτό, το PBS φιλτράρετε με φίλτρο 0,22μm ώστε είναι πολύ καθαρό και να μην προκαλεί θόρυβο στη μέτρηση.
- Από την απόλυτη αιθανόλη παρασκευάζεται διάλυμα 5% αιθανόλης για τον καθαρισμό του NTA. Η συγκέντρωση της αιθανόλης δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη ώστε να μη βλάψει το υλικό της κυψελίδας. Το διάλυμα αιθανόλης 5% φτιάχνεται σε falcon τοποθετώντας 47,5mL WFI και 2,5mL αιθανόλης.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε σωληνάρια με αντιπηκτικό κιτρικό νάτριο μπλε πώματος, για την απομόνωση του πλάσματος. Τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται δύο φορές στις 3,500 στροφές για 15 λεπτά και το υπερκείμενο πλάσμα αφαιρείται προσεκτικά με την χρήση πιπέτας ώστε να μη διαταραχθεί η στιβάδα του αίματος. Το πλάσμα τοποθετείται σε μικρά σωληνάρια του 1mL και φυλάσσεται στους -80°C. Πριν την ανάλυση του πλάσματος στην συσκευή NTA, αυτό αφήνεται να ξεπαγώσει μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου.

Το δείγμα αφού ξεπαγώσει αραιώνεται ώστε να έχει κατάλληλη συγκέντρωση για το NTA. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις (από 1/100 έως 1/200) ώστε οι μετρήσεις να είναι αξιόπιστες.

3.2.4. Έναρξη της συσκευής NTA

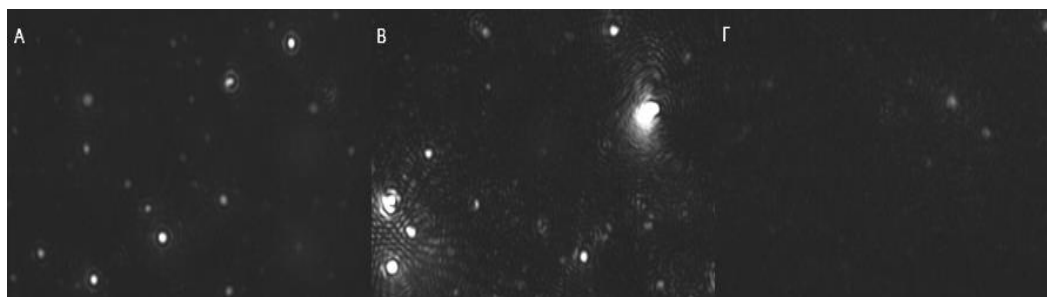
1. Αρχικά ενεργοποιείται ο ηλεκτρονικός υπολογιστής και το NANOSIGHT NS300.
2. Ανοίγεται το NanoSight NTA software.
3. Ακολουθεί η σύνδεση της μονάδας laser με την κυψελίδα. Η κυψελίδα που χρησιμοποιείται είναι η LVFC. Για τον σκοπό αυτό η κυψελίδα τοποθετείται πάνω στην μονάδα laser με τρόπο ώστε να εφάπτονται σωστά και με τέσσερεις βίδες βιδώνεται σφικτά στην μονάδα.
4. Στην συνέχεια τοποθετούνται πάνω στην κυψελίδα το σωληνάριο των αποβλήτων και το σωληνάριο για τα δείγματα.
5. Στο πρόγραμμα του NTA ενεργοποιούμε την κάμερα πατώντας το 'Start Camera' στο πλαίσιο του 'Capture'.
6. Σε μια σύριγγα του 1mL τοποθετείται WFI. Τοποθετείται η σύριγγα με το WFI στην υποδοχή του δείγματος και στη συνέχεια πιέζοντας το έμβολο το WFI περνάει από το σωληνάριο και φτάνει στην κυψελίδα και στον θάλαμο μέτρησης και εμφανίζονται στην οθόνη του υπολογιστή τα ελάχιστα σωματίδια του WFI. Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώνεται η σωστή έναρξη του NTA.
7. Στο 'Standard Measurement' στο πλαίσιο του 'SOP' καθορίζονται στο 'Number of captures' και στο 'Capture duration (s)' ο αριθμός των καταγραφών και ο χρόνος καταγραφής αντίστοιχα. Στην περίπτωση μας ο αριθμός των καταγραφών ήταν 5 και η διάρκεια κάθε καταγραφής ορίστηκε στα 30 δευτερόλεπτα. Επιπλέον, επιλέγονται τα 'Date and time file name', 'Continuous syringe pump flow', Launch report details pre-capture' και 'Target temperature'.

3.2.5. Ανάλυση δειγμάτων στην συσκευή NTA

1. Για την ανάλυση δειγμάτων αρχικά ανοίγεται η κάμερα πατώντας 'Star Camera'
2. Πατιέται στο 'SOP' το 'Create and Run Script'.
3. Στον φάκελο του πειράματος δημιουργείται φάκελος με το όνομα του δείγματος, μέσα στον φάκελο ξαναγράφεται το όνομα του δείγματος.
4. Στο 'Set Report Details' αναγράφονται το όνομα του δείγματος ('Sample Description') και η αραιώση που έχει πραγματοποιηθεί ('Dispersant/Diluent').
5. Τοποθετείται το δείγμα σε σύριγγα 1mL και απομακρύνονται οι φυσαλίδες αέρα μέσα από τη σύριγγα.
6. Εισάγεται η σύριγγα στο σωληνάκι του μηχανήματος και με το χέρι ελαφρά αντλείται το δείγμα μέχρι να αρχίσουν να φαίνονται τα σωματίδια στην κάμερα.
7. Το δείγμα τοποθετείται στην υδραυλική αντλία.
8. Στα 'Settings' επιλέγουμε το 'Ok' και το δείγμα τρέχει για μικρό χρονικό διάστημα ώστε να μην είναι αραιωμένο.
9. Όταν σταματήσει να τρέχει ρυθμίζεται το 'Camera Level' ώστε να υπάρχει ο σωστός κορεσμός, το 'Screen Gain' και το 'Focus' από τον κοχλία πλάγια στη συσκευή (Εικόνα 15). Ο σκοπός είναι τα σωματίδια να φαίνονται καθαρά, χωρίς άλω και

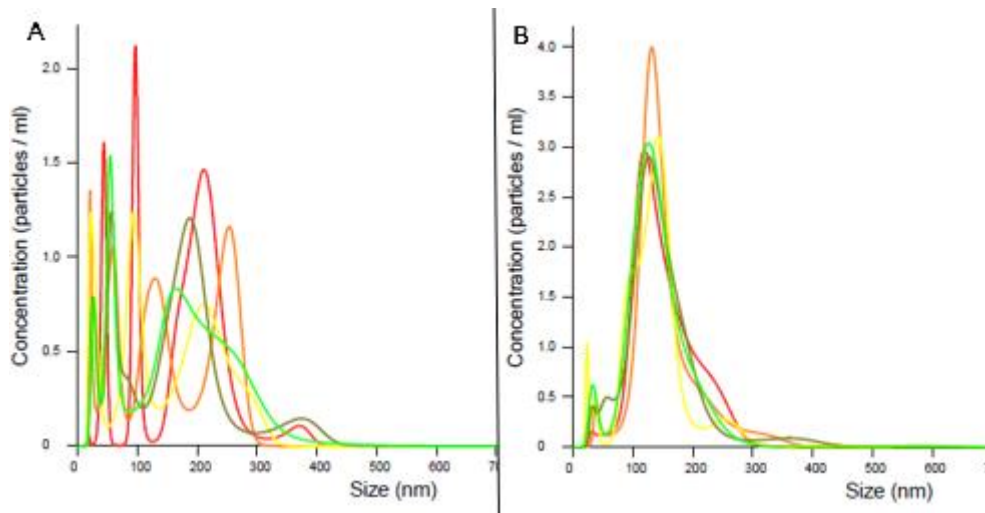
χωρίς μεγάλο κορεσμό. Η διαδικασία αυτή πρέπει να πραγματοποιηθεί πριν αρχίσει η καταγραφή των βίντεο.

10. Όταν ολοκληρωθεί η καταγραφή του βίντεο ρυθμίζονται το 'Screen Gain' (φωτεινότητα) και το 'Detection Threshold' και επιλέγεται το 'OK'.
11. Με την ολοκλήρωση της ανάλυσης από το πρόγραμμα NanoSight NTA ελέγχεται αν υπάρχει επαναληψιμότητα στις καμπύλες και επιλέγεται το 'Export Graph' (Εικόνα 16).
12. Αν η καμπύλη θέλει διόρθωση επιλέγεται το 'Process Selected Files', τροποποιούνται το 'Detection Threshold' και 'Screen Gain' και επαναλαμβάνεται η ανάλυση από το πρόγραμμα.
13. Για να συνεχίσει η ανάλυση του επόμενου δείγματος ανοίγεται η κάμερα και από μια σύριγγα, που περιέχει WFI, στην υποδοχή των δειγμάτων χορηγείται νερό μέχρι η εικόνα στην κάμερα να είναι καθαρή.



Εικόνα 15. Παραδείγματα στιγμιότυπων από βίντεο στο NTA. Για την πραγματοποίηση σωστών μετρήσεων πρέπει να υπάρχει η επιθυμητή συγκέντρωση και εστίαση. Α) Καλή εικόνα βίντεο. Υπάρχει η σωστή συγκέντρωση ώστε να μπορεί το πρόγραμμα να διεξάγει σωστά την ανάλυση και να μην υπάρχουν αλληλοεπικαλύψεις. Η εστίαση είναι καλή, παρότι υπάρχουν μερικά κυστίδια με άλω δεν είναι αρκετά έντονη ώστε να επηρεάσει τη μέτρηση. Β) Πολύ μεγάλη συγκέντρωση. Σε αυτό το οπτικό πεδίο βρίσκονται παρά πολλά κυστίδια με αποτέλεσμα να μη μπορεί να γίνει καλή εστίαση και να αλληλεπικαλύπτονται τα κυστίδια μεταξύ του. Στην περίπτωση αυτή πραγματοποιείται περαιτέρω αραιώση. Γ) Μη σωστή εστίαση. Η εστίαση δεν είναι καλή με αποτέλεσμα να μη διακρίνονται τα κυστίδια. Θα πρέπει να διορθωθεί η εστίαση και πιθανών το 'Camera Level' και 'Screen Gain'.

Οι φυσαλίδες αέρα μπορούν να μπλοκάρουν την κυψελίδα, να επηρεάσουν την ροή του δείγματος ή να μη φαίνεται καθόλου στην κάμερα το δείγμα. Όταν συμβεί φραγμός στην κυψελίδα αρχικά αντλείται WFI με το χέρι χωρίς πίεση. Αν το πρόβλημα επιμένει με προσοχή αντλείται νερό με το χέρι με λίγη πίεση. Στην περίπτωση που το οπτικό πεδίο δεν καθαρίζει πραγματοποιείται καθαρισμός την κυψελίδας. Αν οι παραπάνω διαδικασίες δεν καθαρίσουν την κυψελίδα μπορεί με προσοχή να αντληθεί μια σύριγγα με αιθανόλη 5% και αμέσως να απομακρυνθεί με πολύ WFI από την κυψελίδα.



Εικόνα 16. Καμπύλες συγκέντρωσης κυστιδίων σε σχέση με το μέγεθος τους. Α) Καμπύλη με κακή επαναληψιμότητα. Οι πέντε καμπύλες (διαφορετικά χρώματα) από την κάθε μέτρηση δεν συμπίπτουν ακριβώς η μία πάνω στην άλλη, στην αρχή της καμπύλης υπάρχει πολύ θόρυβος και μερικές καμπύλες επεκτείνονται πιο πολύ από ότι άλλες. Β) Καμπύλη με καλή επαναληψιμότητα. Όλες οι καμπύλες συμπίπτουν η μία πάνω στην άλλη, δεν υπάρχει πολύ θόρυβος στα μικρότερα η και δεν υπάρχουν καμπύλες που να επεκτείνονται πολύ. Οι καμπύλες της κάθε μέτρησης πρέπει να είναι συμπίπτουν αφού προέρχονται από την μέτρηση του ίδιου δείγματος.

3.2.6. Καθαρισμός και κλείσιμο του NTA

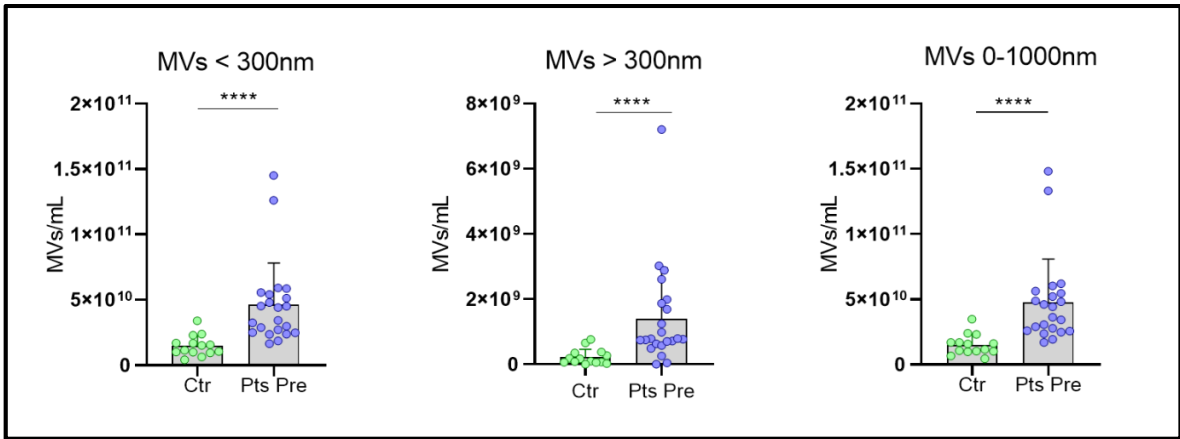
1. Το πρώτο βήμα στον καθαρισμό του NTA είναι η αφαίρεση της μονάδας laser από τη συσκευή.
2. Με μια σύριγγα χορηγείται WFI στο σωληνάριο της υποδοχής του δείγματος. Η χορήγηση αυτή πραγματοποιείται 12 με 15 φορές
3. Αποσυνδέονται οι βίδες της κυψελίδας, το σωληνάκι της υποδοχής των δειγμάτων και το σωληνάκι των αποβλήτων
4. Απομακρύνονται εναπομείναντα υγρά που μπορεί υπάρχουν πάνω στην κυψελίδα και την μονάδα laser.
5. Αν τα απόβλητα είναι γεμάτα, αδειάζονται και μέσα με μια πιπέτα Παστέρ τοποθετείται μικρή ποσότητα χλωρίνης.
6. Με μια άδεια σύριγγα αφαιρείται ο αέρα από την κυψελίδα πιέζοντας τον αέρα στις υποδοχές της, τουλάχιστον 15-20 φορές σε κάθε υποδοχή ή μέχρι να φαίνονται στεγνά τα σωληνάκια στο εσωτερικό της κυψελίδας.
7. Με τον ίδιο τρόπο στεγνώνεται και το σωληνάριο των δειγμάτων.
8. Σκουπίζεται η κυψελίδα και το γυάλινο σημείο της μονάδας laser με το διάλυμα αιθανόλης 5%.
9. Η κυψελίδα σκουπίζεται τα ειδικά πανάκια.
10. Η μονάδα laser τοποθετείται στην συσκευή, η κυψελίδα, οι βίδες και τα σωληνάκια φυλάσσονται.
11. Απενεργοποιείται το NTA και απενεργοποιείται ο ηλεκτρονικός υπολογιστής.

4. Αποτελέσματα

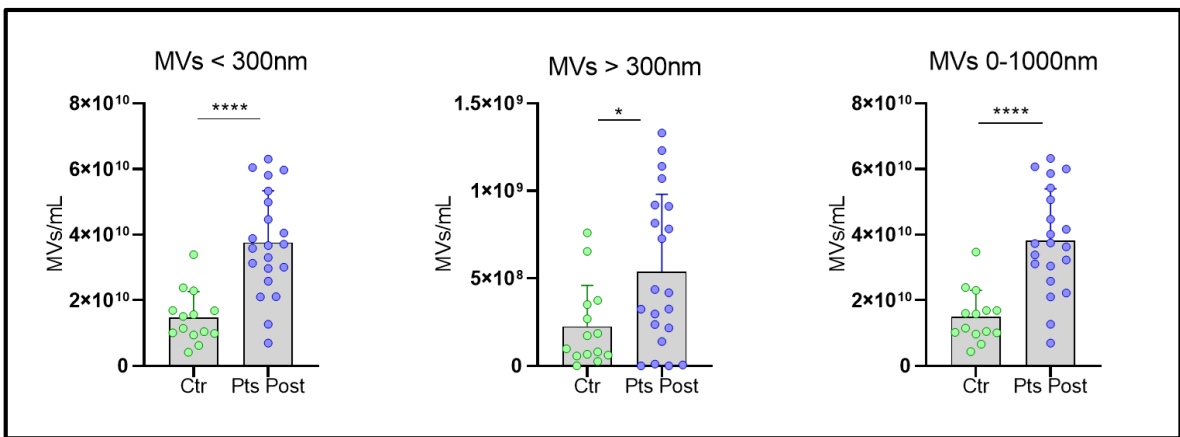
Κατά τη διεξαγωγή της έρευνας μετρήθηκαν και αναλυθήκαν τα κυστίδια του πλάσματος από ασθενείς με ΧΝΑ και από υγιείς μάρτυρες. Οι ασθενείς που συμμετείχαν ήταν 22 και συλλέχθηκαν 22 δείγματα πριν την αιμοκάθαρση και 21 μετά. Οι μάρτυρες ήταν υγιή άτομα. Η τεχνική ΝΤΑ έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει τον αριθμό των κυστιδίων ανά μέγεθος στο πλάσμα. Τα κυστίδια διαχωρίστηκαν βάσει της διαμέτρου τους σε κυστίδια μικρού μεγέθους (<300nm) και μεγάλου μεγέθους (>300nm). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων και η δημιουργία των διαγραμμάτων πραγματοποιήθηκαν στο πρόγραμμα GraphPad Prism. Ο αριθμός των MVs στους ασθενείς με ΧΝΑ βρέθηκε υψηλότερος σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες και πριν και μετά την αιμοκάθαρση (Διαγράμματα 1 και 2). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των MVs των ασθενών πριν και μετά την αιμοκάθαρση (Διάγραμμα 3). Βάση του διαχωρισμού του πραγματοποιήθηκε ο πληθυσμός των MVs <300nm σε κάθε περίπτωση υπερτερεί σε σύγκριση με τα MVs >300nm (Πίνακας 1). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη διάμετρο των MVs, η μέση τιμή της διαμέτρου των μαρτύρων βρέθηκε 152,3nm, των ασθενών πριν την αιμοκάθαρση 155,4nm και μετά την αιμοκάθαρση 149,7nm.

	M.T. [MV<300nm]	M.T. [MV>300nm]	M.T. [MV]
Μάρτυρες	1,48E+10	2,25E+08	1,50E+10
Ασθενείς με ΧΝΑ πριν την αιμοκάθαρση	4,47E+10	1,40E+09	4,76E+10
Ασθενείς με ΧΝΑ μετά την αιμοκάθαρση	3,76E+10	5,40E+08	3,82E+10

Πίνακας 1. Μέσος Τιμή (M.T.) της συγκέντρωσης των MVs <300nm, >300nm και του συνόλου των MVs στους μάρτυρες και τους ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση.

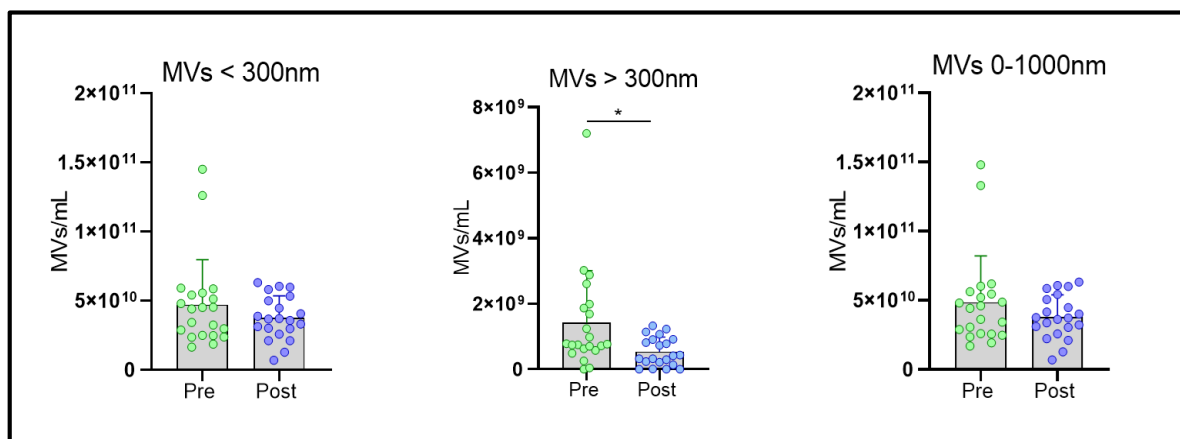


Διάγραμμα 1. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης των MVs στην ομάδα μαρτύρων (control, Ctr) και τους ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση (Patients Pre, Pts Pre). Οι αστερίσκοι συμβολίζουν τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς μεταξύ των δύο πληθυσμών. Κάθε κουκίδα συμβολίζει τη μέτρηση ενός δείγματος. Το πρώτο διάγραμμα αφορά στη συγκέντρωση των MVs μεγέθους <300nm. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων, με τους ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση να εμφανίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση MVs ($p < 0,0001$). Στο μεσαίο διάγραμμα συγκρίνεται η συγκέντρωση των MVs μεγάλου μεγέθους >300nm μεταξύ των υγιών μαρτύρων και των ασθενών πριν την αιμοκάθαρση. Ανάμεσα στις δύο ομάδες βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$) στη συγκέντρωση των MVs, με τους ασθενείς να εμφανίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση. Το τελευταίο διάγραμμα αφορά στο σύνολο των MVs στους δυο πληθυσμούς. Ομοίως, παρατηρείται ισχυρή στατιστική σημαντικότητα στη συγκέντρωση των MVs μεταξύ των μαρτύρων και των ασθενών πριν την αιμοκάθαρση ($p < 0,0001$).



Διάγραμμα 2. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης των MVs στην ομάδα μαρτύρων (control, Ctr) και τους ασθενείς μετά την αιμοκάθαρση (Patients Post, Pts Post). Οι αστερίσκοι συμβολίζουν τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς στη συγκέντρωση των MVs. Κάθε κουκίδα συμβολίζει τη μέτρηση ενός δείγματος. Το πρώτο διάγραμμα αφορά στη συγκέντρωση των MVs μεγέθους <300nm και παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων, με τους ασθενείς μετά την αιμοκάθαρση να εμφανίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση κυστιδίων ($p < 0,0001$). Στο μεσαίο διάγραμμα συγκρίνεται η συγκέντρωση των MVs μεγάλου μεγέθους >300nm μεταξύ των υγιών

μαρτύρων και των ασθενών μετά την αιμοκάθαρση. Ανάμεσα στις δύο ομάδες βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση των MVs ($p=0,0362$). Το τελευταίο διάγραμμα αφορά στο σύνολο των MVs που μετρήθηκαν και στους δυο πληθυσμούς. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά της συγκέντρωσης των MVs μεταξύ των μαρτύρων και των ασθενών μετά την αιμοκάθαρση ($p<0,0001$).



Διάγραμμα 3. Διαγραμματική απεικόνιση της συγκέντρωσης των MVs στους ασθενείς με ΧΝΑ πριν και μετά την αιμοκάθαρση. Οι αστερίσκοι συμβολίζουν τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς στη συγκέντρωση των MVs. Κάθε κουκίδα συμβολίζει τη μέτρηση ενός δείγματος. Από το πρώτο διάγραμμα αντλείται το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει διαφορά στη συγκέντρωση των MVs μεγέθους $<300\text{nm}$ στους ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση. Το μεσαίο διάγραμμα απεικονίζει την συγκέντρωση των MVs $>300\text{nm}$ πριν και μετά την αιμοκάθαρση. Βρέθηκε διαφορά ($p=0,0290$) στην συγκέντρωση των MVs με τους ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση να έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση. Το τελευταίο διάγραμμα αφορά στο σύνολο των MVs των δειγμάτων. Στο σύνολο των MVs δεν φαίνεται να υπάρχει διαφορά στην συγκέντρωση των MVs.

Επομένως, από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, φαίνεται ότι οι ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση έχουν αυξημένο αριθμό MVs ανεξαρτήτως μεγέθους ($<300\text{nm}$, $>300\text{nm}$ και στο σύνολο των MVs, Διάγραμμα 1). Μετά την αιμοκάθαρση τα μικρά MVs ($<300\text{nm}$) και το σύνολο των MVs (0-1000nm) βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα μαρτύρων ($p<0,0001$). Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και στον πληθυσμό των μεγάλων MVs $>300\text{nm}$ με μικρότερη ωστόσο στατιστική σημαντικότητα ($p<0,0362$, Διάγραμμα 2).

Από τη σύγκριση της συγκέντρωσης των MVs πριν και μετά την αιμοκάθαρση προέκυψε ότι τα MVs μεγαλύτερου μεγέθους ($>300\text{nm}$) ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση ($p=0,0290$). Τα MVs μικρότερης διαμέτρου ($<300\text{nm}$) και το σύνολο των MVs (0-1000nm) δεν παρουσίασαν διαφορά στην συγκέντρωση πριν και μετά την αιμοκάθαρση (Διάγραμμα 3).

5. Συζήτηση

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια οι οποίοι υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση και σε υγιείς άτομα. Η τιμές της συγκέντρωσης των MVs σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και σε υγιείς μάρτυρες συγκρίθηκαν μεταξύ τους με σκοπό να ερευνηθεί αν υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο αυτών πληθυσμών. Η σύγκριση της συγκέντρωσης των MVs στους ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση σκοπό είχε να μελετήσει την επιρροή που μπορεί να έχει η αιμοκάθαρση στην έκκριση των MVs και γενικότερα στις μεταβολές της συγκέντρωσης τους.

Η αυξημένη συγκέντρωση των MVs που βρέθηκε από της μετρήσεις στο πλάσμα των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες (82-84). Η αύξηση αυτή δικαιολογείται καθώς τα στοιχεία της παθογένεια της νόσου όπως το οξειδωτικό στρες, η αναιμία και η χρόνια φλεγμονή επάγουν την έκκριση MVs από τα κύτταρα (39, 58, 61). Τα MVs πιθανόν να αποτελούν χρήσιμο βιοδείκτη για την εξέλιξη της νεφρικής νόσου, αφού έχουν την δυνατότητα να επάγουν την δημιουργία θρομβώσεων και συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής (83). Τα MVs που κυκλοφορούν στο πλάσμα μπορούν να βλάψουν άμεσα τους νεφρούς μέσω των μορίων που φέρουν, επιβαρύνοντας με αυτόν τον τρόπο την εξέλιξη της νεφρικής νόσου (54).

Οι ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια έχουν αυξημένο κίνδυνο για θρομβωτικά περιστατικά και αιμορραγία (85). Η καρδιαγγειακή νόσος είναι η κυρίαρχη αιτία θανάτου των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια καθώς οδηγεί πιο συχνά τους ασθενείς σε θάνατο από ότι η εξέλιξη της νόσου σε νεφρική νόσο τελικού σταδίου. Οι ουραιμικές ενώσεις σε συνδυασμό με την αιμοκάθαρση και την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία φαίνεται να είναι η αιτία της αυξήσεως αυτής (82).

Κατά τη μέτρηση των MVs οι τιμές τους δεν βρέθηκαν ιδιαίτερα αυξημένες μετά την αιμοκάθαρση των ασθενών. Μικρές μεταβολές στην συγκέντρωση των MVs πριν και μετά την αιμοκάθαρση έδειξαν και άλλες έρευνες (84, 86). Αντίθετος, σε άλλες έρευνες βρέθηκε φανερή αύξηση των MVs μετά την αιμοκάθαρση (84, 87). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση των MVs των αιμοπεταλίων (84) και των MVs εκκρινόμενων από ερυθρά αιμοσφαίρια. Οι αυξομειώσεις της συγκέντρωσης των MVs εξαρτιούνται από το είδος της αιμοκάθαρσης. Η αιμοκάθαρση φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική στην απομάκρυνση μικρότερων κυστιδίων (53).

Παρότι στην παρούσα έρευνα δεν έγινε διαχωρισμός βάσει των κυττάρων προέλευσης των MVs αξίζει να σημειωθεί ότι στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια οι πληθυσμοί των κυστιδίων προερχόμενα από αιμοπετάλια, ερυθρά αιμοσφαίρια και ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ιδιαίτερα αυξημένοι (83). Πιο συγκεκριμένα, μετά από θρομβωτικά περιστατικά τα εξωκυτταρικά κυστίδια των αιμοπεταλίων εμφάνισαν μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης τους (86). Επιπλέον, τα MVs αυτά φαίνεται να σχετίζονται με την φλεγμονή, την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, την υπερπηκτικότητα (88) και στην νεφρική νόσο τελικού σταδίου ευθύνονται για διαταραχές της πήξης, για την προπνηκτική τους δράση και για την πρόκληση καρδιαγγειακής νόσου (33). Η συγκέντρωση των MVs αυτών είναι

αυξημένη ανεξάρτητα από τη χορήγηση αιμοκάθαρσης, υποδηλώνοντας ότι η αιμοκάθαρση δεν τα αφαιρεί από την κυκλοφορία (87). Η χορήγηση ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης αυξάνει τη συγκέντρωση των κυστιδίων εκκρινόμενων από αιμοπετάλια (86). Αξίζει να αναφερθεί ότι εξωκυττάρια κυστίδια του πλάσματος ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια όταν ενώθηκαν με υγιές πλάσμα *in vitro* προκάλεσαν τον σχηματισμό θρομβίνης (89, 90).

Τα αυξημένα MVs των αιμοπεταλίων θα έπρεπε να δικαιολογούν τα συχνά θρομβωτικά περιστατικά σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, όμως σε κάποιες έρευνες βρέθηκε ότι λόγω της χρόνιας αναιμίας και της καταπόνησης των κυττάρων από την αιμοκάθαρση τα MVs είναι λιγότερο προπηκτικά και σε ασθενής 4^{ου} σταδίου με θετικά σε φωσφατιδυλοσερίνη MVs των αιμοπεταλίων τα οποία έχουν μειωμένη προθρομβωτική δράση (82).

Τα επίπεδα των κυστιδίων των ενδοθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται και αυτά αυξημένα στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι στενά συνδεδεμένα με την καρδιαγγειακή λειτουργία στη νεφρική νόσο τελικού σταδίου (91), επηρεάζουν σημαντικά την αιμόσταση, τη φλεγμονή και την αγγειογένεση και άρα μαζί με άλλους επιβαρυντικούς παράγοντες συμβάλουν ενεργά στη θρόμβωση (92). Η ανίχνευση των ενδοθηλιακών κυστιδίων στους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση πιθανόν να αποτελεί προγνωστικό δείκτη των καρδιαγγειακών προβλημάτων και της θνητότητας που προκαλούν (93). Επομένως, η μελλοντική ταυτοποίηση των MVs θα ήταν πολύ χρήσιμη ώστε να αντληθούν περεταίρω δεδομένα τον ρόλο των MVs στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και θα μπορούσε να γίνει συσχέτιση του φαινοτύπου τους με διάφορα στοιχεία παθογένεια της ασθένειας αυτής.

Η ρύθμιση της έκκρισης των εξωκυττάρων κυστιδίων με φαρμακευτική αγωγή θα μπορούσε να αποτελεί λύση στο πρόβλημα της αιμορραγίας και των θρομβώσεων στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (94). Όμως, θα πρέπει να υπάρχει ιδιαίτερη προσοχή στην χορήγηση αυτών των φαρμάκων γιατί όπως έχει προαναφερθεί να εξωκυτταρικά κυστίδια αποτελούν βασικό εργαλείο απομάκρυνσης βλαβερών ουσιών από το κύτταρο και ρύθμισης βασικών κυτταρικών λειτουργιών (95).

Παρά τις πολυάριθμες έρευνες σχετικά με τον ρόλο που έχουν τα MVs στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια προκύπτουν πολλά ερωτήματα σχετικά με την επιρροή τους στους χρόνιους νεφροπαθείς. Γενικότερα, επικρατεί η άποψη ότι τα MVs είναι αυξημένα στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, όμως ο φαινότυπος των κυστιδίων αυτών και ο τρόπος που συμβάλουν στην παθογένεια της νόσου ανάλογα τα κύτταρο προέλευσης τους δεν είναι σαφής ακόμα. Επιπλέον, ο ρόλος που διαδραματίζει η θεραπεία της αιμοκάθαρσης στη μεταβολή της συγκέντρωσης των MVs δεν είναι πλήρως κατανοητός. Επομένως, για την απάντηση όλων αυτών των ερωτημάτων κρίνεται απαραίτητη η πραγματοποίηση περισσότερων ερευνών.

6. Συμπέρασμα

Συμπερασματικά, οι ασθενείς με ΧΝΑ εμφανίζουν μεγαλύτερο αριθμό MVs ανεξαρτήτως μεγέθους (<300, >300 και 0-1000nm) στο πλάσμα τους σε σχέση με την ομάδα μαρτύρων που μελετήθηκαν, πιθανά λόγω της ουραιμίας, της ενδοθηλιακής διαταραχής και της χρόνιας αναιμίας. Η αιμοκάθαρση δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό των μικρών MVs (<300nm) και το σύνολο των MVs (0-1000nm) στα δείγματα των ασθενών που μελετήθηκαν, ενώ παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση της συγκέντρωσης των MVs μεγαλύτερου μεγέθους (<300nm) μετά την αιμοκάθαρση. Η μέτρηση των MVs σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών και υγιών μαρτύρων θα οδηγήσει στην εξαγωγή ασφαλέστερων αποτελεσμάτων και θα αναδείξει τον πιθανό προγνωστικό και προβλεπτικό ρόλο των MVs στην ΧΝΑ.

7. Βιβλιογραφία

1. 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.
2. Ogobuiro I, Tuma F. *Physiology, Renal*. StatPearls. Treasure Island (FL)2023.
3. Hashmi MF, Benjamin O, Lappin SL. *End-Stage Renal Disease*. StatPearls. Treasure Island (FL)2023.
4. Vaidya SR, Aeddula NR. *Chronic Renal Failure*. StatPearls. Treasure Island (FL)2023.
5. Kovesdy CP. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney Int Suppl* (2011). 2022;12(1):7-11.
6. Romagnani P, Remuzzi G, Glasscock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17088.
7. Birtwistle L, Chen XM, Pollock C. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles to the Rescue of Renal Injury. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12).
8. Ammirati AL. Chronic Kidney Disease. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2020;66Suppl 1(Suppl 1):s03-s9.
9. Levey AS, Eckardt KU, 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;67(6):2089-100.
10. Vanholder R, Argiles A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, et al. Uremic toxicity: present state of the art. *Int J Artif Organs*. 2001;24(10):695-725.
11. Moradi H, Sica DA, Kalantar-Zadeh K. Cardiovascular burden associated with uremic toxins in patients with chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2013;38(2):136-48.
12. Cases A, Egocheaga MI, Tranche S, Pallares V, Ojeda R, Gorriz JL, et al. Anemia of chronic kidney disease: Protocol of study, management and referral to Nephrology. *Nefrologia (Engl Ed)*. 2018;38(1):8-12.
13. Thomas R, Kanso A, Sedor JR. Chronic kidney disease and its complications. *Prim Care*. 2008;35(2):329-44, vii.
14. 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.
15. Himmelfarb J, Ikizler TA. Hemodialysis. *N Engl J Med*. 2010;363(19):1833-45.
16. 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;35(3):488-95.
17. Locatelli F, Carfagna F, Del Vecchio L, La Milia V. Haemodialysis or haemodiafiltration: that is the question. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(11):1896-904.
18. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Hemodialysis 2018 [Available from: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/kidney-disease/kidney-failure/hemodialysis>].
19. Chen YA, Ou SM, Lin CC. Influence of Dialysis Membranes on Clinical Outcomes: From History to Innovation. *Membranes (Basel)*. 2022;12(2).
20. Zmigrodzka M, Guzera M, Miskiewicz A, Jagielski D, Winnicka A. The biology of extracellular vesicles with focus on platelet microparticles and their role in cancer development and progression. *Tumour Biol*. 2016;37(11):14391-401.
21. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*. 2007;21(3):157-71.
22. Pomatto MAC, Gai C, Bussolati B, Camussi G. Extracellular Vesicles in Renal Pathophysiology. *Front Mol Biosci*. 2017;4:37.

23. Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):581-93.
24. Yue B, Yang H, Wang J, Ru W, Wu J, Huang Y, et al. Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNAs in skeletal muscle myogenesis. *Cell Prolif.* 2020;53(7):e12857.
25. Chaput N, Thery C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol.* 2011;33(5):419-40.
26. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells.* 2019;8(7).
27. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal.* 2021;19(1):47.
28. Liu D, Kou X, Chen C, Liu S, Liu Y, Yu W, et al. Circulating apoptotic bodies maintain mesenchymal stem cell homeostasis and ameliorate osteopenia via transferring multiple cellular factors. *Cell Res.* 2018;28(9):918-33.
29. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* 2013;113(1):1-11.
30. Inal JM, Kosgodage U, Azam S, Stratton D, Antwi-Baffour S, Lange S. Blood/plasma secretome and microvesicles. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1834(11):2317-25.
31. Zhu S, Li S, Yi M, Li N, Wu K. Roles of Microvesicles in Tumor Progression and Clinical Applications. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:7071-90.
32. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda).* 2005;20:22-7.
33. Georgatzakou HT, Fortis SP, Papageorgiou EG, Antonelou MH, Kriebardis AG. Blood Cell-Derived Microvesicles in Hematological Diseases and beyond. *Biomolecules.* 2022;12(6).
34. Liu ML, Williams KJ, Werth VP. Microvesicles in Autoimmune Diseases. *Adv Clin Chem.* 2016;77:125-75.
35. Enjeti AK, Lincz LF, Seldon M. Microparticles in health and disease. *Semin Thromb Hemost.* 2008;34(7):683-91.
36. Noren Hooten N, Evans MK. Extracellular vesicles as signaling mediators in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020;318(6):C1189-C99.
37. Pollet H, Conrard L, Cloos AS, Tyteca D. Plasma Membrane Lipid Domains as Platforms for Vesicle Biogenesis and Shedding? *Biomolecules.* 2018;8(3).
38. Lux SEt. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood.* 2016;127(2):187-99.
39. Thangaraju K, Neerukonda SN, Katneni U, Buehler PW. Extracellular Vesicles from Red Blood Cells and Their Evolving Roles in Health, Coagulopathy and Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1).
40. Chiangjong W, Netsirisawan P, Hongeng S, Chutipongtanate S. Red Blood Cell Extracellular Vesicle-Based Drug Delivery: Challenges and Opportunities. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:761362.
41. Bosman GJ, Lasonder E, Groenen-Dopp YA, Willekens FL, Werre JM. The proteome of erythrocyte-derived microparticles from plasma: new clues for erythrocyte aging and vesiculation. *J Proteomics.* 2012;76 Spec No.:203-10.
42. Willekens FL, Bosch FH, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Dopp YA, Werre JM. Quantification of loss of haemoglobin components from the circulating red blood cell in vivo. *Eur J Haematol.* 1997;58(4):246-50.
43. Leal JKF, Adjubo-Hermans MJW, Bosman G. Red Blood Cell Homeostasis: Mechanisms and Effects of Microvesicle Generation in Health and Disease. *Front Physiol.* 2018;9:703.
44. Westerman M, Porter JB. Red blood cell-derived microparticles: An overview. *Blood Cells Mol Dis.* 2016;59:134-9.
45. Zwaal RF, Bevers EM, Comfurius P, Rosing J, Tilly RH, Verhallen PF. Loss of membrane phospholipid asymmetry during activation of blood platelets and sickled red cells; mechanisms and physiological significance. *Mol Cell Biochem.* 1989;91(1-2):23-31.

46. Zaldivia MTK, McFadyen JD, Lim B, Wang X, Peter K. Platelet-Derived Microvesicles in Cardiovascular Diseases. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:74.
47. Spakova T, Janockova J, Rosocha J. Characterization and Therapeutic Use of Extracellular Vesicles Derived from Platelets. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18).
48. Melki I, Tessandier N, Zufferey A, Boilard E. Platelet microvesicles in health and disease. *Platelets.* 2017;28(3):214-21.
49. Perez-Pujol S, Marker PH, Key NS. Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: studies using a new digital flow cytometer. *Cytometry A.* 2007;71(1):38-45.
50. Puhm F, Boilard E, Machlus KR. Platelet Extracellular Vesicles: Beyond the Blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(1):87-96.
51. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond).* 2013;124(7):423-41.
52. Zhang W, Zhou X, Zhang H, Yao Q, Liu Y, Dong Z. Extracellular vesicles in diagnosis and therapy of kidney diseases. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;311(5):F844-F51.
53. 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. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:227.
54. Cobbs A, Chen X, Zhang Y, George J, Huang MB, Bond V, et al. Saturated fatty acid stimulates production of extracellular vesicles by renal tubular epithelial cells. *Mol Cell Biochem.* 2019;458(1-2):113-24.
55. Zhou X, Zhang W, Yao Q, Zhang H, Dong G, Zhang M, et al. Exosome production and its regulation of EGFR during wound healing in renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;312(6):F963-F70.
56. Al-Nedawi K, Haas-Neill S, Gangji A, Ribic CM, Kapoor A, Margetts P. Circulating microvesicle protein is associated with renal transplant outcome. *Transpl Immunol.* 2019;55:101210.
57. Yu M, Xie R, Zhang Y, Liang H, Hou L, Yu C, et al. Phosphatidylserine on microparticles and associated cells contributes to the hypercoagulable state in diabetic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2018;33(12):2115-27.
58. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(11):3381-8.
59. Yang W, Zou B, Hou Y, Yan W, Chen T, Qu S. Extracellular vesicles in vascular calcification. *Clin Chim Acta.* 2019;499:118-22.
60. Behrens F, Holle J, Kuebler WM, Simmons S. Extracellular vesicles as regulators of kidney function and disease. *Intensive Care Med Exp.* 2020;8(Suppl 1):22.
61. Aparicio-Trejo OE, Aranda-Rivera AK, Osorio-Alonso H, Martinez-Klimova E, Sanchez-Lozada LG, Pedraza-Chaverri J, et al. Extracellular Vesicles in Redox Signaling and Metabolic Regulation in Chronic Kidney Disease. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(2).
62. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth.* 2014;58(5):515-23.
63. Ogedegbe HO. An Overview of Hemostasis. *Laboratory Medicine.* 2002;33(12):948-53.
64. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998;91(10):3527-61.
65. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost.* 2002;88(2):186-93.
66. Chang JC. Hemostasis based on a novel 'two-path unifying theory' and classification of hemostatic disorders. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2018;29(7):573-84.
67. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2009;19(1):3-10.
68. Loof TG, Deicke C, Medina E. The role of coagulation/fibrinolysis during *Streptococcus pyogenes* infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:128.

69. Owens AP, 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res.* 2011;108(10):1284-97.
70. Suades R, Padro T, Vilahur G, Badimon L. Circulating and platelet-derived microparticles in human blood enhance thrombosis on atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost.* 2012;108(6):1208-19.
71. Koshiar RL, Somajo S, Norstrom E, Dahlback B. Erythrocyte-derived microparticles supporting activated protein C-mediated regulation of blood coagulation. *PLoS One.* 2014;9(8):e104200.
72. 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;79(5):552-9.
73. Kaw D, Malhotra D. Platelet dysfunction and end-stage renal disease. *Semin Dial.* 2006;19(4):317-22.
74. Boccardo P, Remuzzi G, Galbusera M. Platelet dysfunction in renal failure. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30(5):579-89.
75. 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;11(9).
76. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJ, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine.* 2011;7(6):780-8.
77. Sharma V, Nikolajeff F, Kumar S. Employing nanoparticle tracking analysis of salivary neuronal exosomes for early detection of neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener.* 2023;12(1):7.
78. Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6).
79. Malvern-Instruments. Manual: Nano-Sight NS300 user manual - MAN0541. 2017.
80. Rozo AJ, Cox MH, Devitt A, Rothnie AJ, Goddard AD. Biophysical analysis of lipidic nanoparticles. *Methods.* 2020;180:45-55.
81. Masri H, Raynes JK. Nanoparticle Tracking Analysis of beta-Casein Nanocarriers. *Methods Mol Biol.* 2020;2073:301-9.
82. Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Frerichs FC, Spronk HM, ten Cate H, de Fijter CW, et al. Chronic renal failure is accompanied by endothelial activation and a large increase in microparticle numbers with reduced procoagulant capacity. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(4):1446-53.
83. Karpman D, Stahl AL, Arvidsson I. Extracellular vesicles in renal disease. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(9):545-62.
84. Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost.* 2006;4(3):566-73.
85. Manzano-Fernandez S, Marin F, Pastor-Perez FJ, Caro C, Cambronero F, Lacunza J, et al. Impact of chronic kidney disease on major bleeding complications and mortality in patients with indication for oral anticoagulation undergoing coronary stenting. *Chest.* 2009;135(4):983-90.
86. 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;62(5):1757-63.
87. Daniel L, Fakhouri F, Joly D, Mouthon L, Nusbaum P, Grunfeld JP, et al. Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int.* 2006;69(8):1416-23.
88. Almquist T, Mobarrez F, Jacobson SH, Wallen H, Hjemdahl P. Effects of lipid-lowering treatment on circulating microparticles in patients with diabetes mellitus and chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(6):944-52.

89. 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.
90. Mortberg J, Lundwall K, Mobarrez F, Wallen H, Jacobson SH, Spaak J. Increased concentrations of platelet- and endothelial-derived microparticles in patients with myocardial infarction and reduced renal function- a descriptive study. *BMC Nephrol*. 2019;20(1):71.
91. Amabile N, Guerin AP, Tedgui A, Boulanger CM, London GM. Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(5):1873-80.
92. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension*. 2006;48(2):180-6.
93. Merino A, Portoles J, Selgas R, Ojeda R, Buendia P, Ocana J, et al. Effect of different dialysis modalities on microinflammatory status and endothelial damage. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(2):227-34.
94. 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;26(12):2594-604.
95. Stahl AL, Johansson K, Mossberg M, Kahn R, Karpman D. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatr Nephrol*. 2019;34(1):11-30.