



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

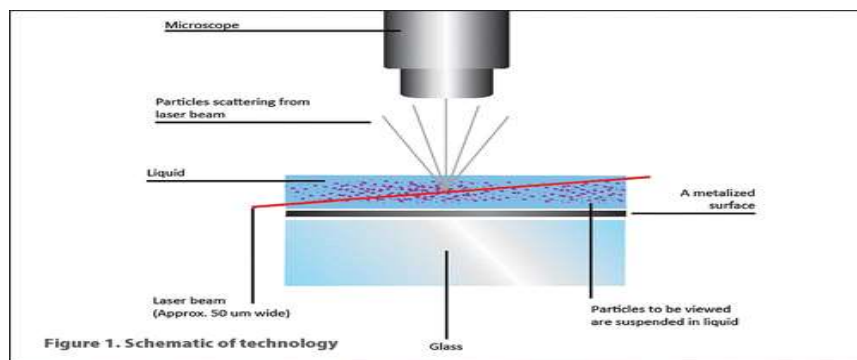


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Κυστιδιοποίηση κυττάρων αίματος στη χρόνια φλεγμονή

POST GRADUATE THESIS

Encapsulation of blood cells in chronic inflammation



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENTS

Ειρήνη Νικολαΐδου

Eirini Nikolaidou

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Ευθυμία Παύλου

Efthimia Pavlou

ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ 2024



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



POST GRADUATE THESIS
Encapsulation of blood cells in chronic inflammation

NAME OF STUDENT

EIRINI NIKOLAIDOU

21021

FIRST SUPERVISOR

EFTHIMIA PAVLOU

SECOND SUPERVISOR

ANASTASIOS KRIEMPARDIS

AIGALEO 2024

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 10/2/2024

Όνόματα εξεταστών

Υπογραφή

1^{ος} Εξεταστής Ευθυμία Παύλου

2^{ος} Εξεταστής Αναστάσιος
Κριεμπάρδης

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη **Ειρήνη Νικολαΐδου** του **Ιωάννη**, με αριθμό μητρώου **21021** φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

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

Η Δηλούσα

Ειρήνη Νικολαΐδου



Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν ώστε να βγάλω εις πέρας τη παρούσα διπλωματική εργασία και να ολοκληρώσω την φοίτηση μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής και του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών με τίτλο «ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές όλου του τμήματος καθώς οι γνώσεις που μου παρείχαν μέσα από τις διαλέξεις τους ήταν σημαντικές για την ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ακαδημαϊκή Υπότροφο κα. Παύλου Ευθυμία, επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας μου κα. Παύλου Ευθυμία, για την καθοδήγηση της σε όλα τα στάδια της εκπόνησης τη εργασίας, την υποστήριξη τις επικοινωνητικές παρατηρήσεις της.

Αφιερώσεις

Θα ήθελα να αφιερώσω τη παρούσα διπλωματική στην οικογένεια μου και στους φίλους μου, που μου συμπαράσθηκαν καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της.

Περίληψη

Εισαγωγή: Τα μικροκυστίδια (EVs) αποτελούν ένα νέο ερευνητικό κλάδο στο χώρο της ιατρικής. Τα EVs αποκολλώνται από τα κύτταρα, περιέχοντας σημαντικές πληροφορίες για αυτά. Ακόμα φέρουν στην επιφάνια τους μόρια όπως οι προπηκτικοί φωσφολιπιδικοί παράγοντες (PPL), που έχουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της πήξης και για την ομαλή λειτουργία του πηκτικού μηχανισμού. Τα EVs και τα βιομόρια που έχουν, θεωρούνται βιοδείκτες καθώς είναι σημαντικοί για τη διάγνωση, τη πρόγνωση και τη θεραπεία νόσων.

Σκοπός: Ο έλεγχος της μεταβολής του δείκτη PPL σε ασθενείς με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια (ΧΝΑ), η επιρροή της ηλικίας καθώς και αν υπάρχει μεταβολή του δείκτη προ και μετά τη θεραπεία της αιμοκάθαρσης.

Μέθοδος: Η μέτρηση του δείκτη PPL σε αίμα ασθενών και υγιών ατόμων έγινε αυτόματα μέσω της μεθόδου STA Procoag-PPL. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά με το πρόγραμμα SPSS v28 (28.0.1) και το πρόγραμμα excel.

Αποτελέσματα: Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ασθενείς με ΧΝΑ είχαν μικρότερο χρόνο PPL σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων. Συγκεκριμένα η ομάδα των ασθενών έδωσε αποτελέσματα 12sec χαμηλότερα, με το μέσο όρο του PPL των μαρτύρων των οποίων τα αποτελέσματα κυμαίνονταν κατά μέσο όρο στα 68,5sec. Τα αποτελέσματα των ασθενών δεν μεταβλήθηκαν μετά τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης.

Συμπεράσματα: Οι ασθενείς με ΧΝΑ είχαν χαμηλότερους χρόνους PPL, το οποίο αποτελεί ένδειξη προβλημάτων στη πήξη, τα οποία όντως αντιμετωπίζουν. Το παραπάνω δείχνουν ότι τα PPL έχουν θρομβογόνο δράση, η οποία αυξάνεται σε παθολογικές καταστάσεις. Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης δεν επηρεάζει τους χρόνους του PPL, καθώς δεν υπήρξαν μεγάλες διαφορές στους χρόνους του βιοδείκτη πριν και μετά τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης.

Λέξεις κλειδιά: Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια, Μικροκυστίδια, PPL, Πήξη Αίματος, Βιοδείκτες

Abstract

Introduction: Vesicles (EVs) are a new branch of research in the field of medicine. EVs are detached from cells, containing important information about them. They also bring to the surface molecules such as procoagulant phospholipid factors (PPL), which have an important role in the coagulation process and for the smooth functioning of the coagulation mechanism. EVs and the biomolecules they contain are considered biomarkers as they are important for the diagnosis, prognosis and treatment of diseases.

Purpose: The control of the change of the PPL index in patients with Chronic Renal Failure (CRF), the influence of age as well as whether there is a change of the index before and after the dialysis treatment.

Method: The measurement of the PPL index in the blood of patients and healthy individuals was done automatically using the STA Procoag-PPL method. Then the results were statistically analyzed with the SPSS v28 (28.0.1) program and the excel program.

Results: The results showed that patients with CRF had a shorter PPL time compared to the control group. In particular the patient group gave results 12sec lower, with the average PPL of the controls whose results averaged 68.5sec. Patient outcomes were unchanged after the dialysis procedure.

Discussion: Patients with CRF had lower PPL times, which is an indication of coagulation problems, which they do have. The above shows that PPLs have a thrombogenic effect, which increases in pathological conditions. The dialysis procedure does not affect the PPL times, as there were no major differences in the biomarker times before and after the dialysis procedure.

Key words: Chronic Renal Failure, Microvesicles, PPL, Blood Coagulation, Biomarkers

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	13
1.1. Μικροκυστίδια	13
1.1.2. Δημιουργία	15
1.1.3. Κατηγορίες	16
1.1.4. Ρόλος	17
1.1.5. Μέθοδοι μέτρησης και ανάλυσης	18
1.2. Νεφροπάθειες	19
1.2.1. Λειτουργία νεφρών	20
1.2.2. Νεφρικές νόσοι	20
1.2.3. Θεραπεία	25
1.3. Αιμόσταση	27
1.3.1. Πρωτογενής Αιμόσταση	27
1.3.2. Δευτερογενής αιμόσταση	29
1.3.3. Ινωδόλυση	30
1.4. Procoagulant Phospholipid (PPL)	31
Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι	32
2.1. Μεθοδολογία	32
2.2. Επιλογή ασθενών	33
2.3. Υλικά	33
2.4. Διαδικασία	33
2.5. Περιορισμοί	34
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα	35
3.1. Αποτελέσματα ομάδας Control	35
3.2. Αποτελέσματα ομάδας ασθενών	37
3.3. Σύγκριση αποτελεσμάτων	41
Κεφάλαιο 4: Συζήτηση	44
Συμπέρασμα	48
Αναφορές	50

Συντομογραφίες

Συντομογραφία	Αγγλική Ορολογία	Ελληνική Ορολογία
PPL	Coagulant Phospholipid	Προπηκτικοί φωσφολιπιδικοί παράγοντες
PS	Phosphatidylserine	Φωσφατιδυλοσερίνη
MVs	Microvesicles	Μικροκυστίδια
XNA	Chronic kidney failure	Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια
RBCs	Red Blood Cells	Ερυθροκύτταρα
PLTs	Platelets	Αιμοπετάλια
WBCs	White Blood Cells	Λευκά αιμοσφαίρια
ΔΕΚ	Reticulocytes	Δικτυοερυθροκύτταρα
EVs	Extracellular Vesicles	Εξωκυστίδια
PE	Phosphatidylethanolamine	Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη
SM	Sphingomyelin	Σφιγγομυελίνη
PC	Phosphatidylcholine	Φωσφατιδυλοχολίνη
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis	Ανάλυση Παρακολούθησης Νανοσωματιδίων
EPO	Erythropoietin	Ερυθροποιητίνη
TKE	Red sedimentation rate	Ταχύτητα καθίζησης ερυθρών
ΣΕΛ	Systemic Lupus Erythematosus	Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
ESRD	End-stage renal disease	Νεφρική νόσος τελικού σταδίου
ΑΝΣ	Autonomic nervous system	Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα
eGFR	Glomerular filtration rate	Ρυθμός σπειραματικής διήθησης
vWF	Von Willebrand	Von Willebrand
GPIb	Glycoprotein Ib	Γλυκοπρωτεΐνης Ib
KMMB	Kininogen	Κινογόνο
tPA	Tissue Polypeptide Antigen	Ιστικός ενεργοποιητής
uPA	Urokinase activator	Ενεργοποιητής ουροκινάσης
FDP	Fibrinogen Degradation Products	Προϊόντα λύσης του ινωδογόνου

Πρόλογος

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε έρευνα σε νεφροπαθείς ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση σχετικά με τη θρομβογόνο δράση του coagulant phospholipid (PPL). Αναλύθηκαν δείγματα αίματος από 22 ασθενείς, των οποίων η λήψη έγινε πριν και μετά τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης. Τα αποτελέσματα των δειγμάτων των ασθενών συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα της ομάδας control, η οποία αποτελούνταν από 16 ενήλικες, οι οποίοι είχαν μέση ηλικία τα 44 έτη, δεν αντιμετώπιζαν κάποιο φλεγμονώδες νόσημα ή έκαναν λήψη φαρμάκων την περίοδο που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Όλα τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε φιαλίδια με κιτρικό νάτριο και αναλύθηκαν με τη μεθοδολογία STA-Procoag-PPL (Diagnostica Stago, Asnieres, France).

Η δημιουργία των προπηκτικών φωσφολιπιδικών παραγόντων (PPL), εξαρτάται άμεσα από τη φωσφατιδυλοσερίνη (PS), που βρίσκεται στο εξωτερικό της διπλοστοιβάδας της κυτταρικής μεμβράνης. Η αλληλεπίδραση της φωσφατιδυλοσερίνης με τα λιπίδια της μεμβράνης σε συνδυασμό με το ερέθισμα που ευθύνεται για αυτήν την αλληλεπίδραση (απόπτωση κυττάρου, αποκόλληση), οδηγεί στη δημιουργία μικροκυστιδίων (MVs), τα οποία αφήνονται ελεύθερα στη κυκλοφορία και είναι ικανά να προάγουν τον σχηματισμό και τη δραστηριότητα συμπλεγμάτων ενζύμων πήξης, έχοντας μέγεθος 0,1 - 1 μm. Τα μικροκυστίδια αυτά έχουν γενετικές πληροφορίες και μεταφέρουν βιοδραστικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι ικανοί να εμπλακούν με άμεσο τρόπο στη δημιουργία φλεγμονών, θρομβώσεων καθώς και στην αγγειογένεση. Η σημαντικότητα του ρόλου τους κάνει επιτακτική ανάγκη την αύξηση των ερευνών που σχετίζονται με αυτά.

Τα αποτελέσματα της έρευνας συγκρίθηκαν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία και τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί και αναλυθεί σε παλαιότερες έρευνες. Η βιβλιογραφία που χρησιμοποιήθηκε, αντλήθηκε από επιστημονικά εγκεκριμένες πλατφόρμες, όπως είναι το PubMed, το Scopus και το Research Gate. Οι λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση της βιβλιογραφίας στις παραπάνω πλατφόρμες είναι οι εξής: Μικροκυστίδια (MVs), Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια (ΧΝΑ), Coagulant Phospholipid (PPL), Αιμόσταση, Καταρράκτης πήξης.

Στο βιβλιογραφικό μέρος θα αναλυθεί η δημιουργία και ρόλος των μικροκυστίδων και συγκεκριμένα ο ρόλος τους στη ανάπτυξη διαφόρων κλινικών καταστάσεων (καρκίνοι, καρδιαγγειακές παθήσεις, λοιμώδεις ή φλεγμονώδεις νόσοι), την εξέλιξη τους και την ανταπόκριση τους στη θεραπεία. Επιπλέον, θα γίνει λόγος για την παθοφυσιολογία των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, της θεραπείας που ακολουθείτε σε κάθε μια από αυτές και την επίδρασή τους στην υγεία των ασθενών. Τέλος, θα γίνει παρουσίαση του συστήματος της πήξης, στο οποίο επιδρά η PPL.

Συνοψίζοντας, στόχος της έρευνας που θα πραγματοποιηθεί είναι να βρεθεί η διαφορά της δράσης του θρομβογόνου παράγοντα PPL στους νεφροπαθείς ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και κατά πόσο επηρεάζεται η δράση τους από την διαδικασία της αιμοκάθαρσης.

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1. Μικροκυστίδια

Η πρόοδος της τεχνολογίας και συγκεκριμένα της νανοτεχνολογίας και της νανοεπιστήμης έχουν συμβάλλει στην επέκταση της έρευνας σε σωματίδια πολύ μικρού μεγέθους. Στις βιολογικές επιστήμες, η εξέλιξη αυτή βοήθησε ώστε να μπορέσει να διερευνηθεί σε βάθος η ποικιλομορφία των κυττάρων, καθώς και στοιχεία του πυρήνα. Ακόμη, οδήγησε στην εκ βάθους μελέτη των μεμονωμένων βιομορίων – νάνο/μικρο κυστιδίων, που βρίσκονται στη κυκλοφορία του αίματος και αποτελούν μέρος των κυττάρων του. Η επιστημονική ομάδα, πρόσθεσε το πρόθεμα «νάνο», που προέρχεται από την ελληνική γλώσσα και σημαίνει πολύ μικρός, στη λέξη μικροκυστίδια για να μπορέσει να τα κατηγοριοποιήσει, λόγω του μεγέθους τους (Bayda, Adeel, Tiziano, Cordani, & Rizzolio, 2020).

Τα κύτταρα του αίματος έχουν τη δυνατότητα να δημιουργούν νανοκυστίδια (nanoparticles) μεγέθους 0,2 – 200 μm, τα οποία απελευθερώνουν στη κυκλοφορία του αίματος και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επικοινωνία των κυττάρων και τη λειτουργία ολόκληρου του οργανισμού. Μέχρι στιγμής οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στα μικροκυστίδια που δημιουργούνται από τα ερυθροκύτταρα (RBCs) και τα αιμοπετάλια (PLTs) (Laura & Wang, 2019). Τα μικροκυστίδια αποτελούν τα μικρότερα μόρια που ανευρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος και είναι σημαντικά για τη διακυτταρική επικοινωνία καθώς και για την έκβαση ασθενειών και θεραπειών. Η συμμετοχή τους θεωρείται ιδιάζουσα σημαντική, για αυτό και τα τελευταία χρόνια αυξάνεται συνεχώς ο αριθμός των σχετιζόμενων μελετών (Westerman & Porter, 2016).

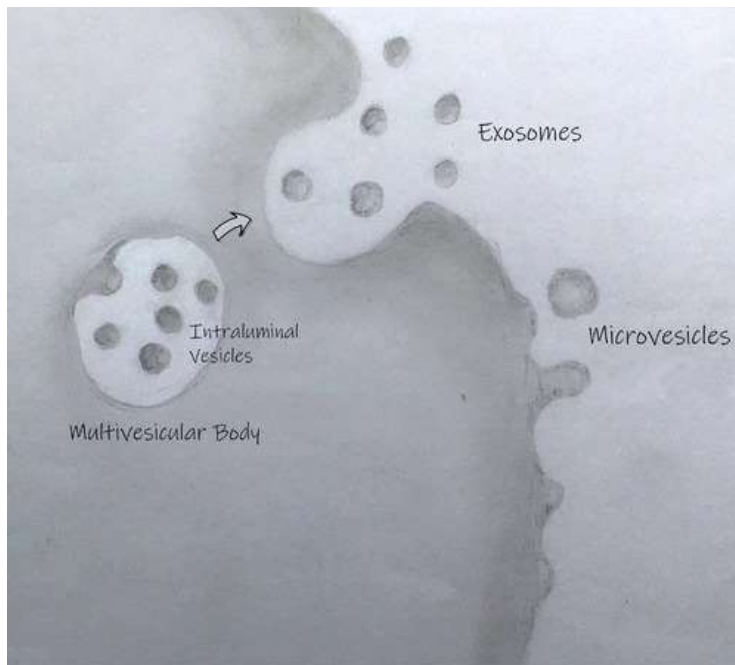
Για πολλά χρόνια αναφέρονταν ως κυτταρικά υπολείμματα και οι ερευνητές δεν τους έδιναν την πρέπουσα σημασία, καθώς τα θεωρούσαν «κυτταρικά υπόλοιπα – σκουπίδι». Με το πέρασμα των χρόνων οι ερευνητές τα θεωρούσαν δείγματα ενεργοποίησης των κυττάρων ή κυτταρικού θανάτου (Auger, και συν., 2022).

1.1.1. Ιστορική Αναδρομή

Ο Chargaff το 1936 είχε ξεκινήσει μια σειρά ερευνών σχετικά με τη πήξη του αίματος, κατά τη διάρκεια των οποίων έκανε μια σημαντική ανακάλυψη, η οποία σήμερα

θεωρείται ως η αρχή της έρευνας των μικροκυστιδίων. Συγκεκριμένα, σε ένα άρθρο του ανέφερε ότι «την προσθήκη του ιζήματος υψηλής ταχύτητας στο υπερκείμενο πλάσμα προκάλεσε μια πολύ σημαντική μείωση του χρόνου πήξης» (Chargaff, 1945).

Ο Wolf το 1967 έκανε αναφορά για την παρουσία των μικροκυστιδίων στο αίμα, τα οποία παρατήρησε σε φυγοκεντρημένο και ανέφερε ως «υλικό σε μικροσκοπική σωματιδιακή μορφή, ιζηματοποιήσιμο με φυγοκέντρηση υψηλής ταχύτητας και προερχόμενο από αιμοπετάλια, αλλά διακριτό από άθικτα αιμοπετάλια.». Μάλιστα στην έρευνα του ανέφερε ότι ο αριθμός των κυτταρικών υπολειμμάτων ήταν ανάλογος με τον συνολικό αριθμό των PLTs στη κυκλοφορία του αίματος (Wolf, 1967). Ο Crawford το 1971 ήταν αυτός που τα ανέφερε για πρώτη φορά ως μικροσωματίδια και μάλιστα ήταν αυτός που ανέφερε ότι αποτελούνταν κατά κύριο λόγο από λιπίδια και μετέφεραν γενετικό φορτίο (Crawford, 1971). Σε μια ακόμη μελέτη το 1974 έγινε λόγος πως η προέλευση και απελευθέρωση των μικροκυστιδίων προέρχεται από τη πλασματική μεμβράνη των κυττάρων (Nunez, Wallis, & Gershon, 1974).



Εικόνα 1: Απελευθέρωση εξωσωμάτων από πολυκιστιδιακό σωματίδιο (Couch, και συν., 2021)

Στην δεκαετία του '80 υπήρξε μια έρευνα σταθμός στην ιστορία των κυστιδίων, που έγινε από δυο ομάδες και είχε ως κέντρο την ωρίμανση των

δικτυοερυθροκυττάρων (ΔΕΚ). Στην έρευνα της ομάδας του Stahl διερευνήθηκε η μεταβολή των μεμβρανών κατά τη διαδικασία ωρίμανσης τους και στο εργαστήριο του Johnstone μελετήθηκε η βιοχημεία της πλασματικής μεμβράνης. Η έρευνα τους οδήγησε στο συμπέρασμα πως κατά την ωρίμανση των ΔΕΚ ο υποδοχέας της τρανσφερίνης χάθηκε μέσω της απελευθέρωσης κυστιδίων (Johnstone, Adam, Hammond, Orr, & Turbide, 1987). Μέχρι τα τέλη του αιώνα υπήρξαν μελέτες που διερεύνησαν την ικανότητα των κυστιδίων αυτών. Συγκεκριμένα, το 1996 ο Raposo, ανακάλυψε ότι τα μικροκυστίδια που προέρχονται από ανοσοκύτταρα είναι ικανά να παρουσιάζουν αντιγόνο (Raposo, et al., 1996) ενώ το 1998 άλλη μελέτη ανέφερε τη δυνατότητα να αξιοποιηθούν ως αντικαρκινικά εμβόλια (Zitvogel, και συν., 1998).

Οι παραπάνω έρευνες έδειξαν ότι τα EVs έχουν λειτουργικούς ρόλους σε βιολογικές διεργασίες, επομένως έχουν φυσιολογικούς ρόλους στον οργανισμό άρα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες σε θεραπευτικές εφαρμογές. Αυτά οδήγησαν στην έκρηξη του ενδιαφέροντος για τα EVs στις αρχές του 21ου αιώνα, όπου και έγινε ραγδαία αύξηση των ερευνών, οι οποίες συνεχίζονται να αυξάνονται διαρκώς σήμερα (Couch, και συν., 2021).

1.1.2. Δημιουργία

Η δημιουργία των μικροκυστιδίων πραγματοποιείται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων από όπου και απελευθερώνονται. Ο ρόλος της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) και της φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) που βρίσκονται στο εσωτερικό της μεμβράνης και η αλληλεπίδραση τους με τα λιπίδια που βρίσκονται στο εξωτερικό μέρος και συγκεκριμένα με τη σφιγγομυελίνη (SM) και τη φωσφατιδυλοχολίνη (PC), είναι κομβικός για την δημιουργία των MPs (Zhang, et al., 2018). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο παίζουν και τα επίπεδα του ενδοκυττάρου ασβέστιου. Η απελευθέρωση τους οδηγεί σε αλλαγές της αρχιτεκτονικής της κυτταρικής μεμβράνης του κυττάρου καθώς και της βιοσύνθεσης της (Couzin, 2005).

Όσο αναφορά τον κυτταρικό σκελετό, υπάρχουν τρεις πρωτεΐνες σε αυτόν, που παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την εξωτερίκευση των EVs στη κυκλοφορία του αίματος. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι η ακτίνη, η κασπάση – 3 και η μυοσίνη. Η κασπάση – 3 ενεργοποιείται μέσω των Rh Κινασών 1 και 2 και με τη σειρά της προκαλεί συστολή στο σύμπλοκο των πρωτεϊνών που δημιουργείται μεταξύ της κασπάσης και

της μυοσίνης. Η εμπλοκή των Rh κινασών, κάνει φανερό πως τα μικροκυστίδια περιέχουν γενετικό υλικό από το κύτταρο προέλευσης τους. Το κύτταρο προέλευσης των κυστιδίων είναι αυτό που καθορίζει και την σύνθεση τους ως προς τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια (Willms, et al., 2016).

Παρόλα αυτά, οι μέχρι τώρα έρευνες έχουν δείξει ότι τα μικροκυστίδια που απελευθερώνονται από αποπτωτικά κύτταρα έχουν διαφορετική σύνθεση ως προς τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Αυτός είναι και ο λόγος που ο ρόλος τους θεωρείται διαφορετικός από τα υπόλοιπα EVs που απελευθερώνονται από άλλα κύτταρα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα της απελευθέρωσης των MVs από τα αιμοπετάλια (PLTs) είναι η απελευθέρωση των μικροκυστιδίων του κολλαγόνου, της θρομβίνης, του συμπλέγματος του συμπληρώματος C5b-9 και του ασβεστίου (Leroyer, Tedgui, & Boulanger, 2008).

1.1.3. Κατηγορίες

Τα μικροκυστίδια χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, σύμφωνα με το μέγεθος τους που προκύπτει αναλόγως με τον τρόπο βιογένεσής τους:

1. Τα αποπτωτικά σωματίδια μεγέθους 500nm – 3μm, τα οποία απελευθερώνονται από τα αποπτωτικά κύτταρα.
2. Τα μικροκυστίδια (MVs) μεγέθους 100nm – 1μm, τα οποία απελευθερώνονται από την κυτταρική μεμβράνη.
3. Τα νανοκυστίδια ή εξωσώματα μεγέθους 30nm – 100nm, τα οποία απελευθερώνονται μέσω της φυσαλίδωσης τμημάτων της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτά θεωρούνται ως βασικά υπεύθυνα για τη μεταφορά των ενδοκυτταρικών μορίων στον οργανισμό, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα (Dragovic, και συν., 2011).

Παρόλα αυτά, υπάρχει μεγάλη ετερογένεια μεταξύ τους και ως προς το μέγεθος και ως προς το περιεχόμενο. Αυτός είναι και ο λόγος που υπάρχει δυσκολία στο να δημιουργηθούν υποομάδες των βασικών κατηγοριών και κατηγοριοποίηση τους σύμφωνα με τα πιο ειδικά χαρακτηριστικά τους (Witwer & Théry, 2019).

Ένας άλλος τρόπος κατηγοριοποίησης των κυστιδίων αφορά τη προέλευσή τους, και είναι ο εξής:

1. Μικροκυστίδια ερυθροκυττάρων

2. Μικροκυστίδια αιμοπεταλίων
3. Μικροκυστίδια ενδοθηλιακών κυττάρων
4. Μικροκυστίδια νεοπλασματικών κυττάρων (Bachurski, και συν., 2019).

1.1.4. Ρόλος

Τα μικροκυστίδια δεν απελευθερώνονται μόνο από καρκινικά κύτταρα του οργανισμού αλλά και από υγιή κύτταρα, με τον στόχο και στις δύο περιπτώσεις να είναι ο ίδιος, η διακυτταρική επικοινωνία. Συγκεκριμένα, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταναστεύουν σε άλλα κύτταρα και είτε λειτουργούν σε αυτά ως μεταφορείς πληροφοριών μέσω των πρωτεϊνών, των κυτοκινών, των microRNA (miRNAs) και του RNA που περιέχονται σε αυτά είτε ως σημαντήρες προσελκύοντας και προσαρτώντας πρωτεΐνες ή μόρια σε αυτά (Clemmens & Lambert, 2018). Οι πληροφορίες που μεταφέρουν τα μικροκυστίδια είναι ανάλογες με τις πληροφορίες που είχε το κύτταρο - δότης από το οποίο προέρχονται. Ακόμη, έρευνες έχουν δείξει πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην δημιουργία και στην ανάπτυξη όγκου, καθώς οι πληροφορίες που μεταφέρουν είναι ικανές να ρυθμίσουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και να συμβάλλουν άμεσα στην αγγειογένεση και τη μετάσταση του (Auger, και συν., 2022).

Ωστόσο σήμερα, τα μικροκυστίδια ερευνώνται κατά κύριο λόγο ως βιοδείκτες για πληθώρα ασθενειών όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, φλεγμονώδεις νόσους και κακοήθειες (Dragonic, και συν., 2011) καθώς και την χρήση τους ως βιοδείκτες ελέγχου της βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων (Masri & Raynes, 2019). Ακόμη, έχουν ανασκοπαστατικό και αντιφλεγμονώδη ρόλο σε πολλές νευρολογικές παθήσεις μέσω της ενεργοποίησης των μικρογλίων (Xiong, Zhao, Wan, Hu, & Li, 2023). Σύμφωνα με τις τελευταίες εξελίξεις της νανοτεχνολογίας, προκύπτει ότι στον βιοϊατρικό τομέα τα νανοσωματίδια θα είναι σε θέση στο μέλλον να παίξουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου, καθώς μπορούν να υπερβούν τους περιορισμούς που προκύπτουν από τις παραδοσιακές προσεγγίσεις της χημειοθεραπείας και της ακτινοθεραπείας (Raposo & Stahl, 2019). Μάλιστα, ο τομέας αυτός ονομάζεται νάνο – ογκολογία και αναφέρεται στην βελτίωση των ποσοστών απόκρισης του όγκου και της σημαντικής μείωσης της συστηματικής τοξικότητας που

σχετίζεται με τις τρέχουσες θεραπείες χημειοθεραπείας (Bayda, Adeel, Tiziano, Cordani, & Rizzolio, 2020).

1.1.5. Μέθοδοι μέτρησης και ανάλυσης

Οι συμβατικές εργαστηριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εύρεση, αναγνώριση και ανάλυση των μικροκυστιδίων είναι οι εξής:

Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση είναι μια ποιοτική μέθοδο, η οποία ερευνά την ύπαρξη μικροκυστιδίων σε βιολογικά υλικά (πλάσμα, ούρα). Στα αρνητικά της μεθόδου είναι η υψηλή ειδίκευση που απαιτεί καθώς, η χρονοβόρα επεξεργασία που χρειάζεται το αναλυθέν δείγμα και συνεπώς η χαμηλή ειδικότητα και ευαισθησία της.

Η Western Blot δίνει τη δυνατότητα αναγνώρισης των μικροκυστιδίων, δίχως να τα ποσοτικοποιούν αλλά ούτε και να τα διαχωρίζουν με σε μικροκυστίδια ή εξωσώματα με βάση το μέγεθος τους (Roy, Hochberg, & Jones, 2018).

Η κυτταρομετρία ροής ενδείκνυται για την μέτρηση των μικροκυστιδίων που έχουν μέγεθος έως 300nm. Η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να αναγνωρίσει και να μετρήσει εξωσώματα λόγω του μεγέθους τους. Κατά την έναρξη της διαδικασίας το αναλυθέν δείγμα, διαπερνά το φως, το οποίο σκεδάζεται και καταμετρά τα μικροκυστίδια που υπάρχουν στο εναιώρημα ως προς το μέγεθος και τον αριθμό τους (Dragonic, et al., 2011). Χρησιμοποιείται ως δείκτης η Αννεξίνη ή δείκτες όπως το CD41+, οι οποίοι μπορούν να ανιχνευθούν στα MPs του ασθενή – εφόσον υπάρχουν - που εξετάζετε και να μας δείξουν την προέλευση τους.

Οι παραπάνω τεχνικές δεν ενδείκνυται σε έρευνες μικροκυστιδίων, καθώς δεν είναι ικανές να διακρίνουν και να διαχωρίσουν μικροκυστίδια μεγέθους κάτω των 300nm. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν τη σκέδαση φωτός δεν είναι ικανές να απεικονίσουν ορθά το μέγεθος τους αλλά ούτε και την κατανομή τους. Αυτό οφείλεται στην ευαισθησία των μεθόδων και όχι στην οργανολογία τους. Συνεπώς, είναι ορθό οι τεχνικές αυτές να χρησιμοποιούνται στα εργαστήρια για εξετάσεις ρουτίνας (Silmore, Gong, Strano, & Swan, 2019).

Η Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), αποτελεί τη πιο σύγχρονη και αξιόπιστη μέθοδο εύρεσης και ανάλυσης των μικροκυστιδίων σε πραγματικό χρόνο σε βιολογικά υλικά. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, παρέχει στον ερευνητή την δυνατότητα να πραγματοποιήσει ευκολότερα και γρηγορότερα τις αναλύσεις που

απαιτούνται. Το διάλυμα οπτικοποιείται μέσω ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και της σκεδάσης του φωτός που διέρχεται σε αυτό και με βάση τη κινητικότητα του κατά Brown. Καταμετρούνται σωματίδια μεγέθους 10 – 2000nm, που ταξινομούνται με βάση το μέγεθος τους και τη συγκέντρωσή τους. Αναλυτικά, η σκέδαση του φωτός διαπερνά το κέντρο των μικροσωματιδίων του βιολογικού υλικού και η κάμερα που υπάρχει στο σύστημα καταγράφει τη κίνηση τους σε αυτό με βάση τους κανόνες του Brown. Ο αριθμός των σωματιδίων που θα μετρηθεί μπορεί να συγκριθεί τον όγκο των κυττάρων Η ΝΤΑ παρέχει τη δυνατότητα σήμανσης των μικροσωματιδίων και την μέτρηση αυτών μέσω του ανοσοφθορισμού.

Το βασικό πλεονέκτημα της ΝΤΑ έναντι στις συμβατικές μεθόδους είναι η ταυτόχρονη μέτρηση πολλαπλών χαρακτηριστικών των κυστιδίων σε μικρό χρονικό διάστημα. Για τη μέτρηση απαιτείται ελάχιστη ποσότητα δείγματος ενώ η επεξεργασία που πρέπει να πραγματοποιηθεί είναι ελάχιστη (αραίωση δείγματος εφόσον απαιτείται). Το τελικό αποτέλεσμα που δίνεται οπτικά είναι υψηλής ανάλυσης και κάνει εμφανή τα αποτελέσματα της διασποράς των κυστιδίων (Dragovic, και συν., 2011).

1.2. Νεφροπάθειες

Το ουροποιητικό σύστημα αποτελεί ένα από τα πιο περίπλοκα και συνάμα πιο βασικά συστήματα του οργανισμού. Οι νεφροί που αποτελούν κύριο μέρος του, είναι ένα από τα σημαντικότερα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού, γι' αυτό και η ομαλή λειτουργία τους θεωρείται μείζονος σημασία. Ωστόσο σήμερα, ολοένα και περισσότεροι ασθενείς πάσχουν από νεφρολογικά νοσήματα, αιτία της εμφάνισης των οποίων αποτελούν πολλοί παράγοντες, που είναι είτε βιολογικοί και είτε κοινωνικοί. Οι νεφροπαθείς ασθενείς υπόκεινται στη κατηγορία των χρόνιων πασχόντων, καθώς από τη στιγμή της διάγνωσης τους και μετά, αναγκάζονται να αλλάξουν τον μέχρι πρότινος τρόπο ζωής τους και τη καθημερινότητά τους (Cijiang He, Chuang, Ma'Ayan, & Ravi, 2012).

Είναι απαραίτητο η διάγνωση των νεφροπαθών ασθενών να γίνεται όσο το δυνατό σε πιο πρώιμο στάδιο της νεφρικής ασθένειας. Ωστόσο, αυτό δεν είναι πάντα δυνατό, καθώς η κλινική εικόνα δεν μπορεί να συσχετιστεί με τα εργαστηριακά

ευρήματα. Τα μικροκυστίδια μπορούν να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες τόσο για τη διάγνωση όσο και τη παρακολούθηση των νεφροπαθών ασθενών, για αυτό και οι έρευνες που τα συσχετίζουν αυξάνονται συνεχώς τη τελευταία δεκαετία (Ma, et al., 2020).

1.2.1. Λειτουργία νεφρών

Η βασική λειτουργία των νεφρών είναι η διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού, με αυτό να επιτυγχάνεται μέσω της αποβολής και απαναρρόφησης ουσιών. Συγκεκριμένα, οι νεφροί αποβάλλουν ουσίες, οι ποσότητες των οποίων είναι σε αυξημένα επίπεδα στον οργανισμό (ενδοκυττάρια είτε εξωκυττάρια) και θα μπορούσαν να λειτουργήσουν τοξικά σε αυτόν (Basile, Anderson, & Sutton, 2012). Οι νεφροί είναι βασικοί ρυθμιστές της οξεοβασικής ισορροπίας του αίματος μέσω της αποβολής ή/και επανάρροφησης οξέων και αλκαλίων. Με παρόμοιο μηχανισμό ρυθμίζουν και τα επίπεδα των ανόργανων κατιόντων και ανιόντων ουσιών (Osborn, Tyshynsky, & Vulchanova, 2021).

Επιπλέον, οι νεφροί έχουν την ικανότητα να συνθέτουν ουσίες απαραίτητες για τη λειτουργία του οργανισμού. Η σημαντικότερη από αυτές είναι η ερυθροποιητινη (EPO), που διεγείρει τον μυαλό των οστών και προχωρά στην παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs). Ακόμα ευθύνεται για την δημιουργία της δραστικής μορφής της βιταμίνης D, την 1,25-διυδροξυ και την απελευθερώνει στο αίμα. Τέλος, απελευθερώνει τη ρενίνη, η οποία εκκρίνεται από τα παρασπειραματικά κύτταρα των νεφρών και ρυθμίζει τα επίπεδα του καλίου στο αίμα, τη πίεση του αίματος και τον όγκο των υγρών του οργανισμού (Cijiang He, Chuang, Ma'Ayan, & Ravi, 2012).

1.2.2. Νεφρικές νόσοι

Όταν αναφερόμαστε στους νεφροπαθείς, η πρώτη σκέψη οδηγεί στα άτομα που πάσχουν από Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια (ΧΝΑ). Ωστόσο, υπάρχουν και άλλες νόσοι, πιο σπάνιες που μπορεί να κατατάξουν τους ασθενείς στην κατηγορία των νεφροπαθών.

1.2.2.1. Σπειραματονεφρίτιδα

Η σπειραματονεφρίτιδα είναι μια νόσος που οφείλεται σε αλλαγές που υφίσταται η μεμβράνη του σπειράματος. Οι αλλαγές αυτές οφείλονται είτε στην εμφάνιση των συμπλεγμάτων αντιγόνων – αντισωμάτων, που είναι ικανά να προσελκύσουν παράγοντες (C3), που με τη σειρά τους ενεργοποιούν άλλους χημειοδραστικούς που προσελκύουν τα WBCs, ένζυμα των οποίων ευθύνονται για την εμφάνιση της νόσου, είτε σε αλλοιώσεις που εμφανίζονται στη μεμβράνη λόγω των ενζύμων των αυτοαντισωμάτων που ενεργοποιούνται με τη βοήθεια του συμπληρώματος. Βάση της ταχύτητας της εξέλιξης της νόσου ορίζεται είτε σε οξεία, ταχέως οξεία και χρόνια (Franssen, De Vries, & McGrogan, 2011).

Η οξεία σπειραματονεφρίτιδα εμφανίζεται είτε σε πολύ νεαρές ηλικίες (3-10 ετών) είτε σε πολύ μεγάλες (άνω των 50 ετών) και χρειάζεται μόλις λίγες μέρες για να εκδηλωθεί. Οι πιο συνήθεις αιτίες που ευθύνονται για την εμφάνιση της είναι προυπάρχουσες λοιμώξεις του οργανισμού, όπως ο αιμολυτικό στρεπτόκοκκος Α ή Β. Πιο αναλυτικά, ο αιμολυτικός στρεπτόκοκκος Α, εμφανίζει λοιμώξεις στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα και στο δέρμα, οι οποίες μπορούν να μεταφερθούν στα νεφρά και να εμφανίσουν τη νόσο. Ο στρεπτόκοκκος Β προκαλεί βλάβη στα μεσαγγειακά κύτταρα με αποτέλεσμα να κάνουν το σπείραμα πιο ευάλωτο σε λοιμώξεις (Couser, 2016).

Οι ασθενείς με οξεία σπειραματονεφρίτιδα, εμφανίζουν ως πρώτα συμπτώματα κόπωση, πυρετό, ολιγουρία, οσφουαλγία, υπέρταση και δύσπνοια. Τα ούρα τους έχουν συνήθως κόκκινο – καφέ χρώμα, εξαιτίας των RBCs που ανευρίσκονται σε αυτά. Σπάνια συμπτώματα είναι το πνευμονικό οίδημα και οιδήματα στον υπεζωκότα, στο περιτόναιο και τα άκρα. Όσον αναφορά τα εργαστηριακά ευρήματα, στο σπείραμα εμφανίζονται υπερπλασία των ενδοθηλιακών κυττάρων και της κάψας. Τα νεφρικά σωληνάκια εμφανίζουν λιπώδη εκφύλιση, η οποία μπορεί να οδηγήσει και σε νέκρωση τους λόγω της απόφραξης τους. Στους ασθενείς ανευρίσκονται αυξημένα επίπεδα της κρεατινίνης, του αζώτου και της ταχύτητας καθίζησης ερυθρών (ΤΚΕ) (AlYousef, et al., 2020).

Η ταχέως οξεία σπειραματονεφρίτιδα αποτελεί τη μορφή της νόσου που χρειάζεται λίγες εβδομάδες προκειμένου να εκδηλωθεί. Αυτή η μορφή της νόσου συνήθως εκδηλώνεται ως απόρροια άλλης νόσου όπως ο ερυθθηματώδης λύκος, η θομβοκυτταροπενική πορφύρα και οι νεφρίτιδες. Τα συμπτώματα που εμφανίζονται

είναι παρόμοια με αυτά της οξείας μορφής συν αυτά της τάσης προς έμετο, του κοιλιακού άλγους και της πρωτεϊνουρίας, ενώ στην κάψα του Bowman εμφανίζονται πολυάριθμα επιθηλιακά κύτταρα (Satoskar, Parikh, & Nadasdy, 2019).

Τέλος, η χρόνια σπειραματονεφρίτιδα ορίζεται ως το τελικό στάδιο της οξείας μορφής της νόσου. Συνήθως εμφανίζεται σε ασθενείς που δεν είχαν διαγνωσθεί στην οξεία μορφή της λόγω μη εκδήλωσης συμπτωμάτων Τα συμπτώματα και τα κλινικά ευρήματα είναι μεν παρόμοια αλλά σε εντονότερη μορφή. Οι ασθενείς θα πρέπει να λάβουν αμέσως θεραπεία διαφορετικά μπορεί να επέλθει μέχρι και ο θάνατος (Sethi & Fervenza, 2019).

1.2.2.2. Νεφρωσικό Σύνδρομο

Το νεφρωσικό σύνδρομο εμφανίζεται συνήθως ως απόρροια της σπειραματικής βλάβης. Η σπειραματική βλάβη μπορεί να οφείλεται σε διάφορες αιτίες όπως για παράδειγμα στη λιπώδη νέφρωση, στη σπειραματική σκλήρυνση ή την μεμβρανουπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα ή ακόμα και σε νόσους όπως ο ερυθματώδης λύκος (ΣΕΛ), η ύπαρξη νεοπλασμάτων ή μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας C (Wang & Greenbaum, 2019).

Το χαρακτηριστικό σύμπτωμα που εμφανίζουν οι ασθενείς είναι το οίδημα, το οποίο τους επιβαρύνει ολοένα και περισσότερο με το πέρασμα των ημερών. Σύνηθες θεωρείται η εμφάνιση υπέρτασης, η αλλοίωση των αγγείων καθώς και η δυσκολία στην αναπνοή (Park & Shin, 2011). Πραγματοποιείται ενδελεχής εξέταση ούρων και συγκεκριμένα γίνεται μικροσκόπηση τους από ειδικό κλινικό ιατρό, στα οποία ανευρίσκονται RBCs, κύλινδροι καθώς και κυττάρων του νεφρικού ιστού. Επίσης, ο ασθενής αποβάλλει μέσω των ούρων μεγάλες ποσότητες αλδοστερόνης ενώ κάνει κατακράτηση νατρίου. Ακόμη, εμφανίζονται υψηλά επίπεδα χοληστερίνης και τριγλυκεριδίων στο αίμα και χαμηλά επίπεδα νατρίου και ασβεστίου (Andolino & Reid-Adam, 2015).

1.2.2.3. Νεφρική Ανεπάρκεια

Η πλειοψηφία των νεφροπαθών ασθενών είναι διαγνωσμένοι με κάποια μορφή νεφρικής ανεπάρκειας. Υπάρχουν τρεις μορφές, οι οποίες είναι εξίσου σοβαρές και χρειάζονται άμεσης θεραπείας καθώς μπορεί να οδηγήσουν τους ασθενείς μέχρι και

στο θάνατο. Οι μορφές αυτές είναι η οξεία νεφρική ανεπάρκεια, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και η νόσος τελικού σταδίου, που είναι το τελικό στάδιο της χρόνιας μορφής της νόσου (Angramovic & Vladisav , 2012).

1.2.2.3.1. Οξεία νεφρική ανεπάρκεια

Η οξεία νεφρική ανεπάρκεια είναι η μορφή της νόσου που επέρχεται ξαφνικά στον ασθενή και έχει υψηλές πιθανότητες ίασης εφόσον διαγνωσθεί εγκαίρως. Συγκεκριμένα, οι νεφροί σταματούν να λειτουργούν και αυτό εμφανίζει πληθώρα συμπτωμάτων στον οργανισμό με πιο σοβαρό να είναι η αγγειοκινητική σύσπαση των προσαγωγών αρτηριτίδων. Οι πιο συνήθεις αιτίες της απότομης παύσης της λειτουργίας των νεφρών είναι οι τραυματισμοί στην περιοχή, οι προϋπάρχουσες μολύνσεις στο ουροποιητικό σύστημα, η ύπαρξη εγκευμάτων, η υπερδοσολογία αντιβιοτικών. Ακόμη μπορεί να προκληθεί ως επιπλοκή κάποιας εγχείρησης όπως για παράδειγμα του προστάτη (Kozs, 2016).

Τα συμπτώματα που οδηγούν τους ασθενείς στον ιατρό είναι η μείωση του όγκου των ούρων που αποβάλλει κατά τη διάρκεια της ημέρας, ο οποίος μειώνεται περί των 30 mL και μπορεί να φτάσει σε ακραίες περιπτώσεις έως και τα 500 mL. Όλοι οι ασθενείς εμφανίζουν βλάβη και στους δυο νεφρούς. Άλλα συμπτώματα που εμφανίζονται είναι η τάση προς έμετο και η υπνηλία. Στα ούρα των ασθενών που η κατάσταση τους οφείλεται σε τραυματισμό ανευρίσκεται αίμη και μυοσφαιρίνη. Ακόμη ανευρίσκονται κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων, τα οποία έχουν υποστεί νέκρωση καθώς και επιθηλιακά κύτταρα. Οι αιματολογικές εξετάσεις των ασθενών δείχνουν αύξηση των τιμών των οργανικών οξέων και των ηλεκτρολυτών πλην του νατρίου που εμφανίζεται αυξημένο (Hudson & Sinert, 2011).

Βασικό σημείο της οξείας νεφρικής ανεπάρκεια είναι η μειωμένη αιμάτωση της περιοχής του ουροποιητικού συστήματος. Αυτό είναι το χαρακτηριστικό που την κάνει να ξεχωρίζει από άλλες ασθένειες της περιοχής όπως η οξεία σπειραματονεφρίτιδα και η απόφραξη των ουρητήρων λόγω καθετηριασμού ή λόγω ύπαρξης νεοπλασματος. Με βάση τα παραπάνω και το ιστορικό του ασθενή οι ιατροί προχωράνε στη διαφορική διάγνωση της νόσου (Jean-Philippe & Prasad , 2019).

1.2.2.3.2. Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια (ΧΝΑ)

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια αποτελεί συνήθως απόρροια της μη ίασης της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας ή κάποιας άλλης νεφρικής νόσου όπως η σπειραματονεφρίτιδα ή άλλες νόσος των νεφρών και ουρητήρων. Οποιαδήποτε και αν είναι η αιτία, η κατάληξη για τον ασθενή είναι ίδια καθώς οι νεφρώνες του παύουν να λειτουργούν. Αυτό οδηγεί τους ασθενείς να εμφανίσουν συμπτώματα όπως η κόπωση, η ναυτία, ο εμετός, ο πονοκέφαλος, η μείωση των αντανακλαστικών. Σπανίως εμφανίζουν διάρροια και κοιλιακές ενοχλήσεις, αιμορραγία δια της ρινικής κοιλότητας ή πνευμονικό οίδημα (Olsen & van Galen, 2022). Οι ασθενείς εμφανίζουν αδυναμία στην κράτηση των ούρων λόγω της απώλειας των νεφρώνων καθώς και σε προβλήματα ωσμωτικότητας και οξεοβασικής ισορροπίας του οργανισμού, καθώς αυτοί αποτελούσαν τους βασικούς ρυθμιστές. Τα παραπάνω οδηγούν στην εμφάνιση συμπτωμάτων σχετικά με την αναιμία καθώς και αφυδάτωσης (Levey & Coresh, 2012).

Οι νεφροί εμφανίζουν μείωση στο μέγεθος τους ενώ παράλληλα αυξάνεται σε όγκο ο έσω και ο μέσος χιτώνας, με τον έξω να μην εμφανίζει κάποια μεταβολή. Η μείωση του ρυθμού της σπειραματικής διήθησης είναι ανάλογη με τη μείωση του ρυθμού της αιμάτωσης των νεφρών. Οι ουρητήρες και η κύστη εμφανίζουν απόφραξη, στις περισσότερες περιπτώσεις των ασθενών. Υπάρχει αυξημένη αποβολή ηλεκτρολυτών από τα ούρα το οποίο οδηγεί σε αυξημένες τιμές των οργανικών και φωσφορικών οξέων στο αίμα (Ammirati, 2020). Το νάτριο, η βιταμίνη D, η ουρία και το ουρικό οξύ βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα ενώ το κάλιο σε αυξημένα. Επειδή οι νεφροί δεν λειτουργούν σωστά, παύουν να παράγουν τα απαιτούμε ποσοστά EPO που χρειάζεται ο οργανισμός, με αποτελέσματα να εμφανίζεται αναιμία, η οποία έχει χαρακτηριστικά ορθόχρωμης ορθοκυτταρικής. Η μικροσκοπική εξέταση των ούρων δείχνει πολυάριθμα WBCs και RBCs (Olsen & van Galen, 2022).

1.2.2.3.3. Νεφρική νόσος τελικού σταδίου (ESRD)

Οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται με νεφρική νόσο τελικού σταδίου δεν έχουν πλέον λειτουργικούς νεφρούς και χρειάζονται μηχανική υποστήριξη. Η αιμοκάθαρση ή/και η μεταμόσχευση νεφρού είναι οι μόνες θεραπείες που επέρχονται σε αυτό το στάδιο, παρόλο που δεν προσφέρουν ίαση στον ασθενή παρά μόνο παράταση ζωής μερικών

μηνών (Cantarín & McCauley, 2018). Η νεφρική νόσος τελικού σταδίου αποτελεί το τελικό στάδιο των νεφροπαθειών που δεν κατάφεραν να ιαθούν. Ωστόσο, ασθενείς με ιστορικό καρδιοαγγειακών νοσημάτων, με διαβήτη ή επιβαρυσμένο οικογενειακό ιστορικό φτάνουν συχνότερα σε αυτό το στάδιο της νόσου (Abbasi, Chertow,, & Hall, 2010).

Οι ασθενείς εμφανίζουν μια πληθώρα συμπτωμάτων όπως αδυναμία, ζαλάδες, ναυτίες, λήθαργο, κόπωση, πόνο στα κόκκαλα, υπέρταση καθώς και μείωση του βάρους τους όπως και μείωση του όγκου των ούρων που αποβάλλουν. Έχουν καταγραφεί περιπτώσεις ασθενών, όπου δεν είχαν κανένα από τα παραπάνω συμπτώματα άλλα έχρηζαν άμεσης έναρξης της θεραπείας (Liyanage, Ninomiya, & Jha). Τα πιο σύνηθες εργαστηριακά ευρήματα δείχνουν υπερκαλιαιμία, για την οποία ευθύνεται η συσσώρευση του καλίου στον οργανισμό, καθώς δεν μπορεί να αποβληθεί μέσω των ούρων. Επιπλέον, ανευρίσκεται χαμηλός αριθμός των RBCs, ενώ ο ασθενής δεν έχει σταθερή αρτηριακή πίεση. Τέλος, η κρεατινίνη και το EGFR βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα. Για να επιβεβαιωθεί η ασθένεια πέρα από βιοχημικές εξετάσεις χρειάζεται να πραγματοποιηθούν απεικονιστικές εξετάσεις καθώς και βιοψία νεφρών (Braun & Khayat , 2021).

1.2.3. Θεραπεία

Η θεραπεία που θα ακολουθηθεί σε κάθε ασθενή εξαρτάται από την νόσο που έχει διαγνωστεί και το στάδιο αυτής, της οποίας βρίσκεται. Αν ο ασθενής βρίσκεται σε αρχικό στάδιο τότε η θεραπεία στοχεύει στην εξάλειψη των συμπτωμάτων και συνάμα της νόσου. Αν ο ασθενής βρίσκεται στο τελικό στάδιο, τότε ο στόχος είναι η μείωση της συμπτωματολογίας και η παράταση του χρόνου ζωής. Σε οποιαδήποτε από τις περιπτώσεις ενδείκνυται να δίνεται θεραπεία για άλλες νόσους ή συμπτώματα που ταλαιπωρούν τους ασθενείς καθώς και να αποφεύγονται φάρμακα που περιέχουν νευροτοξίνες και ακτινοσκίερους, παράγοντες που μπορεί να επιβαρύνουν την κατάσταση των νεφρών. Ως πρώτη σύσταση δίνεται η αλλαγή του διατροφολογίου, με την αποφυγή τροφών που περιέχουν υψηλές ποσότητες νατρίου ή καλίου (Turner, Bauer, Abramowitz, Melamed, & Hostetter, 2012).

Η αιμοκάθαρση θεωρείται ως η κυριότερη θεραπεία των νεφροπαθών καθώς έχει την ικανότητα να επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου και ταυτόχρονα να

κάνει ποιοτικότερη τη ζωή του ασθενή. Παρόλα αυτά έχει πολλές παρενέργειες, γι' αυτό η επιλογή της θα πρέπει να γίνεται με σύσταση από τον γιατρό και τον ασθενή. Οι πιο συχνές επιπλοκές αφορούν μολύνσεις της φλέβας όπου τοποθετείται η ειδική αναστόμωση, όταν δεν έχει γίνει σωστή προετοιμασία.

Η αιμοκάθαρση θεωρείται μια από τις πιο επίπονες θεραπευτικές δοκιμασίες εξαιτίας της πολύπλοκης διαδικασίας της (Ismail, et al., 2019). Μέσω της φλεβικής αναστόμωσης, συνδέεται ο ασθενής με το μηχάνημα της αιμοκάθαρσης, που του χορηγεί ουσίες απαραίτητες για τη λειτουργία των νεφρών όπως, η κουπραφίνη, η πολυσουλφόνη, η κυτταρίνη και η πολυακρυλονιτριλη. Παράλληλα αποβάλλει από την κυκλοφορία ουσίες που είναι δεν είναι χρήσιμες και δεν δύναται να απομακρυνθούν με άλλο τρόπο (Magnani & Atti, 2021). Αναλυτικότερα, το αίμα του ασθενή μεταφέρεται στο μηχάνημα της αιμοκάθαρσης με μέση ταχύτητα 300 mL/min ενώ παράλληλα από αντίθετη ροή μεταφέρεται στον οργανισμό του με μέση ταχύτητα 500 mL/min το υγρό που περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά που αναφέρθηκαν παραπάνω για την λειτουργία των νεφρών. Κατά μέσο όρο η διαδικασία της αιμοκάθαρσης διαρκεί κάθε φορά 10 ώρες. Ο όγκος του υγρού που θα μεταφερθεί, οι ποσότητες και οι ουσίες που θα περιέχονται σε αυτό, η ταχύτητα της ροής και ο χρόνος που θα χρειαστεί για να ολοκληρωθεί η διαδικασία εξαρτώνται από την σοβαρότητα της κατάστασης του ασθενή (Akchurin & Kaskel, 2015).

Αξίζει σε αυτό το σημείο να γίνει αναφορά και στη περιτοναϊκή κάθαρση, η οποία ουσιαστικά αφορά την τοποθέτηση καθετήρα στη περιτοναϊκή περιοχή και τη δημιουργία ενός κλειστού κυκλώματος, μέσω του οποίου γίνεται η ανταλλαγή υγρών. Σήμερα εφαρμόζεται η διαλείπουσα και η κυκλική περιτοναϊκή κάθαρση. Πλεονέκτημα και των δυο είναι ότι μπορούν να εφαρμοστούν πέρα από το νοσοκομείο και στο σπίτι του ασθενή. Επιπλέον, οι παρενέργειες που εμφανίζει είναι λιγότερες από αυτές της αιμοκάθαρσης. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της είναι ότι είναι μεγαλύτερη σε χρονική διάρκεια (Turner, Bauer, Abramowitz, Melamed, & Hostetter, 2012)

Παρ' όλα αυτά, οι νεφροπαθείς ασθενείς που κάνουν μακροχρόνια αιμοκάθαρση, αντιμετωπίζουν πληθώρα επιπλοκών, οι οποίες επιβαρύνουν την κατάσταση της υγείας τους. Οι πιο συχνές επιπλοκές αφορούν μολύνσεις στη περιοχή του φλεβοκαθετήρα από στελέχη του *Staphylococcus* και συγκεκριμένα τον *S. Aureus*

καθώς και στην δημιουργία θρόμβων. Σπανίως εμφανίζονται αρρυθμίες, άνοια και διαταραχή της ωσμωτικότητας. Η εξάντληση των νεφροπαθών ασθενών που βρίσκονται υπό την διαδικασία της αιμοκάθαρσης είναι τόσο σωματική όσο και ψυχολογική (Akchurin & Kaskel, 2015).

1.3. Αιμόσταση

Η πήκτικότητα του αίματος αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία και ταυτόχρονα μια από τις σημαντικότερες για την επιβίωση του ανθρώπου, διεργασίες του οργανισμού. Η διαδικασία της αιμόστασης είναι αυτή που κρατά το αίμα σε σταθερή ροή ώστε να μην διαπερνά τα αγγεία και συμβούν αιμορραγίες και ούτε να τα φράζει μέσω της δημιουργίας θρόμβων (Periyah, Halim, & Saad, 2016). Ωστόσο, σε επείγουσες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα η διάτρηση αγγείων και η ύπαρξη αιμορραγίας ή η απόφραξη αγγείων εξαιτίας θρόμβου, μεταβάλλετε η πήκτικότητα, με τη βοήθεια των κυττάρων και των παραγόντων του οργανισμού, ώστε να λυθεί το πρόβλημα. Οι ερευνητές συγκαταλέγουν την αιμόσταση, λόγω του προστατευτικού της χαρακτήρα, στους αμυντικούς μηχανισμούς του οργανισμού.

Η διαδικασία της αιμόστασης αποτελείται από τρία στάδια. Το στάδιο της πρωτογενούς αιμόστασης ενεργοποιείται σε περιπτώσεις τραυματισμού των μικρών αγγείων. Το στάδιο της δευτερογενούς αιμόστασης ενεργοποιείται σε περιπτώσεις τραυματισμού μεγάλων αγγείων. Το στάδιο της ινωδόλυσης που ενεργοποιείται σε περιπτώσεις πολλαπλού αγγειακού τραυματισμού (Versteeg, Heemskerk, Levi, & Reitsma, 2013).

1.3.1. Πρωτογενής Αιμόσταση

Η πρωτογενής αιμόσταση ξεκινά με τον τραυματισμό ενός αγγείου και όλες οι διεργασίες συμβαίνουν μέσα σε αυτό. Σε περιπτώσεις που ο τραυματισμός αφορά μικρά αγγεία, τότε είναι δυνατόν να ιαθούν μέσω αυτού του σταδίου, δίχως να χρειαστεί να ενεργοποιηθεί το επόμενο στάδιο. Το στάδιο αυτό συμβάλλει τόσο στην αποτροπή της δημιουργίας θρόμβων όσο και αιμορραγιών. Σε περίπτωση που η αιμορραγία είναι μικρή και ο τραυματισμός έχει συμβεί σε μικρό αγγείο, τότε επέρχεται πλήρη ίαση (Jalal, Chonchol, & Targher, 2010). Αν το αγγείο είναι μεγάλο,

θα χρειαστούν περισσότερες ενέργειες. Η αποτροπή της δημιουργίας θρόμβων εφαρμόζεται μέσα από την απενεργοποίηση του μηχανισμού της αγγειοδιαστολής, δηλαδή της μη ενεργοποίησης των PLTs και των WBCs, και όποιων μορίων ή ενζύμων που ενεργοποιούνται μέσω αυτών (Broos, Feys, De Meyer, Vanhoorelbeke, & Deckmyn, 2011).

Σε περίπτωση τραυματισμού ενός αγγείου, αυτό αρχίζει να συστέλλεται έντονα, ώστε να περιοριστεί όσο το δυνατό περισσότερο η αιμορραγία καθώς και να προσελκύει τα PLTs και των WBCs, των οποίων η λειτουργία αναστέλλεται σε περίπτωση θρόμβου όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Margetic, 2012). Αυτή λοιπόν είναι η αρχή του μηχανισμού της αιμόστασης. Στη συνέχεια ενεργοποιείται το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα (ΑΝΣ), που δίνει σήμα στους μυείς που βρίσκονται κοντά στο τραυματισμένο αγγείο και απελευθερώνουν διαβιβαστές, η δράση των οποίων είναι σημαντική για την πρωτογενή φάση της αιμόστασης. Οι διαβιβαστές αυτοί είναι η σεροτονίνη, η νοραδρεναλίνη και η επινεφρίνη. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που απελευθερώνονται και έχουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία είναι ο παράγοντας Von Willebrand (vWF), ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου PAI, ο αναστολέας της εξωγενούς οδού της πήξης (EPI), το κολλαγόνο, η προστακυκλίνη και η Θρομβομοντουλίνη. Στη περίπτωση που κάποια από τις παραπάνω ουσίες λείπουν ή είναι σε έλλειψη στον οργανισμό, τότε εμφανίζονται προβλήματα στη διαδικασία της αιμόστασης (Levy, Szlam, Tanaka, & Sniecienski, 2012).

Ωστόσο, σε αυτό το στάδιο η δράση των PLTs είναι η πιο σημαντική, καθώς αυτά είναι που δημιουργούν τον θρόμβο που απαιτείται για να σταματήσει η αιμορραγία. Παρόλα αυτά, απαιτείται η δράση των ουσών που αναφέρθηκαν παραπάνω καθώς, ο αιμοπεταλιακός θρόμβος είναι ασταθής και δεν μπορεί να σταματήσει την αιμορραγία (Broos, Feys, De Meyer, Vanhoorelbeke, & Deckmyn, 2011). Επιπλέον, οι ουσίες, κυρίως οι προστακυκλίνη και το κολλαγόνο, συμβάλουν στην προσαρμογή της ρευστότητας του θρόμβου (D'Alessio, Genua, & Vetrano, 2012).

Αρχικά, ο VWF ενώνεται με το κολλαγόνο του υποενδοθηλίου και το συνδέει με τα PLTs μέσω των υποδοχέων γλυκοπρωτεΐνης Ib (GPIb) που βρίσκονται σε αυτά. Η σύνδεση αυτή, οδηγεί στην αντίδραση των PLTs, τα οποία εκκρίνουν πληθώρα κόκκων, τα οποία με σειρά τους προσελκύουν ακόμα περισσότερα PLTs στην

τραυματισθείσα περιοχή. Τα PLTs που προσελκύονται ενώνονται και δημιουργούν τον αιμοπεταλιακό θρόμβο (Levy, Szlam, Tanaka, & Sniecinski, 2012).

1.3.2. Δευτερογενής αιμόσταση

Το στάδιο της δευτερογενούς αιμόστασης ξεκινά σε περιπτώσεις που ο τραυματισμός του αγγείου είναι μεγάλος και δεν επαρκή η δράση της πρωτογενούς φάσης για να σταματήσει την αιμορραγία. Ο θρόμβος που χρειάζεται για να σταματήσει η αιμορραγία είναι μεγαλύτερος γι' αυτό και είναι απαραίτητη η συμμετοχή πληθώρας ουσιών του οργανισμού καθώς και όλων των πηκτικών παραγόντων (Danckwardt, Hentze, & Kulozik, 2013).

Το συγκεκριμένο στάδιο αποτελείται από τρεις φάσεις την ενδογενή οδό, την εξωγενή οδό και την κοινή οδό, οι οποίες είναι γνωστές και ως «καταρράκτης της πήξης». Σε όλες τις φάσεις συμμετέχουν πρωτεΐνες και συστατικά του οργανισμού και του αίματος, τα οποία αλληλοεπιδρούν με τελικό στόχο την επαναφορά της ομαλής πήξης του αίματος στον οργανισμό μέσα από την μετατροπή του διαλυτού ινωδογόνου που έχει δημιουργηθεί σε αδιάλυτο ινώδες που με τη σειρά του δημιουργεί πλέγμα ινικής. Οι αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι συγκεκριμένες και γίνονται βάση του μηχανισμού του καταρράκτη (Müller & Renné, 2011).

Η ενδογενής οδός ξεκινά με τη δράση των FXI, του κινινογόνο (KMMB) και της προκαλικρεΐνης, οι οποίοι ενώνονται και δημιουργούν ένα σύμπλεγμα, που με τη σειρά του προσκολλάτε στο ενδοθήλια του τραυματισμένου αγγείου και ενεργοποιεί τον FXII. Εφόσον ενεργοποιηθεί ο FXII, η δράση του FXI σταματάει μέσω του FXIIa, ο οποίος δρα σαν ένζυμο. Ο FXIa δρα μαζί με τα ιόντα ασβεστίου και ενεργοποιεί τον FXI, ο οποίος με τη σειρά του συνδέεται με τον FVIII. Τα ιόντα ασβεστίου παράλληλα δρουν μαζί και με τον FIX προς τον FX, που αλλάζει σε ενεργή μορφή FXa.

Η εξωγενής οδός ξεκινά με την δράση του ιστικού παράγοντα ή γνωστό και ως Tissue factor (TF), ο οποίος ενεργοποιείται σε περιπτώσεις τραυματισμού των αγγείων και συνδέεται με τον FVII, σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα. Το σύμπλεγμα αυτό έχει διττό ρόλο καθώς προκαλεί την ενεργοποίηση του FX σε FXa καθώς και του FIX σε FIXa (Franchini, Lippi, & Favaloro, 2014).

Η κοινή οδός συμβαίνει στα PLTs, όπου ο FXa και ο FVa δημιουργούν σύμπλεγμα και οδηγούν στη λύση της προθρομβίνης σε θρομβίνη. Η θρομβίνη δρα μαζί με το ινωδογόνο και σαν σύμπλεγμα πλέον, οδηγούν στη δημιουργία των A και B ινωδοπεπτιδίων καθώς και στην ενεργοποίηση του FXIII. Η δημιουργία των μονομερών του ινώδους ευθύνεται για τη δημιουργία του ασταθή θρόμβου, ο οποίος μέσω της συμβολής του FXIIIa αλλάζει και δημιουργείται ένας αδιάλυτος θρόμβος ινώδους (Puy, Rigg, & McCarty, 2016).

Η δράση του καταρράκτη της πήξης σταματάει μόλις αποκατασταθεί η βλάβη στο αγγείο. Αυτό γίνεται μέσω του μηχανισμού της ινωδόλυσης, καθώς και της συμμετοχής μιας πλειάδας παραγόντων, ενζύμων και πρωτεϊνών (Lippi, Franchini, & Falavero, 2016).

1.3.3. Ινωδόλυση

Η ινωδόλυση είναι το τελευταίο στάδιο του μηχανισμού της αιμόστασης του οργανισμού. Ενεργοποιείται μετά το τέλος των διεργασιών του καταρράκτη της πήξης και έχει στόχο την διάλυση των θρόμβων που δημιουργήθηκαν, ώστε να μην συμβεί φράξη των αγγείων εξαιτίας τους. Βασικό ρόλο στη διαδικασία παίζει το πλασμινογόνο (Muto, et al., 2021).

Αρχικά το πλασμινογόνο με τη βοήθεια του ιστικού ενεργοποιητή (tPA), του ενεργοποιητή της ουροκινάσης (uPA) και των FXI, FXII, ενεργοποιείται και μετατρέπεται στην ενεργή μορφή του τη πλασμίνη, όπου με τη σειρά της διασπά την ινική. Πιο αναλυτικά, η πλασμίνη διασπά το ινωδογόνο και το ινώδες και οδηγεί στη δημιουργία των μονομερών D και E και των μονομερών E και διμερών D αντίστοιχα. Ουσιαστικά, η δράση της πλασμίνης έγκειται στο να σπάσει τα τριμερή μόρια του ινωδογόνου (D – E – D), να δημιουργήσει διμερή μορφές τους (D – E) και τέλος μονομερή D και E ή προϊόντα της αποδομής ινωδογόνου (FDP). Τελικός στόχος της πλασμίνης είναι να δημιουργηθούν διμερή D και μονομερή E. Επιπλέον, η πλασμίνη οδηγεί στην αναστολή της ενεργοποίησης των FV, FVIII και FXIII.

Αξίζει να σημειωθεί, πως καθ' όλη τη διάρκεια της ινωδόλυσης, δρουν αναστάλτες ενάντια στο πλασμινογόνο και τη πλασμίνη. Συγκεκριμένα, οι αναστάλτες που δρουν κατά της ενεργοποίησης της δράσης του πλασμινογόνου είναι

οι αναστάλτες 1 και 2 (PAI-1 και PAI-2) που αδρανοποιούν τον tPA. Ο αναστάλτης που δρα κατά την δράση της πλασμίνης είναι η A2 αντιπλασμίνη (Charin & Hajjar, 2015).

1.4. Procoagulant Phospholipid (PPL)

Η δράση των προπηκτικών φωσφολιπιδίων εξαρτάται άμεσα από την εξωτερίκευση και την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στη διπλοστιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, και συγκεκριμένα την τοποθέτηση τους σε σημείο όπου μπορούν να αναγνωριστούν και να επηρεαστούν από διάφορα κυτταρικά ερεθίσματα όπως η απόπτωση και η κυτταρική ενεργοποίηση. Με την ενεργοποίησή τους, οδηγούν στο σχηματισμό και τη δραστηριότητα συμπλεγμάτων ενζύμων πήξης. Με αυτό τον τρόπο αναδιαμορφώνεται η κυτταρική μεμβράνη, απελευθερώνοντας μικροκυστίδια μεγέθους 0,1 – 1μm (Morel, et al., 2006).

Τα μικροκυστίδια αυτά, περιέχουν πληροφορίες του κυττάρου από το οποίο απελευθερώθηκαν και ενσωματώνονται στα βιολογικά υγρά του οργανισμού. Αποτελούν ουσιαστικά μια δεξαμενή αποθήκευσης βιοδραστικών παραγόντων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς των θρομβώσεων, των φλεγμονών και της αγγειογένεσης. Επομένως, η εύρεση αυξημένου επιπέδου PPL μπορεί να σημαίνει την ύπαρξη κάποιας παθολογικής κατάστασης όπως κακοήθειες και φλεγμονώδεις νόσοι, και ρυθμός του να σχετίζεται άμεσα με την πρόληψη, τη πρόγνωση και τη θεραπεία του (van den Goor, et al., 2007).

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

Η μεθοδολογία που επιλέχθηκε στη παρούσα έρευνα είναι αυτή της πειραματικής μεθόδου, η οποία χαρακτηρίζεται από μεθοδικό σχεδιασμό και οδηγεί στην εξαγωγή συμπερασμάτων μέσω των αποτελεσμάτων της. Τα αποτελέσματα αυτά, συσχετίζονται με την υπάρχουσα βιβλιογραφία και τα αποτελέσματα παλαιότερων μελετών που είχαν πραγματοποιηθεί. Ουσιαστικά, η ερευνητική μεθοδολογία οδηγεί στην εξαγωγή συμπερασμάτων, μέσα από τη συσχέτιση των μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Σύμφωνα με τον ορισμό της πειραματικής έρευνας, κατά τη διάρκεια της ακολουθείτε ένα αυστηρό πρωτόκολλο, που περιλαμβάνει εργαστηριακές δοκιμές ή προσπάθεια απόδειξης μιας υπόθεσης μέσω πειραματισμού. Αυτό το είδος της μελέτης εκτελείται σε κάποιο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε οι ερευνητές να μπορούν να συνάγουν ένα επιβεβαιωμένο συμπέρασμα σχετικά με τις μεταβλητές που έχουν ορίσει. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, ο ερευνητής συλλέγει δεδομένα που μπορούν να υποστηρίξουν ή να αντικρούσουν μια υπόθεση, επομένως, αυτή η έρευνα αναφέρεται επίσης ως έλεγχος υποθέσεων ή επαγωγική ερευνητική μέθοδος.

2.1. Μεθοδολογία

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στη πειραματική έρευνα που πραγματοποιήθηκε είναι αυτή του STA-Procoag-PPL. Η μέθοδος δημιουργήθηκε ειδικά για ερευνητικούς σκοπούς και πιο συγκεκριμένα για να ανιχνεύσει τα Procoagulant Phospholipid (PPL) ή Προπηκτικά φωσφολιπίδια με χρονομετρική μέθοδο, στο πλάσμα ασθενών.

Η μέθοδος αποτελείται από την μέτρηση του χρόνου της πήξης παρουσία ασβεστίου δημιουργώντας ένα σύστημα στο οποίο η προσθήκη του αντιδραστηρίου PPL, αντικαθιστά το πλάσμα και καθιστά τη δοκιμασία εξαρτώμενη από τα προπηκτικά φωσφολιπίδια που υπάρχουν στο προς εξεταζόμενο πλάσμα του ασθενή. Στη δοκιμασία υπάρχει και δεύτερο αντιδραστήριο που συμμετέχει αυτό του παράγοντα – Χα, που ευθύνεται για την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης, δίχως να επηρεάζει τους υπόλοιπους παράγοντες που δρουν στην ενδογενή και εξωγενή οδό. Όσο μεγαλύτερος ο χρόνος του PPL τόσο μεγαλύτερη η αύξηση του αριθμού των προπηκτικών φωσφολιπιδίων στο πλάσμα του ασθενή.

2.2. Επιλογή ασθενών

Οι ασθενείς που επιλέχθηκαν έπασχαν από νεφρική ανεπάρκεια και υποβάλλονταν σε αιμοκάθαρση. Συνολικά συλλέχθηκαν 44 δείγματα από 22 ασθενείς, εκ των οποίων η λήψη των 22 έγινε πριν τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης και των 22 μετά την ολοκλήρωση της. Τα παραπάνω αποτελέσματα συγκρίθηκαν με δείγματα από 16 υγιείς άτομα (μάρτυρες), οι οποίοι έχουν μέση ηλικία τα 44 έτη και δεν αντιμετώπιζαν κάποιο φλεγμονώδες νόσημα ή έκαναν λήψη φαρμάκων την περίοδο που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία.

2.3. Υλικά

- Αναλυτής STA
- Kit STA Procoag-PPL που περιέχει τα 4 απαιτούμενα αντιδραστήρια σε μορφή σκόνης
- Απεσταγμένο νερό
- Δείγματα ασθενών που συλλέχθηκαν σε φιαλίδια με αντιπηκτικό κιτρικό τρινατρίου
- Φυγόκεντρος
- Πουάρ μια χρήσης
- Πιπέτα των 5 mL
- Εξοπλισμός αιμοληψιών (περιχειρίδα, σύριγγες 10 mL, πεταλούδες)

2.4. Διαδικασία

Η διαδικασία της μέτρησης στον αναλυτή STA ξεκίνησε με τον έλεγχο ποιότητας της παρτίδας STA Procoag-PPL χρησιμοποιήθηκε, μέσω των αρνητικών και θετικών control. Αρχικά έγινε η ανασύσταση των controls που βρίσκονταν υπό τη μορφή σκόνης με τη προσθήκη 1 mL απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απαλή περιστροφή των φιαλιδίων, δημιουργήθηκε μια ομοιογενή μορφή και παρέμειναν σε κατάσταση ηρεμίας πριν τη χρήση τους για 30' σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C). Τα control τοποθετήθηκαν σε τυχαίες θέσεις στον αναλυτή STA. Τα αποτελέσματα συμφωνούσαν με τις τιμές που έχει δώσει ο κατασκευαστής και έτσι συνεχίστηκε η πειραματική διαδικασία.

Η μεθοδολογία απαιτούσε πριν την έναρξη της μέτρησης του PPL στα δείγματα των ασθενών να γίνεται η μέτρηση σε τουλάχιστον 15 δείγματα μαρτύρων. Συνολικά έγινε μέτρηση του δείκτη σε 16 δείγματα μαρτύρων, η διαδικασία συλλογής των οποίων ήταν ίδια με αυτή της συλλογής των προς διερεύνηση δειγμάτων.

Η συλλογή των δειγμάτων των ασθενών έγινε ως εξής: Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε φυαλίδια των 4 mL με αντηπηκτικό κιτρικό τρι- νατρίου (trisodium citrate anticoagulant), φυγοκεντρήθηκαν άμεσα, εντός μιας ώρας από τη συλλογή τους για 15 λεπτά στις 2500 στροφές και συλλέχθηκε το υπερκείμενο πλάσμα τους, το οποίο αποθηκεύτηκε θερμοκρασία κατάψυξης περί τους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Τα δείγματα πριν εξεταστούν ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου ($18-25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εμφανίστηκαν στην οθόνη του αναλυτή ως χρόνος (seconds) που αντιστοιχούν στο χρόνο πήξης PPL.

2.5. Περιορισμοί

- Οι ασθενείς που εμφανίζουν χαμηλό ποσοστά του FV, κάτω από 40%, μπορεί να εμφανίσουν ψευδώς παρατεταμένο χρόνο πήξης.
- Η παρουσία αναστολέων της θρομβίνης και αντιπηκτικού λύκου μπορεί να οδηγήσουν σε αποτελέσματα με ψευδώς παρατεταμένο χρόνο πήξης.
- Η δοκιμή STA® Procoag-PPL δεν είναι ευαίσθητη σε επίπεδα μη κλασματοποιημένης ηπαρίνης (έως 1,5 IU/ mL) καθώς και σε επίπεδα ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους έως (2,0 anti-Xa IU/ mL). Οι αναστολείς θρομβίνης και τα αντιπηκτικά του λύκου μπορεί να οδηγήσουν σε αποτελέσματα με ψευδώς παρατεταμένο χρόνο πήξης.

Ακόμη θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και οι συνθήκες λειτουργίας του εργαστηρίου στο οποίο πραγματοποιούνται οι μετρήσεις, καθώς και οι θερμοκρασίες που υπάρχουν τόσο στο χώρο όσο και στη φύλαξη των δειγμάτων.

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της έρευνας αναλύθηκαν μέσω του στατιστικού προγράμματος SPSS v28 (28.0.1) και του προγράμματος excel. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων Ppl στους ασθενείς προ και μετά της αιμοκάθαρσης, η συσχέτιση τους με την ηλικία και η σύγκριση των αποτελεσμάτων με την ομάδα ελέγχου.

3.1. Αποτελέσματα ομάδας Control

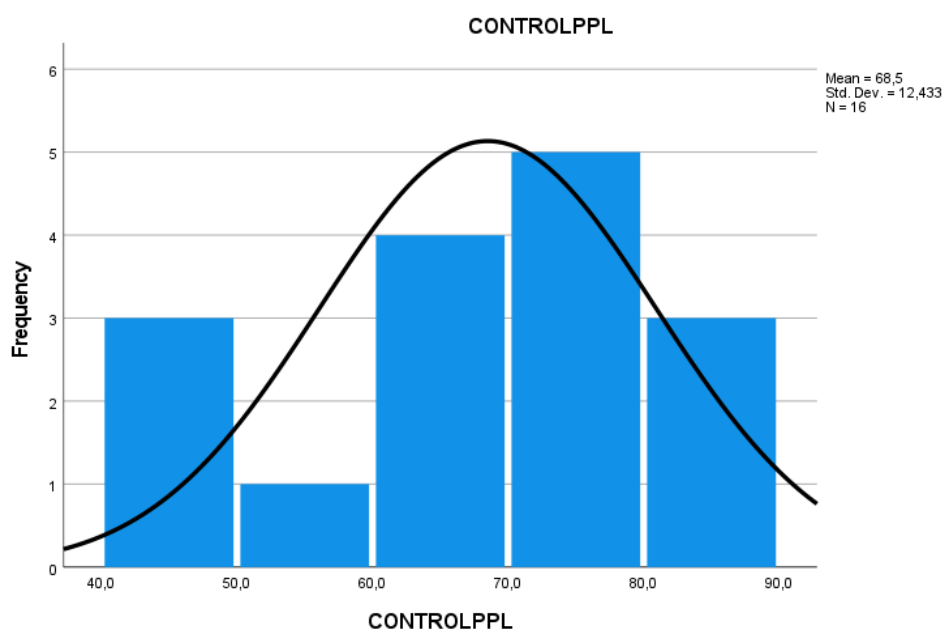
Στο πρώτο μέρος του κεφαλαίου θα παρουσιαστούν σε πίνακες οι στατιστικές αναλύσεις που έγιναν στα δημογραφικά στοιχεία και στα αποτελέσματα της ομάδας control. Τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν αφορούν την ηλικία, τα αποτελέσματα της μέτρησης PPL και τη συσχέτιση των δυο παραμέτρων.

Ηλικίες ατόμων ομάδας control	
N	16
Mean	44έτη
Median	45έτη
Mode	45έτη
Std. Deviation	9,96έτη
Minimum	22έτη
Maximum	58έτη
Sum	704έτη

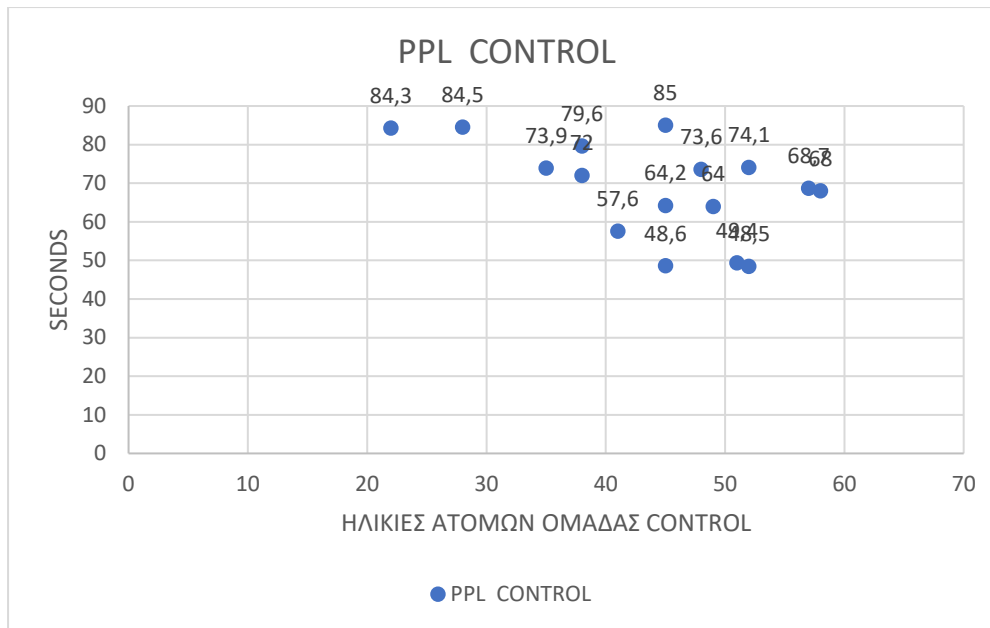
Πίνακας 1: Στατιστικά στοιχεία της ηλικίας των 16 ατόμων που συμμετείχαν στην ομάδα ελέγχου. Η μέση τιμή (mean) των ηλικιών των συμμετεχόντων είναι 44 έτη, η διάμεσος (median) των ηλικιών είναι στα 45 έτη, η τυπική απόκλιση (Std. Deviation) μεταξύ των ηλικιών είναι χαμηλή στο 9,9 με την μικρότερη (minimum) ηλικία να είναι τα 22 έτη και την μεγαλύτερη (maximum) στα 58 έτη.

Αποτελέσματα PPL ομάδας control	
N	16
Mean	68,5sec
Median	70,35sec
Mode	48,5sec
Std. Deviation	12,4326sec
Minimum	48,5sec
Maximum	85sec
Sum	1096sec

Πίνακας 2 Στατιστικά στοιχεία των αποτελεσμάτων των μετρήσεων του PPL στα δείγματα των ατόμων που συμμετείχαν στην ομάδα control. Η μέση τιμή (mean) των χρόνων PPL που μετρήθηκαν ήταν στα 68,5 seconds, η διάμεσος (median) των χρόνων PPL ήταν στα 70,3 seconds, η τυπική απόκλιση (Std. Deviation) μεταξύ των χρόνων βρέθηκε στο 12,4, με τον χαμηλότερο χρόνο (minimum) να καταγράφεται στα 48,5 seconds και τον υψηλότερο (maximum) στα 85 seconds.



Εικόνα 2: Παρουσίαση συχνοτήτων των αποτελεσμάτων PPL (sec) των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Η κατανομή των συχνοτήτων σύμφωνα με την καμπύλη είναι κανονική. Η πλειοψηφία των χρόνων εμφανίζεται σε ένα εύρος 30sec (60 – 90sec) που είναι κοντά στις φυσιολογικές ενώ δεν εμφανίζονται ακραίοι χρόνοι.



Εικόνα 3: Γράφημα διασποράς των αποτελεσμάτων PPL σε συσχέτισμό με την ηλικία των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Η ηλικιακή ομάδα των μαρτύρων ξεκινούσε από τα 20 έτη και έφτανε έως τα 60. Οι νεότεροι μάρτυρες εμφάνισαν μεγαλύτερους χρόνους PPL σε αντίθεση με τους μεγαλύτερους σε ηλικία συμμετέχοντες. Όλες οι τιμές ήταν κοντά στις φυσιολογικούς χρόνους και υπάρχει συνοχή των αποτελεσμάτων.

3.2. Αποτελέσματα ομάδας ασθενών

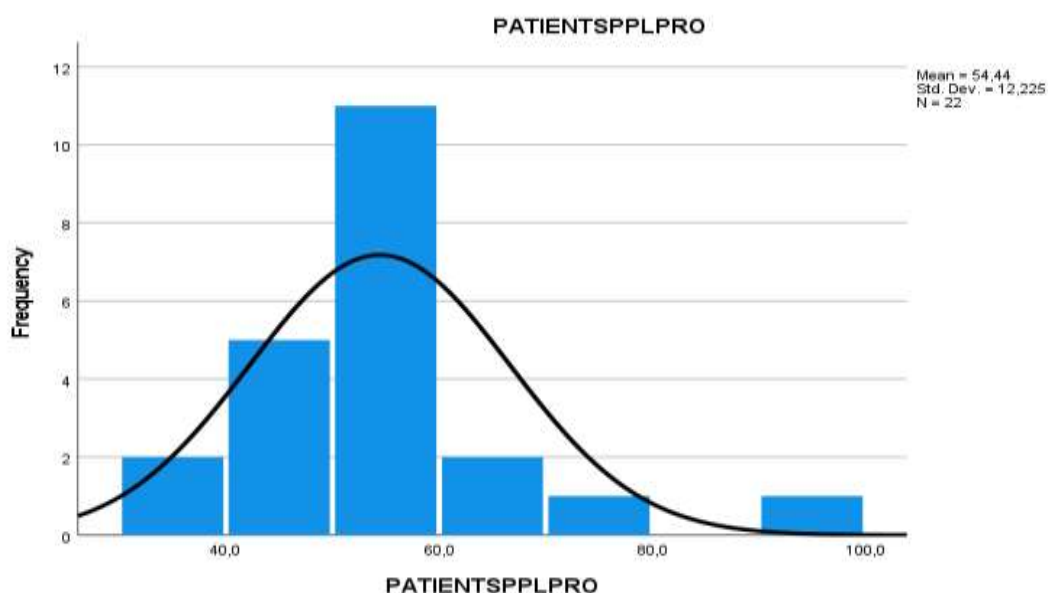
Στο δεύτερο μέρος του κεφαλαίου θα παρουσιαστούν σε πίνακες οι στατιστικές αναλύσεις που έγιναν στα δημογραφικά στοιχεία και στα αποτελέσματα των αναλύσεων του χρόνου PPL στους ασθενείς που συμμετείχαν στην έρευνα. Θα παρουσιαστούν πίνακες για τις μετρήσεις που έγιναν προ την θεραπεία των ασθενών και μετά από αυτή. Τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν αφορούν την ηλικία, τα αποτελέσματα της μέτρησης PPL και τη συσχέτιση των δυο παραμέτρων.

Ηλικίες ασθενών	
N	22
Mean	52,86έτη
Median	53,5έτη
Mode	44έτη
Std. Deviation	7,711έτη
Minimum	34έτη
Maximum	64έτη
Sum	1163έτη

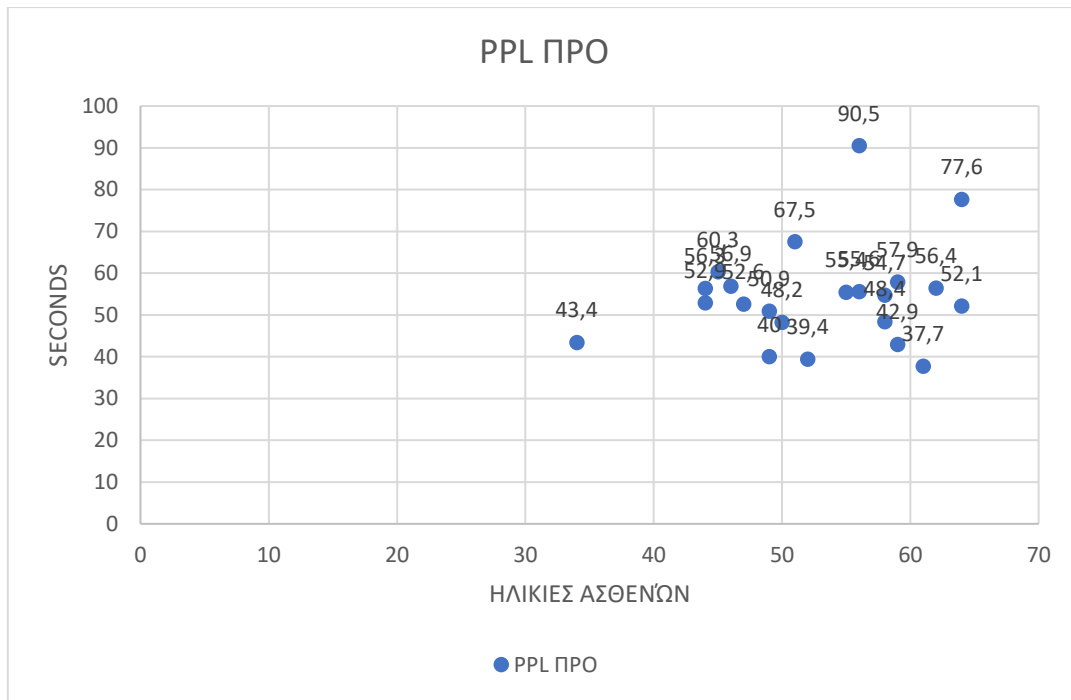
Εικόνα 4: Στατιστικά στοιχεία της ηλικίας των 22 ασθενών που συμμετείχαν στην έρευνα. Η μέση τιμή (mean) των ηλικιών των ασθενών είναι 52 έτη, η διάμεσος (median) των ηλικιών είναι στα 53 έτη, η τυπική απόκλιση (Std. Deviation) μεταξύ των ηλικιών είναι χαμηλή στο 7,7 με την μικρότερη (minimum) ηλικία να είναι τα 34 έτη και την μεγαλύτερη (maximum) στα 64 έτη.

Αποτελέσματα PPL ασθενών Προ θεραπείας	
N	22
Mean	54,436sec
Median	53,8sec
Mode	37,7sec
Std. Deviation	12,225sec
Minimum	37,7sec
Maximum	90,5sec
Sum	1197,6sec

Εικόνα 5: Στατιστικά στοιχεία των αποτελεσμάτων των μετρήσεων του PPL στα δείγματα των ασθενών που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα αίματος Προτού υποβληθούν σε θεραπεία αιμοκάθαρσης. Η μέση τιμή (mean) των χρόνων PPL που μετρήθηκαν ήταν στα 54,4 seconds, η διάμεσος (median) των χρόνων PPL ήταν στα 53,8 seconds, η τυπική απόκλιση (Std. Deviation) μεταξύ των χρόνων βρέθηκε στο 12,2, με τον χαμηλότερο χρόνο (minimum) να καταγράφεται στα 37,7 seconds και τον υψηλότερο (maximum) στα 90,5 seconds.



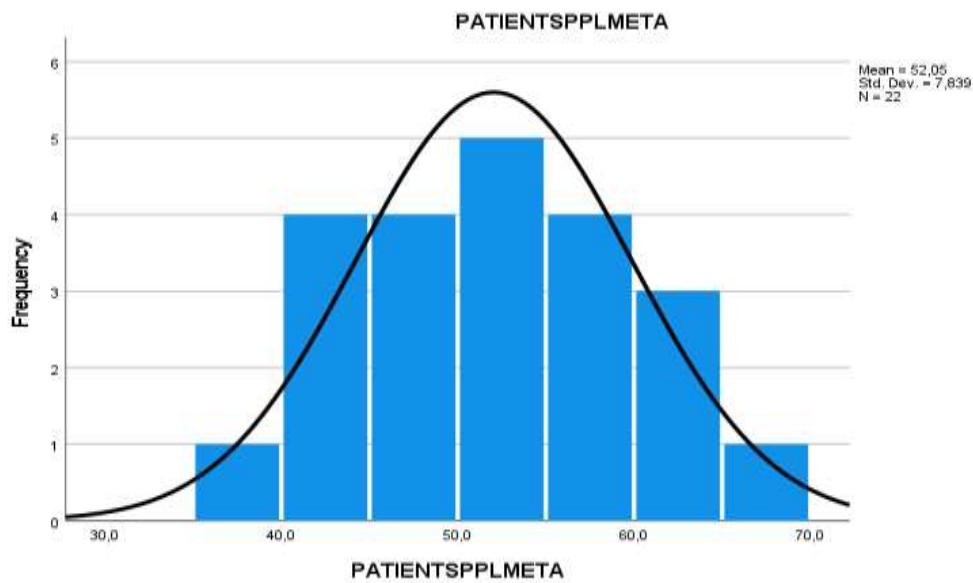
Εικόνα 6: Παρουσίαση συχνότητων των αποτελεσμάτων PPL (sec) των ασθενών που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα αίματος Προτού υποβληθούν σε θεραπεία αιμοκάθαρσης. Η κατανομή των συχνότητων σύμφωνα με την καμπύλη είναι κανονική. Η πλειοψηφία των χρόνων εμφανίζεται σε ένα εύρος 20sec (40 – 60sec). Παρά τις διακυμάνσεις των μετρήσεων, η πλειοψηφία τους βρίσκεται στο μέσο αυτών και δεν επηρεάζεται από τα άκρα.



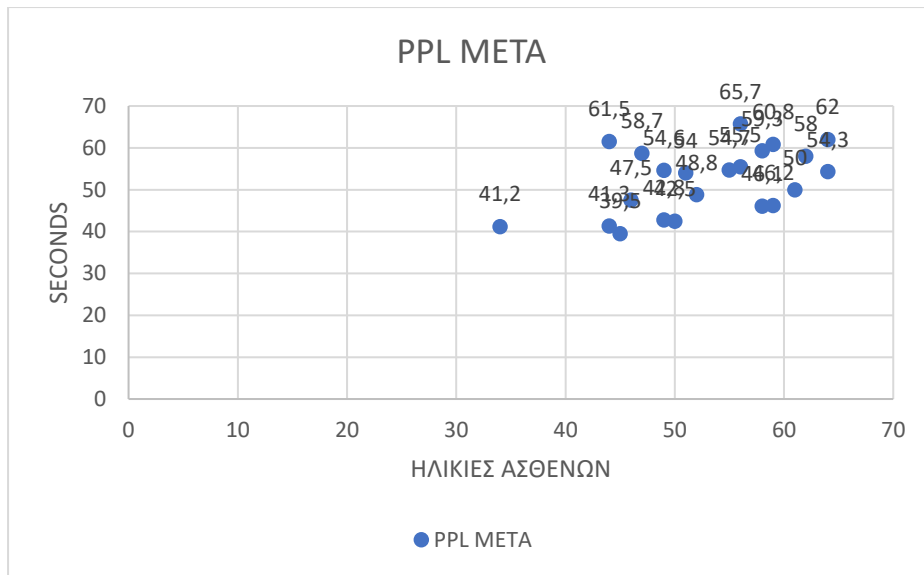
Εικόνα 7: Γράφημα διασποράς των αποτελεσμάτων PPL Προ Θεραπείας σε συσχετισμό με την ηλικία των συμμετεχόντων. Η πλειοψηφία των ασθενών, ηλικίας 42 – 65 έτη, εμφάνισαν χρόνους μεταξύ των 40 – 60 seconds, το οποίο δείχνει συνοχή μεταξύ των αποτελεσμάτων. Υπήρξαν και κάποιοι υψηλότεροι (75 και 85sec) αλλά και χαμηλοί (45sec) χρόνοι, οι οποίοι θεωρούνται ως ακραίες τιμές.

PPL ασθενών Μετά θεραπείας Αποτελέσματα	
N	22
Mean	52,045sec
Median	54,15sec
Mode	39,5sec
Std. Deviation	7,8386sec
Minimum	39,5sec
Maximum	65,7sec
Sum	1145sec

Εικόνα 8: Στατιστικά στοιχεία των αποτελεσμάτων των μετρήσεων του PPL στα δείγματα των ασθενών που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα αίματος Μετά τη θεραπεία αιμοκάθαρσης. Η μέση τιμή (mean) των χρόνων PPL που μετρήθηκαν ήταν στα 52 seconds, η διάμεσος (median) των χρόνων PPL ήταν στα 54,1 seconds, η τυπική απόκλιση (Std. Deviation) μεταξύ των χρόνων βρέθηκε στο 7,8, με τον χαμηλότερο χρόνο (minimum) να καταγράφεται στα 39,5 seconds και τον υψηλότερο (maximum) στα 65,7 seconds.



Εικόνα 9: Παρουσίαση συχνότητων των αποτελεσμάτων PPL (sec) των ασθενών που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα αίματος Μετά τη θεραπεία αιμοκάθαρσης. Η κατανομή των συχνότητων σύμφωνα με την καμπύλη είναι κανονική. Η πλειοψηφία των χρόνων εμφανίζεται σε ένα εύρος 25sec (40 – 65sec). Παρά τις διακυμάνσεις των μετρήσεων, η πλειοψηφία τους βρίσκεται στο μέσο αυτών και δεν επηρεάζεται από τα άκρα



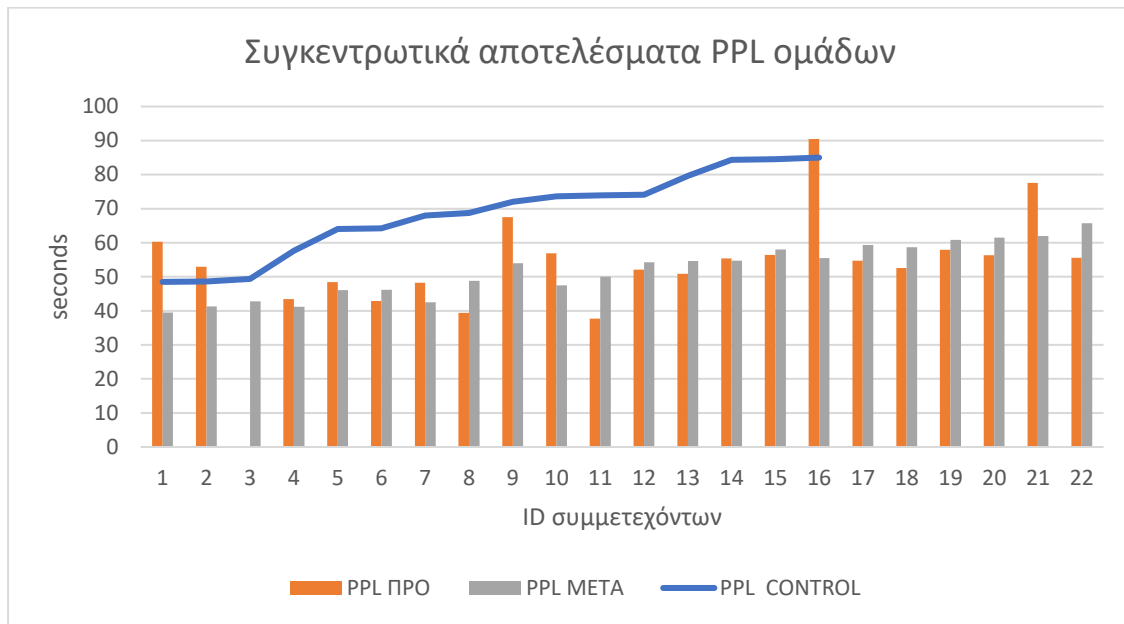
Εικόνα 10: Γράφημα διασποράς των αποτελεσμάτων PPL Μετά Θεραπείας σε συσχετισμό με την ηλικία των συμμετεχόντων. Η πλειοψηφία των ασθενών, ηλικίας 42 – 65 έτη, εμφάνισαν χρόνους μεταξύ των 40 – 65 seconds, το οποίο δείχνει συνοχή μεταξύ των αποτελεσμάτων. Υπήρξαν και κάποιοι χαμηλότεροι και υψηλότεροι χρόνοι οι οποίοι δεν απείχαν από την πλειοψηφία των αποτελεσμάτων.

3.3. Σύγκριση αποτελεσμάτων

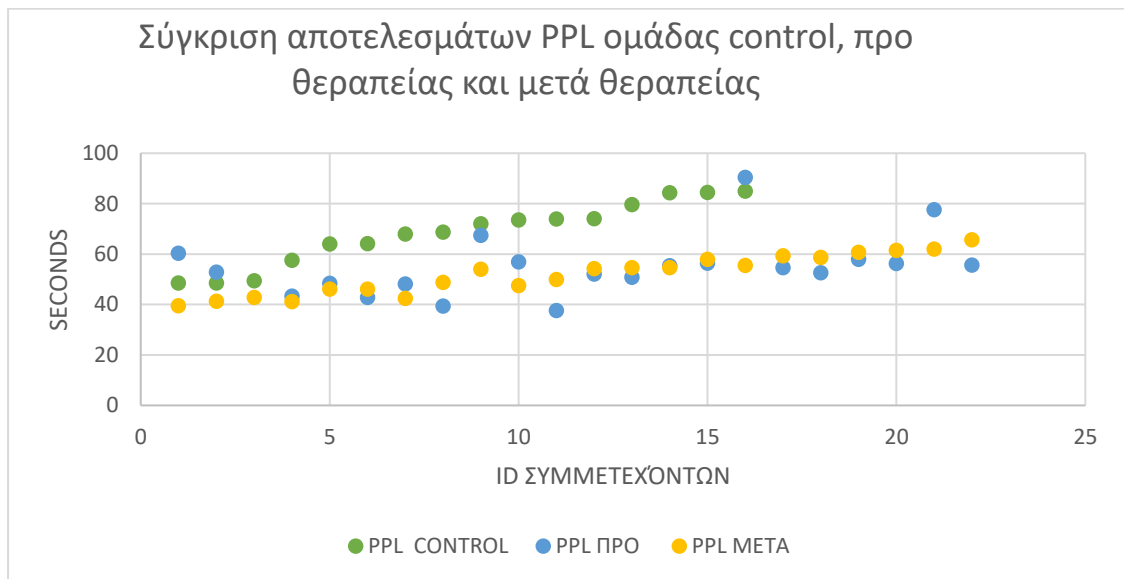
Στο τρίτο μέρος του κεφαλαίου θα παρουσιαστούν οι συγκριτικοί πίνακες των αποτελεσμάτων των χρόνων PPL της ομάδας control και των ασθενών Προ και Μετά τη θεραπεία. Θα συγκριθούν τόσο οι τρεις ομάδες μεταξύ τους όσο και οι διακυμάνσεις των τιμών PPL των ασθενών Προ και Μετά τη θεραπεία.

Στατιστικές διαφορές ομάδων στα αποτελέσματα του PPL			
	PPL ομάδας control	PPL ασθενών Προ θεραπείας	PPL ασθενών Προ θεραπείας
N	16	22	22
Mean	68,5sec	54,436sec	52,045sec
Median	70,35sec	53,8sec	54,15sec
Mode	48,5sec	37,7sec	39,5sec
Std. Deviation	12,4326sec	12,225sec	7,8386sec
Minimum	48,5sec	37,7sec	39,5sec
Maximum	85sec	90,5sec	65,7sec
Sum	1096sec	1197,6sec	1145sec

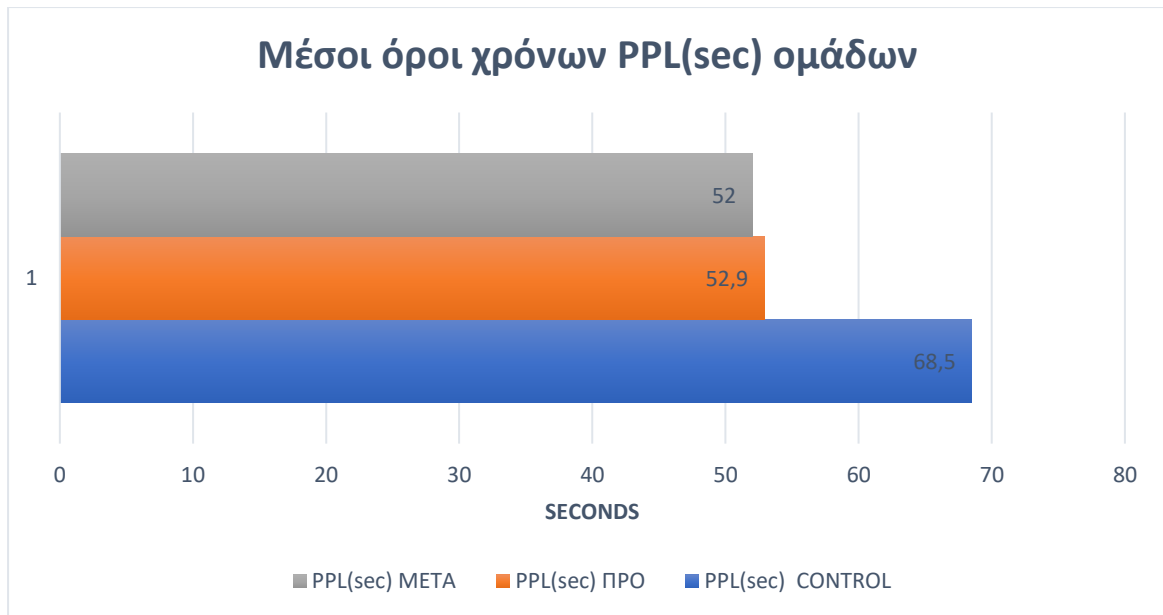
Εικόνα 11: Στατιστικά στοιχεία των αποτελεσμάτων των μετρήσεων του PPL στα δείγματα της ομάδας control και των ασθενών Προ και Μετά τη θεραπεία της αιμοκάθαρσης. Η μέση τιμή (mean) των χρόνων PPL και η διάμεσος (median) είναι υψηλότερη στην ομάδα control με χρόνους 68,5 και 70,3 seconds αντίστοιχα. Η τυπική απόκλιση (Std. Deviation), εμφανίζεται παρόμοια στην ομάδα control και στην ομάδα των ασθενών Προ θεραπεία (12,4 και 12,2). Οι χαμηλότεροι χρόνοι (minimum) βρέθηκαν σε δείγματα ασθενών τόσο Προ όσο και Μετά θεραπεία (37,7 και 39,5 seconds αντίστοιχα) ενώ οι υψηλότεροι (maximum) στην ομάδα control και Προ θεραπείας (85 και 90,5 seconds αντίστοιχα)



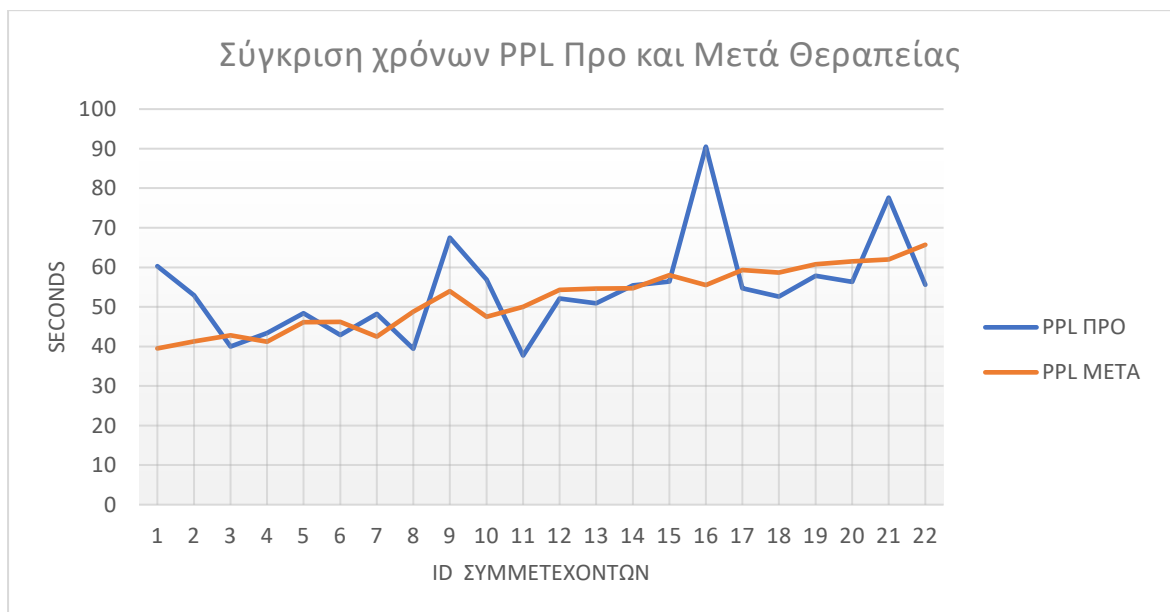
Εικόνα 12: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα όλων των μετρήσεων του PPL στην ομάδα control αλλά και στους ασθενείς Προ και Μετά θεραπείας. Τα άτομα της ομάδας control εμφανίζουν υψηλότερους χρόνους από τις ομάδες των ασθενών. Μεταξύ των ασθενών τα δείγματα που αναλύθηκαν Προ της θεραπείας εμφανίζουν υψηλότερους χρόνους από ότι τα δείγματα που αναλύθηκαν Μετά από αυτή.



Εικόνα 13: Γράφημα διασποράς που δείχνει τους χρόνους των μετρήσεων PPL και των τριών ομάδων (control, ασθενών Προ θεραπείας, ασθενών Μετά θεραπείας). Οι χρόνοι της ομάδας control είναι υψηλότεροι και σε λίγες περιπτώσεις συμπίπτουν με τους χρόνους της ομάδας Προ θεραπείας. Οι ομάδες των ασθενών εμφανίζουν παρόμοιους χρόνους με μικρές διακυμάνσεις μεταξύ τους.



Εικόνα 14: Σύγκριση μέσων χρόνων PPL που έδωσαν οι ομάδες control, ασθενών Προ θεραπείας και ασθενών Μετά θεραπείας. Η ομάδα control εμφανίζει μέσο χρόνο 15,6 seconds μεγαλύτερο από την ομάδα Προ θεραπείας. Οι ομάδες των ασθενών εμφανίζουν παρόμοιο μέσο χρόνο με την ομάδα των ασθενών Προ θεραπείας να έχει υψηλότερο μέσο χρόνο κατά 0,9 seconds.



Εικόνα 15: Σύγκριση αποτελεσμάτων ασθενών Προ και Μετά τη θεραπεία. Παρατηρείται ότι οι χρόνοι PPL μετά τη θεραπεία βρίσκονται σε χαμηλότερους αλλά δίχως διακυμάνσεις χρόνους. Οι χρόνοι των ασθενών Προ θεραπείας βρίσκονται οι περισσότεροι σε παρόμοια επίπεδα, αλλά υπάρχουν και χρόνοι αρκετά αυξημένοι και άλλοτε χαμηλότεροι από τον μέσο όρο

Κεφάλαιο 4: Συζήτηση

Η έρευνα που πραγματοποιήθηκε είχε ως στόχο να συγκρίνει τη μεταβολή του δείκτη Procoagulant Phospholipid (PPL) σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ) και υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση και σε σχέση με τους χρόνους του δείκτη που εμφανίζουν υγιή άτομα. Στόχος ήταν να βρεθεί η διαφορά μεταξύ των ασθενών και υγιών ατόμων καθώς και πόσο επηρεάζεται ο δείκτης PPL από την ηλικία και αν μεταβάλλεται με τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης.

Η εξέλιξη της τεχνολογίας οδήγησε τους ερευνητές στην ανακάλυψη των μικροκυστιδίων (EVs) που κυκλοφορούν στο αίμα και θεωρούνται υπεύθυνα για πληθώρα διεργασιών στον οργανισμό. Σε παθολογικές καταστάσεις τα μικροκυτίδια βρίσκονται σε αυξημένο αριθμό και αυτό τα καθιστά έναν σημαντικό βιοδείκτη. Ωστόσο, δεν ισχύει το ίδιο και για τα βιομόρια που βρίσκονται και απελευθερώνονται στη κυκλοφορία του αίματος ύστερα από την εξωκύττωση τους από τα EVs. Ανάλογα με τη το ιστορικό, τη κλινική εικόνα του ασθενή αλλά και τον τύπο του βιομορίου που ελέγχεται, οι τιμές άλλοτε είναι σε υψηλά και άλλοτε σε χαμηλά επίπεδο.

Τα προπηκτικά φωσφολιπίδια (PPL) ανιχνεύονται στην επιφάνεια των μικροκυστιδίων (EVs) και έχει βρεθεί πως συμμετέχουν σε διαδικασίες ασθενειών όπως οι κακοήθειες, οι καρδιαγγειακές νόσοι, οι φλεγμονές και οι μολυσματικές ασθένειες. Έρευνες έχουν δείξει πως η απομάκρυνση των μικροκυστιδίων καθώς και των μορίων PPL από το πλάσμα ασθενών αλλά και υγιών ατόμων μπορεί να μειώσει σε μεγάλο βαθμό τη πηκτική δραστηριότητα. Είναι φανερό πως ήταν απαραίτητο να εφευρεθεί μια νέα αυτοματοποιημένη μέθοδος μέτρησης του PPL σε δείγματα αίματος (Marchetti, et al., 2013). Η μέθοδος STA – PROCOAG – PPL που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα έρευνα είναι μια τέτοια μέθοδος, η οποία λόγω της αυτοματοποίησης της και της άμεσης απάντησης της σε λίγα μόνο λεπτά, ανοίγει τον δρόμο για την δημιουργία και άλλων αυτοματοποιημένων μεθόδων για την μέτρηση και άλλων μικροκυστιδίων και δεικτών αυτών. Με τη μέθοδο αυτή τα αποτελέσματα του PPL εκφράζονται σε χρόνο και συγκεκριμένα σε δευτερόλεπτα (sec). Όσο μικρότερος είναι ο χρόνος έκφρασης τους τόσο μεγαλύτερη προπηκτική δράση έχει, για αυτό και ως τιμή αναφοράς ορίζεται ένας αρκετά υψηλός χρόνος που είναι στα >80sec (Stago, n.d.).

Η ηλικία των ατόμων που συμμετείχαν στην ομάδα control κυμαίνονταν από 22 έως 58 έτη. Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία που παρουσιάστηκαν στον πίνακα 1, η μέση ηλικία των ατόμων της ομάδας control ήταν τα 44 έτη, με τα στατιστικά στοιχεία των ηλικιών τους να χαρακτηρίζονται από συνοχή, παρόλα αυτά μπορεί να θεωρηθεί πως οι νεότεροι συμμετέχοντες (22 ετών) ήταν αυτοί που ευθύνονται για τις χαμηλότερες τιμές του μέσου όρου και της διαμέσου, καθώς η πλειοψηφία των ατόμων ήταν πιο κοντά στη μέση ηλικία της ομάδας.

Τα αποτελέσματα που δόθηκαν από τις μετρήσεις PPL (Πίνακας 2) των ατόμων της ομάδας control ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων και επιβεβαιώθηκε ότι όλα τα μέλη της ομάδας ήταν κατάλληλα για τη συμμετοχή τους στην παρούσα έρευνα. Κατά τη πλειοψηφία τους η ομάδα ελέγχου έδωσε υψηλούς χρόνους σε PPL έχοντας μέσο χρόνο 68,5sec με τις μετρήσεις τους να κυμαίνονται από τα 48,5 έως τα 85sec. Η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων ήταν στο 12,4 το οποίο δείχνει πως δεν υπήρχε μεγάλος αποκλεισμός μεταξύ των μετρήσεων. Τα 80sec έχουν αναφερθεί ως τιμή αναφορά για το PPL και όπως φαίνεται το γράφημα στην εικόνα 2 η πλειοψηφία των μετρήσεων των μαρτύρων έδωσαν τιμές μεταξύ των 70 και 80 seconds, οι οποίες είναι κοντά στο σημείο αυτό. Συνεπώς, οι μάρτυρες εμφάνισαν υγιές αποτελέσματα, τα οποία ήταν αναμενόμενα λόγω της καλής κατάστασης της υγείας τους. Στην εικόνα δυο είναι φανερό και η κατανομή κατά gauss των μετρήσεων τους, η οποία είναι φυσιολογική, το οποίο επιβεβαιώνει την συνοχή των μετρήσεων. Οι τιμές που εμφανίζονται από τα 40 έως τα 60 seconds και από τα 80 έως τα 90, συγκαταλέγονται στις ακραίες μετρήσεις. Ο αριθμός των ακραίων μετρήσεων είναι μικρός ενώ οι χρόνοι δεν είναι μακριά από τη πλειοψηφία των μετρήσεων, για αυτό και η τυπική απόκλιση αλλά και το γράφημα εμφανίζονται φυσιολογικά και κοινώς αποδεκτά για την έρευνα.

Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται η συσχέτιση των ηλικιών των ατόμων της ομάδας control με τα αποτελέσματα PPL που έδωσαν. Όπως φαίνεται, η ανεξάρτητα από την ηλικία των μαρτύρων, οι χρόνοι των αποτελεσμάτων ήταν κοντά. Ωστόσο, οι νεότεροι ηλικιακά μάρτυρες, συγκεκριμένα ηλικίας 20 – 30 ετών εμφάνισαν υψηλότερους χρόνους σε σχέση με τους μάρτυρες ηλικίας 40 – 50 ετών.

Η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από 16 άτομα, καθώς όπως όριζε το πρωτόκολλο έπρεπε να συμμετέχουν σε αυτή πάνω από 15 άτομα, ώστε να

θεωρηθούν τα αποτελέσματα της αξιόπιστα. Οι προϋποθέσεις για να συμμετέχουν τα άτομα στην ομάδα ελέγχου ήταν τα εξής: να ήταν ενήλικες (άνω των 18 ετών), να μην αντιμετώπιζαν κάποιο φλεγμονώδες νόσημα και να έκαναν λήψη φαρμάκων την περίοδο της συλλογής των δειγμάτων, και ιδιότερα φαρμάκων που επηρεάζουν τη πήκτικότητα του αίματος. Στην ομάδα των ασθενών συμμετείχαν συνολικά 22 άτομα στους οποίους έγινε η μέτρηση PPL στο αίμα πριν την υποβολή τους στη διαδικασία της αιμοκάθαρσης και μετέπειτα σε δείγμα αίματος που πάρθηκε μετά την ολοκλήρωση της θεραπευτικής διαδικασίας. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη συμμετοχή τους ήταν να πάσχουν από ΧΝΑ και να υποβάλλονται σε θεραπεία αιμοκάθαρσης.

Όσο αναφορά τους ασθενείς που συμμετείχαν στην έρευνα, ο μέσος όρος της ηλικίας τους ήταν τα 53. Ο ασθενής με τη μικρότερη ηλικία ήταν 34 χρονών και αυτός με τη μεγαλύτερη 64. Όπως γίνεται φανερό η *minimum* και η *maximum* ηλικία δεν είχαν μεγάλη απόκλιση από τον μέσο όρο, για αυτό και η τυπική απόκλιση ορίστηκε σε χαμηλή τιμή μόλις 7,71. Τα παραπάνω οδηγούν σε δυο συμπεράσματα: Πρώτον πως η επιλογή των συμμετεχόντων έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύψουν ένα μεγάλο ηλικιακό εύρος (από 34 έως 64 έτη) και δεύτερον πως δεν υπήρχαν ακραίες διαφορές, με αποτέλεσμα ο μέσος όρος να βρίσκεται σε τέτοια θέση που να μπορεί η ανάγνωση του να καλύψει πλήρως όλο το εύρος των ηλικιών.

Όσο αναφορά τα αποτελέσματα των μετρήσεων PPL στους ασθενείς αυτά εμφάνισαν διαφορές στο χρόνο Προ και Μετά τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης. Συγκεκριμένα ο μέσος χρόνος των μετρήσεων Προ θεραπείας ήταν τα 54,4 seconds με τον υψηλότερο χρόνο να είναι τα 90,5 seconds και το χαμηλότερο τα 37,7 seconds (Εικόνα 5), ενώ στις μετρήσεις μετά τη θεραπεία ο μέσος χρόνος ήταν 52 seconds με τον υψηλότερο χρόνο να είναι τα 65,7 seconds και το χαμηλότερο τα 39,5 seconds (Εικόνα 8). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων εκ πρώτης όψεως δείχνει πως δεν υπήρχαν μεγάλες διαφορές στις μετρήσεις και πως η διαδικασία της αιμοκάθαρσης δεν επηρέασε σε μεγάλο βαθμό τη δράση των μικροκυστιδίων PPL. Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται και στην εικόνα 7, η πλειοψηφία των ασθενών ανεξαρτήτου ηλικίας Προ τη θεραπεία εμφάνισαν χρόνους μεταξύ των 40 – 70 seconds. Από την άλλη πλευρά, οι ίδιοι ασθενείς μετά τη διαδικασία της

αιμοκάθαρσης εμφάνισαν χρόνους σε ίδια χρονικό διάστημα, ωστόσο έλειπαν οι υψηλές μετρήσεις πάνω από τα 66 seconds.

Οι τιμές του PPL των ασθενών είναι χαμηλές και μακριά από τιμή αναφοράς των 80sec. Αυτό αποδεικνύει πως οι ασθενείς με ΧΝΑ αντιμετωπίζουν προβλήματα πήκτικότητας ή έχουν προδιάθεση να αποκτήσουν. Το παραπάνω συμπέρασμα είναι απόρροια των μέχρι τώρα πληροφοριών που υπάρχουν σχετικά με τη δράση του PPL. Πιο αναλυτικά, το PPL είναι σημαντικό για την διαδικασία της πήξης στον οργανισμό καθώς επηρεάζει πολλούς παράγοντες. Όσο μεγαλύτερη είναι η έκφραση του PPL στα EVs τόσο ευκολότερα συγκεντρώνονται και δρουν οι παράγοντες πήξης κατά τη διαδικασία της απόπτωσης ή της κυτταρικής ενεργοποίησης (Tavoosi, et al., 2011). Συγκεκριμένα, είναι απαραίτητο σε πολλά στάδια της διαδικασίας της αιμόστασης και κυρίως στη κοινή οδό του ενδογενούς και εξωγενούς μονοπατιού όπου γίνεται η μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη από τον παράγοντα πήξης FXa. Συγκεκριμένα το PPL αυξάνει τη δραστηριότητα του συμπλόκου του ιστικού παράγοντα (Tissue Factor – TF), της εξωγενούς τενάσης και του παράγοντα FVIIa. Παρόλα αυτά, οι έρευνες σχετικά με τη δράση του θα πρέπει να συνεχιστούν καθώς οι πληροφορίες που υπάρχουν είναι ακόμη ελάχιστες (van Dreden, Rousseau, Fontaine, Woodhams, & Exner, 2009). Σε έρευνα που είχε γίνει σε ασθενείς που έπασχαν από μια γενετική διαταραχή τη πρωτοπαθή θρομβοκυτταραιμία που μεταβάλλει τα αιμοπετάλια και επηρεάζει άμεσα τη πήκτικότητα του αίματος, ο δείκτης του PPL στους ασθενείς βρέθηκε σε χαμηλούς χρόνους σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου (Ramberg, et al., 2021).

Στο τρίτο μέρος της έρευνας έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων των ασθενών και των μετρήσεων τους Προ και Μετά τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης και των υγιών ατόμων που συμμετείχαν στην ομάδα control. Στην εικόνα 13 φαίνεται συγκριτικά η κάθε μέτρηση ξεχωριστά για κάθε ομάδα. Οι τιμές των ομάδων των ασθενών κυμαίνονται σε παρόμοια επίπεδα ενώ η ομάδα των μαρτύρων εμφανίζει υψηλότερους χρόνους. Δεν καταγράφηκαν ακραίες χαμηλές τιμές σε καμία από τις δυο ομάδες των ασθενών ενώ δυο ακραίες υψηλές τιμές που εμφανίζονται ομάδα προ θεραπείας στα 90,5 και 77,6 sec δεν μπορούν να οδηγήσουν σε κάποιο συμπέρασμα σχετικά με την επιρροή της αιμοκάθαρσης στο δείκτη του PPL, καθώς ανήκουν στις ακραίες τιμές και δεν λαμβάνονται υπόψη στο τελικό συμπέρασμα. Οι

μέσοι χρόνοι των μετρήσεων των τριών ομάδων μπορούν να οδηγήσουν σε μια πιο καθαρή εικόνα. Σύμφωνα με την εικόνα 14, ο μέσος χρόνος των μαρτύρων είναι 12 seconds υψηλότερα από τις μετρήσεις της ομάδας των ασθενών. Ωστόσο, οι μετρήσεις των ασθενών μετά τη θεραπεία, δείχνουν μια μικρή πτώση της τάξης των 0,9 seconds.

Συμπέρασμα

Το PPL αποτελεί έναν προπηκτικό παράγοντα και συμμετέχει ενεργά σε διαδικασίες της πήξης. Η μέτρηση του γίνεται σε χρόνους και συγκεκριμένα σε δευτερόλεπτα, με τα 80 seconds να θεωρούνται ως χρόνος αναφοράς, βάση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας. Το PPL αποτελεί έναν νέο δείκτη πήκτικότητας και κατατάσσεται στην κατηγορία των μικροκυστιδίων. Λόγω της νεότητας του θα πρέπει να διερευνηθεί η αξία που έχει ως βιοδείκτης σε διαγνωστικό επίπεδο σαν προθρομβωτικός δείκτης, σε προγνωστικό επίπεδο σαν πρώιμος δείκτης ασθενειών και σε θεραπευτικό επίπεδο σαν δείκτης παρακολούθησης και ανταπόκρισης των ασθενών στις θεραπείες. Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο να παρουσιάσει τις διακυμάνσεις του προπηκτικού φωσφολιπιδικού παράγοντα PPL που βρίσκεται στην επιφάνεια των μικροκυστιδίων σε ασθενείς που πάσχουν από ΧΝΑ και υποβάλλονται σε θεραπεία αιμοκάθαρσης και κατά πόσο οι χρόνοι διαφέρουν από τους αυτούς των υγιών ατόμων.

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν πως πράγματι οι ασθενείς με ΧΝΑ που εμφανίζουν πήκτικές διαταραχές λόγω της κατάστασης τους, έχουν χαμηλούς χρόνους PPL σε αντίθεση με τα υγιή άτομα. Η διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων ήταν στα 12sec, αρκετά για να θεωρηθεί το μόριο υπεύθυνο για τις θρομβωτικές ανωμαλίες που μπορεί να υπάρχουν. Παρόλα αυτά, για να μπορέσει να βγει ένα ορθό συμπέρασμα, θα πρέπει να εξεταστούν και οι υπόλοιποι πήκτικοί παράγοντες, η κλινική εικόνα και να γίνει συνεκτίμηση και με άλλα μόρια. Αξίζει να σημειωθεί πως δεν υπήρχε διαφορά στο στους χρόνους που εμφάνισαν οι ασθενείς πριν και μετά τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης, το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα πως η αιμοκάθαρση δεν μπορεί να μεταβάλλει τον χρόνο του PPL των ασθενών.

Όσον αναφορά την επιρροή της ηλικίας στο χρόνο του PPL, θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι οι ασθενείς ήταν κατά μέσο 10 χρόνια μεγαλύτεροι σε ηλικία από ότι τα υγιή άτομα. Αυτό κατά έναν τρόπο οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα νεότερα άτομα και δη τα υγιή έχουν φυσιολογικούς χρόνους PPL αρά δεν αντιμετωπίζουν κάποια πηκτική διαταραχή. Παρόλα αυτά, αν ληφθεί υπόψιν το γεγονός πως η ομάδα ελέγχου πέρα από μεγαλύτερης ηλικίας αποτελούνταν από ασθενείς με ΧΝΑ, τότε είναι δύσκολο να ληφθεί κάποιο συμπέρασμα, καθώς η δυσμενή κατάσταση στην οποία βρίσκονται επηρεάζει τη πήξη σε οποιαδήποτε ηλικία και να βρίσκονται. Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπήρχαν σημαντικές στατιστικές διαφορές στις ηλικίες μεταξύ των ατόμων που απάρτιζαν την κάθε ομάδα και αυτό είναι καλό καθώς δείχνει πως υπήρχε συνοχή του συνόλου.

Συμπερασματικά, ο δείκτης PPL μπορεί να αποτελέσει ένα πολύ σημαντικό βιοδείκτη για τις θρομβωτικές διαταραχές επομένως η δράση του μπορεί να χαρακτηριστεί ως θρομβογόνος. Στους ασθενείς με ΧΝΑ βρέθηκε μειωμένος έναντι στην ομάδα υγιών μαρτύρων. Ωστόσο, χρειάζονται να πραγματοποιηθούν περαιτέρω έρευνες, σχετικά με την επιρροή της ηλικίας στον βιοδείκτη τόσο σε ασθενείς όσο και σε υγιή άτομα καθώς και πόσο επηρεάζει και επηρεάζεται από άλλους δείκτες και παθήσεις.

Αναφορές

- Abbasi, M., Chertow, G. M., & Hall, Y. N. (2010). End-stage renal disease. *BMJ clinical evidence*, σ. 4200. doi:10.1007/978-0-387-78665-0_5585
- Akchurin, O. M., & Kaskel, F. (2015). Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purification*, 39(1-3), 84-92. doi:10.1159/000368940
- AlYousef, A., AlSahow, A., AlHelal, B., Alqallaf, A., Abdallah, E., Abdellatif, M., . . . Elmahalawy, R. (2020). Glomerulonephritis histopathological pattern change. *BMC Nephrology*, 21(1). doi:10.1186/s12882-020-01836-3
- Ammirati, A. L. (2020). Chronic kidney disease. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 66(1). doi:10.1590/1806-9282.66.s1.3
- Andolino, T. P., & Reid-Adam, J. (2015). Nephrotic syndrome. *Pediatrics in Review*, 117-126. doi:10.1542/pir.36-3-117
- Auger, C., Brunel, A., Darbas, T., Akil, H., Perraud, A., Bégaud, G., . . . Verdier, M. (2022). Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis: A different appreciation of up and down secretion. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), σ. 2310. doi:10.3390/ijms23042310
- Avramovic, M., & Vladisav, S. (2012). Health-Related Quality of Life in Different Stages of Renal Failure. *Artificial Organs*, 36(7), 581-589. doi:10.1111/j.1525-1594.2011.01429.x
- Bachurski, D., Schuldner, M., Nguyen, P.-H., Malz, A., Reiners, K. S., Grenzi, P. C., . . . Pogge von Strandmann, E. (2019). Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis – an accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and zetaview. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1). doi:10.1080/20013078.2019.1596016
- Basile, D. P., Anderson, M. D., & Sutton, T. A. (2012). Pathophysiology of acute kidney injury. *Comprehensive Physiology*, σσ. 1303 - 1353. doi:10.1002/cphy.c110041
- Bayda, S., Adeel, M., Tiziano, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2020, 1). The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules*, 25(1). doi:10.3390/molecules25010112
- Braun, M., & Khayat, M. (2021, 10). Kidney Disease: End-Stage Renal Disease. *FP Essent*(509), 26-32. doi:PMID: 34643362
- Broos, K., Feys, H., De Meyer, S., Vanhoorelbeke, K., & Deckmyn, H. (2011). Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews*, 25(4), 155-167. doi:10.1016/j.blre.2011.03.002

- Cantarin, M. P., & McCauley, J. (2018). Epidemiology of end-stage renal disease and kidney transplantation. *Contemporary Kidney Transplantation*, σσ. 335-341. doi:10.1007/978-3-319-19617-6_24
- Chapin, J. C., & Hajjar, K. A. (2015). Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*, 29(1), 17-24. doi:10.1016/j.blre.2014.09.003
- Chargaff, E. (1945). Cell structure and the problem of Blood Coagulation. *Journal of Biological Chemistry*, 160(1), 351-359. doi:10.1016/s0021-9258(18)43131-6
- Cijiang He, J., Chuang, P. Y., Ma'Ayan, A., & Ravi, I. (2012). Systems biology of kidney diseases. *Kidney International*, 81(1), 22-39. doi:10.1038/ki.2011.314
- Clemmens, H., & Lambert, D. W. (2018). Extracellular vesicles: Translational challenges and opportunities. *Biochemical Society Transactions*, 46(5), σσ. 1073-1082. doi:10.1042/bst20180112
- Couch, Y., Buzàs, E. I., Di Vizio, D., Gho, Y. S., Harrison, P., Hill, A. F., . . . Carter, D. R. (2021). A brief history of nearly ev-erything – the rise and rise of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(14), 1-12. doi:10.1002/jev2.12144
- Couser, W. G. (2016). Pathogenesis and treatment of glomerulonephritis-an update. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 38(1). doi:10.5935/0101-2800.20160016
- Couzin, J. (2005). The Ins and outs of exosomes. *Science*, 308(5730), σσ. 1862-1863. doi:10.1126/science.308.5730.1862
- Crawford, N. (1971). The presence of contractile proteins in platelet microparticles isolated from human and animal platelet-free plasma. *British Journal of Haematology*, 21(1), 53-59. doi:10.1111/j.1365-2141.1971.tb03416.x
- D'Alessio, S., Genua, M., & Vetrano, S. (2012). The protein C pathway in intestinal barrier function: Challenging the hemostasis paradigm. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1258(1), σσ. 78-85. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06557.x
- Danckwardt, S., Hentze, M. W., & Kulozik, A. E. (2013). Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: Thrombin in hemostasis, cancer, and beyond. *Journal of Molecular Medicine*, 91(11), σσ. 1257-1271. doi:10.1007/s00109-013-1074-5
- Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J., Hole, P., . . . Sargent, I. L. (2011, April 11). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, σσ. 780-788. doi:10.1021/acsnano.8b07215
- Franchini, M., Lippi, G., & Falavero, E. (2014). Aging hemostasis: Changes to laboratory markers of hemostasis as we age—a narrative review. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 40(6), σσ. 621-633. doi:10.1055/s-0034-1384631

- Franssen, C. F., De Vries, C. S., & McGrogan, A. (2011, 2). The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(2), 414-430. doi:10.1093/ndt/gfq665
- Hudson, K. B., & Sinert, R. (2011). Renal failure: Emergency evaluation and management. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 29(3), σσ. 569-585. doi:10.1016/j.emc.2011.04.005
- Ismail, A. F., Abidin, M. N., Mansur, S., Zailani, Z. M., Said, N., Raharjo, Y., . . . Hasbullah, H. (2019). Hemodialysis membrane for blood purification process. *Membrane Separation Principles and Applications*, 283-314. doi:10.1016/b978-0-12-812815-2.00009-0
- Jalal, D., Chonchol, M., & Targher, G. (2010). Disorders of hemostasis associated with chronic kidney disease. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36(1), σσ. 34-40. doi:10.1055/s-0030-1248722
- Jean-Philippe, R., & Prasad, D. (2019). Acute Kidney Injury: Diagnosis and Management. *The Indian Journal of Pediatrics*, 87(8), 600-607. doi:10.1007/s12098-019-03096-y
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, 262(19), 9412-9420. doi:10.1016/s0021-9258(18)48095-7
- Kasthuri, R., Glover, S., Boles, J., & Mackman, N. (2010). Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor as key regulators of global hemostasis: Measurement of their levels in coagulation assays. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36(7), σσ. 764-771. doi:10.1055/s-0030-1265293
- Koza, Y. (2016, 1 8). Acute kidney injury: Current concepts and New Insights. *Journal of Injury and Violence Research*, 58-62. doi:10.5249/jivr.v8i1.610
- Laura, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7), σ. 727. doi:10.3390/cells8070727
- Leroyer, A. S., Tedgui, A., & Boulanger, M. C. (2008, 4 10). Role of microparticles in atherothrombosis. *Journal of Internal Medicine*, 263(5), σσ. 528 -537. doi:10.1111/j.1365-2796.2008.01957.x
- Levey, S. A., & Coresh, J. (2012, 1 14). Chronic kidney disease. *The Lancet*(379), 165 - 180. doi:10.1016/s0140-6736(11)60178-5
- Levy, J., Szlam, F., Tanaka, K., & Sniecinski, R. (2012). Fibrinogen and hemostasis. *Anesthesia & Analgesia*, 144(2), 261-274. doi:10.1213/ane.0b013e31822e1853

- Lippi, G., Franchini, M., & Favaloro, E. J. (2016). Diagnostics of Inherited Bleeding Disorders of Secondary Hemostasis: An Easy Guide for Routine Clinical Laboratories. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 42(5), 471-477. doi:10.1055/s-0036-1571311
- Liyanage, T., Ninomiya, T., & Jha, V. (χ.χ.). Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: A systematic review. *Journal of Vascular Surgery*, 62(4), σ. 1089. doi:10.1016/j.jvs.2015.08.003
- Ma, Y., Cai, F., Li, Y., Chen, J., Han, F., & Lin, W. (2020). A review of the application of nanoparticles in the diagnosis and treatment of chronic kidney disease. *Bioactive Materials*, 5(3), 732-743. doi:10.1016/j.bioactmat.2020.05.002
- Magnani, S., & Atti, M. (2021). Uremic toxins and blood purification: A review of current evidence and future perspectives. *Toxins*, 13(4), σ. 246. doi:10.3390/toxins13040246
- Margetic, S. (2012). Inflammation and hemostasis. *Biochemia Medica*, 22(1), σσ. 49-62. doi:10.11613/bm.2012.006
- Masri, H., & Raynes, J. K. (2019). Nanoparticle tracking analysis of β-casein nanocarriers. *Methods in Molecular Biology*, σσ. 301-309. doi:10.1007/978-1-4939-9869-2_16
- McMichael, M. (2012). New models of hemostasis. *Topics in Companion Animal Medicine*, 27(2), σσ. 40-45. doi:10.1053/j.tcam.2012.07.005
- Morel, O., Toti, F., Hugel, B., Bakouboula, B., Camoin-Jau, L., Dignat-George, F., & Freyssinet, J.-M. (2006). Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(12), 2594-604. doi:10.1161/01.ATV.0000246775.14471.26
- Müller, F., & Renné, T. (2011). Platelet polyphosphates: The nexus of primary and secondary hemostasis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 71(2), 82-86. doi:10.3109/00365513.2010.550312
- Muto, M., Chakraborty, D., Varberg, K., Moreno-Irusta, A., Iqbal, K., Scott, R., . . . Soares, M. (2021). Intersection of regulatory pathways controlling hemostasis and hemochorial placentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(50). doi:10.1073/pnas.2111267118
- Nunez, E. A., Wallis, J., & Gershon, M. D. (1974). Secretory processes in follicular cells of the bat thyroid. III. the occurrence of extracellular vesicles and colloid droplets during arousal from hibernation. *American Journal of Anatomy*, 141(2), 179-201. doi:10.1002/aja.1001410203
- Olsen, E., & van Galen, G. (2022). Chronic renal failure-causes, clinical findings, treatments and prognosis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 38(1), 25-46. doi:10.1016/j.cveq.2021.11.003

- Osborn, J. W., Tyshynsky, R., & Vulchanova, L. (2021). Function of renal nerves in kidney physiology and pathophysiology. *Annual Review of Physiology*, *83*(1), σσ. 429-450. doi:10.1146/annurev-physiol-031620-091656
- Park, S. J., & Shin, J. I. (2011). Complications of nephrotic syndrome. *Korean Journal of Pediatrics*, *54*(8), σ. 322. doi:10.3345/kjp.2011.54.8.322
- Periayah, M. H., Halim, A. S., & Saad, A. Z. (2016). Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, *11*(4), σσ. 319-327. doi:PMID: 29340130
- Puy, C., Rigg, R. A., & McCarty, O. J. (2016). The hemostatic role of factor XI. *Thrombosis Research*, *141*(2), σσ. 8-11. doi:10.1016/s0049-3848(16)30354-1
- Raposo, G., & Stahl, P. D. (2019). Extracellular vesicles: A new communication paradigm? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(9), σσ. 509-510. doi:10.1038/s41580-019-0158-7
- Raposo, G., Nijman, H., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, V. C., Melief, J. C., & Geuze, J. H. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, *183*(3), 1161 -1172. doi:10.1084/jem.183.3.1161
- Roy, S., Hochberg, F. H., & Jones, P. S. (2018). Extracellular vesicles: The growth as diagnostics and Therapeutics; a survey. *Journal of Extracellular Vesicles*, *7*(1). doi:10.1080/20013078.2018.1438720
- Satoskar, A. A., Parikh, S. V., & Nadasdy, T. (2019). Epidemiology, pathogenesis, treatment and outcomes of infection-associated glomerulonephritis. *Nature Reviews Nephrology*, *16*(1), σσ. 32-50. doi:10.1038/s41581-019-0178-8
- Sethi, S., & Fervenza, F. C. (2019, 2). Standardized Classification and reporting of Glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *23*(4), 193-199. doi:10.1093/ndt/gfy220
- Silmore, K. S., Gong, X., Strano, M. S., & Swan, J. W. (2019). High-Resolution Nanoparticle Sizing with Maximum A Posteriori Nanoparticle Tracking Analysis. *ACS Nano*, *13*(4), σσ. 3940 - 3952. doi:10.1021/acsnano.8b07215
- Turner, J. M., Bauer, C., Abramowitz, M. K., Melamed, M. L., & Hostetter, T. H. (2012). Treatment of chronic kidney disease. *Kidney International*, *81*(4), 351-362. doi:10.1038/ki.2011.380
- van den Goor, J. M., Nieuwland, R., Rutten, P. M., Tijssen, J. G., Chi, H., Sturk, A., . . . de Mol, B. A. (2007). Retransfusion of pericardial blood does not trigger systemic coagulation during cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg*, *31*(6), σσ. 1029-36. doi:10.1016/j.ejcts.2007.02.016

- Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W., Levi, M., & Reitsma, P. H. (2013). New Fundamentals in Hemostasis. *Physiological Reviews*, *93*(1), 237 - 358. doi:10.1152/physrev.00016.2011
- Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W., Levi, M., & Reitsma, P. H. (2013). New Fundamentals in Hemostasis. *Physiological Reviews*, *93*(1), σσ. 327-358. doi:10.1152/physrev.00016.2011
- Wang, C.-s., & Greenbaum, L. A. (2019). Nephrotic syndrome. *Pediatric Clinics of North America*, *66*(1), σσ. 73-85. doi:10.1016/j.pcl.2018.08.006
- Westerman, M., & Porter, J. B. (2016). Red blood cell-derived microparticles: An overview. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, σσ. 134-139. doi:10.1016/j.bcmed.2016.04.003
- Willms, E., Johansson, H. j., Mäger, I., Lee, Y., Blomberg, E. K., Sadik, M., . . . Vader, P. (2016). Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific Reports*, *6*(1). doi:10.1038/srep22519
- Witwer, K. W., & Théry, C. (2019). Extracellular vesicles or exosomes? on primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. *Journal of Extracellular Vesicles*, *8*(1). doi:10.1080/20013078.2019.1648167
- Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*, *13*(3), 269-288. doi:10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x
- Xiong, Q.-h., Zhao, L., Wan, G.-q., Hu, Y.-g., & Li, X.-l. (2023, 1 4). Exosomes derived from mesenchymal stem cells overexpressing mir-210 inhibits neuronal inflammation and contribute to neurite outgrowth through modulating microglia polarization. *Open Medicine*, *18*(1). doi:10.1515/med-2022-0618
- Zhang, H., Freitas, D., Kim, H. S., Fabijanic, K., Li, Z., Chen, H., . . . Lyden, D. (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation. *Nature Cell Biology*, *20*(3), σσ. 332-343. doi:10.1038/s41556-018-0040-4
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., . . . Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell derived exosomes. *Nature Medicine*, *4*(5), 594-600. doi:10.1038/nm0598-594