



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

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός και προπηκτική δραστικότητα κυστιδίων
πλάσματος σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου υπό θεραπεία
αιμοκάθαρσης

Κυριακή Καϊταλίδου

A.M.:62117079

Ονοματεπώνυμο Επιβλέποντα

Χαρά Γεωργατζάκου

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2021



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Medical Laboratories

GRADUATE THESIS

Immunophenotypic characterization and procoagulant activity of plasma vesicles in patients with Chronic Kidney Disease undergoing hemodialysis treatment.

NAME OF STUDENT

Kyriaki Kaitalidou

kaitalidoy@gmail.com

NAME OF THE SUPERVISOR

Hara Georgatzakou

Athens, September 2021



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

Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός και προπηκτική δραστικότητα κυστιδίων πλάσματος σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου υπό θεραπεία αιμοκάθαρσης

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

Α/α	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΧΑΡΑ ΓΕΩΡΓΑΤΖΑΚΟΥ	Ακαδ. Υπότροφος	
2	ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΚΡΙΕΜΠΑΡΔΗΣ	Αν. Καθηγητής	
3	ΕΥΣΤΑΘΙΑ ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ	Καθηγήτρια	

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κυριακή Καϊταλίδου του Τριαντάφυλλου, με αριθμό μητρώου 62117079, φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

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

Η Δηλούσα

Κυριακή Καϊταλίδου

(Υπογραφή)

Ευχαριστίες

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Δρ. Χαρά Γεωργατζάκου για την πολύτιμη βοήθεια της αλλά και για την υπομονή, τις χρήσιμες συμβουλές και την συνολική καθοδήγηση.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κριεμπάρδη Αναστάσιο για την φιλοξενία στον εργαστηριακό του χώρο και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου έχει προσφέρει στη διάρκεια των σπουδών μου.

Ευχαριστώ πολύ τον Δρ. Φόρτη Σωτήρη για τον χρόνο που αφιέρωσε για την εκμάθηση μου στο κυτταρόμετρο ροής αλλά και την συνολική του συμβολή στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την στήριξη και την αγάπη τους.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	9
1.1.Χρονια νεφρική Ανεπάρκεια.....	9
1.1.1 Ορισμός.....	9
1.1.2. Αίτια	9
1.1.3. Ουραιμικό σύνδρομο.....	10
1.1.4. Θεραπεία.....	10
1.1.5. Διαταραχές της νόσου	11
1.2. Κυστίδια.....	15
1.2.1 Ορισμός.....	15
1.2.2 Εξωσώματα	16
1.2.3 Μικροσωματίδια ή μικροκυστίδια	16
1.2.5. Περιεχόμενο των διαφόρων τύπων κυστιδίων.....	18
1.3. Κυστίδια προερχόμενα από ερυθροκύτταρα	18
1.3.1 Κυστιδοποίηση ερυθροκυττάρων λόγω μειωμένης συγκέντρωσης ATP.....	18
1.3.2 Κυστιδοποίηση ερυθροκυττάρων λόγω αυξημένου Ca ++	19
1.3.3 Κυστιδοποίηση ερυθροκυττάρων λόγω οξειδωτικού στρες	20
1.3.4 Ρόλος.....	20
1.4. Κυστίδια προερχόμενα από αιμοπετάλια	21
1.4.1 Πότε κυστιδοποιούνται	21
1.4.2 Ρόλος.....	21
1.5. Κυστίδια στη ΧΝΑ.....	22
1.6. Διαδικασία πήξης αίματος	23
1.6.1 Συμμετοχή ερυθροκυττάρων στη διαδικασία της πήξης.....	23
1.6.2 Συμμετοχή αιμοπεταλίων στη διαδικασία της πήξης.....	24
1.6.3 Συμμετοχή κυστιδίων στη διαδικασία της πήξης	24
2. Σκοπός της μελέτης	26
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	27
3.1 Απομόνωση κυστιδίων πλάσματος.....	27
3.2 Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός κυστιδίων πλάσματος με κυτταρομετρία ροής	27
3.3 Μέθοδος κυτταρομετρίας ροής	28
3.4 Στατιστική επεξεργασία.....	28
4. Αποτελέσματα.....	30
5. Συζήτηση.....	36
6. Συμπεράσματα	38
Περίληψη.....	39

Abstract	40
Βιβλιογραφικές αναφορές	41

1. Εισαγωγή

1.1.Χρόνια νεφρική Ανεπάρκεια

1.1.1 Ορισμός

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ) είναι κλινικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από την παρουσία διαταραχών στη δομή ή τη λειτουργία των νεφρών. Ένας ενήλικας ασθενής νοσεί από ΧΝΑ όταν εμφανίζει 1 ή περισσότερα από τα ακόλουθα, για περίοδο ίση ή μεγαλύτερη από τρεις μήνες,-: 1) ρυθμό σπειραματικής διήθησης (GFR) χαμηλότερο από $60 \text{ ml / min / } 1,73 \text{ m}^2$ 2) αλβουμινουρία (δηλαδή, αλβουμίνη ούρων $\geq 30 \text{ mg / g}$), 3) διαταραχές στο ίζημα των ούρων, στην ιστολογία ή στην απεικόνιση που υποδηλώνει νεφρική βλάβη. 4) διαταραχές των νεφρικών σωληναρίων ή 5) ιστορικό μεταμόσχευσης νεφρού (Babitt and Lin, 2012)

Η ΧΝΑ κατηγοριοποιείται σε πέντε στάδια, σύμφωνα με το GFR,

I	> 90	Φυσιολογική λειτουργία νεφρών
II	60-89	Ελαφρώς μειωμένη λειτουργία νεφρών
III A	30-59	Ήπια έως μέτρια μείωση στη λειτουργία νεφρών
III B	30-44	Μέτρια έως σοβαρά μειωμένη λειτουργία νεφρών
IV A	15-29	Σοβαρή μείωση της λειτουργίας των νεφρών
IV B	<15	Νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (Ammirati, 2020)

1.1.2. Αίτια

Οι κύριες αιτίες της ΧΝΑ είναι ο διαβήτης, η υπέρταση, η χρόνια σπειραματονεφρίτιδα, η χρόνια πυελονεφρίτιδα, η χρόνια χρήση αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, οι αυτοάνοσες ασθένειες, η πολυκυστική νόσος των νεφρών, οι συγγενείς δυσπλασίες, η παρατεταμένη οξεία νεφρική νόσος και γενετικές διαταραχές. (Ammirati, 2020)

1.1.3. Ουραιμικό σύνδρομο

Η κακή λειτουργία των νεφρών οδηγεί στη συσσώρευση παραπροϊόντων του μεταβολισμού, καθώς δεν φιλτράρονται και δεν αποκρίνονται από αυτούς όπως φυσιολογικά συμβαίνει, δημιουργώντας ένα περιβάλλον τοξικό για τα κύτταρα. Οι ουσίες αυτές αναφέρονται ως ουραιμικές τοξίνες και αλληλοεπιδρούν αρνητικά σε βιολογικές λειτουργίες. Πολλές από αυτές προκαλούν χρόνια φλεγμονή και οξειδωτικό στρες. Τόσο η φλεγμονή όσο και το οξειδωτικό στρες μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη χρόνιας νεφρικής νόσου και σε πολλές επιπλοκές της.

Οι τοξίνες αυτές ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος: α) μικρά υδατοδιάλυτα μόρια, τα οποία μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα με συμβατική αιμοκάθαρση, β) μεσαίου μεγέθους που απομακρύνονται μέσω συγκεκριμένων φίλτρων αιμοκάθαρσης με μεγαλύτερους πόρους και γ) μόρια δεσμευμένα σε πρωτεΐνες τα οποία δεν απομακρύνονται εύκολα με την συμβατική αιμοκάθαρση λόγω της αύξησης του μοριακού βάρους που προκαλείται από τη δέσμευση των πρωτεϊνών. (Owen et al., 1993) (Vanholder and Ringoir, 1992) (Lesaffer et al., 2000) (Dhondt et al., 2000)

1.1.4. Θεραπεία

Οι θεραπείες που επιλέγονται στη ΧΝΑ είναι η αιμοκάθαρση, η περιτοναϊκή διήθηση ή η μεταμόσχευση νεφρού. Η αιμοκάθαρση αποτελεί την κύρια επιλογή θεραπείας στοχεύοντας στην απομάκρυνση της περίσσειας των υγρών, των ηλεκτρολυτών και των ουραιμικών τοξινών που έχουν συσσωρευθεί στο αίμα εξαιτίας της βλάβης στη λειτουργία των νεφρών. Τα μικρά υδατοδιάλυτα μόρια μπορούν να απομακρυνθούν μέσω της αιμοκάθαρσης, ενώ τα μόρια μεσαίου μεγέθους απαιτούν φίλτρα με μεγαλύτερους πόρους για να επιτραπεί η διέλευσή τους. (Dhondt et al., 2000)

1.1.5. Διαταραχές της νόσου

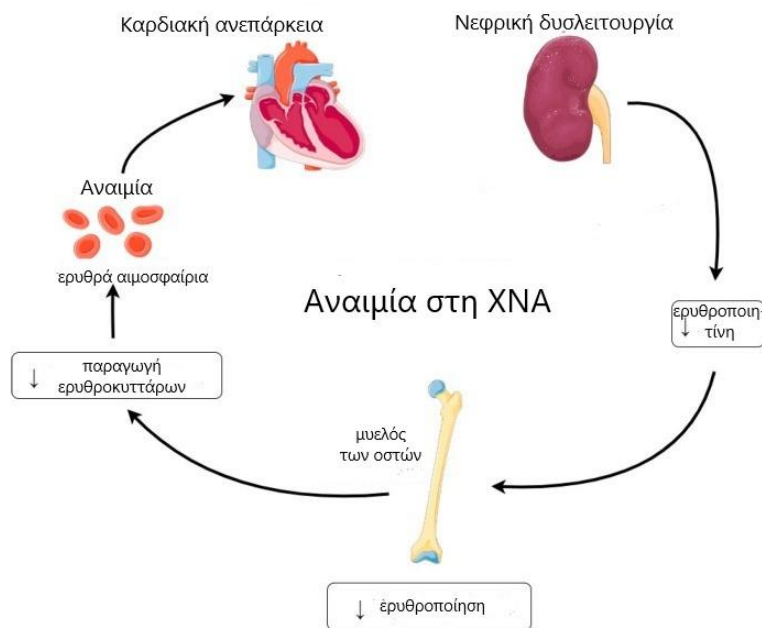
1.1.5.1 Αναιμία

Μία από τις αιματολογικές διαταραχές στη ΧΝΑ είναι η αναιμία που προκαλείται από τις ουραιμικές τοξίνες. Οι περισσότερες επιδράσεις των τοξινών στην αναιμία αυτή αφορούν τη μειωμένη παραγωγή ερυθροποιητίνης, της ορμόνης που είναι υπεύθυνη για τη διέγερση της ερυθροποίησης και παράγεται στους νεφρούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής ερυθροκυττάρων οδηγώντας τελικά σε αναιμία (Εικόνα 1). (Macdougall, 2001) (Ratcliffe, 1993)

Η αναιμία είναι μια συχνή επιπλοκή της ΧΝΑ και σχετίζεται με την αύξηση της νοσηρότητας, της θνησιμότητας και της εξέλιξης της νόσου. Η πιο κοινή μορφή αναιμίας που παρατηρείται κλασικά στην ΧΝΑ είναι συνήθως νορμοκυτταρική και νορμοχρωμική. (Cases et al., 2018)

Στην πραγματικότητα, η αναιμία αυτή είναι μια πολυπαραγοντική κατάσταση, και εκτός από την ανεπάρκεια ερυθροποιητίνης, η έλλειψη σιδήρου, φυλλικού οξέος και βιταμίνης Β12 αναγνωρίζονται επίσης ως σημαντικοί παράγοντες. (Babitt and Lin, 2012) (Agarwal, 2006) (Yoshida et al., 2006)

Επιπλέον, έχουν αναφερθεί ορισμένες ουραιμικές τοξίνες που παίζουν ρόλο στη διαδικασία της αναιμίας μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων από την παραγωγή ερυθροποιητίνης. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι η δράση τους ως αναστολείς ερυθροποίησης, προκαλώντας μείωση πολλαπλασιασμού και ωρίμανσης των προδρόμων ερυθροκυττάρων, και η συμβολή τους στην απόπτωση των ερυθροκυττάρων, προκαλώντας αύξηση της έκθεσης της φωσφατιδυλοσερίνης και την απελευθέρωση κυστιδίων λόγω της αύξησης του Ca^{2+} μέσα στο κύτταρο. (Ahmed et al., 2013) (Gao et al., 2015)



Εικόνα 1 Αναίμια στη ΧΝΑ: Η συσσώρευση ουραιμικών τοξινών προκαλεί μείωση της παραγωγής ερυθροποιητίνης στο νεφρό. Η μειωμένη σύνθεση ερυθροποιητίνης θέτει σε κίνδυνο την ερυθροποίηση στον μυελό των οστών. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί σε μείωση της παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων που οδηγεί σε αναιμία σχετιζόμενη με ΧΝΑ. (Hamza et al., 2020)

1.1.5.2 Οξειδωτικό στρες

Η απελευθέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) στο σώμα σχετίζεται με τον φυσιολογικό τους ρόλο ως μόρια σηματοδότησης. Ωστόσο, η αυξημένη παραγωγή τους ή / και η ανεπαρκής απόδοση των αντιοξειδωτικών συστημάτων μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτικό στρες. Στη ΧΝΑ, το οξειδωτικό στρες παίζει βασικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου, όπως αποδεικνύεται από το υψηλό επίπεδο δεικτών που σχετίζονται με οξειδωτική βλάβη σε πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA. (Pizzino et al., 2017)

Ως αποτέλεσμα της οξείδωσης των συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων, δηλαδή των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, εμφανίζονται αλλαγές στη διαπερατότητά της, γεγονός που οδηγεί σε διαρροή αιμοσφαιρίνης (Ibrahim et al., 2002). Για παράδειγμα, η υπεροξείδωση των λιπιδίων προκαλεί αποπόλωση της διπλής στιβάδας λιπιδίων και αλλαγές στη δομή της μεμβράνης λιπιδίων, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ρευστότητα της (Bartosz, 1981).

Η αιμοσφαιρίνη που απελευθερώνεται από ερυθροκύτταρα είναι επικίνδυνη καθώς είναι ο κύριος παράγοντας του οξειδωτικού στρες στα ερυθροκύτταρα . Τα ROS δημιουργούνται ως αποτέλεσμα της αυτοοξειδωσης της αιμοσφαιρίνης (Rifkind and Nagababu, 2013) . Η οξειδωτική βλάβη στη μεμβράνη πλάσματος των ερυθροκυττάρων οδηγεί σε μειωμένη παροχή οξυγόνου και σε επιταχυνόμενη γήρανση των ερυθροκυττάρων. (Mohanty et al., 2014)

1.1.5.3 Διαταραχές ερυθροκυττάρων στη ΧΝΑ και επιδράσεις αιμοκάθαρσης

Οι ασθενείς με ΧΝΑ χαρακτηρίζονται από χαμηλό αριθμό ερυθροκυττάρων (Costa et al., 2008) (Antonellou et al., 2011) και υψηλό δείκτη πλάτους κατανομής που οφείλεται στον αυξημένο αριθμό δικτυοερυθροκυττάρων, στην ανεπάρκεια σιδήρου και στην ανισοκυττάρωση (Costa et al., 2008) (Antonellou et al., 2014) (Tekce et al., 2014). Επιπλέον, τα ερυθροκύτταρα των ασθενών παρουσιάζουν αυξημένη ακαμψία (Sakthivel et al., 2007) και ευαισθησία στην ωσμωτική λύση που είναι ανάλογη της περιεκτικότητας των λιπιδίων στη μεμβράνη τους, στην αντιοξειδωτική ικανότητα κ.α (Ibrahim et al., 2002, Peuchant et al., 1988) (Wu et al., 1998) . (Georgatzakou et al., 2016).

Το τοξικό ουραιμικό περιβάλλον προκαλεί πληθώρα αλλαγών στα χαρακτηριστικά της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων. Έτσι, στη μεμβράνη τους μπορεί να παρατηρηθεί ανεπάρκεια πρωτεϊνών, ανώμαλα επίπεδα λιπιδίων, συσσώρευση πρωτεϊνών και κατακερματισμός (Sakthivel et al., 2007) (Saradhadevi et al., 2005) (Georgatzakou et al., 2016). Επίσης, παρατηρείται ανεπάρκεια στη ζώνη 3 (Saradhadevi et al., 2005) (Antonellou et al., 2011) (Maduell et al., 1990) και τις σκελετικές πρωτεΐνες (Costa et al., 2008) (Antonellou et al., 2014), με αποτέλεσμα την αποδυνάμωση του κυτταροσκελετού και συνεπώς την κυστιδοποίηση (Georgatzakou et al., 2016).

Η ΧΝΑ συνδέεται με διαταραχές στο σχήμα των ερυθροκυττάρων, καθώς παρατηρούνται στοματοκύτταρα, σφαιροκύτταρα, κύτταρα-στόχοι και εχνοκύτταρα, και μπορεί να επηρεάσουν τη ροή του αίματος. (Antonellou et al., 2011) (Sakthivel et al., 2007) (Saradhadevi et al., 2005) (Antonellou et al., 2014). Τα στοματοκύτταρα πιθανώς να είναι αποτέλεσμα των αυξημένων επιπέδων ROS στα ερυθροκύτταρα (Richards et al., 2007), ενώ η εχνοκυττάρωση φαίνεται να προκαλείται από υπεροξειδωση λιπιδίων

(Hashimoto et al., 1996) ή αυξημένα επίπεδα ασβεστίου στο κύτταρο (Abed et al., 2014) (Wang et al., 2014), αλλά μπορεί να προκληθεί και κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης

Παρά τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η αιμοκάθαρση, απομακρύνοντας τις ουραιμικές τοξίνες, αποτελεί μια στρεσογόνα διαδικασία για τα ερυθροκύτταρα, καθώς υφίστανται βλάβες από τη διατημητική πίεση που προκαλείται κατά τη ροή τους μέσω των φίλτρων της αιμοκάθαρσης. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης απελευθερώνονται ROS σαν απάντηση στη δράση των φαγοκυττάρων (Himmelfarb et al., 1991). Σαν αποτέλεσμα, επηρεάζονται τα συστατικά των ερυθροκυττάρων και προκαλείται παραμόρφωση, καθώς αλλάζει η ρευστότητα της μεμβράνης και το εσωτερικό ιξώδες τους (Wang et al., 1999), αλλά παρουσιάζεται και επιταχυνόμενη γήρανση και αιμόλυση. (Mohanty et al., 2014).

Τέλος, παρατηρείται μείωση του χρόνου ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά 70% σε σχέση με αυτά των υγιών ατόμων. (Ly et al., 2004) (Vos et al., 2011)

1.1.6. Διαταραχές αιμοπεταλίων στη ΧΝΑ

Οι ασθενείς με ΧΝΑ είναι επιρρεπείς τόσο σε αιμορραγία όσο και σε θρόμβωση. Αυτή η διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ προ- και αντι-αιμοστατικών παραγόντων αποτελεί παράγοντα της υψηλής νοσηρότητας και θνησιμότητας στη ΧΝΑ. Τα πρώτα στάδια της χρόνιας νεφρικής νόσου συνήθως συνδέονται με προθρομβωτική τάση, ενώ σε πιο προχωρημένο στάδιο οι ασθενείς υποφέρουν επίσης από αιμορραγική διάθεση. (Jalal et al., 2010)

1.1.6.1 Αιμορραγία

Η αιμορραγία πιστεύεται πως οφείλεται σε δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων, καθώς συμβαίνει πάρα τα φυσιολογικά επίπεδα παραγόντων πήξης και αριθμού αιμοπεταλίων (Di Minno et al., 1985) (Bloom et al., 1972) (Evans et al., 1972). Η δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων μπορεί να προκαλείται από τη δράση των ουραιμικών τοξινών, την αναιμία, τις ανωμαλίες στον παράγοντα von Willebrand και τη χρήση φαρμάκων όπως η ασπιρίνη (Kaw and Malhotra, 2006) (Moal et al., 2003) (Rios et al., 2010).

Η κακή λειτουργία των αιμοπεταλίων φαίνεται να περιλαμβάνει διαταραχές στην έκκριση αλλά και την πρόσφυση τους. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια από ουραιμικούς ασθενείς περιέχουν λιγότερο ADP και σεροτονίνη, υποδηλώνοντας μια επίκτητη βλάβη που προκαλείται από την ουραιμία κατά την αποθήκευσή τους (Eknoyan and Brown, 1981) (Schafer et al., 1980). Στη συνέχεια, υπάρχει διαταραχή στη λειτουργία του κύριου υποδοχέα αιμοπεταλίων GPIIb-IIIa, ο οποίος παίζει κρίσιμο ρόλο για τη διαμεσολάβηση τόσο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μέσω του ινωδογόνου, όσο και της σηματοδότησης μέσω της μεταφοράς σήματος με τη μεσολάβηση του υποδοχέα. (Zwaginga et al., 1991)

1.2.6.2 Θρόμβωση

Η θρόμβωση αποτελεί σημαντικό παράγοντα νοσηρότητας της ΧΝΑ με περισσότερα από τα μισά μοσχεύματα να αναπτύσσουν θρόμβωση μέσα σε 2 χρόνια (Brahmbhatt et al., 2016). Η θρόμβωση αυτή οφείλεται στις ουραιμικές τοξίνες, συγκεκριμένα στο θεϊκό ινδοξύλιο, που αυξάνει τη δραστηριότητα των αιμοπεταλίων και την κυστιδοποίηση. Επιπλέον, σε ασθενείς με ΧΝΑ αναφέρονται αρκετές διαταραχές στους παράγοντες πήξης του αίματος, καθώς παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα του παράγοντα VW, VII, θρομβίνης, αλλά και μειωμένη δράση αντιθρομβίνης.

1.2. Κυστίδια

1.2.1 Ορισμός

Τα κυστίδια είναι δομές ποικίλου μεγέθους (30-1000 nm) που περικλείονται από μεμβράνη και απελευθερώνονται από κύτταρα σε διάφορες περιπτώσεις κυτταρικής ενεργοποίησης από εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα. (Wolf, 1967)

Η παραγωγή εξωκυτταρικών κυστιδίων περιγράφηκε αρχικά ως μέσο απομάκρυνσης υλικού από το κύτταρο (Johnstone et al., 1987). Ωστόσο, σήμερα είναι γνωστό πως τα εξωκυτταρικά κυστίδια δεν είναι απλοί φορείς αποβλήτων αλλά είναι και σημαντικοί μεσολαβητές της ενδοκυτταρικής επικοινωνίας, καθώς έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν συστατικά μεταξύ των κυττάρων και να λειτουργούν ως φορείς σηματοδότησης σε φυσιολογικές κυτταρικές ομοιοστατικές διαδικασίες ή ακόμα και σε

παθολογικές καταστάσεις. (Colombo et al., 2014) (Yáñez-Mó et al., 2015) (Lo Cicero et al., 2015)

Τα κυστίδια διατηρούν τα αντιγονικά χαρακτηριστικά των κυττάρων από τα οποία έχουν προέλθει με αποτέλεσμα να μπορεί εύκολα να ταυτοποιηθεί η κυτταρική τους προέλευση.

Ταξινομούνται σε τρεις υπότυπους με βάση το μέγεθος τους και τη μέθοδο κυτταρικής απελευθέρωσης: εξωσώματα (30-150 nm), μικροσωματίδια (50-1000 nm) και αποπτωτικά σώματα (> 1000 nm). (Kowal et al., 2016)

1.2.2 Εξωσώματα

Ο μικρότερος τύπος κυστιδίων δημιουργείται με τη δημιουργία προεκβολών προς το εσωτερικό της πλασματικής μεμβράνης για σχηματισμό ενός ενδοσώματος, το οποίο περιέχει επιλεκτικά κυτταροπλασματικά συστατικά. Τα πρώιμα αυτά ενδοσώματα, υποβάλλονται σε ωρίμανση σε ώσιμα ενδοσώματα, τα οποία δημιουργούν πολλαπλά ενδοσωματικά κυστίδια, που στη συνέχεια συντήκονται με τη μεμβράνη και απελευθερώνονται ως εξωσώματα. (Εικόνα 2β) (Willms et al., 2016)

1.2.3 Μικροσωματίδια ή μικροκυστίδια

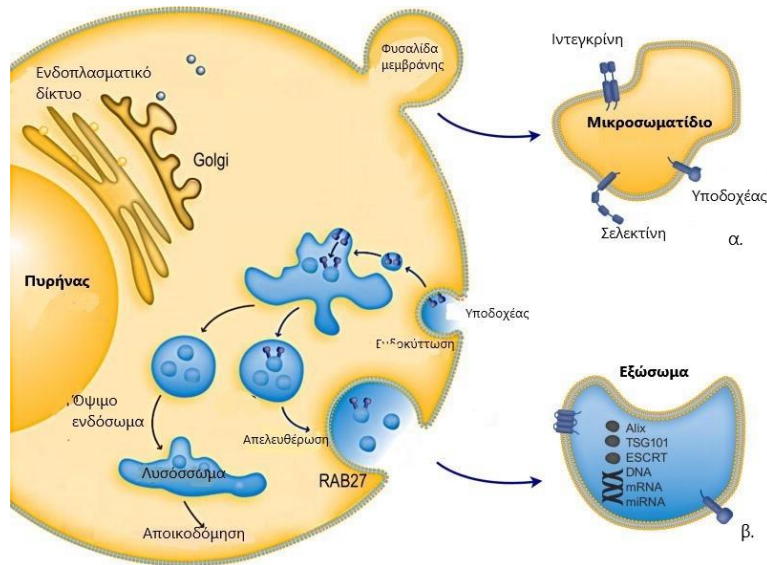
Τα μικροσωματίδια, τα οποία παλαιότερα ονομάζονταν «σκόνη αιμοπεταλίων», περιγραφήκαν για πρώτη φορά ως υποκυτταρικό υλικό που προέρχεται από αιμοπετάλια σε φυσιολογικό πλάσμα και ορό (Wolf, 1967). Ωστόσο, έκτοτε έχει γίνει κατανοητό ότι εμπλέκονται στην επικοινωνία μεταξύ τοπικών και μακρινών κυττάρων.

Τα μικροσωματίδια παράγονται από τη φυσαλιδοποίηση και αποκοπή τμημάτων της πλασματικής μεμβράνης με επακόλουθη την απελευθέρωση κυστιδίων στον εξωκυτταρικό χώρο (Εικόνα 2^α). Επομένως, έχοντας την ικανότητα να περιέχουν ενεργό φορτίο (πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια) μπορούν να το παραδίδουν σε άλλο κύτταρο, γειτονικό ή μακρινό, και να μεταβάλλουν τις λειτουργίες του. (Simpson et al., 2009) (Vidal et al., 1989) (Valadi et al., 2007)

Η λιπιδική στιβάδα της πλασματικής μεμβράνης χαρακτηρίζεται από ασυμμετρία των φωσφολιπιδίων που την αποτελούν. Το εξωτερικό στρώμα είναι εμπλουτισμένο με

φωσφατιδυλογολίνη και σφιγγομυελίνη, ενώ το εσωτερικό στρώμα σχηματίζεται κυρίως με φωσφατιδυλοσερίνη και φωσφατιδυλαιθανολαμίνη. (Haest, 2003)

Ωστόσο, η ασυμμετρία αυτή μπορεί να διαταραχθεί, για παράδειγμα λόγω αυξημένου κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , με αποτέλεσμα την ανακατανομή των φωσφολιπιδίων, διευκολύνοντας τη διαδικασία φυσαλιδοποίησης. (Tricarico et al., 2017)



Εικόνα 2 Παραγωγή κυστιδίων. 2α :Παραγωγή μικροκυστιδίων: Φυσαλιδοποίηση και αποκοπή τμήματος της μεμβράνης του κυττάρου. 2β: Παραγωγή εξωσωμάτων: Ενδοκύττωση μεμβράνης και παραγωγή πρώιμων ενδοσωμάτων με επακόλουθη την ωρίμανση σε όωμα ενδοσώματα, τα οποία είτε ακολουθούν το μονοπάτι αποικοδόμησης για φαγοκυττάρωση είτε συντήκονται με την μεμβράνη και απελευθερώνονται ως κυστίδια στον εξωκυττάριο χώρο. (Shao et al., 2018)

1.2.4 Αποπτωτικά σώματα

Τα αποπτωτικά σώματα σχηματίζονται κατά τη διάρκεια προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όπου δημιουργούνται προεκβολές στην πλασματική μεμβράνη και αποκόπτονται τα αποπτωτικά σώματα. Τα αποπτωτικά σώματα αποτελούνται από μια άθικτη μεμβράνη που περικλείει συστατικά κυτταροπλάσματος και μπορούν να περιέχουν τόσο οργανίδια όσο και πυρηνικά θραύσματα. Αυτά τα σώματα στη συνέχεια αποβάλλονται μέσω φαγοκυττάρωσης από τα περιβάλλοντα κύτταρα. (Taylor et al., 2008)

1.2.5. Περιεχόμενο των διαφόρων τύπων κυστιδίων

Τα κυστίδια μπορεί να περιέχουν διάφορες πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα. Πιο συγκεκριμένα, συνήθως περιέχουν πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό και την απελευθέρωση κυστιδίων όπως, RAB27A, RAB11B κ.α. Εκτός από τις πρωτεΐνες, έχει μελετηθεί εκτενώς και η σύνθεση λιπιδίων. Κάποια από αυτά είναι η σφιγγομυελίνη, χοληστερόλη, γαγγλιοσίδη GM3, ακόρεστα λιπίδια, φωσφατιδυλοσερίνη και κεραμίδιο (Llorente et al., 2013). Όσον αφορά στο νουκλεϊκό οξύ των κυστιδίων, εμπλουτίζονται κυρίως με μικρά RNA (Crescitelli et al., 2013) και σε μικρό αριθμό περιπτώσεων, με DNA, συμπεριλαμβανομένου του γονιδιωματικού και του μιτοχονδριακού DNA. (Guescini et al., 2010)

1.3. Κυστίδια προερχόμενα από ερυθροκύτταρα

Τα κυστίδια που προέρχονται από ερυθροκύτταρα εκκρίνονται κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης, της φυσιολογικής κυτταρικής γήρανσης, καθώς και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Τα κυστίδια αυτά εμπλουτίζονται σε διάφορα βιοδραστικά μόρια που διευκολύνουν την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων και μπορούν να λειτουργήσουν ως δείκτες ασθένειας. Έχουν ετερογενή μορφολογία, είναι είτε στρογγυλά είτε σαν νήματα. (Thangaraju et al., 2020)

Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο σχηματισμό των κυστιδίων κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των ερυθρών, η οποία μπορεί να διαρκέσει κάποιες εβδομάδες, και μπορεί να παρατηρηθούν κάποιες αλλαγές, όπως βιοχημικές, βιομηχανικές ή ανοσολογικές. (Grazzini and Vaglio, 2012) (Zimring, 2015) (D'Alessandro et al., 2015)

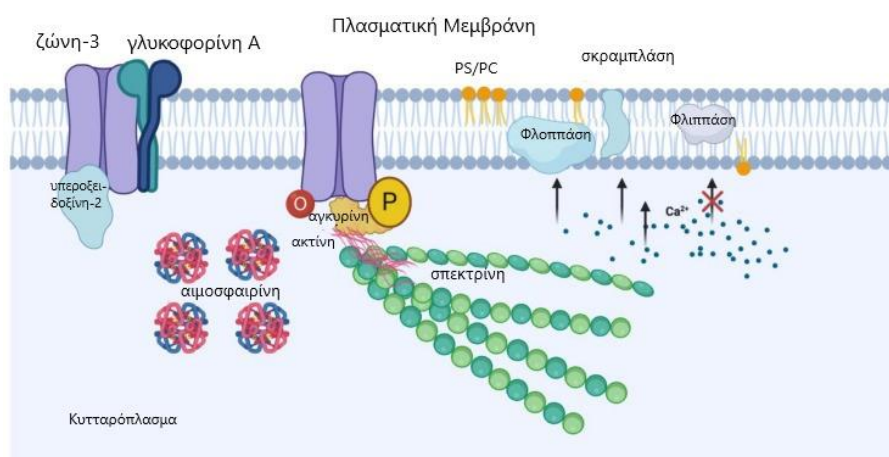
1.3.1 Κυστιδοποίηση ερυθροκυττάρων λόγω μειωμένης συγκέντρωσης ATP

Μία από τις αιτίες πρόκλησης αλλαγών στη μεμβράνη των ερυθρών και συνεπώς στη δημιουργία κυστιδίων είναι η μείωση των συγκεντρώσεων τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) (Gevi et al., 2012) (D'Alessandro et al., 2015). Καθώς το ATP είναι απαραίτητο, κυρίως για την ακεραιότητα διασταύρωσης σπεκτρίνης, σε συνθήκες με μειωμένο ATP αυξάνεται η ευαισθησία της μεμβράνης σε φυσαλιδοποίηση λόγω αποσταθεροποίησης του υποκυτταρικού σκελετού της μεμβράνης (Lutz et al., 1977) (Park et al., 2010) (Sens and Gov, 2007).

1.3.2 Κυστιδοποίηση ερυθροκυττάρων λόγω αυξημένου Ca^{++}

Μειωμένο ATP οδηγεί σε αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, ενεργοποιώντας ακόμα έναν παράγοντα κυστιδοποίησης (Wiley et al., 1982). Το γεγονός αυτό οφείλεται στη μείωση της δραστηριότητας των αντλιών Ca^{++} της μεμβράνης με αποτέλεσμα τη συνεχή αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{++} εντός των ερυθροκυττάρων. (Gevi et al., 2012) (Zimrin and Hess, 2009).

Η παρατεταμένη αύξηση του Ca^{++} μέσα στο ερυθροκύτταρο σε συνδυασμό με την εξάντληση των αποθεμάτων ATP οδηγούν στη μεταβολή δραστηριότητας των βασικών ενζύμων της μεμβράνης που εμπλέκονται στη διατήρηση της ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων της (Εικόνα 3). Τέτοια ένζυμα είναι η φλιππάση, φλοππάση και η σκραμπλάση. Η δράση της σκραμπλάσης που είναι εξαρτώμενη από το ασβέστιο οδηγεί σε αυξημένη εξωτερίκευση ανιονικών φωσφολιπιδίων στο εξωτερικό της μεμβράνης, ιδιαίτερα της φωσφατιδυλοσερίνης, οδηγώντας σε κυστιδοποίηση και απελευθέρωση των κυστιδίων. Επομένως, κατά τον σχηματισμό κυστιδίων πέρα από τη μείωση μεγέθους των ερυθρών, παρατηρούνται και αυξανόμενα επίπεδα φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνειά τους. (Kuo et al., 2017)



Εικόνα 3: Μηχανισμός παραγωγής κυστιδίων από ερυθροκύτταρα λόγω αυξημένου ενδοκυτταρικού Ca^{2+} : Η δημιουργία κυστιδίων στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων προκαλείται από αλλαγές στην κατανομή των φωσφολιπιδίων στη διπλή λιπιδική στιβάδα. Ένζυμα όπως η σκραμπλάση, η καλπαϊνη και οι πρωτεάσες ενεργοποιούνται με οξειδωτική βλάβη ή εισροή Ca^{2+} και οδηγούν στην εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια του κυττάρου, στην κυτταροσκελετική αποικοδόμηση και στη συσσώρευση της ζώνης 3, με αποτέλεσμα την κυστιδοποίηση. (Thangaraju et al., 2020)

1.3.3 Κυστιδοποίηση ερυθροκυττάρων λόγω οξειδωτικού στρες

Οι οξειδωτικές διεργασίες εντός των ερυθροκυττάρων που συμβαίνουν συνήθως υπό συνθήκες αποθήκευσης ή *in vivo* σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως η ΧΝΑ, οδηγούν σε αύξηση του οξειδωτικού στρες.

Τα κυστίδια των ερυθροκυττάρων μπορεί να εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων. Η συνεπώαση τους με τα ουδετερόφιλα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ROS. (Jank and Salzer, 2011) (Danesh et al., 2014)

Τα κυτταρικά στοιχεία που επηρεάζονται άμεσα από το οξειδωτικό στρες είναι συνήθως η ζώνη 3, σπεκτρίνη, η γλυκεραλδεϋδη, το GAPDH κ.α. Πολλές από τις πρωτεΐνες που επηρεάζονται είναι πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και συμμετέχουν στην διατήρηση της ακεραιότητας της μεμβράνης.(D'Amici et al., 2007) (Wolfe et al., 1986)

1.3.4 Ρόλος

1.3.4.1 Ομοιοστασία οξειδίου του αζώτου

Κατά τη διάρκεια της υποξίας, τα κυστίδια των ερυθροκυττάρων φέρουν παράγοντες που ευθύνονται για την παραγωγή οξειδίου του αζώτου, το οποίο είναι σημαντικό μόριο σηματοδότησης σε διαδικασίες ρύθμισης του αγγειακού μικροπεριβάλλοντος (Eich et al., 1996), με αποτέλεσμα την αύξηση της αγγειοδιαστολής και τη χαλάρωση των λείων μυϊκών κυττάρων. (Thangaraju et al., 2020)

1.3.4.2 Ανοσοδιαμόρφωση

Τα κυστίδια των ερυθροκυττάρων έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν ανοσολογικές αποκρίσεις. Μελέτες έχουν δείξει πως μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή προφλεγμονώδων κυτταροκινών (Danesh et al., 2014), αλλά και τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων. (Hezel et al., 2017)

1.3.4.3 Πήξη

Αρκετές μελέτες αναφέρουν αύξηση της προπηκτικής δραστηριότητας σε ερυθροκύτταρα *in vitro* (Devalet et al., 2018). Αυτό το αποτέλεσμα προκαλείται από τη φωσφατιδυλοσερίνη που παρουσιάζουν τα κυστίδια στην επιφάνεια τους (Aleshnick et al., 2016). Επιπλέον τα κυστίδια των ερυθροκυττάρων φαίνεται να επηρεάζουν άλλα

κύτταρα. Για παράδειγμα, μονοκύτταρα έχουν υψηλότερη έκφραση ιστικού παράγοντα μετά από έκθεση σε κυστίδια. Επιπλέον, ο φαινότυπος των αιμοπεταλίων αλλάζει, παρουσιάζοντας αύξηση της έκφρασης P-σελεκτίνης και PAC-1 στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι τα προερχόμενα από ερυθροκύτταρα κυστίδια προάγουν προπηκτική δράση *in vitro*. (Baumann Kreuziger et al., 2021)

1.4. Κυστίδια προερχόμενα από αιμοπετάλια

1.4.1 Πότε κυστιδοποιούνται

Τα αιμοπετάλια παράγουν σε μεγάλο βαθμό μικροσωματίδια μετά από ενεργοποίηση από ισχυρούς ή αδύναμους αγωνιστές (όπως θρομβίνη, ADP και κολλαγόνο) ως μέσο για να επιταχύνουν την αιμόσταση τοπικά στις θέσεις ενεργοποίησης αυξάνοντας την επιφάνεια φωσφολιπιδίων για αγκύρωση και στρατολόγηση προπηκτικών παραγόντων. Επιπλέον η κυστιδοποίηση συμβαίνει σε συνθήκες υψηλής διάτμησης, επαφής με εξωγενείς επιφάνειες, όπως η μεμβράνη αιμοκάθαρσης, κατά την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και κατά τη διαδικασία απόπτωσης (Heijnen et al., 1999). Τα κυστίδια αυτά χαρακτηρίζονται κυρίως από έκφραση ομάδων διαφοροποίησης όπως το CD41 και φωσφατιδυλοσερίνης,

1.4.2 Ρόλος

Τα κυστίδια που προέρχονται από αιμοπετάλια περιλαμβάνουν έως και 70-90% του συνόλου των κυστιδίων που υπάρχουν στην κυκλοφορία. (Horstman and Ahn, 1999)

Η πρώτη παρατήρηση των προερχόμενων από αιμοπετάλια κυστιδίων έγινε από τον Peter Wolf (Wolf, 1967) ο οποίος τα ονόμασε σκόνη αιμοπεταλίων και παρατηρήθηκε η προπηκτική λειτουργία τους που θα μπορούσε να συντομεύσει τον χρόνο πήξης και να προωθήσει τη δημιουργία της θρομβίνης. (Wolf, 1967)

Ενώ τα κυστίδια αυτά είχαν κυρίως συσχετιστεί με προπηκτική δραστηριότητα, διαφορές μελέτες έδειξαν πως μπορούσαν να ασκήσουν τόσο προπηκτική όσο και αντιπηκτική δραστηριότητα, μέσω ενεργοποίησης της προθρομβίνης αλλά και απενεργοποίησης του παράγοντα Va. (Tans et al., 1991)

Τα προπηκτικά κυστίδια εκφράζουν φωσφατιδυλοσερίνη στην επιφάνεια τους (Morel et al., 2006). Ωστόσο, το δυναμικό πήξης τους εξαρτάται από τον βαθμό κυστιδοποίησης των αιμοπεταλίων (Sims et al., 1989). Πιο συγκεκριμένα, παράγονται όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από έναν συνδυασμό κολλαγόνου και θρομβίνης, συμπληρώματος και C5b-9 ή από ασβεστίου (Sims et al., 1989) (Zwaal et al., 1992). Τα μικροσωματίδια από αιμοπετάλια ορίζονται ως κυστίδια διαμέτρου 100 έως 1000 nm που εκθέτουν φωσφατιδυλοσερίνη και είναι αυτά που συνδέονται με τις ιδιότητες πήξης

Τα κυστίδια από αιμοπετάλια που βρίσκονται στο περιφερικό αίμα εκφράζουν το CD41 (Italiano et al., 2010) και έχουν μικρό χρόνο ζωής (Flaumenhaft, 2006) (Italiano et al., 2010). Διαχέονται συνεχώς στην κυκλοφορία σε ορισμένες ποσότητες ακόμη και σε υγιείς ασθενείς. (Rand et al., 2006)

Όπως και τα κυστίδια που προέρχονται από άλλους τύπους κυττάρων, τα κυστίδια που προέρχονται από αιμοπετάλια μεταφέρουν διάφορα φορτία (π.χ. RNA, λιπίδια, πρωτεΐνες) τα οποία μπορούν να μεταφερθούν σε όργανα και ιστούς που είναι απρόσιτα για τα αιμοπετάλια, λόγω του μεγέθους τους, και έτσι συμβάλουν στην μακρινή κυτταρική επικοινωνία. (Żmigrodzka et al., 2016)

Έχουν επίσης προ-φλεγμονώδη αποτελέσματα, καθώς έχουν την ικανότητάς να προκαλούν χημειοταξία μονοκυττάρων, κυττάρων NK και λεμφοκυττάρων. Επίσης, λόγω της έκφρασης CD41 και CD62P, μπορούν να ενεργοποιήσουν ουδετερόφιλα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα κυστίδια που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μεταφέρουν τον υποδοχέα μεμβράνης CD41 ενισχύοντας την πρόσφυση των αιμοποιητικών κυττάρων στο ενδοθηλιακό. (Bobrie et al., 2011)

1.5. Κυστίδια στη XNA

Πολλές από τις διαταραχές που παρουσιάζονται στη XNA, όπως η αναιμία, η συσσώρευση ουραιμικών τοξινών και το οξειδωτικό στρες μπορούν να συσχετιστούν με την παραγωγή κυστιδίων. Έτσι, τα κυστίδια μπορούν να χαρακτηριστούν ως βιοδείκτες της κυτταρικής δυσλειτουργίας συμβάλλοντας στη διάγνωση και τη παρακολούθηση της ασθένειας. Επομένως, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα κυστιδίων σε ασθενείς με XNA. (Amabile et al., 2005) (Georgatzakou et al., 2020). Ο ρυθμός παραγωγής κυστιδίων είναι ανάλογος με τα επίπεδα ουρικού οξέος και πρωτεϊνουρίας (Yu et al., 2018) και αντιστρόφως ανάλογος με το GFR (Almquist et al., 2016) (Yu et al., 2018).

Σε ασθενείς με ΧΝΑ ο φαινότυπος των κυστιδίων πλάσματος περιλαμβάνει τη φωσφατιδυλοσερίνη, τους δείκτες ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, τον ιστικό παράγοντα κ.α τα οποία μπορεί να εμπλέκονται στην πήξη, το οξειδωτικό στρες, τη φλεγμονή και την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (Stinghen et al., 2016). Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι ένας από τους παράγοντες κινδύνου καρδιακού επεισοδίου στους ασθενείς αυτούς.

Μελέτες έχουν δείξει πως τα κυστίδια ασθενών χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας με σακχαρώδη διαβήτη ή/και ακραία λευκωματουρία παρουσιάζουν μεγαλύτερη προπηκτική ικανότητα από αυτούς που δεν παρουσιάζουν τις διαταραχές αυτές (Yu et al., 2018) (Almquist et al., 2016)

Τέλος, τα κυστίδια έχοντας την δυνατότητα να διασχίσουν τη βασική σπειραματική μεμβράνη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί παράγοντες για τη διαχείριση της ΧΝΑ. (Oosthuyzen et al., 2016)

1.6. Διαδικασία πήξης αίματος

1.6.1 Συμμετοχή ερυθροκυττάρων στη διαδικασία της πήξης

Πολλές πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως τα ερυθροκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην πήξη και μπορούν να λειτουργήσουν ως προπηκτικό και προθρομβωτικό συστατικό αίματος. (Litvinov and Weisel, 2017)

Ο υψηλός αιματοκρίτης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ιξώδους του αίματος που εμποδίζει τη ροή του αίματος (Andrews and Low, 1999) (Pries et al., 1992). Το ιξώδες αίματος που σχετίζεται με τον αιματοκρίτη μπορεί να έχει φυσικές επιδράσεις στην αλληλεπίδραση μεταξύ αιμοπεταλίων και επιφανειών των αιμοφόρων αγγείων. Αυτή η επίδραση των ερυθρών αιμοσφαιρίων μπορεί να είναι ένας ισχυρός προθρομβωτικός παράγοντας. Έτσι το κλάσμα όγκου των ερυθρών αιμοσφαιρίων μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στην αιμόσταση και τη θρόμβωση. (Turitto and Weiss, 1980)

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν να ρυθμίσουν την αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων απευθείας είτε μέσω χημικής σηματοδότησης είτε με αλληλεπιδράσεις με αυτά (Helms et al., 2013). Για παράδειγμα, η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, ως προϊόν λύσης ερυθροκυττάρων μπορεί να επηρεάσει τα αιμοπετάλια. Η εξωκυτταρική αιμοσφαιρίνη εμποδίζει την καταστολή των αιμοπεταλίων, επομένως, όταν τα ερυθρά αιμοσφαίρια καταστρέφονται, η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη προκαλεί συσσώρευση αιμοπεταλίων, συμβάλλοντας σε υψηλό κίνδυνο θρομβωτικών επιπλοκών. (Tran et al., 2016)

Η αποτελεσματική πήξη του αίματος απαιτεί επαρκείς προθρομβωτικές επιφάνειες για τη σωστή συναρμολότητα του συμπλόκου προθρομβινάσης και δημιουργία θρομβίνης για την έναρξη της πήξης. Αυτές οι επιφάνειες παρέχονται από κύτταρα που εκθέτουν φωσφατιδυλοσερίνη (Schroit and Zwaal, 1991). Υπό συνθήκες απόπτωσης ή βλάβης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όπως υψηλά ποσοστά διάτμησης, φλεγμονές ή οξειδωτικού στρες, τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορεί να χάσουν την ασυμμετρία της μεμβράνης και να εκθέσουν φωσφατιδυλοσερίνη (Shi et al., 2006). Λόγω του μεγάλου αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων που υπάρχουν στο αίμα, ακόμη και ένα μικρό κλάσμα ερυθρών αιμοσφαιρίων με έκθεση σε φωσφατιδυλοσερίνη μπορεί να οδηγήσει σε προθρομβωτικές καταστάσεις. (Whelihan et al., 2012)

1.6.2 Συμμετοχή αιμοπεταλίων στη διαδικασία της πήξης

Τα αιμοπετάλια αποτελούν βασικό ρόλο στη διαδικασία της πήξης του αίματος μέσω 1) της προσκόλλησης τους στο ενδοθήλιο των τραυματισμένων αγγείων χρησιμοποιώντας υποδοχείς για τον παράγοντα von Willebrand και το κολλαγόνο, 2) συσσώρευσης 3) και επακόλουθης απελευθέρωσης κοκκίων που περιλαμβάνουν διφωσφορικής αδενοσίνης [ADP], σεροτονίνης κ.α. Η απελευθέρωση ADP και σεροτονίνης ενισχύει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και στρατολογεί περισσότερα αιμοπετάλια κατά τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, με τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό θρόμβου.

1.6.3 Συμμετοχή κυστιδίων στη διαδικασία της πήξης

Ο ρόλος των κυστιδίων στην πήξη σχετίζεται με την επιφάνεια τους που εκφράζει προπηκτικές πρωτεΐνες, όπως είναι ο ιστικός παράγοντας. Επιπλέον, ο σχηματισμός των κυστιδίων οδηγεί στην εξωτερίκευση ανιονικών φωσφολιπιδίων, όπως της φωσφατιδυλοσερίνης που συμβάλει σημαντικά στην προπηκτική ικανότητα των κυστιδίων, καθώς παρέχει θέσεις δέσμευσης παραγόντων πήξης όπως ο παράγοντας IXa, Va, Xa και VIII ακολουθούμενη από παραγωγή θρομβίνης (Owens and Mackman, 2011). Παρόλο που η φωσφατιδυλοσερίνη ανιχνεύεται στην επιφάνεια των περισσότερων κυστιδίων, υπάρχουν κυστίδια που είναι αρνητικά για χρώση αννεξίνης, αποδεικνύοντας την ύπαρξη κυστιδίων χωρίς έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης. (Perez-Pujol et al., 2007)

Κυστίδια που εκφράζουν τόσο φωσφατιδυλοσερίνη όσο και ιστικό παράγοντα παρουσιάζουν την υψηλότερη προπηκτική δράση. Ο ιστικός παράγοντας είναι βασικός

ενεργοποιητής του καταρράκτη πήξης, καθώς ενεργοποιεί τον παράγοντα VII, προκαλώντας αιμόσταση σε κατάσταση βλάβης των αγγείων (Mackman, 2009). Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο ιστικός παράγοντας δεν εκφράζεται σε κύτταρα του αίματος (Grover and Mackman, 2018), επομένως χαμηλές ποσότητες του στο αίμα σχετίζονται με κυστίδια προερχόμενα από κυκλοφορούντα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων κάποιων αιμοπεταλίων που έχει αποδειχθεί πως μπορούν να εκφράζουν τον παράγοντα αυτό (Brambilla et al., 2015) (Müller et al., 2003).

Τα κυστίδια μπορούν να συμβάλουν στη θρόμβωση με έμμεσους μηχανισμούς, ανεξάρτητα από την έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης και ιστικού παράγοντα. Μελέτες έχουν δείξει πως τα κυστίδια μπορούν να αυξήσουν σημαντικά την εναπόθεση αιμοπεταλίων σε αρτηριακές βλάβες. (Suades et al., 2012)

Εκτός από την προπηκτική δράση, τα κυστίδια συμμετέχουν στην πήξη και με αντιπηκτικούς μηχανισμούς. Μελέτες έδειξαν ότι κυστίδια που προέρχονται από ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια δεσμεύουν την πρωτεΐνη S και υποστηρίζουν την αντιπηκτική δράση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C (Koshiar et al., 2014) (Somajo et al., 2014). Επιπλέον, διαθέτουν λειτουργικά ενεργό TFPI που αντισταθμίζει τη δραστηριότητα του ιστικού παράγοντα, αποτρέποντας την ανώμαλη ενεργοποίησή του (Steppich et al., 2005).

Τέλος τα κυστίδια των αιμοπεταλίων έχει παρατηρηθεί πως μειώνουν το CD36 στα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα μειώνοντας τη συσσώρευση και τη πρόσφυση των αιμοπεταλίων, αποτρέποντας έτσι τον σχηματισμό θρόμβων (Srikanthan et al., 2014) .

2. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ποσοτικοποίηση και ο ανοσοφαινοτυπικός προσδιορισμός των κυστιδίων του πλάσματος που προέρχονται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια, σε ασθενείς με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια τελικού σταδίου που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.

Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκαν 32 ασθενείς με ΧΝΑ που υποβάλλονται σε θεραπεία αιμοκάθαρσης και 15 υγιή άτομα που δε διέφεραν ως προς την ηλικία και το φύλο. Οι ασθενείς με ΧΝΑ υποβλήθηκαν σε τακτική αιμοκάθαρση τρεις φορές την εβδομάδα (μέση διάρκεια αιμοκάθαρσης $41,3 \pm 21,4$ μήνες), χρησιμοποιώντας βιοσυμβατές μεμβράνες αιμοκάθαρσης υψηλής ροής. Οι ασθενείς λάμβαναν rhEPO (ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη (Epoetin Alfa) (κατά μέσο όρο $6.833,3 \pm 3.588,7$ IU/εβδομάδα) και ηπαρίνη (4.470 ± 1.243 IU/συνεδρία) και ήταν κλινικά σταθεροί κατά τη διάρκεια της έρευνας. Τα αίτια της νεφρικής ανεπάρκειας ήταν η υπερτασική νεφροπάθεια (N = 11), η πολυκυστική νεφρική νόσος (N = 5), η σπειραματονεφρίτιδα (N = 2) και η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια άγνωστης αιτιολογίας (N=14). Οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, ανεξέλεγκτη υπέρταση, ενεργές λοιμώξεις, κακοήθειες, φλεγμονώδεις, αυτοάνοσες ή αιματολογικές παθήσεις ή άτομα που χρειάστηκαν μετάγγιση αίματος τους τελευταίους 3 μήνες αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Απομόνωση κυστιδίων πλάσματος

Για την απομόνωση των κυστιδίων από το πλάσμα των ασθενών και των υγιών ατόμων πραγματοποιήθηκε μια φυγοκέντρηση ολικού αίματος στα 2.500g για 15 λεπτά. Στη συνέχεια απομονώθηκε το υπερκείμενο πλάσμα το οποίο φυγοκεντρήθηκε ξανά στα 2.500g για 15 λεπτά. Αφού απομακρύνθηκαν τυχόν κυτταρικά υπολείμματα, ακολούθησε επεξεργασία του υπερκειμένου ώστε να μετρηθούν τα επίπεδα κυστιδίων στα δείγματα.

3.2 Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός κυστιδίων πλάσματος με κυτταρομετρία ροής

Για τη μελέτη των μικροκυστιδίων πλάσματος πραγματοποιήθηκε επώαση του πλούσιου σε κυστίδια πλάσματος με τη φθορίζουσα χρωστική Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). Το CFSE διαχέεται παθητικά στα κύτταρα. Μέσα στο κύτταρο, οι οξικές του ομάδες διασπώνται από ενδοκυτταρικές εστεράσες και τα μόρια μετατρέπονται σε φθορίζοντες εστέρες. Έτσι, η χρωστική αυτή βοηθάει στο διαχωρισμό των κυστιδίων από μη κυτταρικό υλικό που πιθανά να υπάρχει στο δείγμα. Στη συνέχεια, ακολούθησε ταυτοποίηση των κυστιδίων με επώαση με τους ειδικούς κυτταρικούς δείκτες CD235, ο οποίος εκφράζεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια και CD41, ο οποίος εκφράζεται στα αιμοπετάλια.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην επιφάνεια των κυστιδίων που αποτελεί έναν δείκτη κυτταρικής εκκαθάρισης για τα ερυθροκύτταρα, ενώ για τα αιμοπετάλια αποτελεί επιπλέον και δείκτη ενεργοποίησης. Για την ανίχνευση της χρησιμοποιήθηκε η χρωστική αννεξίνη V.

Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά σωληνάρια TruCount tubes τα οποία περιέχουν συγκεκριμένο αριθμό σφαιριδίων και χρησιμοποιούνται για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των κυστιδίων ανά μικρόλιτρο πλάσματος.

Η πειραματική διαδικασία που πραγματοποιήθηκε ήταν η εξής:

- 1) Προσθήκη 5μl χρωστικής CFSE σε 95μl πλάσματος
- 2) Επώαση για 10 λεπτά στους 4οC
- 3) Αφαίρεση υπερκειμένου

- 4) Σε 82μl διαλύματος αννεξίνης [Hepes-NaOH 0,01M(10mM) pH 7.4, NaCl 0,140 M (140Mm), CaCl₂ 2,5mM] προστίθεται 10μl πλάσματος, 3μl anti-CD41-PECy5, 3μl anti-CD235-APC και 2μl AnnV-PE, σε TruCount tube.
- 5) Ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- 6) Τερματισμός της αντίδρασης με 400μl διαλύματος αννεξίνης.
- 7) Μέτρηση 100.000 events στο κυτταρόμετρο

3.3 Μέθοδος κυτταρομετρίας ροής

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια αυτοματοποιημένη τεχνική που συνδυάζει τη σκέδαση και το φθορισμό με σκοπό την ποσοτικοποίηση κυτταρικών πληθυσμών και την ανάλυση των χαρακτηριστικών τους. Το κυτταρόμετρο αποτελείται από : i) το υδροδυναμικό σύστημα ροής, ii) το οπτικό σύστημα και iii) το ηλεκτρονικό σύστημα. Το υδροδυναμικό σύστημα περιλαμβάνει την κυψελίδα ροής μέσα από την οποία περνάνε τα κύτταρα σε μονήρη διάταξη. Το οπτικό σύστημα περιλαμβάνει τα laser, τα φίλτρα που διαχωρίζουν το φάσμα της ακτινοβολίας, και τους φωτοπολλαπλασιαστές που συλλέγουν τα φωτεινά σήματα. Η σκέδαση των κυττάρων μπορεί να είναι πρόσθια, η οποία αποκαλύπτει το μέγεθος των κυττάρων και πλάγια που αποκαλύπτει την ενδοκυττάρια πολυπλοκότητά τους (π.χ. κοκκία). Τα κύτταρα επισημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές, έτσι ώστε το φως που απορροφάται στη συνέχεια να εκπέμπεται σε διαφορετικές συχνότητες. Οι φωτοανιχνευτές συλλέγουν το σκεδαζόμενο ή εκπεμπόμενο φως. Από τα δεδομένα που συλλέγει ο ανιχνευτής μπορεί να γίνει ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός των κυττάρων/υποκυτταρικών σωματιδίων τα οποία μελετώνται.

3.4 Στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS- Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS Software; έκδοση 26.0 για Windows IBM Corp., Armonk, NY; υπό τη διοίκηση του UNIWA). Όλες οι μεταβλητές μελετήθηκαν για προφίλ κανονικής κατανομής. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων στις κανονικά κατανεμημένες παραμέτρους αξιολογήθηκαν με t-test χρησιμοποιώντας τη διόρθωση Bonferroni (ή δοκιμή Mann Whitney U για μη κανονικά κατανεμημένες παραμέτρους). Τα ζευγαρωμένα δείγματα αξιολογήθηκαν με t-test ή

δοκιμασία δύο σχετικών δειγμάτων, για κανονικά ή μη κανονικά κατανεμημένες παραμέτρους, αντίστοιχα, για την αξιολόγηση της επίδρασης της αιμοκάθαρσης (παράμετροι προ- και μετα-αιμοκάθαρσης).

4. Αποτελέσματα

Πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη αιματολογικών χαρακτηριστικών ανάμεσα σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς με ΧΝΑ και σε υγιή άτομα, η οποία έδειξε, όπως ήταν αναμενόμενο δείκτες αναιμίας, ουραιμίας και φλεγμονής στους ασθενείς. Τα κύρια δημογραφικά, αιματολογικά και σχετιζόμενα με τη θεραπεία χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Συγκεκριμένα, στους ασθενείς με ΧΝΑ παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός ερυθροκυττάρων, χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη, υποδηλώνοντας αναιμία. Ακόμα, οι ουραιμικές τοξίνες, όπως η ουρία, η κρεατινίνη κ.α. φαίνεται να υπάρχουν σε αυξημένα επίπεδα, επιβεβαιώνοντας τη συσσώρευση τοξινών στη ΧΝΑ. Παρά τις υψηλές τιμές των ουραιμικών τοξινών στο πλάσμα των ασθενών, παρατηρείται σημαντική μείωση τους μετά από θεραπεία με αιμοκάθαρση. Τέλος, η αυξημένη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), η φερριτίνη καθώς και η αύξηση της αναλογίας ουδετερόφιλα/λεμφοκύτταρα υποδηλώνουν την ύπαρξη φλεγμονής.

Πίνακας 1: Αιματολογικό πρότυπο και βιοχημικός έλεγχος ορού σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία αιμοκάθαρσης και σε υγιή άτομα.

Χαρακτηριστικά	Ασθενείς (n=32)		Υγιείς (n=15)	Φυσιολογικές Τιμές
	Προ-ΑΙΚ	Μετά-ΑΙΚ		
Διάρκεια αμοκάθαρσης (ΑΙΚ) (μήνες)	41.3±21.4		-	-
Ηλικία (χρόνια)	59±11.4		50±9.8	-
Δόση Ερυθροπιητίνης (IU/wk)	6,833.3±3,588.7		-	-
Βάρος (kg)	82.2±11.1	80.2±11.8	85.6±13.2	-
Αιματολογικός έλεγχος				
Λευκά αιμοσφαίρια WBC (x10 ³ /μL)	7.60±2.70	-	7.10±1.80	5.2-12.4
Ουδετερόφιλα (%)	64.7±8.3*	-	59.0±8.0	40.0-74.0

Λεμφοκύτταρα (%)	20.7±6.3**	-	28.7±6.6	19.0-48.0
Μονοκύτταρα (%)	7.4±1.6**	-	6.1±1.6	3.4-9.0
Ηωσινόφιλα (%)	4.9±3.9	-	2.9±1.9	0.0 -7.0
Βασεόφιλα (%)	0.7±0.4	-	0.8±0.3	0.0-1.5
Αναλογία Ουδετερόφιλα/Λεμφοκύτταρα	3.5±1.6**	-	1.9±0.6	1.3-3.5
Ερυθρά αιμοσφαίρια RBC (x10 ⁶ /μL)	3.80±0.59**	-	4.60±0.46	4.2-6.1
Αιμοσφαιρίνη (gr/dL)	11.1±1.3**	-	13.5±1.6	12.0-18.0
Αιματοκρίτης (%)	34.3±4.3**	-	40.6±4.4	37.0-52.0
Μέσος Όγκος Ερυθρών MCV (fL)	91.1±9.7	-	88.7±5.3	80.0-99.0
Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης MCH (pg)	29.4±3.4	-	30.5±2.0	27.0-31.0
Μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης MCHC (gr/dL)	32.3±0.9*	-	34.4±0.7	33.0-37.0
Εύρος κατανομής ευθροκυττάρων RDW (%)	15.8±1.1	-	13.0±3.0	11.5-14.5
Αιμοπετάλια PLT (x10 ³ /μL)	240.8±82.0	-	250.1±40.6	130.0-400.0
Μέσος όγκος αιμοπεταλίων (fL)	10.0±0.6**	-	7.8±1.3	7.2-11.1
Βιοχημικός έλεγχος ορού				
Γλυκόζη (mgr/dL)	86.8±22.2	-	89.5±12.1	70-105
Ουρία (mg/dL)	129.3±27.9**	39.1±12.7 [#]	33.9±9.4	18.0-55.0
Κρεατινίνη (mg/dL)	10.42±3.10**	3.90±1.42**[#]	0.92±0.16	0.72-1.25
Ουρικό οξύ (mg/dL)	6.1±1.0**	-	4.4±1.5	3.5-7.2
Παραθορμόνη (pg/mL)	388.3±216.2**	-	49.7±15.5	15.0-68.0
Ασβέστιο (mg/dL)	8.5±0.7**	-	9.5±0.2	8.4-10.2
Φώσφορος (mg/dL)	4.5±1.3**	-	3.1±0.5	2.4-4.7

Κάλιο (mmol/L)	4.95±0.61**	-	4.47±0.39	3.5-5.1
Νάτριο (mmol/L)	136.6±2.3**	-	139.3±2.3	136.0-145.0
Σίδηρος (mg/dL)	69.2±25.0	-	88.0±39.8	50-150 (γυναίκες); 60-160 (άνδρες)
Φερριτίνη (ng/mL)	263.3±153.3**	-	53.8±29.1	14.0-233.0 (γυναίκες); 16.4-293.3 (άνδρες)
Ολική Σιδηροδεσμευτική Ικανότητα (mg/dL)	251.6±53.3**	-	342.0±50.7	225.0-480.0
B12 (pg/mL)	602.6±265.5	-	414.3±179.5	179.0-1,162.0
b2 μικροσφαιρίνη (mg/L)	33.3±11.4**	-	1.4±0.5	0.7-1.8
Γαλακτική αφυδρογονάση LDH (IU/L)	210.6±67.6	-	203.3±54.3	125.0-220.0
Βιταμίνη-D (ng/mL)	11.6±6.5*	-	20.5±4.9	30.0-100.0
C-αντιδρώσα πρωτεΐνη CRP (mg/L)	12.5±10.2**	-	1.8±1.0	0.0-5.0

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (M.O±T.A). Έντονη γραφή: παθολογικές τιμές. *p<0.05 vs υγιείς; ** p<0.01 vs υγιείς; # p<0.05 προ vs μετά- από την αιμοκάθαρση (AIK).

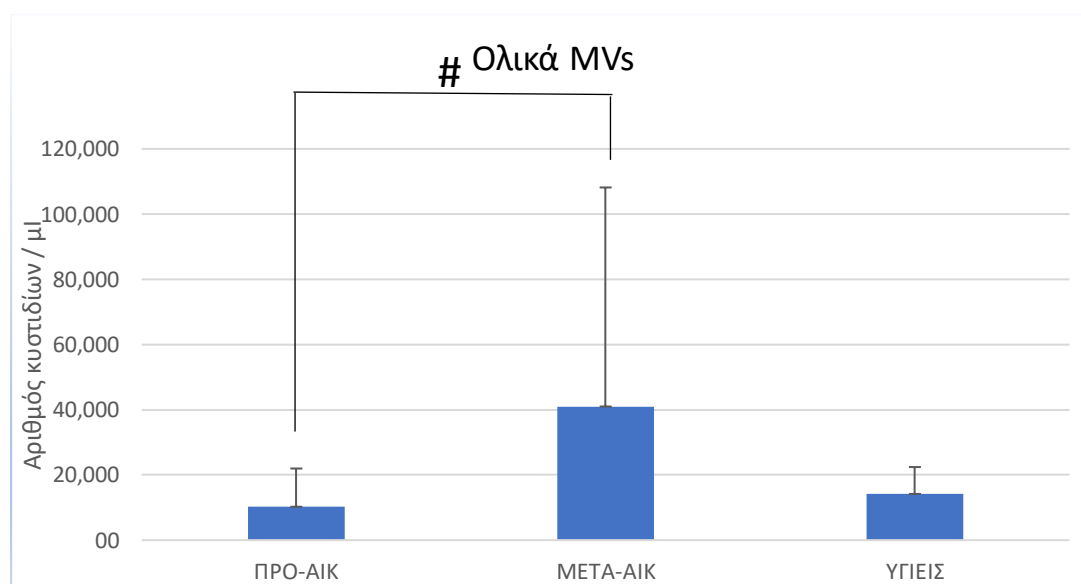
Οι μετρήσεις για τον αριθμό των ολικών κυστιδίων πλάσματος έδειξαν αυξημένα επίπεδα στους ασθενείς σε σχέση με τα υγιή άτομα, με τον αριθμό των κυστιδίων μετά την αιμοκάθαρση να είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένος σε σχέση με τα επίπεδα πριν από την αιμοκάθαρση (Πίνακας 2, Διάγραμμα 1).

Πίνακας 2: Απόλυτος αριθμός κυστιδίων ανα μl πλάσματος σε υγιή άτομα και σε ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση (ΠΡΟ-ΑΙΚ) και μετά την αιμοκάθαρση (ΜΕΤΑ-ΑΙΚ).

	Ολικά MVs (MVs/μl)
ΠΡΟ-ΑΙΚ (Μ.Ο. ± ΤΑ)	10.240,6 ± 11.727,7
ΜΕΤΑ-ΑΙΚ (Μ.Ο. ± ΤΑ)	40.988,5 ± 67.185,2 [#]
ΥΓΙΕΙΣ (Μ.Ο. ± ΤΑ)	14.168,7 ± 8.248,0

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως: Μέσος όρος (Μ.Ο.) ± τυπική απόκλιση (SD).

Τα κυστίδια που μετρήθηκαν ταυτοποιήθηκαν ως κυστίδια με εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, ολικά κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης, κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης με εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης (PS), κυστίδια αιμοπεταλιακής προέλευσης και κυστίδια αιμοπεταλιακής προέλευσης με εξωτερίκευση PS (Πίνακας 3). Οι περισσότερες κατηγορίες κυστιδίων φαίνεται να είναι σημαντικά αυξημένες στους ασθενείς μετά την αιμοκάθαρση σε σχέση με τα υγιή άτομα.



Διάγραμμα 1: Διαγραμματική απεικόνιση αριθμού μικροκυστιδίων σε υγιή άτομα και σε ασθενείς πριν την αιμοκάθαρση (ΠΡΟ-ΑΙΚ) και μετά την αιμοκάθαρση (ΜΕΤΑ-ΑΙΚ). (#): στατιστικά σημαντική διαφορά.

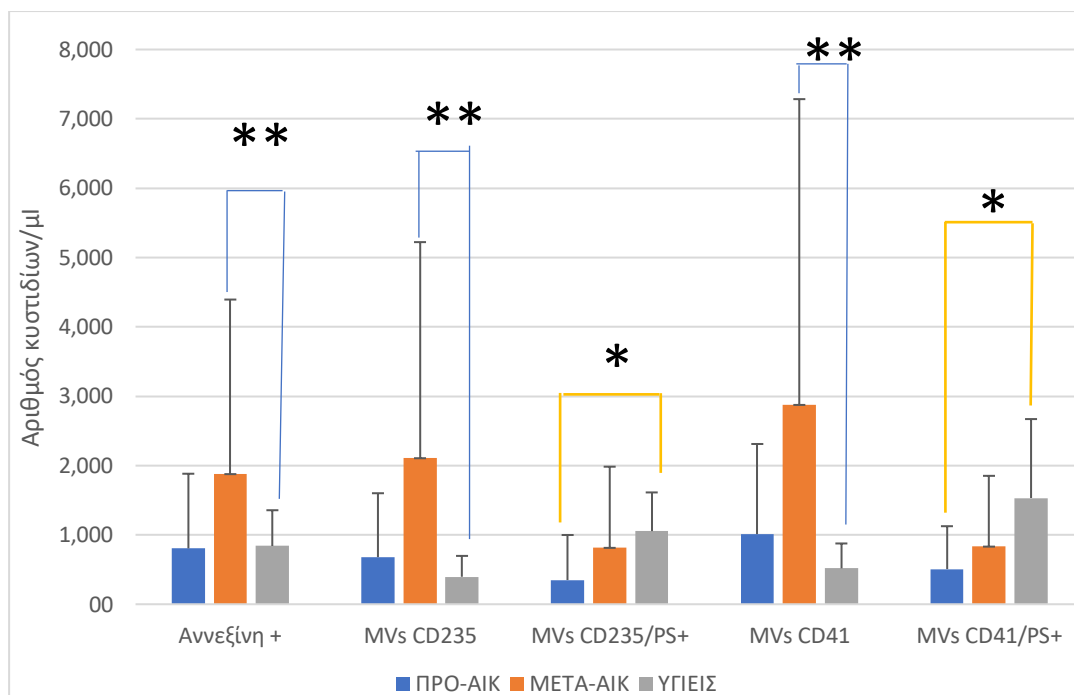
Πιο συγκεκριμένα, πριν από την αιμοκάθαρση οι ασθενείς έχουν στατιστικά σημαντικά μειωμένα ερυθροκυτταρικά και αιμοπεταλιακά κυστίδια που χαρακτηρίζονται από εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης σε σχέση με τα υγιή άτομα. Μετά από την αιμοκάθαρση, όλα τα κυστίδια που είναι θετικά στην αννεξίνη είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς σε σχέση με του υγιείς. Το ίδιο πρότυπο παρατηρείται και για τα ολικά ερυθροκυτταρικά και αιμοπεταλιακά κυστίδια (Πίνακας 3, Διάγραμμα 2).

Μελετώντας την επίδραση της αιμοκάθαρσης και συγκρίνοντας τα επίπεδα των κυστιδίων στους ασθενείς πριν και μετά την αιμοκάθαρση, παρατηρείται πως τα ολικά κυστίδια επηρεάζονται σημαντικά από τη θεραπεία κάθαρσης, η οποία φαίνεται να επιδεινώνει την κυστιδιοποίηση στο σύνολο των κυττάρων του αίματος που μελετώνται (ερυθροκυτταρικά και αιμοπεταλιακά) (**Error! Reference source not found.**).

Πίνακας 3: Απόλυτος αριθμός και ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός κυστιδίων πλάσματος σε υγιή άτομα και ασθενείς πριν και μετά τη συνεδρία αιμοκάθαρσης

	PS +	MVs CD235+	MVs CD235+/PS+	MVs CD41+	MVs CD41+/PS+
ΠΡΟ-ΑΙΚ (Μ.Ο. ± Τ.Α)	805,3±1076,8	679,1±921,9	349,1±649,5 (*)	1.011,1±1.299,8	506,9±618,4 (*)
ΜΕΤΑ-ΑΙΚ (Μ.Ο. ± Τ.Α)	1.877,2±2.516,8 (**)	2.106,5±3.115,8 (**)	814,1±1.169,7	2.875,3±4.408,9 (**)	832,2±1.019,4
ΥΓΙΕΙΣ (Μ.Ο. ± Τ.Α)	840,1±515,7	396,1±301,0	1.054,5±558,0	517,6±358,7	1.532,2±1.138,3

PS+: κυστίδια που παρουσιάζουν εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, CD235+: κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης, CD235+/PS+: κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης με εξωτερίκευση PS, CD41+: κυστίδια αιμοπεταλιακής προέλευσης και CD41+/PS+: κυστίδια αιμοπεταλιακής προέλευσης με εξωτερίκευση PS. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως Μέσος όρος (Μ.Ο.) ± τυπική απόκλιση (Τ.Α.). (*): στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς ΠΡΟ-ΑΙΚ και υγιή άτομα, (**): στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς ΜΕΤΑ-ΑΙΚ και υγιή άτομα.



Διάγραμμα 2: Διαγραμματική απεικόνιση κυστιδίων σε υγιή άτομα και ασθενείς ΠΡΟ-ΑΙΚ και META-ΑΙΚ που παρουσιάζουν εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, ολικών κυστιδίων ερυθροκυτταρικής προέλευσης, κυστιδίων ερυθροκυτταρικής προέλευσης με εξωτερίκευση PS, ολικών κυστιδίων αιμοπεταλιακής προέλευσης και κυστιδίων αιμοπεταλιακής προέλευσης με εξωτερίκευση PS. (*): στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς ΠΡΟ-ΑΙΚ και υγιή άτομα, (**): στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς META-ΑΙΚ και υγιή άτομα. (#): στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ασθενείς ΠΡΟ-ΑΙΚ και META-ΑΙΚ.

Πίνακας 4: Στατιστικά σημαντικές διαφορές με έλεγχο t-test ανάμεσα στον αριθμό κυστιδίων σε ασθενείς και υγιή άτομα.

	Ολικά MVs	Αννεξίτη +	MVs CD235	MVs CD235/PS+	MVs CD41	MVs CD41/PS+
ΠΡΟ έναντι ΥΓΙΩΝ	0,286	0,904	0,220	0,004 (*)	0,124	0,015 (*)
META έναντι ΥΓΙΩΝ	0,059	0,048 (**)	0,017(**)	0,983	0,020 (**)	0,153
ΠΡΟ έναντι META	0,050 (#)	0,086	0,056	0,126	0,077	0,226

Παρουσιάζονται οι τιμές p σε σύγκριση μεταξύ ασθενών ΠΡΟ-ΑΙΚ έναντι υγιών ατόμων (*), ασθενών META-ΑΙΚ έναντι υγιών ατόμων (**), και ασθενών ΠΡΟ-ΑΙΚ έναντι META-ΑΙΚ (#).

5. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς με ΧΝΑ και υγιή άτομα δείχνει την επίδραση της ασθένειας αλλά και της θεραπείας αιμοκάθαρσης στα κύτταρα του αίματος.

Η αναιμία αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα στη ΧΝΑ (Macdougall, 2001) (Ratcliffe, 1993), οπότε στη σύγκριση των ασθενών με τα υγιή άτομα αναμενόμενα οι αιματολογικοί δείκτες που αφορούν στην αναιμία βρέθηκαν μειωμένοι, επιβεβαιώνοντας τη θεωρία αυτή. Παρόμοια, μελετήθηκαν οι βιοχημικοί παράμετροι ορού, όπως η ουρία, το ουρικό οξύ και η κρεατινίνη, όπου βρέθηκαν αυξημένα σε σχέση με τα υγιή άτομα επιβεβαιώνοντας τη συσσώρευση των ουραιμικών τοξινών.

Οι διαταραχές που σχετίζονται με ΧΝΑ, συμπεριλαμβανομένης της παραμόρφωσης του σχήματος των ερυθροκυττάρων, της χρόνιας φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες επηρεάζουν την κυστιδιοποίηση των κυττάρων του αίματος (Faure et al., 2006) (Trappenburg et al., 2012) (Amabile et al., 2005). Έτσι, το κύριο μέρος της μελέτης αυτής αφορά τα επίπεδα κυστιδιοποίησης στα ερυθροκύτταρα και τα αιμοπετάλια στους ασθενείς με ΧΝΑ.

Στην παρούσα μελέτη το σύνολο των κυστιδίων βρέθηκε σε φυσιολογικά επίπεδα πριν από την αιμοκάθαρση γεγονός το οποίο έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες σύμφωνα με τις οποίες οι ασθενείς με ΧΝΑ χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα κυστιδιοποίησης (Faure et al., 2006) (Ando et al., 2002a). Έχει βρεθεί πως ένα μεγάλο ποσοστό των ερυθροκυτταρικών κυστιδίων σε ασθενείς με ΧΝΑ συνδέεται με την αννεξίνη-V, υποδεικνύοντας την παρουσία φωσφατιδυλοσερίνης στη μεμβράνη τους (Trappenburg et al., 2012) (Nguyen et al., 2016) (Georgatzakou et al., 2017). Παρόλα αυτά οι μετρήσεις για την συγκεκριμένη ομάδα κυστιδίων έδειξε αντίθετα αποτελέσματα, με τους υγιείς να παρουσιάζουν μεγαλύτερο αριθμό κυστιδίων από τους ασθενείς. Έτσι και τα επίπεδα των αιμοπεταλιακών και των ερυθροκυτταρικών κυστιδίων θετικών στην εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης είναι σημαντικά μειωμένα σε σχέση με των υγιών ατόμων, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να σχετίζεται με την αιμορραγική διάθεση η οποία χαρακτηρίζει αυτήν την ομάδα των ασθενών (Jalal et al., 2010) (Di Minno et al., 1985) (Bloom et al., 1972) (Evans et al., 1972)

Μετά από την αιμοκάθαρση παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα κυστιδιοποίησης των ερυθροκυττάρων και των αιμοπεταλίων σε σχέση με τα υγιή άτομα επιβεβαιώνοντας

προηγούμενες μελέτες (Daniel et al., 2006) (de Laval et al., 2019). Η αύξηση των ερυθροκυτταρικών κυστιδίων μετά τη θεραπεία αιμοκάθαρσης πιθανά οφείλεται στο μηχανικό στρες, το οποίο υφίστανται τα ερυθροκύτταρα καθώς περνούν από τα φίλτρα αιμοκάθαρσης, αλλά και το οξειδωτικό και μεταβολικό στρες που υφίστανται λόγω επαφής με τα φίλτρα (Zhao, 2013).

Από την άλλη πλευρά, η αύξηση στα αιμοπεταλιακά κυστίδια πιθανά να είναι αποτέλεσμα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από τη διαδικασία αιμοκάθαρσης (Sloand and Sloand, 1997). Παρότι η αύξηση των θετικών στη φωσφατιδυλοσερίνη κυστιδίων δεν είναι στατιστικά σημαντική λόγω της μεγάλης ετερογένειας του δείγματος των ασθενών, φαίνεται μια τάση για αύξηση τόσο στα ερυθροκυτταρικά όσο και στα αιμοπεταλιακά κυστίδια, γεγονός το οποίο πιθανά σχετίζεται με τη θρομβωτική διάθεση που χαρακτηρίζει τους ασθενείς μετά τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης (Casserly and Dember, 2003) (Sirolli et al., 2001).

Η κύρια λειτουργία των κυστιδίων που προέρχονται από αιμοπετάλια σχετίζεται με προπηκτική δράση. Όπως έχει αναφερθεί, η εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων δηλώνει ενεργοποίηση. Η φωσφατιδυλοσερίνη που συμβάλει σημαντικά στην προπηκτική ικανότητα των κυστιδίων, καθώς παρέχει θέσεις δέσμευσης παραγόντων πήξης, επιταχύνει το σχηματισμό θρομβίνης (Owens and Mackman, 2011). Για το συγκεκριμένο είδος κυστιδίων έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες με σκοπό την συσχέτιση της παραγωγής κυστιδίων με τα θρομβωτικά επεισόδια που εμφανίζονται στους ασθενείς με ΧΝΑ. Πολλές από τις έρευνες αυτές έδειξαν σημαντικά αυξημένο αριθμό κυστιδίων αιμοπεταλιακής προέλευσης (Faure et al., 2006) (Ando et al., 2002a) (Trappenburg et al., 2012).

Όσον αφορά στην επίδραση της αιμοκάθαρσης στην παραγωγή κυστιδίων, η παρούσα μελέτη έδειξε σημαντική αύξηση των ολικών κυστιδίων μετά την αιμοκάθαρση. Η θεωρία αυτή είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών (Faure et al., 2006) (Daniel et al., 2006). Συγκεκριμένα για τα κυστίδια που προέρχονται από αιμοπετάλια υπάρχουν μελέτες στις οποίες παρατηρήθηκε αύξηση των κυστιδίων μετά την αιμοκάθαρση (Faure et al., 2006), όπως βρέθηκε και στην μελέτη αυτή, ενώ άλλες που έδειξαν πως τα επίπεδα κυστιδίων είναι παρόμοια πριν και μετά την αιμοκάθαρση (Trappenburg et al., 2012) (Ando et al., 2002a) (Ando et al., 2002b) (Boulanger et al., 2007) (Chuang et al., 2003). Για τον αριθμό των κυστιδίων που προέρχονται από ερυθρά

αιμοσφαίρια παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση μετά την αιμοκάθαρση, σε αντίθεση με άλλες μελέτες που εμφανίστηκαν παρόμοιοι αριθμοί και δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση κατά την αιμοκάθαρση (Trappenburg et al., 2012). Η αύξηση αυτή υποδηλώνει μορφολογικές διαταραχές των ερυθρών αιμοσφαιρίων, οι οποίες έχουν επιβεβαιωθεί από προηγούμενες μελέτες (Gyawali et al., 2015) , αλλά και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

6. Συμπεράσματα

Η ΧΝΑ συνοδεύεται από παραγωγή τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην πήξη του αίματος μέσω της εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης, αλλά είναι και δείκτες κυτταρικού στρες ή/και ενεργοποίησης. Η θεραπεία μέσω της αιμοκάθαρσης επηρεάζει σημαντικά την κυστιδοποίηση των κυττάρων του αίματος, δείχνοντας πως η επαφή των κυττάρων με τα φίλτρα της αιμοκάθαρσης αυξάνει σημαντικά τη απελευθέρωση κυστιδίων. Τα αυξημένα επίπεδα κυστιδίων που προέρχονται από ερυθρά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια μπορούν να προκαλέσουν ανισορροπία μεταξύ θρόμβωσης και αιμορραγίας σε αυτούς ασθενείς.

Περίληψη

Η συσσώρευση ουραιμικών τοξινών, λόγω μη φυσιολογικής λειτουργίας των νεφρών στη Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια (ΧΝΑ), σχετίζεται με σημαντικές διαταραχές στα κύτταρα του αίματος. Μία από αυτές είναι η παραγωγή κυστιδίων. Τα κυστίδια είναι σφαιρικά θραύσματα κυτταρικής μεμβράνης που απελευθερώνονται από διάφορους τύπους κυττάρων υπό φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ποσοτικοποίηση και ο ανοσοφαινοτυπικός προσδιορισμός των κυστιδίων του πλάσματος με κυτταρομετρία ροής, για τον χαρακτηρισμό τους ως ερυθροκυτταρικής ή αιμοπεταλιακής προέλευσης, σε ασθενείς με ΧΝΑ τελικού σταδίου που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Οι ασθενείς με ΧΝΑ είχαν σημαντικά χαμηλότερους αριθμούς, θετικών στην εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, κυστιδίων σε σχέση με τους υγιείς. Η αιμοκάθαρση αύξησε σημαντικά τον αριθμό τόσο των ερυθροκυτταρικών όσο και των αιμοπεταλιακών κυστιδίων. Συμπερασματικά, η νεφρική ανεπάρκεια συνοδεύεται από μειωμένη παραγωγή θετικών στη φωσφατιδυλοσερίνη κυστιδίων σε σύγκριση με υγιή άτομα, γεγονός που πιθανά σχετίζεται με την αιμορραγική διάθεση που χαρακτηρίζει τους ασθενείς. Επιπλέον, το μηχανικό αλλά και το οξειδωτικό στρες στο οποίο υποβάλλονται τα κύτταρα του αίματος κατά τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό κυστιδιοποίησης των ερυθροκυττάρων, ενώ η θεραπεία αιμοκάθαρσης φαίνεται να οδηγεί και σε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων η οποία εκδηλώνεται με την παραγωγή αιμοπεταλιακών κυστιδίων.

Abstract

The accumulation of uremic toxins, due to the abnormal kidney function in Chronic Kidney Disease, is associated with significant disorders in blood cells. One of them is the extracellular vesicle production. Extracellular vesicles are spherical fragments of cell membrane released from different cell types under normal or pathological conditions. The aim of this study is the quantification and the immunophenotypic characterization of plasma vesicles using flow cytometry, for their characterization as erythrocyte or platelet- derived vesicles, in patients with end stage chronic kidney disease undergoing hemodialysis treatment. Chronic kidney disease patients had significantly lower numbers of vesicles that were positive to phosphatidylserine externalization than the healthy ones. Hemodialysis increased the number of both erythrocyte and platelet-derived vesicles. In conclusion, kidney disease is accompanied by reduced production of phosphatidylserine-positive vesicles compared to healthy ones, which is probably related to the bleeding diathesis of the patients. In addition, the mechanical and oxidative stress to which the blood cells are subjected during the process of hemodialysis affects the rate of erythrocyte cystization, while hemodialysis treatment seems to lead to platelet activation which is manifested by the production of platelet-derived vesicles.

Uncategorized References

- ABED, M., ARTUNC, F., ALZOUBI, K., HONISCH, S., BAUMANN, D., FÖLLER, M. & LANG, F. 2014. Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease. *J Mol Med (Berl)*, 92, 871-9.
- AGARWAL, A. K. 2006. Practical approach to the diagnosis and treatment of anemia associated with CKD in elderly. *J Am Med Dir Assoc*, 7, S7-S12; quiz S17-21.
- AHMED, M. S., ABED, M., VOELKL, J. & LANG, F. 2013. Triggering of suicidal erythrocyte death by uremic toxin indoxyl sulfate. *BMC Nephrol*, 14, 244.
- ALESHNICK, M., FOLEY, J. H., KEATING, F. K. & BUTENAS, S. 2016. Procoagulant activity in stored units of red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 474, 680-685.
- ALMQUIST, T., MOBARREZ, F., JACOBSON, S. H., WALLÉN, H. & HJEMDAHL, P. 2016. Effects of lipid-lowering treatment on circulating microparticles in patients with diabetes mellitus and chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 31, 944-52.
- AMABILE, N., GUÉRIN, A. P., LEROYER, A., MALLAT, Z., NGUYEN, C., BODDAERT, J., LONDON, G. M., TEDGUI, A. & BOULANGER, C. M. 2005. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 16, 3381-8.
- AMMIRATI, A. L. 2020. Chronic Kidney Disease. *Rev Assoc Med Bras (1992)*, 66Suppl 1, s03-s09.
- ANDO, M., IWATA, A., OZEKI, Y., TSUCHIYA, K., AKIBA, T. & NIHEI, H. 2002a. Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients. *Kidney Int*, 62, 1757-63.
- ANDO, M., IWATA, A., OZEKI, Y., TSUCHIYA, K., AKIBA, T. & NIHEI, H. 2002b. Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients. *Kidney International*, 62, 1757-1763.
- ANDREWS, D. A. & LOW, P. S. 1999. Role of red blood cells in thrombosis. *Curr Opin Hematol*, 6, 76-82.
- ANTONELOU, M. H., GEORGATZAKOU, H. T., TZOUNAKAS, V. L., VELENTZAS, A. D., KOKKALIS, A. C., KRIEBARDIS, A. G. & PAPASSIDERI, I. S. 2014. Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study. *J Proteomics*, 101, 88-101.
- ANTONELOU, M. H., KRIEBARDIS, A. G., VELENTZAS, A. D., KOKKALIS, A. C., GEORGAKOPOULOU, S. C. & PAPASSIDERI, I. S. 2011. Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. *J Proteomics*, 74, 2441-52.
- BABITT, J. L. & LIN, H. Y. 2012. Mechanisms of anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol*, 23, 1631-4.
- BARTOSZ, G. 1981. Aging of the erythrocyte. IV. Spin-label studies of membrane lipids, proteins and permeability. *Biochim Biophys Acta*, 644, 69-73.
- BAUMANN KREUZIGER, L., EDGREN, G., HAUSER, R. G., ZACCARO, D., KISS, J., WESTLAKE, M., BRAMBILLA, D. & MAST, A. E. 2021. Red blood cell transfusion does not increase risk of venous or arterial thrombosis during hospitalization. *Am J Hematol*, 96, 218-225.
- BLOOM, A. L., EVANS, E. P. & BRANCH, R. A. 1972. Platelet function in chronic renal failure. *Acta Univ Carol Med Monogr*, 53, 333-8.
- BOBRIE, A., COLOMBO, M., RAPOSO, G. & THÉRY, C. 2011. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, 12, 1659-68.
- BOULANGER, C. M., AMABILE, N., GUÉRIN, A. P., PANNIER, B., LEROYER, A. S., MALLAT, C. N., TEDGUI, A. & LONDON, G. M. 2007. In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension*, 49, 902-8.
- BRAHMBHATT, A., REMUZZI, A., FRANZONI, M. & MISRA, S. 2016. The molecular mechanisms of hemodialysis vascular access failure. *Kidney Int*, 89, 303-316.

- BRAMBILLA, M., FACCHINETTI, L., CANZANO, P., ROSSETTI, L., FERRI, N., BALDUINI, A., ABBONANTE, V., BOSELLI, D., DE MARCO, L., DI MINNO, M. N., TOSCHI, V., CORSINI, A., TREMOLI, E. & CAMERA, M. 2015. Human megakaryocytes confer tissue factor to a subset of shed platelets to stimulate thrombin generation. *Thromb Haemost*, 114, 579-92.
- CASES, A., EGOCHÉAGA, M. I., TRANCHE, S., PALLARÉS, V., OJEDA, R., GÓRRIZ, J. L. & PORTOLÉS, J. M. 2018. [Anemia of chronic kidney disease: Protocol of study, management and referral to Nephrology]. *Aten Primaria*, 50, 60-64.
- CASSERLY, L. F. & DEMBER, L. M. 2003. Thrombosis in end-stage renal disease. *Semin Dial*, 16, 245-56.
- CHUANG, Y. C., CHEN, J. B., YANG, L. C. & KUO, C. Y. 2003. Significance of platelet activation in vascular access survival of haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 18, 947-54.
- COLOMBO, M., RAPOSO, G. & THÉRY, C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 255-89.
- COSTA, E., ROCHA, S., ROCHA-PEREIRA, P., CASTRO, E., MIRANDA, V., FARIA MDO, S., LOUREIRO, A., QUINTANILHA, A., BELO, L. & SANTOS-SILVA, A. 2008. Changes in red blood cells membrane protein composition during hemodialysis procedure. *Ren Fail*, 30, 971-5.
- CRESCITELLI, R., LÄSSER, C., SZABÓ, T. G., KITTEL, A., ELDH, M., DIANZANI, I., BUZÁS, E. I. & LÖTVALL, J. 2013. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles*, 2.
- D'ALESSANDRO, A., KRIEBARDIS, A. G., RINALDUCCI, S., ANTONÉLOU, M. H., HANSEN, K. C., PAPASSIDERI, I. S. & ZOLLA, L. 2015. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. *Transfusion*, 55, 205-19.
- D'AMICI, G. M., RINALDUCCI, S. & ZOLLA, L. 2007. Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage. *J Proteome Res*, 6, 3242-55.
- DANESH, A., INGLIS, H. C., JACKMAN, R. P., WU, S., DENG, X., MUENCH, M. O., HEITMAN, J. W. & NORRIS, P. J. 2014. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro. *Blood*, 123, 687-96.
- DANIEL, L., FAKHOURI, F., JOLY, D., MOUTHON, L., NUSBAUM, P., GRUNFELD, J. P., SCHIFFERLI, J., GUILLEVIN, L., LESAVRE, P. & HALBWACHS-MECARELLI, L. 2006. Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int*, 69, 1416-23.
- DE LAVAL, P., MOBARREZ, F., ALMQUIST, T., VASSIL, L., FELLSTRÖM, B. & SOVERI, I. 2019. Acute effects of haemodialysis on circulating microparticles. *Clin Kidney J*, 12, 456-462.
- DEVALET, B., WANNEZ, A., BAILLY, N., ALPAN, L., GHELDOF, D., DOUXFILS, J., DENEYS, V., BIHIN, B., CHATELAIN, B., DOGNÉ, J. M., CHATELAIN, C. & MULLIER, F. 2018. Application of a clot-based assay to measure the procoagulant activity of stored allogeneic red blood cell concentrates. *Blood Transfus*, 16, 163-172.
- DHONDT, A., VANHOLDER, R., VAN BIESEN, W. & LAMEIRE, N. 2000. The removal of uremic toxins. *Kidney International*, 58, S47-S59.
- DI MINNO, G., MARTINEZ, J., MCKEAN, M. L., DE LA ROSA, J., BURKE, J. F. & MURPHY, S. 1985. Platelet dysfunction in uremia. Multifaceted defect partially corrected by dialysis. *Am J Med*, 79, 552-9.
- EICH, R. F., LI, T., LEMON, D. D., DOHERTY, D. H., CURRY, S. R., AITKEN, J. F., MATHEWS, A. J., JOHNSON, K. A., SMITH, R. D., PHILLIPS, G. N., JR. & OLSON, J. S. 1996. Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry*, 35, 6976-83.
- EKNOYAN, G. & BROWN, C. H., 3RD 1981. Biochemical abnormalities of platelets in renal failure. Evidence for decreased platelet serotonin, adenosine diphosphate and Mg-dependent adenosine triphosphatase. *Am J Nephrol*, 1, 17-23.

- EVANS, E. P., BRANCH, R. A. & BLOOM, A. L. 1972. A clinical and experimental study of platelet function in chronic renal failure. *J Clin Pathol*, 25, 745-53.
- FAURE, V., DOU, L., SABATIER, F., CERINI, C., SAMPOL, J., BERLAND, Y., BRUNET, P. & DIGNAT-GEORGE, F. 2006. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost*, 4, 566-73.
- FLAUMENHAFT, R. 2006. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells Mol Dis*, 36, 182-7.
- GAO, C., JI, S., DONG, W., QI, Y., SONG, W., CUI, D. & SHI, J. 2015. Indolic uremic solutes enhance procoagulant activity of red blood cells through phosphatidylserine exposure and microparticle release. *Toxins (Basel)*, 7, 4390-403.
- GEORGATZAKOU, H. T., ANTONELLOU, M. H., PAPASSIDERI, I. S. & KRIEBARDIS, A. G. 2016. Red blood cell abnormalities and the pathogenesis of anemia in end-stage renal disease. *Proteomics Clin Appl*, 10, 778-90.
- GEORGATZAKOU, H. T., PAVLOU, E. G., PAPAGEORGIOU, E. G., PAPASSIDERI, I. S., KRIEBARDIS, A. G. & ANTONELLOU, M. H. 2020. The Multi-Faced Extracellular Vesicles in the Plasma of Chronic Kidney Disease Patients. *Front Cell Dev Biol*, 8, 227.
- GEORGATZAKOU, H. T., TZOUNAKAS, V. L., KRIEBARDIS, A. G., VELENTZAS, A. D., PAPAGEORGIOU, E. G., VOULGARIDOU, A. I., KOKKALIS, A. C., ANTONELLOU, M. H. & PAPASSIDERI, I. S. 2017. Pathophysiological aspects of red blood cells in end-stage renal disease patients resistant to recombinant human erythropoietin therapy. *Eur J Haematol*, 98, 590-600.
- GEVI, F., D'ALESSANDRO, A., RINALDUCCI, S. & ZOLLA, L. 2012. Alterations of red blood cell metabolome during cold liquid storage of erythrocyte concentrates in CPD-SAGM. *Journal of Proteomics*, 76, 168-180.
- GRAZZINI, G. & VAGLIO, S. 2012. Red blood cell storage lesion and adverse clinical outcomes: post hoc ergo propter hoc? *Blood Transfus*, 10 Suppl 2, s4-6.
- GROVER, S. P. & MACKMAN, N. 2018. Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 38, 709-725.
- GUESCINI, M., GENEDANI, S., STOCCHI, V. & AGNATI, L. F. 2010. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm (Vienna)*, 117, 1-4.
- GYAWALI, P., RICHARDS, R. S., BWITITI, P. T. & NWOSE, E. U. 2015. Association of abnormal erythrocyte morphology with oxidative stress and inflammation in metabolic syndrome. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 54, 360-363.
- HAEST, C. W. M. 2003. Distribution and Movement of Membrane Lipids. In: BERNHARDT, I. & ELLORY, J. C. (eds.) *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- HAMZA, E., METZINGER, L. & METZINGER-LE MEUTH, V. 2020. Uremic Toxins Affect Erythropoiesis during the Course of Chronic Kidney Disease: A Review. *Cells*, 9.
- HASHIMOTO, H., MIO, T. & SUMINO, K. 1996. Lipid abnormalities of erythrocyte membranes in hemodialysis patients with chronic renal failure. *Clin Chim Acta*, 252, 137-45.
- HEIJNEN, H. F., SCHIEL, A. E., FIJNHEER, R., GEUZE, H. J. & SIXMA, J. J. 1999. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*, 94, 3791-9.
- HELMS, C. C., MARVEL, M., ZHAO, W., STAHL, M., VEST, R., KATO, G. J., LEE, J. S., CHRIST, G., GLADWIN, M. T., HANTGAN, R. R. & KIM-SHAPIRO, D. B. 2013. Mechanisms of hemolysis-associated platelet activation. *J Thromb Haemost*, 11, 2148-54.
- HEZEL, M. E. V., NIEUWLAND, R., BRUGGEN, R. V. & JUFFERMANS, N. P. 2017. The Ability of Extracellular Vesicles to Induce a Pro-Inflammatory Host Response. *Int J Mol Sci*, 18.

- HIMMELFARB, J., LAZARUS, J. M. & HAKIM, R. 1991. Reactive oxygen species production by monocytes and polymorphonuclear leukocytes during dialysis. *Am J Kidney Dis*, 17, 271-6.
- HORSTMAN, L. L. & AHN, Y. S. 1999. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol*, 30, 111-42.
- IBRAHIM, F. F., GHANNAM, M. M. & ALI, F. M. 2002. Effect of dialysis on erythrocyte membrane of chronically hemodialyzed patients. *Ren Fail*, 24, 779-90.
- ITALIANO, J. E., JR., MAIRUHU, A. T. & FLAUMENHAFT, R. 2010. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr Opin Hematol*, 17, 578-84.
- JALAL, D. I., CHONCHOL, M. & TARGHER, G. 2010. Disorders of hemostasis associated with chronic kidney disease. *Semin Thromb Hemost*, 36, 34-40.
- JANK, H. & SALZER, U. 2011. Vesicles generated during storage of red blood cells enhance the generation of radical oxygen species in activated neutrophils. *ScientificWorldJournal*, 11, 173-85.
- 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). *J Biol Chem*, 262, 9412-20.
- KAW, D. & MALHOTRA, D. 2006. Platelet dysfunction and end-stage renal disease. *Semin Dial*, 19, 317-22.
- KOSHIAR, R. L., SOMAJO, S., NORSTRÖM, E. & DAHLBÄCK, B. 2014. Erythrocyte-derived microparticles supporting activated protein C-mediated regulation of blood coagulation. *PLoS One*, 9, e104200.
- KOWAL, J., ARRAS, G., COLOMBO, M., JOUVE, M., MORATH, J. P., PRIMDAL-BENGTSON, B., DINGLI, F., LOEW, D., TKACH, M. & THÉRY, C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E968-77.
- KUO, W. P., TIGGES, J. C., TOXAVIDIS, V. & GHIRAN, I. 2017. Red Blood Cells: A Source of Extracellular Vesicles. *Methods Mol Biol*, 1660, 15-22.
- LESAFFER, G., DE SMET, R., LAMEIRE, N., DHONDT, A., DUYM, P. & VANHOLDER, R. 2000. Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane. *Nephrol Dial Transplant*, 15, 50-7.
- LITVINOV, R. I. & WEISEL, J. W. 2017. Role of red blood cells in haemostasis and thrombosis. *ISBT Sci Ser*, 12, 176-183.
- LLORENTE, A., SKOTLAND, T., SYLVÄNNE, T., KAUKANEN, D., RÓG, T., ORŁOWSKI, A., VATTULAINEN, I., EKROOS, K. & SANDVIG, K. 2013. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1831, 1302-9.
- LO CICERO, A., STAHL, P. D. & RAPOSO, G. 2015. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Curr Opin Cell Biol*, 35, 69-77.
- LUTZ, H. U., LIU, S. C. & PALEK, J. 1977. Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion. I. Characterization of spectrin-free vesicles. *J Cell Biol*, 73, 548-60.
- LY, J., MARTICORENA, R. & DONNELLY, S. 2004. Red blood cell survival in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis*, 44, 715-9.
- MÄLLER, I., KLOCKE, A., ALEX, M., KOTZSCH, M., LUTHER, T., MORGENSTERN, E., ZIESENISS, S., ZÄHLER, S., PREISSNER, K. & ENGELMANN, B. 2003. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *Faseb j*, 17, 476-8.
- MACDOUGALL, I. C. 2001. Role of uremic toxins in exacerbating anemia in renal failure. *Kidney Int Suppl*, 78, S67-72.
- MACKMAN, N. 2009. The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost*, 7 Suppl 1, 136-9.
- MADUELL, F., FERNANDEZ, J. & DÍEZ, J. 1990. Alterations of the Cl⁻/NaCO₃⁻ anion exchanger in erythrocytes of uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant*, 5, 1018-22.

- MOAL, V., BRUNET, P., DOU, L., MORANGE, S., SAMPOL, J. & BERLAND, Y. 2003. Impaired expression of glycoproteins on resting and stimulated platelets in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant*, 18, 1834-41.
- MOHANTY, J. G., NAGABABU, E. & RIFKIND, J. M. 2014. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol*, 5, 84.
- MOREL, O., TOTI, F., HUGEL, B. N. D., BAKOUBOULA, B., CAMOIN-JAU, L., DIGNAT-GEORGE, F. O. & FREYSSINET, J.-M. 2006. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26, 2594-2604.
- NGUYEN, D. B., LY, T. B., WESSELING, M. C., HITTINGER, M., TORGE, A., DEVITT, A., PERRIE, Y. & BERNHARDT, I. 2016. Characterization of Microvesicles Released from Human Red Blood Cells. *Cell Physiol Biochem*, 38, 1085-99.
- OOSTHUYZEN, W., SCULLION, K. M., IVY, J. R., MORRISON, E. E., HUNTER, R. W., STARKEY LEWIS, P. J., O'DUIBHIR, E., STREET, J. M., CAPORALI, A., GREGORY, C. D., FORBES, S. J., WEBB, D. J., BAILEY, M. A. & DEAR, J. W. 2016. Vasopressin Regulates Extracellular Vesicle Uptake by Kidney Collecting Duct Cells. *J Am Soc Nephrol*, 27, 3345-3355.
- OWEN, W. F., JR., LEW, N. L., LIU, Y., LOWRIE, E. G. & LAZARUS, J. M. 1993. The urea reduction ratio and serum albumin concentration as predictors of mortality in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med*, 329, 1001-6.
- OWENS, A. P., 3RD & MACKMAN, N. 2011. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res*, 108, 1284-97.
- PARK, Y., BEST, C. A., AUTH, T., GOV, N. S., SAFRAN, S. A., POPESCU, G., SURESH, S. & FELD, M. S. 2010. Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 1289-94.
- PEREZ-PUJOL, S., MARKER, P. H. & KEY, N. S. 2007. Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: studies using a new digital flow cytometer. *Cytometry A*, 71, 38-45.
- PEUCHANT, E., SALLES, C., VALLOT, C., WONE, C. & JENSEN, R. 1988. Increase of erythrocyte resistance to hemolysis and modification of membrane lipids induced by hemodialysis. *Clin Chim Acta*, 178, 271-82.
- PIZZINO, G., IRRERA, N., CUCINOTTA, M., PALLIO, G., MANNINO, F., ARCORACI, V., SQUADRITO, F., ALTAVILLA, D. & BITTO, A. 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 8416763.
- PRIES, A. R., NEUHAUS, D. & GAEHTGENS, P. 1992. Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit. *Am J Physiol*, 263, H1770-8.
- RAND, M. L., WANG, H., BANG, K. W., PACKHAM, M. A. & FREEDMAN, J. 2006. Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *J Thromb Haemost*, 4, 1621-3.
- RATCLIFFE, P. J. 1993. Molecular biology of erythropoietin. *Kidney International*, 44, 887-904.
- RICHARDS, R. S., WANG, L. & JELINEK, H. 2007. Erythrocyte oxidative damage in chronic fatigue syndrome. *Arch Med Res*, 38, 94-8.
- RIFKIND, J. M. & NAGABABU, E. 2013. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxid Redox Signal*, 18, 2274-83.
- RIOS, D. R., CARVALHO, M., LWALEED, B. A., SIMÕES E SILVA, A. C., BORGES, K. B. & DUSSE, L. M. 2010. Hemostatic changes in patients with end stage renal disease undergoing hemodialysis. *Clin Chim Acta*, 411, 135-9.
- SAKTHIVEL, R., FAROOQ, S. M., KALAISELVI, P. & VARALAKSHMI, P. 2007. Investigation on the early events of apoptosis in senescent erythrocytes with special emphasis on intracellular free calcium and loss of phospholipid asymmetry in chronic renal failure. *Clin Chim Acta*, 382, 1-7.

- SARADHADEVI, V., SAKTHIVEL, R., VEDAMOORTHY, S., SELVAM, R. & PARINANDI, N. 2005. Alterations in band 3 protein and anion exchange in red blood cells of renal failure patients. *Mol Cell Biochem*, 273, 11-24.
- SCHAFER, A. I., LEVINE, S. & HANDIN, R. I. 1980. Regulation of platelet arachidonic acid oxygenation by cyclic AMP. *Blood*, 56, 853-8.
- SCHROIT, A. J. & ZWAAL, R. F. 1991. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1071, 313-29.
- SENS, P. & GOV, N. 2007. Force balance and membrane shedding at the red-blood-cell surface. *Phys Rev Lett*, 98, 018102.
- SHAO, H., IM, H., CASTRO, C. M., BREAKEFIELD, X., WEISSLEDER, R. & LEE, H. 2018. New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem Rev*, 118, 1917-1950.
- SHI, J., SHI, Y., WAEHRENS, L. N., RASMUSSEN, J. T., HEEGAARD, C. W. & GILBERT, G. E. 2006. Lactadherin detects early phosphatidylserine exposure on immortalized leukemia cells undergoing programmed cell death. *Cytometry A*, 69, 1193-201.
- SIMPSON, R. J., LIM, J. W., MORITZ, R. L. & MATHIVANAN, S. 2009. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*, 6, 267-83.
- SIMS, P. J., WIEDMER, T., ESMON, C. T., WEISS, H. J. & SHATTIL, S. J. 1989. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem*, 264, 17049-57.
- SIROLI, V., STRIZZI, L., DI STANTE, S., ROBUFFO, I., PROCOPIO, A. & BONOMINI, M. 2001. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in end-stage renal disease patients on hemodialysis. *Thromb Haemost*, 86, 834-9.
- SLOAND, J. A. & SLOAND, E. M. 1997. Studies on platelet membrane glycoproteins and platelet function during hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*, 8, 799-803.
- SOMAJO, S., KOSHIAR, R. L., NORSTRÖM, E. & DAHLBÄCK, B. 2014. Protein S and factor V in regulation of coagulation on platelet microparticles by activated protein C. *Thromb Res*, 134, 144-52.
- SRIKANTHAN, S., LI, W., SILVERSTEIN, R. L. & MCINTYRE, T. M. 2014. Exosome poly-ubiquitin inhibits platelet activation, downregulates CD36 and inhibits pro-atherothrombotic cellular functions. *J Thromb Haemost*, 12, 1906-17.
- STEPPICH, B., MATTISEK, C., SOBCZYK, D., KASTRATI, A., SCHÖMIG, A. & OTT, I. 2005. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 93, 35-9.
- STINGHEN, A. E., MASSY, Z. A., VLASSARA, H., STRIKER, G. E. & BOULLIER, A. 2016. Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD. *J Am Soc Nephrol*, 27, 354-70.
- SUADES, R., PADRÓ, T., VILAHUR, G. & BADIMON, L. 2012. Circulating and platelet-derived microparticles in human blood enhance thrombosis on atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost*, 108, 1208-19.
- TANS, G., ROSING, J., THOMASSEN, M. C., HEEB, M. J., ZWAAL, R. F. & GRIFFIN, J. H. 1991. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. *Blood*, 77, 2641-8.
- TAYLOR, R. C., CULLEN, S. P. & MARTIN, S. J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 231-41.
- TEKCE, H., KIN TEKCE, B., AKTAS, G., TANRISEV, M. & SIT, M. 2014. The evaluation of red cell distribution width in chronic hemodialysis patients. *Int J Nephrol*, 2014, 754370.
- THANGARAJU, K., NEERUKONDA, S. N., KATNENI, U. & BUEHLER, P. W. 2020. Extracellular Vesicles from Red Blood Cells and Their Evolving Roles in Health, Coagulopathy and Therapy. *Int J Mol Sci*, 22.
- TRAN, P. L., PIETROPAOLO, M. G., VALERIO, L., BRENGLE, W., WONG, R. K., KAZUI, T., KHALPEY, Z. I., REDAELLI, A., SHERIFF, J., BLUESTEIN, D. & SLEPIAN, M. J. 2016. Hemolysate-

- mediated platelet aggregation: an additional risk mechanism contributing to thrombosis of continuous flow ventricular assist devices. *Perfusion*, 31, 401-8.
- TRAPPENBURG, M. C., VAN SCHILFGAARDE, M., FRERICHS, F. C., SPRONK, H. M., TEN CATE, H., DE FIJTER, C. W., TERPSTRA, W. E. & LEYTE, A. 2012. Chronic renal failure is accompanied by endothelial activation and a large increase in microparticle numbers with reduced procoagulant capacity. *Nephrol Dial Transplant*, 27, 1446-53.
- TRICARICO, C., CLANCY, J. & D'SOUZA-SCHOREY, C. 2017. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*, 8, 220-232.
- TURITTO, V. T. & WEISS, H. J. 1980. Red blood cells: their dual role in thrombus formation. *Science*, 207, 541-3.
- VALADI, H., EKSTRÖM, K., BOSSIOS, A., SJÖSTRAND, M., LEE, J. J. & LÖTVALL, J. O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, 654-9.
- VANHOLDER, R. C. & RINGOIR, S. M. 1992. Adequacy of dialysis: a critical analysis. *Kidney Int*, 42, 540-58.
- VIDAL, M., SAINTE-MARIE, J., PHILIPPOT, J. R. & BIENVENUE, A. 1989. Asymmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during in vitro maturation of guinea pig reticulocytes: evidence precluding a role for "aminophospholipid translocase". *J Cell Physiol*, 140, 455-62.
- VOS, F. E., SCHOLLUM, J. B., COULTER, C. V., DOYLE, T. C., DUFFULL, S. B. & WALKER, R. J. 2011. Red blood cell survival in long-term dialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 58, 591-8.
- WANG, J., VAN BENTUM, K., SESTER, U. & KAESTNER, L. 2014. Calcium homeostasis in red blood cells of dialysis patients in dependence of erythropoietin treatment. *Front Physiol*, 5, 16.
- WANG, X., WU, Z., SONG, G., WANG, H., LONG, M. & CAI, S. 1999. Effects of oxidative damage of membrane protein thiol groups on erythrocyte membrane viscoelasticities. *Clin Hemorheol Microcirc*, 21, 137-46.
- WHELIHAN, M. F., ZACHARY, V., ORFEO, T. & MANN, K. G. 2012. Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation. *Blood*, 120, 3837-45.
- WILEY, J. S., MCCULLOCH, K. E. & BOWDEN, D. S. 1982. Increased calcium permeability of cold-stored erythrocytes. *Blood*, 60, 92-8.
- WILLMS, E., JOHANSSON, H. J., MÄGER, I., LEE, Y., BLOMBERG, K. E., SADIK, M., ALAARG, A., SMITH, C. I., LEHTIÖ, J., EL ANDALOUSSI, S., WOOD, M. J. & VADER, P. 2016. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep*, 6, 22519.
- WOLF, P. 1967. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*, 13, 269-88.
- WOLFE, L. C., BYRNE, A. M. & LUX, S. E. 1986. Molecular defect in the membrane skeleton of blood bank-stored red cells. Abnormal spectrin-protein 4.1-actin complex formation. *J Clin Invest*, 78, 1681-6.
- WU, S. G., JENG, F. R., WEI, S. Y., SU, C. Z., CHUNG, T. C., CHANG, W. J. & CHANG, H. W. 1998. Red blood cell osmotic fragility in chronically hemodialyzed patients. *Nephron*, 78, 28-32.
- YÁÑEZ-MÓ, M., SILJANDER, P. R., ANDREU, Z., ZAVEC, A. B., BORRÀS, F. E., BUZAS, E. I., BUZAS, K., CASAL, E., CAPPELLO, F., CARVALHO, J., COLÁS, E., CORDEIRO-DA SILVA, A., FAIS, S., FALCON-PEREZ, J. M., GHOBRIAL, I. M., GIEBEL, B., GIMONA, M., GRANER, M., GURSEL, I., GURSEL, M., HEEGAARD, N. H., HENDRIX, A., KIERULF, P., KOKUBUN, K., KOSANOVIC, M., KRALJ-IGLIC, V., KRÄMER-ALBERS, E. M., LAITINEN, S., LÄSSER, C., LENER, T., LIGETI, E., LINĚ, A., LIPPS, G., LLORENTE, A., LÖTVALL, J., MANČEK-KEBER, M., MARCILLA, A., MITTELBRUNN, M., NAZARENKO, I., NOLTE-'T HOEN, E. N., NYMAN, T. A., O'DRISCOLL,

- L., OLIVAN, M., OLIVEIRA, C., PÁLLINGER, É., DEL PORTILLO, H. A., REVENTÓS, J., RIGAU, M., ROHDE, E., SAMMAR, M., SÁNCHEZ-MADRID, F., SANTARÉM, N., SCHALLMOSER, K., OSTENFELD, M. S., STOORVOGEL, W., STUKELJ, R., VAN DER GREIN, S. G., VASCONCELOS, M. H., WAUBEN, M. H. & DE WEVER, O. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*, 4, 27066.
- YOSHIDA, K., YONEDA, T., KIMURA, S., FUJIMOTO, K., OKAJIMA, E. & HIRAO, Y. 2006. Polyamines as an inhibitor on erythropoiesis of hemodialysis patients by in vitro bioassay using the fetal mouse liver assay. *Ther Apher Dial*, 10, 267-72.
- YU, M., XIE, R., ZHANG, Y., LIANG, H., HOU, L., YU, C., ZHANG, J., DONG, Z., TIAN, Y., BI, Y., KOU, J., NOVAKOVIC, V. A. & SHI, J. 2018. Phosphatidylserine on microparticles and associated cells contributes to the hypercoagulable state in diabetic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 33, 2115-2127.
- ZHAO, Y. Y. 2013. Metabolomics in chronic kidney disease. *Clin Chim Acta*, 422, 59-69.
- ZIMRIN, A. B. & HESS, J. R. 2009. Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells. *Vox Sang*, 96, 93-103.
- ZIMRING, J. C. 2015. Established and theoretical factors to consider in assessing the red cell storage lesion. *Blood*, 125, 2185-90.
- ŽMIGRODZKA, M., GUZERA, M., MIŚKIEWICZ, A., JAGIELSKI, D. & WINNICKA, A. 2016. The biology of extracellular vesicles with focus on platelet microparticles and their role in cancer development and progression. *Tumour Biol*, 37, 14391-14401.
- ZWAAL, R. F., COMFURIUS, P. & BEVERS, E. M. 1992. Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta*, 1180, 1-8.
- ZWAGINGA, J. J., MJ, I. J., DE GROOT, P. G., VOS, J., DE BOS KUIL, R. L. & SIXMA, J. J. 1991. Defects in platelet adhesion and aggregate formation in uremic bleeding disorder can be attributed to factors in plasma. *Arterioscler Thromb*, 11, 733-44.

