

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

"Στρεσογόνες επιδράσεις της νεφρικής ανεπάρκειας στα ώριμα ερυθροκύτταρα"

ΓΕΩΡΓΑΤΖΑΚΟΥ ΧΑΡΑ Βιολόγος



AOHNA 2017

AOHNA 2017



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Στρεσογόνες επιδράσεις της νεφρικής ανεπάρκειας στα ώριμα ερυθροκύτταρα

ΓΕΩΡΓΑΤΖΑΚΟΥ ΧΑΡΑ Βιολόγος, BSc, MSc

AOHNA 2017



NATIONAL & KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS SCHOOL OF SCIENCE FACULTY OF BIOLOGY DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY AND BIOPHYSICS

DOCTORAL (PhD) THESIS

Stressful effects of chronic kidney disease in mature erythrocytes

GEORGATZAKOU HARA Biologist, BSc, MSc

AOHNA 2017

<u>Επιβλέπουσα Καθηγήτρια</u>

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη, Καθηγήτρια Κυτταρικής & Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη, Καθηγήτρια Κυτταρικής & Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

Παναγούλα Κόλλια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας

Διαμάντης Σίδερης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Ευκαρυωτικών Οργανισμών, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη, Καθηγήτρια Κυτταρικής & Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

Διαμάντης Σίδερης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Ευκαρυωτικών Οργανισμών, Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας

Παναγούλα Κόλλια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας

Βασιλική Αλεπόρου-Μαρίνου, Καθηγήτρια Γενετικής, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας

Ιωάννης Π. Τρουγκάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας Ζωικού Κυττάρου & Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

Μαριάννα Χ. Αντωνέλου, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας Ζωικού Κυττάρου, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

«Η έγκριση της παρούσης Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέως» (Ν. 5343/1932, άρθρο 202, παρ.

Αφιερωμένο

στον Κωνσταντίνο μου

και στη νέα μας ζωή...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	
Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1 AIMA	12
2. Ερυφροκύτταρική μεμβρανή	13
2.1 Μεμβοανικά λιπίδια	
	15
2.2.1 Διαμεμβρανικές	
2.2.2 Μεμβρανοσυνδεόμενες	
2.2.3 Σκελετικές	23
2.2.4 Κυτοσολικές	26
2.3 Σύμπλοκα ερυθροκυτταρικής μεμβράνης	
2.4 Εξαγωνικό δίκτυο ερυθροκυτταρικού σκελετού	
3. Μεταβολισμός ερυθροκυτταρών	
4. Γηρανση	
4.1 Κυστιδιοποίηση	
4.1.1 Κλαστερίνη (sCLU, secretory clusterin)	
4.1.2 Κυστιδιοποίηση και παθολογικές καταστάσεις	37
4.2 Μονοπάτι γήρανσης λόγω μετατροπών της ζώνης-3	
4.3 Ομοιόσταση ενδοκυττάριων ιόντων Ca ²⁺	
4.4 Οξειδωτικό στρες κατά τη γήρανση	
4.5 Ενεργοποίηση κασπασών	41
4.6 Γήρανση και CD47	41
4.7 Γήρανση και ουμπικουιτίνωση	
5. Ερυθροπτώση	
6. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	
6.1 Δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species)	
6.2 Υπεροξείδωση λιπιδίων	45
6.3 Οξείδωση πρωτεϊνών	45
7. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ	
7.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστατικά (ερυθροκύτταρα και πλάσμα)	46
7.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστατικά (ερυθροκύτταρα & πλάσμα)	47
8. Νεφροι: Ανατομία και Λειτουργια	
9. Хроніа	
9.1 Γενικά: Ορισμός-Αίτια-Συπτώματα	50
9.2 Ουραιμικές τοξίνες	51
10. Θ EPANEIES NE ϕ PIKHS YNOKATASTASHS (RENAL REPLACEMENT THERAPIES, F	RT) 52
11. Μεταβόλες στα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα ασθένων με Χ	NA noy
ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΙ ΣΕ AIK - ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ AIK	
11.1 Χαρακτηριστικά του ουραιμικού πλάσματος και επίδραση της ΑΙΚ	54
11.1.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα και δείκτες οξειδωτικού στρες	
11.1.1 Μη ενζυμικά συστατικά - Βιταμίνες 11.1.1.2 Ενζυμικά συστατικά και μονοστοινεία	54 55
11.1.1.2 Δείκτες οζειδωτικού στρες	

11.1.2 Δείκτες φλεγμονής	
11.1.3 Εξωκυτταρικά κυστίδια	58
11.2 Μεταβολές των ερυθροκυττάρων στη ΧΝΑ και επίδραση της ΑΙΚ	.59
11.2.1 Χαρακτηριστικά της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων	59
11.2.2 Οξειδοαναγωγικό δυναμικό των ερυθροκυττάρων	60
11.2.3 Πρωτεϊνική σύσταση και ιδιότητες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης	62
11.2.4 Σήματοδότηση απομάκρυνσης των κυττάρων από την κυκλοφορία	63
12. Επιδράση της αιμοδιαδιήθησης (ΑΔΔ) στο αίμα ασθενών με XNA	.64
13. ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΝΟΣΟΥ ΚΑΙ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗ ΧΝΑ	.64
14. Θεραπεία αναιμίας στη ΧΝΑ	.65
14.1 Παράγοντες διέγερσης της ερυθροποίησης (ESAs) & Ερυθροποιητίνη	.65
14.1.1 Αντίσταση στη θεραπεία με rhEpO - Ορισμός	67
14.1.2 Αίτια αντίστασης στη θεραπεία με rhEpO	67
14.1.2.1 Χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος κατά την εμφάν "ανθεκτικότητας στη θεραπεία με rhEpO"	νιση 68
Β. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	. 70
Γ ΥΛΙΖΑ ΜΕΘΟΛΟΙ	70
	. 14
1. Αδθενείς	.72
2. Меюодоі	.73
2.1. Αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος	.73
2.2. Απομόνωση και επεξεργασία ερυθροκυτταρικών μεμβρανών	.73
2.2.1. Λευκαφαίρεση και αιμοπεταλιαφαίρεση σε κολώνες κυτταρίνης	73
2.2.2 Απομόνωση ερυθροκυτταρικών μεμβρανών	73
2.2.3 Υπολογισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δείγματος	74
2.2.4 Προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος για ηλεκτροφόρηση	75
2.2.5 Αποδιατακτική ηλεκτροφορήση πρωτεινών κατα Laemmli	/6
2.2.6 Γεχνική ανοσοαποτυπωματός κατά western	//
2.2.7 Hosotiki ektimion two npwterow two inference with two grap.	19 166
2.5. Method two entrees kappovorisons two newters of the proportition u_{0}	
	.80
2.4. Προετοιμασία για παρατηρηση της μορφολογίας ερυθροκυτταρών	με
Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σαρώσης - ΗΜΣ (Scanning Electron Microscope - SEN	1)80
2.5. Μέτρηση της οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων	.82
2.6. Μέτρηση της μηχανικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων	.82
2.7. Μέτρηση ενδοκυττάριων επιπέδων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS)	.83
2.8. Μέτρηση ενδοκυττάριων επιπέδων ιόντων Ca ²⁺	.84
2.9. Μέτρηση της εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης (PS) με κυτταρομετρία ροή	ς85
2.10. Μέτρηση επιπέδων αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος - FRAP (Fe	rric
Reducing Ability of Plasma)	.85
2.11. Μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος	.86
2.12. Μέτοηση των επιπέδων κυστιδιοποίησης με κυτταρομετοία ροής	.86
2.13. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων και ανάλυση δικτύων	.87
Δ . ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	. 90
Δ1 Μελετή τον επιαράσεον τον υψυλού λοσεόν ερυωρομοτιστικό γ	- 5Т Л
ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ΑΣΘΕΝΟΝ ΜΕ ΧΝΑ ΤΕΛΙΚΟΥ ΣΤΑΛΙΟΥ	.90

 Αιματολογικό πρότυπο και χαρακτηριστικά του πλάσματος
2. Φυσιολογία, μορφολογία και πρωτεϊνική σύσταση των ερυθροκυττάρων
3. Συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων και απεικόνιση σε δίκτυα
Δ2. Μελετή των επιδράσεων δύο διαφορετικών μεθοδών καθάρσης στα
ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΝΑ ΤΕΛΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ103
Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ
ΜΕΡΟΣ Α': Μεταβόλες στα ερυφροκύτταρα και το πλάσμα των άσθενων με
Χρονία Νεφρική Ανεπαρκεία που ανταποκρινονται η όχι στη Θεραπεία
ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΛΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΑΙΜΟΚΑΘΑΡΣΗΣ110
A1. Μεταβολές στα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα ασθενών με XNA
Α2. Η μειωμένη ανταπόκριση στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη σχετίζεται με ένα
τροποποιημένο πλαίσιο ομοιόστασης των ερυθροκυττάρων στους ασθενείς με ΧΝΑ112
Α3. Ενδείξεις για διαφορετική επίδραση της αιμοκάθαρσης καθώς και για την ύπαρξη
διαφορετικού μηχανισμού κυστιδιοποίησης, ανάμεσα στα ερυθροκύτταρα των
ανταποκρινόμενων και μη ανταποκρινόμενων ασθενών
Α4. Το διαφορετικό ομοιοστατικό πλαίσιο των ερυθροκυττάρων μεταξύ των
ανταποκρινόμενων και μη ανταποκρινόμενων ασθενών μπορεί να απεικονιστεί σε
βιολογικά δίκτυα115
Α5. Συμπεράσματα
ΜΕΡΟΣ Β': ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΙΜΟΔΙΑΔΙΗΘΗΣΗΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΣΥΜΒΑΤΙΚΗΣ ΑΙΜΟΚΑΘΑΡΣΗΣ
ΣΤΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ 118
ΒΙ. Η χρονια επιοραση της αιμοδιαδιηθησης στο αιματολογικό προτυπό και σε
παραμετρούς της φυσιολογίας των ερυθροκυτταρών
B_2 . Αμεσες και παροσικές επιπτωσεις της θεραπείας με αιμοσιαστηθηση στο
B_{2} Suppose for the set of the superior of the postonovial two spooporting we can be a superior B_{2} . Suppose for the set of the superior B_{2} .
ΣΤ. ΣΥΝΟΙΙΤΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ
Ζ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ124
ПЕРІАНΨН136
ABSTRACT138
ПАРАРТНМА
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ
ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ
ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του τμήματος Βιολογία του Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κας. Ισιδώρας Παπασιδέρη και ήταν ένα πολύ όμορφο ταξίδι στον κόσμο της έρευνας, το οποίο με δίδαξε πολλά πράγματα και μου δημιούργησε υπέροχα συναισθήματα τα οποία θα με συντροφεύουν όποιον δρόμο κι αν ακολουθήσω στην πορεία της ζωής μου. Στην ολοκλήρωση όμως αυτής της εργασίας, συνέβαλλαν πολλοί άνθρωποι τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα. Ισιδώρα Παπασιδέρη γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να αποτελέσω κι εγώ μέλος της ερευνητικής της ομάδας, να μπω στους εργαστηριακούς χώρους και να ασχοληθώ με ένα θέμα που με ενδιέφερε ιδιαίτερα. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω για τη γενικότερη επιστημονική συμβολή της στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας αλλά και γιατί οποιαδήποτε στιγμή χρειάστηκα τη βοήθεια και τις συμβουλές της ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει και να με στηρίξει τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Είναι πολύ σημαντικό να αισθάνεσαι πως οι άνθρωποι που συνεργάζεσαι είναι άνθρωποι που νοιάζονται και ενδιαφέρονται για εσένα πραγματικά.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Μαριάννα Αντωνέλου για τις γνώσεις που μου έχει προσφέρει απλόχερα, για την υπομονή της να με διδάξει όχι μόνο στο πρακτικό κομμάτι της εργασίας αλλά και να με μυήσει στον επιστημονικό τρόπο σκέψης, για την εμπιστοσύνη της και γενικότερα για όλες τις όμορφες αναμνήσεις που μου έχει χαρίσει όλα αυτά τα χρόνια που συνεργαστήκαμε. Είναι ένας άνθρωπος που προσφέρει πάντα ανιδιοτελώς βοήθεια όποτε του ζητηθεί χωρίς δεύτερη σκέψη και με χαροποιεί και με τιμά ιδιαίτερα το γεγονός ότι υπήρξα συνεργάτης της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Παναγούλα Κόλλια και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Διαμάντη Σίδερη για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή καθώς και για τις αξιόλογες παρατηρήσεις και επισημάνσεις τους. Αντίστοιχα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα. Βασιλική Αλεπόρου-Μαρίνου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκο, τον Επίκουρο καθηγητή κ. Δημήτριο Στραβοπόδη και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Αντωνέλου Μαριάννα για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην

Ευχαριστώ πολύ τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων του ΤΕΙ Αθηνών κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη για τη φιλοξενία στον εργαστηριακό του χώρο και την άψογη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στο Ερευνητικό Πρόγραμμα «ΑΡΧΙΜΗΔΗΣ ΙΙΙ: ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΣΤΑ ΤΕΙ» στο οποίο επιτέλεσε επιστημονικός υπεύθυνος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Βασίλειο Τζούνακα για την άψογη συνεργασία που είχαμε. Νομίζω πως καταφέραμε πολύ καλά να αλληλοσυμπληρωνόμαστε και παρά τις δυσκολίες που προκύπτουν, όταν υπάρχει πίεση χρόνου και άγχος, μπορέσαμε να δημιουργήσουμε μια πολύ όμορφη ομάδα.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον Ιατρό Νεφρολόγο και Διευθυντή της Μονάδας Χρόνιας Αιμοκάθαρσης «Ιώνιο Θεραπευτήριο», τον κ. Απόστολο Κόκκαλη για την άριστη συνεργασία μας και τις επιστημονικές συμβουλές του καθώς και την προϊσταμένη του τμήματος κα. Βασιλεία Στούπα και την πολύτιμη συμβολή της στην παροχή των βιολογικών δειγμάτων. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Δρ. Αθανάσιο Βελέντζα τόσο για τη συμβολή του στα πειράματα της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης, αλλά κυρίως για την παρουσία του στον Τομέα. Είναι ένας άνθρωπος που υπήρξε δίπλα μου οποιαδήποτε στιγμή, η πόρτα του γραφείου του ήταν πάντα ανοιχτή για εμένα και είναι ιδιαίτερη χαρά μου και κυρίως τιμή μου που τον έχω γνωρίσει και υπάρχει στη ζωή μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Ευσταθία Παπαγεωργίου, του Γενικού Τμήματος Μαθηματικών του ΤΕΙ Αθήνας, για τη συμβολή της στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων καθώς και για τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετέχω στο ερευνητικό πρόγραμμα «Εσωτερικό Πρόγραμμα Ενίσχυσης Ερευνητών του ΤΕΙ Αθήνας για το έτος 2015» στο οποίο υπήρξε επιστημονική υπεύθυνη.

Οφείλω, επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα. Άρτεμη Βουλγαρίδου για την πολύτιμη βοήθειά της στην κατασκευή των βιολογικών δικτύων.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην οικονομική υποστήριξη της διατριβής μου και συγκεκριμένα το Ίδρυμα Α.Γ. Λεβέντης (A.G. Leventis Foundation) για την οικονομική ενίσχυση που μου παρείχε το διάστημα 2014-2016, το πρόγραμμα Αρχιμήδης ΙΙΙ-2012, το «Εσωτερικό πρόγραμμα ενίσχυσης ερευνητών του ΤΕΙ Αθήνας για το έτος 2015» και την Ελληνική Εταιρεία Μεταγγισιοθεραπείας για την υποτροφία που μου έδωσε το ακαδ.έτος 2016-2017 υπό την προεδρεία του Δρ. Κωνσταντίνου Σταμούλη, Διευθυντή του Εθνικού Κέντρου Αιμοδοσίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη ΔΕΠ και τα υπόλοιπα μέλη του τομέα για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλους τους εθελοντές δότες και ιδιαίτερα τους ασθενείς δότες οι οποίοι δέχτηκαν συμμετέχουν στη συγκεκριμένη εργασία.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου, στη μητέρα μου Στέλλα και την αδερφή μου Ευφροσύνη, για τη στήριξη και την εμπιστούνη που μου δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια, στον πατέρα μου Θεόδωρο τον οποίο ελπίζω ότι έχω κάνει υπερήφανο κι ας μην είναι πλέον κοντά μου να μου το δείξει, αλλά κυρίως τον άνθρωπο της ζωής μου, τον Κωνσταντίνο μου, ο οποίος μου δίνει δύναμη, ελπίδα, χαρά, χαμόγελα, είναι ο άνθρωπος που με καταλαβαίνει, με δικαιολογεί και με στηρίζει πάντα με κατανόηση και υπομονή όλα αυτά τα χρόνια που βρίσκεται δίπλα μου.

> Χαρά Θ. Γεωργατζάκου Μάιος 2017

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AC(-UA): αντιοξειδωτική ικανότητα οφειλόμενη σε αντιοξειδωτικά συστατικά του πλάσματος εκτός του ουρικού οξέος (uric acid-independent antioxidant capacity) Add: αδουσίνη (adducin) **Alb**: αλβουμίνη (albumin) ALP: αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase) Aqp-1: υδατοπορίνη-1 (aquaporin-1) **B3**: ζώνη-3 (band-3) γ **GT**: γ-γλουταμυλ τρανσφεράση (γ-glutamyl transferase) **Ca**: ασβέστιο ορού (serum calcium) **Calp**: καλπαΐνη-1 (calpain-1) cHD: συμβατική αιμοκάθαρση (conventional hemodialysis) **Creat**: κρεατινίνη (creatinine) CRP: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein) Disco: δισκοκύτταρα (discocytes) dHD: διάρκεια σε θεραπεία αιμοκάθαρσης (duration of hemodialysis) dROS: ενδοκυττάρια επίπεδα ROS εξωγενώς επαγόμενα από diamide (diamide-induced reactive oxygen species) ESRD: νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (end stage renal disease) Fe: σίδηρος (ferrrum) **Fer**: φερριτίνη (ferritin) fHb: ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος (free hemoglobin) **Flot-2**: φλοτιλλίνη-2 (flotillin-2) GAPDH: αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης (Glyceraldehyde 3phosphate dehydrogenase) Glut-1: μεταφορέας γλυκόζης-1 (glucose transporter-1) Hb: αιμοσφαιρίνη (hemoglobin) Hct: αιματοκρίτης (hematocrit) **HDF**: αιμοδιαδιήθηση (hemodiafiltration) HDL: $\psi \eta \lambda \eta \zeta \pi \psi \kappa \psi \delta \tau \eta \tau \alpha \zeta \lambda i \pi \delta \pi \delta \psi \kappa \zeta$ (high density lipoproteins) **Hsp70**: πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70 (heat shock protein 70) iCa: ενδοκυττάρια ιόντα ασβεστίου (intracellular calcium) iROS: ενδοκυττάρια επίπεδα δραστικών ριζών οξυγόνου (intracellular reactive oxygen species) **IRR**: ερυθροκύτταρα μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης (irreversible deformation erythrocytes) **K**: κάλιο ορού (serum potassium) LDL: χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (low density lipoproteins) MCF: μέση οσμωτική ευθραυστότητα κυττάρων (mean corpuscular fragility) MCF': μέση οσμωτική ευθραυστότητα κυττάρων μετά από επώαση στους 37°C MCH: μέση ενδοκυττάρια ποσότητα αιμοσφαιρίνης (mean corspuscular hemoglobin)

MCHC: μέση ενδοκυττάρια συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (mean corspuscular hemoglobin concentration)

MCV: μέσος όγκος ερυθροκυττάρου (mean cell volume)

MDA: μαλονδυαλδεΰδη

MFI: δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας (mechanical fragility index)

Mono: μονοκύτταρα (monocytes) Neu: ουδετρεόφιλα (neutrophils) NO: μονοξείδιο του αζώτου (nitric oxide) oxHb: οξειδωμένη/αποδιαταγμένη αιμοσφαιρίνη (oxidized hemoglobin) **P**: φώσφορος ορού (serum phosphate) PCI: δείκτης πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης (protein carbonylation index) **Prot**: πρωτεΐνες ορού (total serum proteins) **Prx-2**: υπεροξειρεδοξίνη-2 (peroxiredoxin-2) PS: φωσφατιδυλοσερίνη (phosphatidylserine) **PTH**: παραθορμόνη (parathormone) **RBCs**: ερυθροκύτταρα (red blood cells) RDW: εύρος μεγέθους ερυθροκυττάρων (red blood cell distribution width) **RET**: δικτυοερυθροκύτταρα (reticulocytes) **REV**: ερυθροκύτταρα αναστρέψιμης παραμόρφωσης (reversible deformation erythrocytes) rhEPO: ανθρώπινη ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη (recombinant human erythropoietin) RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units) ROS: δραστικές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species) R-MVs: ερυθροκυτταρικά κυστίδια (red blood cell-derived microvesicles) sCLU: κλαστερίνη (soluble clusterin) Sp: σπεκτρίνη (spectrin) **Sp-Pr**: θραύσματα σπεκτρίνης (spectrin proteolysis) ST: στοματοκύτταρα (stomatocytes) **Stom**: στοματίνη (stomatin) Syn: συνεξίνη (synexin)

TAC: ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (total antioxidant capacity of plasma) **TIRC**: ολική σύντος δοσματοχική μετράστος (total iron hinding conscitut)

TIBC: ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα (total iron binding capacity)

tROS: επίπεδα ROS εξωγενώς επαγόμενα από tBHP (tBHP-induced reactive oxygen species)

UA: ουρικό οξύ (uric acid)

UA/AC: αντιοξειδωτική ικανότητα οφειλόμενη στο ουρικό οξύ (uric acid-dependent antioxidant capacity)

Ub: ουμπικουιτινωμένες πρωτεΐνες (ubiquitinylated proteins)

URR: δείκτης απομάκρυνσης ουρίας (urea reduction ratio)

WBC: λευκά αιμοσφαίρια (white blood cells)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Αίμα

Το αίμα είναι ένα εξειδικευμένο υγρό του σώματος το οποίο αποτελείται από έμμορφα και άμορφα συστατικά. Ο όγκος του στον άνθρωπο είναι περίπου 5 λίτρα, αποτελεί το 8% του συνολικού βάρους και χαρακτηρίζεται από ελαφρά αλκαλικό pH με τιμές οι οποίες κυμαίνονται στο 7.35-7.45. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια (ερυθροκύτταρα), τα λευκά αιμοσφαίρια (λευκοκύτταρα) και τα αιμοπετάλια αποτελούν τα έμμορφα συστατικά ενώ το άμορφο στοιχείο του αίματος είναι το πλάσμα. Οι λειτουργίες που έχει το αίμα στον οργανισμό είναι πολλές και περιλαμβάνουν τη μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στους πνεύμονες και στους ιστούς, τη δημιουργία θρόμβων για την αποφυγή απώλειας μεγάλων ποσοτήτων αίματος σε περίπτωση τραυματισμού, τη μεταφορά κυττάρων και αντισωμάτων για την αντιμετώπιση λοιμώξεων, τη μεταφορά των άχρηστων παραπροϊόντων στους νεφρούς και το ήπαρ, όπου φιλτράρεται και καθαρίζεται το αίμα, τη ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος κ.α.

<u>Πλάσμα</u>

Το υγρό συστατικό του αίματος καλείται πλάσμα και είναι ένα μείγμα από νερό, σάκχαρα, λίπη, πρωτεΐνες και ιόντα. Αποτελεί περίπου το 55% του όγκου του αίματος και η κύρια λειτουργία του είναι η μεταφορά κυττάρων και θρεπτικών συστατικών, παραπροϊόντων του μεταβολισμού, αντισωμάτων, παραγόντων πήξης, χημικών μεσολαβητών (π.χ. ορμόνες) και πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες είναι τα συστατικά που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στο πλάσμα και έχουν σημαντική συμβολή στην πήξη του αίματος, στη μεταφορά ουσιών και στην άμυνα του οργανισμού έναντι ουσιών που εισβάλλουν στο αίμα. Πιο συγκεκριμένα:

- Έχουν σημαντικό ρόλο στην παροχή αμινοξέων. Διάφορα κύτταρα όπως τα μακροφάγα διασπούν πρωτεΐνες του πλάσματος σε αμινοξέα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή νέων πρωτεϊνών.
- Αποτελούν μεταφορείς άλλων μορίων. Πολλά μικρά μόρια προσδένονται σε πρωτεΐνες του πλάσματος και μεταφέρονται από τα όργανα που τις απορροφούν σε άλλους ιστούς για περαιτέρω χρήση.
- Βοηθούν στη διατήρηση ελαφρώς βασικού pH στο αίμα, καθώς προσδένουν τη περίσσεια ιόντων H⁺.
- Συμμετέχουν στη δημιουργία θρόμβων.
- Ρυθμίζουν την κατανομή του νερού στον οργανισμό μεταξύ του αίματος και ιστών (κολλοειδής οσμωτική πίεση).

Η αλβουμίνη είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη καθώς αποτελεί περίπου το 55% του συνόλου των πρωτεϊνών στο πλάσμα. Άλλα συστατικά του πλάσματος αποτελούν οι σφαιρίνες, το ινωδογόνο, τα αμινοξέα, τα αέρια, οι ηλεκτρολύτες κ.α.

Λευκά αιμοσφαίρια (λευκοκύτταρα)

Ο κύριος ρόλος των λευκών αιμοσφαιρίων είναι να προστατεύουν το σώμα από λοιμώξεις επάγοντας ανοσολογική απάντηση. Είναι πολύ λιγότερα σε αριθμό από τα ερυθροκύτταρα, αποτελώντας περίπου το 1% του όγκου του αίματος ενώ τα κύτταρα που αποτελούν το σύνολο των λευκοκυττάρων είναι τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα) και τα κύτταρα «φυσικοί φονείς»

(NK, natural killer). Το μέγεθός τους ποικίλλει από 8 μέχρι 18μm, με τα ουδετερόφιλα και τα λεμφοκύτταρα να αποτελούν τις πολυπληθέστερες ομάδες λευκών αιμοσφαιρίων.

<u>Αιμοπετάλια (θρομβοκύτταρα)</u>

Τα αιμοπετάλια αποτελούν θραύσματα κυττάρων 2-3μm, προερχόμενα από τα μεγακαρυοκύτταρα. Συμμετέχουν στη διαδικασία πήξης του αίματος μέσω της συγκέντρωσής τους στην περιοχή της βλάβης και της συμβολής τους στη δημιουργία του θρόμβου ινικής. Με αυτόν τον τρόπο, εμποδίζεται η είσοδος παθογόνων μικροοργανισμών και η απώλεια του αίματος.

Ερυθροκύτταρα (ερυθρά αιμοσφαίρια)

Τα ώριμα ερυθροκύτταρα αποτελούν το 40-50% του όγκου του αίματος, έχουν δισκοειδές σχήμα, διάμετρο περίπου 8μm, πάχος 2μm, όγκο 90fL, επιφάνεια 140μm² και μέση διάρκεια ζωής 120±20 ημέρες [1]. Τα κύτταρα αυτά έχουν μεγάλη ικανότητα παραμόρφωσης και μπορούν εύκολα να συμπιέζονται μέσα στα τριχοειδή, τα οποία έχουν πολύ μικρότερη διάμετρο από τη δική τους, και να επανέρχονται ταχέως στο φυσιολογικό τους σχήμα. Εξαιτίας της έλλειψης ενδοκυττάριων οργανιδίων, ιδιαίτερα πυρήνα και μιτοχονδρίων, δεν έχουν ικανότητα σύνθεσης αμινοξέων και λιπαρών οξέων με αποτέλεσμα να έχουν μειωμένη μεταβολική ικανότητα η οποία επαρκεί μόνο για την επιβίωσή τους κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Καθότι στερούνται ενδοκυττάριων οργανιδίων, αποτελούνται αποκλειστικά από τη μεμβράνη και το κυτοσόλιο. Παρότι έχουν πολλές λειτουργίες στον οργανισμό όπως η ρύθμιση της αγγειοδιαστολής, η αλληλεπίδραση με κύτταρα του ανοσολογικού κα., ο κύριος ρόλος τους είναι η μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς και η απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς στους πνεύμονες, με την κυτοσολική αιμοσφαιρίνη να αποτελεί την υπεύθυνη πρωτεΐνη για τη διεκπεραίωση αυτής της διαδικασίας [2]. Τα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται συνεχώς από την κυκλοφορία στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα, αλλά ο αριθμός τους παραμένει σε σταθερά επίπεδα μέσω της δημιουργίας νέων, από το μυελό των οστών [3].

2. Ερυθροκυτταρική μεμβράνη

Η δομική οργάνωση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης της δίνει τη δυνατότητα να υφίσταται μεγάλες αναστρέψιμες παραμορφώσεις, διατηρώντας τη δομική της ακεραιότητα κατά τη διάρκεια της παραμονής του ερυθροκυττάρου στην κυκλοφορία. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το ερυθροκύτταρο μπορεί να παραμορφώνεται σε γραμμική έκταση πάνω από 250%, αλλά μια αύξηση 3-4% στην επιφάνειά του επιφέρει τη λύση του. Οι μοναδικές ιδιότητες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης είναι αποτέλεσμα της δομής της, καθώς αυτή αγκυροβολεί στο δυσδιάστατο, ελαστικό, υπομεμβρανικό δίκτυο σκελετικών πρωτεϊνών μέσω των κυτταροπλασματικών περιοχών των διαμεμβρανικά φωσφολιπίδια συντελεί περαιτέρω στην σύνδεση του σκελετικού δικτύου με τη λιπιδική στιβάδα [1].

2.1 Μεμβρανικά λιπίδια

Η λιπιδική διπλοστιβάδα αποτελείται από ίσες αναλογίες βάρους χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων. Η χοληστερόλη είναι ισομερώς κατανεμημένη ανάμεσα στα δύο φύλλα

της διπλοστιβάδας, ενώ τα τέσσερα κύρια είδη φωσφολιπιδίων είναι ασύμμετρα κατανεμημένα. Έτσι, η φωσφατιδυλοχολίνη και η σφιγγομυελίνη βρίσκονται κυρίως στην εξωτερική μονοστιβάδα, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης και όλη η φωσφατιδυλοσερίνη, μαζί με μικρά ποσοστά φωσφοϊνοσιτίδιων, βρίσκονται στην εσωτερική μονοστιβάδα. Αυτή η ασυμμετρία διατηρείται με τη συμβολή πολλών διαφορετικών ειδών πρωτεϊνών μεταφοράς φωσφολιπιδίων, είτε με κατανάλωση ενέργειας, είτε χωρίς. Πιο συγκεκριμένα, οι "φλιππάσες" μεταφέρουν φωσφολιπίδια από την εξωτερική μονοστιβάδα στην εσωτερική, οι "φλοππάσες" μεταφέρουν τα φωσφολιπίδια προς την αντίθετη κατεύθυνση με κατανάλωση ενέργειας, ενώ οι "σκραμπλάσες" τα μεταφέρουν και προς τις δυο κατευθύνσεις, αντίθετα προς τη διαβάθμιση της συγκέντρωσής τους, χωρίς κατανάλωση μορίων ΑΤΡ.

> Φωσφατιδυλοσερίνη (PS)

Η διατήρηση της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας και συγκεκριμένα η διατήρηση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης έχει σημαντικό λειτουργικό ρόλο, καθώς η εξωτερίκευσή της έχει ως αποτέλεσμα την αναγνώριση των ερυθροκυττάρων από τα μακροφάγα και την απομάκρυνσή τους από την κυκλοφορία μέσω ερυθροφαγοκυττάρωσης [1].



Εικόνα 1: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ώριμων ερυθροκυττάρων της κυκλοφορίας και των μακροφάγων του σπλήνα. Τα ερυθροκύτταρα αλληλεπιδρούν με τα σπληνικά μακροφάγα είτε άμεσα μέσω υποδοχέων είτε έμμεσα μέσω μορίων-συνδετών. Τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα εκφράζουν μόρια PS στην επιφάνειά τους, τα οποία είτε συνδέονται άμεσα στην Stabilin-2 ή την Tim-4 των μακροφάγων, είτε έμμεσα με οψωνίνες όπως η Gas-6, η λακταντχερίνη ή η θρομβοσπονδίνη-1. Επιπλέον, τα ερυθροκύτταρα εκφράζουν το CR1 στην επιφάνειά τους, το οποίο συνδέεται με μόρια οψωνισμένα με C3b προωθώντας τη φαγοκυττάρωση από τα σπληνικά μακροφάγων. Τά χώνη-3 των ερυθροκύτταρων και αναγνωρίζονται από τους Fc υποδοχείς των μακροφάγων. Τέλος, τα ερυθροκύτταρα εκφράζουν και το μόριο CD47 το οποίο συνδέεται στον υποδοχέα SIRPa των μακροφάγων (Ανατύπωση από [4]).

Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης αυξάνει την προσκόλληση των ερυθροκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω υποδοχέων PS, οι οποίο βρίσκονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Παρότι για πολλά χρόνια, θεωρούταν ότι τα αποπτωτικά κύτταρα αναγνωρίζονται από τα μακροφάγα μόνο μέσω των PS υποδοχέων, τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί κι άλλοι υποδοχείς οι οποίοι φαίνεται να έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν τη PS στην επιφάνεια των κυττάρων, όπως οι Tim-1, Tim-4 και Stabilin-2, ενώ έχουν βρεθεί πολλά μόρια-προσδέτες όπως η λακταντχερίνη (lactadherin), η Gas-6 και η πρωτεΐνη S του πλάσματος που γεφυρώνουν αυτήν τη σύνδεση συνδέοντας έμμεσα την PS και με τους PS-υποδοχείς, τις ανβ3/5 ιντεγρίνες και τους TAM υποδοχείς των φαγοκυττάρων. Από αυτούς τους υποδοχείς, οι Tim-4 και Stabilin-2 εκφράζονται και στα μακροφάγα του ερυθρού πολφού (Eικ.1) [4].

Παρότι, όπως έχουν δείξει πειράματα με βιοτυνιλιωμένα ερυθροκύτταρα [5], η εξωτερίκευση PS αντικατοπτρίζει το ρυθμό με τον οποίο τα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται *in vivo* από την κυκλοφορία, στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα η εξωτερίκευση της PS *in vivo* αποτελεί ακόμη ένα θέμα προς συζήτηση, ιδιαίτερα εξαιτίας των αμφιβολιών που υπάρχουν όσον αφορά στις τεχνικές απομόνωσης των γηρασμένων ερυθροκυττάρων [6].

2.2 Πρωτεΐνες

2.2.1 Διαμεμβρανικές

Περισσότερες από 300 διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με άφθονα αντίγραφα έχουν βρεθεί στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, εκ των οποίων μεγάλο ποσοστό αποτελείται από διάφορες ομάδες των αντιγόνων του αίματος [7]. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μπορεί να έχουν λειτουργία μεταφορέων ή λειτουργία μορίων προσκόλλησης. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν πρωτεΐνες όπως η ζώνη-3 (μεταφορέας ανιόντων), η υδατοπορίνη-1 (μεταφορέας μορίων νερού), ο μεταφορέας γλυκόζης-1 (Glut-1, μεταφορέας γλυκόζης και Lαφυδροασκορβικού οξέος), το αντιγόνο Kidd (μεταφορέας ουρίας), η συνδεμένη με Rhesus γλυκοπρωτεΐνη (RhAG, μεταφορέας αερίων, πιθανά και διοξειδίου του άνθρακα), η ΑΤΡάση Na⁺-K⁺, η ΑΤΡάση Ca²⁺, ο συνμεταφορέας Na⁺K⁺2Cl⁻, ο συνμεταφορέας Na⁺Cl⁻, ο συνμεταφορέας Na⁺K⁺, ο συνμεταφορέας Na⁺Cl⁻ και τα κανάλια Gardos ενώ στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι ICAM-4 και Lu που συνδέονται με ιντεγκρίνες και με τη λαμινίνη, αντίστοιχα [1].

Ανιοντοανταλλάκτης (Ζώνη-3)

Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη ζώνη-3 αποτελείται από 911 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 100kDa, κωδικοποιείται από το γονίδιο *SLC4A1* και στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη συναντάται σε περίπου 10⁶ αντίγραφα ανά κύτταρο, υπό τη μορφή διμερών ή τετραμερών. Η κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης δημιουργείται από τα αμινοξέα 1-402 και 892-911 ενώ η περιοχή των αμινοξέων 403-891 είναι διαμεμβρανική και αποτελείται από τμήματα τα οποία διαπερνούν τη μεμβράνη 12-14 φορές [8].

Ο κύριος ρόλος της πρωτεΐνης είναι η αποτελεσματική μεταφορά των αερίων που συμμετέχουν στη διαδικασία της αναπνοής. Πιο συγκεκριμένα, ο μηχανισμός ανταλλαγής O₂ και CO₂ γίνεται ως εξής: το οξυγόνο είναι προσδεμένο στην αιμοσφαιρίνη, ενώ το διοξείδιο του άνθρακα που παραλαμβάνεται από τους ιστούς μετατρέπεται σε δικαρβονικό ανιόν (HCO₃⁻) και πρωτόνιο (H⁺). Το δικαρβονικό εξάγεται στο πλάσμα από τη ζώνη-3 με

ανταλλαγή ιόντων χλωρίου, το ενδοκυττάριο pH μειώνεται και το πρωτόνιο συνδέεται στην αιμοσφαιρίνη ενισχύοντας την απελευθέρωση του οξυγόνου στους ιστούς. Η υδρογόνωση του CO₂ σε καρβονικό οξύ καταλύεται από το ενδοκυτταρικό ένζυμο καρβονική ανυδράση (Εικ.2α).

Η ερυθροειδική ζώνη-3 είναι πολυλειτουργική καθώς, εκτός από τη συμμετοχή της στη μεταφορά ιόντων, συμμετέχει και στη δομή της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Ο ρόλος της είναι να συμμετέχει στη σύνδεση του υπομεμβρανικού σκελετού σπεκτρίνηςακτίνης με τη λιπιδική διπλοστιβάδα, μέσω σύνδεσης με την αγκυρίνη. Κληρονομήσιμες μεταλλαγές σε αυτήν την περιοχή σύνδεσης, οδηγούν στην εμφάνιση κληρονομικής σφαιροκυττάρωσης [8]. Ένας ακόμη δομικός ρόλος της πρωτεΐνης είναι η δράση της ως βασικός προσδέτης ποικίλων πρωτεϊνών, συμμετέχοντας στο ονομαζόμενο "μακροσύμπλοκο της ζώνης-3", υπό τη μορφή τετραμερών (Εικ.2γ, δ).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των μορίων και του μακροσυμπλόκου της ζώνης-3. α) Κυτταροπλασματική πλευρά της ζώνης-3 συνδεμένη με την καρβονική ανυδράση, β) το τετραμερές της ζώνης-3 με την προσδεμένη δεοξυαιμοσφαιρίνη, τα αιμοχρώματα, την αλδολάση και την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης (G3PD), γ) πρόσδεση του τετραμερούς στον κυτταροσκελετό μέσω αγκυρίνης, δ) σύνδεση του τετραμερούς με το σύμπλοκο Rh (Ανατύπωση από [9]).

Εκτός από το δομικό της ρόλο, η πρωτεΐνη αυτή έχει και σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των ερυθροκυττάρων καθώς στο αμινοτελικό άκρο της υπάρχει ανταγωνιστική σύνδεση μεταξύ των γλυκολυτικών ενζύμων και της δεοξυαιμοσφαιρίνης (μη οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη) (βλ. κεφ.3 "Μεταβολισμός ερυθροκυττάρων"). Συγκεκριμένα, η ζώνη-3 είναι κύριο υπόστρωμα δύο πρωτεϊνικών κινασών του ερυθροκυττάρου, της κινάσης καζεΐνης και της κινάσης p72^{syk} [10]. Η φωσφορυλίωση τυροσινών *in vitro* στη ζώνη-3 έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει τη γλυκόλυση των ερυθροκυττάρων, μέσω αποσύνδεσης του ενζύμου αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης (G3PD) που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενζύμου [11].

Αλλαγές στη φωσφορυλίωση της ζώνης-3 συμμετέχουν επίσης στη μείωση της συγγένειάς της με την αγκυρίνη [12] και πιθανά στη δημιουργία του νεοαντιγόνου γήρανσης [13].

Γλυκοφορίνες

Οι γλυκοφορίνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, χαρακτηριστικές για τα ερυθροκύτταρα, αποτελούν το 10% του συνόλου των μεμβρανικών πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και ανήκουν στην οικογένεια των σιαλογλυκοπρωτεϊνών στην οποία περιλαμβάνονται οι γλυκοφορίνες α, β, γ, δ και ε (GPA, GPB, GPC, GPD, GPE). Οι GPA, B και Ε περιέχουν την ομάδα αίματος των αντιγόνων MNS ενώ οι GPC και D περιέχουν την ομάδα αίματος των αντιγόνων Gerbich. Το μοριακό βάρος αυτών των πρωτεϊνών πρωτεϊνών ποικίλλει μεταξύ 17-36kDa [14].

Οι γλυκοπρωτεΐνες GPA και GPD δημιουργούν σταθερά διμερή (α_2 και δ_2) ή ετεροδιμερή (α_3) και είναι οι πιο άφθονες σιαλογλυκοπρωτεΐνες στη μεμβράνη, με 600.000 και 80.000 αντίγραφα ανά κύτταρο, ενώ αντίθετα η GPB είναι λιγότερο άφθονη με 50.000 αντίγραφα ανά ερυθροκύτταρο [15].

Όσον αφορά στο ρόλο αυτών των πρωτεϊνών φαίνεται πως οι γλυκοφορίνες, λόγω των σιαλικών οξέων που περιέχουν, έχουν σημαντική συμβολή στην απόδοση αρνητικού φορτίου στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, που αποτρέπει τη συσσωμάτωσή τους [16]. Εκτός αυτού, έχουν προταθεί και επιπλέον λειτουργίες για κάποια μόρια γλυκοφορινών όπως αυτή της μοριακής συνοδού για τη GPA η οποία φαίνεται να ρυθμίζει τη μεταφορά των μορίων της ζώνης-3 στη μεμβράνη κατά τη βιοσύνθεσή της [17], ενώ οι GPC και GPD συμμετέχουν στη διατήρηση του σχήματος των ερυθροκυττάρων μέσω των αλληλεπιδράσεων της κυτταροπλασματικής περιοχής τους με τον υπομεμβρανικό σκελετό [18]. Συγκεκριμένα, η GPC φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία των ερυθροκυττάρων μέσω της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη 4.1R και p55 συνιστώντας έναν επιπλέον μηχανισμό αγκυροβόλησης της μεμβράνης στον υπομεμβρανικό σκελετό [19].

Τέλος, πρόσφατα δεδομένα προτείνουν πως η πρόσδεση συστατικών του συμπληρώματος στη GPA σε καταστάσεις φλεγμονής οδηγεί σε αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων ROS μέσω της NADPH οξειδάσης, πυροδοτώντας στη συνέχεια, ενεργοποίηση της κασπάσης-3, αύξηση της φωσφορυλίωσης της ζώνης-3 και απώλεια μορίων ATP, με αποτέλεσμα αλλαγές στην ικανότητα παραμόρφωσης των ερυθροκυττάρων [20].

Υδατοπορίνη-1 (Aqp-1)

Η υδατοπορίνη-1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 269 αμινοξικών καταλοίπων, 28kDa [21], η οποία δημιουργεί ένα διαμεμβρανικό κανάλι διαπερατό στο νερό, αλλά όχι σε άλλους διαλύτες ή φορτισμένα μόρια. Αποτελείται από έξι διαμεμβρανικά δομικά στοιχεία (domains) υπό τη μορφή α-ελίκων και πέντε θηλιές οι οποίες συνδέουν τις διαμεμβρανικές περιοχές, ενώ το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο της βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Περιέχει δύο συντηρημένα μοτίβα NPA (Ασπαραγίνης - Προλίνης - Αλανίνης) στις θηλιές Β και Ε οι οποίες εισχωρούν στη μεμβράνη χωρίς να τη διαπερνούν. Οι θηλιές αυτές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους δημιουργώντας το ονομαζόμενο "μοντέλο κλεψύδρας", που χαρακτηρίζεται από φαρδιά εξωτερικά ανοίγματα με μια κεντρική στένωση (~3-4 Å) στην περιοχή που αλληλεπιδρούν τα δύο μοτίβα NPA. Κάθε

ερυθροκύτταρο φέρει στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη 40.000-50.000 τετραμερή της υδατοπορίνης-1 [22], με διαπερατότητα 3x10⁹ μόρια/μονομερές/δευτερόλεπτο.

Η κύρια λειτουργία της υδατοπορίνης-1 είναι η ταχεία και ρυθμιζόμενη μεταφορά μορίων νερού κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης, η οποία προκαλείται οσμωτικά ή μέσω διάχυσης. Συγκεκριμένα στα ερυθροκύτταρα, η υδατοπορίνη-1 συμβάλλει κατά ~64% στη συνολική διαπερατότητα του νερού λόγω διάχυσης, με την αντίστοιχη λιπιδική διαπερατότητα να είναι περίπου 23%, ενώ συμβάλλει με ποσοστό μεγαλύτερο του 85% στη συνολική διαπερατότητα της μεμβράνης που προκαλείται λόγω οσμωσης, με την αντίστοιχη λιπιδική διαπερατότητα να είναι μόνο ~10% [23]. Η διαπερατότητα των ερυθροκυττάρων σε νερό λόγω όσμωσης θεωρείται ότι υπηρετεί την ανάγκη για ταχεία οσμωτική μεταφορά νερού στα ερυθροκύτταρα λόγω του υπερτονικού περιβάλλοντος που υπάρχει στο μυελό των νεφρών [24]. Επίσης, έχει αναφερθεί πως η διαπερατότητα των ερυθροκυττάρων σε νερό συμβάλλει στη μετακίνησή τους μέσα στα τριχοειδή [25]. Στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, η υδατοπορίνη-1 δεν εμφανίζει αλληλεπιδράσεις με κυτταροπλασματικές ή άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες αλλά έχει προταθεί η παρουσία της σε λιπιδικές σχεδίες όπου συν-τοποθετείται μαζί με τη στοματίνη [26].



Εικόνα 3: Προτεινόμενο μοντέλο διαλογής της υδατοπορίνης-1 στα εξωσώματα κατά την ωρίμανση των δικτυοερυθροκυττάρων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες (A) τα επίπεδα της υδατοπορίνης-1 ρυθμίζονται μέσω του εξωσωμικού μονοπατιού. Σε συνθήκες οσμωτικού στρες (B) η απομάκρυνση της υδατοπορίνης-1 εμποδίζεται, πιθανά μέσω ρύθμισης της ουμπικουϊτινιλίωσης ή μέσω φωσφορυλίωσης, και τα μόρια της πρωτεΐνης από το μονοπάτι έκκρισης εισέρχονται στο μονοπάτι ανακύκλωσης, αυξάνοντας τη συγκέντωση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη (Ανατύπωση από [27]). MVE=πολυκυστιδιακά ενδοσώματα, PKA=φωσφορική κινάση Α.

Η έκφραση της υδατοπορίνης-1 έχει μελετηθεί και στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα. In vitro ωρίμανση ερυθροκυττάρων ποντικών έδειξε απομάκρυνση των μορίων της πρωτεΐνης από τη μεμβράνη μέσω εξωσωμάτων (με ουμπικουιτίνωση), η οποία ρυθμίζεται από την οσμωτικότητα του εξωκυττάριου περιβάλλοντος. Έτσι, σε υπέρτονο περιβάλλον, μπλοκάρεται το εξωσωμικό μονοπάτι της πρωτεΐνης στα δικτυοερυθροκύτταρα με αποτέλεσμα τα μόρια της υδατοπορίνης-1 να παραμένουν στη μεμβράνη (Εικ.3). Είναι πιθανό λοιπόν, λόγω των διαφορετικών συνθηκών στο μυελό των οστών σε σχέση με το

πλάσμα του αίματος, τα δικτυοερυθροκύτταρα να χρειάζονται περισσότερα μόρια της υδατοπορίνης-1 και γι' αυτό η έκφραση του μορίου σε αυτό το στάδιο ζωής του κυττάρου να βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα τα οποία μειώνονται κατά την ωρίμανσή του [27].

Τέλος, στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα έχει βρεθεί μειωμένη διαπερατότητα της μεμβράνης σε νερό, χωρίς όμως σημαντικές μεταβολές στον αριθμό των μορίων της πρωτεΐνης ανά κύτταρο, πιθανά μέσω αναστολής της λειτουργίας του καναλιού λόγω γήρανσης.

Μεταφορέας γλυκόζης-1 (Glut-1)

Ο μεταφορέας γλυκόζης-1 (Glut-1) είναι μια πρωτεΐνη, 54 kDa, η οποία διαπερνά τη μεμβράνη 12 φορές και είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά μορίων γλυκόζης μέσα στα κύτταρα. Τα ερυθροκύτταρα εκφράζουν υψηλά επίπεδα του μεταφορέα γλυκόζης με περισσότερα από 200.000 μόρια ανά κύτταρο, αποτελώντας το 10% της συνολικής πρωτεϊνικής μάζας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης [28]. Ο Glut-1 των ερυθροκυττάρων μεταφέρει επίσης μόρια L-αφυδροασκορβικού (DHA) οξέος, που αποτελεί οξειδωμένο ενδιάμεσο του ασκορβικού οξέος. Το ασκορβικό οξύ είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της αναγωγικής ικανότητας του πλάσματος, απομακρύνοντας τα υπεροξείδια, μέσω της οξείδωσής του σε DHA. Αφού εισέλθει στο κύτταρο, το DHA ανάγεται αμέσως σε ασκορβικό οξύ συμβάλλοντας στην ανακύκλωση του ασκορβικού καθώς τα ερυθροκύτταρα δεν έχουν τη δυνατότητα σύνθεσης νέων μορίων [29]. Ο μεταφορέας Glut-1 έχει εκλεκτικότητα τόσο για μόρια γλυκόζης όσο και για μόρια DHA, χωρίς να υφίσταται ανταγωνισμός μεταξύ των δύο, με τη ρύθμιση της μεταφοράς να γίνεται μέσω της πρωτεΐνης στοματίνη [30] (Εικ.4).



Εικόνα 4: Στον άνθρωπο και σε κάποια άλλα θηλαστικά όπου η de novo βιοσυνθετική ικανότητα βιταμίνης C (ασκορβικό οξύ) έχει χαθεί, η συγγένεια του Glut-1 για τη μεταφορά γλυκόζης και Lαφυδροασκορβικού οξέος (DHA) τροποποιείται από τη μεμβρανική πρωτεΐνη στοματίνη. Τα πρόδρομα ερυθροειδή κύτταρα του μυελού εκφράζουν Glut-1, πρωταρχικά εισάγουν γλυκόζη και δευτερευόντως DHA. Κατά τη διαφοροποίηση, η έκφραση της στοματίνης αυξάνεται δραστικά. Η στοματίνη προσδένεται στον Glut-1 και αλλάζει την προτίμησή του από γλυκόζη για DHA. Ενδοκυττάρια, το DHA ανάγεται σε ασκορβικό οξύ, το οποίο διατίθεται πίσω στο πλάσμα, αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωση της βιταμίνης C (Ανατύπωση από [31]).

Επιπλέον, έχει προταθεί ότι συνδέεται με τη δεματίνη και την αδουσίνη στα άκρα των τετραμερών σπεκτρίνης, συγκροτώντας ένα μακροσύμπλοκο το οποίο παρέχει μία επιπρόσθετη σύνδεση του συμπλέγματος ζεύξης στην πλασματική μεμβράνη (Εικ.8) [32].

Αντλία ιόντων Ca²⁺- ΑΤΡάση (PMCA)

Η Ca²⁺-ATPάση (PMCA - Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase) είναι μια πρωτεΐνη η οποία έχει ως ρόλο την απομάκρυνση των ιόντων ασβεστίου από το εσωτερικό των κυττάρων. Στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη απαντάται η ισομορφή της αντλίας ιόντων ασβεστίου PMCA1. Αυτή η ATPάση είναι μια πρωτεΐνη περίπου 140kDa, αποτελείται από 1.220 αμινοξέα τα οποία δημιουργούν μια πρωτεΐνη με 10 διαμεμβρανικές περιοχές και δύο ενδοκυττάριες θηλιές που αποτελούν περιοχές φωσφορυλίωσης και πρόσδεσης μορίων ATP. Για την μεταφορά ενός ιόντος Ca²⁺ απαιτείται η υδρόλυση ενός μορίου ATP, ενώ μεταφέρεται παράλληλα και ένα ιόν H⁺. Όταν τα ενδοκυττάρια επίπεδα Ca²⁺ είναι χαμηλά, τότε η αντλία παραμένει ανενεργή, ενώ όταν είναι υψηλά ενεργοποιείται από την καλμοντουλίνη [33]. Το καρβοζυτελικό άκρο της πρωτεΐνης περιέχει μια περιοχή πρόσδεσης της καλμοντουλίνης, η οποία αποτελεί περιοχή φωσφορυλίωσης και σημείο πρόσδεσης διαφόρων πρωτεϊνών. Αυτή η περιοχή αλληλεπιδρά με την καταλυτική περιοχή ενός δομικού στοιχείου της πρωτεΐνης (domain) και με αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται η πρόσδεση των μορίων ATP, διατηρώντας τη δραστηριότητα του ενζύμου σε χαμηλά επίπεδα.

Η αύξηση των ενδοκυττάριων επιπέδων ιόντων ασβεστίου, ενεργοποιεί την καλμοντουλίνη η οποία προσδένεται στην καρβοξυτελική περιοχή της PMCA και απομακρύνει την αυτοκατασταλτική περιοχή από την καταλυτική περιοχή δράσης του ενζύμου, αυξάνοντας έτσι την ενεργότητα της PMCA περίπου εφτά φορές, παρέχοντας μια κινητήρια δύναμη για την μεταφορά των ιόντων Ca²⁺ κατά μήκος της μεμβράνης [34]. Ο περιοριστικός παράγοντας στη δράση της αντλίας είναι η διαθεσιμότητα των μορίων ATP.

Όπως και πολλά άλλα μεμβρανικά συστατικά έτσι και η Ca²⁺-ATPάση λόγω των σουλφυδρυλικών ομάδων που περιέχει είναι δυνητικά στόχος των οξειδωτικών μορίων. Επειδή αυτή η πρωτεΐνη είναι βασικής σημασίας για τη διατήρηση της μεγάλης διαφοράς που υπάρχει στα επίπεδα των ιόντων ασβεστίου ενδοκυττάρια σε σχέση με το εξωκυττάριο περιβάλλον, η οξείδωση και η επερχόμενη απώλεια της δραστικότητας του ενζύμου σχετίζεται άμεσα με μειωμένη ικανότητα παραμόρφωσης και πρόωρη καταστροφή των κυττάρων [35].

CD47 και σύμπλοκο Rhesus

Το μόριο CD47 (ή αλλιώς πρωτεΐνη IAP-integrin associated protein) είναι μια πρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Ig), είναι γλυκοζυλιωμένη και έχει μοριακό βάρος 50kDa. Το γεγονός ότι ο Rh_{null} φαινότυπος σχετίζεται με μειωμένη έκφραση του μορίου CD47 έως και 75%, έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ του μορίου CD47 και του συμπλόκου Rhesus (Rh) [36]. Στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη τα αντιγόνα Rh συνδέονται με πολλές άλλες πρωτεΐνες (γλυκοφορίνη B, LW, CD47, RhAG-συνδεμένες με Rh γλυκοπρωτεΐνες) δημιουργώντας το σύμπλοκο Rh, το οποίο φαίνεται να συνδέεται και με τη ζώνη-3 και την 4.2 καθώς μεταλλαγές σε αυτές τις πρωτεΐνες οδηγούν σε μειωμένη έκφραση των πολυπεπτιδίων Rh, RhAG και CD47 [37].

Μελέτες σε ποντίκια έγουν δείξει σταδιακή απώλεια του CD47 από την επιφάνεια των ώριμων ερυθροκυττάρων της κυκλοφορίας, με τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα να εμφανίζουν μείωση έως και 30% σε σχέση με τα νεαρά [38]. Το μόριο CD47 θεωρείται «δείκτης-εαυτού», καθώς η αναγνώρισή του στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων αναστέλλει τη φαγοκυττάρωση ενώ έλλειψή του οδηγεί σε απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία μέσω φαγοκυττάρωσης. Το μόριο αυτό εκδηλώνει την ανασταλτική του δράση μέσω πρόσδεσης στο μόριο SIRPa των μακροφάγων, το οποίο επάγει ανασταλτική σηματοδότηση (non-eat me signal) μέσω των μοτίβων ITIMs tyrosine-based inhibition motifs) (immunorceptor που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική ουρά του. Η σύνδεση αυτή προκαλεί φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των φωσφατασών SHP-1 και -2 οι οποίες απενεργοποιούν υποστρώματα που είναι απαραίτητα για τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, όπως η μυοσίνη-ΙΙ, η οποία δημιουργεί τα ψευδοπόδια για τη φαγοκυττάρωση [39].



Εικόνα 5: Καταρροϊκά της σύνδεσης IgG-FcγR, οι κινάσες φωσφορυλιώνουν πολλές κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της μυοσίνης-ΙΙ, η οποία οδηγεί στη δημιουργία ψευδοποδίων και τελικά στη φαγοκυττάρωση. Η σύνδεση όμως CD47-SIRPa οδηγεί στην ενεργοποίηση των φωσφατασών SHP-1 που απενεργοποιούν τη μυοσίνη-ΙΙ. Όταν υπάρχει ακαμψία του ερυθροκυττάρω, αυτή φαίνεται να εμποδίζει τη μεσολαβούμενη από το μόριο CD47 αναστολή της φαγοκυττάρωσης. Πιο συγκεκριμένα, η υπάρχουσα υπόθεση υποστηρίζει πως (A) στα εύκαμπτα ερυθροκύτταρα, η μεσολαβούμενη από CD47 αναστολή μπορεί να ξεπεράσει την ενεργοποίηση των κυτταρικού σκελετού δεν αναστέλλεται από τη σύνδεση CD47-SIRPa (Ανατύπωση από [40]).

Τέλος, πρόσφατα δεδομένα, υποδηλώνουν ότι κατά την αναγνώριση των ερυθροκυττάρων από τα φαγοκύτταρα, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο η ικανότητα παραμόρφωσης των ερυθροκυττάρων, τα οποία μπορεί να εκφράζουν τόσο μόρια κυτταρικής εκκαθάρισης όσο και μόρια «δείκτες-εαυτού». Φαίνεται πως στα εύκαμπτα δισκοκύτταρα, παρά την παρουσία δεικτών κυτταρικής εκκαθάρισης στην επιφάνειά τους (IgGs), η σύνδεση CD47-SIRPa είναι ικανή να εμποδίσει την ενεργοποίηση της μυοσίνης-ΙΙ στα μακροφάγα για τη δημιουργία ψευδοποδίων. Αντίθετα, στα ερυθροκύτταρα που παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα παραμόρφωσης, παρά την παρουσία μορίων CD47, η μυοσίνη-ΙΙ υπερενεργοποιείται με αποτέλεσμα να επάγεται η φαγοκυττάρωση [40] (Εικ.5).

CD59

Η πρωτεΐνη CD59 (protectin) είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με MB 18-20kDa, η οποία έχει ως ρόλο την προστασία των ερυθροκυττάρων από λύση, μέσω αναστολής της ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Κατά την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, η CD59 αλληλεπιδρά, είτε με περιοχές του συμπλόκου C5b-8 εμποδίζοντας την επαφή των μορίων C9 με αυτό, είτε απευθείας με τα μόρια C9. Έτσι, εμποδίζεται η δημιουργία του συμπλόκου MAC (membrane attack complex) και η επερχόμενη λύση του κυττάρου [41] (Εικ.6).



Εικόνα 6: Πιθανοί μηχανισμοί δράσης του μορίου CD59. A) Η πρωτεΐνη CD59 προσδένεται στο σχηματιζόμενο MAC και συγκεκριμένα στο C5b-8 μόριο, εμποδίζοντας την πρόσδεση των μορίων C9. Θεωρείται ότι το πρώτο μόριο C9 προσδένεται μεν αλλά αδυνατεί να εισέλθει στη μεμβράνη, λόγω της παρουσίας του CD59. B) Το CD59 προσδένεται απευθείας σε μόρια C9 εμποδίζοντας την στρατολόγηση περισσότερων C9

μορίων που είναι απαραίτητα για τη δημιουργία πόρων μέσω του ΜΑC (Ανατύπωση από [41]).

2.2.2 Μεμβρανοσυνδεόμενες

Στοματίνη (Ζώνη 7.2)

Η στοματίνη είναι μια μεμβρανοσυνδεόμενη πρωτεΐνη 32kDa, με μια υδρόφοβη περιοχή η οποία εισέρχεται στην κυτταροπλασματική περιοχή της λιπιδικής διπλοστιβάδας, χωρίς να τη διαπερνά. Η πρωτεΐνη αυτή συνδέεται με περιοχές πλούσιες σε χοληστερόλη (λιπιδικές σχεδίες), δημιουργεί ολιγομερή και παίζει ρόλο ικριώματος για τη δημιουργία μεγάλων συμπλόκων λιπιδίων-πρωτεϊνών, ελέγχοντας έτσι τη λειτουργία πολλών μεμβρανικών πρωτεϊνών ρυθμίζοντας αντιστρεπτά τη συμμετοχή τους στις λιπιδικές σχεδίες. Από μελέτες ερυθροκυττάρων στα οποία λείπει η στοματίνη φαίνεται ο ρόλος της στη ρύθμιση της διαμεμβρανικής μεταφοράς κατιόντων μέσω των ιοντικών καναλιών, ενώ έχει αποδειχθεί και η ρύθμιση του μεταφορέα Glut-1 από αυτήν. Επιπλέον, η αναγνώριση κι άλλων πρωτεϊνών μεταφορέων που αλληλεπιδρούν με τη στοματίνη, όπως η ζώνη-3, ο μεταφορέας ουρίας, η φερροπορτίνη-1, η Ca²⁺-ATPάση και η υδατοπορίνη-1 επιβεβαιώνει τη λειτουργία της ως ρυθμιστή των ιοντικών καναλιών και πρωτεϊνών μεταφορέων [26].

Η στοματίνη έχει επίσης βρεθεί να συν-τοποθετείται στη μεμβράνη με τις πρωτεΐνες συνεξίνη και σορκίνη. Οι πρωτεΐνες αυτές βρίσκονται μόνο στην κυτταροπλασματική περιοχή της μεμβράνης, η πρόσδεσή τους επάγεται από την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου και συμμετέχουν στην κυστιδιοποίηση [42].

Η στοματίνη, μαζί με τις φλοτιλλίνες-1 και -2, αποτελούν βασικές πρωτεΐνες των λιπιδικών σχεδιών στα ερυθροκύτταρα οι οποίες οργανώνονται, στην κυτταροπλασματική περιοχή της μεμβράνης, σε ολιγομερή σύμπλοκα [43]. Ο εμπλουτισμός των μικροκυστιδίων (*in vitro* κυστιδιοποίηση με αύξηση του ενδοκυττάριου Ca²⁺ ή κυστίδια από ασκούς μετάγγισης), που προέρχονται από αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου, σε στοματίνη και των νανοκυστιδίων σε συνεξίνη και σορκίνη υποδηλώνουν τη σημαντική συμβολή αυτών των πρωτεϊνών στη διαδικασία της **κυστιδιοποίησης**. Αντίθετα, οι φλοτιλλίνες απουσιάζουν από τα κυστίδια και παραμένουν στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, υποδηλώνοντας πως οι στοματίνες και οι φλοτιλλίνες συμμετέχουν σε ανεξάρτητα ολιγομερή σύμπλοκα δημιουργώντας διαφορετικά "είδη" λιπιδικών σχεδιών με διαφορετικό ρόλο και προορισμό για το καθένα [44].

2.2.3 Σκελετικές

Τα κύρια συστατικά του δυσδιάστατου υπομεμβρανικού σκελετικού δικτύου είναι οι πρωτεΐνες α- και β-σπεκτρίνη, αγκυρίνη, αδουσίνη, πρωτεΐνη 4.1R, δεματίνη, ακτίνη, τροπομυοσίνη και τροπομοντουλίνη.

Σπεκτρίνη

Η πρωτεΐνη σπεκτρίνη αποτελεί κύριο συστατικό του υπομεμβρανικού σκελετού και χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία μακριών νηματίων α- και β-σπεκτρίνης (240kDa και 220kDa, αντίστοιχα). Η α- και β-σπεκτρίνη δημιουργούν ένα αντιπαράλληλο ετεροδιμερές μέσω ισχυρών πλευρικών αλληλεπιδράσεων του καρβοξυτελικού άκρου της α-σπεκτρίνης με το αμινοτελικό άκρο της β-σπεκτρίνης. Το τετραμερές σπεκτρίνης, που είναι το κύριο δομικό συστατικό του υπομεμβρανικού σκελετού, δημιουργείται μέσω πλευρικών αλληλεπιδράσεων του αμινοτελικού άκρου της α-αλυσίδας του ενός διμερούς, με την καρβοξυτελική περιοχή της β-αλυσίδας του άλλου διμερούς. Το άλλο άκρο του διμερούς συμμετέχει στη συγκρότηση του συμπλόκου ζεύξης με την F-ακτίνη και την πρωτεΐνη 4.1R [1].

Οι αλληλεπιδράσεις των διμερών σπεκτρίνης και των πρωτεϊνών του συμπλόκου ζεύξης είναι κύριοι ρυθμιστές της ακεραιότητας της μεμβράνης και των μηχανικών ιδιοτήτων του ερυθροκυττάρου εμποδίζοντας την παραμόρφωσή του και τη θραυσματοποίηση της μεμβράνης από τις πιέσεις που δέχεται στην κυκλοφορία [1] (Εικ.7). Εκτός όμως από το δομικό της ρόλο, πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την ικανότητα της σπεκτρίνης να δρα ως μοριακή συνοδός, βοηθώντας *in vitro* το δίπλωμα των αποδιαταγμένων αλυσίδων α-σφαιρίνης [45].



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης στον άνθρωπο. (Ανατύπωση από [46])

Αγκυρίνη (Πρωτεΐνη 2.1)

Η αγκυρίνη των ερυθροκυττάρων είναι μια πρωτεΐνη 1881 αμινοξικών καταλοίπων, 206kDa που χωρίζεται λειτουργικά σε τρείς περιοχές: 1) την αμινοτελική περιοχή 89kDa στην οποία συνδέεται η ζώνη-3, 2) την κεντρική περιοχή 62kDa, η οποία περιέχει την περιοχή σύνδεσης της β-σπεκτρίνης και 3) τη λειτουργική περιοχή 55 kDa, ευαίσθητη σε πρωτεάσες, η οποία ρυθμίζει την αλληλεπίδραση της αγκυρίνης με τη σπεκτρίνη και τη ζώνη-3. Έτσι, η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει ως κύριος συνδέτης στην πρόσδεση του σκελετού της σπεκτρίνης στην πλασματική μεμβράνη, μέσω της ζώνης-3 [14] (Εικ.7).

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν τη συμμετοχή της πρωτεΐνης αυτής στην ερυθροφαγοκυττάρωση. Πιο συγκεκριμένα, δεδομένα από ερυθροκύτταρα ποντικών δείχνουν ότι η *in vitro* ενεργοποίηση της φωσφορικής κινάσης C (PKC) που προκαλεί εισροή ιόντων ασβεστίου οδηγεί σε έκθεση των περιοχών RGD της αγκυρίνης μέσω ενεργοποίησης καλπαϊνών και άλλων ασβεστιο-εξαρτώμενων πρωτεϊνών ή μέσω φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών [47]. Η έκθεση των RGD (Arg-Gly-Asp) περιοχών της πρωτεΐνης στην επιφάνεια του κυττάρου οδηγεί σε πρόσδεση της α_νβ₃ ιντεγκρίνης και τελικά σε φαγοκυττάρωση των ερυθροκυττάρων [48].

Αδουσίνη (Ζώνη 2.8, 2.9)

Η αδουσίνη είναι ένα ετεροδιμερές α (81kDa) και β (80kDa) αλυσίδων, με 30.000 αντίγραφα ανά ερυθροκύτταρο, που επιτελεί σημαντικές λειτουργίες με τη συμμετοχή της στο υπομεμβρανικό σκελετικό δίκτυο, συνδεόμενη στο σύμπλοκο σπεκτρίνης-ακτίνης μέσω της κυτταροπλασματικής περιοχής της [49] (Εικ.7). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη αυτή δημιουργεί μια γέφυρα σύνδεσης του συμπλόκου ζεύξης στη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα μέσω της ζώνης-3 [50]. Η σταθεροποίηση της σύνδεσης ακτίνης-σπεκτρίνης, εξασφαλίζει την ακεραιότητα του συμπλόκου ζεύξης όταν τα ερυθροκύτταρα υποβάλλονται σε μηχανικές παραμορφώσεις στην περιφερική κυκλοφορία [49], ενώ η ρήξη της οδηγεί σε μεμβρανική αστάθεια και κυστιδιοποίηση. Επιπλέον, η αδουσίνη συνδέεται στα άκρα των νηματίων ακτίνης, εμποδίζοντας την ανεξέλεγκτη επιμήκυνσή τους [51], διαδικασία που ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης καθώς η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί υπόστρωμα πολλών πρωτεϊνικών κινασών, όπως η PKC και η εξαρτώμενη από cAMP πρωτεϊνική κινάση.

Πρωτεΐνη 4.1 R

Η πρωτέινη 4.1R αποτελεί το 6% του συνόλου των πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης με 200.000 αντίγραφα ανά κύτταρο και συναντάται σε δύο ισομορφές 4.1a και 4.1b με μοριακά βάρη 80kDa και 78 kDa αντίστοιχα. Έχει μια περιοχή 10kDa μέσω της οποίας αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή της β-σπεκτρίνης, συμβάλλοντας στην πρόσδεση της σπεκτρίνης στην ακτίνη, ενώ η αμινοτελική της πλευρά προσδένεται στη GPC και σε αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια της εσωτερικής μονοστιβάδας της μεμβράνης, βοηθώντας την πρόσδεση των απομακρυσμένων άκρων της σπεκτρίνης στην ερυθροκυτταρική [14] (Εικ.7).

Η πρωτεΐνη 4.1R προσδένεται τόσο σε λιπίδια όσο και σε πρωτεΐνες. Όσον αφορά στα φωσφολιπίδια, προσδένεται στη φωσφατιδυλοσερίνη και στην 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP₂), ενώ όσον αφορά στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες προσδένεται στη ζώνη-3 και στη γλυκοφορίνη C με την οποία δημιουργεί ένα σύμπλοκο μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη p55. Οι ικανότητες πρόσδεσης της πρωτεΐνης 4.1R

βρίσκονται σε μια περιοχή 30kDa που είναι γνωστή ως FERM περιοχή. Η περιοχή αυτή περιέχει τρεις σφαιρικούς λοβούς, καθένας από τους οποίους περιέχει μια μοναδική περιοχή πρόσδεσης του κατάλληλου συνδέτη. Έτσι, η ζώνη-3 προσδένεται στον λοβό A (αμινοτελική περιοχή), η γλυκοφορίνη C προσδένεται στον κεντρικό λοβό B και οι p55 και φωσφατιδυλοσερίνη προσδένονται στο λοβό C (καρβοξυτελική περιοχή). Η PIP₂ προσδένεται στην περιοχή ανάμεσα στους λοβούς A και C [52].

Παλλιδίνη (Ζώνη 4.2)

Η περιφερική πρωτεΐνη του υπομεμβρανικού σκελετού παλλιδίνη (πρωτεΐνη 4.2) αποτελεί το 5% της συνολικής πρωτεϊνικής περιεκτικότητας, με 2.5x10⁵ αντίγραφα ανά ερυθροκύτταρο και συναντάται σε δύο ισομορφές μοριακού βάρους 72kDa και 74kDa. Αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή της ζώνης-3 και με την αγκυρίνη ενώ έχει βρεθεί και σύνδεσή της με το μόριο CD47 του συμπλόκου Rhesus συμβάλλοντας στην αγκυροβόληση του συμπλόκου αυτού στον υπομεμβρανικό σκελετό (Εικ.7). Έχει σημαντική συμβολή στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, μέσω των αλληλεπιδράσεων με τη ζώνη-3 και με άλλα συστατικά του υπομεμβρανικού σκελετού, ενώ η έλλειψή της έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση σφαιροκυττάρωσης. Επιπλέον, μέσω αλληλεπίδρασης με το μόριο CD47 που είναι «δείκτης-εαυτού», βοηθά στην επιβίωση των ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία [53].

Δεματίνη (Ζώνη 4.9)

Η δεματίνη είναι πρωτεΐνη του υπομεμβρανικού σκελετού της οποίας ο ρόλος είναι να προσδένεται σε μόρια ακτίνης και να τα πακετάρει σε νημάτια ορισμένου μήκους. Το λειτουργικό μόριο της πρωτεΐνης αυτής αποτελείται από τρείς υπομονάδες, δύο πολυπεπτίδια μοριακού βάρους 48kDa και ένα 52kDa. Κάθε ερυθροκύτταρο αποτελείται από περίπου 43.000 αντίγραφα της πρωτεΐνης αυτής, με ένα μόριο δεματίνης να συνδέεται σε ένα ολιγομερές ακτίνης [14].

Η δεματίνη βρίσκεται στις περιοχές σύνδεσης ακτίνης-σπεκτρίνης και η ικανότητά της να σταθεροποιεί τα νημάτια ακτίνης ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης. Συγκεκριμένα, ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης Α οδηγεί σε φωσφορυλίωση της δεματίνης, η οποία εμποδίζει τη σύνδεση της σπεκτρίνης με τα μόρια F-ακτίνης μειώνοντας τη μηχανική σταθερότητα της μεμβράνης [54]. Επιπλέον, η δεματίνη έχει σημαντικό δομικό ρόλο καθώς μαζί με την αδουσίνη και τον μεταφορέα Glut-1 συνδέουν το σύμπλοκο ζεύξης στην ερυθροκυτταρική μεμβράνης [32] (Εικ.8).

Ακτίνη (Ζώνη 5)-Τροπομυοσίνη-Τροπομοντουλίνη

Ένα ερυθροκύτταρο αποτελείται από ~500.000 μονομερή β-ακτίνης, όπου 12-13 μονομερή συγκροτούνται για τη δημιουργία ενός ολιγομερούς F-ακτίνης. Έτσι, σε ένα ερυθροκύτταρο συναντώνται περίπου 40.000 ολιγομερή κάθε ένα από τα οποία συνδέεται στα άκρα με ένα μόριο δεματίνης για τη σταθεροποίησή του [14] (Εικ.8).

Η τροπομυοσίνη των ερυθροκυττάρων είναι μια πρωτεΐνη που αποτελεί το 1% του συνόλου των πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Αποτελείται από δύο υπομονάδες μοριακού βάρους 27kDa και 29kDa και προσδένεται σε μόρια F-ακτίνης, σε αναλογία ενός μορίου τροπομυοσίνης (60kDa) ανά 6-8 μόρια μονομερών ακτίνης [55]. Μια πιθανή λειτουργία της είναι η σταθεροποίηση των κοντών νηματίων ακτίνης του υπομεμβρανικού σκελετού ενώ έχει προταθεί και η συμμετοχή της στη διατήρηση της μηχανικής σταθερότητας της μεμβράνης μέσω σταθεροποίησης του συμπλέγματος σπεκτρίνη - ακτίνη - πρωτεΐνη 4.1R [56] (Εικ.8).

Η τροπομοντουλίνη είναι πρωτεΐνη του υπομεμβρανικού σκελετού, 40,6kDa, η οποία προσδένεται στο ένα άκρο της τροπομυοσίνης και ως ρόλος της έχει προταθεί η παρεμπόδιση της επιμήκυνσης και του αποπολυμερισμού των νηματίων ακτίνης για τη διατήρηση σταθερού μήκους των νηματίων ακτίνης.

p55

Η p55 είναι μια περιφερική παλμιτυλιωμένη πρωτεΐνη της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, η οποία χωρίζεται σε δομικές περιοχές στις οποίες περιλαμβάνονται η περιοχή PDZ (η οποία συνδέεται στην καρβοζυτελική περιοχή της γλυκοφορίνης C), η περιοχή SH3, η περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης 4.1R και η περιοχή φωσφορυλίωσης τυροσινών [57]. Η p55 συνδέεται απευθείας στην πρωτεΐνη 4.1R αλλά και στη γλυκοφορίνη C για τη δημιουργία ενός τριμερούς συμπλόκου στην κυτταροπλασματική περιοχή της πλασματικής μεμβράνης (Εικ.8). Αυτό το σύμπλοκο συνδέει το σύμπλοκο σπεκτρίνης-ακτίνης με τη λιπιδική διπλοστιβάδα και θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της μορφολογίας των ερυθροκυττάρων και των ιδιοτήτων της μεμβράνης [58].



Εικόνα 8: Προτεινόμενο μοντέλο σύνδεσης του υπομεμβρανικού σκελετού στη μεμβράνη μέσω του μεταφορέα γλυκόζης (Ανατύπωση από [32]).

2.2.4 Κυτοσολικές

Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη είναι η πιο άφθονη κυτοσολική πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 65kDa, η οποία αποτελεί πάνω από το 97% της συνολικής πρωτεϊνικής μάζας του ερυθροκυττάρου [59]. Η HbA είναι η κύρια αιμοσφαιρίνη στα ερυθροκύτταρα (σε ποσοστό 97-99% του συνόλου των σφαιρινών) και αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες σφαιρίνης 17kDa, δύο α και δύο β, όπου στην καθεμία είναι προσδεμένη μια ομάδα αίμης. Η α αλυσίδα αποτελείται από 141 και η β αλυσίδα από 146 αμινοξικά κατάλοιπα. Σε μικρότερα ποσοστά συναντώνται σε έναν υγιή ενήλικα οι αιμοσφαιρίνες A_2 ($a_2\delta_2$, 1,5-3%) και F ($a_2\gamma_2$,<1%). Η ομάδα αίμης δίνει το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα στα ερυθροκύτταρα και αποτελείται από ένα δακτύλιο πορφυρίνης με ένα άτομο σιδήρου στο κέντρο του. Η συγγένεια της αιμοσφαιρίνης για το οξυγόνο εξαρτάται από τη συγκέντρωση διαφόρων χημικών παραγόντων, όπως είναι τα πρωτόνια, το διοξείδιο του άνθρακα, τα ιόντα χλωρίου και το 2,3-διφωσφογλυκερινικό οξύ (2,3-DPG).

Η κύρια λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής είναι η μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς και η επιστροφή του διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς στους πνεύμονες. Ένα ποσοστό περίπου 3% της αιμοσφαιρίνης καθημερινά υφίσταται αυτο-οξείδωση η οποία οφείλεται στην απώλεια ενός ηλεκτρονίου από το μόριο του σιδήρου και στη μετατροπή του από δισθενή σε τρισθενή, με ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξείδιου του υδρογόνου (H₂O₂). Το μόριο της αιμοσφαιρίνης που είναι συνδεδεμένο με μόρια τρισθενούς σιδήρου δεν μπορεί να επιτελέσει τη μεταφορά του οξυγόνου και ονομάζεται μεθαιμοσφαιρίνη. Υπό φυσιολογικές συνθήκες μόνο ένα ποσοστό της τάξης του 1% της αιμοσφαιρίνης παραμένει στην οξειδωμένη μορφή καθώς το ένζυμο αναγωγάση της μεθαιμοσφαιρίνης επαναφέρει την αιμοσφαιρίνη στη λειτουργική της μορφή ανάγοντας το μόριο του σιδήρου [60].



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση των αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχει η ελεύθερη (εξωκυττάρια) αιμοσφαιρίνη του πλάσματος (Ανατύπωση από [61]). Hb=αιμοσφαιρίνη

Ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος (free Hb)

Όταν τα ερυθροκύτταρα της κυκλοφορίας υφίστανται λύση (ενδοαγγειακή αιμόλυση) η αιμοσφαιρίνη που απελευθερώνεται προσδένεται στην απτοσφαιρίνη και δημιουργεί σύμπλοκα τα οποία απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω των μακροφάγων. Σε περιπτώσεις όμως υψηλής αιμόλυσης, η αιμοσφαιρίνη δρα σαν πηγή παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) προκαλώντας βλάβες στους γύρω ιστούς και στα ενδοθήλια. Ταυτόχρονα, αλληλεπιδρά ταχέως και μη αναστρέψιμα με το μονοξείδιο του αζώτου (NO) μειώνοντας σημαντικά τη διαθεσιμότητά του στο αίμα. Το NO είναι ένα μόριο με σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πίεσης του αίματος, στην αγγειογένεση, στις λειτουργίες των αιμοπεταλίων, στον πολλάπλασιασμό των λείων μυικών κυττάρων των αγγείων και στη φλεγμονή [60] (Εικ.9). Επομένως, παθολογικά υψηλά επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα μπορούν να οδηγήσουν σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, ιδιαίτερα σε ασθένειες που χαρακτηρίζονται από υψηλή αιμόλυση όπως η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια [62].

Υπεροξειρεδοξίνη-2 (Prx-2)

Η υπεροξειρεδοξίνη-2 (Prx-2) είναι η τρίτη πιο άφθονη κυτοσολική πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων, μετά από την αιμοσφαιρίνη και την καρβονική ανυδράση, με 15 εκατ. αντίγραφα ανά κύτταρο. Η πρωτεΐνη αυτή δημιουργεί ολιγομερή, κυρίως διμερή και δεκαμερή τα οποία υπό συνθήκες οξείδωσης αποσυντίθενται σε διμερή. Η Prx-2 είναι κυτοσολική αλλά προσδένεται στη μεμβράνη υπό φυσιολογικές συνθήκες σε ποσοστό της τάξης του 0,05% [63]. Ο λόγος πρόσδεσής της φαίνεται να είναι η ικανότητά της να ανάγει λιπιδικά υπεροξείδια προστατεύοντας την ερυθροκυτταρική μεμβράνη από το οξειδωτικό στρες [64] αλλά και η ικανότητά της ως μοριακή συνοδός να συνδέεται με την αιμοσφαιρίνη των ερυθροκυττάρων, υπό τη μορφή δεκαμερούς, και να την προστατεύει από την επαγόμενη από οξειδωτικό στρες αποδιάταξη και συσσωμάτωση [65]. Άλλοι ρόλοι που έχουν προταθεί ότι επιτελεί είναι η προστασία της ζώνης-3 από οξειδωτική βλάβη κατά την πρόσδεση στην αμινοτελική περιοχή της [66], η λειτουργία της ως μοριακή συνοδός βοηθώντας άλλες πρωτεΐνες να ανακτήσουν τη λειτουργική διαμόρφωσή τους αλλά και η επαγόμενη από ιόντα ασβεστίου πρόσδεση δομών υψηλού MB της πρωτεΐνης στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, για τη ρύθμιση της εκροής ιόντων K^+ μέσω των καναλιών Gardos [63].

Στο κυτοσόλιο των ερυθροκυττάρων η υπεροξειρεδοξίνη υπάρχει υπό τη μορφή ολιγομερών (160-450kDa) τα οποία δημιουργούνται από την ανηγμένη, μονομερή μορφή (21,8kDa) του μορίου και έχουν δραστικότητα υπεροξειδάσης και μοριακής συνοδού. Η πρωτεΐνη αυτή προστατεύει τις ερυθροκυτταρικές πρωτεΐνες από το οξειδωτικό στρες καθώς έλλειψή της οδηγεί σε οξείδωση καταλοίπων κυστεΐνης πολλών πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης [65, 67]. Όταν η Prx-2 αλληλεπιδρά με υπεροξείδια, οξειδώνεται και διμερίζεται με αποτέλεσμα τη δημιουργία δισουλφιδικού δεσμού, ο οποίος ανάγεται από τη θειορεδοξίνη για την επαναφορά του μορίου στην ενεργή, ανηγμένη κατάσταση. Η θειορεδοξίνη, στη συνέχεια επανέρχεται με τη δράση της αναγωγάσης της θειορεδοξίνης και τη συμμετοχή NADPH. Η Prx-2 είναι αποτελεσματικός αποικοδομητής των υπεροξειδίων υδρογόνου, όταν αυτά βρίσκονται σε χαμηλές σχετικά συγκεντρώσεις. Όμως σε υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίων του υδρογόνου, η Prx-2 οξειδώνεται και απαιτείται η δράση της καταλάσης ή/και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης για την εξουδετέρωσή τους. Επίσης, μετά από οξείδωση η Prx-2 εμφανίζει χαμηλό ρυθμό επανενεργοποίησης [68].

Ο προστατευτικός ρόλος αυτού του μορίου στα ερυθροκύτταρα επιβεβαιώνεται από ερυθροκύτταρα προερχόμενα από ποντίκια *knockout* για το γονίδιο της Prx-2, τα οποία παρουσιάζουν: 1) ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της Syk κινάσης, 2) αυξημένη πρόσδεση μορίων οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης και 3) αυξημένη κυστιδιοποίηση [69] (Εικ.10).

Hsp70

Οι οικογένεια των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Hsp - Heat Shock Proteins) περιλαμβάνει πρωτεΐνες 66-78kDa, κυτοσολικές κυρίως οι οποίες έχουν τη δράση

μοριακών συνοδών. Οι πρωτεΐνες Hsp70 των ώριμων ερυθροκυττάρων, υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται στο κυτοσόλιο, αλλά σε συνθήκες στρες φαίνεται να συμβάλλουν στην προστασία των κυττάρων σταθεροποιώντας τον υπομεμβρανικό σκελετό μέσω αλληλεπιδράσεων με τις σκελετικές πρωτεΐνες [70]. In vitro μελέτες έχουν δείξει αυξημένη πρόσδεση των Hsp's στη μεμβράνη των δρεπανοκυττάρων ως απόκριση στο αυξημένο οξειδωτικό στρες και στην υποξία [67].



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου της Prx-2 στη διατήρηση της πρωτεόστασης της κυτταρικής μεμβράνης έναντι του οξειδωτικού στρες. Σε ποντίκια φυσικού τύπου, το οξειδωτικό στρες επάγει τη μεταφορά των Hsp's και της Prx-2 στη μεμβράνη, οι οποίες εμποδίζουν τη δημιουργία βλαβών στη μεμβράνη και περιορίζουν την ενεργοποίηση των Syk κινασών που φωσφορυλιώνουν τη ζώνη-3. Στα ερυθροκύτταρα ποντικών knockout για το γονίδιο της Prx-2, η έλλειψη της Prx-2 επιφέρει συσσώρευση των Hsp's στη μεμβράνη σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Οι Hsp's αδυνατούν να αναστείλουν την οξείδωση και συσσωμάτωση των μορίων της ζώνης-3, η οποία ευνοείται με την ενεργοποίηση των Syk κινασών. Αυτό οδηγεί σε ταχεία απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη μέσω των μακροφάγων και αυξάνει την απελευθέρωση μικροκυστιδίων, τα οποία με αυτόν τον τρόπο απομακρύνουν την αιμοσφαιρίνη και άλλες πρωτεΐνες που έχουν υποστεί βλάβη (Ανατύπωση από [69]). Prx-2: υπεροξειρεδοξίνη-2, RBCs: ερυθροκύτταρα, P, φωσφορυλίωση της ζώνης-3; HCM: αιμοχρώματα, HSPs: πρωτεΐνες θερμικού σοκ, MPs: μικροκυστίδια.

Καλπαΐνη - καλπαστατίνη

Οι καλπαΐνες είναι ασβεστιο-εξαρτώμενες πρωτεάσες κυστεΐνης οι οποίες δρουν εκλεκτικά σε πρωτεΐνες, ως απόκριση μετά από ερέθισμα από ιόντα ασβεστίου. Τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα περιέχουν μόνο την καλπαΐνη-1 (ή μ-καλπαΐνη) της οποίας η δράση ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη-ενεργοποιητή και αναστολέα της καλπαΐνης-1, την καλπαστατίνη. Στα ερυθροκύτταρα, η καλπαΐνη-1 στοχεύει σε μεμβρανικές και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, προκαλώντας μερική πρωτεόλυση, μεταβάλλοντας έτσι τη λειτουργία τους ή την ενεργότητά τους όσον αφορά σε μεμβρανοσυνδεόμενα ένζυμα. Για παράδειγμα, η καλπαΐνη-1 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της αντλίας Ca²⁺-ATPάση μέσω απομάκρυνσης ενός πεπτιδίου 14kDa, ρυθμίζοντας έτσι την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων Ca²⁺ στο κύτταρο, ενώ έχει προταθεί και η συμμετοχή της στην ενεργοποίηση των καναλιών Gardos. Εκτός από το φορτίο του κυττάρου σε ιόντα Ca²⁺, το οξειδωτικό στρες έχει επίσης δειχθεί ότι ενεργοποιεί την καλπαΐνη-1 στα ερυθροκύτταρα [71].

Οι στόχοι των ενεργοποιημένων καλπαϊνών είναι κυρίως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες που συνδέονται έμμεσα με τη μεμβράνη όπως η PMCA, η σπεκτρίνη, οι αδουσίνες, η ζώνη-3, η πρωτεΐνη 4.1 και 4.2 αλλά και η ίδια η καλπαΐνη. Η αυτοπρωτεόλυση συμβαίνει σε συγκεντρώσεις ιόντων ασβεστίου πέρα των φυσιολογικών ορίων (50-150μΜ), ενώ έχει αναφερθεί και περιορισμένη διάσπαση α- και β- αλυσίδων αιμοσφαιρίνης. Μάλιστα, ποντίκια στα οποία δεν εκφράζεται το γονίδιο της μ-καλπαΐνης (*knock-out*) χαρακτηρίζονται από ερυθροκύτταρα με βελτιωμένη ικανότητα παραμόρφωσης [72].

Η καλπαστατίνη, ένας ενδογενής αναστολέας και ρυθμιστής της ενεργότητας της μκαλπαΐνης στα ερυθροκύτταρα. Η αλληλεπίδραση της καλπαστατίνης με την καλπαΐνη είναι επίσης ασβεστιο-εξαρτώμενη διαδικασία. Σε ερυθροκύτταρα ηλικιωμένων ανθρώπων έχουν βρεθεί μειωμένα επίπεδα καλπαστατίνης και αυξημένη δραστηριότητα της καλπαΐνης [72].

2.3 Σύμπλοκα ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

Δύο είναι τα κύρια μεμβρανικά σύμπλοκα που συμβάλλουν στην αγκυροβόληση του κυτταροσκελετού σπεκτρίνης-ακτίνης με τη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα: 1) το σύμπλοκο της ζώνης-3 (ή σύμπλοκο αγκυρίνης) στο οποίο συμμετέχουν τετραμερή της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης ζώνη-3, η γλυκοφορίνη Α, το σύμπλοκο πρωτεϊνών Rhesus, η CD47, η αγκυρίνη, η πρωτεΐνη 4.2 και ποικιλία γλυκολυτικών ενζύμων και 2) το σύμπλοκο ζεύξης στο οποίο συμμετέχουν διμερή της ζώνης-3, η γλυκοφορίνη C, οι πρωτεΐνες του συμπλόκου Rhesus, ο μεταφορέας Glut-1 καθώς και οι περιφερικές πρωτεΐνες ακτίνη, τροπομυοσίνη, αδουσίνη, δεματίνη, p55, πρωτεΐνη 4.1, πρωτεΐνη 4.2 και ποικιλία γλυκολυτικών ενζύμων [50].

Το σύμπλοκο της ζώνης-3 αποτελείται κυρίως από τετραμερή της ζώνης-3, της οποίας η κυτοσολική πλευρά συνδέεται στην πρωτεΐνη 4.2 και την αγκυρίνη, μέσω της οποίας αγκυροβολεί στον υπομεμβρανικό σκελετό της σπεκτρίνης. Η γλυκοφορίνη Α συμμετέχει στο σύμπλοκο αυτό υπό τη μορφή διμερών. Το σύμπλοκο Rhesus περιλαμβάνει τα πεπτίδια Rhesus, τις συνδεμένες με Rh γλυκοπρωτεΐνες (RhAG), το CD47, την LW γλυκοπρωτεΐνη και διμερή της γλυκοφορίνης B. Το μόριο CD47 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη 4.2 και τα πεπτίδια Rh για τη δημιουργία επαφής με την αγκυρίνη. Έτσι, το σύμπλοκο Rh και το σύμπλοκο της ζώνης-3 συνδέονται μεταξύ τους δημιουργώντας ένα μακροσύμπλοκο (Εικ.12).

Το σύμπλοκο ζεύξης αποτελείται από την πρωτεΐνη 4.1R η οποία αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή της β-σπεκτρίνης του τετραμερούς σπεκτρίνης με τη συμμετοχή κοντών νηματίων ακτίνης και άλλων πρωτεϊνών που συνδέονται με την ακτίνη, όπως δεματίνη, τροπομυσσίνη, β-αδουσίνη και τροπομοντουλίνη (Εικ.12). Απώλεια των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της διπλοστιβάδας και του κυτταροσκελετού έχει ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της μεμβράνης και την κυστιδιοποίηση [73].

Η δεματίνη και η αδουσίνη φαίνεται να παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του σχήματος των ερυθροκυττάρων και της σταθερότητας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, μέσω σύνδεσής τους με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη μεταφορέα Glut-1. Η δεματίνη και η αδουσίνη μπορούν να συνδεθούν ανεξάρτητα στον

μεταφορέα **Glut-1** δημιουργώντας ένα μακροσύμπλοκο το οποίο παρέχει έναν επιπλέον μηχανισμό κάθετων συνδέσεων μεταξύ του συμπλόκου σπεκτρίνης-ακτίνης και της πλασματικής μεμβράνης [32].



Εικόνα 12: Αναπαράσταση των συμπλόκων της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (Ανατύπωση από [50]).

2.4 Εξαγωνικό δίκτυο ερυθροκυτταρικού σκελετού

Στο υπομεμβρανικό σκελετικό δίκτυο οι πρωτεΐνες συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας κυρίως εξαγωνική διάταξη. Τα σύμπλοκα ζεύξης βρίσκονται στο κέντρο και στις έξι γωνίες του εξαγώνου και συνδέονται μεταξύ τους με νημάτια σπεκτρίνης τα οποία συνίστανται υπό τη μορφή τετραμερών. Τα σύμπλοκα ζεύξης μπορούν να διευθετούνται και υπό μορφή πεντάγωνου ή επτάγωνου αλλά εμφανίζονται με μικρότερη συχνότητα σε αυτές τις μορφές [74].

3. Μεταβολισμός ερυθροκυττάρων

Το 80-90% της γλυκόζης την οποία προσλαμβάνουν τα ερυθροκύτταρα με διευκολυνόμενη διάχυση, μετατρέπεται σε γαλακτικό μέσω του μονοπατιού της γλυκόλυσης, ενώ το υπόλοιπο 10% υφίσταται οξείδωση μέσω του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών. Από το γλυκολυτικό μονοπάτι δημιουργούνται τρία κύρια μόρια: το NADH ως συμπαράγοντας στην αντίδραση αναγωγής της μεθαιμοσφαιρίνης, το ATP ως φωσφορικό νουκλεοτίδιο υψηλής ενέργειας και το 2,3-διφωσφογλυκερινικό οξύ (2,3-DPG), που ρυθμίζει την συγγένεια του οξυγόνου με το μόριο της σφαιρίνης. Από το μονοπάτι της φωσφορικών πεντοζών κύριο προϊόν παραγωγής είναι το μόριο NADPH το οποίο λειτουργεί ως συμπαράγοντας κατά την αντίδραση αναγωγής της οξειδωμένης γλουταθειόνης. Ένα μεγάλο ποσοστό των μορίων ATP που παράγονται μέσω της γλυκόλυσης καταναλώνεται για τη λειτουργία των αντλιών νατρίου-καλίου που είναι απαραίτητη για διατήρηση της ιοντικής ισορροπίας του κυτταροπλάσματος εμποδίζοντας την οσμωτική λύση του κυττάρου [75]. Σε κατάσταση στρες τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούν 1,7 φορές περισσότερη γλυκόζη απ'ότι φυσιολογικά, ενώ η δραστηριότητα του κύκλου φωσφορικών πεντοζών αυξάνεται μέχρι και 20 φορές για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων NADPH [76].

> Γλυκόλυση

Η γλυκόλυση είναι μια διαδικασία κατά την οποία ένα μόριο γλυκόζης μετατρέπεται σε δύο μόρια πυροσταφυλικού με ταυτόχρονη δημιουργία δύο μορίων ATP και δύο μορίων NADH. Η ενέργεια που απελευθερώνεται αποθηκεύεται με τη μορφή μορίων ATP. Το ηλεκτρόνιο που απελευθερώνεται κατά τη μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης σε 1,3-διφωσφογλυκερινικό προσλαμβάνεται από το NAD⁺ για τη δημιουργία NADH. Η γλυκόλυση όμως δεν μπορεί να προχωρήσει χωρίς την παρουσία μορίων NAD⁺. Έτσι, η μετατροπή του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ από την γαλακτική αφυδρογονάση δημιουργεί νέα μόρια NAD⁺ με το γαλακτικό οξύ να αποτελεί το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης [77].

> Μονοπάτι Φωσφορικών Πεντοζών (ή Μονοφωσφορικής Εξόζης)

Τα ερυθροκύτταρα υφίστανται ισχυρό οξειδωτικό στρες είτε λόγω έκθεσής τους σε φάρμακα και άλλες χημικές ουσίες, είτε λόγω της μεταφοράς του οξυγόνου. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου που δημιουργούνται μπορούν να επηρεάσουν τη βιωσιμότητα και τη λειτουργικότητα του κυττάρου μέσω μετατροπής του δισθενούς σιδήρου αιμοσφαιρίνης σε τρισθενή, δημιουργώντας τη μεθαιμοσφαιρίνη. Επιπλέον, μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στα λιπίδια των μεμβρανών μειώνοντας τη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων. Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που αποικοδομεί τις ελεύθερες ρίζες μέσω οξείδωσής της και η αναγωγάση της γλουταθειόνης επαναφέρει τη γλουταθειόνη στην ανηγμένη μορφή της με τη χρήση του NADPH ως δότη ηλεκτρονίων. Η μοναδική μη-μιτοχονδριακή πηγή παραγωγής NADPH είναι το μονοπάτι φωσφορικής πεντόζης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το 10% της γλυκόζης μεταβολιζεται μέσω του μονοπατιού της φωσφορικής πεντόζης. Όταν το ερυθροκύτταρο έρχεται αντιμέτωπο με υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες, περίπου το 90% του συνόλου της γλυκόζης μεταβολίζεται μέσω αυτού του μονοπατιού. Το κυριότερο ένζυμο που αποτελεί και τον βασικό περιοριστικό παράγοντα σε αυτή τη διαδικασία είναι η αφυδρογονάση της 6φωσφορικής γλυκόζης (glucose 6-phosphate dehydrogenase, G6PD). Η έλλειψη αυτού του ενζύμου αποτελεί τη συχνότερη ενζυμοπάθεια και προκαλεί αιμολυτική αναιμία. Έτσι, το μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης είναι κρίσιμης σημασίας για την επιβίωση των ερυθροκυττάρων [77].

Κύκλος Rappaport-Luebering

Το 2,3-διφωσφογλυκερινικό οξύ (2,3-BPG or 2,3-DPG) και τα ιόντα H⁺ μειώνουν τη συγγένεια του οξυγόνου με την αιμοσφαιρίνη, ευνοώντας την απόδοση του οξυγόνου στους ιστούς. Το **Rappaport-Luebering** γλυκολυτικό μονοπάτι συνθέτει 2,3-DPG από μόριο 1,3-DPG. Το μονοπάτι αυτό αποτελεί μια παράκαμψη του μονοπατιού της γλυκόλυσης, παρακάμπτοντας ταυτόχρονα και την παραγωγή ενός μορίου ATP.

Η ζώνη-3 είναι μια πρωτεΐνη η οποία παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στον μεταβολισμό των ερυθροκυττάρων καθώς στο αμινοτελικό άκρο της υπάρχει

ανταγωνιστική σύνδεση μεταξύ του γλυκολυτικού ενζύμου αλδολάση και της δεοξυαιμοσφαιρίνης (μη οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη). Πιο συγκεκριμένα, έχει προταθεί ένας μηχανισμός μεταβολικής ρύθμισης που εξαρτάται από την αποξυγόνωση της αιμοσφαιρίνης. Η δεοξυαιμοσφαιρίνη προσδένεται στην αμινοτελική περιοχή της ζώνης-3 σε ανταγωνισμό με τρία μέλη του μονοπατιού της γλυκόλυσης: αδολάση, G3PD (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης, GAPDH) και φωσφοφρουκτοκινάση (Εικ.13). Όταν το κύτταρο είναι οξυγονωμένο, τα τρία ένζυμα προσδένονται στη ζώνη-3 και απενεργοποιούνται. Όταν το κύτταρο είναι μη οξυγονωμένο, η δεοξυαιμοσφαιρίνη απομακρύνει τα ένζυμα και ο ρυθμός γλυκόλυσης επανέρχεται. Μάλιστα, έχει προταθεί πως όταν τα ένζυμα είναι απενεργοποιημένα, η γλυκόζη γρησιμοποιείται στο μονοπάτι φωσφορικής πεντόζης για την αναγέννηση της ανηγμένης γλουταθειόνης [8, 9]. Έτσι, τα ένζυμα της γλυκόλυσης που προσδένονται στο αμινοτελικό άκρο της ζώνης-3 φαίνεται να συμμετέχουν σε ένα μηχανισμό ρύθμισης του ρυθμού γλυκόλυσης. Επιπλέον, η αποξυγόνωση των ερυθροκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της αγκυρίνης από τη ζώνη-3 και την απελευθέρωση του κυτταροσκελετού από τη μεμβράνη. Η ασθενής αλληλεπίδραση κυτταροσκελετού-μεμβράνης για σύντομες περιόδους μπορεί να αποδειχθεί ευεργετική για τη ροή του αίματος, αλλά σε περιόδους μεγάλων περιόδων αποξυγόνωσης, μπορεί να προωθήσει την κυστιδιοποίηση της μεμβράνης [78].



Εικόνα 13: Αναδιαμόρφωση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη ανάλογα τα επίπεδα οξυγόνωσης των ερυθροκυττάρων. Η γλυκόλυση, η μεταφορά κατιόντων, η απελευθέρωση μορίων ATP και η πρόσδεση της αγκυρίνης στη μεμβράνη αποτελούν οξυγονο-εξαρτώμενες διαδικασίες στα ερυθροκύτταρα. Επειδή η κυτταροπλασματική περιοχή της ζώνης-3 (cdb3) αποτελεί το μοναδικό γνωστό σημείο πρόσδεσης της Hb στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και επειδή η πρόσδεση της Hb είναι μια απόλυτα οξυγονο-εξαρτώμενη διαδικασία, πολλά- αν όχι όλα- οξυγονο-εξαρτώμενα μονοπάτια στα ερυθροκύτταρα θεωρείται ότι εξαρτώνται από την αναστρέψιμη πρόσδεση της δεοξυαιμοσφαιρίνης στην cdb3 περιοχή. Η πρόσδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση πολλών cdb3-συνδεόμενων πρωτεϊνών (π.χ. γλυκολυτικά ένζυμα, αγκυρίνη) (Ανατύπωση από [79]).

GAPDH - G3PD

Η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης (GAPDH, G3PD) είναι μια υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη 140-150kDa, που αποτελείται από τέσσερις όμοιες υπομονάδες των 35-37kDa και έχει βασικό ρόλο στο μονοπάτι της γλυκόλυσης,

καταλύοντας την οξειδωτική φωσφορυλίωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης παρουσία μορίων NAPD και ανόργανων φωσφορικών (Εικ.13).

4. Γήρανση

Η γήρανση των ερυθροκυττάρων χαρακτηρίζεται από συσσώρευση δομικών, μεταβολικών και λειτουργικών τροποποιήσεων. Ο φαινότυπος των γηρασμένων ερυθροκυττάρων, δηλαδή το σύνολο των ηλικιο-εξαρτώμενων αλλαγών, έχει συσχετισθεί με μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας, σταδιακή απώλεια του φυσιολογικού κυτταρικού σχήματος, αναδιαμόρφωση της μεμβράνης, κυστιδιοποίηση, οξειδωτικές βλάβες και έκθεση δεικτών απομάκρυνσης από την κυκλοφορία, στην επιφάνεια του κυττάρου [80]. Ισχυρά σήματα απομάκρυνσης από την κυκλοφορία αποτελούν η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης και η πρόσδεση αυτόλογων ανοσοσφαιρινών G στα νεο-αντιγόνα γήρανσης που δημιουργούνται λόγω δομικών αλλαγών της ζώνης-3 [81].

Η κυτταρική γήρανση είναι μια διαδικασία η οποία σχετίζεται με αλλαγές στην ισορροπία μεταξύ της παραγωγής οξειδωτικών ουσιών και της απομάκρυνσής τους από τα ενζυμικά και μη ενζυμικά συστατικά του κυττάρου στα οποία ανήκουν και τα μόρια GSH, NADH, NADPH και ασκορβικό οξύ. Η σταδιακή συσσώρευση των μη-αναστρέψιμα οξειδωμένων και αποδιαταγμένων πρωτεϊνών, και ιδιαίτερα της αιμοσφαιρίνης, επιδεινώνεται κατά τη γήρανση των ερυθροκυττάρων [61] στα οποία η *de novo* σύνθεση πρωτεϊνών και λιπιδίων δεν είναι πλέον ενεργή. Οι αλλαγές στη δραστικότητα των ενζύμων και στη λιπιδική σύσταση της μεμβράνης και η αναδιάρθρωση πολλών πρωτεϊνών συμβαίνουν σταδιακά στη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων και προκαλούνται κυρίως από την επίδραση οξειδωτικού στρες.

Η μεταφορά μορίων γλυκόζης κατά μήκος της μεμβράνης μειώνεται επίσης κατά τη γήρανση καθώς τα νεαρά ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούν 2,5 φορές μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης σε σχέση με τα γηρασμένα. Τα ενδοκυττάρια επίπεδα ΑΤΡ πέφτουν περίπου 30-40% ακολουθώντας τους μειωμένους ρυθμούς γλυκόλυσης και συμβάλλοντας στη μειωμένη παραγωγή ανηγμένης γλουταθειόνης [82].

Η διαδικασία της γήρανσης, ακόμη, σχετίζεται με τη συμμετοχή γεγονότων παρόμοιων με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των εμπύρηνων κυττάρων, τα οποία επάγονται με την εισροή ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου και παρεμποδίζονται με αναστολείς καλπαϊνών και κασπασών. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και -8 θεωρούνται σημάδια κυτταρικής γήρανσης, καθώς έχει βρεθεί ενεργοποίηση κασπασών *in vivo* σε γηρασμένα ερυθροκύτταρα περιφερικής κυκλοφορίας [83].

Χαρακτηριστικοί δείκτες γήρανσης των ερυθροκυττάρων θεωρούνται η μη ενζυμική γλυκοζυλίωση της αιμοσφαιρίνης, η συγκρότηση συμπλόκου σπεκτρίνης-αιμοσφαιρίνης και η απαμιδίωση της πρωτεΐνης 4.1b σε 4.1a. Η αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας χρησιμοποιήθηκε για χρόνια ως κριτήριο χαρακτηρισμού και απομόνωσης γηρασμένων ερυθροκυττάρων και παρότι συνεχίζεται μέχρι σήμερα έχει πλέον τεθεί σε ισχυρή αμφισβήτηση.

4.1 Κυστιδιοποίηση

Τα μικροκυστίδια (MVs, microvesicles) αποτελούν έναν ετερογενή πληθυσμό από κυστίδια, με μέγεθος που ποικίλει από 100 έως 1000nm. Διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους όσον αφορά στην περιεκτικότητά τους σε φωσφολιπίδια, αντιγόνα επιφανείας και
στην πρωτεϊνική τους σύσταση, αλλά διατηρούν τα αντιγονικά χαρακτηριστικά των κυττάρων από τα οποία προέρχονται με αποτέλεσμα να μπορεί να ταυτοποιηθεί η κυτταρική προέλευσή τους. Τα MVs διαχωρίζονται από τα εξωσώματα τα οποία είναι κυστίδια μεγέθους 40-100nm που δημιουργούνται από εξωκύτωση ενδοσωμάτων, τα οποία προέρχονται από τα πολυκυστιδιακά σωμάτια έχοντας τους αντίστοιχους δείκτες. Σε αντίθεση με τα εξωσώματα, τα MVs δημιουργούνται κυρίως από τη φυσαλιδοποίηση και την αποκοπή τμημάτων της εξωτερικής μεμβράνης. Η απελευθέρωση κυστιδίων από τη μεμβράνη είναι μια απόλυτα ελεγχόμενη διαδικασία η οποία πυροδοτείται από πολλά, διαφορετικά ερεθίσματα όπως αποπτωτικά σήματα, μηχανικό στρες, οξειδωτικό στρες και κυτταρικές βλάβες γενικότερα (Εικ.14). Αποτελούν βασικούς μεσολαβητές της διακυτταρικής επικοινωνίας η οποία είναι απαραίτητη σε κυτταρικές διαδικασίες όπως οι ανοσολογικές αντιδράσεις, η πήξη και η φλεγμονή. Η εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, ο ιστικός παράγοντας (tissue factor) και τα μόρια προσκόλλησης είναι κάποια από τα χαρακτηριστικά μόρια που απαντώνται στα κυστίδια μέσω των οποίων ενεργοποιούν αντιδράσεις πήξης [84].







ασυμμετρία της διπλοστιβάδας. Οι φλοππάσες και οι σκραμπλάσες είναι ανενεργές και η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του ασβεστίου χαμηλή. (B) Ύστερα από ενεργοποίηση, η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του ασβεστίου αυξάνεται, οι φλιππάσες απενεργοποιούνται, ενώ οι σκραμπλάσες ενεργοποιούνται. φλοππάσες φλοππάσες και Οı εξωτερικεύουν τη φωσφατιδυλοσερίνη, που αποτελεί ένα αρνητικά φορτισμένο φωσφολιπίδιο, και οι σκραμπλάσες μεταφέρουν τα φωσφολιπίδια μη ειδικά κατά μήκος της μεμβράνης, με αποτέλεσμα την απώλεια της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας. (Γ) Η αυξημένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου ενεργοποιεί επίσης και πρωτεάσες που διασπούν πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, η μεμβράνη γίνεται λιγότερο εύκαμπτη και φυσαλιδοποιείται, δημιουργώντας και απελευθερώνοντας κυστίδια (Ανατύπωση από [85]).

Τα κύρια χαρακτηριστικά των MVs που προέρχονται από ερυθροκύτταρα είναι παρόμοια με αυτά των υπολοίπων MVs. Όπως και για τα υπόλοιπα κυστίδια, ο ρόλος τους δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Παρόλα αυτά, μέσω απελευθέρωσης κυστιδίων τα ερυθροκύτταρα φαίνεται να μπορούν να απομακρύνουν βλαβερά και μη λειτουργικά μόρια, εμποδίζοντας την πρόωρη απομάκρυνση ολόκληρου του ερυθροκυττάρου και βοηθώντας στην επιβίωσή του στην κυκλοφορία [85].

Η κυστιδιοποίηση της μεμβράνης αποτελεί επίσης μέρος της ωρίμανσης των ερυθροκυττάρων, καθώς αντιπροσωπεύει μια καλά ρυθμιζόμενη διαδικασία η οποία συμβαίνει σε όλη τη διάρκεια της ζωής του κυττάρου αλλά επιταχύνεται στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα. Συγκεκριμένα, κατά τη γήρανση των ερυθροκυττάρων έχει παρατηρηθεί μείωση του όγκου, αύξηση στην πυκνότητα του κυττάρου και μείωση στην ποσότητα της αιμοσφαιρίνης, ιδιαίτερα στο δεύτερο μισό της διάρκειας ζωής των κυττάρων. Αυτές οι αλλαγές σχετίζονται με απώλεια της επιφάνειας του κυττάρου κατά 20% και εμπλουτισμό των κυστιδίων σε αιμοσφαιρίνη. Παρότι η μεμβρανική κυστιδιοποίηση ζημιώνει το κύτταρο, διαμέσου της μη αναστρέψιμης απώλειας μεμβράνης και αιμοσφαιρίνης, φαίνεται πως ταυτόχρονα είναι το μέσο με το οποίο τα ερυθροκύτταρα απομακρύνουν βλαβερά συστατικά όπως η αποδιαταγμένη αιμοσφαιρίνη, συστατικά του συμπληρώματος, νεοαντιγόνα της ζώνης-3 και ανοσοσφαιρίνες G, καθώς και πολλά άλλα συστατικά τα οποία συσσωρεύονται σταδιακά. Ταυτόχρονα, η απομάκρυνση των κυστιδίων μπορεί να προωθήσει και την απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων. Για παράδειγμα, μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης «δείκτη-εαυτού» CD47 στα κύτταρα λόγω κυστιδιοποίησης, επάγει την αναγνώριση αυτών των ερυθροκυττάρων από τα μακροφάγα και την φαγοκυττάρωσή τους [80, 85].

Οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί για τη βιογένεση των κυστιδίων στα ερυθροκύτταρα περιλαμβάνουν το μοντέλο της ερυθρόπτωσης και τη συσσωμάτωση της ζώνης-3. Στο πρώτο μοντέλο συμμετέχουν τα ιόντα ασβεστίου τα οποία ενεργοποιούν πρωτεΐνες όπως η καλπαΐνη και η σκραμπλάση. Στο δεύτερο συμμετέχει το οξειδωτικό στρες όπου η οξειδωμένη αιμοσφαιρίνη οδηγεί σε συσσωμάτωση της ζώνης-3 και πρόσδεση IgGs, ενώ και τα δύο αυτά μοντέλα έχουν ως αποτέλεσμα την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης.

Μελέτες της πρωτεϊνικής σύστασης των κυστιδίων έχουν αποκαλύψει την παρουσία IgG's στην επιφάνειά τους, προϊόντων αποικοδόμησης της ζώνης-3 και έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης ενώ περιέχουν και γλυκοζυλιωμένη ή/και καρβαμυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (χαρακτηριστική των γηρασμένων ερυθροκυττάρων) [81]. Επιπλέον, έχουν μικρό αριθμό σκελετικών πρωτεϊνών, με την αγκυρίνη και τη σπεκτρίνη να απουσιάζουν πλήρως και την ακτίνη να αποτελεί την κυρίαρχη κυτταροσκελετική πρωτεΐνη. Όσον αφορά στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι μόνες που έχουν ανιχνευθεί είναι η ζώνη-3, σε συγκεντρώσεις μικρότερες από τις αντίστοιχες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, και ο μεταφορέας γλυκόζης Glut-1, ενώ έχουν βρεθεί οι S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, θειορεδοξίνη, υπεροξειρεδοξίνη-1 και -2 σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από αυτές των ερυθροκυττάρων. Η μείωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα σε συνδυασμό με τον εμπλουτισμό των κυστιδίων σε υπεροξειρεδοξίνη και θειορεδοξίνη υποδηλώνουν ότι οι οξειδωμένες πρωτεΐνες ενσωματώνονται εκλεκτικά στα κυστίδια. Όμως, η αδυναμία εύρεσης οξειδωμένων πρωτεϊνών σε αυτά, οδηγεί στο συμπέρασμα πως η οξείδωση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών πιθανά έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της σύνδεσης του κυτταροσκελετού στη μεμβράνη ή/και την αποικοδόμησή τους σε μικρά, διαλυτά πεπτίδια. Επομένως, η μείωση των αλληλεπιδράσεων του κυτταροσκελετού με τη μεμβράνη φαίνεται να είναι κύριο γεγονός της γήρανσης των ερυθροκυττάρων [86].

4.1.1 Κλαστερίνη (sCLU, secretory clusterin)

Η κλαστερίνη είναι μια ετεροδιμερής γλυκοπρωτεΐνη ~75-80kDa, η οποία κατανέμεται και στο κυτοσόλιο αλλά κυρίως στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων (τόσο ενδοκυττάρια όσο και εξωκυττάρια), ενώ αποτελεί και συστατικό του πλάσματος. Η περιεκτικότητά της στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη εξαρτάται από την έκφραση δεικτών γήρανσης, ερυθροφαγοκυττάρωσης και οξειδωτικού στρες και έχει βασικό ρόλο στην κυστιδιοποίηση της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων λόγω γήρανσης.



Εικόνα 15: Προτεινόμενο μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η sCLU (secretory clusterin) εμπλέκεται στην ακεραιότητα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, στην κυτταρική γήρανση και στην κυστιδιοποίηση (Ανατύπωση από [87]).

Η κλαστερίνη απομακρύνεται από τα ώριμα ερυθροκύτταρα με επιλεκτική διαλογή και εξωκυττάρωση μέσω της διαδικασίας κυστιδιοποίησης. Εκτός από τη λειτουργία της ως πρωτεΐνη μοριακή-συνοδός που συμβάλλει στο σωστό δίπλωμα ή στην απομάκρυνση των μη λειτουργικών πρωτεϊνών, η κλαστερίνη συμμετέχει και στην απομάκρυνση μέσω κυστιδιοποίησης των μορίων που έχουν υποστεί βλάβες στα γηρασμένα και στρεσαρισμένα ερυθροκύτταρα. Επομένως, αποτελεί μοριακό βιοδείκτη της κυτταρικής γήρανσης και του οξειδωτικού στρες αλλά και έναν παράγοντα επιβίωσης καθώς συμβάλλει στην παροδική αναστολή ή καθυστέρηση της πρόωρης απομάκρυνσης από την κυκλοφορία των, κατά τα άλλα, λειτουργικών ερυθροκυττάρων. Συγκεκριμένα, προερχόμενη είτε από το κυτοσόλιο, είτε από το πλάσμα, η κλαστερίνη προσδένεται στη ζώνη-3, στο CD59, στην αιμοσφαιρίνη και σε μια σειρά οξειδωμένων και καρβονυλιωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών για την απομάκρυνση συστατικών που έχουν υποστεί βλάβη [87, 88] (Εικ.15).

Τέλος, η κλαστερίνη του πλάσματος δημιουργεί σύμπλοκα με λιπίδια ενώ συμμετέχει και στον έλεγχο της λυτικής δράσης του συμπληρώματος (C5b-9) καθώς το καθιστά ανενεργό. Και οι δύο υπομονάδες της πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν με το συστατικό C9 και μπορούν να αναστείλουν τη μεσολαβούμενη από C5b-9 αιμόλυση [89].

4.1.2 Κυστιδιοποίηση και παθολογικές καταστάσεις

Παρά τον προστατευτικό εν μέρει ρόλο που έχουν τα μικροκυστίδια στα κύτταρα, στον οργανισμό μπορούν να συμβάλλουν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις πυροδοτώντας καταστάσεις φλεγμονής. Για παράδειγμα, εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητας σε αιμοσφαιρίνη στο εσωτερικό τους, συμβάλλουν στη μείωση της διαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου, ενώ λόγω της παρουσίας PS στην επιφάνειά τους, η οποία δρα καταλυτικά στη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη, παρουσιάζουν αυξημένη θρομβωτική ικανότητα. Επιπλέον, δεδομένου ότι τα κυριότερα συστατικά των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών είναι τα φωσφολιπίδια και η χοληστερόλη, τα μικροκυστίδια που προέρχονται από αυτά είναι πλούσια σε χοληστερόλη, λιπιδικές σχεδίες, μεμβρανικές πρωτεΐνες και αιμοπρωτεΐνες. Έτσι, η χοληστερόλη μπορεί να επάγει φλεγμονώδεις αντιδράσεις ενώ ο σίδηρος μπορεί να δράσει σαν καταλύτης για την παραγωγή ROS που προκαλούν βλάβες στους ιστούς και ενεργοποιούν φλεγμονώδεις αντιδράσεις [85].

Όσον αφορά στα μικροκυστίδια του αίματος γενικότερα, αυτά μπορούν να προκαλέσουν απευθείας βλάβες στο ενδοθήλιο. In vitro πειράματα έχουν δείξει ότι τα μικροκυστίδια που προέρχονται από το ενδοθήλιο μπορούν να ρυθμίζουν την αγγειακή πίεση μεταβάλοντας την παραγωγή μονοξείδιου του αζώτου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αντίστοιγα, τα λευκοκυτταρικά μικροκυστίδια διεγείρουν την απελευθέρωση κυτταροκινών από τα ενδοθηλιακά μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών, οδηγώντας πιθανά σε αυξημένη φλεγμονώδη και θρομβωτική δραστηριότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα αιμοπεταλιακά κυστίδια επάγουν την παραγωγή κυτταροκινών και την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα in vitro, ενώ μέσω μεταφοράς αραχιδονικού οξέος στα ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλούν υπερενεργοποίηση των μορίων προσκόλλησης και επακόλουθη προσκόλληση των μονοκυττάρων. Τα αιμοπεταλιακά κυστίδια μπορούν επίσης να προωθήσουν τη συσσωμάτωση των λευκοκυττάρων. Όμως, παρά τις βλαβερές επιδράσεις των μικροκυστιδίων στη λειτουργία του ενδοθηλίου in vitro, δεν υπάρχουν αναμφισβήτητες αποδείξεις ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου in vivo [90].

4.2 Μονοπάτι γήρανσης λόγω μετατροπών της ζώνης-3

Ένα κύριο μονοπάτι, στο οποίο εμπλέκονται ανοσολογικοί μηχανισμοί απομάκρυνσης των ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία είναι αυτό το οποίο περιλαμβάνει αλλαγές στην κύρια διαμεμβρανική πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων, τη ζώνη-3.



Εικόνα 16: Προτεινόμενος μηχανισμός συσσωμάτωσης ζώνης-3 στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα. Η υπεροξείδωση της μεμβράνης προκαλεί αποσύνδεση της αγκυρίνης από τη ζώνη-3 η οποία σε

συνδυασμό με την πρόσδεση της μεθαιμοσφαιρίνης, που οδηγεί πιθανά σε καρβονυλίωση της ζώνης-3, ενισχύει την αποσύνδεση και προκαλεί συσσωμάτωση της ζώνης-3 (Ανατύπωση από [91]).

Τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες, φαίνεται να σχετίζονται με διάσπαση της ζώνης-3 ή συσσωμάτωσή της (από μόρια που δε συμμετέχουν στο ίδιο διμερές) καθώς και με αυξημένα επίπεδα πρόσδεσης της οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης στη μεμβράνη (μέσω της ζώνης-3). Η συσσώρευση της μεμβρανο-συνδεόμενης οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης θεωρείται ένα από τα κύρια ερεθίσματα που πυροδοτούν τη συσσωμάτωση της ζώνης-3. Επιπλέον, η υπεροξείδωση της μεμβράνης προκαλεί αποσύνδεση της αγκυρίνης η οποία, σε συνδυασμό με την πρόσδεση της μεθαιμοσφαιρίνης που ενισχύει την αποσύνδεση, προκαλεί παραιτέρω συσσωμάτωση της ζώνης-3 (Εικ. 16). Οι αλλαγές αυτές μαζί με αλλαγές στην κατάσταση φωσφορυλίωσης της ζώνης-3, οδηγούν στη δημιουργία του "νεοαντιγόνου γήρανσης" στην επιφάνεια του ερυθροκυττάρου που οδηγεί στην πρόσδεση αυτόλογων ανοσοφαιρινών-G (IgGs) και συστατικών C3 του εναλλακτικού μονοπατιού του συμπληρώματος στη μεμβράνη, οδηγώντας στην ερυθροφαγοκυττάρωση [80] (Εικ.17). Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της ζώνης-3, μειώνει σημαντικά τη συγγένειά της προς την αγκυρίνη, δημιουργεί αποσταθεροποιήση του κυτταροσκελετού, αυξάνει την οριζόντια κινητικότητα της πρωτεΐνης και επάγει την κυστιδιοποίηση [12].



ζώνη-3 Εικόνα 17: Η υπάρχει κυρίως υπό διμερή/τετραμερή συνδεόμενη μορφή, με τον υπομεμβρανικό σκελετό, εμποδίζοντας την πρόσδεση των φυσικών αυτοαντισωμάτων (NAbs). Αποσύνδεση της ζώνης-3 από τον κυτταροσκελετό έχει ως αποτέλεσμα δημιουργία ολιγομερών, τη διευκολύνοντας την πρόσδεση των NAbs (Ανατύπωση από [92]).

4.3 Ομοιόσταση ενδοκυττάριων ιόντων Ca²⁺

Οι αλλαγές στην ομοιόσταση του ασβεστίου φαίνεται να είναι μέρος κάποιου μηχανισμού που σχετίζεται με τη γήρανση, είτε σαν παράγοντας που την πυροδοτεί είτε σαν αποτέλεσμα αυτής. Η εισροή ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου σχετίζεται με οξειδωτική βλάβη, κυστιδιοποίηση, αφυδάτωση (ενεργοποίηση καναλιών Gardos) και μείωση της ικανότητας παραμόρφωσης. Το σύνολο των μονοπατιών τα οποία σχετίζονται με την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου ως απόκριση σε διάφορα είδη στρες ονομάζεται **ερυθρόπτωση** (βλ. Κεφ.5) [80].

Εκτός από τα αυξημένα επίπεδα στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα, τα ιόντα ασβεστίου φαίνεται να συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες κατά τη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων. Συγκεκριμένα, διαφορετικές συγκεντρώσεις ενδοκυττάριων επιπέδων ιόντων ασβεστίου ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων ερυθροειδικών κυττάρων, τη ρεολογία των ερυθροκυττάρων και τη συμμετοχή τους στη δημιουργία θρόμβου κατά το μηχανισμό πήξης. Επομένως, είναι απαραίτητη η διατήρηση των ιόντων Ca²⁺ σε κατάλληλα επίπεδα, η οποία επιτυγχάνεται με τη δράση της αντλίας

PMCA, είτε με τη συμβολή πρωτεϊνών που συνδέονται με τα ιόντα και δρουν σαν "αποθήκες" αυτών (π.χ. καλμοντουλίνη) (Εικ.18).



Εικόνα 18: Μετά από την επίδραση ερεθισμάτων (οξειδωτικό, μεταβολικό ή οσμωτικό στρες) τα οποία οδηγούν στην αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου (Ca^{2+}), παρατηρείται διέγερση της σκραμπλάσης και της φλοππάσης και αναστολή της φλιππάσης (A). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επερχόμενη αλλαγή στη φωσφολιπιδική ασυμμετρία της συγκρότηση μεμβράνης, τη και στρατολόγηση συγκεκριμένων συστατικών στις λιπιδικές σχεδίες, την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης τελικά και την κυστιδίων απελευθέρωση **(B)**. (Ανατύπωση από [93]).

4.4 Οξειδωτικό στρες κατά τη γήρανση

Εκτός από την επίδραση που έχει στη δημιουργία του νεοαντιγόνου της ζώνης-3 και στην ενεργοποίηση προαποπτωτικών συστατικών, το οξειδωτικό στρες επηρεάζει την αιμοσφαιρίνη (Hb) και τις αλληλεπιδράσεις της με μεμβρανικά συστατικά.

Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις της αιμοσφαιρίνης σχετίζονται με την ενδογενή αυτο-οξείδωση της οξυαιμοσφαιρίνης αλλά και με την είσοδο στο ερυθροκύτταρο εξωγενών ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου. Αυτές οι αντιδράσεις είναι μια επιπλέον πηγή παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS). Η συνεχής παραγωγή οξειδωτικού στρες στα ερυθροκύτταρα, τα οποία δεν μπορούν να συνθέσουν νέες πρωτεΐνες, προκαλεί βλάβες στο μεταβολισμό τους, με αποτέλεσμα την αδυναμία εξουδετέρωσης των τοξικών ριζών και αναγωγής της αιμοσφαιρίνης, την πρόσδεση της αιμοσφαιρίνης στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και τελικά την απομάκρυνση των κυττάρων από την κυκλοφορία [61].

Εκτός από την οξείδωση της Hb και την πρόσδεσή της στη ζώνη-3, το μη αναστρέψιμο σύμπλεγμα της Hb με τη σπεκτρίνη είναι ένας ακόμη δείκτης της γήρανσης των ερυθροκυττάρων. Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου, έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της αυτοσυγκρότησης των διμερών σπεκτρίνης σε τετραμερή και πιθανά τη χαλάρωση των συνδέσεων της ζώνης-3 με τη σπεκτρίνη με αποτέλεσμα την αύξηση της οριζόντιας μεταφοράς της ζώνης-3 στη μεμβράνη και τη διευκόλυνση της δημιουργίας των νέο-αντιγόνων γήρανσης μέσω συσσωμάτωσης των μορίων της [80, 94].

Επιπλέον, ενώ η συρρίκνωση του ερυθροκυττάρου και η κυστιδιοποίηση επάγονται από πολλούς παράγοντες, κάποιοι από τους οποίους είναι ανεξάρτητοι από τα επίπεδα οξειδωτικού στρες, η συρρίκνωση η οποία σχετίζεται με την εκροή ιόντων καλίου από τα κανάλια Gardos, πυροδοτείται από το οξειδωτικό στρες. Αυτή η διαδικασία ξεκινά από οξειδωτικές βλάβες στην αντλία Ca²⁺-ATPάση, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των καναλιών Gardos και την έξοδο ιόντων καλίου που προκαλεί κυτταρική συρρίκνωση και μειωμένη ικανότητα παραμόρφωσης.

Τέλος, ένας επιπλέον μηχανισμός επίδρασης του οξειδωτικού στρες στη γήρανση είναι μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-3 η οποία οδηγεί σε πρωτεόλυση της ζώνης-3, απώλεια της σύνδεσης με τον υπομεμβρανικό σκελετό, εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και κυστιδιοποίηση.

4.5 Ενεργοποίηση κασπασών

Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες κυστεΐνης που κόβουν μετά από κατάλοιπα ασπαρτικού και υπάρχουν με τη μορφή προενζύμων, τα οποία όταν ενεργοποιηθούν από αποπτωτικά σήματα προάγουν την απόπτωση μέσω στοχευμένης πρωτεόλυσης των υποστρωμάτων τους. Η κασπάση-3 συντίθενται ως προένζυμο 32kDa και μετατρέπεται σε ώριμο μόριο μετά από πρωτεόλυση στα κατάλοιπα Asp9, Asp28 και Asp175, δημιουργώντας την ενεργή μορφή των 20kDa και μια υπομονάδα 12kDa [95].

Η προκασπάση-3 είναι παρούσα στα ώριμα ερυθροκύτταρα, ενώ in vitro συνθήκες ενεργοποιείται σε οξειδωτικού στρες οδηγώντας σε βλάβη της τρανσλοκάσης (φλιππάση), εξωτερίκευση αμινοφωσφολιπιδικής της PS και ερυθροφαγοκυττάρωση [96]. Τα αποπτωτικά μονοπάτια που οδηγούν στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 είναι το εξωγενές και το ενδογενές που βασίζεται στη συμμετοχή του μιτογονδρίου. Καθώς τα ερυθροκύτταρα στερούνται μιτογονδρίων, το μοναδικό μονοπάτι που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 είναι το εξωγενές. Έτσι, η πρόσδεση του FasL στο Fas προκαλεί την πρόσδεση του μορίου FADD, στο οποίο συνδέεται η προκασπάση-8 και ενεργοποιεί την προκασπάση-3 σε κασπάση-3.

Τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα καθώς και τα ερυθροκύτταρα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες *in vitro* εμφανίζουν αποπτωτικά σήματα όπως μεταφορά του Fas στις λιπιδικές σχεδίες και συμμετοχή του στη δημιουργία συμπλέγματος κατάλληλου για την ενεργοποίηση των κασπασών-8 και -3. Αυτά τα γεγονότα εξαρτώνται από την παρουσία των ROS. Η απενεργοποίηση της αμινοφωσφολιπιδικής τρανσλοκάσης από την κασπάση-3 είναι αποτέλεσμα είτε άμεσης πρωτεόλυσης είτε έμμεσης επίδρασης στους ενδιάμεσους ρυθμιστές της [97].

Ακόμη, η ενεργή κασπάση-3 καταλύει άμεσα την πρωτεόλυση του αμινοτελικού άκρου της ζώνης-3, με αποτέλεσμα πιθανά την απώλεια της ακεραιότητας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης που είναι χαρακτηριστικό της γήρανσης των ερυθροκυττάρων [98].

4.6 Γήρανση και CD47

Το CD47 είναι ένα άλλο μόριο το οποίο θεωρείται ότι εμπλέκεται στην αναγνώριση των γηρασμένων ερυθροκυττάρων από τα μακροφάγα. Παρότι για πολλά χρόνια θεωρούταν «δείκτης-εαυτού» για τα ερυθροκύτταρα ("non-eat me signal"), τα τελευταία χρόνια θεωρείται ότι το μόριο αυτό μπορεί να δώσει σήμα και για τη φαγοκυττάρωση των ερυθροκυττάρων ("eat me signal"). Πειράματα που έχουν γίνει σε γηρασμένα ερυθροκύτταρα (ύστερα από δημιουργία γηρασμένου φαινότυπου *in vitro* με επίδραση οξειδωτικών) έδειξαν ταχεία φαγοκυττάρωση ως αποτέλεσμα της σύνδεσης CD47-SIRPa, με τη συμμετοχή της γλυκοπρωτεΐνης θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1) [99] (Εικ.19). Δύο είναι οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί ότι οδηγούν στις στερεοδιαμορφωτικές αλλαγές του CD47: 1) Η γήρανση προκαλεί πολλές αλλαγές στη ζώνη-3. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το μόριο CD47 είναι συστατικό του μακροσυμπλόκου της ζώνης-3, οι αλλαγές που συμβαίνουν στην πρωτεΐνη αυτή θα μπορούσαν να επηρεάσουν το μόριο CD47. 2) Το μόριο CD47 υφίστανται απευθείας αλλαγές λόγω γήρανσης, π.χ. μέσω οξείδωσης [39, 81].

Παρόλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν πως η ανασταλτική δράση αυτού του μορίου εξαρτάται άμεσα και από την ικανότητα παραμόρφωσης των ερυθροκυττάρων (Εικ.5) [40].



Εικόνα 19: Μοντέλο συμμετοχής του μορίου CD47 στην ερυθροφαγοκυττάρωση, λόγω γήρανσης και οξείδωσης. (Ανατύπωση από [99])

4.7 Γήρανση και ουμπικουιτίνωση

Μέχρι πρόσφατα, η ουμπικουιτίνωση θεωρούταν πως είναι μειωμένη στα γηρασμένα ερυθροκύτταρα καθώς το ποσοστό ουμπικουιτινωμένης σπεκτρίνης είχε βρεθεί να μειώνεται κατά τη γήρανση. Συγκεκριμένα, η ουμπικουιτινωμένη α-σπεκτρίνη παρουσίαζε μείωση 50% στα γηρασμένα σε σχέση με τα νεαρά ερυθροκύτταρα, μείωση που είχε θεωρηθεί ότι οφείλεται στην απώλεια της ικανότητας σύζευξης της ουμπικουιτίνης ή/και σε μειωμένη ευαισθησία της α-σπεκτρίνης στην ουμπικουιτίνωση, λόγω στερεοδιαμορφωτικών αλλαγών που συμβαίνουν στο δίκτυο της σπεκτρίνης [100]. Παρόλα αυτά, νεότερα δεδομένα υποδηλώνουν αύξηση της ουμπικουιτίνωσης κατά τη γήρανση, ταυτόχρονα με την επιλεκτική απομάκρυνση των ουμπικουιτινωμένων πρωτεϊνών μέσω κυστιδιοποίησης [86].

5. Ερυθρόπτωση

Τα ώριμα ερυθροκύτταρα, λόγω έλλειψης πυρήνα, μιτοχονδρίων και άλλων οργανιδίων, δεν μπορούν θεωρητικά να υποστούν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Παρόλα αυτά υφίστανται μια ταχεία διαδικασία αυτοκαταστροφής η οποία επιτρέπει στα ερυθροκύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες να αποφύγουν την αιμόλυση και εμφανίζει κοινά χαρακτηριστικά με την απόπτωση, όπως κυτταρική συρρίκνωση, κυστιδιοποίηση της πλασματικής μεμβράνης και εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης, οδηγώντας στην αποσύνθεσή τους ή τη φαγοκυττάρωσή τους από τα μακροφάγα. Αυτή η ρυθμιζόμενη διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου επάγεται από την εισροή ιόντων ασβεστίου και ονομάζεται ερυθρόπτωση. Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου επιφέρει μορφολογικές αλλαγές στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετατρέπονται από δισκοκύτταρα σε εχινοκύτταρα και σφαιρο-εχινοκύτταρα λόγω κυστιδιοποίησης της πλασματικής μεμβράνης [101].

Το οσμωτικό σοκ, το οξειδωτικό στρες, η έλλειψη επαρκών ενεργειακών αποθεμάτων, το κεραμίδιο, η προσταγλανδίνη E₂ και ο PAF (παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων) είναι παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν το ερυθροκύτταρο σε ερυθρόπτωση (Εικ.20).

Πιο συγκεκριμένα:

Η ενεργοποίηση των καναλιών κατιόντων πυροδοτεί την ερυθρόπτωση

Η μείωση των ενεργειακών αποθεμάτων του ερυθροκυττάρου και η έκθεση σε οσμωτικό σοκ ή οξειδωτικό στρες επιφέρουν εξασθένιση του συστήματος αντιοξειδωτικής άμυνας και ενεργοποίηση των καναλιών κατιόντων, πυροδοτώντας την πρόσληψη ιόντων Ca²⁺, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της ασβεστιο-εξαρτώμενης σκραμπλάσης και την εξωτερίκευση PS [102].

Οι προσταγλανδίνες διεγείρουν τα κανάλια κατιόντων και την ερυθρόπτωση

Το υπεροσμωτικό σοκ και η μετακίνηση ιόντων χλωρίου πυροδοτούν την απελευθέρωση προσταγλανδίνης E₂ (PGE₂). Η PGE₂ ενεργοποιεί κανάλια κατιόντων, προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης των ενδοκυττάριων ιόντων ασβεστίου και διεγείρει την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια του ερυθροκυττάρου. Ακόμη, η PGE₂ ενεργοποιεί την ασβεστιο-εξαρτώμενη καλπαΐνη [102].



Εικόνα 20: Μηχανισμοί που εμπλέκονται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο των ερυθροκυττάρων. B3: ζώνη-3, Hb: αιμοσφαιρίνη, MetHb: μεθαιμοσφαιρίνη, PTK: κινάσες τυροσίνης, PTPs: φωσφατάσες τυροσίνης, PS: φωσφατιδυλοσερίνη. (Πηγή: *http://www.intechopen.com/books/anemia/erythrocyte-programmed-cell-death*)

<u>Τα ασβεστιο-εξαρτώμενα κανάλια ιόντων K⁺ συμβάλλουν στη συρρίκνωση του κυττάρου</u>

Η είσοδος των ιόντων ασβεστίου στα ερυθροκύτταρα επιφέρει ενεργοποίηση στα κανάλια ιόντων καλίου, "Gardos", η οποία οδηγεί σε υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, απομακρύνοντας ιόντα Cl⁻ και K⁺ από το εσωτερικό των ερυθροκυττάρων, ευνοώντας τη συρρίκνωσή τους. Η ενεργοποίηση των καναλιών "Gardos" εμποδίζει τη διόγκωση του ερυθροκυττάρου, η οποία θα επερχόταν μέσω εισροής ιόντων Na⁺, Cl⁻ και νερού και θα οδηγούσε σε αιμόλυση [102].

Ο PAF ενεργοποιεί τη σφιγγομυελινάση

Η κυτταρική συρρίκνωση οδηγεί στην απελευθέρωση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), ο οποίος εμπλέκεται στην ρύθμιση της φλεγμονής, της θρόμβωσης και της καρδιαγγειακής λειτουργίας. Ο PAF ενεργοποιεί τη σφιγγομυελινάση και επιφέρει διάσπαση της σφιγγομυελίνης, απελευθέρωση κεραμιδίου, κυτταρική συρρίκνωση, ενεργοποίηση των "Gardos" και έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια του ερυθροκυττάρου [102].

Στο μυελό των νεφρών τα ερυθροκύτταρα προστατεύονται από το οσμωτικό στρες με δυο μηχανισμούς: 1) τα ιόντα Cl⁻ εμποδίζουν την ενεργοποίηση των καναλιών κατιόντων και 2) η δράση της σφιγγομυελινάσης εμποδίζεται από τις υψηλές συγκεντρώσεις ουρίας. Η ενεργοποίηση των καναλιών κατιόντων αναστέλλεται επίσης και από την ερυθροποιητίνη [102].

6. Οξειδωτικό στρες

Τα ερυθροκύτταρα αποτελούν βασικό συστατικό της αντιοξειδωτικής ικανότητας του αίματος, μέσω των ενζύμων που περιέχουν, του συστήματος γλουταθειόνης και των αντιοξειδωτικών συστατικών χαμηλού μοριακού βάρους. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η συμμετοχή των ερυθροκυττάρων στην αναγέννηση των οξειδοαναγωγικών ισοδύναμων (π.χ. NADPH) που καταναλώνονται μέσω του μονοπατιού αναγωγής της γλουταθειόνης και της υπεροξειρεδοξίνης. Επιπλέον, η ικανότητα μετακίνησής τους στο σώμα τα καθιστά μια αποτελεσματική δεξαμενή "απόρριψης" των οξειδωτικών ουσιών του οργανισμού. Γι'αυτό το λόγο ο μεταβολισμός και η ομοιόσταση των ερυθροκυττάρων επηρεάζει άμεσα τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του αίματος [103].

6.1 Δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species)

Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) παράγονται ως παραπροϊόν του αερόβιου μεταβολισμού καθώς και από τη μιτοχονδριακή αναπνοή (στα εμπύρηνα κύτταρα). Υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχουν στο κύτταρο σε ισορροπία με τα αντιοξειδωτικά μόρια. Η κατάσταση "οξειδωτικού στρες" δημιουργείται όταν αυτή η ισορροπία διαταράσσεται εξαιτίας της έλλειψης αντιοξειδωτικών, της αυξημένης παραγωγής και συσσώρευσης ROS ή λόγω και των δύο αυτών καταστάσεων.

Στα ερυθροκύτταρα η κύρια πηγή των ROS είναι η πρωτεΐνη-μεταφορέας οξυγόνου, αιμοσφαιρίνη, που υφίσταται αυτό-οξείδωση και παράγει O₂⁻.

6.2 Υπεροξείδωση λιπιδίων

Τα λιπίδια είναι το βασικό συστατικό των μεμβρανών και λειτουργούν ως στεροειδείς ορμόνες, ρετινοϊκά οξέα και προσταγλανδίνες. Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, οι ασταθείς ανθρακικές ρίζες που δημιουργούνται από λιπαρά οξέα αντιδρούν με μόρια οξυγόνου και δημιουργούν ρίζες υπεροξυλίου, οι οποίες τελικά μετατρέπονται σε λιπιδικά υδρο-υπεροξείδια.

Ένας από τους κύριους βιοδείκτες της οξειδωτικής βλάβης των λιπιδίων είναι η μέτρηση της μαλονδιαλδεΰδης (MDA), που είναι το κύριο προϊόν της λιπιδικής υπεροξείδωσης και μπορεί να αντιδράσει με ελεύθερες αμινοξικές ομάδες πρωτεϊνών, φωσφολιπίδια και νουκλεϊκά οξέα οδηγώντας σε δομικές αλλαγές που επιφέρουν δυσλειτουργία. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου αποτελούν το ερέθισμα για την έναρξη αντιδράσεων λιπιδικής υπεροξείδωσης που οδηγούν σε απώλεια μεμβρανικής ακεραιότητας και κυτταρικό θάνατο.

Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι επιρρεπής σε λιπιδική υπεροξείδωση η οποία περιλαμβάνει διάσπαση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στο διπλό δεσμό και δημιουργία MDA που αποτελεί τελικό προϊόν της λιπιδικής υπεροξείδωσης της μεμβράνης. Αυτή η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τη πρόκληση βλαβών στις λειτουργίες της μεμβράνης ενώ η συσσώρευση αυτού του προϊόντος μπορεί να επηρεάσει τη μεταφορά ιόντων και τη λειτουργία των, μεμβρανοσυνδεόμενων στη ζώνη-3, ενζύμων [104].

6.3 Οξείδωση πρωτεϊνών

Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου μπορούν να οδηγήσουν σε οξείδωση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, στη δημιουργία διασυνδέσεων μεταξύ των πρωτεϊνών και στην οξείδωση του βασικού σκελετού αυτών με αποτέλεσμα τη θραύση τους. Μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε τροποποιήσεις πολλών αμινοξέων δημιουργώντας καρβονυλικά παράγωγα, τα οποία θεωρούνται ως πρώιμος δείκτης πρωτεϊνικής οξείδωσης και χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της πρωτεϊνικής βλάβης. Κάποιες από τις οξείδωστικές βλάβες είναι αναστρέψιμες, ενώ άλλες είναι μη αναστρέψιμες με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να γίνονται μη λειτουργικές (π.χ. η οξείδωση των πλευρικών αλυσίδων σε καρβονυλικά παράγωγα). Έτσι, η παρουσία καρβονυλικών ομάδων στις πρωτεΐνες χρησιμοποιείται ως δείκτης μη αναστρέψιμης πρωτεϊνικής οξείδωσης [105].

Καρβονυλίωση πρωτεϊνών

Η καρβονυλίωση είναι μια μη αναστρέψιμη, μη ενζυμική τροποποίηση των πρωτεϊνών και είναι αποτέλεσμα εισαγωγής καρβονυλικών ομάδων στις πρωτεϊνες, μέσω ποικίλων μονοπατιών. Η οξείδωση των πρωτεϊνών από τις ρίζες οξυγόνου δημιουργεί δραστικά καρβονυλικά παράγωγα που προκύπτουν είτε από άμεση οξείδωση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξικών καταλοίπων, είτε από διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού, οδηγώντας στη δημιουργία πεπτιδίων στα οποία το αμινοτελικό αμινοξύ μπλοκάρεται από ένα α-κετοακυλο παράγωγο. Οι καρβονυλικές ομάδες μπορούν επίσης να εισαχθούν στις πρωτεΐνες μέσω δευτερογενών αντιδράσεων των καταλοίπων με δραστικές καρβονυλικές ομάδες που παράγονται από την αντίδραση αναγωγής σακχάρων ή των προϊόντων οξείδωσής τους (glycation/ glycoxidation reactions), οδηγώντας στη δημιουργία τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs, advanced glycation end products). Τέλος, η παραγωγή δραστικών αλδεϋδών μπορεί να προέλθει από οξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, π.χ. μαλονδυαλδεΰδη (MDA), οδηγώντας στην παραγωγή τελικών προϊόντων λιπιδικής οξείδωσης (ALEs, advanced lipoxidation end products) [105] (Εικ.21).



Εικόνα 21: Μονοπάτια που οδηγούν στην καρβονυλίωση των πρωτεϊνών (Ανατύπωση από [105]).

Η μέτρηση των καρβονυλικών παραγώγων προτιμάται ως δείκτης στρες γιατί δημιουργούνται σε αρχικά στάδια και είναι σχετικά σταθερά σε σχέση με άλλα παράγωγα. Το καρβονυλικό στρες μπορεί να προέρχεται από οξειδωτικές ή μη οξειδωτικές αιτίες (π.χ. έλλειψη θειολών).

7. Αντιοξειδωτικά μόρια

7.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστατικά (ερυθροκύτταρα και πλάσμα)

Στα αερόβια κύτταρα υπάρχουν πολλά ένζυμα που έχουν ως ρόλο να αποτρέπουν την καταστροφική επίδραση των ROS. Αυτά τα ένζυμα χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες. Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) και η καταλάση (CAT) είναι τα κύρια ενδογενή, ενζυμικά συστήματα αντιοξειδωτικής άμυνας των αερόβιων κυττάρων. Προστατεύουν μέσω άμεσης αποικοδόμησης των υπεροξειδικών ριζών και του υπεροξείδιου του υδρογόνου, μετατρέποντάς τα σε λιγότερο δραστικά είδη. Η SOD καταλύει τη μετατροπή των ριζών υπεροξειδίου (\cdot O₂) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Το H₂O₂, παρότι δεν είναι ρίζα, μετατρέπεται με την αντίδραση Fenton σε \cdot OH, το οποίο είναι πολύ δραστικό. Η υπεροξείδαση της γλουταθειόνης (GPx) εξουδετερώνει τα υπεροξείδια του υδρογόνου παίρνοντας υδρογόνα από δύο GSH μόρια, δημιουργώντας δύο μόρια νερού και ένα μόριο GSSG. Ένα άλλο σημαντικό ένζυμο είναι η καταλάση η οποία εξουδετερώνει τα H₂O₂ δημιουργώντας μόρια νερού [75] (Εικ.22).



Εικόνα 22: Κύρια μεταβολικά μονοπάτια των ελεύθερων ριζών στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα (Ανατύπωση από [75]). Ηδ:αιμοσφαιρίνη, SOD: υπεροξειδική δισμουτάση, CAT: καταλάση, GSHPx: υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, GlRed: αναγωγάση της γλουταθειόνης, G6PD: αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης.

7.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστατικά (ερυθροκύτταρα & πλάσμα)

Η αλβουμίνη είναι η κυριότερη αντιοξειδωτική πρωτεΐνη του πλάσματος, καθώς είναι υπεύθυνη σε ποσοστό μέχρι και 70% για την αντιοξειδωτική ικανότητά του, εξαιτίας των θειολικών ομάδων που περιέχει και της υψηλής συγκέντρωσής της στο πλάσμα. Εκτός από την αντιοξειδωτική δράση της, έχει σημαντική συμβολή και στη μεταφορά μικρών μορίων και ιόντων, στην πρόσδεση τοξινών και στη διατήρηση της οσμωτικής ισορροπίας του πλάσματος. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης μειώνονται σε παθολογικές καταστάσεις όπως οι ηπατικές βλάβες, η νεφρική ανεπάρκεια ή ο υποσιτισμός [106].

Η χολερυθρίνη (bilirubin) είναι μια άλλη πρωτεΐνη η οποία βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στο πλάσμα, είναι το τελικό προϊόν του καταβολισμού της αίμης, έχει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα και συμβάλλει εξίσου με την αλβουμίνη στον περιορισμό της οξείδωσης των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL, low density lipoproteins). Είναι συστατικό το οποίο δρα κυρίως προστατεύοντας λιπίδια από υπεροξείδωση σε αντίθεση με την GSH η οποία δράση καθώς εμποδίζει την επαγόμενη από TNF-α ενεργοποίηση των ICAM-1, VCAM-1 και σελεκτίνης E [107].

Οι **τοκοφερόλες**, που αποτελούν είδη της βιταμίνης Ε, είναι λιπόφιλα συστατικά που υπάρχουν στο πλάσμα σε τέσσερις ισομορφές (α-,β-,γ- και δ-τοκοφερόλη).

Το **ασκορβικό οξύ**, ή αλλιώς βιταμίνη C, είναι ένα αντιοξειδωτικό συστατικό που δρα συμπληρωματικά στα καροτενοειδή και τις τοκοφερόλες για την απενεργοποίηση των ROS. Η βιταμίνη C δρα προστατευτικά επαναφέροντας τη βιταμίνη E από την οξειδωμένη στη λειτουργική ανηγμένη μορφή της, ενώ μέσω της αποικοδόμησης των ROS προστατεύει τις LDL λιποπρωτεΐνες από οξειδωτική βλάβη.

Τέλος, το **ουρικό οξύ** αποτελεί ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό συστατικό του πλάσματος. Παράγεται από το ήπαρ και απομακρύνεται από τους νεφρούς (65-75%) και το έντερο (25-35%). Αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο, εξαιτίας της εξελικτικής απώλειας της ενεργότητας της ουρικάσης η οποία οδηγεί σε υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος στο πλάσμα σε σχέση με άλλα θηλαστικά.

Εξαιτίας των διπλών δεσμών που περιέχει, αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό συμμετέχοντας, υπό φυσιολογικές συνθήκες, στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος σε ποσοστό που κυμαίνεται από 35 έως 65%. Επειδή είναι ασθενές οξύ με υψηλή σταθερά διάσπασης, το ουρικό οξύ υπάρχει στο πλάσμα υπό τη μορφή κυρίως (98%) αλάτων νατρίου. Έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (και στο πλάσμα), η οποία αυξάνεται (κατά 70%) όταν αυτό προσδένεται σε πρωτεΐνες, κυρίως στην αλβουμίνη η οποία είναι ο κύριος μεταφορέας του. Στους νεφρούς, το ουρικό και τα άλατα ουρικού φιλτράρονται και απομακρύνονται, αλλά τελικά το μεγαλύτερο μέρος (90%) του επιστρέφει στην κυκλοφορία [108].

Υπάρχουν διάφορες μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν είτε την ευεργετική είτε την επιβλαβή δράση του ουρικού οξέος. Στο γενικό πληθυσμό (και στην περιτοναϊκή κάθαρση) τα υψηλά επίπεδα του ουρικού οξέος έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας [109]. Παρόλα αυτά, έρευνες σε ασθενείς με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια υπό θεραπεία αιμοκάθαρσης έχουν δείξει αντίθετα αποτελέσματα, καθώς τα υψηλά επίπεδα του ουρικού οξέος έχουν συσχετισθεί με χαμηλότερο κίνδυνο θνησιμότητας [110, 111]. Παρότι τα αποτελέσματα γι'αυτην την υπόθεση δεν είναι πλήρη, ως επεξήγηση αυτής της αντίστροφης σχέσης, έχει θεωρηθεί το γεγονός ότι το ουρικό οξύ αποτελεί και δείκτη καλής διατροφικής κατάστασης του οργανισμού.

Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι το ουρικό οξύ ευθύνεται για πολλές παθήσεις όπως η αρθρίτιδα, η νεφρολιθίαση, το μεταβολικό σύνδρομο και καρδιαγγειακά νοσήματα, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν πως η ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης νευροεκφυλιστικών παθήσεων [112].

Τέλος, η **ανηγμένη γλουταθειόνη** (GSH) είναι κύριο ενδοκυτταρικό μη πρωτεινικό συστατικό και θεωρείται το πιο σημαντικό ενδοκυττάριο, υδρόφιλο αντιοξειδωτικό. Παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των θειολικών ομάδων των μεμβρανικών πρωτεϊνών στην ανηγμένη μορφή τους, καθώς η οξείδωσή τους μπορεί να προκαλέσει αλλαγή στη δομή και τη λειτουργία τους [113]. Τα ενδοκυττάρια επίπεδα των μη πρωτεϊνικών θειολών, εκ των οποίων η γλουταθειόνη αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό, μειώνονται κατά την ωρίμανση των δικτυοερυθροκυττάρων σε ώριμα ερυθροκύτταρα, αλλά από αυτό το σημείο και μετά η συγκέντρωσή τους παραμένει σταθερή.

Η σύνθεση της γλουταθειόνης (GSH) από γλουταμινικό, κυστεΐνη και γλυκίνη καταλύεται από δύο κυτοσολικά ένζυμα, τη συνθετάση της γλουταμυλ-κυστεΐνης και τη GSH-συνθετάση με τη χρήση μορίων ATP (Εικ.23). Αυτή η διαδικασία συμβαίνει σε όλα τα κύτταρα, με τα ηπατικά να αποτελούν τη βασικότερη πηγή παραγωγής γλουταθειόνης. Ανάμεσα όμως στα υπόλοιπα κύτταρα, τα ερυθροκύτταρα έχουν έναν ιδιαίτερα υψηλό ρυθμό μετατροπής της GSSG σε GSH, συμμετέχοντας τελικά με ένα ποσοστό της τάξης του 10% στα συνολικά επίπεδα της GSH που παράγονται στον άνθρωπο.

Η γλουταθειόνη συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές αντιδράσεις. Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της είναι ότι μπορεί και αποικοδομεί αποτελεσματικά τις ελεύθερες ρίζες, είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω ενζυμικών αντιδράσεων. Σε αυτές τις αντιδράσεις η GSH οξειδώνεται σε GSSG, η οποία στη συνέχεια ανάγεται σε GSH από την NADPHεξαρτώμενη αναγωγάση της γλουταθειόνης [114]. Η αντίσταση πολλών κυττάρων στο οξειδωτικό στρες σχετίζεται με τα υψηλά ενδοκυττάρια επίπεδα της GSH. Τέλος, μπορεί να δράσει και άμεσα ως αποικοδομητής ελεύθερων ριζών εξουδετερώνοντας το OH· ή έμμεσα αποκαθιστώντας τη βλάβη σε μακρομόρια στα οποία έχουν ήδη επιδράσει τα OH· [3]. Η ανηγμένη γλουταθειόνη δε διαπερνά την πλασματική μεμβράνη παθητικά και η *de* novo σύνθεσή της είναι η μόνη πηγή GSH για τα ερυθροκύτταρα. Η έξοδος της οξειδωμένης γλουταθειόνης GSSG από το κύτταρα πραγματοποιείται με κατανάλωση ενέργειας και χρήση μορίων ATP (Εικ.23).



Εικόνα 23: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου της γλουταθειόνης (Ανατύπωση από [82]). EMP: Embden-Meyerhof μονοπάτι (αναερόβια γλυκόλυση). HPS: μονοπάτι μονοφωσφορικής εξόζης (ή μονοπάτι φωσφορικών πεντοζών). G-6P: 6-φωσφορική γλυκόζη και 6PG: φωσφογλυκονολακτόνη. Glu, Gln, Gly, Cys, Ala και Asp είναι το γλουταμικό, η γλουταμίνη, η γλυκίνη, η κυστεΐνη, η αλανίνη και το ασπαρτικό, αντίστοιχα.

8. Νεφροί: Ανατομία και Λειτουργία

Οı νεφροί βρίσκονται στο πίσω μέρος κοιλιακού τοιγώματος, του οπισθοπεριτοναϊκά. Κάθε νεφρός περιέχει από περίπου ένα εκατομμύριο όμοιες δομικές και λειτουργικές μονάδες που ονομάζονται νεφρώνες, ενώ κάθε νεφρώνας αποτελείται από ένα διηθητικό οργανίδιο που ονομάζεται νεφρικό σωμάτιο και ένα ουροφόρο σωληνάριο που αποτελεί προέκταση του νεφρικού σωματίου. Κάθε νεφρικό σωμάτιο αποτελείται από ένα σύνολο αλληλοσυνδεμένων τριχοειδών βρόγχων που ονομάζεται νεφρικό σπείραμα. Κάθε σπείραμα τροφοδοτείται με αίμα από ένα προσαγωγό αρτηρίδιο και εισέργεται μέσα σε μια κάψουλα γεμάτη με υγρό γνωστή ως κάψα του Bowman. Καθώς το αίμα ρέει μέσα στο σπείραμα ένα μέρος του πλάσματος διηθείται μέσα στην κάψα του Bowman. Το υπόλοιπο αίμα εξέργεται από το σπείραμα με το απαγωγό αρτηρίδιο. Το τμήμα του σωληναρίου στο οποίο εισρέει το υγρό από την κάψα του Bowman ονομάζεται εγγύς σωληνάριο, και αποτελείται από τα σωληνάρια εγγύς εσπειραμένο και εγγύς ευθύ. Το επόμενο τμήμα του σωληναρίου είναι η αγκύλη του Henle, η οποία αποτελείται από ένα κατιόν σκέλος, το οποίο προέρχεται από το εγγύς σωληνάριο, και από ένα ανιόν σκέλος το οποίο οδηγεί στο επόμενο μέρος του νεφρώνα, το άπω εσπειραμένο σωληνάριο.

Οι κύριες λειτουργίες των νεφρών περιλαμβάνουν τη ρύθμιση της συγκέντρωσης του νερού και των ανόργανων ιόντων, την απομάκρυνση των παραπροϊόντων του μεταβολισμού μέσω των ούρων, την απομάκρυνση ξένων χημικών ουσιών και τη γλυκονεογένεση καθώς σε καταστάσεις παρατεταμένης νηστείας οι νεφροί παράγουν γλυκόζη και την απελευθερώνουν στο αίμα. Τέλος, λειτουργούν ως ενδοκρινείς αδένες παράγοντας την ορμόνη ερυθροποιητίνη, τη ρενίνη και την 1,25-διυδροξυβιταμίνη D3.

9. Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια

9.1 Γενικά: Ορισμός-Αίτια-Συπτώματα

Η Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια (XNA) είναι η απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των νεφρών, η οποία κατηγοριοποιείται σε πέντε στάδια ανάλογα με τα επίπεδα του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (GFR, glomerular filtration rate) (Πίνακας 1). Ο GFR αντιπροσωπεύει τον όγκο του πλάσματος που διηθείται από τους νεφρούς στη μονάδα του χρόνου και αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη καλής ή κακής λειτουργίας των νεφρών. Η Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια τελικού σταδίου (στάδιο 5) χαρακτηρίζει είτε ασθενείς οι οποίοι εμφανίζουν GFR <15ml/min/1.73m², έναντι των φυσιολογικών τιμών που είναι ~100ml/min/1.73m², είτε ασθενείς οι οποίοι υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση, ανεξάρτητα από τα επίπεδα του GFR.

Ο διαβήτης και η αρτηριακή πίεση αποτελούν τις κύριες αιτίες της ασθένειας, παρόλα αυτά οι διάφορες λοιμώξεις (π.χ. χρόνια σπειραματονεφρίτιδα), γενετικές (π.χ. πολυκυστική νόσος νεφρών) ή αυτοάνοσες ασθένειες (π.χ. ερυθηματώδης λύκος, IgA νεφροπάθεια) και η λήψη φαρμάκων μπορούν να επηρεάσουν εξίσου αρνητικά τη φυσιολογική λειτουργία των νεφρών [115]. Οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι διαταραχές στο μεταβολισμό των οστών, στους ηλεκτρολύτες και στα μεταλλικά στοιχεία καθώς και οι διατροφικές διαταραχές (π.χ. υποσιτισμός) αποτελούν τις πιο κοινές επιπλοκές στη XNA, ενώ η αναιμία, η οποία επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα ζωής και την επιβίωση των ασθενών, αποτελεί τη βασικότερη αιματολογική διαταραχή η οποία εμφανίζεται από τα αρχικά στάδια της νεφρικής ανεπάρκειας, και παρουσιάζει σταδιακή επιδείνωση καθώς η νόσος εξελίσσεται σε επόμενα στάδια [116].

ΣΤΑΔΙΟ	GFR (ml/min/1.73m ²)	Περιγραφή		
1	90+	Φυσιολογική λειτουργία των νεφρών αλλά δομικές ή/και λειτουργικές μεταβολές των νεφρών (παθολογοανατομικές αλλοιώσεις, δείκτες νεφρικής βλάβης στο αίμα ή στα ούρα) ή προϋπάρχον γενετικό υπόβαθρο για XNA		
2	60-89	Μικρή μείωση της λειτουργίας των νεφρών και άλλες παθολογίες (όπως στο στάδιο 1) που προδιαθέτουν για XNA		
3	30-59	Μέτρια μείωση της νεφρικής λειτουργίας		
4	15-29	Σοβαρή μείωση της νεφρικής λειτουργίας		
5	<15 ή σε θεραπεία αιμοκάθαρσης	Σχεδόν ολική απώλεια της λειτουργίας των νεφρών (νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου)		

Πίνακας 1: Σταδιοποίηση της χρόνιας νεφρικής νόσου με βάση το ρυθμό σπειραματικής διήθησης GFR (ml/min/1.73m²), σύμφωνα με τις οδηγίες του NKF (National Kidney Foundation).

Αναιμία είναι η παθολογική κατάσταση κατά την οποία η τιμή της αιμοσφαιρίνης (Hb), του αιματοκρίτη (Hct) ή/και των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) αίματος είναι κάτω

των φυσιολογικών επιπέδων. Όσον αφορά στα επίπεδα αιμοσφαιρίνης, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), ως αναιμία χαρακτηρίζεται η κατάσταση κατά την οποία η αιμοσφαιρίνη βρίσκεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από 13 g/dL στους άντρες ή σε μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες και χαμηλότερες από 12 g/dL στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Η αναιμία στη XNA οφείλεται στη μειωμένη παραγωγή ερυθροποιητίνης από τους νεφρούς οι οποίοι έχουν υποστεί βλάβη, στη μειωμένη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων, στη χρόνια φλεγμονή και την ανεπάρκεια σιδήρου που συνήθως χαρακτηρίζει αυτούς τους ασθενείς, καθώς και σε μειωμένη ανταπόκριση των ασθενών στη χορήγηση ερυθροποιητίνης εξωγενώς [117, 118].

9.2 Ουραιμικές τοξίνες

Η σταδιακή συσσώρευση παραπροϊόντων του μεταβολισμού, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες απομακρύνονται από τους νεφρούς, χαρακτηρίζεται ως ουραιμικό σύνδρομο και τα συστατικά που προκαλούν το ουραιμικό σύνδρομο είναι γνωστά ως ουραιμικές τοξίνες.

Οι ουραιμικές τοξίνες διαχωρίζονται σε τρεις κύριες ομάδες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος: μικρά υδατοδιαλυτά συστατικά, μεσαίου μεγέθους μόρια και πρωτεϊνοσυνδεόμενα συστατικά.

• <u>Μικρά υδατοδιαλυτά μόρια</u> (<500Da)

Τα μικρά υδατοδιαλυτά μόρια αποτελούν ομάδα μορίων που απομακρύνονται εύκολα με τη συμβατική αιμοκάθαρση και σε αυτή την ομάδα ανήκουν:

 - οι γουανιδίνες, που είναι μεταβολίτες της αργινίνης και της ουρίας και προκαλούν καταστολή της δράσης των ΝΚ κυττάρων και της παραγωγής υπεροξειδίων από τα ουδετερόφιλα,

- η ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη (ADMA) η οποία ενοχοποιείται για την πρόκληση υπέρτασης, στη XNA εμφανίζεται σε συγκέντρωση 6 φορές μεγαλύτερη από των υγιών ατόμων και με τη αιμοκάθαρση απομακρύνεται μόνο ένα ποσοστό της τάξης του 20-30%,

- η κρεατινίνη που αποτελεί τελικό προϊόν του μεταβολισμού των μυών και θεωρείται ότι παρεμποδίζει τα κανάλια χλωρίου,

- η ουρία η οποία αναστέλλει τον συνμεταφορέα NaK₂Cl και εμποδίζει τη σύνθεση NO από τα μακροφάγα,

- οι πουρίνες (ξανθίνη, υποξανθίνη, γουανοσίνη), ο φώσφορος, το ουρικό οξύ κα.

<u>Μεσαίου μεγέθους μόρια</u> (>500Da)

Τα μεσαίου και μεγάλου μοριακού βάρους μόρια απομακρύνονται καλύτερα με συγκεκριμένα φίλτρα αιμοκάθαρσης (*high-flux*) που έχουν μεγάλους πόρους και σε αυτήν την ομάδα ανήκουν μόρια 300-12.000kDa, στα οποία περιλαμβάνονται:

 τα αμινοξέα που προέρχονται από μη ενζυμική γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών (AGEsadvanced glycosylation end products), των οποίων η απομάκρυνση με συμβατική AIK είναι ανεπαρκής και σχετίζονται με λειτουργικές τροποποιήσεις ενζύμων και πρωτεϊνών,
προϊόντα οξείδωσης,

- η β2-μικροσφαιρίνη, η οποία οδηγεί σε αμυλοείδωση των οστών,

η παραθορμόνη, η οποία θεωρείται κύρια ουραιμική τοξίνη, οδηγεί σε αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου με αποτέλεσμα διαταραχές στη λειτουργία οργάνων (π.χ. οστεοποίηση, ερυθροποίηση) κα.

<u>Πρωτεϊνο-συνδεόμενα συστατικά</u>

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν χαμηλού μοριακού βάρους συστατικά τα οποία συνδέονται με πρωτεΐνες με αποτέλεσμα η απομάκρυνσή τους με συμβατική AIK να είναι πολύ περιορισμένη, ακόμη και με φίλτρα με μεγάλους πόρους. Σε αυτά περιλαμβάνονται: οι ινδόλες, η ομοκυστεΐνη, οι πολυαμίνες, η p-κρεσόλη κα. [119].



Εικόνα 24: Μεταφορά των τοξινών και της περίσσειας νερού μέσα από το φίλτρο στο υγρό της αιμοκάθαρσης στη συμβατική διαδικασία, μέσω διάχυσης (αριστερή εικόνα), και στην αιμοδιαδιήθηση, μέσω διάχυσης και διήθησης (δεξιά εικόνα). (Πηγή: http://www.baxter.com. sg/healthcare_professionals/therapies/renal/acute_kidney_treatment/continuous_renal_replacemen t_therapy.html)

10. Θεραπείες νεφρικής υποκατάστασης (Renal replacement therapies, RRT)

Οι θεραπείες νεφρικής υποκατάστασης περιλαμβάνουν την αιμοκάθαρση, την περιτοναϊκή κάθαρση και τη μεταμόσχευση νεφρού. Η αιμοκάθαρση αποτελεί την κύρια επιλογή προτίμησης καθώς το 89% των ασθενών που πάσχουν από XNA τελικού σταδίου υποβάλλονται σε αυτή τη θεραπεία, με τον αριθμό τους να υπολογίζεται περίπου στα 2.000.000 παγκοσμίως. Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια, με σημαντικές βελτιώσεις στα διαλύματα και τα φίλτρα που χρησιμοποιούνται, η διαδικασία αυτή θεωρείται πως παρέχει ένα ποσοστό μόλις 10% στην απομάκρυνση ουσιών σε σχέση με τη φυσιολογική λειτουργία των νεφρών.

Η **αιμοκάθαρση** (AIK) στοχεύει στην απομάκρυνση της περίσσειας νερού και των μεταβολιτών (ουραιμικές τοξίνες), που έχουν συσσωρευθεί στο αίμα λόγω της νεφρικής βλάβης, μέσω ενός μηχανήματος κάθαρσης (Εικ.24, 25). Θεωρείται ότι βελτιώνει την αναιμία μέσω της απομάκρυνσης ουραιμικών ουσιών οι οποίες δρουν είτε καταστέλλοντας της ερυθροποίηση (π.χ. κυτταροκίνες), είτε μειώνοντας τη διαθεσιμότητα του σιδήρου (π.χ. εψιδίνη) [120].

Η κατηγοριοποίηση των μεθόδων κάθαρσης βασίζεται στις διαφορετικές αρχές με τις οποίες πραγματοποιείται η απομάκρυνση των ουραιμικών τοξινών. Έτσι, στη συμβατική αιμοκάθαρση (conventional hemodialysis, cHD) η απομάκρυνση των ουσιών βασίζεται στην αρχή της διάχυσης, δηλαδή στη μεταφορά ουσιών από το αίμα, στο οποίο βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση, στο διάλυμα της AIK μέσω ημι-διαπερατής μεμβράνης, η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλή διαπερατότητα στο νερό (*low-flux*). Η μεταφορά απαιτεί την παρουσία ενός υγρού το οποίο ρέει αντίθετα από τη φορά ροής του αίματος, ενώ τα μόρια τα οποία απομακρύνονται με αυτόν τον τύπο της AIK είναι υδατοδιαλυτά, κυρίως μικρού MB (<500Da) συστατικά [121].

Σε αντίθεση με τη συμβατική AIK, η αιμοδιαδιήθηση (hemodiafiltration, HDF) αποτελεί έναν συνδυασμό αιμοκάθαρσης (HD-hemodialysis) και αιμοδιήθησης (HFhemofiltration), βασιζόμενη στην αρχή τόσο της διάχυσης όσο και της διήθησης. Στην αιμοδιήθηση η μεταφορά των ουσιών γίνεται λόγω της διαφορετικής υδροστατικής πίεσης που υπάρχει μεταξύ των υγρών που περιβάλλουν την ημιδιαπερατή μεμβράνη, δηλαδή του αίματος και του υγρού της ΑΙΚ, ενώ χρησιμοποιούνται φίλτρα υψηλής διαπερατότητας (high-flux) απομακρύνοντας και υψηλού MB ουραιμικές τοξίνες. Έτσι, η διαδικασία της αιμοδιαδιήθησης είναι αποτελεσματικότερη σε σχέση με τη συμβατική ΑΙΚ στην απομάκρυνση της περίσσειας νερού και ουσιών όχι μόνο μικρού αλλά και μεσαίου MB. Παρόλα αυτά, με αυτή τη μέθοδο υπάρχει κίνδυνος να ξεπεραστεί η επιθυμητή απώλεια βάρους του ασθενή κάτι το οποίο αντιμετωπίζεται με την επαναφορά του βάρους μέσω υποκατάστασης» (ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρολύτες) έγχυσης «υγρού με (substitution/replacement fluid) (Eik. 25) [120, 121].



Εικόνα 25: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου κάθαρσης σε: Α) συμβατική αιμοκάθαρση, Β) αιμοδιαδιήθηση και Γ) φυσικό σπείραμα νεφρών (Ανατύπωση από: «Ελληνική Νεφρολογία», 2008, 20(3):171-181).

Οι ασθενείς που υποβάλλονται σε συμβατική ΑΙΚ είναι πολύ πιθανό να εμφανίσουν αιμοδυναμική αστάθεια, αύξηση βάρους, διαταραχές στο μεταβολισμό των οστών και των μεταλλικών ιόντων, ανεπαρκή θρέψη και υποσιτισμό, φλεγμονή, ψυχολογικά και άλλα προβλήματα. Εμφανίζουν, επίσης, αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών επιπλοκών που αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας καθώς μόνο το 32-33% των ασθενών σε συμβατική ΑΙΚ επιβιώνουν μέχρι τον 5° χρόνο θεραπείας. Έτσι, η συμβατική ΑΙΚ βοηθά στην επιβίωση χωρίς όμως να επαναφέρει τη ζωή των ασθενών σε πλήρως φυσιολογικά επίπεδα [120]. Επιπλέον, παρά τη βελτίωση της αναιμίας, τα ερυθροκύτταρα ταυτόχρονα υποβάλλονται με αυτή τη διαδικασία σε μηχανικό στρες καθώς περνούν μέσα από το φίλτρο της αιμοκάθαρσης, μεταβολικό στρες από την απώλεια γλυκόζης κατά τη διαδικασία της ΑΙΚ και **οξειδωτικό στρες** από την επαφή των κυττάρων του αίματος με τα φίλτρα αιμοκάθαρσης (Εικ.26) [122].

11. Μεταβολές στα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα ασθενών με ΧΝΑ που υποβάλλονται σε ΑΙΚ - Επίδραση της ΑΙΚ

Τα ερυθροκύτταρα των ασθενών με ΧΝΑ χαρακτηρίζονται από πλήθος τροποποιήσεων όσον αφορά στο σύνολο σχεδόν των χαρακτηριστικών της κυτταρικής φυσιολογίας, ενεργοποιώντας μονοπάτια κυτταρικής εκκαθάρισης και ερυθρόπτωσης. Το ουραιμικό πλάσμα αποτελεί ένα "εχθρικό" περιβάλλον για τα κύτταρα καθώς αποτελεί ένα μείγμα βλαβερών ουσιών, φλεγμονωδών μορίων και άλλων βιοδραστικών ουσιών, σε διάφορες συγκεντρώσεις οι οποίες εξαρτώνται από τη συχνότητα και την αποτελεσματικότητα της αιμοκάθαρσης.

Η διαδικασία της ΑΙΚ παρότι συμβάλλει σημαντικά στην απομάκρυνση των τοξικών ουσιών, συνιστά και η ίδια έναν επιπλέον στρεσογόνο παράγοντα για τα ερυθροκύτταρα. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και τα αιμοπετάλια που έρχονται σε επαφή με το φίλτρο και τα διαλύματα της αιμοκάθαρσης απελευθερώνουν ROS οδηγώντας σε αστάθεια της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, ενώ η απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης λόγω αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη, επιβαρύνει το οξειδωτικό φορτίο του πλάσματος.

Στις ενότητες που ακολουθούν αναλύονται οι μεταβολές τόσο των ερυθροκυττάρων όσο και του πλάσματος στους ασθενείς με XNA, οι οποίες πιθανά σχετίζονται με την αναιμία (Εικ.28), καθώς και η περαιτέρω επίδραση της ΑΙΚ σε αυτές.

11.1 Χαρακτηριστικά του ουραιμικού πλάσματος και επίδραση της ΑΙΚ

11.1.1 Αντιοξειδωτική ικανότητα και δείκτες οξειδωτικού στρες

11.1.1.1 Μη ενζυμικά συστατικά - Βιταμίνες

Το ουραιμικό πλάσμα παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλή ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC-Total Antioxidant Capacity) σε σχέση με τα επίπεδα των υγιών ατόμων, η οποία έχει αποδοθεί κυρίως στα υψηλά επίπεδα του ουρικού οξέος που το χαρακτηρίζουν [123, 124]. Γενικότερα, το πλάσμα των ασθενών με XNA εμφανίζει χαμηλά επίπεδα βιταμινών C και E [123-125] πιθανά εξαιτίας της υπερκατανάλωσης για την ικανοποίηση των αυξημένων αναγκών απενεργοποίησης οξειδωτικών ουσιών, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην περαιτέρω στην αύξηση του οξειδωτικών στρες. Παρότι γενικότερα στη XNA έχει βρεθεί έλλειψη αντιοξειδωτικών ουσιών, υπάρχουν μελέτες στις οποίες οι βιταμίνες A, C και Ε έχουν βρεθεί εντός των φυσιολογικών τιμών ή και αυξημένες [123, 126], γεγονός που έχει θεωρηθεί ως αντισταθμιστικός μηχανισμός στις συνεχείς οξειδωτικές προκλήσεις.

Η αιμοκάθαρση οδηγεί σε σημαντική μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος τόσο λόγο της απομάκρυνσης μεγάλου μέρους του ουρικού οξέος όσο και εξαιτίας της απώλειας άλλων υδατοδιαλυτών αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως η βιταμίνη C. Πιο συγκεκριμένα, η αιμοκάθαρση μειώνει τα επίπεδα της βιταμίνης C [123, 124, 126] επιφέρει αύξηση ή δεν έχει καμία επίδραση στη βιταμίνη A (ρετινόλη) ενώ για τη βιταμίνη E έχουν αναφερθεί ποικίλες επιδράσεις [124, 126].

Η έλλειψη βιταμινών και αντιοξειδωτικών ουσιών όπως η αλβουμίνη έχει συσχετισθεί με το φλεγμονώδες φορτίο σε αυτούς τους ασθενείς, ενώ τα αυξημένα επίπεδα της βιταμίνης Α του πλάσματος έχουν συσχετισθεί με υψηλή λιπιδική υπεροξείδωση και αυξημένη ενεργότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης και καταλάσης, υποδηλώνοντας

έναν οξειδωτικό ρόλο αυτής της βιταμίνης όταν βρίσκεται σε επίπεδα υψηλότερα των φυσιολογικών [127, 128].

11.1.1.2 Ενζυμικά συστατικά και ιχνοστοιχεία

Όσον αφορά στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστατικά του πλάσματος των ασθενών, τα επίπεδα ενεργότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR), της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) έχουν βρεθεί είτε αυξημένα είτε μειωμένα σε σχέση με των υγιών ατόμων [129, 130]. Η χαμηλή ενεργότητα των ενζύμων έχει αποδοθεί σε τροποποιήσεις λόγω οξείδωσης, καρβαμυλίωσης ή γλυκοζυλίωσης, αναστολή της δράσης από ουραιμικές τοξίνες, μειωμένη έκφραση λόγω βλάβης των νεφρικών κυττάρων ή σε έλλειψη ιχνοστοιχείων που δρουν ως συμπαράγοντες. Επιπλέον, η μειωμένη γαστρεντερική απορρόφηση, οι διατροφικοί περιορισμοί, η φλεγμονή και η απώλεια συστατικών μέσω της αιμοκάθαρσης οδηγούν σε έλλειψη ιχνοστοιχείων, όπως το σελήνιο, ο ψευδάργυρος και ο χαλκός [131, 132]. Η έλλειψη αυτή έχει συσχετισθεί με τη χαμηλή ενεργότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (selenium-dependent protein) και υπεροξειδικής δισμουτάσης (coppercontaining protein) στα ερυθροκύτταρα των ασθενών.

Μετά την αιμοκάθαρση έχει παρατηρηθεί μερική αύξηση αυτών των στοιχείων [133] με μείωση όμως της δραστικότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης [130], ενώ η μερική αύξηση που έχει βρεθεί στην ενεργότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης [134] πιθανά οφείλεται στη βελτίωση των επιπέδων του σελήνιου ή σε αύξηση της συγκέντρωσής της λόγω της απώλειας μορίων νερού κατά την αιμοκάθαρση.



Εικόνα 26: Αρχή λειτουργίας αιμοκάθαρσης (Πηγή: *http://www.assignmenthelp.net/ assignment_help/principle-of-dialysis,* by Al Granberg).

11.1.1.3 Δείκτες οξειδωτικού στρες

Ως αποτέλεσμα των κατεσταλμένων ή υπερενεργοποιημένων, ενζυμικών και μη ενζυμικών, αντιοξειδωτικών συστημάτων, το πλάσμα των ασθενών με XNA χαρακτηρίζεται από πληθώρα πρωτεϊνικών και λιπιδικών δεικτών οξειδωτικού στρες, οι οποίοι επηρεάζονται με ποικίλους τρόπους από τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης.

Τα υψηλά επίπεδα λιπιδικής υπεροξείδωσης (MDA) [131], οξειδωμένης LDL και καρβονυλιωσης των πρωτεϊνών του πλάσματος είναι κάποιοι από τους κλασσικούς δείκτες που έχουν βρεθεί στους ασθενείς, οι οποίοι συνήθως επιδεινώνονται με τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης [135, 136]. Η μειωμένη ικανότητα απομάκρυνσης και απενεργοποίησης των ενεργών καρβονυλικών παραγώγων από τη γλουτεθειόνη, η οποία βρίσκεται σε μειωμένα επίπεδα στην ουραιμία, εξηγεί εν μέρει τα υψηλά επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες στο πλάσμα.

Όπως προαναφέρθηκε, κατά τη διαδικασία της αιμοκαθαρσης, η βιοασυμβατότητα των φίλτρων και των διαλυμάτων αιμοκάθαρσης τα οποία έρχονται σε επαφή με το αίμα των ασθενών, οδηγεί σε αστάθεια της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, κυρίως από την αναπνευστική έκρηξη των ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων τα οποία απελευθερώνουν ROS (*axidative burst*), με αποτέλεσμα να οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα καρβονυλίωσης [137]. Παρόλα αυτά, διάφορες έρευνες έχουν βρει είτε βελτίωση μετά την αιμοκάθαρση είτε καμία επίδραση [138]. Η μειωμένη βελτιωτική επίδραση της αιμοκάθαρσης σε συνδυασμό με τα υψηλά επίπεδα των καρβονυλικών παραγώγων στο πλάσμα των ασθενών, επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι η ίδια η ουραιμία είναι μια κατάσταση «υπερφόρτωσης» του αίματος με καρβονυλικά παράγωγα μπορούν να αντιδράσουν με πρωτεΐνες προκαλώντας δομικές και λειτουργικές μεταβολές, οδηγώντας τελικά στη δημιουργία AGEs που θεωρούνται τοξίνες μεσαίου μοριακού βάρους και ανιχνεύονται σε παθολογικά υψηλά επίπεδα στο πλάσμα των ασθενών [139].

Δεδομένου ότι η αλβουμίνη αποτελεί έναν βασικό αποικοδομητή των καρβονυλικών ριζών στο πλάσμα, είναι η κύρια πρωτεΐνη-στόχος του οξειδωτικού στρες [140]. Οι ασθενείς με XNA χαρακτηρίζονται από υποαλβουμιναιμία, ως αποτέλεσμα του υποσιτισμού (λόγω του περιορισμού λήψης συγκεκριμένων τροφών προς αποφυγή δημιουργίας συνοδών νοσημάτων) και της χρόνιας φλεγμονής, που προκαλεί μειωμένη σύνθεση αλβουμίνης ή ενισχύει τον καταβολισμό της. Η υποαλβουμιναιμία, η οποία βελτιώνεται μερικώς μετά την AIK, σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα τροποποιημένων μορφών της πρωτεΐνης (οξείδωση, διμερισμός, πρωτεόλυση) στη XNA υποδηλώνουν αυξημένο οξειδωτικό στρες και έντονα κατεσταλμένη αντιοξειδωτική ικανότητα [141, 142].

Άλλες πρωτεΐνες οι οποίες έχουν προστατευτικό ρόλο στο καρδιαγγειακό σύστημα, όπως οι απολιποπρωτεΐνες Α-ΙV και η απτοσφαιρίνη, βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα στο αίμα των ασθενών. Εξίσου χαμηλή έχει βρεθεί και η κλαστερίνη του πλάσματος σε μακροχρόνια επιζώντες ασθενείς, η οποία θεωρείται δείκτης καρδιαγγειακών βλαβών [143]. Τέλος, τα επίπεδα μονοξειδίου του αζώτου (NO) παρουσιάζονται συνήθως αυξημένα στους ασθενείς [123], παρότι τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα [144]. Η αυξημένη παραγωγή του NO θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα της αιμοκάθαρσης (π.χ. εξαιτίας του μηχανικού στρες που υφίστανται τα ενδοθηλιακά κύτταρα στην κυκλοφορία (shear stress) ή της μεσολαβούμενης από κυτταροκίνες ενεργοποίησης της συνθετάσης του NO). Μάλιστα οι μεταβολές αυτές ίσως συμβάλλουν περαιτέρω στις επιπλοκές της ουραιμίας που σχετίζονται με την αναιμία και τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Εικ.28).

11.1.2 Δείκτες φλεγμονής

Τόσο η AIK όσο και η XNA, ανεξάρτητα αλλά και σε συνδυασμό πυροδοτούν φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Οι λοιμώξεις εξαιτίας της εισαγωγής συριγγίου για την αναστόμωση της φλέβας (fistula), το βακτηριακό φορτίο που περιέχεται στα υγρά αιμοκάθαρσης και η χρήση βιοασύμβατων μεμβρανών κάθαρσης, είναι κάποιες από τις αιτίες φλεγμονής που οδηγούν σε ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων [145], η οποία ακολουθείται από την παραγωγή IL-6 και ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Παρόλα αυτά, η διαδικασία της AIK φαίνεται να είναι εν μέρει μόνο υπεύθυνη για τη φλεγμονώδη απόκριση των ασθενών, αφού και ασθενείς με XNA οι οποίοι δεν έχουν ξεκινήσει θεραπεία με AIK παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα φλεγμονωδών κυτταροκινών. Επιπλέον, η μειωμένη απομάκρυνση των κυτταροκινών και των AGEs από τους νεφρούς σε συνδυασμό με συνυπάρχουσες φλεγμονώδεις ασθενειες όπως η αρτηριοσκλήρυνση, συμβάλλουν περαιτέρω στη διέγερση των φλεγμονωδών αποκρίσεων [146].

Το πλάσμα των ασθενών με XNA χαρακτηρίζεται από πληθώρα δεικτών φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένης της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), της φερριτίνης, κυτταροκινών όπως η ιντερλευκίνη-6, ο TNF-α, ο διαλυτός υποδοχέας της ιντερλευκίνης-2, καθώς και δείκτες ενεργοποίησης των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων [147-149]. Μάλιστα, έχει βρεθεί ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της CRP, των κυτταροκινών, της ελαστάσης και της δόσης της ερυθροποιητίνης [147, 150]. Αντίθετα, αρνητική συσχέτιση συνδέει τους δείκτες φλεγμονής με τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης του αίματος και με αντιοξειδωτικά συστατικά του πλάσματος, όπως η α-τοκοφερόλη και η αλβουμίνη [151, 152] υποδηλώνοντας πως η φλεγμονή είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει σημαντικά στην εμφάνιση της αναιμίας, της υποαλβουμιναιμίας και του οξειδωτικού στρες.

Όσον αφορά στη στενή σύνδεση της φλεγμονής με την αναιμία, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι κάποιες κυτταροκίνες εμποδίζουν την ερυθροποίηση είτε καταστέλλοντας την έκφραση της ερυθροποιητίνης, είτε ενισχύοντας την έκφραση του διαλυτού υποδοχέα της, ο οποίος αποτελεί ανταγωνιστή του μεμβρανοσυνδεόμενου, είτε επιταχύνοντας την καταστροφή των ερυθροκυττάρων μέσω ενεργοποίησης των μακροφάγων [153, 154]. Ακόμη, οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1β και TNF-α καταστέλλουν την ερυθροποίηση μέσω επαγωγής αποπτωτικού θανάτου στην ερυθροειδική σειρά CFU-E ή μέσω ενεργοποίησης της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) [155]. Επιπλέον, οι ίδιες κυτταροκίνες διαταράσσουν τον μεταβολισμό του σιδήρου μέσω καταστολής της έκφρασης υποδοχέων τρανσφερίνης στα ερυθροειδικά κύτταρα [156], είτε μέσω αύξησης της έκφρασης των υποδοχέων λακτοφερίνης και μείωσης των επιπέδων φερροπορτίνης στα μακροφάγα με παράλληλη υπερέκφραση της εψιδίνης (Εικ.27). Το τελικό αποτέλεσμα των προαναφερθέντων είναι η λειτουργική ανεπάρκεια σιδήρου σε αυτούς τους ασθενείς. Τέλος, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει άμεση επίδραση των κυτταροκινών στα ερυθροκύτταρα τα οποία μετά από επίδραση υψηλών δόσεων κυτταροκινών in vitro παρουσιάζουν χαρακτηριστικά ερυθρόπτωσης [157].



Εικόνα 27: Μεταβολισμός σιδήρου και ο ρόλος της εψιδίνης. Ο σίδηρος λαμβάνεται από τις τροφές είτε στη μορφή δισθενούς μορφής (συνδεδεμένος με αίμη) είτε τρισθενούς μορφής (ελεύθερος). Ο τρισθενής σίδηρος ανάγεται σε δισθενή από το κυτόχρωμα Β στο δωδεκαδάκτυλο, ώστε να μεταφερθεί στη συνέχεια από τον μεταφορέα DMT1. Αφού εισέλθει στο εντερικό κύτταρο, είτε αποθηκεύεται στη φερριτίνη αν υπάρχει επάρκεια στον οργανισμό, είτε μεταφέρεται μέσω της φερροπορτίνης (FPN) στο εξωτερικό του κυττάρου. Η HCP-1 είναι η πρωτεΐνη που μεταφέρει την αίμη, ενώ η HO-1 χρειάζεται για την απελευθέρωση του σιδήρου από την αρωτεΐνη-αποθήκη σιδήρου (φερριτίνη) μέσω πρόσδεσης στη φερροπορτίνης (Πηγή: http://dx.doi.org/10.5772/52061).

11.1.3 Εξωκυτταρικά κυστίδια

Στους ασθενείς με XNA, οι ουραιμικές τοξίνες, η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες σε συνδυασμό με τη διαδικασία της AIK, αποτελούν παράγοντες οι οποίοι φαίνεται να συμβάλλουν στην απελευθέρωση κυστιδίων στο πλάσμα [158, 159]. Σε πολλές περιπτώσεις, έχει αναφερθεί αύξηση του βαθμού κυστιδιοποίησης από τη διαδικασία AIK, πιθανά λόγω του μηχανικού στρες το οποίο ασκείται στα αιμοπετάλια και σε άλλα κύτταρα κατά την επαφή τους με τα υλικά του μηχανήματος κάθαρσης [158, 159]. Παρόλα αυτά, σε άλλες μελέτες έχει αναφερθεί μείωση των επιπέδων των κυστιδίων μετά την AIK, η οποία έχει αποδοθεί στη μείωση των ουραιμικών τοξινών, στην επαναφορά της μηχανικής πίεσης που ασκείται στα κύτταρα του αίματος στην κυκλοφορία (shear stress) ή στα διαφορετικά πρωτόκολλα AIK που χρησιμοποιούνται στις μελέτες [158, 160]. Σε αντίθεση με την πυροδότηση της κυστιδιοποίησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, κάποιες τοξίνες όπως η *p-cresol* δρουν ανασταλτικά στη δημιουργία κυστιδίων από τα ουδετερόφιλα, εμποδίζοντας την ενεργοποίησή τους και πιθανά γι'αυτόν το λόγο, τα επίπεδα της κυστιδιοποίησης να μην ακολουθούν πάντα την εξέλιξη της νόσου [161].

Παρότι τα μικροκυστίδια στη XNA, και ιδιαίτερα εκείνα τα οποία προέρχονται από αιμοπετάλια, παρουσιάζουν χαμηλό θρομβωτικό δυναμικό σε σχέση με άλλες ασθένειες [162], τα υψηλά επίπεδά τους θεωρείται ότι συμβάλλουν σε ένα βαθμό στα θρομβωτικά επεισόδια τα οποία παρουσιάζονται στους ασθενείς [163]. Επιπλέον, υπό την επίδραση των ουραιμικών τοξινών, το ενδοθήλιο απελευθερώνει μικροκυστίδια τα οποία μειώνουν σημαντικά την απελευθέρωση μονοξειδίου του αζώτου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, συμβάλλοντας περαιτέρω στην ενδοθηλιακή και αρτηριακή δυσλειτουργία στη XNA [164].

11.2 Μεταβολές των ερυθροκυττάρων στη ΧΝΑ και επίδραση της ΑΙΚ

11.2.1 Χαρακτηριστικά της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων

Τα ερυθροκύτταρα των ασθενών με XNA χαρακτηρίζονται από ακαμψία και μειωμένη ικανότητα ελαστικής παραμόρφωσης [165] σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Όσον αφορά στην ευαισθησία τους σε οσμωτική λύση, αυτή έχει βρεθεί είτε αυξημένη, είτε μειωμένη και θεωρείται ότι επηρεάζεται από τη διακύμανση των επιπέδων παραθορμόνης στο πλάσμα (parathyroid hormone, PTH), χοληστερόλης και πρωτεϊνών στη μεμβράνη και ενεργότητας ΑΤΡασών στα ερυθροκύτταρα [166]. Σε πολλές περιπτώσεις η κυτταρική ευθραυστότητα παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με τα ενδοκυττάρια επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, ενώ η απομάκρυνση ουραιμικών τοξινών και η επαναφορά της οσμωμοριακότητας του ορού σε φυσιολογικά επίπεδα μετά την αιμοκάθαρση φαίνεται να βελτιώνουν την οσμωτική ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων [166]. Επιπλέον, στα ερυθροκύτταρα των ασθενών έχει αναφερθεί μεμβρανική αστάθεια καθώς και αυξημένος ρυθμός απελευθέρωσης κυστιδίων [117, 164], παρότι υπάρχουν μελέτες που έχουν βρει παρόμοια επίπεδα κυστιδιοποίησης στους ασθενείς και στα υγιή άτομα [162].

Τα ερυθροκύτταρα των ασθενών παρουσιάζουν πληθώρα μορφολογικών τροποποιήσεων, όπως στοματοκύτταρα, κνιζοκύτταρα, σφαιροκύτταρα, εχινοκύτταρα, στοχοκύτταρα αλλά και πιο σπάνιες μορφές όπως δακρυοκύτταρα, οβαλοκύτταρα, ελλειπτοκύτταρα και σχιστοκύτταρα [117, 162-164]. Αποτελέσματα από πειράματα ανασύστασης ερυθροκυττάρων και πλάσματος ασθενών με XNA με ερυθροκύτταρα και πλάσμα από υγιή άτομα, προτείνουν πως υπάρχει ένας παράγοντας του ουραιμικού πλάσματος ο οποίος συμβάλλει στην εχινοκυττάρωση, ενώ η αυξημένη συγκέντρωση χοληστερόλης, η λιπιδική υπεροξείδωση της μεμβράνης, καθώς και η εισροή ιόντων ασβεστίου θεωρούνται παράγοντες που μπορούν να την ενισχύσουν περαιτέρω [167-169]. Τέλος, τα εχινοκύτταρα, τα στοματοκύτταρα και άλλες μορφολογικές τροποποιήσεις των ερυθροκυττάρων πιθανά επηρεάζουν το ιξώδες του αίματος, την ικανότητα παραμόρφωσης και τις ρεολογικές ιδιότητες των ερυθροκυττάρων στη XNA [170].

Όσον αφορά στη συμβολή που έχει η αιμοκάθαρση στις παραπάνω μεταβολές, έχουν αναφερθεί τόσο θετικές όσο και αρνητικές επιδράσεις. Παρότι η αιμοκάθαρση φαίνεται να επάγει προσωρινή αύξηση της εχινοκυττάρωσης [171], η απομάκρυνση των ουραιμικών τοξινών έχει συσχετισθεί με μείωση των ποσοστών εχινοκυττάρωσης και βελτίωση της μεμβρανικής ελαστικότητας και της ικανότητας παραμόρφωσης των κυττάρων σε σχέση με τα επίπεδα αυτών των παραμέτρων πριν από την AIK [172]. Αντίθετα, σύμφωνα με άλλες μελέτες, η κυκλοφορία των ερυθροκυττάρων μέσα από το φίλτρο της AIK επιφέρει αντίθετα αποτελέσματα στη μορφολογία τους αυξάνοντας την ακαμψία τους [165], συμβάλλοντας στη μειωμένη διάρκεια ζωής τους και τελικά στην αναιμία. Σε αυτήν την περίπτωση, τα ευεργετικά αποτελέσματα της απομάκρυνσης των ουραιμικών τοξινών "καλύπτονται" από τις αρνητικές επιδράσεις που επιφέρει η διαδικασία της AIK στη μορφολογία των κυττάρων (Εικ.28).

11.2.2 Οξειδοαναγωγικό δυναμικό των ερυθροκυττάρων

Όπως συμβαίνει με πολλές πτυχές της φυσιολογίας του αίματος στη XNA τελικού σταδίου, υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα που σχετίζονται με τη μεγάλη διακύμανση που παρατηρείται στους ενδοκυττάριους αντιοξειδωτικούς παράγοντες των ουραιμικών ερυθροκυττάρων και στις επιδράσεις της AIK σε αυτούς. Από τη μια πλευρά, υπάρχει πληθώρα δεδομένων που υποστηρίζουν την παρουσία ενός κατεσταλμένου αντιοξειδωτικού συστήματος στα ερυθροκύτταρα των ασθενών τα οποία χαρακτηρίζονται από παθολογικά χαμηλό λόγο GSH/GSSG, χαμηλά επίπεδα βιταμίνης Ε και ενεργότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων (καταλάση, SOD, G6PD, GPx κα.) [129, 131]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί θεωρείται ότι επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την ουραιμία με αποτέλεσμα να μην είναι αποδοτικοί έναντι των οξειδωτικών ερεθισμάτων καθώς έχουν φτάσει σε κορεσμό από τα παρατεταμένα υψηλά επίπεδα του οξειδωτικού στρες. Μάλιστα, πολλές ουραιμικές τοξίνες [173] έχει δειχθεί ότι αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της ενεργότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων ή ότι προωθούν την οξείδωση της γλουταθειόνης.

Από την άλλη πλευρά, έχει αναφερθεί υπερέκφραση (π.χ. της GSH [174] ή αυξημένη ενεργότητα π.χ. της καταλάσης, GPx, GST κτλ. [129]) σε κάποιους αντιοξειδωτικούς παράγοντες των ερυθροκυττάρων των ασθενών. Αυτή η αύξηση θεωρείται αντισταθμιστική, σαν μέρος του ομοιοστατικού μηχανισμού για την προστασία των κυττάρων έναντι του συνεχόμενου οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, η αυξημένη ενεργότητα της GPx θεωρείται ότι σχετίζεται και με τον αυξημένο αριθμό δικτυοερυθροκυττάρων ο οποίος συναντάται σε άτομα που λαμβάνουν ερυθροποιητίνη, ενώ η αυξημένη ενεργότητα της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης θεωρείται ως απόκριση των ερυθροειδικών προγόνων στη σταδιακή απενεργοποίηση του ενζύμου στα άριμα ερυθροκύτταρα από τις ουραιμικές τοξίνες. Αντικρουόμενα είναι επίσης τα αποτελέσματα συνήθως εξαρτώνται από το αν έχει βρεθεί αντίστοιχα αύξηση ή όχι των ROS κατά τη διάρκεια της συνεδρίας αιμοκάθαρσης.

Παρότι υπάρχει ασυμφωνία όσον αφορά στο αντιοξειδωτικό δυναμικό των ερυθροκυττάρων, αντίθετα υπάρχει μεγάλη συμφωνία απόψεων όσον αφορά στις οξειδωτικές βλάβες των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Έτσι, η πλειονότητα των ασθενών παρουσιάζει συσσώρευση ενδοκυττάριων επιπέδων ROS στα ερυθροκύτταρα, καρβονυλίωση μεμβρανικών πρωτεϊνών, αυζημένη ευαισθησία σε εζωνενή οζειδωτικά ερεθίσματα [117, 169], λιπιδική υπεροξείδωση της μεμβράνης [175], καθώς και παθολογικές τροποποιήσεις στη σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Επιπλέον, in vitro πειράματα ανασύστασης έχουν δείξει ότι το ουραιμικό πλάσμα, τόσο πριν όσο και μετά την AIK, ενισχύει τη συσσώρευση ROS σε φυσιολογικά ερυθροκύτταρα [169]. Σε συμφωνία με αυτά τα ευρήματα, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η ΑΙΚ δεν επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα των ROS και τη λιπιδική υπεροξείδωση της μεμβράνης [117], επισημαίνοντας ότι οι αρνητικές επιδράσεις της παθολογίας των νεφρών στην οξειδωτική κατάσταση των κυττάρων δεν αναστρέφονται από τη διαδικασία της ΑΙΚ [176]. Παρότι σε μερικές περιπτώσεις έγει αναφερθεί ότι η ΑΙΚ αυξάνει τη λιπιδική υπεροξείδωση [175], αυτή η επίδραση ίσως να μην είναι αποτέλεσμα της επιδείνωσης του οξειδωτικού στρες από τη διαδικασία της ΑΙΚ, αλλά ένδειξη της μειωμένης ανθεκτικότητας των κυττάρων στα οξειδωτικά ερεθίσματα, πιθανά λόγω απώλειας αντιοξειδωτικών ουσιών. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η ευαισθησία των ερυθροκυττάρων, ύστερα από επίδραση με εξωγενή

οξειδωτικά ερεθίσματα, είναι μεγαλύτερη σε ερυθροκύτταρα που λήφθηκαν μετά την AIK σε σχέση με πριν [117]. Μάλιστα, η επιδείνωση της πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης των ερυθροκυττάρων μετά την AIK έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο θανάτου λόγω καρδιαγγειακών προβλημάτων [176], υποδηλώνοντας ότι ένα, σε μεγάλο βαθμό, κατεσταλμένο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας δεν μπορεί να αντιμετωπίσει τα οξειδωτικά ερεθίσματα που σχετίζονται με τη διαδικασία της AIK.

Η στενή σχέση της αναιμίας με το αντιοξειδωτικό δυναμικό στη XNA είναι ιδιαίτερα εμφανής σε ασθενείς που λαμβάνουν αντιοξειδωτικά συστατικά και ιχνοστοιχεία. Σύμφωνα με διάφορες έρευνες, η χορήγηση βιταμίνης Ε, ασκορβικού οξέος και ανηγμένης γλουταθειόνης, όχι μόνο βελτιώνει τα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες [177] και προάγει την έκφραση ή την ενεργότητα αντιοξειδωτικών συστατικών στα ερυθροκύτταρα και στο πλάσμα, αλλά επίσης μειώνει την απαιτούμενη δόση της ερυθροποιητίνης, βελτιώνει την αναιμία και την οσμωτική ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων [178, 179]. Πολλά αντιοξειδωτικά, όπως η Ν-ακετυλοκυστεΐνη και το ασκορβικό οξύ, βελτιώνουν επίσης τους δείκτες φλεγμονής στη XNA. Παρόλα αυτά, πολλές μελέτες, έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά στην αντιοξειδωτική δράση αυτών των ουσιών καθώς η περίσσεια τους στο αίμα μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση αγγειακής νόσου, επισημαίνοντας ότι η αντιοξειδωτική θεραπεία στη XNA χρειάζεται μεγάλη προσοχή και περαιτέρω διερεύνηση.



Εικόνα 28: Παράγοντες που συμβάλλουν και επιδρούν στην αναιμία στη XNA. (+/-): θετική ή αρνητική επίδραση της αιμοκάθαρσης, αντίστοιχα (Ανατύπωση από [180]).

Όλα τα παραπάνω ευρήματα, υποδηλώνουν ότι το οξειδωτικό στρες αποτελεί έναν ενδογενή παράγοντα στην ουραιμία, τα ουραιμικά ερυθροκύτταρα έχουν αναπτύξει προσαρμοστικούς μηχανισμούς σε αυτό και παρότι μπορεί να επιδεινώνεται από τη χρόνια

θεραπεία σε AIK σίγουρα δεν είναι μόνο αποτέλεσμα αυτής [181]. Η ουραιμία, η χρόνια φλεγμονή, η προχωρημένη ηλικία, η αρτηριοσκλήρυνση, η υποαλβουμιναιμία, η χορήγηση σιδήρου και οι συνυπάρχουσες ασθένειες αποτελούν βασικές αιτίες του οξειδωτικού στρες σε αντίθεση με τη βιοασυμβατότητα των φίλτρων και τη μόλυνση των διαλυμάτων AIK που αποτελούν δευτερεύουσες. Αυτοί οι παράγοντες στρες, οι οποίοι αντικατοπτρίζονται σε ένα ευρύ φάσμα μεταβολών που χαρακτηρίζουν τα ουραιμικά ερυθροκύτταρα, πιθανά συμβάλλουν στην αναιμία μέσω μοριακών μονοπατιών που περιλαμβάνουν τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα, τις μηχανικές ιδιότητες και τη σηματοδότηση δεικτών απομάκρυνσης και ερυθρόπτωσης των ερυθροκυττάρων.

11.2.3 Πρωτεϊνική σύσταση και ιδιότητες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

Η ακεραιότητα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στις μηχανικές ιδιότητες των ερυθροκυττάρων και στην επιβίωσή τους. Τόσο η ουραιμία όσο και η θεραπεία της AIK σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη λήψη παραγόντων ερυθροποίησης φαίνεται να επηρεάζουν τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Οι τροποποιήσεις της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης στη XNA περιλαμβάνουν έλλειψη βασικών πρωτεϊνών, αύξηση δεικτών κυτταρικού στρες και αυξημένη πρόσδεση κυτοσολικών ή συστατικών του πλάσματος στη μεμβράνη, συσσωμάτωση πρωτεϊνών, δημιουργία θραυσμάτων και καρβονυλίωση.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει έλλειψη της ζώνης-3 καθώς και βασικών συστατικών του υπομεμβρανικού σκελετού όπως σπεκτρίνη, αγκυρίνη, ακτίνη και παλλιδίνη, στοιχεία που αποτελούν ένδειξη των διαταραγμένων οριζόντιων και κάθετων αλληλεπιδράσεων του υπομεμβρανικού σκελετού [117, 176]. Αυτές οι αλλαγές οδηγούν σε εξασθένιση της πρόσδεσης του κυτταροσκελετού στη λιπιδική διπλοστιβάδα και μειωμένη ικανότητα παραμόρφωσης της μεμβράνης, προωθώντας την απώλεια κυτταρικής επιφάνειας και αιμοσφαιρίνης μέσω κυστιδιοποίησης. Η αυξημένη πρόσδεση ασβεστιο-εξαρτώμενων πρωτεϊνών (π.χ. καλπαΐνη και συνεξίνη) στη μεμβράνη συνάδει με την αύξηση των ενδοκυττάριων ιόντων ασβεστίου, ενώ η πρόσδεση της υπεροξειρεδοξίνης-2 στη μεμβράνη, η θραυσματοποίηση της σπεκτρίνης και η σύνδεσή της με την αιμοσφαιρίνη σε συνδυασμό με την παρουσία οξειδωμένης αγκυρίνης προκύπτουν ως αποτέλεσμα των αυξημένων επιπέδων οξειδωτικού στρες [182]. Επιπλέον, σε μερικές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί χαμηλή παρουσία του «δείκτη εαυτού» CD47, αυξημένη πρόσδεση των IgGs καθώς και αυξημένη ευαισθησία στην λύση μέσω ενεργοποίησης του συμπληρώματος, παρά τη φυσιολογική έκφραση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος CD55 και CD59 [183]. Η διακύμανση της έκφρασης του μεταφορέα νερού υδατοπορίνη-1 στη μεμβράνη πιθανά σχετίζεται με τις μεταβολές στην οσμωμοριακότητα του ουραιμικού πλάσματος από τη διαδικασία της AIK.

Η απομάκρυνση των ουραιμικών τοξινών μέσω της διαδικασίας της ΑΙΚ αλλά και των ερυθροκυττάρων που έχουν υποστεί βλάβες, η αποκατάσταση της οσμωμοριακότητας του πλάσματος και ο αυξημένος ρυθμός ερυθροφαγοκυττάρωσης [184] πιθανά ευθύνονται για τη βελτίωση της έκφρασης μερικών πρωτεϊνών στη μεμβράνη μετά την ΑΙΚ [117]. Αντιθέτως, σε κάποιες μελέτες η ΑΙΚ φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την έκφραση κάποιων πρωτεϊνών του υπομεμβρανικού σκελετού και της μεμβράνης. Διάφοροι παράγοντες που σχετίζονται με την ασθένεια σχετίζονται και με αλλαγές στην πρωτεϊνική έκφραση. Για παράδειγμα, ο χρόνος στον οποίο υποβάλλονται οι ασθενείς στη θεραπεία αιμοκάθαρσης έχει συσχετισθεί με αυξημένη μεμβρανική έκφραση του μεταφορέα γλυκόζης-1, της στοματίνης και της υδατοπορίνης-1 [176], πρωτεΐνες οι οποίες συμβάλλουν στη δομική ακεραιότητα, το μεταβολισμό, την κυστιδιοποίηση, και την αντιοξειδωτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων, μέσω της διατήρησης των επιπέδων ασκορβικού οξέος ενδοκυττάρια [30].

Παρότι η πρωτεϊνική σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης διαφέρει ανάμεσα στους ασθενείς και στα υγιή άτομα, είναι κοινή αποδοχή πως δεν υπάρχει κοινό πρότυπο μεταβολών, ούτε η AIK έχει κοινή επίδραση στο πρωτεϊνικό προφίλ των ερυθροκυττάρων ανάμεσα στους ασθενείς. Αυτό, πιθανά οφείλεται σε πληθώρα παραγόντων οι οποίοι διαφέρουν ανάμεσα στους ασθενείς με XNA όπως η ουραιμία, η θεραπεία με ερυθροποιητίνη και η AIK. Παρόλα αυτά, το εύρος της αύξησης των ουραιμικών δεικτών και η διάρκεια της θεραπείας με AIK, αντικατοπτρίζονται σε σημαντικό βαθμό στην αναδιάρθρωση της πρωτεϊνικής σύστασης της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης των ασθενών, είτε ως άμεση επίδραση των πρωτογενών στρεσογόνων ερεθισμάτων, είτε ως απόκριση των κυττάρων σε αυτά [117, 176].

11.2.4 Σήματοδότηση απομάκρυνσης των κυττάρων από την κυκλοφορία

Τα ενδοκυττάρια επίπεδα ιόντων Ca^{2+} και η επίδραση της AIK σε αυτά εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση μεταξύ των ασθενών [185]. Παρόλα αυτά, πολλές μελέτες έχουν αναφέρει παθολογικά υψηλά επίπεδα ενδοκυττάριων ιόντων Ca^{2+} [169, 172] ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης διαλυτών ουραιμικών συστατικών που επιδρούν στη αντλία ιόντων ασβεστίου και της Ca^{2+} -ATPάσης [186].

Η ανεπάρκεια των ουραιμικών ερυθροκυττάρων σε ασβεστιο-εξαρτώμενες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως η καλμοντουλίνη [187] και τα αυξημένα επίπεδα παραθορμόνης ορού έχουν επίσης συσχετισθεί με περίσσεια ενδοκυττάριων ιόντων Ca²⁺ και με αυξημένη διαπερατότητα της μεμβράνης σε ιόντα Ca²⁺ [188]. Παρόλα αυτά, υπάρχουν και μελέτες στις οποίες η συγκέντρωση των ενδοκυττάριων ιόντων ασβεστίου δε σχετίζεται με τα επίπεδα παραθορμόνης ορού [187].

Όσον αφορά στη διαδικασία της AIK, αυτή είτε βελτιώνει [187], είτε δεν έχει καμία επίδραση [169, 186] στα ενδοκυττάρια επίπεδα των ιόντων Ca^{2+} . Όμως, ακόμη και σε περιπτώσεις όπου τα επίπεδα των ιόντων Ca^{2+} δεν επηρεάζονται από τη διαδικασία της AIK, το ουραιμικό πλάσμα που λαμβάνεται μετά από την AIK προκαλεί σημαντικά μικρότερη αύξηση των ενδοκυττάριων ιόντων όταν επωαστεί με ερυθροκύτταρα υγιών ατόμων σε σχέση με το πλάσμα που λαμβάνεται πριν [169], ενισχύοντας την υπόθεση των *Gafter και συν*. [186] ότι κάποιος διαλυτός παράγοντας του ουραιμικού πλάσματος στη XNA ευθύνεται εν μέρει για την αύξηση των ιόντων Ca^{2+} στα ερυθροκύτταρα.

Η αύξηση αυτού του σηματοδοτικού μορίου στα ουραιμικά ερυθροκύτταρα θεωρείται ότι ενεργοποιεί μια σειρά ασβεστιο-εξαρτώμενων πρωτεϊνών (καλμοντουλίνη, καλπαΐνη, κανάλια Gardos, σκραμπλάση, φωσφορική κινάση C (PKC)) οι οποίες συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες. Μεταξύ αυτών, συμπεριλαμβάνονται η κυστιδιοποίηση, ο κορεσμός της αιμοσφαιρίνης σε οξυγόνο, η σταθερότητα του κυτταροσκελετού, η ικανότητα παραμόρφωσης, η ανθεκτικότητα σε οσμωτικό στρες, η έλλειψη ATP, η διάσπαση της ζώνης-3, η παραγωγή NO, η μορφολογία, ο όγκος και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, τα περισσότερα εκ των οποίων χαρακτηρίζουν τα ερυθροκύτταρα στη XNA [72]. Η αυξημένη κυτοσολική δραστηριότητα των ιόντων Ca^{2+} στα ουραιμικά ερυθροκύτταρα πιθανά συμβάλλει και στην ερυθρόπτωση [169]. Όπως έχει αποδειχθεί, η AIK σε συνδυασμό με την παρουσία διαλυτών συστατικών του πλάσματος και ουραιμικών τοξινών (βαναδικές ενώσεις (vanadate), θειικά ινδοξύλια (indoxyl sulfate), ακρολεΐνη (acrolein) κα.) πυροδοτούν την ερυθρόπτωση στη XNA, εν μέρει λόγω αύξησης των ενδοκυττάριων ιόντων Ca^{2+} , των ROS και της δημιουργίας κεραμίδιου [169].

Επίσης, η εξωτερίκευση PS, είτε σαν ένα μέρος προγραμματισμένου μονοπατιού που οδηγεί σε απομάκρυνση από την κυκλοφορία λόγω ερυθρόπτωσης είτε όχι, χαρακτηρίζει τα ερυθροκύτταρα στην ουραιμία, καθώς παρουσιάζει σημαντική αύξηση ανεξάρτητα από τη μέθοδο κάθαρσης [184]. Η εξωτερίκευση PS στα ερυθροκύτταρα στη XNA προωθεί τόσο την ερυθροφαγοκυττάρωση όσο και το θρομβωτικό δυναμικό των ερυθροκυττάρων [189], που ενισχύεται περαιτέρω από την απελευθέρωση μικροκυστιδίων που εκθέτουν PS στην επιφάνειά τους. Επιπλέον, έχει συσχετισθεί με αυξημένη προσκόλληση των ουραιμικών ερυθροκυττάρων στο ενδοθήλιο και μειωμένη απελευθέρωση NO από την ενδοθηλιακή συνθετάση μονοξειδίου του αζώτου, παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν σε καρδιαγγειακά νοσήματα και επομένως σε αυξημένη θνησιμότητα λόγω καρδιαγγειακών νοσημάτων στη XNA.

12. Επίδραση της αιμοδιαδιήθησης (ΑΔΔ) στο αίμα ασθενών με ΧΝΑ

Η αιμοδιαδιήθηση αποτελεί θεραπεία εξωνεφρικής κάθαρσης η οποία χρησιμοποιεί φίλτρα με μεγάλους πόρους για την απομάκρυνση τοξινών μεσαίου μοριακού βάρους και βιοσυμβατά φίλτρα. Παρότι υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα [190, 191], η αιμοδιαδιήθηση έχει βρεθεί πως συμβάλλει στη διατήρηση της αιμοδυναμικής σταθερότητας, στη βελτίωση της αναιμίας και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη, στη μείωση του οξειδωτικού στρες, της δυσλιπιδιαιμίας και της αμυλοείδωσης, στην αύξηση της διαθεσιμότητας του σιδήρου και στην καταστολή της φλεγμονής και των βλαβών του ενδοθηλίου, ενώ πολλές μελέτες έχουν βρει και σημαντική μείωση του ρυθμού θνησιμότητας σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αυτή τη μέθοδο κάθαρσης σε σχέση με τη συμβατική αιμοκάθαρση [192-194].

13. Αιματολογικοί βιοδείκτες εξέλιξης νόσου και θνησιμότητας στη ΧΝΑ

Η παθοφυσιολογία της αναιμίας στους ασθενείς με XNA είναι πολύπλοκη καθώς σχετίζεται με την πρωταρχική βλάβη, τη νοσηρότητα και την ανταπόκριση στις διάφορες θεραπευτικές αγωγές (αιμοκάθαρση, σκευάσματα ερυθροποιητίνης κα.). Η ποικιλία που συναντάται στα πρωτόκολλα αιμοκάθαρσης (φίλτρα, μέθοδος, διαλύματα αιμοκάθαρσης), τα αντιοξειδωτικά και αντιφλεγμονώδη φάρμακα και τα σκευάσματα σιδήρου, αποτελούν επιπλέον εμπόδια στην εύρεση βιοδεικτών θνησιμότητας και εξέλιξης της νόσου στη XNA. Παρόλα αυτά, έχουν βρεθεί κάποιοι δείκτες αίματος εξέλιξης της νόσου ή δείκτες αυξημένου κινδύνου καρδιαγγειακής ή γενικής θνησιμότητας. Πιο συγκεκριμένα:

Τα αυξημένα επίπεδα ενδοθηλιακών κυστιδίων πλάσματος αποτελούν έναν ανεξάρτητο, ισχυρό, νέο δείκτη πρόβλεψης κινδύνου θνησιμότητας σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, καθώς σχετίζονται με τη δημιουργία θρόμβων και την υπερπηκτικότητα του αίματος [195].

Η δραστικότητα της ερυθροκυτταρικής S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST, glutathione-S-transferase) θεωρείται ως ενδογενής "βιοαισθητήρας" της τοξικότητας του

αίματος, καθώς υπερεκφράζεται όταν αυξάνονται τα επίπεδα των τοξινών στο αίμα. Η έκφρασή της είναι ανεξάρτητη του μεγέθους ή της ποσότητας των τοξινών αλλά εξαρτάται από την "τοξικότητα" αυτών [196]. Επομένως, η δραστηριότητα της GST θεωρείται δείκτης εξέλιξης της νόσου καθώς εμφανίζει θετική συσχέτιση με τη σοβαρότητα της XNA.

Τα χαμηλά επίπεδα αλβουμίνης ορού [197], και τα υψηλά επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) [198], IL-6 [199], φερριτίνης ορού [200] και αλκαλικής φωσφατάσης [201] θεωρούνται ισχυροί δείκτες πρόβλεψης του κινδύνου θνησιμότητας στη XNA.

✓ Τα αυξημένα επίπεδα παραθορμόνης ορού έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο θανάτου και νοσηλείας [202].

 Τα υψηλά επίπεδα φωσφόρου ορού υποδεικνύουν αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου και θνησιμότητας [203].

✓ Τα επίπεδα ουρικού οξέος του ορού αποτελούν ισχυρό δείκτη της κατάστασης θρέψης του οργανισμού, με τα χαμηλά επίπεδα να αποτελούν έναν ανεξάρτητο δείκτη καρδιαγγειακής και ολικής θνησιμότητας [204]. Αντίστοιχα, τα υψηλά επίπεδα του ουρικού οξέος έχουν συσχετισθεί με χαμηλό κινδυνο θανάτου στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς [111].

✓ Αυξημένος κίνδυνος θανάτου και επιπλοκών έχει βρεθεί σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς με υψηλά, εκτός των προβλεπόμενων στόχων, επίπεδα αιμοσφαιρίνης [200]. Παρότι υπάρχει διαφωνία μεταξύ των μελετών, ο υψηλός αιματοκρίτης και τα υψηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης αίματος [205], εκτός των προβλεπόμενων ορίων αλλά εντός των φυσιολογικών επιπέδων, θεωρούνται παράγοντες που συμβάλλουν σε αυξημένη θνησιμότητα στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, πιθανά εξαιτίας του υψηλού κινδύνου θρομβώσεων και υπέρτασης. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα ενδοκυττάριας Hb ίσως οδηγούν σε προβληματική πρόσβαση του οξυγόνου, αυξημένη αυτο-οξείδωση και σε μια σειρά οξειδωτικών αντιδράσεων στα κύτταρα [176].

14. Θεραπεία αναιμίας στη ΧΝΑ

14.1 Παράγοντες διέγερσης της ερυθροποίησης (ESAs) & Ερυθροποιητίνη

<u>Ερυθροποίηση</u>

Η παραγωγή των ερυθροκυττάρων πραγματοποιείται με μια αυστηρά ελεγχόμενη διαφοροποίησης διαδικασία πολλαπλασιασμού και κυττάρων που ονομάζεται ερυθροποίηση. Τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα διαφοροποιούνται στην ερυθροειδική σειρά BFU (burst-forming unit), όπου ξεκινά να εκφράζεται ο υποδοχέας ερυθροποιητίνης. Στη συνέχεια, η σειρά BFU διαφοροποιείται στη δεσμευμένη ερυθροειδική κυτταρική σειρά CFU (colony-forming unit), όπου εμφανίζεται πολύ μεγάλη αύξηση της έκφρασης του υποδογέα. Η συνεγής διέγερση από τα μόρια της ερυθροποιητίνης οδηγεί σε διαφοροποίηση των κυττάρων προς ερυθροβλάστες, ακολουθεί αποπυρήνωση και τελικά δημιουργία δικτυοερυθροκυττάρων τα οποία εκφράζουν ελάχιστα μόρια του υποδογέα ερυθροποιητίνης. Τόσο περιβαλλοντικοί παράγοντες όσο και διάφορες ασθένειες μπορούν να διαταράξουν την ισορροπία που υπάρχει ανάμεσα στην παραγωγή και την καταστροφή των ερυθροκυττάρων. Η μεγάλη απώλεια ερυθροκυττάρων ή η μειωμένη παραγωγή τους έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αναιμίας.

Η ερυθροποίηση πραγματοποιείται κυρίως στους νεφρούς, παρότι κι άλλα όργανα όπως το ήπαρ μπορούν να παράγουν μικρότερες ποσότητες ερυθροποιητίνης. Αρχικά, η ερυθροποιητίνη συντίθεται ως ένα πρωτεϊνικό μόριο 193 αμινοξικών καταλοίπων. Στη συνέχεια, απομακρύνεται ένα πεπτίδιο 27 καταλοίπων μαζί με την καρβοξυτελική αργινίνη και τέλος προστίθενται υδρογονάνθρακες μέσω Ν- και Ο- γλυκοζυλίωσης. Το τελικό μόριο της πρωτεΐνης αποτελείται από 165 αμινοξέα και είναι ιδιαίτερα γλυκοζυλιωμένο καθώς ένα ποσοστό της τάξης του 40% του μορίου αποτελείται από υδατάνθρακες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, 10-25mU/ml ερυθροποιητίνης στον ορό επαρκούν για να διατηρήσουν την αιμοσφαιρίνη του αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα. Σε καταστάσεις βαριάς αναιμίας, η παραγωγή της ερυθροποιητίνης μπορεί να αυξηθεί μέχρι και 1000 φορές [206].

Σκευάσματα διέγερσης ερυθροποίησης – ESAs (Erythropoiesis Stimulating Agents)

Η χορήγηση σκευασμάτων που διεγείρουν την ερυθροποίηση (ESAs - Erythropoiesis Stimulating Agents), σε συνδυασμό με τη χορήγηση σιδήρου αποτελούν τον βασικό τρόπο αντιμετώπισης της αναιμίας στους ασθενείς. Τα ESAs ενεργοποιούν τα μονοπάτια ερυθροποίησης μέσω πρόσδεσης στον υποδοχέα της ερυθροποιητίνης των πρόδρομων ερυθροκυττάρων.

ESA	ЕΟΦ	Χαρακτηριστικά σε σχέση	Χρόνος	Συχνότητα	
		με ΕρΟ	ημιζωής	χορήγησης	
Βραχείας διάρκειας (short-acting)					
Epoetin alpha	1987	Παρόμοια α.α και σύσταση υδρογονανθράκων	ΕΦ: ~5 ώρες ΥΔ: ~24 ώρες	3 φορές/ εβδομάδα	
Epoetin beta	1989	Παρόμοια α.α και σύσταση υδρογονανθράκων	ΕΦ: 4-12 ώρες ΥΔ: 12-28 ώρες	3 φορές/ εβδομάδα	
Epoetin zeta	2007	Παρόμοια α.α και σύσταση υδρογονανθράκων	ΕΦ: ~5 ώρες ΥΔ: ~24 ώρες	3 φορές/ εβδομάδα	
Epoetin theta	2009	Παρόμοια α.α και σύσταση υδρογονανθράκων	ΕΦ: ~4 ώρες ΥΔ: ~34 ώρες	3 φορές/ εβδομάδα	
Μακράς διάρκειας (long-acting)					
Darbepoetin alpha	2001	Περιέχει δύο επιπρόσθετες αλυσίδες υδρογονανθράκων στην αμινοτελική περιοχή	ΕΦ: 21 ώρες ΥΔ: 73 ώρες	1 φορά/ εβδομάδα	
MethoxyPoly- EthyleneGlycol (PEG)- epoetin beta	2007	Ενεργοποιητής του υποδοχεά ερυθροποιητίνης (προσθήκη μεθοξυ-πολυαιθυλενο- γλυκόλης σε epoetin-beta)	ΕΦ: 134 ώρες ΥΔ: 139 ώρες	1 φορά/ μήνα	
Peginesatide		Πεπτίδιο συνδεμένο με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), ομοδιμερές, χωρίς ομόλογη ακολουθία με την EpO		1 φορά/ μήνα	

Πίνακας 2: Σκευάσματα επαγωγής της ερυθροποίησης. ESA: σκευάσματα διέγερσης της ερυθροποίησης (Πηγή: *http://dx.doi.org/10.5772/52061*). ΕΟΦ: έγκριση από τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων, α.α: αμινοξική ακολουθία.

Η χορήγηση σιδήρου είναι εξίσου σημαντική και λειτουργεί συμπληρωματικά στη χορήγηση των ESAs. Η ανεπάρκεια σιδήρου, ως αποτέλεσμα της χρόνιας απώλειας αίματος, της μειωμένης απορρόφησης και της χρόνιας φλεγμονής, οδηγεί σε μειωμένη ανταπόκριση στα ESAs.

Ύστερα από την κλωνοποίηση του γονιδίου και την παραγωγή ανθρώπινης ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης (rhEpO-recombinant human erythropoietin) έχουν δημιουργηθεί διάφορα σκευάσματα του φαρμάκου τα οποία κυκλοφορούν στο εμπόριο και διαφέρουν κυρίως στο χρόνο ημιζωής τους στην κυκλοφορία (Πίνακας 2).

Παρά, όμως, τη βελτιωτική δράση της στην αναιμία, οι πολύ υψηλές δόσεις ερυθροποιητίνης στους ασθενείς έχουν συσχετισθεί με υπέρταση και καρδιαγγειακές παθήσεις, φλεγμονή και θρομβώσεις.

14.1.1 Αντίσταση στη θεραπεία με rhEpO - Ορισμός

Ως "*αντίσταση στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη*" ορίζεται η αδυναμία επίτευξης της αιμοσφαιρίνης αίματος εντός των επιθυμητών ορίων, παρά τη χορήγηση φυσιολογικών δόσεων ερυθροποιητίνης (≤300 U/kg/wk για ενδοφλέβια έγχυση ή ≤200 U/kg/wk για υποδόρια έγχυση) [207]. Παρότι η πλειονότητα των ασθενών με XNA ανταποκρίνεται επαρκώς, υπάρχει ένα ποσοστό της τάξης του 5-10% που εμφανίζει αντίσταση (ή ανθεκτικότητα) στη θεραπεία.

14.1.2 Αίτια αντίστασης στη θεραπεία με rhEpO

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που θεωρείται ότι συμβάλλουν στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στην rhEpO. Το οξειδωτικό στρες, η φλεγμονή και η ανεπάρκεια σιδήρου θεωρούνται οι κύριοι λόγοι, ενώ δευτερεύοντα ρόλο παίζουν η έλλειψη βιταμινών και φυλλικού οξέος, ο υπερπαραθυρεοειδισμός, ο υποσιτισμός και η δημιουργία αντισωμάτων έναντι της ερυθροποιητίνης [208].

Πιο συγκεκριμένα:

1) Οι **ουραιμικές τοξίνες** θεωρείται πως καταστέλλουν την ερυθροποίηση στο μυελό των οστών, καθώς η αύξηση του δείκτη κάθαρσης έχει συσχετισθεί με μείωση της δόσης ερυθροποιητίνης.

2) Το οξειδωτικό στρες αυξάνει τη λιπιδική υπεροξείδωση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης οδηγώντας σε εμμένουσα ενδοαγγειακή αιμόλυση. Η έμμεση δράση του οξειδωτικού στρες επιβεβαιώνεται από το γεγονός πως χορήγηση βιταμίνης Ε σχετίζεται με την ανάγκη χαμηλότερων δόσεων rhEpO για την αντιμετώπιση της αναιμίας.

3) Η **ανεπάρκεια σιδήρου** οδηγεί σε αντίσταση στη θεραπεία και οφείλεται κυρίως στη χαμηλή απορρόφηση, τη φλεγμονή και την απώλεια αίματος.

4) Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η ιντερλευκίνη-1 (IL-1), η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) οι οποίες βρίσκονται σε περίσσεια στο ουραιμικό πλάσμα μπορούν να καταστείλουν την ερυθροποίηση στο μυελό των οστών και να προκαλέσουν διαταραχές στο μεταβολισμό του σιδήρου. Επιπλέον, μπορούν να οδηγήσουν σε υπερενεργοποίηση των μακροφάγων με αποτέλεσμα την ταχεία απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία.

5) Οι βιταμίνες καταστέλλουν την έκφραση κυτταροκινών, επομένως η έλλειψή τους οδηγεί στην παραγωγή κυτταροκινών και άλλων δεικτών φλεγμονής όπως φερριτίνη και εψιδίνη.

14.1.2.1 Χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος κατά την εμφάνιση "ανθεκτικότητας στη θεραπεία με rhEpO"

Υπάρχουν ελάχιστες μελέτες οι οποίες δείχνουν πως ασθενείς με XNA που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη εμφανίζουν μεταβολές σε χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων αλλά και του πλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, οι μη ανταποκρινόμενοι ασθενείς εμφανίζονται περισσότερο αναιμικοί και χαρακτηρίζονται από εντονότερη ανισοκυττάρωση. Στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, παρουσιάζουν μεταβολές στους λόγους των πρωτεϊνών αγκυρίνη/ζώνη-3 και σπεκτρίνη/αγκυρίνη υποδηλώνοντας βλάβες στα ερυθροκύτταρα [209]. Όσον αφορά στα λευκά αιμοσφαίρια, τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα είναι υπερενεργοποιημένα, ενώ τα ερυθροκύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στις επιδράσεις της ελαστάσης, πρωτεάση η οποία εκκρίνεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα [210, 211]. Στο πλάσμα των ασθενών παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα αλβουμίνης και αυξημένα επίπεδα IL-10, IL-6 και CRP [148]. Επιπλέον, παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης [212], ενώ η αυξημένη εψιδίνη στον ορό τους σχετίζεται με τη μειωμένη ανταπόκρισή τους στην ερυθροποιητίνη. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Β. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα ερυθροκύτταρα των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (XNA) τελικού σταδίου που υποβάλλονται σε θεραπεία αιμοκάθαρσης, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές τόσο στο αιματολογικό πρότυπο σε σχέση με υγιή άτομα όσο και σε χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων σε επίπεδο οξειδωτικού στρες, μορφολογίας, ερυθρόπτωσης, πρωτεϊνικής σύστασης καθώς και αλλαγές σε χαρακτηριστικά του πλάσματος.

Η ανθεκτικότητα στην ερυθροποιητίνη έχει συσχετισθεί με κάποιες ερυθροκυτταρικές βλάβες χωρίς όμως να έχει μελετηθεί ενδελεχώς αυτός ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης. Στόχος της παρούσας μελέτης υπήρξε η λεπτομερής ανάλυση σε κυτταρικό/υποκυτταρικό επίπεδο των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος ασθενών με XNA τελικού σταδίου υπό συμβατική αιμοκάθαρση οι οποίοι λαμβάνουν πολύ υψηλές δόσεις ερυθροποιητίνης σε συγκριση με ασθενείς που λαμβάνουν φυσιολογικές δόσεις, με απώτερο στόχο την εύρεση των τροποποιήσεων που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της περίσσειας ερυθροποιητίνης στο αίμα των ασθενών.

Όσον αφορά στην αιμοκάθαρση, εκτός από τη σημαντική επίδραση που έχει στο προσδόκιμο ζωής των ασθενών με XNA και στην αντιμετώπιση της αναιμίας, έχει σημαντική επίδραση και σε χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση της αναιμίας. Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε αναγκαία η μελέτη της επίδρασης μιας σχετικά νέας μεθόδου κάθαρσης, της αιμοδιαδιήθησης, σε σχέση με την παραδοσιακά εφαρμοζόμενη συμβατική αιμοκάθαρση για την εύρεση των επιδράσεων αυτής της μεθόδου στο βαθμό αναιμίας των ασθενών, μέσα από τη μελέτη του αιματολογικού προτύπου αλλά και χαρακτηριστικών των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος.
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Ασθενείς

A) Ασθενείς ανταποκρινόμενοι (responders, R) και μη ανταποκρινόμενοι (non-responders, NR) στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη (rhEpO).

Την ομάδα μελέτης αποτέλεσαν 28 ασθενείς με ΧΝΑ τελικού σταδίου υπό θεραπεία συμβατικής αιμοκάθαρσης, στους οποίους πραγματοποιείται ενδοφλέβια χορήγηση ερυθροποιητίνης για την αντιμετώπιση της αναιμίας. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα την ικανότητα ανταπόκρισης στη θεραπεία με rhEpO: 16 ασθενείς ανταποκρινόμενοι στην rhEpO (ομάδα R, rhEpO=9.350±4.203 IU/εβδομάδα) και 12 ασθενείς μη ανταποκρινόμενοι στην rhEpO (ομάδα NR, rhEpO=23.250±5.650 IU/εβδομάδα). Οι πρωτοπαθείς αιτίες της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας περιελάμβαναν: υπερτασική νεφροπάθεια (N=3), σπειραματονεφρίτιδα (N=3), πολυκυστική νόσο των νεφρών (N=4), νεφροσκλήρυνση (N=2), νεφρολιθίαση (N=2) καθώς και περιπτώσεις νεφρικής ανεπάρκειας αγνώστου αιτιολογίας (N=14). Κατά τη θεραπεία αιμοκάθαρσης χρησιμοποιήθηκαν βιοσυμβατές, συνθετικές μεμβράνες πολυαμιδίου. Την ομάδα «μαρτύρων» αποτέλεσαν 12 υγιείς αιμοδότες, αντίστοιχου φύλου και ηλικιακής τάξης.

Στα πειράματα ανασύστασης (N=6), πραγματοποιήθηκε ανάμειξη ουραιμικού πλάσματος (υπό την επίδραση ή όχι ουρικάσης) με φυσιολογικά ερυθροκύτταρα και φυσιολογικού πλάσματος με ουραιμικά ερυθροκύτταρα σε αιματοκρίτη ~35%. Ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 37°C σε κλίβανο 5% CO₂.

B) Ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση (hemodiafiltration, HDF) έναντι της συμβατικής αιμοκάθαρσης (conventional hemodialysis, cHD).

Την ομάδα μελέτης αποτέλεσαν 32 ασθενείς με ΧΝΑ τελικού σταδίου υπό θεραπεία αιμοκάθαρσης, οι οποίοι λάμβαναν φυσιολογικές δόσεις ερυθροποιητίνης (9,225 ± 4,781 ΙU/εβδομάδα) για την αντιμετώπιση της αναιμίας. Οι ασθενείς γωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα τη μέθοδο κάθαρσης στην οποία υποβάλλονταν: 16 ασθενείς υποβάλλονταν σε αιμοδιαδιήθηση με φίλτρα υψηλής ροής (high flux) (ομάδα HDF) και 16 ασθενείς υποβάλλονταν σε συμβατική αιμοκάθαρση με φίλτρα χαμηλής ροής (low flux) (ομάδα HD). Ο κάθε ασθενής ήταν στη συγκεκριμένη μέθοδο κάθαρσης για τουλάγιστον τρεις μήνες πριν εισαχθεί στην αντίστοιχη ομάδα. Κατά τη διάρκεια της μελέτης δεν υπήρξε αλλαγή στο μηγάνημα κάθαρσης (Gambro AK200 or Hospal Integra) ούτε στα φίλτρα και τις μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν (βιοσυμβατές, συνθετικές μεμβράνες πολυαμιδίου ή πολυακρυλονιτρίλιου, Gambro). Οι πρωτοπαθείς αιτίες της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας περιελάμβαναν την υπερτασική νεφροπάθεια (N=2), την νεφροπάθεια IgA (N=4), τη σπειραματονεφρίτιδα (N=4), την πολυκυστική νόσο των νεφρών (N=2), τη νεφροσκλήρυνση (N=2), τη νεφρολιθίαση (N=2) καθώς και περιπτώσεις νεφρικής ανεπάρκειας αγνώστου αιτιολογίας (N=16). Την ομάδα «μαρτύρων» αποτέλεσαν 12 υγιείς αιμοδότες, αντίστοιχου φύλου και ηλικιακής τάξης.

Όλοι οι ασθενείς οι οποίοι εντάχθηκαν στη μελέτη λάμβαναν συμπληρώματα διατροφής (καρνιτίνη 6g/εβδομάδα, βιταμίνη B1 100mg/εβδομάδα, βιταμίνη B6 100mg/εβδομάδα and B12 1g/εβδομάδα), σίδηρο (100mg/εβδομάδα) και ηπαρίνη (3,050±1,690 IU/συνεδρία). Ασθενείς που παρουσίαζαν σακχαρώδη διαβήτη, μη ελεγχόμενη υπέρταση, λοιμώξεις, κακοήθειες, φλεγμονές, αυτοάνοσα νοσήματα και

αιματολογικές νόσους ή ασθενείς που είχαν μεταγγιστεί εντός των προηγούμενων 3 μηνών αποκλείονταν από τη μελέτη. Τα δείγματα αίματος λήφθηκαν σε σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA (ή κιτρικό νάτριο για τη μελέτη των κυστιδίων), ακριβώς πριν την έναρξη και αμέσως μετά το τέλος της συνεδρίας κάθαρσης.

<u>2. Μέθοδοι</u>

2.1. Αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος

Ο αιματολογικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τον αυτόματο αναλυτή Sysmex K-4500 και ο βιοχημικός έλεγχος με τη χρήση του αυτόματου βιοχημικού αναλυτή Hitachi 9180 (Roche, Indianapolis, IN).

2.2. Απομόνωση και επεξεργασία ερυθροκυτταρικών μεμβρανών

2.2.1. Λευκαφαίρεση και αιμοπεταλιαφαίρεση σε κολώνες κυτταρίνης

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Για την απομόνωση των ερυθροκυττάρων από το ολικό αίμα πραγματοποιήθηκε λευκαφαίρεση και αιμοπεταλιαφαίρεση σε στήλες κυτταρίνης. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει το πέρασμα ολικού αίματος από στήλες που αποτελούνται από μείγμα κυτταρινών (μικροκρυσταλλικής και α-κυτταρίνης), με αποτέλεσμα την απομάκρυνση πάνω από το 99,75% του συνόλου των λευκοκυττάρων και της πλειονότητας των αιμοπεταλίων [213]. Τα λευκά αιμοσφαίρια λόγω μεγάλου μεγέθους δεν μπορούν να διαπεράσουν τους πόρους που δημιουργούνται, άρα κατακρατώνται στις κολώνες. Αντίστοιχα τα αιμοπετάλια λόγω μικρού μεγέθους χρειάζονται αρκετή ώρα για να περάσουν ή παγιδεύονται στους πολύ μικρούς πόρους.

<u>Υλικά-Αντιδραστήρια</u>

- Ισότονο διάλυμα φωσφορικών 310mosm (PBS), (5mM PO₄/150mM NaCl, pH 8.0)
- Κυτταρίνη a-cellulose, SIGMA
- Κυτταρίνη Sigmacell cellulose type 50, SIGMA
- Σύριγγες, 10ml
- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraus

Πειραματική διαδικασία:

- 1) Φυγοκέντρηση ολικού αίματος (1.000g, 10 λεπτά, 4°C) και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- 2) Αραίωση των πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων με ισότονο διάλυμα PBS.
- Ακολουθεί ανάμειξη των κυτταρινών, το μείγμα μεταφέρεται στις κολώνες και εμποτίζεται με διάλυμα PBS.
- 4) Προσθήκη του δείγματος στη στήλη.
- 5) Σταδιακή συλλογή του δείγματος και πλυσίματα με διάλυμα PBS σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C), για την απομάκρυνση των κυτταρινών.

2.2.2 Απομόνωση ερυθροκυτταρικών μεμβρανών

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Η απομόνωση των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών ελευθέρων αιμοσφαιρίνης γίνεται

με τη μέθοδο της υποτονικής αιμόλυσης [214] βασιζόμενη στο φαινόμενο της όσμωσης, ελαφρά τροποποιημένη με την προσθήκη αναστολέων πρωτεασών (PMSF) [215] για την αποφυγή της πρωτεόλυσης. Για λόγους βελτιστοποίησης της τεχνικής, όσον αφορά, αφενός μεν την αποφυγή αλλοιώσεων στα συστατικά της μεμβράνης, αφετέρου δε την απομάκρυνση του μεγαλύτερου δυνατού ποσού της αιμοσφαιρίνης, επιλέγονται συγκεκριμένες τιμές ιοντικής ισχύος και pH (20mOsm και pH 8.0 αντίστοιχα).

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Διάλυμα λύσης (20mosm) (Na₂HPO₄·2H₂O 5mM /NaH₂PO₄·H₂O 5mM /0,3mM PMSF, pH 8.0, 4°C)
- N-Ethyl-Maleimide (NEM) (MW=125,13), SIGMA
- PMSF (Phenyl mathyl sulfonyl fluoride) 200mM, SERVA
- Διάλυμα φωσφορικού νατρίου 50mM (50P8) (Na2HPO4·2H2O 50mM, NaH2PO4H2O 50mM, pH 8.0)
- Ψυχόμενη επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraus

Πειραματική διαδικασία: (συνέχεια από βήμα 5, §2.2.1)

- Μετά από το τελευταίο πλύσιμο για την απομάκρυνση των κυτταρινών, προστίθεται το διάλυμα λύσης.
- 7) Ακολουθεί φυγοκέντρηση (13.000rpm, 20 λεπτά, 4°C) και αναρρόφηση του υπερκειμένου και του δεύτερου ιζήματος στο οποίο περιέχονται άσπαστα ερυθροκύτταρα και πηκτώματα πρωτεασών.
- 8) Η διαδικασία επαναλαμβάνεται όσες φορές χρειαστεί μέχρι να αποχρωματιστεί το ίζημα των μεμβρανών (ghosts).
- Απομόνωση ερυθροκυτταρικών μεμβρανών για μελέτη πρωτεϊνών που περιέχουν σουλφυδρυλικές (-SH) ομάδες

Πειραματική διαδικασία: (συνέχεια από βήμα 5, §2.2.1)

- 6) Μετά από το τελευταίο πλύσιμο για την απομάκρυνση των κυτταρινών, προστίθεται το αντιδραστήριο NEM (100mM)/PBS.
- Ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- Προστίθεται το διάλυμα λύσης στο οποίο έχει προστεθεί το αντιδραστήριο NEM (100mM) και τα δείγματα επωάζονται για 45 min, 4°C.
- 9) Ακολουθεί φυγοκέντρηση (13.000rpm, 20 λεπτά, 4°C) και αναρρόφηση υπερκειμένου και δεύτερου ιζήματος.
- 10) Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να αποχρωματιστεί το ίζημα και να μείνουν «καθαρές» μεμβράνες, ελεύθερες αιμοσφαιρίνης (ghosts).

2.2.3 Υπολογισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δείγματος

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Ο προσδιορισμός της ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης κατά Bradford βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στις πρωτεΐνες, που προκαλεί μετατόπιση του μέγιστου της απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 στα

595nm [216]. Το αντιδραστήριο Bradford σχηματίζει με τις πρωτεΐνες σταθερό σύμπλοκο κυανού χρώματος για μία ώρα περίπου. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης άγνωστων δειγμάτων απαιτείται η δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Για κάθε δείγμα λαμβάνονται τρεις μετρήσεις και από αυτές υπολογίζεται ο μέσος όρος.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Κυβέτες φασματοφωτομέτρου, SIGMA
- Υπότονο διάλυμα φωσφορικών 5P₈ (Na₂HPO₄·2H₂O 5mM, NaH₂PO₄·H₂O 5mM, pH 8.0)
- Φασματοφωτόμετρο, ZEISS
- Χρωστική Bradford, BIO-RAD

Πειραματική διαδικασία:

- Μετά από την απομόνωση των μεμβρανών ακολουθεί αραίωση ποσότητας του δείγματος με υπότονο διάλυμα 5P₈ για τη μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.
- 2) Σε ποσότητα αραιωμένου δείγματος 10μl προστίθεται 790μl υπότονο διάλυμα 5P₈ και 200μl διάλυμα Bradford. Στο τυφλό προστίθεται 200μl διαλύματος Bradford σε 800μl υπότονου διαλύματος. Ακολουθεί καλή ανάμειξη και τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 25 λεπτά, για να ολοκληρωθεί και να σταθεροποιηθεί ο χρωματισμός του δείγματος.
- 3) Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 595nm.
- 4) Υπολογίζεται η συγκέντρωση κάθε δείγματος σε mg/ml από την πρότυπη καμπύλη.

2.2.4 Προετοιμασία πρωτεϊνικού δείγματος για ηλεκτροφόρηση

Για να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν οι απομονωμένες μεμβράνες για ηλεκτροφόρηση, είναι αναγκαία η επεξεργασία τους με ένα διάλυμα χρώσης. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με την ανάμειξη των διαλυμάτων 20% SDS-10mM EDTA, γλυκερόλη, β-μερκαπτοαιθανόλη και 1% μπλε της βρωμοφαινόλης. Το απορρυπαντικό SDS χρησιμοποιείται για αποδιάταξη των πρωτεϊνών προσδίδοντας σε αυτές αρνητικό φορτίο, η β-μερκαπτοαιθανόλη για την αποδιάταξη των ενδο- και δια- μοριακών δισουλφιδικών δεσμών, το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι απαραίτητο ώστε να είναι ορατό το δείγμα κατά το φόρτωμα στα πηγαδάκια και η γλυκερόλη αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος για την αποφυγή της διάχυσής του στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Β-μερκαπτοαιθανόλη, SIGMA
- Γλυκερόλη, FERAK
- EDTA (Ethyleno-diamino-tetraacetic acid disodium salt), MW=372.24, RESEARCH ORGANICS
- Θειικό δωδεκυλικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate SDS), MW =288.38, SIGMA
- Μπλε της βρωμοφαινόλης, SIGMA

Πειραματική διαδικασία

Για τελικό όγκο βαμμένου δείγματος 100λ, προστίθενται 26λ του διαλύματος χρώσης σε 74λ απομονωμένων μεμβρανών. Η αναλογία όγκου των διαλυμάτων SDS-10mM

EDTA, γλυκερόλης, β-μερκαπτοαιθανόλης και μπλε της βρωμοφαινόλης είναι 10:10:5:1, αντίστοιχα. Για μεμβράνες οι οποίες έχουν απομονωθεί με ταυτόχρονη χρήση του αντιδραστηρίου NEM, τα συστατικά του διαλύματος χρώσης είναι SDS-10mM EDTA, γλυκερόλη και μπλε της βρωμοφαινόλης σε αναλογία 10:10:1 αντίστοιχα και για τελικό όγκο βαμμένου δείγματος 100λ, προστίθενται 21λ του διαλύματος χρώσης σε 79λ απομονωμένων μεμβρανών. Το βαμμένο δείγμα, στη συνέχεια, τοποθετείται σε νερό που βράζει για 3 λεπτά και στη συνέχεια γίνεται αποθήκευση στους -80°C.

2.2.5 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κατά Laemmli

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών είναι μια διαδικασία κατά την οποία γίνεται διαχωρισμός φορτισμένων μακρομορίων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος, το ισοηλεκτρικό τους σημείο ή το φορτίο τους, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Στην επίπεδη SDS-PAGE αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση ομοιογενούς σύστασης κατά *Laemmli* [217], χρησιμοποιείται το μόριο SDS ώστε να καλυφθούν όλες οι πρωτεΐνες με αρνητικό φορτίο και έτσι ο διαχωρισμός τους να γίνει ανάλογα το μοριακό βάρος τους.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Ακρυλαμίδη, GIBCO BRL
- APS (Ammonium Persulfate), BIO-RAD
- Γλυκίνη (MW =75.07), APPLICHEM
- Δις-ακρυλαμίδη, SIGMA
- Ηλεκτρονικό πεχάμετρο
- Θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS) (MW =288.38), SIGMA
- Μείγμα μαρτύρων, THERMO MOLECULAR BIOLOGY
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης, BIO-RAD
- TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine), SIGMA
- Tris (MW=121.14), MERCK
- Συσκευή εφαρμογής τάσης
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl), MERCK

Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία ξεκινά με την παρασκευή των πηκτωμάτων διαχωρισμού και πακεταρίσματος. Η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στο πήκτωμα είναι αυτή που καθορίζει και τη διακριτική του ικανότητα, καθώς μεγάλη συγκέντρωση ακρυλαμίδης έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη ανάλυση πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους, ενώ χαμηλή συγκέντρωση βοηθά στην ανάλυση πρωτεϊνών υψηλού μοριακού βάρους.

Στο πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel), εκτός από τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης η οποία αλλάζει κάθε φορά ανάλογα το μέγεθος των πρωτεϊνών που θέλουμε να διαχωρίσουμε, τα υπόλοιπα διαλύματα βρίσκονται σε σταθερή συγκέντρωση. Πιο συγκεκριμένα το πήκτωμα περιέχει 10-15% διάλυμα ακρυλαμίδης-δις ακρυλαμίδης 30:0.8 w/v, 0.375M Tris/HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.025% APS, 0.083% TEMED. Μετά από καλή ανάμειξη των παραπάνω συστατικών το διάλυμα μεταφέρεται σε γυάλινα τζαμάκια όπου αφήνεται να πήξει για τη δημιουργία του πηκτώματος. Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του πηκτώματος διαχωρισμού, ακολουθεί η παρασκευή του πηκτώματος πακεταρίσματος, το οποίο εξασφαλίζει ότι όλες οι πρωτεΐνες θα ξεκινήσουν από το ίδιο σημείο για το διαχωρισμό τους. Το πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel), έχει σταθερή σύσταση ανεξάρτητα από το πήκτωμα διαχωρισμού και περιέχει: 3.05% διάλυμα ακρυλαμίδης-δις ακρυλαμίδης 30:0.8 w/v, 0.127M Tris/HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.17% TEMED. Ύστερα από καλή αλλά ήπια ανάδευση προστίθεται το πήκτωμα πακεταρίσματος πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού και ακολούθως εισάγεται το χτένι που θα δημιουργήσει τις θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων.

Αφού γίνει ο πολυμερισμός των δύο πηκτωμάτων, εισάγονται τα δείγματα στις ειδικές θέσεις υποδοχής, ενώ στην πρώτη υποδοχή εισάγονται δείγματα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (μάρτυρες). Στη συνέχεια, προστίθεται στη συσκευή το διάλυμα (Running buffer) που βοηθά στην επίδραση του ρεύματος πάνω στις πρωτεΐνες, μέσω των ηλεκτροδίων της συσκευής. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης κλείνει και τα δύο ηλεκτρόδια συνδέονται με ειδική συσκευή εφαρμογής τάσης. Έτσι, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών υπό σταθερό ρεύμα I=20 mA, για κάθε πήκτωμα πακεταρίσματος και υπό σταθερό ρεύμα I=35 mA, για κάθε πήκτωμα διαχωρισμού. Η ηλεκτροφόρηση σταματάει όταν η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης φτάσει σε απόσταση μισό εκατοστό από τη βάση του πηκτώματος διαχωρισμού και είναι εμφανείς όλες οι ζώνες των μοριακών βαρών των μαρτύρων.

Το διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (Running buffer) περιέχει 17.7 mM Tris, 192 mM γλυκίνη και 0.1% SDS, pH 8.3. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στη ρύθμιση του pH, η οποία δεν πρέπει να γίνεται με υδροχλωρικό οξύ διότι τα ιόντα χλωρίου μειώνουν την αναλυτική ικανότητα της μεθόδου.

2.2.6 Τεχνική ανοσοαποτυπώματος κατά Western

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Η τεχνική του ανοσοαποτυπώματος των πρωτεϊνών είναι μια αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών, που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά, από το πήκτωμα σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης (νιτροκυτταρίνη) καθώς και την ανίχνευσή τους με αντισώματα. Αυτή η διαδικασία είναι χρήσιμη για την ευκολότερη ανίχνευση των πρωτεϊνών από τα αντισώματα καθώς οι πρωτεΐνες προσδένονται επιφανειακά στις μεμβράνες της νιτροκυτταρίνης.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- anti-a-adducin (rabbit), Acris
- anti-aqp1 (rat), Cell Signaling Technology
- anti-band 3 (mouse), Santa-Cruz Biotechnology
- anti-calpain-1 (rabbit), Santa-Cruz Biotechnology
- anti-CD47 (rabbit), Santa Cruz Biotechnology
- anti-CD59 (goat), R&D Systems
- anti-DNP (rabbit), Millipore
- anti-flotillin-2 (mouse), BD Transduction Laboratories
- anti-GAPDH (mouse), Abnova
- anti-Glut-1 (rabbit), Acris GmbH
- anti-Hsp70 (rabbit), Santa Cruz Biotechnology

- anti-Hb (goat), Europa Bioproducts
- anti-IgGs-HRP (human), SIGMA-ALDRICH
- anti-peroxiredoxin 2 (rabbit), Acris GmbH
- anti-4.1R (rabbit)
- anti-sCLU (goat), Santa-Cruz Biotechnology
- anti-spectrin (rabbit), SIGMA-ALDRICH
- anti-stomatin (mouse)
- anti-synexin (mouse), BD Transduction Laboratories
- anti-ubiquitin (rabbit), Cell Signaling Technology
- Ακτινογραφικό φίλμ,
- Β-μερκαπτοαιθανόλη, SIGMA-ALDRICH
- Γλυκίνη (MW=75.07), APPLICHEM
- Διηθητικό χαρτί Whatmann 3MM, SCHLEICHER & SCHUELL
- ECL Western Blotting Detection Reagents, GE HEALTHCARE
- Εμφανιστής D-19, SIGMA
- HRP-conjugated anti-mouse IgG, DakoCytomation
- HRP-conjugated anti-rabbit IgG, R&D Systems
- HRP-conjugated anti-goat IgG, SIGMA-ALDRICH
- Θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS) (MW =288.38), SIGMA
- Κασέτα εμφάνισης
- KCl (MW=74.55), SIGMA
- KH₂PO₄ (MW=136.1), MERCK
- Λαβίδες
- Μεθανόλη, SIGMA
- NaCl (MW=58.44), OmniPur
- Na₂HPO₄·2H₂O (MW=177.9), MERCK
- Νιτροκυτταρίνη 0.45 μm, 33cm x 3mm, BIO-RAD
- Στερεωτής (fixer) ακτινογραφικού φιλμ, ALPHA CHEMICALS
- Συσκευή εφαρμογής τάσης
- Transblot SDI Semidry Transfer Gel, BIO-RAD
- Tris (MW=121.14), MERCK

Πειραματική διαδικασία

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης τα πηκτώματα στα οποία έχει γίνει ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών μεταφέρονται στην ειδική συσκευή της Transblot-SDI Semidry Transfer Gel. Πιο συγκεκριμένα, τοποθετούνται 6 φύλλα χαρτιών Whatmann, διαστάσεων 6 x 9.3 mm, το ένα πάνω στο άλλο, τα οποία έχουν εμποτιστεί προηγουμένως σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer). Μετά από την τοποθέτηση κάθε χαρτιού είναι αναγκαία η απομάκρυνση φυσαλίδων που μπορεί να έχουν εγκλωβιστεί ενδιάμεσα, καθώς τα κενά αέρος που ίσως υπάρχουν θα εμποδίσουν τη μεταφορά των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια τοποθετείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, διαστάσεων 5.5 x 8.8 mm, η οποία προηγουμένως έχει εμποτιστεί σε απεσταγμένο νερό, και αφαιρούνται όπως και προηγουμένως τυχόν φυσαλίδες. Ακολουθεί η τοποθέτηση του πηκτώματος πάνω στην νιτροκυτταρίνη με το σωστό προσανατολισμό και τέλος τοποθετούνται άλλα 6 φύλλα

χαρτιών Whatmann εμποτισμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Σε κάθε στάδιο είναι απαραίτητη η αφαίρεση των φυσαλίδων. Η συσκευή κλείνει, ενώνεται με συσκευή εφαρμογής τάσης μέσω ηλεκτροδίων και ακολουθεί η μεταφορά πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη για περίπου 50 λεπτά σε σταθερή τάση 20 V.

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς (Transfer buffer) είναι:

Tris 50mM, Glycine 40mM, SDS 0.04%, Methanol 20%, pH 8.3

Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στο φύλλο νιτροκυτταρίνης ακολουθεί ανίχνευση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει με, ειδικά για την πρωτεΐνη, αντισώματα. Αρχικά, γίνεται κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος με επώαση της μεμβράνης σε άπαχο γάλα (5% σε διάλυμα PBS-Tween) (blocking). Ακολουθεί επώαση των μεμβρανών με το πρωτογενές αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Αφού τελειώσει η επώαση και αφού ξεπλυθεί καλά η μεμβράνη με διάλυμα PBS-T (Tween 0.1% σε PBS), ακολουθεί η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP-Horseradish Peroxidase).

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS είναι:

NaCl 1.37M, KCl 27mM, Na₂HPO₄·2H₂O 80.6mM, KH₂PO₄ 19.4mM

Στη συνέχεια γίνεται ανίχνευση του σήματος με το σύστημα ECL που βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Συγκεκριμένα, η νιτροκυτταρίνη επωάζεται με το υπόστρωμα του ενζύμου HRP (horseradish peroxidase), τη λουμινόλη, η οποία οξειδώνεται και διεγείρεται. Επιστρέφοντας στην κατάσταση ηρεμίας παράγει φως το οποίο προσβάλλει φωτοευαίσθητα φιλμ αυτοραδιογραφίας. Η ανίχνευση του σήματος γίνεται σε σκοτεινό θάλαμο, λόγω της φωτοευαισθησίας των φιλμ. Πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με το αντιδραστήριο ECL και ακολουθεί τοποθέτησή της σε ειδική κασέτα μαζί με το κομμάτι του φιλμ. Στη συνέχεια γίνεται εμφάνιση των ζωνών με το διάλυμα D19. Το φιλμ ξεπλένεται σε νερό και ακολουθεί "στερέωση" με το διάλυμα Fixer.

Μετά το τέλος της ανοσοεντόπισης, είναι δυνατή η επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία, για τον εντοπισμό και άλλων πρωτεϊνών που πιθανόν υπάρχουν στο ίδιο δείγμα. Για την πραγματοποίηση ενός νέου κύκλου ανοσοεντόπισης, είναι αναγκαία η αποκόλληση (stripping) των προηγούμενων ιχνηθετών που τοποθετήθηκαν στη μεμβράνη κατά τον πρώτο κύκλο. Αυτό επιτυγχάνεται με επώαση της μεμβράνης στους 50°C, για 30 λεπτά σε διάλυμα απορρυπαντικού (Stripping buffer) που περιέχει β-μερκαπτοαιθανόλη, σε κατάλληλη ποσότητα ώστε η τελική συγκέντρωσή της να είναι 0.7%. Ακολουθούν ξεπλύματα της μεμβράνης και στέγνωμα, ώστε να είναι έτοιμη για τον επόμενο κύκλο ανοσοεντόπισης.

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος Stripping buffer είναι:

Tris-HCl 62.5mM, 2% SDS, pH 7.6

2.2.7 Ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνών των πηκτωμάτων και των φιλμ

Τα πηκτώματα καθώς και τα φιλμ σαρώνονται και πυκνομετρούνται με τη βοήθεια του προγράμματος επεξεργασίας εικόνων Gel Analyser ver 1.0.

Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται εκτίμηση της ποσότητας της κάθε ζώνης περιλαμβάνει τον ορισμό του υποβάθρου και του περιγράμματος της κάθε ζώνης. Συγκεκριμένα, ο χρήστης ορίζει την περιοχή του υποβάθρου της ζώνης και στη συνέχεια το περίγραμμα της

ζώνης. Μετά από την αφαίρεση του υποβάθρου υπολογίζεται το άθροισμα της φωτεινότητας όλων των εικονοστοιχείων (pixels) που περιέχονται στη ζώνη και οι τιμές που προκύπτουν επεξεργάζονται με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Office Excel. Για κάθε δείγμα, υπολογίζεται η τιμή της κάθε πρωτεϊνικής ζώνης, το άθροισμα των τιμών όλων των πρωτεϊνών, καθώς και η τιμή του λόγου της κάθε πρωτεΐνης προς το άθροισμα αυτό ή προς μια πρωτεΐνη αναφοράς η οποία εμφανίζει σταθερές τιμές ανάμεσα στα δείγματα.

2.3. Μέτρηση των επιπέδων καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (μέθοδος Oxyblot)

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Η μέθοδος Oxyblot χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της μη αναστρέψιμης καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντίδραση των καρβονυλικών ομάδων με το αντιδραστήριο DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) και στη δημιουργία ενός σταθερού παραγώγου DNP (2,4-dinitrophenyl) προσφέροντας έναν ευαίσθητο, αξιόπιστο και απλό στη χρήση τρόπο για την εύρεση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί από οξειδωτικές επιδράσεις στο κύτταρο.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Β-μερκαπτοαιθανόλη, SIGMA
- Oxyblot detection kit, MILLIPORE
- Θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS) (MW=288.38), SIGMA

Πειραματική διαδικασία

- 1) Οι απομονωμένες μεμβράνες (12-15μg) διαλυτοποιούνται σε διάλυμα 12% SDS.
- Προστίθεται ποσότητα αντιδραστηρίου DNPH και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3) Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη του διαλύματος ουδετεροποίησης.
- 4) Το μίγμα ανάγεται με β-μερκαπτοαιθανόλη (5% τελική συγκέντρωση).

Τα πρωτεϊνικά δείγματα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση και ακολουθεί ανίχνευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών με τη μέθοδο ανοσοαποτυπώματος και τη χρήση ειδικού αντισώματος (anti-DNP). Υπολογίζεται ο δείκτης καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών (Proteome Carbonylation Index-PCI) ο οποίος αντιστοιχεί στο πηλίκο του σήματος των οξειδωμένων πρωτεϊνών προς το σήμα μιας πρωτεΐνης ή του αθροίσματος πρωτεϊνών που εμφανίζουν σχετικά σταθερές τιμές ανάμεσα στα δείγματα.

2.4. Προετοιμασία για παρατήρηση της μορφολογίας ερυθροκυττάρων με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης - ΗΜΣ (Scanning Electron Microscope - SEM)

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (ΗΜΣ) στηρίζεται στην αρχή λειτουργίας ενός καθοδικού σωλήνα και περιέχει πηνία για την απόκλιση δέσμης ηλεκτρονίων, η οποία «σαρώνει» την επιφάνεια του παρασκευάσματος. Η αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων με

το παρασκεύασμα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα: 1) την ανάκλαση των ηλεκτρονίων (οπισθοσκεδαζόμενα), 2) την έξοδο των ηλεκτρονίων από την επιφάνεια του παρασκευάσματος (δευτερογενή), 3) την ελευθέρωση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Ανάλογα τις πληροφορίες που θέλουμε να πάρουμε οι ανιχνευτές χρησιμοποιούν και τα αντίστοιχα ηλεκτρόνια. Για παράδειγμα, για την παρατήρηση της ακρότατης επιφανειακής μορφολογίας, χρησιμοποιούνται μόνο τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, ενώ για την παρατήρηση της βαθύτερης μορφολογίας, τα οπισθοσκεδαζόμενα.

Κατά την επεξεργασία των δειγμάτων που προορίζονται για παρατήρηση στο ΗΜΣ, είναι αναγκαία η φάση της μονιμοποίησης. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει την ακινητοποίηση όλων των διεργασιών μεταβολισμού του κυττάρου με σκοπό να μην γίνονται αυτολυτικές αντιδράσεις από τα υδρολυτικά ένζυμα, αλλά σχηματίζονται δεσμοί ανάμεσα στα βιομόρια ώστε το κυτταρόπλασμα να μετατραπεί σε πήκτωμα διατηρώντας το σχήμα, τον όγκο και την θέση των διαφόρων οργανιδίων κατά τα επόμενα στάδια. Κατά την φάση της αφυδάτωσης γίνεται αντικατάσταση των μορίων νερού του μονιμοποιημένου βιολογικού υλικού από ένα μέσον αφυδάτωσης (π.χ. αιθανόλης). Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε παρατήρηση της επιφανειακής μορφολογίας των ερυθροκυττάρων. Για την παραγωγή των δευτερογενών ηλεκτρονίων από την επιφάνεια του δείγματος πραγματοποιείται κάλυψη με στρώμα Χρυσού-Παλλαδίου (Au-Pd) ώστε το δείγμα να γίνει αγώγιμο.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Αιθανόλη 100%, MERK, BDH
- Γλουταρική αλδεΰδη, SERVA
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf, 5410
- Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης, PHILIPS SEM 515
- Κακοδυλικό νάτριο, SERVA
- Καλυπτρίδες
- Τετροξείδιο του οσμίου (OsO4), SIGMA
- Σουκρόζη, SIGMA
- Συσκευή κάλυψης Χρυσού-Παλλαδίου, Tousimis Samsputter-2a
- Ταινία διπλής όψης

Πειραματική διαδικασία

- Σε 20μl από το ίζημα με τα πακεταρισμένα ερυθροκύτταρα προστίθεται διάλυμα 2% γλουταραλδεΰδης σε 0.1 mM κακοδυλικό νάτριο pH 7.4. Επώαση για μία ώρα.
- Ακολουθεί πλύση με διάλυμα 4% σουκρόζης σε 0,1Μ κακοδυλικό νάτριο στους 4°C, για 15λεπτά. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές.
- 3) Προσθήκη διαλύματος 1% OsO_4 σε 0.1 mM κακοδυλικό νάτριο pH 7.4 και επώαση για μία ώρα στους 4°C.
- 4) Ακολουθεί ξέπλυμα με διάλυμα 4% σουκρόζης σε 0.1 mM κακοδυλικό νάτριο pH 7.4. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά.
- 5) Αφυδάτωση με αιθανόλη σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις 30-50-70-85-95-100-100%.
- 6) Αραίωση των πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων με διάλυμα 100% αιθανόλης και επίστρωση του δείγματος σε καλυπτρίδα.

 Στέγνωμα στον αέρα - κάλυψη με Χρυσό-Παλλάδιο και παρατήρηση στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης.

Τα ερυθροκύτταρα κατηγοριοποιούνται σε μη αναστρέψιμα, δισκοκύτταρα και αναστρέψιμα ανάλογα με την ικανότητά τους να επανέρχονται ή όχι στο φυσιολογικό δισκοκυτταρικό σχήμα όταν βελτιωθούν οι συνθήκες του περιβάλλοντος. Ως μη αναστρέψιμες μορφές θεωρούνται τα σφαιρο-εχινοκύτταρα, τα σφαιροκύτταρα, τα οβαλοκύτταρα, τα ελλειπτοκύτταρα, τα δακρυοκύτταρα και τα σχιστοκύτταρα. Ως αναστρέψιμα θεωρούνται τα κύτταρα που αποκλίνουν από το φυσιολογικό δισκοκυτταρικό σχήμα αλλά δεν ανήκουν στις μη αναστρέψιμες μορφές.

2.5. Μέτρηση της οσμωτικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι τα ερυθροκύτταρα με προοδευτική μείωση της πυκνότητας διαλύματος NaCl από 0,9% σε 0,1% αιμολύονται, καθώς το διάλυμα 0,9% NaCl είναι ισότονο για αυτά ενώ η μείωση της συγκέντρωσης σε NaCl κάνει τα διαλύματα υπότονα. Ο δείκτης οσμωτικής ευθραυστότητας (MCF) δείχνει την ευαισθησία των ερυθροκυττάρων στην αιμόλυση λόγω οσμωτικού στρες και είναι εκείνη η συγκέντρωση του διαλύματος NaCl που προκαλεί λύση σε ποσοστό 50% [218].

Υλικά-Αντιδραστήρια

- NaCl (MW=58.44), OmniPur
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf, 5410

Πειραματική διαδικασία

- 1) Προσθήκη 10λ ολικού αίματος σε διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων NaCl (0,0-0,9%).
- 2) Ήπια ανάδευση και επώαση για 15λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3) Φυγοκέντρηση (800g για 5 λεπτά).
- 4) Φωτομέτρηση υπερκείμενου στα 540nm.

Με βάση την πρότυπη καμπύλη απορρόφησης και συγκέντρωσης NaCl, υπολογίζεται η συγκέντρωση του NaCl που προκελεί λύση στο 50% των κυττάρων. Στο διάλυμα 0,9% NaCl, η αιμόλυση θεωρείται 0%.

2.6. Μέτρηση της μηχανικής ευθραυστότητας των ερυθροκυττάρων

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται μικρά, μεταλλικά σφαιρίδια τα οποία ασκούν μηχανικό στρες στα ερυθροκύτταρα, ύστερα από ανάδευση σε κατάλληλο μηχάνημα (Rocker) [219, 220]. Η μηχανική ευθραυστότητα είναι δείκτης της ικανότητας των ερυθροκυττάρων να αντέχουν στη μηχανική καταπόνηση κατά τη μετακίνησή τους στην κυκλοφορία.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf, 5410
- Ισότονο διάλυμα φωσφορικών (PBS 310mOsm)
- Μεταλλικά σφαιρίδια (beads)
- Rocker, Grant Bio PTR-35

Πειραματική διαδικασία

1) Φυγοκέντρηση ολικού αίματος και απομάκρυνση του υπερκειμένου.

- Αραίωση των πακεταρισμένων ερυθροκυττάρων με ισότονο διάλυμα φωσφορικών (αιματοκρίτης 20%).
- 3) Προσθήκη μεταλλικών σφαιριδίων και ανάδευση για 1 ώρα σε 18rpm (10")- 17° (5"). Για το κάθε δείγμα υπάρχει το αντίστοιχο δείγμα-μάρτυρας, στο οποίο δεν προστίθεται σφαιρίδια και δεν αναδεύεται, αλλά η υπόλοιπη διαδικασία ακολουθείται κανονικά.
- 4) Φυγοκέντρηση (2.750g για 15λεπτά, 4°C). Το υπερκείμενο απομονώνεται και φυγοκεντρείται ξανά (20.800g για 20λεπτά, 4°C).
- 5) Ακολουθεί μέτρηση της αιμοσφαιρίνης στο υπερκείμενο των δειγμάτων και των μαρτύρων (κατά Harboe με διόρθωση Allen [220]).

Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται ως εξής: (βλ. Κεφ.2.11 μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος):

Hb (mg/100ml) = $[(167.2 \text{ x } A_{415}) - (83.6 \text{ x } A_{380}) - (83.6 \text{ x } A_{450})] \text{ x } 1/1000 \text{ x } araiwsgn x 100$

Ο δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας MFI υπολογίζεται ως εξής:

MFI = [(συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης υπερκειμένου δείγματος - συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης υπερκειμένου μάρτυρα) / (ολική Hb δείγματος στο 20% αιματοκρίτη - συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης υπερκειμένου μάρτυρα)] x 100.

2.7. Μέτρηση ενδοκυττάριων επιπέδων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS)

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Η μέτρηση των ενδοκυττάριων επιπέδων ROS (Reactive Oxygen Species) βασίστηκε στη χρήση του αντιδραστηρίου CMH₂DCFDA. Αυτό είναι ένα λιπόφιλο, μη φθορίζον συστατικό το οποίο διαπερνά τη πλασματική μεμβράνη, εισέρχεται στο κύτταρο, κόβεται από εστεράσες, οξειδώνεται από τα ενδοκυττάρια ROS και φθορίζει. Έτσι, τα επίπεδα φθορισμού αντικατοπτρίζουν άμεσα τα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- CMH₂DCFDA, Invitrogen
- D-γλυκόζη, SIGMA
- Diamide, SIGMA
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf, 5410
- Ισότονο διάλυμα φωσφορικών (PBS 310mOsm)
- t-BHP (tert-butyl-hydroperoxide), SIGMA
- Φθορισμόμετρο VersaFluorTM, Bio-Rad
- ddH₂O

Πειραματική διαδικασία

- 1) Απομόνωση ερυθροκυττάρων από ολικό αίμα και αραίωση σε ισότονο διάλυμα φωσφορικών με προσθήκη γλυκόζης (5mM).
- Προσθήκη αντιδραστηρίου CMH₂DCFDA (5µM) σε κάθε δείγμα και επώαση, υπό ανάδευση, σε σκοτάδι για 30 λεπτά.
- 3) Ακολουθεί πλύση των κυττάρων με διάλυμα PBS και επώαση στο σκοτάδι για 12 λεπτά.
- 4) Ξεπλύματα με διάλυμα φωσφορικών/γλυκόζης.
- 5) Λύση με ddH₂O και μέτρηση στο φθορισμόμετρο. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράζονται σε RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού. (Μήκος κύματος διέγερσης: 490nm, Μήκος κύματος εκπομπής: 520nm)

Για τη μελέτη της επιδεκτικότητας των ερυθροκυττάρων σε εζωγενή οζειδωτικά ερεθίσματα προηγείται:

- ✓ Επώαση των δειγμάτων με Diamide (2mM), 45λεπτά, 37°C.
- ✓ Επώαση των δειγμάτων με t-BHP (100μM), 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

2.8. Μέτρηση ενδοκυττάριων επιπέδων ιόντων Ca²⁺

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Η μέτρηση των ενδοκυττάριων επιπέδων Ca²⁺ βασίστηκε στη χρήση του αντιδραστηρίου Fluo 4-AM. Αυτό είναι ένα λιπόφιλο, μη φθορίζον συστατικό το οποίο διαπερνά τη πλασματική μεμβράνη, εισέρχεται στο κύτταρο, κόβεται από εστεράσες, αντιδρά με ιόντα ασβεστίου και φθορίζει.

Υλικά-Αντιδραστήρια

- D-γλυκόζη, SIGMA
- CaCl₂, SIGMA
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Eppendorf, 5410
- Fluo 4-AM, Molecular Probes
- Hepes, FLUKA
- NaOH, MERCK
- Ισότονο διάλυμα φωσφορικών (PBS 310mOsm)
- KCl, SIGMA
- NaCl (MW=58.44), OmniPur
- Πυροσταφυλικό νάτριο, GIBCO
- ddH₂O

Πειραματική διαδικασία

- Απομόνωση ερυθροκυττάρων από ολικό αίμα και αραίωση σε ισότονο διάλυμα φωσφορικών.
- Προσθήκη αντιδραστηρίου Fluo4-AM (2μM) σε κάθε δείγμα και επώαση, υπό ανάδευση, σε σκοτάδι για 40 λεπτά, στους 37°C.
- 3) Ακολουθεί πλύση των κυττάρων (145mM NaCl, 7.5mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 10mM γλυκόζη, 10mM Hepes/NaOH pH 7.4, 10mM πυροσταφυλικό νάτριο) και επώαση στο σκοτάδι για 12 λεπτά.

 Αύση με ddH₂O και μέτρηση στο φθορισμόμετρο. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράζονται σε RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού. (Μήκος κύματος διέγερσης: 490nm, Μήκος κύματος εκπομπής: 520nm)

2.9. Μέτρηση της εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης (PS) με κυτταρομετρία ροής *Αρχή μεθόδου*

Στα ερυθροκύτταρα η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης αποτελεί δείκτη γήρανσης, ερυθρόπτωσης, οξειδωτικού στρες και γενικότερα δείκτη ταχείας κυτταρικής εκκαθάρισης από την κυκλοφορία. Η αννεξίνη V είναι μια πρωτεΐνη η οποία συνδέεται επιλεκτικά με τη φωσφατιδυλοσερίνη και χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό των αποπτωτικών κυττάρων [221].

Υλικά-Αντιδραστήρια

- anti-annexinV PE, BD Biosciences
- anti-CD235, BD Biosciences
- BSA (Bovine Serum Albumin), SANTA CRUZ
- Διάλυμμα αννεξίνης, BD Biosciences
- Κυτταρομετρητής, BD FACScan

Πειραματική διαδικασία

- 1) Αραίωση ολικού αίματος (1:500) με διάλυμα αννεξίνης (3.5% BSA).
- Προσθήκη 1,5 μl αντισώματος AnnexinV και 1,5 μl αντισώματος CD235 σε 50μl αραιωμένου δείγματος. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 3) Προσθήκη 500μl διαλύματος αννεξίνης, για να τερματιστεί η αντίδραση.
- 4) Μέτρηση και ανάλυση των δεδομένων (τουλάχιστον 100.000 counts ανά δείγμα).

2.10. Μέτρηση επιπέδων αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος - FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Για τη μέτρηση των επιπέδων συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος (Total Antioxidant Capacity of plasma, TAC) πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ικανότητας αναγωγής του συμπλόκου Fe³⁺-TPTZ σε Fe²⁺-TPTZ από τα αντιοξειδωτικά του πλάσματος. Σε χαμηλό pH, η αναγωγή του συμπλόκου τρισθενούς σιδήρουτριπυριδυλοτριαζίνη (Fe³⁺-TriPyridylTriaZine) σε σύμπλοκο δισθενούς σιδήρου-TPTZ (Fe²⁺-TPTZ) (η οποία έχει ένα έντονο μπλε χρώμα) μπορεί να μετρηθεί από την αλλαγή στην απορρόφηση σε μήκος κύματος 593nm [222]. Για τη μέτρηση του ποσοστού συμμετοχής του ουρικού οξέος και των υπολοίπων αντιοξειδωτικών συστατικών, στην αναγωγική ικανότητα του πλάσματος, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο ουρικάση, το οποίο υδρολύει το ουρικό οξύ [223].

Υλικά-Αντιδραστήρια

- Οξικό οξύ, SIGMA
- TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) (MW=312.34), SIGMA

- HCl, SIGMA
- FeCl₃·6H₂O (MW=270.30), SIGMA
- Uricase, SIGMA
- Φωτόμετρο, BIO-RAD

Το αντιδραστήριο FRAP είναι έτοιμο μετά από ανάμειξη των διαλυμάτων: Οξικό οξύ (300mM, pH 3.6), TPTZ 10mM – HCl (40mM) και FeCl₃· $6H_2O$ 20mM, σε αναλογία 10:1:1 αντίστοιχα.

Πειραματική διαδικασία

- 1) Αραίωση πλάσματος (30x) με αντιδραστήριο FRAP.
- 2) Επώαση για 4 λεπτά στους 37°C.
- 3) Φωτομέτρηση στα 593nm.
- Μέτρηση της ειδικής συμμετοχής του ουρικού οξέος στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με δείγμα πλάσματος το οποίο έχει προ-επωαστεί με διάλυμα ουρικάσης (0.125 U/mL) σε θερμοκρασία δωματίου.

Η απορρόφηση αντιστοιχεί με τη χρήση πρότυπης καμπύλης σε συγκέντρωση (μM) ιόντων ${\rm Fe}^{2+}.$

2.11. Μέτρηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Η μέτρηση της αιμοσφαιρίνης κατά Harboe βασίστηκε αρχικά στο γεγονός ότι η οξυαιμοσφαιρίνη έχει μέγιστη απορρόφηση στα 415nm. Όμως, συστατικά του πλάσματος όπως η χολερυθρίνη, η αλβουμίνη και τα λιπίδια έχουν εξίσου σημαντική απορρόφηση σε αυτήν την περιοχή. Για το λόγο αυτό, οι μετρήσεις στα 380nm και 450nm χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία μια μαθηματικής σχέσης (Allen correction) ώστε να υπολογίζεται απευθείας η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, χωρίς την επίδραση άλλων συστατικών του πλάσματος [220].

Πειραματική διαδικασία

- 1) Αραίωση (1:10) σε dH_2O
- 2) Ακολουθεί καλή ανάδευση των δειγμάτων.
- 3) Επώαση για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Μέτρηση στα 380nm 415nm 450nm.

Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται ως εξής:

Hb $(mg/100ml) = [(167.2 \text{ x } A_{415}) - (83.6 \text{ x } A_{380}) - (83.6 \text{ x } A_{450})] \text{ x } 1/1000 \text{ x } \alpha \rho \alpha i \omega \sigma \eta \text{ x } 100.$

2.12. Μέτρηση των επιπέδων κυστιδιοποίησης με κυτταρομετρία ροής

<u>Αρχή μεθόδου</u>

Σε αυτή τη μέθοδο, μια δέσμη φωτός μεμονωμένου μήκους κύματος (λέιζερ) κατευ-

θύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλει το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού. Κάθε σωματίδιο αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως διαφορετικού μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός προσλαμβάνεται από τους ανιγνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του σωματιδίου (κυττάρου ή κυστιδίου) και η πλάγια σκέδαση "SSC" (Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ. σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Τα κυστίδια ταυτοποιήθηκαν με βάση το μέγεθός τους (<1μm), την εξωτερίκευση PS (Annexin V^+) και την κυτταρική προέλευσή τους (CD235⁺, αντίσωμα έναντι της γλυκοφορίνης που είναι πρωτεΐνη χαρακτηριστική των ερυθροκυττάρων). Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των κυστιδίων χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια ορισμένου μεγέθους σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ενώ για τον προσδιορισμό του απόλυτου αριθμού των μικροκυστιδίων (κυστίδια/μL) χρησιμοποιήθηκαν ειδικά σωληνάκια με φθορίζοντα κυστίδια γνωστής συγκέντρωσης (TruCount tubes).

Υλικά-Αντιδραστήρια

- anti-annexinV PE, BD Biosciences
- Διάλυμμα αννεξίνης, BD Biosciences
- Κυτταρομετρητής, BD FACScan
- Σωληνάκια TruCounts, BD Biosciences

Πειραματική διαδικασία

- 1) Απομόνωση πλάσματος από ολικό αίμα.
- 2) Προσθήκη 10μl πλάσματος σε 90μl ρυθμιστικού διαλύματος αννεξίνης.
- Προσθήκη 3μl αντισώματος annexinV και 4μl αντισώματος CD235. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Προσθήκη 400μl διαλύματος αννεξίνης, για να τερματιστεί η αντίδραση.
- 5) Μέτρηση και ανάλυση των δεδομένων (τουλάχιστον 100.000 counts ανά δείγμα).

2.13. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων και ανάλυση δικτύων

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences, έκδοση 22.0). Οι διαφορές ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών καθώς και η επίδραση της αιμοκάθαρσης ελέχθηκαν μέσω t-test (independent samples t-test και paired t-test, αντίστοιχα), ενώ οι διαφορές των ομάδων των ασθενών με τα υγιή άτομα ελέγχθηκαν με ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA, one way analysis of variance). Η κατηγοριοποίηση των παραμέτρων που μελετήθηκαν έγινε με ανάλυση παραγόντων (Factor analysis) και η πρόβλεψη παραμέτρων με ανάλυση παλινδρόμησης (Regression analysis). Η ανάλυση παραγόντων είναι μια στατιστική μέθοδος η οποία διαπιστώνει τον τρόπο συσχέτισης πολλών διαφορετικών παρατηρήσεων και προσδιορίζει πόσες θεωρητικές κατασκευές

(παράγοντες) θα μπορούσαν να εξηγήσουν με τον απλούστερο δυνατό τρόπο αυτό που παρατηρείται. Η εύρεση των συσχετίσεων μεταξύ των παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με ελέγχους κατά Pearson και Spearmann, ανάλογα με την κανονικότητα της κατανομής των παραμέτρων (κανονική και μη κανονική κατανομή, αντίστοιχα). Ως στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα με P<0,05 ή P<0,01.

Για τη σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραμέτρων που μελετήθηκαν και τη δημιουργία δικτύων, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Cytoscape 3.2.0. Οι γραμμές συνδέουν παραμέτρους με στατιστικά σημαντικές θετικές (συνεχείς γραμμές) ή αρνητικές (διακεκομμένες γραμμές) συσχετίσεις μεταξύ τους (όσο πιο κοντά βρίσκονται οι παράμετροι, τόσο πιο ισχυρή είναι η συσχέτιση). Οι κύκλοι δείχνουν κομβικά σημεία του δικτύου, δηλαδή παραμέτρους οι οποίες παρουσιάζουν συνδέσεις με πληθώρα άλλων παραμέτρων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ1. Μελέτη των επιδράσεων των υψηλών δόσεων ερυθροποιητίνης στα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα ασθενών με ΧΝΑ τελικού σταδίου. Σύγκριση ασθενών που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με rhEpO (non responders, NR) με ασθενείς που ανταποκρίνονται (responders, R) και υγιείς μάρτυρες.

1. Αιματολογικό πρότυπο και χαρακτηριστικά του πλάσματος

Όλοι οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από αναιμία και αιματολογικούς δείκτες χρόνιας φλεγμονής (διαταραχή στην ομοιόσταση του σιδήρου, στο δείκτη εύρους κατανομής μεγέθους των ερυθροκυττάρων (RDW), στα επίπεδα ουδετερόφιλων, HDL κα.) (Πίνακας 1).

Το αιματολογικό και το βιοχημικό πρότυπο δε διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες των ασθενών πριν από την αιμοκάθαρση, παρά μόνο στα επίπεδα ουρίας και ουρικού οξέος τα οποία παρουσιάζονται υψηλότερα στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς. Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης έχει θετική επίδραση στα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης αίματος (Hb) και στα επίπεδα της μέσης ενδοκυττάριας συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης (MCHC) στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς αλλά αρνητική επίδραση στο μέσο όγκο ερυθροκυττάρων (MCV) των ανταποκρινόμενων ασθενών (Πίνακας 1).

ουραιμικό πλάσμα χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα ολικής То αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος (TAC) σε σχέση με το πλάσμα των υγιών ατόμων, ενώ παρουσιάζει και παθολογικά επίπεδα τόσο ολικών (MVs) όσο και ερυθροκυτταρικών κυστιδίων (R-MVs) (E1K.1A). Το πλάσμα των ανταποκρινόμενων ασθενών γαρακτηρίζεται επιπλέον από υψηλά επίπεδα αιμόλυσης (ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, fHb) τόσο πριν όσο και μετά από την αιμοκάθαρση (Εικ.1B). Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης οδηγεί σε μείωση τόσο της ολικής (TAC) όσο και της εξαρτώμενης από τα επίπεδα του ουρικού οξέος (UA/AC) αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος, σε επίπεδα κάτω των φυσιολογικών. Επιπλέον, η αιμοκάθαρση σχετίζεται με μείωση των ολικών κυστιδίων σε όλους τους ασθενείς, χωρίς όμως να τα επαναφέρει σε φυσιολογικά επίπεδα, ενώ μειώνει σημαντικά τα ερυθροκυτταρικά κυστίδια μόνο των ανταποκρινόμενων ασθενών (από 3.258±1.375 κυστίδια/μL προ-ΑΙΚ σε 1.214±822 κυστίδια/μL μετά-ΑΙΚ) χωρίς να προκαλεί σημαντικές αλλαγές στα ερυθροκυτταρικά κυστίδια των μη ανταποκρινόμενων ασθενών (2.443±656 κυστίδια/μL προ-AIK, 2.619±1.072 κυστίδια/μL μετά-AIK). Έτσι, οι μη ανταποκρινόμενοι ασθενείς χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα κυστιδίων στο πλάσμα τους μετά την αιμοκάθαρση σε σχέση με τους ανταποκρινόμενους (Εικ.1B).

Πειράματα ανασύστασης ανάμεσα σε ουραιμικά ερυθροκύτταρα και φυσιολογικό πλάσμα ή φυσιολογικά ερυθροκύτταρα και ουραιμικό πλάσμα έδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του ουραιμικού πλάσματος (πριν από την αιμοκάθαρση) σε σχέση με το φυσιολογικό. Η αντιοξειδωτική δράση του ουραιμικού πλάσματος αποδίδεται κυρίως στο ουρικό οξύ, καθώς με την προσθήκη ουρικάσης στο ουραιμικό πλάσμα καταργείται η ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση (Εικ.2). Επιπλέον, το ουραιμικό πλάσμα αναστέλλει και την αιμόλυση στα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα, δράση η οποία επίσης αποδίδεται στο ουρικό οξύ καθώς προ-επώαση του πλάσματος με ουρικάση αυξάνει μέχρι και τέσσερις φορές τα επίπεδα της αρχικής αιμόλυσης (Εικ.2).



Εικόνα 1: Διακύμανση διαλυτών συστατικών του πλάσματος στους ανταποκρινόμενους (R) και μη ανταποκρινόμενους (NR) ασθενείς, πριν (προ-AIK) (A) και μετά (μετά-AIK) (B) από την αιμοκάθαρση (AIK) ύστερα από κανονικοποίηση ως προς τις τιμές των μαρτύρων (100%, διακεκομμένη γραμμή). fHb: ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος, TAC: συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος, UA/AC: αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ, R-MVs: ερυθροκυταρικά κυστίδια, MVs: ολικά κυστίδια πλάσματος. *P<0.05 k έναντι NR, *P<0.05 προ- έναντι μετά-AIK. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση.



Εικόνα 2: Πειράματα ανασύστασης (N=6) που δείχνουν την αντιοξειδωτική και αντι-αιμολυτική δράση του ουραιμικού πλάσματος λόγω της παρουσίας ουρικού οξέος. Οι τιμές παρουσιάζονται ύστερα από κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα των ενδογενών τιμών, πριν από την ανάμειξη (100%, διακεκομμένη γραμμή). *P<0.05, έναντι των αρχικών τιμών πριν την ανάμειξη. **P<0.05, πριν την επίδραση ουρικάσης έναντι των επιπέδων μετά από την επίδραση της ουρικάσης. Οι τιμές παρουσιάζονται αρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση.

<u> </u>	Ανταποκρινόμενοι ασθενείς (R) (N=16)		Μη ανταποκρινόμενοι ασθενείς (NR) (N=12)		Υγιείς (N=12)
Χαρακτηριστικά	προ-ΑΙΚ	μετά-AIK	προ-ΑΙΚ	μετά-ΑΙΚ	_
Ηλικία (χρόνια)	81±7		76	76±8	
Βάρος (κιλά) Θεραπεία	64,8=	64,8±15,1		75,4±19,8	
αιμοκάθαρσης (μήνες) Δόση rhEpO	6-1	6-105		5-126	
(IU/εβδομάδα)	9.350	±4.203	23.250)±5.650	
Λευκοκύτταρα	5 9 1 6	57125	62117	61176	70112
(x10/µL)	$5,0\pm1,0$	5,7±2,5	$0,5\pm1,7$	$0,1\pm 2,0$	7,0±1,5
Ουδετερόφιλα (%)	66±9	59±8	68±8	/1±8	59±7
Λεμφοκύτταρα (%)	25±8	33±9	23±6	21±8	29±4
Μονοκύτταρα (%)	8±4	6±3	7±3	6±1	9±1
Βασεόφιλα (%)	0	0	1	0	1
Ηωσινόφιλα (%)	1	2	2	2	2
RBC (x10 ⁶ /µL)	$3,61\pm0,40^{*}$	3,99±0,89 [*]	3,87±0,73 [*]	4,20±1,23 [*]	4,73±0,55
Hb (g/dL)	$10,9{\pm}0,7^{*}$	11,7±0,9 [*]	10,41±0,90 [*]	11,3±1,4 ^{*,#}	14,9±1,3
Hct (%)	33,8±1,9 [*]	33,2±3,8 [*]	33,5±2,2 [*]	34,0±4,6 [*]	41,8±4,5
MCV (fL)	95,4±9,1	84,4±8,5 ^{*,#}	89,1±16,1	85,0±16,5 [*]	93,0±6,0
MCH (pg)	30,2±3,2 [*]	29,6±4,4*	27,8±5,9 [*]	28,1±5,9 [*]	31,6±2,1
MCHC (g/dL)	31,2±0,6	33,6±3,7	31,1±1,3	33,1±1,3 [#]	34,0±1,2
RDW (%)	16,6±1,3 [*]	15,8±2,1	16,8±1,4 [*]	14,5±0,7	12,9±0,8
PLT (x10 ³ /µL)	173±54 [*]	185±68 [*]	$192 \pm 55^{*}$	195±63*	348±83
PDW (%)	12,8±2,4 [*]	13,7±1,8 [*]	13,6±2,1 [*]	14,2±2,9 [*]	17,7±0,6
PTH (pg/mL)	235±129 [*]	-	211±94 [*]	-	42±20
Γλυκόζη (mg/dL)	100±10	-	98±12	-	77±19
Ουρία (mg/dL)	125±25 ^{*,**}	37,8±8,6 [#]	153±27 ^{*,**}	46,5±10,4 ^{*,#}	35±12
URR (%)	69,2	2±6,8	69,2±7,9		
Κρεατινίνη (mg/dL)	$6,7{\pm}2,0^{*}$	-	7,7±1,2 [*]	-	$0,7{\pm}0,1$
Ουρικό οξύ (mg/dL)	5,9±1,2 ^{*,**}	-	7,5±1,0 ^{*,**}	-	4,2±1,2

Πίνακας 1: Δημογραφικά, αιματολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά ασθενών και υγιών ατόμων, καθώς και χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη νόσο και τη θεραπεία.

Χοληστερόλη (mg/dL)	147±41	-	136±17	-	145±18
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	148±37	-	129±79	-	139±25
HDL (mg/dL)	43±11 [*]	-	43±10 [*]	-	80±9
Ασβέστιο (mg/dL)	9,3±0,3	-	9,3±0,3	-	9,4±0,3
Φώσφορος (mg/dL)	4,7±0,9	-	4,9±1,1	-	3,7±0,5
Κάλιο (mM)	4,90±0,48	4,20±0,36	5,12±0,65	4,05±0,65	4,21±0,30
Νάτριο (mM)	137±2	-	136±2	-	142±2
Σίδηρος (μg/dL)	60,3±14,7 [*]	-	59,0±24,1 [*]	-	110,2±17,1
Φερριτίνη (ng/mL)	825±482 [*]	-	691±192 [*]	-	69±23
TIBC (µg/dL)	244±39 [*]	-	236±35 [*]	-	383±89
Πρωτεΐνες (g/dL)	7,1±0,3	-	7,2±0,4	-	7,5±0,6
Αλβουμίνη (g/dL) Αλκαλική	4,2±0,6	-	4,1±0,3	-	4,2±0,4
φωσφατάση (IU/L)	71±13	-	75±7	-	64±18
γGT (IU/L)	15±8	-	14±5	-	12±9

(*): P<0.05, παθολογικές τιμές, στατιστικά σημαντική αύξηση ή μείωση έναντι των υγιών ατόμων, (**): P<0.05, ανταποκρινόμενοι ασθενείς έναντι μη ανταποκρινόμενων, (#): P<0.05, πριν από την αιμοκάθαρση (προ-AIK) έναντι μετά από την αιμοκάθαρση (μετά-AIK). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. γGT: γ-γλουταμυλ-τρανσφεράση, Hb: αιμοσφαιρίνη αίματος, Hct: αιματοκρίτης, HDL: υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, MCH: μέση κυτταρική ποσότητα αιμοσφαιρίνης, MCHC: μέση κυτταρική συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, MCV: μέσος κυτταρικός όγκος, PLT: αιμοπετάλια, PDW: εύρος κατανομής μεγέθους αιμοπεταλίων, PTH: παραθορμόνη, rhEpO: ανθρώπινη ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη, RBC: αριθμός ερυθροκυττάρων, RDW: εύρος κατανομής μεγέθους ερυθροκυττάρων, TIBC: ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα, URR: ποσοστό μείωσης ουρίας.

2. Φυσιολογία, μορφολογία και πρωτεϊνική σύσταση των ερυθροκυττάρων

Το σύνολο των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια χαρακτηρίζεται από υψηλότερα ποσοστά ερυθροκυττάρων με μη αναστρέψιμη παραμόρφωση (IRR), εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και χαμηλή οσμωτική ευθραυστότητα (MCF', ύστερα από επώαση για 24 ώρες στους 37°C) σε σχέση με τα υγιή άτομα (**Eικ.3A και 3Γ**). Παρόλα αυτά, οι ασθενείς παρουσιάζουν επίσης φυσιολογικά επίπεδα ενδοκυττάριων δραστικών ριζών οξυγόνου, πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης της μεμβράνης, ενδοκυττάριων ιόντων ασβεστίου καθώς και φυσιολογικές τιμές στο δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας, πριν από την αιμοκάθαρση σε σχέση με τα υγιή άτομα (**Πίνακας 2**). Από την ανάλυση παλινδρόμησης, με τη χρήση της αιμοσφαιρίνης αύματος ως ανεξάρτητου παράγοντα, προέκυψε η δημιουργία ενός μοντέλου πρόβλεψης των επιπέδων των ερυθροκυττάρων μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης (**IRR**).

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος στους ανταποκρινόμενους και μη ανταποκρινόμενους ασθενείς καθώς και στους ασθενείς με ΧΝΑ ως σύνολο (πριν από την AIK) σε σχέση με τα υγιή άτομα.

Χαρακτηριστικά	Ανταποκρινόμενοι ασθενείς (R) (N=16)	Μη ανταποκρινόμενοι ασθενείς (NR) (N=12)	Ασθενείς ΧΝΑ προ-ΑΙΚ (N=28)	Υγιείς (N=12)
Ερυθροκύτταρα μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης (IRR) (%)	5,3 ± 2,9 [*]	7,9 ± 4,1*	6,4 ± 3,6 [*]	2,7 ± 0,9
Οσμωτική ευθραυστότητα MCF'(24ώρες, 37°C)	$0,529 \pm 0,049^{*}$	$0,\!495\pm0,\!052^*$	$0,515 \pm 0,052^{*}$	0,573 ± 0,019
Μηχανική ευθραυστότητα (MFI) PS ⁺	0,634±0,332**	$0,884 \pm 0,235^{**}$	0,773 ± 0,302	$0,804 \pm 0,194$
ερυθροκύτταρα (%)	$1,73 \pm 0,67^{*}$	$1,19 \pm 0,42^{*}$	$1,51 \pm 0,63^*$	$0,\!60\pm\!0,\!19$
iROS (RFU)	443 ± 155 448 ± 194 44		445 ± 168	306 ± 63
iCa ²⁺ (RFU)	2.122 ± 782 2.914 ± 1.269		2.773 ± 1.073	2.371 ± 448
Δείκτης πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης (PCI)	3,49 ± 3,33	$4,79 \pm 4,39$	$4,14 \pm 4,0$	3,86 ± 0,9
Ολικά κυστίδια MVs (κυστίδια/μL)	$52.079 \pm 15.905^{*}$	$41.188 \pm 12.442^{*}$	$47.238 \pm 15.122^*$	19.098 ± 12.497
Ερυθροκυτταρικά κυστίδια R-MVs (κυστίδια/μL)	$3.258 \pm 1.375^{*}$	$2.443 \pm 656^{*}$	$2.896 \pm 1.162^{*}$	707 ± 526

(*): P<0.05, παθολογικές τιμές, στατιστικά σημαντική αύξηση ή μείωση έναντι των υγιών ατόμων, (**): P<0.05, ανταποκρινόμενοι ασθενείς έναντι μη ανταποκρινόμενων. RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού.



Εικόνα 3: Διακύμανση στα χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων μεταξύ των ανταποκρινόμενων (R) και μη ανταποκρινόμενων (NR) ασθενών, πριν (A) και μετά (B) την αιμοκάθαρση (AIK), ύστερα από κανονικοποίηση ως προς τις τιμές των υγιών ατόμων (100%, διακεκομμένη γραμμή). IRR: ερυθροκύτταρα μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης, MCF': δείκτης οσμωτικής ευθραυστότητας κυττάρων (ύστερα από επώαση στους 37°C για 24 ώρες), MFI: δείκτης μηχανικής ευθραυστότητας κυττάρων, PS: εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, iROS: ενδοκυττάρια επίπεδα δραστικών ριζών οξυγόνου. *P<0.05 έναντι υγιών μαρτύρων, **P<0.05 R έναντι NR, [#]P<0.05 προ- έναντι μετά-AIK. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική Αντιπροσωπευτικές εικόνες απόκλιση. **(Γ)** από ηλεκτρονιογραφίες ερυθροκυττάρων ανταποκρινόμενων (R) και μη ανταποκρινόμενων ασθενών (NR), πριν από την AIK. Τα βέλη υποδεικνύουν ερυθροκύτταρα μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης (IRR) όπως σφαιροκύτταρα, δακρυοκύττρα, ελλειπτοκύτταρα, οβαλοκύτταρα και σχιστοκύτταρα. Ράβδος μεγέθυνσης: 10μm.



Εικόνα 4: Μοντέλο πρόβλεψης των επιπέδων μη αναστρέψιμων μορφολογικών τροποποιήσεων των ερυθροκυττάρων (IRR) από τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης αίματος Hb (gr/dL) ως ανεξάρτητου παράγοντα.

τις τροποποιήσεις του πλάσματος, η πλειονότητα Αντίστοιχα με των χαρακτηριστικών της δομής και της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ανταποκρινόμενων και των μη ανταποκρινόμενων ασθενών (Εικ.3Α). Παρόλα αυτά, οι μη ανταποκρινόμενοι ασθενείς παρουσιάζουν μια τάση προς υψηλότερα επίπεδα ερυθροκυττάρων μη αναστρέψιμης ενδοκυττάριων ιόντων ασβεστίου παραμόρφωσης και σε σγέση uε τους ανταποκρινόμενους ασθενείς, χωρίς όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές εξαιτίας της μεγάλης διακύμανσης που παρουσιάζουν οι ασθενείς της ίδιας ομάδας μεταξύ τους. Αντίθετα, τα ερυθροκύτταρα των ανταποκρινόμενων ασθενών παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στο μηχανικό στρες σε σχέση με των μη ανταποκρινόμενων, παρότι και στις δύο ομάδες οι τιμές του δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας είναι εντός των φυσιολογικών επιπέδων (Πίνακας 2).

Όσον αφορά στην επίδραση της αιμοκάθαρσης, αυτή πυροδοτεί τη συσσώρευση ενδοκυττάριων δραστικών ριζών οξυγόνου και στις δύο ομάδες των ασθενών, αλλά δεν επηρεάζει τη μορφολογία των ερυθροκυττάρων (Εικ.3B). Επιπλέον, επιδεινώνει την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης μόνο στα ερυθροκύτταρα των μη ανταποκρινόμενων ασθενών (1.19±0.42% πριν από την AIK, 1.90±0.58% μετά από την AIK), ενώ στους ανταποκρινόμενους ασθενείς εμφανίζει ουδέτερη επίδραση (Εικ.3B).

Η πρωτεϊνική σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης παρουσιάζει σημαντικές τροποποιήσεις στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια σε σχέση με τα υγιή άτομα (Πίνακας 3, Εικ.5), καθώς χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα ολιγομερών ζώνης-3, αυξημένη πρόσδεση ανοσοσφαιρινών G και μειωμένα επίπεδα ουμπικουιτινωμένων πρωτεϊνών.



Εικόνα 5: Ενδεικτικά ανοσοαποτυπώματα κατά Western πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης στους ανταποκρινόμενους και μη ανταποκρινόμενους ασθενείς, πριν (προ-AIK) και μετά αιμοκάθαρση (μετά-ΑΙΚ), καθώς και στους υγιείς δότες. oxHb: την sCLU: οξειδωμένη/αποδιαταγμένη αιμοσφαιρίνη, Κλαστερίνη, Ub: ουμπικουιτινωμένες πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη 4.1 Rχρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισοφόρτωσης.

Σε αντίθεση όμως με τα χαρακτηριστικά του πλάσματος και των ερυθροκυττάρων που δεν παρουσιάζουν στην πλειονότητά τους σημαντικές μεταβολές μεταξύ των δύο ομάδων των ασθενών, η πρωτεϊνική σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης εμφανίζει ένα πρότυπο το οποίο φαίνεται πως εξαρτάται από τη δόση της ερυθροποιητίνης που λαμβάνουν οι ασθενείς καθώς διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ανταποκρινόμενων και μη ανταποκρινόμενων ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, τα ερυθροκύτταρα των ανταποκρινόμενων ασθενών παρουσιάζουν ακόμη μεγαλύτερα επίπεδα προσδεμένων ανοσοσφαιρινών G στη μεμβράνη σε σχέση με τους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς καθώς και σημαντική έλλειψη του μορίου CD47 σε σχέση τόσο με τα υγιή άτομα όσο και με τους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς. Αντίθετα, τα ερυθροκύτταρα των μη ανταποκρινόμενων ασθενών παρουσιάζουν χαμηλή έκφραση των μορίων CD59 και κλαστερίνης καθώς και αυξημένη πρόσδεση της υπεροξειρεδοξίνης-2 σε σχέση με των ανταποκρινόμενων ασθενών ή/και των υγιών ατόμων (Πίνακας 3).

Όσον αφορά στην αιμοκάθαρση, αυτή επιδρά σε πολλές πρωτεΐνες στους ανταποκρινόμενους ασθενείς, σε αντίθεση με τους μη ανταποκρινόμενους όπου έχει ελάχιστη επίδραση. Πιο συγκεκριμένα, η αιμοκάθαρση προκαλεί μείωση σε πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στη διαδικασία της κυστιδιοποίησης όπως η υδατοπορίνη-1, η ζώνη-3, η CD47, η φλοτιλλίνη-2, η GAPDH, οι IgGs, η υπεροξειρεδοξίνη-2 και η στοματίνη (Πίνακας 3). Επιπλέον, μετά από την αιμοκάθαρση οι δύο ομάδες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε πολλές πρωτεΐνες, όπως τα διμερή ζώνης-3, η CD47, η οξειδωμένη Hb, η υπεροξειρεδοξίνη-2, η συνεξίνη και οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες που

παρουσιάζονται μειωμένες στους ανταποκρινόμενους ασθενείς σε σχέση με τους μη ανταποκρινόμενους καθώς και στις πρωτεΐνες CD59 και κλαστερίνη που παρουσιάζονται μειωμένες στους μη ανταποκρινόμενους.

	Ανταποκρ	ινόμενοι	Μη ανταποκρινόμενοι		
Ποωτεΐνη	Ασθενείς (R)		ασθενείς (NR)		
	(N=1	16)	(N=12)		
	προ-ΑΙΚ	μετά-ΑΙΚ	προ-ΑΙΚ	μετά-ΑΙΚ	
Αδουσίνη	80±28	82±24	103±74	100±60	
Υδατοπορίνη-1	91±46	58±24 ^{*,#}	81±62	92±52	
Ζώνη-3	107±26	72±41 [#]	74±46	94±40	
Διμερή ζώνης-3	$622 \pm 332^*$	158±130 ^{**,#}	$946{\pm}610^{*}$	5386±4568 ^{**}	
Καλπαΐνη	96±73	90±80	75±39	72±53	
CD47	39±15 ^{*,**}	$21 \pm 20^{*,**,\#}$	$75 {\pm} 40^{**}$	71±34 ^{*,**}	
CD59	123±40 ^{**}	$140\pm 63^{**}$	$79 \pm 20^{**}$	68±18 ^{*,**}	
Φλοτιλλίνη-2	117±24 ^{**}	$85\pm20^{\#}$	$87 \pm 21^{**}$	100±13	
GAPDH	110±40	69±36 [#]	101±36	117±78	
Μεταφορέας γλυκόζης-1	$222 \pm 120^{*}$	116±58 [#]	161±120	$107 \pm 58^{\#}$	
Hsp70	190±121	173±78	160±114	178±125	
IgGs	$754 \pm 670^{*,**}$	397±269 ^{*,#}	240±27 ^{*,**}	203±104	
Οξειδωμένη Hb	$82{\pm}60^{**}$	37±32 ^{**}	24±19 ^{**}	101±56 ^{**,#}	
Υπεροξειρεδοξίνη-2	95±32 ^{**}	71±16 ^{*,**,#}	129±35 ^{**}	$103 \pm 38^{**}$	
Κλαστερίνη	111±43**	88±39 ^{**}	53±25 ^{*,**}	54±15 ^{*,**}	
Σπεκτρίνη	115±28	83±32 [#]	96±37	104±47	
Θραυσματα σπεκτρίνης	103±63	84±40	96±35	138±74	
Στοματίνη	118±32	72±28 [#]	90±22	105±66	
Συνεξίνη	110±58	101±43 ^{**}	155±70	169±86 ^{**}	
Ουμπικουιτινωμένες πρωτεΐνες	52±21 [*]	$60{\pm}27^{*}$	60±38*	62±48	
Καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες	124±113	98±30 ^{**}	101±95	247±165**	

Πίνακας 3: Μεταβολές στην έκφραση και τον δείκτη καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης στους ανταποκρινόμενους (R) και μη ανταποκρινόμενους ασθενείς (NR), πριν και μετά το τέλος της συνεδρίας AIK.

(*): P<0.05, στατιστικά σημαντική αύξηση ή μείωση έναντι των υγιών ατόμων, (**): P<0.05, ανταποκρινόμενοι ασθενείς έναντι μη ανταποκρινόμενων, (#):P<0.05, προ-AIK έναντι μετά-AIK. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση, ύστερα από κανονικοποίηση στις τιμές των υγιών ατόμων (100%). GAPDH: αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης, Hb: αιμοσφαιρίνη, Hsp70: πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70, IgGs: ανοσοσφαιρίνες G.

3. Συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων και απεικόνιση σε δίκτυα

Από την ανάλυση παραγόντων στους ασθενείς με ΧΝΑ προέκυψαν επτά υποσύνολα από στενά σχετιζόμενες μεταξύ τους αιματολογικές, βιοχημικές, ερυθροκυτταρικές και σχετικές με τη νόσο και τη θεραπεία αιμοκάθαρσης παραμέτρους (Εικ.6).



Εικόνα 6: Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση των αιματολογικών, βιοχημικών και χαρακτηριστικών της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (N=28) μέσω ανάλυσης παραγόντων. Οι παράμετροι ομαδοποιούνται σε εφτά υποσύνολα στενά συνδεμένων (θετικά ή αρνητικά-) μεταξύ τους παραμέτρων. Τέσσερα από αυτά τα υποσύνολα (με διακεκομένο περίγραμμα) αφορούν σε παραμέτρους που σχετίζονται με την ασθένεια (έντονη γραφή). AC(-UA): αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος ανεξάρτητη από το ουρικό οξύ, Ca: ασβέστιο, dHD: διάρκεια σε θεραπεία αιμοκάθαρσης, dROS: ενδοκυττάρια επίπεδα ROS εξωγενώς επαγόμενα από Diamide, rhEPO: ερυθροποιητίνη, fHb: ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος, Hb: αιμοσφαιρίνη, Hct: αιματοκρίτης, iCa: ενδοκυττάρια επίπεδα ιόντων ασβεστίου, iROS: ενδοκυττάρια επίπεδα ROS, MCF: οσμωτική ευθραυστότητα ερυθροκυττάρων, MCF': οσμωτική ευθραυστότητα ερυθροκυττάρων ύστερα από επώαση στους 37°C, MCH: μέση ενδοκυττάρια ποσότητα αιμοσφαιρίνης, MCHC: μέση ενδοκυττάρια συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, MCV: μέσος ερυθροκυτταρικός όγκος, PCI: δείκτης πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης, PS: φωσφατιδυλοσερίνη, RBCs: αριθμός ερυθροκυττάρων, RDW: εύρος κατανομής μεγέθους ερυθροκυττάρων, TAC: ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος, TIBC: σιδηροδεσμευτική ικανότητα, tROS: ενδοκυττάρια επίπεδα ROS εξωγενώς επαγόμενα από tBHP, UA/AC: αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ, URR: ποσοστό μείωσης ουρίας.

Στο σύνολο των ασθενών, η διακύμανση στη δόση της ερυθροποιητίνης σχετίζεται αντίστοιχα με τη διακύμανση της αιμόλυσης καθώς και με τον στενά σχετιζόμενο με αυτήν δείκτη μηχανικής ευθραυστότητας. Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη του πλάσματος (στην οποία συμπεριλαμβάνεται και η αιμοσφαιρίνη που εσωκλείεται στα κυστίδια του πλάσματος) αποτελεί κοινή συνιστώσα για τους παράγοντες που περιλαμβάνουν την αιμοσφαιρίνη αίματος και τον αιματοκρίτη, καθώς και τα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά του πλάσματος (TAC, AC(-UA), UA/AC). Παρόμοια πρότυπα συσχετίσεων, απαντώνται και ανάμεσα στις ουραιμικές τοξίνες (ουρικό, κρεατινίνη, παραθορμόνη) και στα χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων (μορφολογία, εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, ενδοκυττάρια επίπεδα ROS και ιόντων ασβεστίου κα.) και του πλάσματος, υποδηλώνοντας κάποια υποκείμενη σχέση μεταξύ τους, ενώ αιματολογικοί δείκτες και μορφολογικές τροποποιήσεις των ερυθροκυττάρων.

Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (P<0.05) ανάμεσα στις αιματολογικές παραμέτρους, σε χαρακτηριστικά της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων και στην πρωτεϊνική σύσταση της μεμβράνης στους ανταποκρινόμενους και τους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς, αποτυπώνονται σε βιολογικά δίκτυα (Εικ.7 και 8). Όπως φαίνεται από τα δίκτυα των δύο ομάδων των ασθενών, η ίδια παράμετρος συνδέεται με διαφορετικές παραμέτρους στο κάθε δίκτυο. Για παράδειγμα, η δόση της ερυθροποιητίνης παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με την εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης στους ανταποκρινόμενους ασθενείς (Εικ.8) αλλά με την κλαστερίνη των ερυθροκυττάρων στους ανταποκρινόμενους ασθενείς (Eik.7). Επιπλέον, συγκέντρωση μη η των ερυθροκυτταρικών κυστιδίων ασθενών παρουσιάζει αρνητική συσγέτιση με τα επίπεδα ουρικού οξέος στους ανταποκρινόμενους ασθενείς, ενώ στους μη ανταποκρινόμενους με τον δείκτη κάθαρσης της ουρίας (URR) και τα επίπεδα σιδηροδεσμευτικής ικανότητας (TIBC). Η αιμόλυση in vivo σχετίζεται με τη διάρκεια της θεραπείας αιμοκάθαρσης και με δείκτες οξειδωτικού στρες στους ανταποκρινόμενους ασθενείς, ενώ η οσμωτική ευθραυστότητα παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με τις μη αναστρέψιμες μορφολογικές τροποποιήσεις των ερυθροκυττάρων στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς. Επιπλέον, στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς, η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των ερυθροκυττάρων παρουσιάζουν συσχετίσεις με πολλές μεμβρανικές πρωτεΐνες και δείκτες απομάκρυνσης από την κυκλοφορία. Μάλιστα, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος, οι παράμετροι που σγετίζονται με τη μορφολογία των ερυθροκυττάρων (π.χ. δείκτης RDW) και μεμβρανικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των κυττάρων (π.γ. GADPH, μεταφορέας γλυκόζης 1), αποτελούν κομβικά σημεία στο δίκτυο των μη ανταποκρινόμενων ασθενών (Εικ.7).



Εικόνα 7: Βιολογικό δίκτυο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αιματολογικών παραμέτρων και παραμέτρων της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος στους μηανταποκρινόμενους ασθενείς. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές (P<0.05) θετικές ή αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων (συνεχόμενες και διακεκομένες γραμμές, αντίστοιχα). Μικρότερες αποστάσεις μεταξύ των παραμέτρων υποδηλώνουν υψηλότερο συντελεστή συσχέτισης r. Οι κύκλοι υποδεικνύουν παραμέτρους με υψηλή συνδεσιμότητα (hub nodes), δηλαδή παραμέτρους οι οποίες παρουσιάζουν συνδέσεις με πληθώρα άλλων παραμέτρων. Συντομογραφίες: Age: ηλικία ασθενών, Alb: αλβουμίνη, Aqp1: υδατοπορίνη-1, B3-O: διμερή ζώνης 3, Ca: ασβέστιο ορού, Calp: καλπαΐνη-1, EPO: δόση rhEPO, Fer: φερριτίνη, fHb: ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος, Flot 2: φλοτιλλίνη-2, GAPDH: αφυδρογονάση της 3φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης, Glut1: μεταφορέας γλυκόζης-1, Hb: αιμοσφαιρίνη, Hct: αιματοκρίτης, HDL: υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, Hsp70: πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70, iCa: ενδοκυττάριο ασβέστιο, IRR: ερυθροκύτταρα μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης, iROS: ενδοκυττάρια ROS, K⁺: κάλιο ορού, MCF: μέση οσμωτική ευθραυστότητα κυττάρων, MCF': μέση οσμωτική ευθραυστότητα κυττάρων μετά από επώαση στους 37°C, MCH: μέση ενδοκυττάρια ποσότητα αιμοσφαιρίνης, MCHC: μέση ενδοκυττάρια συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, MCV: μέσος όγκος ερυθροκυττάρου, MFI: δείκτης μηγανικής ευθραυστότητας, Neu: ουδετερόφιλα, oxHb: οξειδωμένη/αποδιαταγμένη αιμοσφαιρίνη, P: φώσφορος ορού, PCI: δείκτης πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης, Prot: πρωτεΐνες ορού, Prx2: υπεροξειρεδοξίνη-2, PS: φωσφατιδυλοσερίνη, RDW: εύρος μεγέθους ερυθροκυττάρων, RET: δικτυοερυθροκύτταρα, REV: ερυθροκύτταρα αναστρέψιμης παραμόρφωσης, **R-MVs**: ερυθροκυτταρικά κυστίδια, **sCLU**:

κλαστερίνη, Sp: σπεκτρίνη, Sp-Pr: πρωτεόλυση σπεκτρίνης, Stom: στοματίνη, Syn: συνεξίνη, TAC: ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος, TIBC: ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα, UA/AC: αντιοξειδωτική ικανότητα οφειλόμενη στο ουρικό οξύ, Ub: ουμπικουιτινωμένες πρωτεΐνες, URR: δείκτης απομάκρυνσης ουρίας.



Εικόνα 8: Βιολογικό δίκτυο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αιματολογικών παραμέτρων και παραμέτρων της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος στους ανταποκρινόμενους ασθενείς. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντικές (P<0.05) θετικές ή αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ των παραμέτρων (συνεχόμενες και διακεκομένες γραμμές, αντίστοιχα). Μικρότερες αποστάσεις μεταξύ των παραμέτρων υποδηλώνουν υψηλότερο συντελεστή συσχέτισης r. Οι κύκλοι υποδεικνύουν παραμέτρους με υψηλή συνδεσιμότητα (hub nodes), δηλαδή παραμέτρους οι οποίες παρουσιάζουν συνδέσεις με πληθώρα άλλων παραμέτρων. Add: αδουσίνη, B3: Ζώνη-3, Ca: ασβέστιο ορού, Creat: κρεατινίνη, dHD: διάρκεια σε θεραπεία αιμοκάθαρσης, EPO: δόση ερυθροποιητίνης, Fe: σίδηρος, Fer: φερριτίνη, fHb: ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος, GAPDH: αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης, Hb: αιμοσφαιρίνη, Hct: αιματοκρίτης, HDL: υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες, Hsp70: πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70, IRR: ερυθροκύτταρα μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης, iROS: ενδοκυττάρια επίπεδα ROS, MCF': μέση οσμωτική ευθραυστότητα κυττάρων μετά από επώαση στους 37°C, MCHC: μέση ενδοκυττάρια συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, Mono: μονοκύτταρα, Neu: ουδετερόφιλα, oxHb: οξειδωμένη/αποδιαταγμένη Hb, Prx2: υπεροξειρεδοξίνη-2, PS: φωσφατιδυλοσερίνη, RET: δικτυοερυθροκύτταρα, R-MVs: ερυθροκυτταρικά κυστίδια, sCLU: κλαστερίνη, Stom: στοματίνη, Syn: συνεξίνη, UA: ουρικό οξύ, Urea: ουρία, Ub: ουμπικουιτινωμένες πρωτεΐνες.

Δ2. Μελέτη των επιδράσεων δύο διαφορετικών μεθόδων κάθαρσης στα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα ασθενών με ΧΝΑ τελικού σταδίου. Σύγκριση ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση (HDF) έναντι της συμβατικής αιμοκάθαρσης (cHD) καθώς και σύγκριση των δύο ομάδων ασθενών με τα υγιή άτομα.

Όλοι οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα αριθμού ερυθροκυττάρων και ανισοκυττάρωση (υψηλό RDW). Σε αντίθεση με τους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση, οι ασθενείς που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης αίματος (Hb), αιματοκρίτη (Hct), μέσης συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης (MCHC) και ολικής σιδηροδεσμευτικής ικανότητας (TIBC) πριν από την αιμοκάθαρση. Μετά το τέλος της αιμοδιαδιήθησης παρατηρείται βελτίωση στο αιματολογικό προφίλ των ασθενών, όσον αφορά στους δείκτες RBC, Hb, MCV, MCHC και RDW, ενώ μετά από τη συμβατική αιμοκάθαρση βελτιώνονται μόνο οι δείκτες Hb και MCHC σε σχέση με τα επίπεδα των δεικτών πριν από την αιμοκάθαρση (Πίνακας 1).

Το σύνολο των ασθενών χαρακτηρίζεται από ουραιμία με συσσώρευση ουραιμικών τοξινών στο αίμα, όμως οι ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα κρεατινίνης και ουρικού οξέος καθώς και μια τάση προς υψηλότερα επίπεδα ουρίας σε σχέση με την ομάδα των ασθενών που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση. Μάλιστα, τα υψηλότερα επίπεδα ουρικού οξέος στην ομάδα των ασθενών σε αιμοδιαδιήθηση αντικατοπτρίζονται και στην υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος που οφείλεται στο ουρικό οξύ (UA/AC), που όμως μειώνεται μετά από τη διαδικασία κάθαρσης σε επίπεδα χαμηλότερα σε σχέση τόσο με τα υγιή άτομα όσο και με την άλλη ομάδα των ασθενών (Πίνακας 1). Τέλος, η ίδια ομάδα χαρακτηρίζεται και από υψηλότερο δείκτη κάθαρσης των ουραιμικών τοξινών (URR).

	Ασθενείς ΗDF (N=16)		Ασθενείς cHD (N=16)		Υγιείς (N=12)
	προ-ΑΙΚ	μετά-ΑΙΚ	προ-ΑΙΚ	μετά-ΑΙΚ	
Κλινικά χαρακτηριστικ	ά				
Ηλικία (χρόνια)	64±11		72±7		60±14
Βάρος (κιλά)	75±1	17	65±15		60±10
Θεραπεία ΑΙΚ (μήνες)	35±15		40±30		-
Δ όση rhEpO (IU/εβδ.)	9.100 ± 5.527		9.350±4.204		-
<u>Βιοχημικά χαρακτηριστ</u>	ικά				
WBC (x10 ³ /µL)	6,6±1,5	6,5±1,2	5,7±1,7	5,8±2,3	6,8±1,1
RBC (x10 ⁶ /µL)	3,59±0,18	4,10±0,35 [#]	3,61±0,40	3,99±0,89	4,77±0,56
Hb (gr/dL)	$11,7{\pm}0,3^{*}$	$12,8{\pm}1,6^{\#}$	10,9±0,7*	11,8±1,0	14,2±1,4
Hct (%)	$36,1{\pm}1,0^*$	$37,9{\pm}4,2^{*}$	33,9±1,9 *	33,2±3,8 [*]	43,1±4,6
MCV (fL)	100,4±3,0	93,0±6,0 ^{*,#}	95,4±9,0	84,0±9,0 ^{*,#}	93,2±5,4
MCH (pg)	$32,6{\pm}1,3^*$	31,7±2,0	$30,2{\pm}3,2^{*}$	29,6±4,4	32,5±2,2

Πίνακας 1: Δημογραφικά, αιματολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά στις δύο ομάδες των ασθενών και στα υγιή άτομα, καθώς και χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη νόσο και τη θεραπεία.

MCHC (g/dL)	$32,5{\pm}0,6^{*}$	$34,1\pm1,3^{\#}$	$31,2{\pm}0,6^*$	33,6±3,7	33,7±1,5
RDW (%)	15,1±1,1 [*]	$14,1\pm1,7$	16,6±1,4 [*]	15,7±1,8	12,8±0,9
Παραθορμόνη (pg/mL)	195±65	N/D	235±129	N/D	44±18
Ουρία (mg/dL)	143±23	32±11 [#]	123±27	$38\pm9^{\#}$	31±12
URR (%)	78±	6^*	69	$9\pm7^*$	-
Κρεατινίνη (mg/dL)	8,6±1,2 *	-	6,7±2,0 [*]	-	0,8±0,2
Ουρικό οξύ (mg/dL)	7,9±1,8 [*]	-	6,1±1,0 [*]	-	4,2±1,2
Χοληστερόλη (mg/dL)	148±29	-	145±36	-	145±18
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	150±60	-	146±42	-	132±29
HDL (mg/dL)	45±11	-	43±11	-	73±9
Ασβέστιο (mg/dL)	9,3±0,2	-	9,3±0,3	-	9,3±0,2
Φώσφορος (mg/dL)	5,0±0,6	-	$4,8\pm0,8$	-	3,6±0,6
Κάλιο (mmol/L)	5,0±0,3	$4,5{\pm}0,5$	$4{,}9\pm\!\!0{,}5$	4,7±0,6	4,2±0,3
Νάτριο (mmol/L)	137±2	-	137±2	-	139±2
Σίδηρος (μg/dL)	72,4±17,4	-	66,5±11,5	-	108,9±15,4
Φερριτίνη (ng/mL)	914±436	-	831±487	-	72±18
TIBC (µg/dL)	$280{\pm}37^*$	-	242±41 [*]	-	348±27
Πρωτεΐνες (g/dL)	7,1±0,3	-	7,1±0,3	-	$7,4{\pm}0,5$
Αλβουμίνη (g/dL)	4,3±0,3	-	4,3±0,6	-	4,2±0,4
ALP (IU/L)	83±19	-	79±12	-	63±10
γGT (IU/L)	17±7	-	14±5	-	12±9
TAC (µM Fe ²⁺)	1.127±168	401±65 [#]	1.021±198	465 ±77 [#]	706±159
AC(-UA) (µM Fe ²⁺)	449±90	253±32 [#]	450±102	261±53 [#]	239±45
UA/AC ($\mu M Fe^{2+}$)	$678 \pm 104^{*}$	$147 \pm 47^{*,\#}$	$571 \pm 107^{*}$	199±45 ^{*,#}	467±126

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. Έντονη γραφή: cHD, HDF έναντι υγιών ατόμων, (*): HDF έναντι cHD, ([#]): προ-AIK έναντι μετά-AIK, *P*<0.05.

Τα ουραιμικά ερυθροκύτταρα παρουσιάζονται πιο επιρρεπή στην εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης σε σχέση με τα ερυθροκύτταρα των υγιών ατόμων, ανεξάρτητα από τη μέθοδο κάθαρσης. Παρόλα αυτά, τα ποσοστά των ερυθροκυττάρων που εξωτερικεύουν φωσφατιδυλοσερίνη πριν από την αιμοκάθαρση είναι χαμηλότερα στην ομάδα των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση σε σχέση με τους ασθενείς που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση (**Εικ.1A**). Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης έχει διαφορετική επίδραση στα επίπεδα εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης στις δύο ομάδες των ασθενών, καθώς παρατηρείται σημαντική αύξηση των επιπέδων μόνο μετά από την αιμοδιαδιήθηση αλλά όχι μετά από τη συμβατική αιμοκάθαρση (**Εικ.1A**). Αντίστοιχα, η αιμοδιαδιήθηση έχει αρνητική επίδραση και στα επίπεδα αιμόλυσης (**Εικ.1B**), στα επίπεδα ενδογενών (**Εικ.1Γ**) και εξωγενώς επαγόμενων (**Εικ.1Δ**) ενδοκυττάριων δραστικών ριζών οξυγόνου, σε αντίθεση με τη συμβατική αιμοκάθαρση η οποία είτε οδηγεί σε μια τάση προς βελτίωση (**Εικ.1Α, B**), είτε παρουσιάζει ουδέτερη επίδραση (**Εικ.1Γ, Δ**) σε αυτές τις παραμέτρους.



Εικόνα 1: Διακύμανση σε χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος στις δύο ομάδες των ασθενών και στα υγιή άτομα (διακεκομμένη μαύρη γραμμή). Α) Ποσοστά ερυθροκυττάρων που εξωτερικεύουν φωσφατιδυλοσερίνη (PS), B) επίπεδα αιμόλυσης (fHb, ελεύθερη αιμοσφαιρίνη πλάσματος), Γ) ενδοκυττάρια επίπεδα ενδογενών δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) και Δ) ενδοκυττάρια επίπεδα εξωγενώς επαγόμενων με t-BHP δραστικών ριζών οξυγόνου (tROS), πριν (προ-AIK) και μετά (μετά-AIK) από το τέλος της διαδικασίας κάθαρσης. HDF: ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση, cHD: ασθενείς που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση. RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού. (*) P<0.05 έναντι υγιών, (**) P<0.05 HDF έναντι cHD, (#) P<0.05 προ-AIK έναντι μετά-AIK. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα.

Από τη μελέτη της μορφολογίας των ερυθροκυττάρων προέκυψε πως οι ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση παρουσιάζουν μια τάση στοματοκυττάρωσης πριν από την αιμοκάθαρση. Η στοματοκυττάρωση φαίνεται να πυροδοτείται από την αιμοδιαδιήθηση, καθώς μετά το τέλος της διαδικασίας κάθαρσης οι ασθενείς παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση στα ποσοστά των στοματοκυττάρων σε σχέση με τους ασθενείς που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση (**Εικ. 2A, B**). Επιπλέον, τα επίπεδα των στοματοκυττάρων παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με τα επίπεδα του ουρικού οξέος (*r*=0.810, p=0.004) και αρνητική με την εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης (*r*= -0.684, p=0.043) στους ασθενείς, πριν από την αιμοδιαδιήθηση.



Β <u>Αιμοδιαδιήθηση (HDF)</u>

Συμβατική αιμοκάθαρση (cHD)



Εικόνα 2: Μορφολογία των ερυθροκυττάρων στις δύο ομάδες των ασθενών. Α) Διάγραμμα διακύμανσης των στοματοκυττάρων στους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση και συμβατική αιμοκάθαρση σε σχέση με τα υγιή άτομα. (**) P<0.05 HDF έναντι cHD. B) Ενδεικτικές ηλεκτρονιογραφίες των ερυθροκυττάρων στις δύο ομάδες των ασθενών, μετά από τη συνεδρία κάθαρσης. Ένθετο: τυπικές στοματοκυτταρικές τροποποιήσεις. Ράβδος μεγέθυνσης=10μm.

Κυστίδια (κυστίδια/μL)	Ασθενείς HDF (N=16)		Ασθενε (N=10	Υγιείς (N=12)	
	προ-ΑΙΚ	μετά-ΑΙΚ	προ-ΑΙΚ	μετά-ΑΙΚ	
Ολικά	9.330±4.813 ^{*,**}	4.077±2.275 [#]	21.853±12.391 ^{*,**}	5.032±3.439 [#]	3.445±2.062
Ερυθρο- κυτταρικά	1.103±693 ^{*,**}	1.214±952 [*]	2.365±1.691 ^{*,**}	1.044±627*	130±85

Πίνακας 2: Επίπεδα ολικών και ερυθροκυτταρικών κυστιδίων στο πλάσμα των ασθενών και των υγιών ατόμων

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση. (*): cHD, HDF έναντι υγιών ατόμων, (**): HDF έναντι cHD, ([#]): προ-AIK έναντι μετά-AIK, P<0.05.

Όπως είναι αναμενόμενο, το σύνολο των ασθενών παρουσιάζει παθολογικά επίπεδα ολικών και ερυθροκυτταρικών κυστιδίων στο πλάσμα (Εικ.3, αριστερό διάγραμμα). Όμως, τόσο τα ολικά όσο και τα ερυθροκυτταρικά κυστίδια παρουσιάζονται μειωμένα πριν από
την αιμοκάθαρση στους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση σε σχέση με τη συμβατική αιμοκάθαρση (**Εικ.3**, **Πίνακας 2**). Μετά το τέλος της συνεδρίας κάθαρσης, ο πληθυσμός των ολικών κυστιδίων μειώνεται σε φυσιολογικά επίπεδα και στις δύο ομάδες των ασθενών, ενώ τα ερυθροκυτταρικά κυστίδια παραμένουν παθολογικά αυξημένα (**Εικ.3**, δεξί διάγραμμα). Αν και πολλοί ασθενείς που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση παρουσιάζουν σημαντική μείωση στα ερυθροκυτταρικά κυστίδια μετά τη συνεδρία κάθαρσης, η μείωση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική εξαιτίας της μεγάλης διακύμανσης που παρατηρείται στους ασθενείς της ομάδας αυτής πριν από την αιμοκάθαρση (**Εικ.3**, **Πίνακας 2**).



Εικόνα 3: Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής του ολικού αριθμού κυστιδίων πλάσματος και του ερυθροκυτταρικού πληθυσμού (MVs και R-MVs, αντίστοιχα) στους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση και συμβατική αιμοκάθαρση, πριν και μετά από τη συνεδρία κάθαρσης, ύστερα από κανονικοποίηση στις τιμές των υγιών ατόμων (100%, διακεκομμένη γραμμή). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα. (*) P<0.05 έναντι υγιών, (**) P<0.05 HDF έναντι cHD, (#) P<0.05 προ-ΑΙΚ έναντι μετά-ΑΙΚ.

Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση χαρακτηρίζεται από σημαντική έλλειψη της πρωτεΐνης υδατοπορίνη-1 και αυξημένη πρόσδεση της Hsp70 στη μεμβράνη σε σχέση με τα υγιή άτομα. Επιπλέον, τα ερυθροκύτταρα αυτών των ασθενών παρουσιάζουν σημαντική μείωση της στοματίνης σε σχέση με τους ασθενείς που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση πριν από τη συνεδρία κάθαρσης. Αντίστοιχα, η ερυθροκυτταρική μεμβράνη των ασθενών που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση παρουσιάζει σημαντική έλλειψη του μορίου CD47, υπερέκφραση του μεταφορέα γλυκόζης-1 και αυξημένη πρόσδεση των IgGs στη μεμβράνη (**Εικ. 4A, Πίνακας 3**). Μετά το τέλος της συνεδρίας αιμοδιαδιήθησης, η ερυθροκυτταρική μεμβράνη παρουσιάζει αυξημένη πρόσδεση της οξειδωμένης/ αποδιαταγμένης αιμοσφαιρίνης (**Εικ.4B**, διάγραμμα και ένθετο με εικόνα από Western blot). Αντίθετα, η ερυθροκυτταρική μεμβράνη των ασθενών που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση παρουσιάζει μείωση στην έκφραση πολλών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της στοματίνης (**Εικ.4B, Πίνακας 3**). Σε κάποιες περιπτώσεις, η μείωση αυτή επαναφέρει την πρωτεΐνη σε φυσιολογικά επίπεδα (π.γ. Glut-1), ενώ σε άλλες οδηγεί σε έλλειψη (π.χ. υδατοπορίνη-1) ή επιδείνωση της ήδη σημαντικής έλλειψης της πρωτεΐνης (π.χ. CD47).

Α



Εικόνα 4: Διακύμανση της έκφρασης των πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης στις δύο ομάδες των ασθενών, πριν (A) και μετά (B) από την αιμοκάθαρση, ύστερα από κανονικοποίηση στις τιμές των υγιών ατόμων (100%, διακεκομμένη γραμμή). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα. (*) P<0.05 έναντι υγιών, (**) P<0.05 HDF έναντι cHD, (#) P<0.05 προ-AIK έναντι μετά-AIK. **οxHb**: οξειδωμένη/αποδιαταγμένη αιμοσφαιρίνη. Ένθετη εικόνα: αντιπροσωπευτικά ανοσοαποτυπώματα της οξειδωμένης αιμοσφαιρίνης στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση και συμβατική αιμοκάθαρση, πριν (A) και μετά (B) το τέλος της συνεδρίας κάθαρσης.

Πρωτεΐνη	Ασθενείς HDF (N=16)		Ασθενείς cHD (N=16)		Υγιείς (N=12)
	προ-ΑΙΚ	μετά-ΑΙΚ	προ-ΑΙΚ	μετά-ΑΙΚ	()
Υδατο	0,307±0,162 ^{*,**}	0,287 <u>+</u> 0,125 [*]	$0,639{\pm}0,325^{**}$	0,410 <u>+</u> 0,168 ^{*,#}	0,659±0,262
πορίνη-1					
CD47	$1,019{\pm}0,328^{**}$	$1,034{\pm}0,434^{**}$	$0,595{\pm}0,430^{*,**}$	0,298±0,182 ^{*,**,#}	1,294±0,453
Μεταφορέα	ις 7,510±1,514 ^{**}	$4,747\pm2,220^{**}$	16,098±8,648 ^{*,**}	8,432±4,136 ^{**,#}	6,416±1,153
γλυκόζης-1					
Hsp70	$0,395{\pm}0,166^{*}$	$0,184{\pm}0,059^{**,\#}$	0,319±0,204	$0,291\pm0,131^{*,**}$	$0,156\pm0,087$
IgGs	$1,003{\pm}0,638^{**}$	$0,895\pm0,743$	3,497±3,103 ^{*,**}	$1,840{\pm}1,247^{*,\#}$	$0,505\pm0,107$
oxHb	$0,159\pm0,129$	$0,416\pm0,407^{\#}$	0,251±0,240	$0,245\pm0,241$	0,229±0,125
Στοματίνη	$0,973\pm0,431^{**}$	1,006±0,451	$1,528\pm0,140^{**}$	$0,926{\pm}0,358^{\#}$	1,210±0,144

Πίνακας 3: Επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης ύστερα από ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα κατά Western.

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. (*): cHD, HDF έναντι υγιών ατόμων, (**): HDF έναντι cHD, ([#]): προ-AIK έναντι μετά-AIK, P<0.05. **oxHb**: οξειδωμένη/αποδιαταγμένη αιμοσφαιρίνη.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΜΕΡΟΣ Α': Μεταβολές στα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα των ασθενών με Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια που ανταποκρίνονται ή όχι στη θεραπεία ερυθροποιητίνης και υποβάλλονται σε θεραπεία αιμοκάθαρσης.

Η παρούσα εργασία παρέχει νέα δεδομένα για τους μηχανισμούς οι οποίοι επηρεάζουν τη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Επιπλέον, μελετώνται οι μεταβολες στα χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος οι οποίες σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη και με τη θεραπεία αιμοκάθαρσης.

Α1. Μεταβολές στα ερυθροκύτταρα και το πλάσμα ασθενών με ΧΝΑ

Όπως είναι αναμενόμενο, το αιματολογικό πρότυπο των ασθενών με XNA τελικού σταδίου και αναιμία, χαρακτηρίζεται από χαμηλό αριθμό ερυθροκυττάρων ανά μικρόλιτρο αίματος εξαιτίας τόσο της μειωμένης παραγωγής τους όσο και της μειωμένης διάρκειας ζωής τους στην κυκλοφορία, ενώ ο αιματοκρίτης και η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης είναι εξίσου μειωμένα σε σχέση με τα επίπεδα των υγιών ατόμων [117, 209].

Τα ουραιμικά ερυθροκύτταρα υφίστανται συγκεκριμένες τροποποιήσεις παθοφυσιολογικής φύσεως στη δομή τους, την πρωτεϊνική σύσταση και στους δείκτες απομάκρυνσης από την κυκλοφορία. Συγκεκριμένα, οι ακραίες μορφολογικές τροποποιήσεις σχετίζονται πιθανά με τα υψηλά επίπεδα του δείκτη RDW, ο οποίος υποδηλώνει ανισοκυττάρωση, και καθιστούν τα ερυθροκύτταρα επιρρεπή προς απομάκρυνση από την κυκλοφορία. Σε παθολογίες που γαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες όπως είναι και η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, οι μορφολογικές αυτές τροποποιήσεις υποδηλώνουν την ύπαρξη υποβάθρου φλεγμονής [224, 225]. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι τα ποσοστά των ερυθροκυττάρων μη αναστρέψιμης παραμόρφωσης επηρεάζονται από τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης αίματος, επιβεβαιώνοντας τη στενή σχέση που έχουν οι μορφολογικές τροποποιήσεις των ερυθροκυττάρων με τη φλεγμονή και την αναιμία στη XNA.

Όσον αφορά στις ουραιμικές τοξίνες, αυτές φαίνεται να επάγουν την εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης στα ερυθροκύτταρα, επιταχύνοντας την απομάκρυνσή τους από την κυκλοφορία και πυροδοτώντας πιθανά παθοφυσιολογικές αλληλεπιδράσεις με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, με αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα [226]. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές γίνονται μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών τα οποία εξαρτώνται ή είναι ανεξάρτητα από την εισροή ιόντων ασβεστίου [227], όπως φαίνεται από τα υποσύνολα που δημιουργούνται μέσω της ανάλυσης παραγόντων. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη επαληθεύει τη στενή σχέση μεταξύ της εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης και της κυστιδιοποίησης στα ερυθροκύτταρα [228], ως απόκριση στη διαδικασία αιμοκάθαρσης και στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη. Άλλωστε, όπως έχει ήδη αποδειχθεί, κάποια ινδολικά συστατικά του ουραιμικού πλάσματος προκαλούν εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και ταυτόγρονα αυξάνουν την κυστιδιοποίηση στα ερυθροκύτταρα [229]. Η απώλεια της φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας καθώς και άλλες παθολογίες που παρατηρούνται στα ερυθροκύτταρα και οφείλονται στη ΧΝΑ, όπως οι μορφολογικές τροποποιήσεις, το μηχανικό στρες, η χρόνια φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες, η κυτταρική ενεργοποίηση και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, επηρεάζουν εξίσου την κυστιδιοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και των κυττάρων του αίματος, συμπεριλαμβανομένων των ερυθροκυττάρων [158, 162, 164].

Η πλειονότητα των προηγούμενων μελετών εστίασαν στα κυστίδια του αίματος τα οποία προέρχονται από αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα λόγω του αυξημένου θρομβωτικού και φλεγμονώδους δυναμικού τους [164]. Όμως, τα ερυθροκυτταρικά κυστίδια που εκθέτουν φωσφατιδυλοσερίνη στην κυκλοφορία των ασθενών ρυθμίζουν την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση του μονοξειδίου του αζώτου και συμβάλλουν επίσης σε πολλές καταστάσεις υπερπηκτικότητας στον άνθρωπο [230]. Έτσι, τα επίπεδα των ερυθροκυτταρικών κυστιδίων πιθανά να σχετίζονται με καρδιαγγειακές παθήσεις που αποτελούν τη βασικότερη αιτία θανάτου στους ασθενείς με XNA.

Επιπλέον, η κυστιδιοποίηση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της γήρανσης των ερυθροκυττάρων. Η πλειονότητα των κυστιδίων ερυθροκυτταρικών στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια εκθέτει φωσφατιδυλοσερίνη, ενώ η πρωτεϊνική σύστασή τους προσομοιάζει εκείνη των γηρασμένων ερυθροκυττάρων. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [117, 176], το πρωτεϊνικό προφίλ της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης των ασθενών παρουσιάζει μεταβολές που είναι χαρακτηριστικές του μοντέλου γήρανσης που σχετιζεται με τη ζώνη-3 (σωσσωμάτωση/πρωτεόλυση ζώνης-3, αυξημένη πρόσδεση IgGs κα.) ταυτόχρονα με έλλειψη ουμπικουιτινωμένων συστατικών, χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την αυξημένη κυστιδιοποίηση της μεμβράνης [86]. Δεδομένου ότι οι ασθενείς με ΧΝΑ χαρακτηρίζονται από έναν πληθυσμό ερυθροκυττάρων εμπλουτισμένο σε νεαρά ερυθροκύτταρα σε σχέση με τα υγιή άτομα (λόγω της λήψης παραγόντων που επάγουν την ερυθροποίηση), οι δείκτες που προαναφέρθηκαν υποδηλώνουν ταυτόγρονα την ύπαρξη βλαβών στα ερυθροκύτταρα των ασθενών ή/και την επαγωγή πρόωρης γήρανσης. Τα ουραιμικά ερυθροκύτταρα φαίνεται λοιπόν να αποτελούνται από έναν μεικτό πληθυσμό τόσο νεαρών όσο και πρόωρα γηρασμένων ερυθροκυττάρων, όπως υποδηλώνει η σύσταση της πρωτεϊνικής μεμβράνης και η εντατική κυστιδιοποίηση.

Από την άλλη πλευρά, τα ουραιμικά ερυθροκύτταρα ευνοούνται σε κάποιο βαθμό από τις κυτταροπροστατευτικές ιδιότητες της ερυθροποιητίνης και πιθανά του ουρικού οξέος που υπάργουν σε περίσσεια στο πλάσμα των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, τα ερυθροκύτταρα των ασθενών παρουσιάζονται ανθεκτικά στο οσμωτικό στρες πιθανά λόγω της δράσης της ερυθροποιητίνης, όπως έχει δειχθεί σε ποντίκια τα οποία υπερεκφράζουν το γονίδιο της ερυθροποιητίνης [231], παρότι οι δομικές αλλαγές των κυττάρων μπορεί να ευθύνονται εξίσου για αυτήν την ανθεκτικότητα, όπως υποδηλώνει αυτή (Εικ.7) αλλά και προηγούμενες μελέτες [232]. Αντίστοιχα, και παρά το γεγονός ότι τα κύτταρα δέχονται συνεχώς οξειδωτικές προκλήσεις, τα ουραιμικά ερυθροκύτταρα έχουν φυσιολογικά επίπεδα ενδογενών δραστικών ριζών οξυγόνου, πιθανά λόγω της ικανότητας της ερυθροποιητίνης να δρα ως εκκαθαριστής τους [233] καθώς και λόγω της αποδεδειγμένης αντιοξειδωτικής δράσης του ουρικού οξέος [234, 235] και άλλων αντιοξειδωτικών συστατικών, τα οποία όμως, μειώνονται μετά την αιμοκάθαρση. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος παρουσιάζονται χαμηλότερα από τα επίπεδα των υγιών ατόμων μετά την αιμοκάθαρση, ενώ ταυτόχρονα τα ερυθροκύτταρα των ασθενών παρουσιάζουν συσσώρευση ενδοκυττάριων δραστικών ριζών οξυγόνου, υποδηλώνοντας πως τα ερυθροκύτταρα εκτός από την ερυθροποιητίνη χρησιμοποιούν και το ουρικό οξύ του πλάσματος ως αντιοξειδωτικό, όπως φαίνεται από προηγούμενες μελέτες σε καρκινικά κύτταρα ή κύτταρα που υφίστανται οξειδωτικό στρες [236, 237]. Επιπλέον, τα ουραιμικά ερυθροκύτταρα έχοντας μεγαλύτερο ποσοστό νεαρών ερυθροκυττάρων σε σχέση με τα φυσιολογικά, είναι αναμενόμενο να έχουν και περισσότερες θέσεις πρόσδεσης της ερυθροποιητίνης [238] και έτσι να ανταποκρίνονται περισσότερο στις επιδράσεις της ορμόνης.

A2. Η μειωμένη ανταπόκριση στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη σχετίζεται με ένα τροποποιημένο πλαίσιο ομοιόστασης των ερυθροκυττάρων στους ασθενείς με XNA

Παρότι, όπως προαναφέρθηκε, οι ασθενείς με XNA υπό αιμοκάθαρση παρουσιάζουν κάποιες βασικές τροποποιήσεις στο αιματολογικό τους πρότυπο, τόσο η παρούσα όσο και προηγούμενες μελέτες σε αυτό το πεδίο επιβεβαιώνουν τη μεγάλη διακύμανση που παρατηρείται μεταξύ των ασθενών, σε παραμέτρους που σχετίζονται με την ομοιόσταση των ερυθροκυττάρων. Η πληθώρα των πρωτοπαθών αίτιων της ασθένειας, το ηλικιακό εύρος των ασθενών, τα διάφορα συνοδά νοσήματα, η ποικιλότητα στα πρωτόκολλα θεραπείας αιμοκάθαρσης και ερυθροποιητίνης μεταξύ των ασθενών, αποτελούν κάποιες από τις αιτίες για την εμφάνιση αυτής της μεγάλης διακύμανσης. Για τη μελέτη της επίδρασης που έχει η ανθεκτικότητα στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη σε αυτό το φαινόμενο, μελετήθηκε το προφιλ των ερυθροκυτταρικών χαρακτηριστικών σε ασθενείς που ανταποκρίνονται ικανοποιητικά ή δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη.

Με εξαίρεση την πρωτεϊνική σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, τα χαρακτηριστικά της δομής και της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων των ασθενών πριν από την αιμοκάθαρση. Πιο συγκεκριμένα, ακριβώς πριν από τη συνεδρία αιμοκάθαρσης, δηλαδή όταν το ουραιμικό στρες βρίσκεται στα υψηλότερα επίπεδα, οι λεπτές διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στις δύο ομάδες μπορούν να αποτυπωθούν μόνο στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη που συνιστά μια δυναμική δομή που ανταποκρίνεται άμεσα στα ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Πράγματι, οι δυο ομάδες διαφέρουν μεταξύ τους κυρίως στο πρότυπο της πρωτεϊνικής σύστασης της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, τα χαμηλά επίπεδα των αναστολέων του συμπληρώματος, CD59 και κλαστερίνη, που ανιχνεύονται στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς, υποδηλώνουν αυξημένη επιδεκτικότητα των κυττάρων στη λύση που επέρχεται ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του συμπληρώματος (Εικ.7). Η κλαστερίνη, αποτελεί επίσης έναν βιοδείκτη κυτταρικού στρες και γήρανσης στα ερυθροκύτταρα [88] καθώς και δείκτη νεφρική βλάβης όταν βρίσκεται σε περίσσεια στο πλάσμα [239]. Γενικά, στα ερυθροκύτταρα των ασθενών με ΧΝΑ έχουν βρεθεί χαμηλά επίπεδα κλαστερίνης [176] όπως και στο πλάσμα μακροχρόνια επιζώντων ασθενών [143]. Επιπλέον, η ερυθροποιητίνη, όχι μόνο περιορίζει την αύξηση της κλαστερίνης πλάσματος, όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες [240], αλλά επηρεάζει και τα επίπεδα της κλαστερίνης στα ερυθροκύτταρα όταν βρίσκεται σε πολύ μεγάλες συγκεντώσεις, όπως φαίνεται στα ερυθροκύτταρα των μη ανταποκρινόμενων ασθενών της παρούσας μελέτης.

Από την άλλη πλευρά, παρότι προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει έναν επιταχυνόμενο φαινότυπο γήρανσης στα ερυθροκύτταρα στη XNA [117, 176], η παρούσα μελέτη διευκρινίζει ότι αυτό το χαρακτηριστικό συναντάται κυρίως σε ασθενείς που ανταποκρίνονται στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη, και εκφράζεται μέσω της περίσσειας δεικτών γήρανσης και της έλλειψης του μορίου CD47 [241] που χαρακτηρίζουν την ερυθροκυτταρική μεμβράνη των ανταποκρινόμενων ασθενών. Επιπλέον, τα

ερυθροκύτταρα των ίδιων ασθενών παρουσιάζονται περισσότερο επιδεκτικά σε αιμόλυση τόσο πριν όσο και μετά τη συνεδρία κάθαρσης και λιγότερο ανθεκτικά στο μηχανικό στρες σε σχέση με τα ερυθροκύτταρα των μη ανταποκρινόμενων ασθενών. Επομένως, είναι λογικό να υποτεθεί ότι η αναιμία στους ανταποκρινόμενους ασθενείς είναι, εν μέρει τουλάχιστον, αποτέλεσμα της αυξημένης επιδεκτικότητας στην απώλεια αιμοσφαιρίνης, (μέσω των παραπάνω μηχανισμών) στον αυξημένο οψωνισμό και στην έλλειψη του ανασταλτικού σήματος ερυθροφαγοκυττάρωσης από τα σπληνικά μακροφάγα (Εικ.7).



Εικόνα 7: Σχηματική παρουσίαση των δομικών και λειτουργικών τροποποιήσεων των ερυθροκυττάρων στους ανταποκρινόμενους (R) και μη ανταποκρινόμενους (NR) στην ερυθροποιητίνη ασθενείς, καθώς και οι πιθανές συνδέσεις τους με την αναιμία στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Γενικότερα, τα ουραιμικά ερυθροκύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξημένη κυστιδιοποίηση της μεμβράνης, εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης (PS), ολιγομερισμό της ζώνης-3, πρόσδεση IgGs, μειωμένη ουμπικουιτίνωση και έντονες μορφολογικές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, τα ερυθροκύτταρα των ανταποκρινόμενων ασθενών (R) δείχνουν αυξημένη ευαισθησία στην ερυθροφαγοκυττάρωση (μέσω μεταβολών στα επίπεδα των IgGs και CD47), καθώς και στο μηχανικό στρες και στην αιμόλυση που πυροδοτούνται κυρίως από τη διάρκεια της θεραπείας κάθαρσης. Η εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και η κυστιδιοποίηση της μεμβράνης αναστέλλονται μερικώς από την ερυθροποιητίνη και το ουρικο οξύ του πλάσματος, αντίστοιχα. Αντίθετα, η αναιμία στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς (NR) φαίνεται να σχετίζεται με βλάβες λόγω ενεργοποίησης των συστατικών του συμπληρώματος εξαιτίας των χαμηλών επιπέδων της κλαστερίνης και του μορίου CD59. Η διαδικασία της αιμοκάθαρσης και η θεραπεία με ερυθροποιητίνη επιδεινώνουν, αντίστοιχα, την εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης και την εισροή ιόντων ασβεστίου σε αυτά τα κύτταρα, ενώ η ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα και ο δείκτης κάθαρσης της ουρίας (URR) σχετίζονται αντίστροφα με την την κυστιδιοποίησή τους. Η υπερέκφραση του μεταφορέα γλυκόζης Glut-1 στα ερυθροκύτταρα των ανταποκρινόμενων ασθενών και τα υψηλά επίπεδα ερυθροποιητίνης και ουρικού οξέος στο πλάσμα των μη ανταποκρινόμενων ασθενών, σε συνδυασμό με την πρόσδεση της υπεροξειρεδοξίνης-2, πιθανά αποτελούν προσαρμοστικούς μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας για τα ερυθροκύτταρα.

Τέλος, η παρουσία των υψηλών επιπέδων ουρίας και ουρικού οξέος που βρέθηκαν στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς σε σχέση με τους ανταποκρινόμενους, θα ήταν αναμενόμενο να οδηγήσει σε αύξηση των επιπέδων των οξειδωτικών βλαβών στις πρωτεΐνες των ερυθροκυττάρων αυτών των ασθενών. Τα υψηλότερα επίπεδα της υπεροξειρεδοξίνης-2 στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς έναντι των ανταποκρινόμενων, η οποία προσδένεται στη μεμβράνη όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες οξειδωτικού στρες [242], πράγματι επιβεβαιώνει την ύπαρξη οξειδωτικών προκλήσεων. Το οξειδωτικό στρες, όμως, φαίνεται να αντιμετωπίζεται από την αντιοξειδωτική δράση της ερυθροποιητίνης και του ουρικού οξέος που βρίσκονται σε περίσσεια στο πλάσμα αυτών των ασθενών. Η αντιοξειδωτική δράση αυτών των ουσιών επιβεβαιώνεται άλλωστε στα πειράματα ανασύστασης της παρούσας μελέτης αλλά και προηγούμενων μελετών που έχουν γίνει σε κύτταρα υγιών ατόμων και θαλασσαιμικών ή ουραιμικών ασθενών [243-246]. Αντίθετα, οι οξειδωτικές προκλήσεις που επάγονται από την ουραιμία στα ερυθροκύτταρα των ανταποκρινόμενων ασθενών φαίνεται να αντιμετωπίζονται μέσω της υπερέκφρασης του μεταφορέα Glut-1 (Εικ.7). Αυτή η μεταβολή που έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες μη κατηγοριοποιημένων ασθενών με ΧΝΑ υπό αιμοκάθαρση [176, 247], υποδηλώνει μια κατάσταση υπερενεργοποιημένου μεταβολισμού στα ερυθροκύτταρα των ασθενών [248, 249] και θεωρείται ότι προωθεί τη διατήρηση επαρκών επιπέδων του ενδοκυττάριου ασκορβικού οξέος που χάνεται από τη διαδικασία της κάθαρσης [247].

A3. Ενδείξεις για διαφορετική επίδραση της αιμοκάθαρσης καθώς και για την ύπαρξη διαφορετικού μηχανισμού κυστιδιοποίησης, ανάμεσα στα ερυθροκύτταρα των ανταποκρινόμενων και μη ανταποκρινόμενων ασθενών.

Μέσω της απομάκρυνσης των ουραιμικών τοξινών, η αιμοκάθαρση βελτιώνει την αναιμία και τα επίπεδα των ολικών κυστιδίων στο πλάσμα [158, 229, 250], εξίσου στους ανταποκρινόμενους και στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς. Όσον αφορά στα ερυθροκυτταρικά κυστίδια, στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς, η διαδικασία της κάθαρσης δεν επηρεάζει τη συγκέντρωσή τους ή την πρωτεϊνική σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, όμως επιδεινώνει την εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης στα ερυθροκύτταρα. Από την άλλη πλευρά, η αιμοκάθαρση έχει ευεργετική επίδραση στους ανταποκρινόμενους ασθενείς, οδηγώντας σε επιλεκτική και ταχεία μείωση των ερυθροκυτταρικών κυστιδίων. Ένα αξιοσημείωτο γεγονός όμως είναι ότι αυτή η βελτίωση δε συμβαδίζει με την εκτεταμένη αναδιαμόρφωση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, που παρατηρείται στους ανταποκρινόμενους ασθενείς και εκδηλώνεται μέσω της μειωμένης έκφρασης πλήθους πρωτεινικών συστατικών που σχετίζονται με την κυστιδιοποίηση (π.χ. στοματίνη, φλοτιλλίνη-2, IgGs, ολιγομερή ζώνης-3, CD47, GAPDH, υπεροξειρεδοξίνη-2, υδατοπορίνη-1 κα.), αλλά ούτε με την επιλεκτική και άμεση μείωση στο μέσο όγκο των ερυθροκυττάρων που παρατηρείται μετά από την αιμοκάθαρση στο αιματολογικό πρότυπο. Έτσι, τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν την απελευθέρωση μικρών ή αρνητικών στην έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης μικροκυστιδίων και εξωσωμάτων από τα ερυθροκύτταρα των ανταποκρινόμενων ασθενών, τα οποία είναι μη ανιγνεύσιμα από την κλασσική κυτταρομετρία ροής που χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος ανίχνευσης στην παρούσα μελέτη. Η συμβατική κυτταρομετρία δεν μπορεί να ανιχνεύσει κυστίδια μικρότερα των 300nm, περιοχή η οποία περιλαμβάνει σημαντικό μέρος των εξωκυττάριων κυστιδίων του

ανθρώπινου αίματος [251], με αποτέλεσμα ένα σημαντικό ποσοστό των κυστιδίων που δεν μπορεί να ανιχνευθεί να μην υπολογίζεται στις μετρήσεις.

Προς υποστήριξη της προηγούμενης υπόθεσης, ένα χαρακτηριστικό των εξωκυττάριων κυστιδίων στη ΧΝΑ είναι το μειωμένο θρομβωτικό δυναμικό που παρουσιάζουν σε σχέση με άλλες ασθένειες [162], ενώ έχει βρεθεί πως τα ερυθροκύτταρα είναι ικανά να απελευθερώνουν κυστίδια ακόμη και σε συνθήκες κατά τις οποίες η μεμβράνη διατηρεί τη λιπιδική της ασυμμετρία [252]. Μέσω της απελευθέρωσης αυτών των μικρών και αρνητικών στην εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης κυστιδίων, η πρωτεϊνική σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης των ανταποκρινόμενων ασθενών πιθανά αναδιαμορφώνεται κατάλληλα μετά τη συνδερία κάθαρσης, όπως φαίνεται και από την ανάλυση της πρωτεϊνικής σύστασης. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδηλώνουν τη δημιουργία διαφορετικών ειδών εξωκυττάριων κυστιδίων ανάμεσα στις δύο ομάδες των ασθενών. Τα κύτταρα παράγουν έναν πληθυσμό ετερογενών κυστιδίων ως απόκριση στην κυτταρική γήρανση και σε μεταβολες του περιβάλλοντος που σχετίζονται με την επίδραση διαφόρων ειδών στρες και ερεθισμάτων ενεργοποίησης. Δεδομένου ότι τα εξωκυτταρικά κυστίδια σχετίζονται λειτουργικά με τη θρόμβωση και τη φλεγμονή [253], καθώς και ότι οι βλάβες στο ενδοθήλιο ή οι καρδιαγγειακές παθήσεις εμφανίζονται πιο συχνά σε ασθενείς που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη [254], τα παραπάνω δεδομένα αξίζουν περαιτέρω προσοχή μέσω μελετών οι οποίες θα περιλαμβάνουν μεθόδους περισσότερο κατάλληλες για τη μελέτη της βιολογίας μικρών σωματιδίων.

A4. Το διαφορετικό ομοιοστατικό πλαίσιο των ερυθροκυττάρων μεταξύ των ανταποκρινόμενων και μη ανταποκρινόμενων ασθενών μπορεί να απεικονιστεί σε βιολογικά δίκτυα

Τα χαρακτηριστικά της φυσιολογίας και η πρωτεϊνική σύσταση των ερυθροκυττάρων στους ανταποκρινόμενους και μη ανταποκρινόμενους ασθενείς αποκαλύπτουν ποικιλία στις βλάβες και τους μοριακούς μηχανισμούς που συμμετέχουν στη σηματοδότηση και την απομάκρυνσή τους από την κυκλοφορία. Τα βιολογικά δίκτυα χρησιμοποιούνται για να αναδείξουν τις σχέσεις ανάμεσα σε διάφορες παραμέτρους, και στην παρούσα μελέτη παρουσιάζουν τις στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα σε αιματολογικούς και βιολογικούς παράγοντες των ερυθροκυττάρων στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, υποδηλώνοντας ένα σαφώς διαφορετικό πλαίσιο αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στους ανταποκρινόμενους και τους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς.

Σύμφωνα με τα δίκτυα που δημιουργούνται, η δόση της ερυθροποιητίνης στους σχετίζεται της ανταποκρινόμενους ασθενείς με μείωση εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης στα ερυθροκύτταρα, ενώ οι υψηλές δόσεις ερυθροποιητίνης στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς μεταβάλλουν τα επίπεδα ασβεστιο-εξαρτώμενων πρωτεϊνών και οδηγούν σε μειωμένα κυτταρικά επίπεδα κλαστερίνης. Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες, η ερυθροποιητίνη βελτιώνει μεν την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης και την ερυθροφαγοκυττάρωση [243, 245], δεν μπορεί όμως να εμποδίσει επαρκώς την επαγωγή της ερυθρόπτωσης, καθώς προκαλεί ταυτόγρονα εισροή ιόντων Ca²⁺ στο εσωτερικό των ώριμων ερυθροκυττάρων [244] in vitro. Για το λόγο αυτό, αναστέλλει μερικώς και όχι πλήρως την εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης [245]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η επίδραση της ερυθροποιητίνης στα ιόντα ασβεστίου επιβεβαιώνεται στα ερυθροκύτταρα των μη ανταποκρινόμενων

ασθενών, ενώ η επίδραση που έχει στην εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης επιβεβαιώνεται στα ερυθροκύτταρα των ανταποκρινόμενων ασθενών. Επιπλέον, το δίκτυο των μη ανταποκρινόμενων ασθενών μέσω της θετικής ισχυρής συσχέτισης της κλαστερίνης με το μόριο CD59, επιβεβαιώνει τη στενή σχέση των δύο αυτών πρωτεϊνών στα ερυθροκύτταρα [87], καθώς και οι δύο εμποδίζουν την ενεργοποίηση των συστατικών του συμπληρώματος που εν δυνάμει οδηγεί τα κύτταρα σε λύση. Αντίστοιχα, η διάρκεια σε θεραπεία αιμοκάθαρσης επιδρά αρνητικά στα επίπεδα αιμόλυσης και στη συσσώρευση των ενδοκυττάριων δραστικών ριζών οξυγόνου στους ανταποκρινόμενους ασθενείς, ενώ στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς τα επίπεδα των δραστικών ριζών οξυγόνου των ερυθροκυττάρων παρουσιάζουν συσγέτιση με παράγοντες του πλάσματος (π.γ αλβουμίνη, φώσφορος, ολικές πρωτεΐνες). Επιπλέον, διάφορα χαρακτηριστικά του πλάσματος παρουσιάζουν συσχέτιση με την κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων. Συγκεκριμένα, στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς η ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα και ο δείκτης κάθαρσης ουρίας παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με τα ερυθροκυτταρικά κυστίδια, ενώ αντίστοιχη σχέση στους ανταποκρινόμενους ασθενείς παρουσιάζουν τα επίπεδα του ουρικού οξέος με τα ερυθροκυτταρικά κυστίδια επιβεβαιώνοντας πως η ίδια παράμετρος σχετίζεται με διαφορετικά χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος στην κάθε ομάδα των ασθενών. Τέλος, φάινεται πως τόσο το ουρικό οξύ όσο και η αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος σχετίζονται με πληθώρα ερυθροκυτταρικών παραμέτρων, υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι το ουρικό οξύ έχει έναν κυτταροπροστατευτικό ρόλο στα ερυθροκύτταρα in vivo. Η κατασκευή δικτύων με δεδομένα πρωτεωμικής και μεταβολωμικής θα βοηθούσαν περαιτέρω στην αποκάλυψη της πολυπλοκότητας της ομοιόστασης των ερυθροκυττάρων στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια.

Α5. Συμπεράσματα

Συνολικά, τα ουραιμικά ερυθροκύτταρα χαρακτηρίζονται από έντονες μορφολογικές παραμορφώσεις, εξωκυστιδιοποίηση, δείκτες θανάτου ή/και πρόωρης γήρανσης ταυτόχρονα με αυξημένη ανθεκτικότητα στο οσμωτικό στρες σε σχέση με τα υγιή ερυθροκύτταρα. Οι τροποποιήσεις των ερυθροκυττάρων είναι αποτέλεσμα των αρνητικών επιδράσεων του ουραιμικού περιβάλλοντος και ταυτόχρονα του κυτταροπροστατευτικού ρόλου που έχει η ερυθροποιητίνη και το ουρικό οξύ. Επιπλέον, μέσω της πρόβλεψης των επιπέδων των μη αναστρέψιμων ερυθροκυτταρικών τροποποιήσεων από τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης αίματος, επιβεβαιώνεται η στενή σχέση των μορφολογικών τροποποιήσεων των ερυθροκυττάρων με τη φλεγμονή και την αναιμία στη XNA.

Αντίστοιχα, τα ερυθροκύτταρα των μη ανταποκρινόμενων ασθενών χαρακτηρίζονται από αυξημένη ευαισθησία στα συστατικά του συμπληρώματος και στην εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης η οποία επάγεται από τη διαδικασία κάθαρσης και πιθανά σχετίζεται με την αναιμία. Από την άλλη πλευρά, η αναιμία στους ανταποκρινόμενους ασθενείς φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης επιδεκτικότητας των κυττάρων σε ερεθίσματα που επιφέρουν απώλεια αιμοσφαιρίνης και του αυξημένου οψωνισμού/ ερυθροφαγοκυττάρωσης, ενώ τα ερυθροκύτταρα αυτών των ασθενών χαρακτηρίζονται από έναν διαφορετικό μηχανισμό κυστιδιοποίησης σε σχέση με τους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς. Έτσι, η απορρύθμιση της ομοιόστασης φαίνεται πως οδηγεί σε διαφορετικούς μηχανισμούς σηματοδότησης και απομάκρυνσης των ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία στις δύο ομάδες των ασθενών. Η μεγάλη διακύμανση που παρατηρείται σε πολλά αιματολογικά χαρακτηριστικά και παραμέτρους της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων στους ασθενείς επιβεβαιώνεται και από την παρούσα αλλά και από προηγούμενες μελέτες και δείχνει την ανάγκη για μια πιο εξατομικευμένη προσέγγιση της νόσου. Τέλος, δεδομένου ότι τα ερυθροκύτταρα θεωρούνται ζωτικής σημασίας δείκτες της κατάστασης του οργανισμού, σε συνδυασμό με τις τελευταίες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας που προτείνει την εξατομικευμένη πλέον θεραπεία των ασθενειών [224], οι δομικές και βιοχημικές τροποποιήσεις των ερυθροκυττάρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ένα εργαλείο διάγνωσης σε συνδυασμό με τη θεραπεία κάθαρσης και τη χορήγηση ερυθροποιητίνης, έτσι ώστε να διαλευκανθεί όχι μόνο η αναιμία άλλά και το φλεγμονώδες και οξειδωτικό πρότυπο που χαρακτηρίζει τον κάθε ασθενή ξεχωριστά.

ΜΕΡΟΣ Β': Επίδραση της αιμοδιαδιήθησης έναντι της συμβατικής αιμοκάθαρσης στα ερυθροκύτταρα ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μειωμένη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων και οι παθολογικές τροποποιήσεις τους προκύπτουν ως αποτέλεσμα των επιδράσεων της ουραιμίας και της διαδικασίας κάθαρσης, συμβάλλοντας εν μέρει στην αναιμία και σε άλλες επιπλοκές του αιματολογικού συστήματος. Η συμβατική αιμοκάθαρση έχει μελετηθεί διεξοδικά όσον αφορα στις επιπτώσεις που έχει τόσο στη μορφολογία όσο και στη φυσιολογία των ερυθροκυττάρων [117, 176]. Αντίθετα, δεν γνωρίζουμε καθόλου αν και σε ποιο βαθμό η αιμοδιαδιήθηση αποτελεί έναν στρεσσογόνο παράγοντα για τα κύτταρα του αίματος ή αν είναι περισσότερο «φιλική» σε αυτά ως θεραπεία νεφρικής αποκατάστασης σε σχέση με τη συμβατική αιμοκάθαρση. Έτσι, στο δεύτερο μέρος της παρούσας εργασίας αξιολογήθηκε μια σειρά από παραμέτρους της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων με το αιματολογικό πρότυπο ασθενών που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση και αιμοδιαδιήθηση με σκοπό την εύρεση τροποποιήσεων που προκύπτουν στα ερυθροκύτταρα ως αποτέλεσμα των διαφορετικών μεθόδων κάθαρσης καθώς και τη σχέση αυτών των μεταβολών με την αναιμία.

B1. Η χρόνια επίδραση της αιμοδιαδιήθησης στο αιματολογικό πρότυπο και σε παραμέτρους της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων.

Όπως έδειξαν τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, οι ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα ουραιμικών τοξινών σε σχέση με τους ασθενείς που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση. Όμως οι ουραιμικές τοξίνες θεωρείται ότι αντιμετωπίζονται αποτελεσματικότερα με αυτή τη μέθοδο κάθαρσης σε σχέση με τη συμβατική αιμοκάθαρση, δεδομένου ότι αυτή απομακρύνει τοξίνες τόσο μέσω διάχυσης όσο και διήθησης [193, 255]. Το γεγονός αυτό, επιβεβαιώνεται και από τα υψηλότερα επίπεδα του δείκτη κάθαρσης ουρίας (URR) που παρουσιάζει η συγκεκριμένη μέθοδος, παρά τα αρχικά υψηλότερα επίπεδα των ουραιμικών τοξινών, υποδηλώνοντας ότι η μέθοδος αυτή είναι πράγματι αποτελεσματικότερη στην απομάκρυνση τοξινών, ανεξάρτητα από τα αρχικά τους επίπεδα. Ως αποτέλεσμα της καλύτερης κάθαρσης των τοξινών μέσω της αιμοδιαδιήθησης (οι οποίες θεωρείται ότι καταστέλλουν την ερυθροποίηση μειώνοντας την απόκριση των κυττάρων του μυελού στην ερυθροποιητίνη [256] και ότι επάγουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις [257]) οι ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση αναμενόμενα χαρακτηρίζονται από καλύτερο έλεγχο της αναιμίας και χαμηλότερα επίπεδα φλεγμονώδους φορτίου σε σχέση με τους ασθενείς που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση. Τα χαρακτηριστικά αυτά υποδηλώνονται από τους βελτιωμένους ερυθροκυτταρικούς δείκτες στο αιματολογικό πρότυπο και τα μειωμένα επίπεδα των δεικτών φλεγμονής στο βιοχημικό πρότυπο, όπως είναι η σιδηροδεσμευτική ικανότητα [258] και ο δείκτης RDW [259]. Παρά την ασυμφωνία που επικρατεί στο πεδίο [190, 260], τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν την ευεργετική δράση της αιμοδιαδιήθησης έναντι της συμβατικής αιμοκάθαρσης στην αναιμία και τη φλεγμονή στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια [193, 261].

Εκτός από τις μεγάλες διαφορές που παρατηρούνται στο αιματολογικό πρότυπο μεταξύ των δύο ομάδων, οι ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση παρουσιάζουν μικρές, αλλά λειτουργικά σημαντικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με εκείνους που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση. Σε αυτές περιλαμβάνονται τα χαμηλότερα ποσοστά ερυθροκυττάρων που εκθέτουν φωσφατιδυλοσερίνη, τα χαμηλότερα επίπεδα

μικροκυστιδίων πλάσματος και η σχεδόν φυσιολογική πρωτεϊνική σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης πριν από την αιμοκάθαρση. Η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης, ένα κοινό χαρακτηριστικό των ουραιμικών ερυθροκυττάρων [23], είναι δείκτης ερυθρόπτωσης και σήμα απομάκρυνσης των κυττάρων από την κυκλοφορία μέσω ερυθροφαγοκυττάρωσης. Επιπλέον, η συσσώρευση των μικροκυστιδίων εμπλέκεται στη φλεγμονή, στις διαδικασίες πήξης και στα καρδιαγγειακά προβλήματα των ααμοκαθαιρόμενων [262, 263] και μη [90] ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, και τελικά, ο χαμηλός ρυθμός κυστιδιοποίησης φαίνεται να σχετίζεται με το μειωμένο ρυθμό καρδιαγγειακής θνησιμότητας που έχει παρατηρηθεί στους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση έναντι της συμβατικής αιμοκάθαρσης [264].

Τέλος, σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύστασης της μεμβράνης, τα ερυθροκύτταρα των ασθενών σε αιμοδιαδιήθηση, παρουσιάζουν μόνο υπερέκφραση στην μοριακή συνοδό Hsp70, η οποία έχει προστατευτικό ρόλο για τις σκελετικές πρωτεΐνες [67], και έλλειψη στην υδατοπορίνη-1, η οποία πιθανά σχετίζεται με την επίδραση της ερυθροποιητίνης στη ρύθμιση του νερού στα κύτταρα [265, 266] και με την αναιμία [267] ή/και με τις στοματοκυτταρικές τροποποιήσεις που παρουσιάζουν τα ερυθροκύτταρα αυτών των ασθενών, όπως αναλύεται παρακάτω. Από την άλλη πλευρά, η ερυθροκυτταρική μεμβράνη των ασθενών που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση χαρακτηρίζεται από διάφορες διαταραχές, όπως συσσώρευση των IgGs του πλάσματος, υπερέκφραση του μεταφορέα γλυκόζης-1 και σημαντική έλλειψη του μορίου CD47, που αποτελεί «δείκτη-εαυτού» για τα κύτταρα, υποδηλώνοντας μεταβολικό στρες και αυξημένη επιδεκτικότητα αυτών των κυττάρων σε οψωνισμό και ερυθροφαγοκυττάρωση.

B2. Άμεσες και παροδικές επιπτώσεις της θεραπείας με αιμοδιαδιήθηση στο αιματολογικό πρότυπο και σε παραμέτρους της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων.

Παρά τη θετική επίδραση που έχει η θεραπεία της αιμοδιαδιήθησης μακροπρόθεσμα μέσω της απομάκρυνσης των ουραιμικών τοξινών, προσωρινά μπορεί να επιφέρει και στρεσογόνες προκλήσεις στα ερυθροκύτταρα όπως δείχνουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δειγμάτων που λήφθηκαν μετά το τέλος της συνεδρίας κάθαρσης. Πιο συγκεκριμένα, τα χαμηλότερα επίπεδα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος η οποία οφείλεται στο ουρικό οξύ (UA/AC) πέφτουν σε επίπεδα χαμηλότερα σε σχέση με εκείνα των ασθενών που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση και αυτό φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της καλύτερης απομάκρυνσης του ουρικού οξέος από το πλάσμα μέσω της διαδικασίας κάθαρσης. Όμως, το ουρικό οξύ, το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο, εκτός από ουραιμική τοξίνη είναι και βασικό αντιοξειδωτικό συστατικό του πλάσματος που προστατεύει τόσο το πλάσμα (στου οποίου την αντιοξειδωτική ικανότητα συμμετέχει σε ποσοστό 35-65%) όσο και τα κύτταρα από οξειδωτικές βλάβες, μέσω της ικανότητάς του να εκκαθαρίζει τις δραστικές ρίζες [235, 268]. Μάλιστα, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι, είτε ως δείκτης της καλής κατάστασης θρέψης του οργανισμού είτε όχι, τα χαμηλά επίπεδα ουρικού οξέος έχουν χαρακτηριστεί ως παράγοντας κινδύνου θνησιμότητας στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, σε αντίθεση με το γενικό πληθυσμό [204]. Έτσι, το υψηλό δυναμικό κάθαρσης της αιμοδιαδιήθησης πιθανά οδηγεί σε απώλεια και άλλων συστατικών, εκτός από τις τοξίνες, τα οποία συμμετέχουν στις αντιδράσεις αντιοξειδωτικής άμυνας του πλάσματος, όπως η αλβουμίνη [269, 270], διάφορες βιταμίνες (κυρίως βιταμίνη C) [271] και ιχνοστοιχεία [272], παρότι δεν υπάρχει συμφωνία στις μελέτες όσον αφορά σε αυτήν την επίδραση της

αιμοδιαδιήθησης [273]. Ο ρόλος των ιχνοστοιχείων είναι σημαντικός καθώς αποτελούν συμπαράγοντες για πολλά αντιοξειδωτικά ένζυμα του αίματος [274], η αλβουμίνη είναι η κύρια αντιοξειδωτική πρωτεΐνη του πλάσματος [106], ενώ η βιταμίνη C έχει ενεργό ρόλο στην επαναφορά της βιταμίνης Ε στην ανηγμένη μορφή της ώστε να αποτρέπεται αποτελεσματικά η λιπιδική υπεροξείδωση.

Η σημαντική απώλεια του ουρικού οξέος καθώς και άλλων αντιοξειδωτικών συστατικών του πλάσματος μέσω της αιμοδιαδιήθησης, πιθανά να εξηγεί τα παθολογικά επίπεδα των ενδοκυττάριων δραστικών ριζών οξυγόνου καθώς και την αυξημένη ευαισθησία σε εξωγενή οξειδωτικά ερεθίσματα που παρουσιάζουν τα ερυθροκύτταρα αυτών των ασθενών μετά το τέλος της συνεδρίας κάθαρσης. Η έλλειψη της ανηγμένης γλουταθειόνης, για παράδειγμα, έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο αιμόλυσης στη ΧΝΑ [275]. Η γλουταθειόνη είναι ένα μικρό τριπεπτίδιο που συμμετέχει σε αντιοξειδωτικά μονοπάτια των ερυθροκυττάρων και μπορεί εύκολα λόγω του μικρού του μεγέθους να περάσει μέσα από τους πόρους των φίλτρων αιμοκάθαρσης [126], ιδιαίτερα κατά την αιμοδιαδιήθηση όπου η διήθηση ενισχύει περαιτέρω τη μεταφορά των ουσιών κατά μήκος της μεμβράνης κάθαρσης. Το οξειδωτικό στρες που προκύπτει ως αποτέλεσμα των εκδηλώνεται παραπάνω μεταβολών επίσης μέσω της συσσώρευσης της οξειδωμένης/αποδιαταγμένης αιμοσφαιρίνης στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, της αύξησης της εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης και των επιπέδων αιμόλυσης, και μέσω της εμφάνισης στοματοκυτταρικών τροποποιήσεων [60] στους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση. Η απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης εξωκυττάρια, μετά από τη διαδικασία κάθαρσης, και τα προϊόντα αποικοδόμησής της αναμένεται να επάγουν αντιδράσεις οξείδωσης στο αίμα των ασθενών οι οποίες οδηγούν τελικά σε μια συνεχή ανατροφοδότηση των οξειδωτικών αντιδράσεων [60]. Η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης, που αποτελεί δείκτη οξειδωτικού στρες για τα κύτταρα [96], και η αιμόλυση που προκαλούνται μετά από την αιμοδιαδιήθηση, φαίνεται να αντιπροσωπεύουν δυσμενείς επιπτώσεις της αύξησης των οξειδωτικών ερεθισμάτων που επιφέρει η διαδικασία της αιμοδιαδιήθησης προσωρινά. Η εμφάνιση των στοματοκυττάρων, τα οποία αποτελούν αναστρέψιμες μορφολογικές τροποποιήσεις των ερυθροκυττάρων, έχουν επίσης συσχετισθεί με διάφορες καταστάσεις φλεγμονής και οξειδωτικού στρες [225]. Γενικότερα, τα στοματοκύτταρα αποτελούν μορφολογικές αλλαγές ερυθροκυττάρων με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα [276], οι οποίες προκύπτουν ως απόκριση των κυττάρων στην επίδραση οξειδωτικών ερεθισμάτων [245]. Μάλιστα, είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι στους ασθενείς της παρούσας μελέτης που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των στοματοκυττάρων και των επιπέδων ουρικού οξέος που αποτελεί το ισχυρότερο μη πρωτεϊνικό αντιοξειδωτικό συστατικό του πλάσματος. Η στοματοκυττάρωση φαίνεται ότι αποτελεί χαρακτηριστικό μόνο της ομάδας των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση και αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλα χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων όπως η χαμηλή έκφραση της στοματίνης σε σχέση με τους ασθενείς που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση, ταυτόχρονα με τη μειωμένη έκφραση της υδατοπορίνης-1 και του μεταφορέα Glut-1 με τις οποίες θεωρείται ότι αλληλεπιδρά [26]. η στοματοκυττάρωση πυροδοτείται μόνο Επιπλέον, από τŋ διαδικασία της αιμοδιαδιήθησης και όχι από τη συμβατική αιμοκάθαρση, όπως φαίνεται από τα ποσοστά των στοματοκυττάρων μετά το τέλος της συνεδρίας κάθαρσης στις δύο ομάδες. Έτσι, η παρουσία των στοματοκυττάρων εκτός από την απόκριση στο οξειδωτικό στρες ίσως

οφείλεται και στην ύπαρξη συστατικών του πλάσματος τα οποία εισέρχονται στη μεμβράνη προκαλώντας επέκταση της εσωτερικής σε σχέση με την εξωτερική λιπιδική μονοστιβάδα, χαρακτηριστικό που επάγει το στοματοκυτταρικό φαινότυπο [277]. Τέλος, τα στοματοκύτταρα θεωρείται ότι παρουσιάζουν διαταραχή στη μεταφορά των κατιόντων, οδηγούν σε αλλαγές στην ικανότητα παραμόρφωσης της μεμβράνης και στη δημιουργία κυτταρικών συσσωματωμάτων στην κυκλοφορία των ασθενών, κυρίως μετά από τη διαδικασία της αιμοδιαδιήθησης όπου η παρουσία τους γίνεται εντονότερη [278, 279].

Τόσο η ουραιμία όσο και τα στρεσογόνα ερεθίσματα που προέρχονται από τη διαδικασία κάθαρσης πυροδοτούν κυστιδιοποίηση των κυττάρων του αίματος [160, 263]. Στους ασθενείς της παρούσας μελέτης, και ιδιαίτερα σε εκείνους που υποβάλλονται σε παρατηρείται στο συμβατική αιμοκάθαρση, συσσώρευση κυστιδίων πλάσμα προεργόμενων από τα κύτταρα του αίματος, συμπεριλαμβανομένων των ερυθροκυττάρων, σε σχέση με τα υγιή άτομα. Η διαδικασία της κάθαρσης μειώνει σημαντικά τον πληθυσμό των ολικών κυστιδίων (που περιλαμβάνει κυστίδια αιμοπεταλιακής, ερυθροκυτταρικής, λευκοκυτταρικής και ενδοθηλιακής προέλευσης) σε φυσιολογικά επίπεδα, αλλά έχει ελάχιστη επίδραση στα ερυθροκυτταρικά κυστίδια, ιδιαίτερα στην ομάδα των ασθενών που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση, υποδηλώνοντας τη δημιουργία νέων κυστιδίων κατά τη διαδικασία της αιμοδιαδιήθησης. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται κι από το γεγονός ότι, τα ερυθροκυτταρικά κυστίδια μετά από τη συμβατική αιμοκάθαρση παρουσιάζουν μια τάση προς μείωση σε σχέση με τα επίπεδα των κυστιδίων πριν από την αιμοκάθαρση, αν και αυτή η τάση δεν είναι στατιστικά σημαντική, πιθανά λόγω της μεγάλης διακύμανσης που παρουσιάζουν οι τιμές των κυστιδίων εντός της ομάδας των ασθενών. Στους ίδιους ασθενείς μάλιστα, το οξειδωτικό στρες, ως παράγοντας που πυροδοτεί την κυστιδιοποίηση στα ερυθροκύτταρα, παρουσιάζεται σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από την αιμοκάθαρση σε αντίθεση με τους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοδιαδιήθηση. Επιπλέον, ο στοματοκυτταρικός φαινότυπος θεωρείται ότι εμποδίζει την κυστιδιοποίηση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τα παραπάνω ευρήματα και τις υποθέσεις [280, 281] και δείχνει ότι τα επίπεδα των ερυθροκυτταρικών κυστιδίων στο πλάσμα είναι τελικά αποτέλεσμα μορφολογικών τροποποιήσεων των ερυθροκυττάρων, στρεσογόνων ερεθισμάτων της ουραιμίας αλλά και επιδράσεων της διαδικασίας κάθαρσης.

Β3. Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει τη θετική επίδραση που έχει η αιμοδιαδιήθηση έναντι της συμβατικής αιμοκάθαρσης μακροπρόθεσμα, όχι μόνο όσον αφορά στην καλύτερη αντιμετώπιση της αναιμίας και της φλεγμονής, αλλά και στα χαρακτηριστικά της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων και στα επίπεδα των βιοδραστικών μικροκυστιδίων στο πλάσμα των ασθενών πριν από την αιμοκάθαρση. Από την άλλη πλευρά, με την προσωρινή μεν αλλά οξεία αύξηση του οξειδωτικού στρες, η οποία πιθανά οφείλεται στην απώλεια αντιοξειδωτικών συστατικών του πλάσματος κατά την αιμοδιαδιήθηση, μειώνεται σε σημαντικό βαθμό η λειτουργική αποδοτικότητα της συγκεκριμένης μεθόδου καθώς άμεσα οδηγεί στην εμφάνιση σημάτων απομάκρυνσης των κυττάρων από την κυκλοφορία, σε παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου, κυστιδιοποίηση της μεμβράνης, αιμόλυση και στοματοκυττάρωση.

Παρότι χρειάζεται περαιτέρω μελέτη όσον αφορά στις μακροπρόθεσμες επιδράσεις της διαδικασίας αιμοδιαδιήθησης, αλλά κυρίως στις βραχυπρόθεσμες, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν ότι η προστασία του αίματος μέσω χορήγησης αντιοξειδωτικών ουσιών κατά τη διάρκεια της συνεδρίας κάθαρσης, θα μπορούσε να βελτιώσει το θεραπευτικό δυναμικό της μεθόδου της αιμοδιαδιήθησης έναντι της συμβατικής αιμοκάθαρσης, τουλάχιστον όσον αφορά στην αναιμία και στα χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων. Άλλωστε, προηγούμενες μελέτες σε ασθενείς που υποβάλλονται σε συμβατική αιμοκάθαρση και στους οποίους χορηγήθηκαν συμπληρώματα όπως ανηγμένη γλουταθειόνη, L-καρνιτίνη και βιταμίνη C έχουν δείξει βελτίωση στη διάρκεια ζωής [282], στην οσμωτική ευθραυστότητα [179], στις μεταβολικές λειτουργίες [283], στην ικανότητα παραμόρφωσης των ερυθροκυττάρων και στη λιπιδική υπεροξείδωση [179] της μεμβράνης. Επιπλέον, σε άλλες μελέτες, η χρήση φίλτρων αιμοκάθαρσης εμπλουτισμένων με βιταμίνη-Ε ταυτόχρονα με ενδοφλέβια έγχυση γλουταθειόνης ή βιταμίνης C έχει συσχετισθεί με σημαντική βελτίωση όλων των παραπάνω χαρακτηριστικών, οδηγώντας στην καλύτερη αντιμετώπιση της αναιμίας αλλά και στην αποτελεσματικότερη ανταπόκριση στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη [284, 285].

ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΤ. ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι τροποποιήσεις των ερυθροκυττάρων στη Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια είναι αποτέλεσμα των αρνητικών επιδράσεων του ουραιμικού περιβάλλοντος και ταυτόχρονα του κυτταροπροστατευτικού ρόλου που έχει η ερυθροποιητίνη και το ουρικό οξύ.

Τα ερυθροκύτταρα των μη ανταποκρινόμενων ασθενών χαρακτηρίζονται από αυξημένη ευαισθησία στα συστατικά του συμπληρώματος και στην εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης, χαρακτηριστικά που πιθανά σχετίζονται με την αναιμία.

Η αναιμία στους ανταποκρινόμενους ασθενείς φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης επιδεκτικότητας των κυττάρων σε ερεθίσματα που επιφέρουν απώλεια αιμοσφαιρίνης, αυξημένο οψωνισμό και ερυθροφαγοκυττάρωση

> Τα ερυθροκύτταρα των ανταποκρινόμενων ασθενών χαρακτηρίζονται από διαφορετικό μηχανισμό κυστιδιοποίησης σε σχέση με τους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς.

Η μεγάλη διακύμανση που παρατηρείται σε πολλά αιματολογικά χαρακτηριστικά και παραμέτρους της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων στους ασθενείς δείχνει την ανάγκη για μια πιο εξατομικευμένη προσέγγιση της νόσου.

Η αιμοδιαδιήθηση έχει θετική επίδραση μακροπρόθεσμα έναντι της συμβατικής αιμοκάθαρσης τόσο στην αναιμία και τη φλεγμονή, όσο και στα χαρακτηριστικά της φυσιολογίας των ερυθροκυττάρων και στα επίπεδα των βιοδραστικών μικροκυστιδίων του πλάσματος.

> Τα άμεσα αποτελέσματα της αιμοδιαδιήθησης περιλαμβάνουν την προσωρινή μεν αλλά οξεία αύξηση του οξειδωτικού στρες, η οποία πιθανά οφείλεται στην απώλεια αντιοξειδωτικών συστατικών του πλάσματος ταυτόχρονα με τις ουραιμικές τοξίνες.

Η προστασία του αίματος μέσω χορήγησης αντιοξειδωτικών ουσιών κατά τη διάρκεια της συνεδρίας κάθαρσης, θα μπορούσε να βελτιώσει το θεραπευτικό δυναμικό της μεθόδου της αιμοδιαδιήθησης έναντι της συμβατικής αιμοκάθαρσης, τουλάχιστον όσον αφορά στην αναιμία και στα χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ζ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Mohandas, N. and P.G. Gallagher, *Red cell membrane: past, present, and future.* Blood, 2008. **112**(10): p. 3939-48.
- 2. Lin, Y., et al., Blood group antigens and normal red blood cell physiology: a Canadian blood services research and development symposium. Transfus Med Rev, 2009. **23**(4): p. 292-309.
- 3. Pandey, K.B. and S.I. Rizvi, *Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans.* Oxid Med Cell Longev, 2010. **3**(1): p. 2-12.
- 4. de Back, D.Z., et al., *Of macrophages and red blood cells; a complex love story.* Front Physiol, 2014. **5**: p. 9.
- 5. Boas, F.E., L. Forman, and E. Beutler, *Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3077-81.
- 6. Willekens, F.L., et al., *Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism?* Br J Haematol, 2008. **141**(4): p. 549-56.
- 7. Pasini, E.M., et al., *In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells*. Blood, 2006. **108**(3): p. 791-801.
- 8. Bruce, L., *Mutations in band 3 and cation leaky red cells.* Blood Cells Mol Dis, 2006. **36**(3): p. 331-6.
- 9. Walsh, S.B. and G.W. Stewart, *Anion exchanger 1: Protean function and associations*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(12): p. 1919-22.
- 10. Wang, C.C., et al., *Identification of the major casein kinase I phosphorylation sites on erythrocyte band 3.* Blood, 1997. **89**(8): p. 3019-24.
- 11. Harrison, M.L., et al., *Role of band 3 tyrosine phosphorylation in the regulation of erythrocyte glycolysis.* J Biol Chem, 1991. **266**(7): p. 4106-11.
- 12. Ferru, E., et al., *Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3.* Blood, 2011. **117**(22): p. 5998-6006.
- 13. Pantaleo, A., et al., Oxidized and poorly glycosylated band 3 is selectively phosphorylated by Syk kinase to form large membrane clusters in normal and G6PD-deficient red blood cells. Biochem J, 2009. **418**(2): p. 359-67.
- 14. Yiquin & Junfan, *Erythrocyte membrane proteins and membrane skeleton*. Frontiers of Biology in China Volume 2, Issue 3, pp 247–255
- 15. Merry, A.H., et al., *The use of monoclonal antibodies to quantify the levels of sialoglycoproteins alpha and delta and variant sialoglycoproteins in human erythrocyte membranes.* Biochem J, 1986. **233**(1): p. 93-8.
- 16. Rogers, M.E., et al., *Decrease in erythrocyte glycophorin sialic acid content is associated with increased erythrocyte aggregation in human diabetes.* Clin Sci (Lond), 1992. **82**(3): p. 309-13.
- 17. Bruce, L.J., et al., Altered band 3 structure and function in glycophorin A- and B-deficient (*MkMk*) red blood cells. Blood, 1994. **84**(3): p. 916-22.
- 18. Anstee, D.J., et al., *Two individuals with elliptocytic red cells apparently lack three minor erythrocyte membrane sialoglycoproteins.* Biochem J, 1984. **218**(2): p. 615-9.
- 19. Reid, M.E., J.A. Chasis, and N. Mohandas, *Identification of a functional role for human erythrocyte sialoglycoproteins beta and gamma*. Blood, 1987. **69**(4): p. 1068-72.
- 20. Khoory, J., et al., Ligation of Glycophorin A Generates Reactive Oxygen Species Leading to Decreased Red Blood Cell Function. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0141206.
- 21. Wistow, G.J., M.M. Pisano, and A.B. Chepelinsky, *Tandem sequence repeats in transmembrane channel proteins*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(5): p. 170-1.
- 22. Smith, B.L. and P. Agre, *Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins*. J Biol Chem, 1991. **266**(10): p. 6407-15.
- 23. Mathai, J.C., et al., *Functional analysis of aquaporin-1 deficient red cells. The Colton-null phenotype.* J Biol Chem, 1996. **271**(3): p. 1309-13.
- 24. Smith, B.L., et al., *Concurrent expression of erythroid and renal aquaporin CHIP and appearance of water channel activity in perinatal rats.* J Clin Invest, 1993. **92**(4): p. 2035-41.
- 25. Benga, G., The first discovered water channel protein, later called aquaporin 1: molecular characteristics, functions and medical implications. Mol Aspects Med, 2012. **33**(5-6): p. 518-34.

- 26. Rungaldier, S., et al., *Stomatin interacts with GLUT1/SLC2A1, band 3/SLC4A1, and aquaporin-1 in human erythrocyte membrane domains.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1828**(3): p. 956-66.
- 27. Blanc, L., et al., *The water channel aquaporin-1 partitions into exosomes during reticulocyte maturation: implication for the regulation of cell volume.* Blood, 2009. **114**(18): p. 3928-34.
- 28. Vera, J.C., et al., Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. Nature, 1993. **364**(6432): p. 79-82.
- 29. May, J.M., *Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte.* Front Biosci, 1998. **3**: p. d1-10.
- 30. Montel-Hagen, A., et al., *Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C.* Cell, 2008. **132**(6): p. 1039-48.
- 31. Troadec, M.B. and J. Kaplan, *Some vertebrates go with the GLO*. Cell, 2008. **132**(6): p. 921-2.
- 32. Khan, A.A., et al., *Dematin and adducin provide a novel link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1.* J Biol Chem, 2008. **283**(21): p. 14600-9.
- 33. Di Leva, F., et al., *The plasma membrane Ca2+ ATPase of animal cells: structure, function and regulation.* Arch Biochem Biophys, 2008. **476**(1): p. 65-74.
- 34. Falchetto, R., T. Vorherr, and E. Carafoli, *The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca2+ pump interacts with the transduction domain of the enzyme.* Protein Sci, 1992. **1**(12): p. 1613-21.
- 35. Shalev, O., et al., Abnormal erythrocyte calcium homeostasis in oxidant-induced hemolytic disease. Blood, 1981. **58**(6): p. 1232-5.
- 36. Lindberg, F.P., et al., *Rh-related antigen CD47 is the signal-transducer integrin-associated protein.* J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 1567-70.
- 37. Bruce, L.J., et al., *A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane*. Blood, 2003. **101**(10): p. 4180-8.
- 38. Khandelwal, S., N. van Rooijen, and R.K. Saxena, *Reduced expression of CD47 during murine red blood cell (RBC) senescence and its role in RBC clearance from the circulation.* Transfusion, 2007. **47**(9): p. 1725-32.
- 39. Burger, P., et al., *CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis*. Blood, 2012. **119**(23): p. 5512-21.
- 40. Sosale, N.G., et al., *Cell rigidity and shape override CD47's "self"-signaling in phagocytosis by hyperactivating myosin-II.* Blood, 2015. **125**(3): p. 542-52.
- 41. Morgan, B.P. and S. Meri, *Membrane proteins that protect against complement lysis*. Springer Semin Immunopathol, 1994. **15**(4): p. 369-96.
- 42. Mrowczynska, L., et al., *Echinophilic proteins stomatin, sorcin, and synexin locate outside gangliosideM1 (GM1) patches in the erythrocyte membrane.* Biochem Biophys Res Commun, 2010. **401**(3): p. 396-400.
- 43. Salzer, U. and R. Prohaska, Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. Blood, 2001. **97**(4): p. 1141-3.
- 44. Salzer, U., et al., *Ca(++)-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII), and sorcin.* Blood, 2002. **99**(7): p. 2569-77.
- 45. Basu, A. and A. Chakrabarti, *Hemoglobin interacting proteins and implications of spectrin hemoglobin interaction.* J Proteomics, 2015. **128**: p. 469-75.
- 46. Machnicka, B., et al., *Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(2): p. 191-201.
- 47. Tang, F., et al., *Ankyrin exposure induced by activated protein kinase C plays a potential role in erythrophagocytosis.* Biochim Biophys Acta, 2016. **1860**(1 Pt A): p. 120-8.
- Peng, W. and L.A. Sung, *RGD-containing ankyrin externalized onto the cell surface triggers alphaVbeta3 integrin-mediated erythrophagocytosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2011.
 407(3): p. 466-71.
- 49. Hughes, C.A. and V. Bennett, Adducin: a physical model with implications for function in assembly of spectrin-actin complexes. J Biol Chem, 1995. **270**(32): p. 18990-6.
- 50. Anong, W.A., et al., Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion. Blood, 2009. **114**(9): p. 1904-12.

- 51. Kuhlman, P.A., et al., *A new function for adducin. Calcium/calmodulin-regulated capping of the barbed ends of actin filaments.* J Biol Chem, 1996. **271**(14): p. 7986-91.
- 52. Baines, A.J., *Evolution of spectrin function in cytoskeletal and membrane networks*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 4): p. 796-803.
- 53. Satchwell, T.J., et al., *Protein 4.2: a complex linker*. Blood Cells Mol Dis, 2009. **42**(3): p. 201-10.
- 54. Koshino, I., N. Mohandas, and Y. Takakuwa, *Identification of a novel role for dematin in regulating red cell membrane function by modulating spectrin-actin interaction.* J Biol Chem, 2012. **287**(42): p. 35244-50.
- 55. Fowler, V.M. and V. Bennett, *Erythrocyte membrane tropomyosin. Purification and properties.* J Biol Chem, 1984. **259**(9): p. 5978-89.
- 56. An, X., et al., *Tropomyosin modulates erythrocyte membrane stability*. Blood, 2007. **109**(3): p. 1284-8.
- 57. Kim, A.C., et al., *Complete genomic organization of the human erythroid p55 gene (MPP1), a membrane-associated guanylate kinase homologue.* Genomics, 1996. **31**(2): p. 223-9.
- 58. Hemming, N.J., et al., *Identification of the membrane attachment sites for protein 4.1 in the human erythrocyte.* J Biol Chem, 1995. **270**(10): p. 5360-6.
- 59. Boschetti, E. and P.G. Righetti, *The art of observing rare protein species in proteomes with peptide ligand libraries.* Proteomics, 2009. **9**(6): p. 1492-510.
- 60. Quaye, I.K., *Extracellular hemoglobin: the case of a friend turned foe*. Front Physiol, 2015. **6**: p. 96.
- 61. Rifkind, J.M. and E. Nagababu, *Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(17): p. 2274-83.
- 62. Gladwin, M.T., T. Kanias, and D.B. Kim-Shapiro, *Hemolysis and cell-free hemoglobin drive an intrinsic mechanism for human disease*. J Clin Invest, 2012. **122**(4): p. 1205-8.
- 63. Moore, R.B., et al., *Reconstitution of Ca(2+)-dependent K+ transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein.* J Biol Chem, 1991. **266**(28): p. 18964-8.
- 64. Low, F.M., M.B. Hampton, and C.C. Winterbourn, *Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte.* Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(9): p. 1621-30.
- Han, Y.H., et al., Peroxiredoxin II is essential for preventing hemolytic anemia from oxidative stress through maintaining hemoglobin stability. Biochem Biophys Res Commun, 2012. 426(3): p. 427-32.
- 66. Matte, A., et al., *Membrane association of peroxiredoxin-2 in red cells is mediated by the Nterminal cytoplasmic domain of band 3.* Free Radic Biol Med, 2013. **55**: p. 27-35.
- 67. Biondani, A., et al., *Heat-shock protein-27, -70 and peroxiredoxin-II show molecular chaperone function in sickle red cells: Evidence from transgenic sickle cell mouse model.* Proteomics Clin Appl, 2008. **2**(5): p. 706-19.
- 68. Low, F.M., et al., *Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte.* Blood, 2007. **109**(6): p. 2611-7.
- 69. Matte, A., et al., *The novel role of peroxiredoxin-2 in red cell membrane protein homeostasis and senescence.* Free Radic Biol Med, 2014. **76**: p. 80-8.
- 70. Gudi, T. and C.M. Gupta, *hsp 70-like protein in rhesus erythrocyte cytosol and its interactions with membrane skeleton under heat and pathologic stress.* J Biol Chem, 1993. **268**(28): p. 21344-50.
- De Franceschi, L., et al., *Pharmacological inhibition of calpain-1 prevents red cell dehydration and reduces Gardos channel activity in a mouse model of sickle cell disease.* FASEB J, 2013. 27(2): p. 750-9.
- 72. Bogdanova, A., et al., *Calcium in red blood cells-a perilous balance*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(5): p. 9848-72.
- 73. Perrotta, S., P.G. Gallagher, and N. Mohandas, *Hereditary spherocytosis*. Lancet, 2008. **372**(9647): p. 1411-26.
- 74. Liu, S.C., L.H. Derick, and J. Palek, *Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton.* J Cell Biol, 1987. **104**(3): p. 527-36.

- 75. Cimen, M.Y., *Free radical metabolism in human erythrocytes*. Clin Chim Acta, 2008. **390**(1-2): p. 1-11.
- 76. Pandolfi, P.P., et al., *Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress.* EMBO J, 1995. **14**(21): p. 5209-15.
- 77. van Zwieten, R., A.J. Verhoeven, and D. Roos, *Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells.* Free Radic Biol Med, 2014. **67**: p. 377-86.
- 78. Stefanovic, M., et al., Oxygen regulates the band 3-ankyrin bridge in the human erythrocyte membrane. Biochem J, 2013. **449**(1): p. 143-50.
- 79. Sega, M.F., et al., *Fluorescence assay of the interaction between hemoglobin and the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3.* Blood Cells Mol Dis, 2015. **55**(3): p. 266-71.
- Antonelou, M.H., A.G. Kriebardis, and I.S. Papassideri, Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. Blood Transfus, 2010. 8 Suppl 3: p. s39-47.
- 81. Bosman, G.J., F.L. Willekens, and J.M. Werre, *Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis?* Cell Physiol Biochem, 2005. **16**(1-3): p. 1-8.
- 82. Lutz, H.U. and A. Bogdanova, *Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 387.
- 83. Bratosin, D., et al., Active caspases-8 and -3 in circulating human erythrocytes purified on immobilized annexin-V: a cytometric demonstration. Cytometry A, 2009. **75**(3): p. 236-44.
- Shai, E., et al., Comparative analysis of platelet-derived microparticles reveals differences in their amount and proteome depending on the platelet stimulus. J Proteomics, 2012. 76 Spec No.: p. 287-96.
- 85. Rubin, O., et al., *Red blood cell microparticles: clinical relevance*. Transfus Med Hemother, 2012. **39**(5): p. 342-7.
- 86. Bosman, G.J., et al., *The proteome of erythrocyte-derived microparticles from plasma: new clues for erythrocyte aging and vesiculation.* J Proteomics, 2012. **76 Spec No.**: p. 203-10.
- Antonelou, M.H., et al., Apolipoprotein J/clusterin in human erythrocytes is involved in the molecular process of defected material disposal during vesiculation. PLoS One, 2011. 6(10): p. e26033.
- 88. Antonelou, M.H., et al., *Apolipoprotein J/Clusterin is a novel structural component of human erythrocytes and a biomarker of cellular stress and senescence.* PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26032.
- 89. Tschopp, J., et al., *Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9.* J Immunol, 1993. **151**(4): p. 2159-65.
- 90. Puddu, P., et al., *The involvement of circulating microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases.* Can J Cardiol, 2010. **26**(4): p. 140-5.
- 91. Arashiki, N., et al., *Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence.* Biochemistry, 2013. **52**(34): p. 5760-9.
- 92. Lutz, H.U., *Naturally occurring autoantibodies in mediating clearance of senescent red blood cells.* Adv Exp Med Biol, 2012. **750**: p. 76-90.
- 93. Hugel, B., et al., *Membrane microparticles: two sides of the coin.* Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 22-7.
- 94. Kiefer, C.R., et al., *Hemoglobin-spectrin complexes: interference with spectrin tetramer assembly as a mechanism for compartmentalization of band 1 and band 2 complexes.* Blood, 1995. **86**(1): p. 366-71.
- 95. Chang, H.Y. and X. Yang, *Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases.* Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 821-46.
- Mandal, D., et al., Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. FEBS Lett, 2002. 513(2-3): p. 184-8.

- 97. Mandal, D., et al., *Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity* of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39460-7.
- 98. Mandal, D., et al., *Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3)*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52551-8.
- 99. Burger, P., et al., *CD47 in Erythrocyte Ageing and Clearance the Dutch Point of View.* Transfus Med Hemother, 2012. **39**(5): p. 348-52.
- 100. Corsi, D., et al., Alteration of alpha-spectrin ubiquitination due to age-dependent changes in the erythrocyte membrane. Eur J Biochem, 1999. **261**(3): p. 775-83.
- 101. Lang, E. and F. Lang, *Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death.* Semin Cell Dev Biol, 2015. **39**: p. 35-42.
- 102. Lang, K.S., et al., *Mechanisms of suicidal erythrocyte death*. Cell Physiol Biochem, 2005. **15**(5): p. 195-202.
- 103. Tsantes, A.E., et al., *Redox imbalance, macrocytosis, and RBC homeostasis*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(7-8): p. 1205-16.
- 104. Dumaswala, U.J., et al., *Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(9-10): p. 1041-9.
- 105. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress*. Clin Chim Acta, 2003. **329**(1-2): p. 23-38.
- 106. Taverna, M., et al., *Specific antioxidant properties of human serum albumin.* Ann Intensive Care, 2013. **3**(1): p. 4.
- 107. Vitek, L., *The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases.* Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 55.
- 108. Alvarez-Lario, B. and J. Macarron-Vicente, *Uric acid and evolution*. Rheumatology (Oxford), 2010. **49**(11): p. 2010-5.
- 109. Feng, S., et al., *Uric acid levels and all-cause mortality in peritoneal dialysis patients.* Kidney Blood Press Res, 2013. **37**(2-3): p. 181-9.
- 110. Jiang, M.Y., et al., *Clinical implications and outcome prediction in chronic hemodialysis patients with lower serum potassiumxuric acid product*. Eur J Intern Med, 2015. **26**(8): p. 646-51.
- 111. Latif, W., et al., *Uric acid levels and all-cause and cardiovascular mortality in the hemodialysis population*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(10): p. 2470-7.
- 112. Gao, X., et al., Prospective study of plasma urate and risk of Parkinson disease in men and women. Neurology, 2016. **86**(6): p. 520-6.
- 113. Piccinini, G., et al., Oxidation state of glutathione and membrane proteins in human red cells of different age. Mech Ageing Dev, 1995. **78**(1): p. 15-26.
- 114. Lei, X.G., *In vivo antioxidant role of glutathione peroxidase: evidence from knockout mice.* Methods Enzymol, 2002. **347**: p. 213-25.
- 115. Williams, M.E., J. Sandeep, and A. Catic, *Aging and ESRD demographics: consequences for the practice of dialysis.* Semin Dial, 2012. **25**(6): p. 617-22.
- 116. Thomas, R., A. Kanso, and J.R. Sedor, *Chronic kidney disease and its complications*. Prim Care, 2008. **35**(2): p. 329-44, vii.
- 117. Antonelou, M.H., et al., Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. J Proteomics, 2011. **74**(11): p. 2441-52.
- 118. Nurko, S., Anemia in chronic kidney disease: causes, diagnosis, treatment. Cleve Clin J Med, 2006. **73**(3): p. 289-97.
- 119. Dhondt, A., et al., The removal of uremic toxins. Kidney Int Suppl, 2000. 76: p. S47-59.
- 120. Karkar, A., *Modalities of hemodialysis: quality improvement*. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2012.23(6): p. 1145-61.
- 121. Fischbach, M., et al., *Hemodiafiltration: the addition of convective flow to hemodialysis.* Pediatr Nephrol, 2012. **27**(3): p. 351-6.
- 122. Eckardt, K.U., Pathophysiology of renal anemia. Clin Nephrol, 2000. 53(1 Suppl): p. S2-8.

- 123. Clermont, G., et al., Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. Cardiovasc Res, 2000. **47**(3): p. 618-23.
- 124. Jackson, P., et al., *Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure.* Clin Chem, 1995. **41**(8 Pt 1): p. 1135-8.
- 125. Peuchant, E., et al., *Lipoperoxidation in plasma and red blood cells of patients undergoing haemodialysis: vitamins A, E, and iron status.* Free Radic Biol Med, 1994. **16**(3): p. 339-46.
- 126. Varan, H.I., et al., Acute effects of hemodialysis on oxidative stress parameters in chronic uremic patients: comparison of two dialysis membranes. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2010. **3**: p. 39-45.
- 127. Zhang, K., et al., Low levels of vitamin C in dialysis patients is associated with decreased prealbumin and increased C-reactive protein. BMC Nephrol, 2011. **12**: p. 18.
- 128. Roehrs, M., et al., *The plasma retinol levels as pro-oxidant/oxidant agents in haemodialysis patients*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(7): p. 2212-8.
- 129. Ceballos-Picot, I., et al., *Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure.* Free Radic Biol Med, 1996. **21**(6): p. 845-53.
- 130. Melissinos, K.G., et al., *Serum and erythrocyte glutathione reductase activity in chronic renal failure.* Nephron, 1981. **28**(2): p. 76-9.
- 131. Richard, M.J., et al., *Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure.* Nephron, 1991. **57**(1): p. 10-5.
- 132. Tonelli, M., et al., *Trace elements in hemodialysis patients: a systematic review and metaanalysis.* BMC Med, 2009. **7**: p. 25.
- 133. Lin, T.H., et al., *Trace elements and lipid peroxidation in uremic patients on hemodialysis.* Biol Trace Elem Res, 1996. **51**(3): p. 277-83.
- 134. Roxborough, H.E., et al., *Plasma glutathione peroxidase activity is reduced in haemodialysis patients*. Nephron, 1999. **81**(3): p. 278-83.
- 135. Ozden, M., et al., *Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients.* Clin Biochem, 2002. **35**(4): p. 269-73.
- 136. Pavone, B., et al., *Plasma protein carbonylation in chronic uremia*. J Nephrol, 2011. **24**(4): p. 453-64.
- 137. El-Wakil, H.S., et al., Relation of middle molecules levels and oxidative stress to erythropoietin requirements in high-flux versus low-flux hemodialysis. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2013.
 24(5): p. 930-7.
- 138. Mayer, B., et al., *Effect of hemodialysis on the antioxidative properties of serum*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1638**(3): p. 267-72.
- 139. Gerdemann, A., et al., *Plasma levels of advanced glycation end products during haemodialysis, haemodiafiltration and haemofiltration: potential importance of dialysate quality.* Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(6): p. 1045-9.
- 140. Himmelfarb, J. and E. McMonagle, *Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia.* Kidney Int, 2001. **60**(1): p. 358-63.
- 141. Wapensky, T., S.R. Alexander, and M. Sarwal, *Postdialysis albumin: a better nutrition marker in pediatric hemodialysis patients?* J Ren Nutr, 2004. **14**(1): p. 45-51.
- 142. Ogasawara, Y., et al., Formation of albumin dimers induced by exposure to peroxides in human plasma: a possible biomarker for oxidative stress. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **340**(2): p. 353-8.
- 143. Lin, Y.P., et al., *Plasma protein characteristics of long-term hemodialysis survivors*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40232.
- 144. Tomic, M., K. Galesic, and I. Markota, *Endothelin-1 and nitric oxide in patients on chronic hemodialysis.* Ren Fail, 2008. **30**(9): p. 836-42.
- 145. Hakim, R.M., et al., *Complement activation and hypersensitivity reactions to dialysis membranes.* N Engl J Med, 1984. **311**(14): p. 878-82.
- 146. Stenvinkel, P., et al., *Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure.* Kidney Int, 1999. **55**(5): p. 1899-911.

- 147. Pupim, L.B., et al., Influence of initiation of maintenance hemodialysis on biomarkers of inflammation and oxidative stress. Kidney Int, 2004. **65**(6): p. 2371-9.
- 148. Costa, E., et al., *Inflammation, T-cell phenotype, and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy.* J Clin Immunol, 2008. **28**(3): p. 268-75.
- 149. Borazan, A., et al., *The effects of hemodialysis and peritoneal dialysis on serum homocysteine and C-reactive protein levels*. Mediators Inflamm, 2004. **13**(5-6): p. 361-4.
- 150. Costa, E., et al., *Neutrophil activation and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in hemodialysis patients.* Am J Nephrol, 2008. **28**(6): p. 935-40.
- 151. Kaysen, G.A., et al., *The acute-phase response varies with time and predicts serum albumin levels in hemodialysis patients. The HEMO Study Group.* Kidney Int, 2000. **58**(1): p. 346-52.
- 152. Kalender, B., et al., *The effects of acute phase proteins on serum albumin, transferrin and haemoglobin in haemodialysis patients.* Int J Clin Pract, 2002. **56**(7): p. 505-8.
- 153. La Ferla, K., et al., Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB. FASEB J, 2002. **16**(13): p. 1811-3.
- 154. Khankin, E.V., et al., Soluble erythropoietin receptor contributes to erythropoietin resistance in end-stage renal disease. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9246.
- 155. Morceau, F., M. Dicato, and M. Diederich, *Pro-inflammatory cytokine-mediated anemia: regarding molecular mechanisms of erythropoiesis.* Mediators Inflamm, 2009. **2009**: p. 405016.
- 156. Fahmy, M. and S.P. Young, *Modulation of iron metabolism in monocyte cell line U937 by inflammatory cytokines: changes in transferrin uptake, iron handling and ferritin mRNA.* Biochem J, 1993. **296 (Pt 1)**: p. 175-81.
- 157. Bester, J. and E. Pretorius, *Effects of IL-1beta, IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets and clot viscoelasticity.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 32188.
- 158. Faure, V., et al., *Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(3): p. 566-73.
- 159. Daniel, L., et al., *Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis.* Kidney Int, 2006. **69**(8): p. 1416-23.
- 160. Boulanger, C.M., et al., In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. Hypertension, 2007. **49**(4): p. 902-8.
- 161. Vanholder, R., et al., *Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production: characterization of the role of p-cresol.* Kidney Int, 1995. **47**(2): p. 510-7.
- 162. Trappenburg, M.C., et al., *Chronic renal failure is accompanied by endothelial activation and a large increase in microparticle numbers with reduced procoagulant capacity.* Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(4): p. 1446-53.
- 163. Burton, J.O., et al., *Elevated levels of procoagulant plasma microvesicles in dialysis patients.* PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72663.
- 164. Amabile, N., et al., *Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure.* J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(11): p. 3381-8.
- 165. Sotirakopoulos, N., et al., The red blood cell deformability in patients suffering from end stage renal failure on hemodialysis or continuous ambulatory peritoneal dialysis. Ren Fail, 2004. 26(2): p. 179-83.
- 166. Ibrahim, F.F., M.M. Ghannam, and F.M. Ali, *Effect of dialysis on erythrocyte membrane of chronically hemodialyzed patients*. Ren Fail, 2002. **24**(6): p. 779-90.
- 167. Saradhadevi, V., et al., Alterations in band 3 protein and anion exchange in red blood cells of renal failure patients. Mol Cell Biochem, 2005. **273**(1-2): p. 11-24.
- 168. Hashimoto, H., T. Mio, and K. Sumino, *Lipid abnormalities of erythrocyte membranes in hemodialysis patients with chronic renal failure.* Clin Chim Acta, 1996. **252**(2): p. 137-45.
- 169. Abed, M., et al., *Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease*. J Mol Med (Berl), 2014. **92**(8): p. 871-9.
- 170. Brimble, K.S., et al., *Effect of chronic kidney disease on red blood cell rheology*. Clin Hemorheol Microcirc, 2006. **34**(3): p. 411-20.

- 171. Agroyannis, B., et al., Alterations in echinocyte transformation and erythrocyte sedimentation rate during hemodialysis. Artif Organs, 1997. **21**(4): p. 327-30.
- 172. Agroyannis, B., et al., *Relation between echinocytosis and erythrocyte calcium content in hemodialyzed uremic patients*. Artif Organs, 2001. **25**(6): p. 486-90.
- 173. Shainkin-Kestenbaum, R., Y. Giat, and G.M. Berlyne, *The toxicity of guanidino compounds in the red blood cell in uremia and the effects of hemodialysis.* Nephron, 1982. **31**(1): p. 20-3.
- 174. Stepniewska, J., et al., *Erythrocyte antioxidant defense system in patients with chronic renal failure according to the hemodialysis conditions.* Arch Med Res, 2006. **37**(3): p. 353-9.
- 175. Durak, I., et al., Oxidative stress in patients with chronic renal failure: effects of hemodialysis. Med Princ Pract, 2004. **13**(2): p. 84-7.
- 176. Antonelou, M.H., et al., Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study. J Proteomics, 2014.
 101: p. 88-101.
- 177. Cristol, J.P., et al., *Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation*. Nephrol Dial Transplant, 1997. **12**(11): p. 2312-7.
- 178. Rusu, A., et al., *The influence of vitamin E supplementation on erythropoietin responsiveness in chronic hemodialysis patients with low levels of erythrocyte superoxide dismutase.* Int Urol Nephrol, 2013. **45**(2): p. 495-501.
- 179. Candan, F. and F. Gultekin, *Effect of vitamin C and zinc on osmotic fragility and lipid peroxidation in zinc-deficient haemodialysis patients.* Cell Biochem Funct, 2002. **20**(2): p. 95-8.
- 180. Georgatzakou, H.T., et al., *Red blood cell abnormalities and the pathogenesis of anemia in end-stage renal disease.* Proteomics Clin Appl, 2016. **10**(8): p. 778-90.
- 181. Hirayama, A., et al., *Hemodialysis does not influence the peroxidative state already present in uremia*. Nephron, 2000. **86**(4): p. 436-40.
- 182. Ruskovska, T., et al., Ankyrin is the major oxidised protein in erythrocyte membranes from end-stage renal disease patients on chronic haemodialysis and oxidation is decreased by dialysis and vitamin C supplementation. Free Radic Res, 2015. **49**(2): p. 175-85.
- 183. Himmelfarb, J., et al., *Increased susceptibility to erythrocyte C5b-9 deposition and complement-mediated lysis in chronic renal failure.* Kidney Int, 1999. **55**(2): p. 659-66.
- 184. Bonomini, M., et al., *Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in chronic renal failure*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(9): p. 1982-90.
- 185. Wang, J., et al., Calcium homeostasis in red blood cells of dialysis patients in dependence of erythropoietin treatment. Front Physiol, 2014. 5: p. 16.
- 186. Gafter, U., et al., *Red blood cell calcium homeostasis in patients with end-stage renal disease.* J Lab Clin Med, 1989. **114**(3): p. 222-31.
- 187. Polak-Jonkisz, D., L. Purzyc, and D. Zwolinska, *Ca*(2+)-*Mg* (2+)-*dependent ATP-ase activity in hemodialyzed children. Effect of a hemodialysis session.* Pediatr Nephrol, 2010. **25**(12): p. 2501-7.
- 188. Soldati, L., et al., *Erythrocyte voltage-dependent calcium influx is reduced in hemodialyzed patients.* Kidney Int, 1999. **56**(1): p. 190-7.
- 189. Bonomini, M., et al., *Red blood cells may contribute to hypercoagulability in uraemia via enhanced surface exposure of phosphatidylserine.* Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(2): p. 361-6.
- 190. Locatelli, F., et al., Predictors of haemoglobin levels and resistance to erythropoiesisstimulating agents in patients treated with low-flux haemodialysis, haemofiltration and haemodiafiltration: results of a multicentre randomized and controlled trial. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(9): p. 3594-600.
- 191. van der Weerd, N.C., et al., *Resistance to erythropoiesis stimulating agents in patients treated with online hemodiafiltration and ultrapure low-flux hemodialysis: results from a randomized controlled trial (CONTRAST).* PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94434.
- 192. Bowry, S.K. and E. Gatti, *Impact of hemodialysis therapy on anemia of chronic kidney disease: the potential mechanisms.* Blood Purif, 2011. **32**(3): p. 210-9.

- 193. Susantitaphong, P., M. Siribamrungwong, and B.L. Jaber, *Convective therapies versus low-flux hemodialysis for chronic kidney failure: a meta-analysis of randomized controlled trials.* Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(11): p. 2859-74.
- 194. Leurs, P., B. Lindholm, and P. Stenvinkel, *Effects of hemodiafiltration on uremic inflammation*. Blood Purif, 2013. **35 Suppl 1**: p. 11-7.
- 195. Amabile, N., et al., *Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study.* Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(5): p. 1873-80.
- 196. Noce, A., et al., Erythrocyte glutathione transferase: a new biomarker for hemodialysis adequacy, overcoming the Kt/V(urea) dogma? Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e377.
- 197. Kalantar-Zadeh, K., et al., A malnutrition-inflammation score is correlated with morbidity and mortality in maintenance hemodialysis patients. Am J Kidney Dis, 2001. **38**(6): p. 1251-63.
- 198. Racki, S., et al., *C-reactive protein is a strong predictor of mortality in hemodialysis patients.* Ren Fail, 2006. **28**(5): p. 427-33.
- 199. Honda, H., et al., *Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin a as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD.* Am J Kidney Dis, 2006. **47**(1): p. 139-48.
- 200. Kuragano, T., et al., Association between hemoglobin variability, serum ferritin levels, and adverse events/mortality in maintenance hemodialysis patients. Kidney Int, 2014. **86**(4): p. 845-54.
- 201. Beddhu, S., et al., *Serum alkaline phosphatase and mortality in hemodialysis patients*. Clin Nephrol, 2010. **74**(2): p. 91-6.
- 202. Abe, M., K. Okada, and M. Soma, *Mineral metabolic abnormalities and mortality in dialysis patients*. Nutrients, 2013. **5**(3): p. 1002-23.
- 203. Floege, J., et al., Serum *iPTH*, calcium and phosphate, and the risk of mortality in a European haemodialysis population. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(6): p. 1948-55.
- 204. Beberashvili, I., et al., Serum uric acid as a clinically useful nutritional marker and predictor of outcome in maintenance hemodialysis patients. Nutrition, 2015. **31**(1): p. 138-47.
- 205. Phrommintikul, A., et al., Mortality and target haemoglobin concentrations in anaemic patients with chronic kidney disease treated with erythropoietin: a meta-analysis. Lancet, 2007. **369**(9559): p. 381-8.
- 206. Elliott, S., E. Pham, and I.C. Macdougall, *Erythropoietins: a common mechanism of action.* Exp Hematol, 2008. **36**(12): p. 1573-84.
- 207. Badve, S.V., et al., Interventions for erythropoietin-resistant anaemia in dialysis patients. Cochrane Database Syst Rev, 2013(8): p. CD006861.
- 208. Bamgbola, O.F., *Pattern of resistance to erythropoietin-stimulating agents in chronic kidney disease.* Kidney Int, 2011. **80**(5): p. 464-74.
- 209. Costa, E., et al., *Altered erythrocyte membrane protein composition in chronic kidney disease stage 5 patients under haemodialysis and recombinant human erythropoietin therapy*. Blood Purif, 2008. **26**(3): p. 267-73.
- 210. Pereira, R., et al., *Neutrophil and monocyte activation in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship with resistance to recombinant human erythropoietin and to the hemodialysis procedure.* Hemodial Int, 2010. **14**(3): p. 295-301.
- 211. Pereira, R., et al., *Elastase release during the hemodialysis procedure seems to induce changes in red blood cell membrane proteins.* Hemodial Int, 2011. **15**(3): p. 429-31.
- 212. Gallucci, M.T., et al., *Red blood cell membrane lipid peroxidation and resistance to erythropoietin therapy in hemodialysis patients.* Clin Nephrol, 1999. **52**(4): p. 239-45.
- 213. Beutler, E., C. West, and K.G. Blume, *The removal of leukocytes and platelets from whole blood.* J Lab Clin Med, 1976. **88**(2): p. 328-33.
- 214. Dodge, J.T., C. Mitchell, and D.J. Hanahan, *The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes*. Arch Biochem Biophys, 1963. **100**: p. 119-30.
- 215. Advani, R., et al., Oxidative red blood cell membrane injury in the pathophysiology of severe mouse beta-thalassemia. Blood, 1992. **79**(4): p. 1064-7.

- 216. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
- 217. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
- 218. Parpart, A.K., P.B. Lorenz, and et al., *The osmotic resistance (fragility) of human red cells.* J Clin Invest, 1947. **26**(4): p. 636-40.
- 219. Harm, S.K., et al., *Changes in mechanical fragility and free hemoglobin levels after processing* salvaged cardiopulmonary bypass circuit blood with a modified ultrafiltration device. J Extra Corpor Technol, 2012. **44**(1): p. 21-5.
- 220. Han, V., K. Serrano, and D.V. Devine, A comparative study of common techniques used to measure haemolysis in stored red cell concentrates. Vox Sang, 2010. **98**(2): p. 116-23.
- 221. Sutherland, D.R., M. Keeney, and A. Illingworth, *Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry*. Cytometry B Clin Cytom, 2012. **82**(4): p. 195-208.
- 222. Benzie, I.F. and J.J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay.* Anal Biochem, 1996. **239**(1): p. 70-6.
- 223. Duplancic, D., et al., *Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity.* Molecules, 2011. **16**(8): p. 7058-68.
- 224. Pretorius, E., et al., *Erythrocytes and their role as health indicator: Using structure in a patient-orientated precision medicine approach.* Blood Rev, 2016. **30**(4): p. 263-74.
- 225. Gyawali, P., et al., Association of abnormal erythrocyte morphology with oxidative stress and inflammation in metabolic syndrome. Blood Cells Mol Dis, 2015. **54**(4): p. 360-3.
- 226. Bonomini, M., et al., *Involvement of phosphatidylserine exposure in the recognition and phagocytosis of uremic erythrocytes.* Am J Kidney Dis, 2001. **37**(4): p. 807-14.
- 227. Polak-Jonkisz, D., et al., *Erythrocyte caspase-3 levels in children with chronic kidney disease.* Clin Biochem, 2013. **46**(3): p. 219-24.
- 228. Nguyen, D.B., et al., *Characterization of Microvesicles Released from Human Red Blood Cells*. Cell Physiol Biochem, 2016. **38**(3): p. 1085-99.
- 229. Gao, C., et al., Indolic uremic solutes enhance procoagulant activity of red blood cells through phosphatidylserine exposure and microparticle release. Toxins (Basel), 2015. **7**(11): p. 4390-403.
- 230. Tantawy, A.A., et al., *Flow cytometric assessment of circulating platelet and erythrocytes microparticles in young thalassemia major patients: relation to pulmonary hypertension and aortic wall stiffness.* Eur J Haematol, 2013. **90**(6): p. 508-18.
- 231. Foller, M., et al., *Enhanced susceptibility to suicidal death of erythrocytes from transgenic mice overexpressing erythropoietin.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **293**(3): p. R1127-34.
- 232. Tzounakas, V.L., et al., *Donor variation effect on red blood cell storage lesion: a multivariable, yet consistent, story.* Transfusion, 2016. **56**(6): p. 1274-86.
- 233. Rowley, D.A. and B. Halliwell, *Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: a physiologically significant reaction?* Arch Biochem Biophys, 1983. **225**(1): p. 279-84.
- 234. Ames, B.N., et al., Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(11): p. 6858-62.
- 235. Tzounakas, V.L., et al., Uric acid variation among regular blood donors is indicative of red blood cell susceptibility to storage lesion markers: A new hypothesis tested. Transfusion, 2015. **55**(11): p. 2659-71.
- 236. Becker, B.F., *Towards the physiological function of uric acid.* Free Radic Biol Med, 1993. **14**(6): p. 615-31.
- 237. Itahana, Y., et al., *The uric acid transporter SLC2A9 is a direct target gene of the tumor suppressor p53 contributing to antioxidant defense.* Oncogene, 2015. **34**(14): p. 1799-810.
- 238. Mihov, D., et al., *Erythropoietin activates nitric oxide synthase in murine erythrocytes.* Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **297**(2): p. C378-88.

- 239. Sasaki, D., et al., *Comparison of the course of biomarker changes and kidney injury in a rat model of drug-induced acute kidney injury*. Biomarkers, 2011. **16**(7): p. 553-66.
- 240. Patel, N.S., et al., *Delayed administration of pyroglutamate helix B surface peptide (pHBSP), a novel nonerythropoietic analog of erythropoietin, attenuates acute kidney injury.* Mol Med, 2012. **18**: p. 719-27.
- 241. Oldenborg, P.A., et al., *Role of CD47 as a marker of self on red blood cells*. Science, 2000. **288**(5473): p. 2051-4.
- 242. Rocha, S., et al., *Linkage of cytosolic peroxiredoxin 2 to erythrocyte membrane imposed by hydrogen peroxide-induced oxidative stress.* Blood Cells Mol Dis, 2009. **43**(1): p. 68-73.
- 243. Amer, J., M. Dana, and E. Fibach, *The antioxidant effect of erythropoietin on thalassemic blood cells*. Anemia, 2010. **2010**: p. 978710.
- 244. Myssina, S., et al., *Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(11): p. 2750-7.
- 245. Vota, D.M., et al., *Differential erythropoietin action upon cells induced to eryptosis by different agents.* Cell Biochem Biophys, 2013. **65**(2): p. 145-57.
- 246. Boran, M., et al., Red cell lipid peroxidation and antioxidant system in haemodialysed patients: influence of recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) treatment. Int Urol Nephrol, 1998. **30**(4): p. 507-12.
- 247. Wann, J.G., et al., Enhanced expression of glucose transporter 1 on erythrocyte membrane in hemodialysis patients: the possible role in erythrocyte ascorbate recycling. Am J Kidney Dis, 2006. **47**(6): p. 1055-63.
- 248. Marlewski, M., et al., Accelerated degradation of adenine nucleotide in erythrocytes of patients with chronic renal failure. Mol Cell Biochem, 2000. **213**(1-2): p. 93-7.
- 249. Marlewski, M., et al., Increased rate of adenine incorporation into adenine nucleotide pool in erythrocytes of patients with chronic renal failure. Nephron, 2000. **86**(3): p. 281-6.
- 250. Gao, C., et al., *Thrombotic Role of Blood and Endothelial Cells in Uremia through Phosphatidylserine Exposure and Microparticle Release.* PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142835.
- 251. Yuana, Y., R.M. Bertina, and S. Osanto, *Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles.* Thromb Haemost, 2011. **105**(3): p. 396-408.
- 252. Arraud, N., et al., *Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration.* J Thromb Haemost, 2014. **12**(5): p. 614-27.
- 253. Gyorgy, B., et al., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles.* Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(16): p. 2667-88.
- 254. Panichi, V., et al., *Anaemia and resistance to erythropoiesis-stimulating agents as prognostic factors in haemodialysis patients: results from the RISCAVID study.* Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(8): p. 2641-8.
- 255. Cleto, S.A., et al., *Hemodiafiltration Decreases Serum Levels of Inflammatory Mediators in Severe Leptospirosis: A Prospective Study.* PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0160010.
- 256. Locatelli, F. and L. Del Vecchio, *Dialysis adequacy and response to erythropoietic agents: what is the evidence base?* Nephrol Dial Transplant, 2003. **18 Suppl 8**: p. viii29-35.
- 257. Rossi, M., et al., Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a crosssectional study in stage 3-4 chronic kidney disease. Arch Med Res, 2014. **45**(4): p. 309-17.
- 258. Bross, R., et al., Association of serum total iron-binding capacity and its changes over time with nutritional and clinical outcomes in hemodialysis patients. Am J Nephrol, 2009. **29**(6): p. 571-81.
- 259. Lippi, G., et al., Relation between red blood cell distribution width and inflammatory biomarkers in a large cohort of unselected outpatients. Arch Pathol Lab Med, 2009. 133(4): p. 628-32.
- 260. Schneider, A., et al., *The effect of high-flux hemodialysis on hemoglobin concentrations in patients with CKD: results of the MINOXIS study.* Clin J Am Soc Nephrol, 2012. **7**(1): p. 52-9.
- 261. Li, Y., et al., *Clinical outcomes for maintenance hemodialysis patients using a high-flux (FX60) dialyzer.* Ren Fail, 2013. **35**(9): p. 1240-5.

- 262. Ando, M., et al., *Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients.* Kidney Int, 2002. **62**(5): p. 1757-63.
- 263. Daniel, L., et al., *Circulating microparticles in renal diseases*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(7): p. 2129-32.
- 264. Daugirdas, J.T., *Lower cardiovascular mortality with high-volume hemodiafiltration: a cool effect?* Nephrol Dial Transplant, 2016. **31**(6): p. 853-6.
- 265. De Beuf, A., et al., *Epoetin delta reduces oxidative stress in primary human renal tubular cells*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 395785.
- 266. Rentsch, R.L., et al., *Effects of darbepoetin injections on erythrocyte membrane transport protein expressions in humans.* J Appl Physiol (1985), 2006. **101**(1): p. 164-8.
- 267. Crisp, R.L., et al., *Red blood cell aquaporin-1 expression is decreased in hereditary spherocytosis.* Ann Hematol, 2016. **95**(10): p. 1595-601.
- 268. Assis, R.P., et al., *Effects of uremic solutes on reactive oxygen species in vitro model systems* as a possibility of support the renal function management. BMC Nephrol, 2015. **16**: p. 50.
- 269. Weng, C.H., et al., Association Between Hemodiafiltration and Hypoalbuminemia in Middle-Age Hemodialysis Patients. Medicine (Baltimore), 2016. **95**(15): p. e3334.
- 270. Ahrenholz, P.G., et al., *Dialysis membrane-dependent removal of middle molecules during hemodiafiltration: the beta2-microglobulin/albumin relationship.* Clin Nephrol, 2004. **62**(1): p. 21-8.
- 271. Morena, M., et al., *Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients.* Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(3): p. 422-7.
- 272. Prodanchuk, M., et al., Disturbances of trace element metabolism in ESRD patients receiving hemodialysis and hemodiafiltration. Cent European J Urol, 2014. **66**(4): p. 472-6.
- 273. Basile, C., *The effect of convection on the nutritional status of haemodialysis patients.* Nephrol Dial Transplant, 2003. **18 Suppl 7**: p. vii46-9; discussion vii58-9.
- 274. Chan, S., B. Gerson, and S. Subramaniam, *The role of copper, molybdenum, selenium, and zinc in nutrition and health*. Clin Lab Med, 1998. **18**(4): p. 673-85.
- 275. Weinstein, T., et al., *Haemolysis in haemodialysis patients: evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress.* Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(6): p. 883-7.
- 276. Richards, R.S., L. Wang, and H. Jelinek, *Erythrocyte oxidative damage in chronic fatigue syndrome*. Arch Med Res, 2007. **38**(1): p. 94-8.
- 277. Reinhart, W.H. and S. Chien, *Echinocyte-stomatocyte transformation and shape control of human red blood cells: morphological aspects.* Am J Hematol, 1987. **24**(1): p. 1-14.
- 278. Chabanel, A., W. Reinhart, and S. Chien, *Increased resistance to membrane deformation of shape-transformed human red blood cells*. Blood, 1987. **69**(3): p. 739-43.
- 279. Reinhart, W.H. and S. Chien, *Red cell rheology in stomatocyte-echinocyte transformation:* roles of cell geometry and cell shape. Blood, 1986. **67**(4): p. 1110-8.
- 280. Butikofer, P., U. Brodbeck, and P. Ott, *Modulation of erythrocyte vesiculation by amphiphilic drugs*. Biochim Biophys Acta, 1987. **901**(2): p. 291-5.
- 281. Schreier, S., S.V. Malheiros, and E. de Paula, *Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects.* Biochim Biophys Acta, 2000. **1508**(1-2): p. 210-34.
- 282. Usberti, M., et al., *Effect of exogenous reduced glutathione on the survival of red blood cells in hemodialyzed patients.* J Nephrol, 1997. **10**(5): p. 261-5.
- 283. Matsumoto, Y., et al., *Effects of L-carnitine supplementation on renal anemia in poor responders to erythropoietin.* Blood Purif, 2001. **19**(1): p. 24-32.
- 284. Usberti, M., et al., *Effects of a vitamin E-bonded membrane and of glutathione on anemia and erythropoietin requirements in hemodialysis patients.* J Nephrol, 2002. **15**(5): p. 558-64.
- 285. Yang, C.C., et al., *Effects of vitamin C infusion and vitamin E-coated membrane on hemodialysis-induced oxidative stress.* Kidney Int, 2006. **69**(4): p. 706-14.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ερυθροκύτταρα των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (XNA) τελικού σταδίου που υποβάλλονται σε θεραπεία αιμοκάθαρσης παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές τόσο στο αιματολογικό πρότυπο σε σχέση με υγιή άτομα όσο και σε χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων σε επίπεδο οξειδωτικού στρες, μορφολογίας, ερυθρόπτωσης, πρωτεϊνικής σύστασης καθώς και αλλαγές σε χαρακτηριστικά του πλάσματος. Η ανθεκτικότητα στην ερυθροποιητίνη έχει συσχετισθεί με ερυθροκυτταρικές βλάβες χωρίς όμως να έχει μελετηθεί ενδελεχώς αυτός ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης. Όσον αφορά στην αιμοκάθαρση, εκτός από τη σημαντική επίδραση που έχει στο προσδόκιμο ζωής των ασθενών με XNA και στην αντιμετώπιση της αναιμίας, έχει σημαντική επίδραση και σε χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση αναιμίας.

Στόχος της παρούσας μελέτης υπήρξε η λεπτομερής ανάλυση σε κυτταρικό επίπεδο των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος ασθενών με XNA τελικού σταδίου υπό συμβατική αιμοκάθαρση οι οποίοι λαμβάνουν πολύ υψηλές δόσεις ερυθροποιητίνης σε σύγκριση με ασθενείς που λαμβάνουν φυσιολογικές δόσεις, με απώτερο στόχο την εύρεση των τροποποιήσεων που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της περίσσειας ερυθροποιητίνης στο αίμα των ασθενών. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση μιας σχετικά νέας μεθόδου κάθαρσης, της αιμοδιαδιήθησης, σε σχέση με τη χρόνια εφαρμοζόμενη συμβατική αιμοκάθαρση για την εύρεση των επιδράσεων αυτής της μεθόδου στο βαθμό αναιμίας των ασθενών, μέσα από τη μελέτη του αιματολογικού προτύπου αλλά και χαρακτηριστικών των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος.

Εκτός από τον κλασσικό αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο, στο πλάσμα μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα με δοκιμασία αναγωγής τρισθενούς σιδήρου (FRAP assay), η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη (αιμόλυση) κατά Harboe καθώς και ο πληθυσμός των ολικών και ερυθροκυτταρικών μικροκυστιδίων με κυτταρομετρία ροής. Στα ερυθροκύτταρα, η μορφολογική εκτίμηση έγινε με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης, η πρωτεϊνική σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης με ανοσοαποτύπωμα κατά Western, η μέτρηση των ενδοκυττάριων επιπέδων ROS και ιόντων ασβεστίου διενεργήθηκε με φθορισμομετρία και τα επίπεδα εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης ανιχνεύθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Επιπλέον, στα ερυθροκύτταρα πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οσμωτικής και μηχανικής ευθραυστότητας. Η άμεση επίδραση του ουραιμικού πλάσματος στα ερυθροκύτταρα μελετήθηκε *in vitro* με πειράματα ανασύστασης. Ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και ανάλυση δικτύων.

Γενικά, τα ουραιμικά ερυθροκύτταρα χαρακτηρίζονται από παθολογικές μορφολογικές τροποποιήσεις, δείκτες απομάκρυνσης από την κυκλοφορία και αυξημένα επίπεδα κυστιδιοποίησης. Μάλιστα, τα επίπεδα των μη αναστρέψιμων μορφολογικών τροποποιήσεων επηρεάζονται σε κάποιο βαθμό από τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης αίματος των ασθενών. Η μειωμένη ανταπόκριση στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ουραιμικών τοξινών στο πλάσμα, ανεπάρκεια πρωτεϊνών CD59 και κλαστερίνη, αυξημένη πρόσδεση της υπεροξειρεδοξίνης-2 στη μεμβράνη ενώ η αιμοκάθαρση επιφέρει σημαντική αύξηση των επιπέδων εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης. Αντίθετα, η ανταπόκριση στη θεραπεία σχετίζεται με παθολογικά υψηλή αιμόλυση, μειωμένη ανθεκτικότητα στο μηχανικό στρες, αυξημένη πρόσδεση

133

ανοσοσφαιρινών G στη μεμβράνη και ανεπάρκεια του μορίου CD47, ενώ η διαδικασία της αιμοκάθαρσης οδηγεί σε σημαντική αναδιαμόρφωση της μεμβράνης. Όσον αφορά στη μελέτη των δύο διαφορετικών μεθόδων κάθαρσης, η χρόνια θεραπεία σε αιμοδιαδιήθηση οδηγεί σε αποτελεσματική αντιμετώπιση της αναιμίας, βελτίωση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού των ερυθροκυττάρων και καταστολή της κυστιδιοποίησης σε σχέση με τη συμβατική αιμοκάθαρση. Αντίθετα, οι άμεσες επιδράσεις της αιμοδιαδιήθησης περιλαμβάνουν αύξηση του οξειδωτικού στρες, παθολογική αιμόλυση, αύξηση δεικτών απομάκρυνσης από την κυκλοφορία και εμφάνιση στοματοκυττάρωσης.

Συμπερασματικά, το περισσότερο τοξικό ουραιμικό περιβάλλον που χαρακτηρίζει τους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς σε σγέση με τους ανταποκρινόμενους, αντιμετωπίζεται εν μέρει από τις αντιοξειδωτικές, αντι-αιμολυτικές και αντι-αποπτωτικές ιδιότητες της ευθροποιητίνης και του ουρικού οξέος. Η αναιμία στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς φαίνεται να σχετίζεται κυρίως με ανεπάρκεια πρωτεϊνών που αναστέλουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, ενώ στους ανταποκρινόμενους με επιταχυνόμενο φαινότυπο γήρανσης και αυξημένη ερυθροφαγοκυττάρωση. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις για διαφορετικό μηχανισμό κυστιδιοποίησης των ερυθροκυττάρων ανάμεσα στις δύο ομάδες των ασθενών. Αντίστοιχα, η θεραπεία σε αιμοδιαδιήθηση μακροπρόθεσμα οδηγεί σε βελτίωση της αναιμίας και των ερυθροκυτταρικών παραμέτρων σε σγέση με τη συμβατική αιμοκάθαρση. Οι αρνητικές επιπτώσεις που παρατηρούνται μετά το τέλος της συνεδρίας κάθαρσης στην αιμοδιαδιήθηση φαίνεται να σχετίζονται με την απώλεια χρήσιμων αντιοξειδωτικών συστατικών του αίματος ταυτόχρονα με την απομάκρυνση των ουραιμικών τοξινών. Η θεραπεία με αντιοξειδωτικά φάρμακα κατά τη διάρκεια της συνεδρίας ή η χρήση κατάλληλων φίλτρων εμπλουτισμένων σε βιταμίνες θα μπορούσε να αναστείλλει τις αρνητικές επιπτώσεις που έχει, έστω και προσωρινά, η θεραπεία της αιμοδιαδιήθησης.

ABSTRACT

End stage renal disease (ESRD) patients exhibit a baseline profile of blood modifications, developed around a pathophysiological core of anemia, uremia, inflammation and oxidative stress. There is however, a huge inter-patient variability in numerous measures of red blood cell (RBC) and blood homeostasis, related in part to the administration of widely variable erythropoietin doses. Dialysis therapy, on the other hand, exerts additional stimuli on cells. Haemodiafiltration (HDF) is a renal replacement therapy which is based on the principles of diffusion and convection. It is generally thought to be more effective than conventional haemodialysis (cHD) in eliminating uremic toxins and in improving anemia; however, its effects on red blood cell (RBC) physiological features have not been examined in depth. This study assesses the physiological profile of RBCs in patients with ESRD receiving standard or high doses of recombinant human erythropoietin (rhEPO) as well as the effects of hemodiafiltration versus conventional hemodialysis in hematologic profile and RBC physiology.

Blood samples from twenty-eight patients under sustained conventional hemodialysis, responsive, or not to standard rhEPO administration and thirty-two patients under regular HDF or cHD treatment were examined for haematological and RBC-related parameters compared to healthy donors. Red blood cells and plasma were studied for RBC morphology, fragility, hemolysis, redox status, removal signaling, membrane protein composition, and microvesiculation, in repeated paired measurements accomplished before and right after each dialysis session. Acute effects of uremic plasma on RBC features were examined *in vitro* through reconstitution experiments.

Overall, the ESRD RBCs were characterized by pathological levels of shape distortions, surface removal signaling, and membrane exovesiculation, but reduced fragility compared to healthy RBCs. Irreversible transformation of RBCs was found to be a function of baseline Hb concentration. The more toxic uremic context in non-responsive patients compared to rhEPO responders was blunted in part by the antioxidant, anti-hemolytic, and anti-apoptotic effects of high rhEPO doses, and probably, of serum uric acid. A selective lower expression of RBC membrane in complement regulators (CD59, clusterin) and of CD47 "marker-of- self" was detected in non-responders and responders, respectively. Evidence for different short-term dialysis effects and probably for a different erythrocyte vesiculation mechanism in rhEPO responsive compared to non-responsive patients was also revealed. Regarding dialysis therapy effects, HDF-group of patients was characterized by better anemic indexes, improved redox potential and suppressed exovesiculation of blood cells compared to cHD-group pre-dialysis. However, HDF was associated with a temporary but acute, oxidative stress-driven adverse effect on RBCs, reflected by appearance of haemolysis, removal signaling and stomatocytosis.

Conclusively, deregulation of RBC homeostasis might involve diverse molecular pathways driving erythrocyte signaling and removal in rhEPO non-responders compared to responsive patients. Moreover, HDF has beneficial "long-term" effects over cHD on ESRD in respect to anemia and RBC physiology. The adverse short-term effects of HDF on postdialysis plasma and RBCs, which are probably associated with the effective clearance of natural antioxidant components from the uremic plasma, strongly suggest the use of a parallel antioxidant therapy during the dialysis session.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ
<u>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ</u>

- Hara T. Georgatzakou*, Marianna H. Antonelou*, Issidora S. Papassideri Anastasios G. Kriebardis. Red blood cell abnormalities and the pathogenesis of anemia in end stage renal disease. *Proteomics Clin Appl.*, 2016, Aug;10(8):778-90. Review
- 2) Marianna H. Antonelou*, Hara T. Georgatzakou*, Vasillis L. Tzounakas, Athanassios D. Velentzas, Apostolos C. Kokkalis, Anastasios G. Kriebardis, Issidora. Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study. *Journal of Proteomics, 2014*, 101:88-101.
- 3) Hara T. Georgatzakou, Vassilis L. Tzounakas, Anastasios G. Kriebardis, Athanassios D. Velentzas, Effie G. Papageorgiou, Artemis I. Voulgaridou, Apostolos C. Kokkalis, Marianna H. Antonelou and Issidora S. Papassideri. Pathophysiological aspects of red blood cells in end-stage renal disease patients resistant to recombinant human erythropoietin therapy. *Eur J Hematol*,2017;00:1–11. https://doi.org/10.1111/ejh.12875
- 4) Hara T. Georgatzakou, Vassilis L. Tzounakas, Anastasios G. Kriebardis, Athanassios D. Velentzas, Apostolos C. Kokkalis, Marianna H. Antonelou and Issidora S. Papassideri. Short-term effects of haemodiafiltration versus conventional haemodialysis on erythrocyte performance. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2017 (under revision)

<u>ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ</u>

- Hara T. Georgatzakou, Marianna H. Antonelou, Vasillis L. Tzounakas, Athanassios D. Velentzas, Apostolos C. Kokkalis, Issidora S. Papassideri, Anastasios G. Kriebardis. "Blood modifications associated with anemia and cardiovascular mortality in end stage renal disease" International Conference "Science in Technology" (ScinTE 2015), Athens, Greece, 2015.
- 2) Hara T. Georgatzakou, Vassilis L. Tzounakas, Apostolos C. Kokkalis, Anastasios G. Kriebardis, Marianna H. Antonelou, Issidora S. Papassideri. "In vitro effects of fresh blood versus stored red blood cell concentrates in patients with end stage renal disease on hemodialysis and erythropoiesis stimulating agents therapy", congress of International Society of Blood Transfusion (ISBT), United Kingdom, London, 2015.

ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Γεωργατζάκου Χ., Αντωνέλου Μ., Βελέντζας Α., Κριεμπάρδης Α., Παπασιδέρη Ι. "Δείκτες κυτταρικού στρες σε ερυθροκύτταρα ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια" 34° συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ), 2012, Τρίκαλα, Ελλάδα.
- 2) Αντωνέλου Μ., Γεωργατζάκου Χ., Βελέντζας Α., Κορομηλά Θ., Κριεμπάρδης Α. και Παπασιδέρη Ι. "Παθολογικές τροποποιήσεις των ερυθροκυττάρων στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια", 23° Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 2012, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.
- 3) Γεωργατζάκου Χ., Τζούνακας Β., Βελέντζας Α., Νάνου Χ., Καλκάνη Ε., Κόκκαλης Α., Τζιμογιάννη Α., Κριεμπάρδης Α., Αντωνέλου Μ., Παπασιδέρη Ι. "Η επίδραση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας στα ερυθροκύτταρα του αιμοκαθαιρόμενου ασθενή", 35°

συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ), 2013, Ναύπλιο, Ελλάδα.

- 4) Γεωργατζάκου Χ., Τζούνακας Β., Βελέντζας Α., Νάνου Χ., Καλκάνη Ε., Κόκκαλης Α., Τζιμογιάννη Α., Κριεμπάρδης Α., Αντωνέλου Μ., Παπασιδέρη Ι. "Αιματολογικοί δείκτες εξέλιξης νόσου στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια: αναδρομική μελέτη και μελέτη παρακολούθησης", 24° Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 2013, Αθήνα, Ελλάδα.
- 5) Γεωργατζάκου Χ., Τζούνακας Β., Βελέντζας Α., Κόκκαλης Α., Αντωνέλου Μ., Κριεμπάρδης Α., Παπασιδέρη Ι. "Πρότυπο ερυθροκυτταρικών μεταβολών σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου που δεν ανταποκρίνονται ικανοποιητικά στη χορήγηση ερυθροποιητίνης", 25° Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 2014, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.
- 6) Γεωργατζάκου Χ., Τζούνακας Β., Βελέντζας Α., Κόκκαλης Α., Κριεμπάρδης Α., Αντωνέλου Μ., Παπασιδέρη Ι. "Μελέτη των ομοιοστατικών αλληλεπιδράσεων ερυθροκυττάρων-πλάσματος στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια – επιπτώσεις στη θεραπεία της μετάγγισης", 37° συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ), 2015, Βόλος, Ελλάδα.
- 7) Γεωργατζάκου Χ., Τζούνακας Β., Βελέντζας Α., Κόκκαλης Α., Κριεμπάρδης Α., Αντωνέλου Μ., Παπασιδέρη Ι. "In vitro μελέτη ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου ως δέκτες μετάγγισης αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων", 26° Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 2015, Αθήνα, Ελλάδα. (poster)
- 8) Γεωργατζάκου Χ., Τζούνακας Β., Βελέντζας Α, Κόκκαλης Α., Σταμούλης Κ., Κριεμπάρδης Α., Αντωνέλου Μ., Παπασιδέρη Ι. "In vitro μελέτη ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου ως δέκτες μετάγγισης αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων", 9° Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας, 2016, Καβάλα, Ελλάδα.

DOI: 10.1111/ejh.12875

ORIGINAL ARTICLE

WILEY Haematology

Pathophysiological aspects of red blood cells in end-stage renal disease patients resistant to recombinant human erythropoietin therapy

Hara T. Georgatzakou¹ | Vassilis L. Tzounakas¹ | Anastasios G. Kriebardis² | Athanassios D. Velentzas¹ | Effie G. Papageorgiou² | Artemis I. Voulgaridou³ | Apostolos C. Kokkalis⁴ | Marianna H. Antonelou¹ | Issidora S. Papassideri¹

¹Department of Biology, Section of Cell Biology & Biophysics, School of Science, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA), Athens, Greece

²Department of Medical Laboratories, Faculty of Health and Caring Professions, Technological and Educational Institute (TEI) of Athens, Athens, Greece

³"Apostle Paul" Educational Institution, Thessaloniki, Greece

⁴Chronic Hemodialysis Centre "Ionion", Piraeus, Greece

Correspondence

Marianna H. Antonelou, Department of Biology, Section of Cell Biology & Biophysics, National & Kapodistrian University of Athens (NKUA), School of Science, Panepistimiopolis Zografou, Athens, Greece. Email: manton@biol.uoa.gr

Funding Information

This work was supported in part by the Special Account for Research Grants of the TEI of Athens, in the framework of the Internal Program for the Support of the TEI of Athens Researchers for 2015 to EGP. HTG was a fellow of the A.G. Leventis Foundation for the academic years 2014-2015 and 2015-2016.

Abstract

Objective: Modified, bioreactive red blood cells (RBCs) and RBC-derived microvesicles (MVs) likely contribute to the hematological and cardiovascular complications in endstage renal disease (ESRD). This study assesses the physiological profile of RBCs in patients with ESRD receiving standard or high doses of recombinant human erythropoietin (rhEPO).

Method: Blood samples from twenty-eight patients under sustained hemodialysis, responsive, or not to standard rhEPO administration were examined for RBC morphology, fragility, hemolysis, redox status, removal signaling, membrane protein composition, and microvesiculation before and after dialysis. Acute effects of uremic plasma on RBC features were examined in vitro through reconstitution experiments. Results: Overall, the ESRD RBCs were characterized by pathological levels of shape distortions, surface removal signaling, and membrane exovesiculation, but reduced fragility compared to healthy RBCs. Irreversible transformation of RBCs was found to be a function of baseline Hb concentration. The more toxic uremic context in nonresponsive patients compared to rhEPO responders was blunted in part by the antioxidant, antihemolytic, and anti-apoptotic effects of high rhEPO doses, and probably, of serum uric acid. A selective lower expression of RBC membrane in complement regulators (CD59, clusterin) and of CD47 "marker-of-self" was detected in non-responders and responders, respectively. Evidence for different short-term dialysis effects and probably for a different erythrocyte vesiculation mechanism in rhEPO responsive compared to non-responsive patients was also revealed.

Conclusion: Deregulation of RBC homeostasis might involve diverse molecular pathways driving erythrocyte signaling and removal in rhEPO non-responders compared to responsive patients.

KEYWORDS

end-stage renal disease, hemodialysis, recombinant human erythropoietin, red blood cells, rhEPO resistance

1 | INTRODUCTION

Reduced erythropoietin production, iron deficiency, inflammation, and shortened lifespan of red blood cells (RBCs) contribute to anemia in end-stage renal disease (ESRD). The uremic toxins along with the pathophysiology of uremia account for disturbed redox homeostasis, appearance of removal signals, and membrane proteome modifications in circulating RBCs.¹ While hemodialysis (HD) represents the main renal replacement therapy for the elimination of metabolic end products and excess of water from blood, it also exposes blood cells to oxidative, metabolic, and mechanical stresses that further affect the functionality and viability of RBCs.² Recombinant human erythropoietin (rhEPO) therapy leads to a significant alleviation of the anemia-associated adverse effects in ESRD.³ There is, however, a wide variation in individual response to rhEPO. The so-called "rhEPO resistance" is defined as the failure to achieve or maintain the desired range of hemoglobin (Hb) levels despite administration of standard rhEPO doses. The underlying mechanisms are still poorly understood, yet rhEPO resistance seems to be associated with interpatient variation in oxidative stress, iron and vitamin deficiencies, and accumulation of uremic toxins or inflammatory cytokines, which are supposed to suppress erythropoiesis by blunting bone marrow response.⁴ Previous studies have shown substantial variability among patients in the profile of RBC structural and functional modifications as well as in the effect of HD on them, as a result of different primary defects, comorbidities, and treatments.^{2,5,6} Resistance to rhEPO probably represents another variable that adds complexity to the pathophysiological background of the anemic patient with ESRD. Apart from its erythropoietic properties, EPO is nowadays considered a pleiotropic cytoprotective factor for many cells, including mature RBCs, in which clear effects on glucose and ion transport, redox status, rheological properties, and eryptosis have been reported.^{7,8} However, the physiological characteristics of RBCs in non-responsive patients with ESRD receiving high doses of rhEPO have been scarcely characterized.^{5,9} The present study dealt with the variability observed in several physiological aspects of RBCs that are probably associated with the persistent anemia in ESRD, including structure, fragility, removal signaling, membrane microvesiculation, and protein composition, as a function of rhEPO dose and HD treatment.

2 | PATIENTS AND METHOD

Details about materials' providers, patients' features, and methods used are given in Data S1.

2.1 | Patients

Twenty-eight patients with ESRD on rhEPO supplementation and regular HD treatment with highly biocompatible polyamix filters, vs twelve age- and gender-matched healthy subjects exhibiting normal hematological profile and taking no medication or food supplements, were studied (Table 1). Sixteen patients were responsive (R group), and twelve patients were non-responsive (non-responders, NR group) to standard doses of rhEPO (Table 1). Resistance to rhEPO was defined as a failure to achieve target Hb levels (11-12 g/dL) with maintained doses of rhEPO>300 IU/Kg/ wk of epoetin or 1.5 μ g/Kg/wk of darbepoetin- α .⁹ Blood samples were collected into EDTA or citrate collection tubes just before HD session and immediately after it. The study has been submitted and approved by the Research Bioethics and BioSecure Committee of the Department of Biology/NKUA. Investigations were carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all blood donors that participated in this study.

2.2 | Laboratory testing and RBC fragility tests

Hematological analysis was performed using the Sysmex K-4500 automatic blood cell counter; biochemical analyses of serum factors and electrolytes were performed using the automatic analyzers Hitachi 902 and 9180 and Elecsys Systems (Roche, Indianapolis, IN). Plasma-free hemoglobin (fHb) was calculated by the method of Harboe.¹⁰ In vitro osmotic fragility of RBCs was assessed in solutions with increasing saline concentration,¹¹ and the mean corpuscular fragility (MCF) index (saline concentration causing 50% of hemolysis) was calculated, before (MCF) or after incubation for 24 hours at 37°C (MCF'). The mechanical fragility index (MFI) of RBCs was evaluated as previously described,¹² in blood mixed with stainless steel beads and rocked for 1 hour on a rocker platform. All materials and common chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Munich, Germany), unless otherwise stated.

2.3 | Redox status and calcium accumulation

Total and uric acid-dependent antioxidant capacity of plasma (TAC and UA/AC, respectively) were measured by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay,¹³ with/without uricase treatment (0.125 U/mL, for 20 minutes at 20°C). Intracellular accumulation of ROS (iROS) and cytosolic calcium (iCa²⁺) levels were detected by fluorometry (VersaFluor Fluorometer, Life Science, Bio-Rad, Hertfordshire, UK) using the fluorescent probes CMH₂DCFDA and Fluo-4 AM, respectively, as previously described.² For reconstitution experiments, control and ESRD RBCs at 35% Hct were incubated with ESRD or control plasma from ABO-matched healthy volunteers (n=6), respectively, for 24 hours at 37°C in 5% CO₂-air. Hemolysis and ROS accumulation were measured in mixed vs unmixed samples.

2.4 | Morphological analysis of RBCs by scanning electron microscopy

Isolated RBCs were fixed with 2% glutaraldehyde, postfixed with 1% osmium tetroxide, dehydrated in ascending ethanol series and, examined in a Philips SEM515 microscope after coating with goldpalladium (Tousimis Samsputter-2a, Rockville, Maryland). RBC shape TABLE 1 Demographic, therapy-associated, hematological, and serum biochemical characteristics of patients with ESRD and healthy subjects

	R patients (n=16)		NR patients (n=12)		
Characteristics	pre-HD	post-HD	pre-HD	post-HD	Controls (n=12)
Age (y)	81±7		76±8		68±9
Weight (kg)	64.8±15.1		75.4±19.8		66.3±9.8
HD treatment (mo)	6-105		5-126		-
Epo dose (IU/wk)	9350±4203		23 250±5650		-
WBC (x10 ³ /µL)	5.8±1.6	5.7±2.5	6.3±1.7	6.1±2.6	7.0±1.3
Neutrophils (%)	66±9 ^a	59±8 ^b	68±8 ^a	71±8 ^{a,b}	59±7
Lymphocytes (%)	25±8	33±9 ^b	23±6	21 ± 8^{b}	29±4
Monocytes (%)	8±4	6±3	7±3	6±1	9±1
Basophils (%)	0	0	1	0	1
Eosinophils (%)	1	2	2	2	2
RBC (x10 ⁶ /µL)	3.61±0.40 ^a	3.99±0.89 ^a	3.87±0.73ª	4.20±1.23 ^a	4.73±0.55
Hb (gr/dL)	10.9±0.7 ^a	11.7±0.9ª	10.41±0.90 ^a	11.3±1.4 ^{a,c}	14.9±1.3
Hct (%)	33.8±1.9 ^ª	33.2±3.8ª	33.5±2.2ª	34.0±4.6 ^ª	41.8±4.5
MCV (fL)	95.4±9.1	84.4±8.5 ^{a,c}	89.1±16.1	85.0±16.5ª	93.0±6.0
MCH (pg)	30.2±3.2 ^a	29.6±4.4ª	27.8±5.9 ^a	28.1±5.9 ^a	31.6±2.1
MCHC (g/dL)	31.2±0.6	33.6±3.7	31.1±1.3	33.1±1.3 ^c	34.0±1.2
RDW (%)	16.6±1.3ª	15.8±2.1	16.8±1.4 ^ª	14.5±0.7	12.9±0.8
PLT (x10 ³ /μL)	173±54ª	185±68 ^a	192±55ª	195±63ª	348±83
PDW (%)	12.8±2.4 ^ª	13.7±1.8ª	13.6±2.1ª	14.2±2.9 ^a	17.7±0.6
PTH (pg/mL)	235±129 ^a	N/D	211±94 ^ª	N/D	42±20
Glucose (mg/dL)	100±10	N/D	98±12	N/D	77±19
Urea (mg/dL)	125±25 ^{a,b}	37.8±8.6 ^c	153±27 ^{a,b}	46.5±10.4 ^{a,c}	35±12
URR (%)	69.2±6.8		69.2±7.9		-
Creatinine (mg/dL)	6.7±2.0 ^a	N/D	7.7±1.2 ^a	N/D	0.7±0.1
Uric acid (mg/dL)	5.9±1.2 ^{a,b}	N/D	7.5±1.0 ^{a,b}	N/D	4.2±1.2
Cholesterol (mg/dL)	147±41	N/D	136±17	N/D	145±18
Triglycerides (mg/dL)	148±37	N/D	129±79	N/D	139±25
HDL (mg/dL)	43±11 ^ª	N/D	43±10 ^a	N/D	80±9
Calcium (mg/dL)	9.3±0.3	N/D	9.3±0.3	N/D	9.4±0.3
Phosphorus (mg/dL)	4.7±0.9	N/D	4.9±1.1	N/D	3.7±0.5
Potassium (mmol/L)	4.90±0.48	4.20±0.36	5.12±0.65	4.05±0.65	4.21±0.30
Sodium (mmol/L)	137±2	N/D	136±2	N/D	142±2
Fe (µg/dL)	60.3±14.7 ^a	N/D	59.0±24.1ª	N/D	110.2±17.1
Ferritin (ng/mL)	825±482 ^a	N/D	691±192 ^ª	N/D	69±23
TIBC (μg/dL)	244±39 ^a	N/D	236±35ª	N/D	383±89
Total proteins (g/dL)	7.1±0.3	N/D	7.2±0.4	N/D	7.5±0.6
Albumin (g/dL)	4.2±0.6	N/D	4.1±0.3	N/D	4.2±0.4
ALP (IU/L)	71±13	N/D	75±7	N/D	64±18
γGT (IU/L)	15±8	N/D	14±5	N/D	12±9

Values are presented as Mean±SD. ^apathological values vs healthy subjects; ^bR vs NR; ^cpre- vs post-HD, P<.05. ALP, alkaline phosphatase; γGT, gammaglutamyl transferase; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; HDL, high-density lipoprotein; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; PLT, platelets; PDW, platelet distribution width; PTH, parathormone; RBC, red blood cells; RDW, RBC distribution width; TIBC, total iron-binding capacity; URR, urea reduction ratio; WBC, white blood cells; ESRD, end-stage renal disease.

3

classification was performed using standard criteria, as previously adopted.¹⁴ Briefly, spherocytic transformation and other shape changes (dacryocytes, elliptocytes, ovalocytes, and schistocytes) were characterized as irreversible (IRR) modifications. Shape distribution was estimated by blind assessment of at least 2000 cells from randomly chosen fields per sample.

2.5 | Flow cytometry analysis of RBCs and microvesicles

-WILEY-Haematology

Enumeration and phenotyping of RBCs and microvesicles (MVs) were performed by multicolor flow cytometry using phycoerythrin (PE)-Annexin V apoptosis kit and FITC-conjugated anti-CD235, as previously described.¹⁵ Plasma MVs isolation was performed after a double light spin (2500 g) of citrated blood at 20°C. Their identification was based on size (<1 μ m), RBC origin, and annexin V binding (AnnV⁺). Megamix fluorescent beads were used for gating in accordance with the International Society on Thrombosis and Hemostasis SSC Collaborative workshop recommendations and TruCount bead tubes for enumeration (positive events/ μ L).

2.6 | Immunoblotting of RBC membrane proteins

Red blood cells membranes were isolated from purified leukodepleted RBC fractions and immunoblotted against major membrane proteins as previously described.¹⁴ In brief, equal amounts of protein (15 μ g) were resolved in 10% or 5%-15% linear gradient SDS-PAGE gels and electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes for 45 minutes at constant voltage of 20 V. Membranes were probed with primary antibodies in 5% non-fat milk for 1 hour at RT. After incubation with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:8000 or 1:10 000), the immunoreactivity was visualized by enhanced chemiluminescence. Equal loading of the gels was assessed by hybridization with a 4.1R-specific antibody. The Oxyblot detection kit was used for the detection of RBC membrane carbonylated proteins, as per manufacturer's specifications. For quantification purposes, the Proteome Carbonylation Index (PCI) was calculated.²

2.7 | Statistical and network analysis

For statistical analysis, the Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS; version 22.0 for Windows IBM Corp., Armonk, NY; administrated by NKUA) was used. Intergroup differences were evaluated by t test or one-way ANOVA using a Bonferroni correction. Prediction outcomes were estimated by regression analysis. Pearson's and Spearman's tests were performed to assess correlation (r) between parameters following or not normal distribution profiles, respectively. Significance was accepted at P<.05. Significant correlations among measured variables (in serum/plasma and RBCs) were topologically represented in untargeted biological networks using the Cytoscape version 3.2.0 application.¹⁶ Length of edges was inversely proportional to the r value.

3 | RESULTS

3.1 | Hematological and serum/plasma features in ESRD

Patients with ESRD were anemic with hematological markers of chronic inflammatory response (disturbed iron homeostasis, RDW index, neutrophil, and HDL levels, etc.) (Table 1). The hematological and serum biochemical profiles were comparable in R and NR groups pre-HD, apart from higher urea and uric acid (UA) levels in NR patients. HD had a significant positive effect on Hb and MCHC levels mostly in non-responders but a negative effect on MCV index variation, especially in responsive patients (Table 1). Uremic plasma had pathologically increased total antioxidant capacity (TAC) and concentration of total and RBC-derived MVs (R-MVs) (Figure 1A). Plasma of R patients was further characterized by high baseline hemolysis (free Hb, fHb) both pre- (Figure 1A) and post-HD (Figure 1B). TAC and UA/AC reduced to subnormal levels post-HD. HD was associated with decreased accumulation (though no normalization) of all species of AnnV⁺ MVs, including R-MVs, in R samples (from 3258±1375 MVs/µL pre-HD to 1214±822 MVs/µL post-HD for R-MVs); however, it did not improve accumulation of R-MVs in non-responders (2443±656 MVs/µL pre-HD vs 2619±1072 MVs/µL post-HD). Consequently, post-HD NR plasma contained significantly more AnnV⁺ R-MVs compared to R-plasma (Figure 1B).

Reconstitution experiments showed a strong antioxidant effect of pre-HD uremic compared to control plasma in both ESRD and healthy RBCs, which was mainly attributed to uric acid as it was abolished after treatment of uremic plasma with uricase (Figure 1C). Regarding in vitro hemolysis, uremic plasma improved hemolysis of healthy RBCs in vitro in the presence of UA, as hemolysis increased at four times the baseline, preincubation levels after UA removal (Figure 1D).

3.2 | RBC characteristics

Similarly to plasma modifications, the structural and physiological characteristics of ESRD RBCs were not significantly different between responders and non-responders pre-HD (Figure 2A). Severe RBC shape distortions (irreversibly modified RBCs, IRR), increased PS exposure, and lower MCF to osmotic stress (MCF', after incubation for 24 hours at 37°C) compared to controls (0.515±0.052 vs 0.573±0.019%, respectively), were equally observed in the two groups of ESRD RBCs (Figure 2A, C). Regression analysis of data using Hb levels as an independent variable resulted in a model for the prediction of pathological RBC shape modifications levels in ESRD (Figure 2D). On average, normal levels of intracellular ROS (iROS, 445±168 vs 306±63 RFU in healthy RBCs), membrane proteome carbonylation index (PCI, 4.14±4.0 vs 3.86±0.9 In control), intracellular calcium (iCa²⁺, 2773±1073 vs 2371± 448 RFU in healthy RBCs), and mechanical fragility index (MFI, 0.773±0.302 vs 0.804±0.194% in control) were detected in the patients pre-HD. A trend for higher percentage of IRR modifications (7.9±4.1% vs 5.3±2.9%, respectively) and Ca²⁺



FIGURE 1 Variation in soluble plasma components in responders (R) and non-responders (NR) pre- (A) and post-HD (B) after normalization to controls (100%, dotted line). fHb, free Hb; TAC, total antioxidant capacity; UA/AC, uric acid-dependent antioxidant capacity; R-MVs, RBC-derived MVs; MVs, total MVs. *P<.05 vs control; **P=.006 R vs NR; [#]P<.05 pre- vs post-HD. Bars: Mean±SD. (C) Reconstitution experiments showing the antioxidant and antihemolytic effects of uremic plasma and uric acid. iROS, intracellular ROS. *P<.05 vs baseline (prereconstitution) levels. **P<.05 before vs after uricase treatment. Bars: Mean±SD

levels (2914±1269 vs 2122±782RFU, respectively) was observed in NR- compared to R-RBCs, however, at no statistical significance level, owing to extreme intragroup variations. In a similar way, R-RBCs were more susceptible to hemolysis under mechanical stress than NR-RBCs (MFI=0.884±0.235% vs 0.634±0.332, respectively). HD triggered intracellular ROS formation in R- and NR-RBCs but had no significant effect on RBC shape profile (Figure 2B). It aggravated, however, PS exposure on NR-RBCs (1.19±0.42% pre-HD to 1.90±0.58% post-HD), as opposed to its neutral effect on R-RBCs (Figure 2B).





FIGURE 2 Variation in Red blood cell(RBC) parameters in responders (R) and non-responders (NR) pre- (A) and post-HD (B) after normalization to controls (100%, dotted line). IRR, irreversible RBC shape modifications; MCF', mean corpuscular fragility (following incubation at 37°C for 24 hours); MFI, mechanical fragility index; PS, PS exposure; iROS, intracellular ROS. **P*<.05 vs control; ***P*<.050 R vs NR (*P*=.006 for MFI in A; *P*=.024 for PS in B); **P*<.05 pre- vs post-HD. Bars: Mean±SD. (C) Representative scanning electron micrographs of RBCs from responder (R) or non-responder (NR) patients before the HD session. Arrows show irreversible RBCs shape modifications (IRR), such as spheroechinocytes, dacryocytes, elliptocytes, spherocytes, and ovalocytes. Scale bars: 10 μm. (D) Regression analysis of cellular Hb levels (gr/dL) as an independent variable produced a model that predicts percentage of IRR shape modifications in patients with end-stage renal disease (ESRD)

Hb (gr/dL)

⁶ WILEY Haematology

	R patients		NR patients	
Proteins	pre-HD	post-HD	pre-HD	post-HD
Adducin	80±28	82±24	103±74	100±60
Aquaporin 1	91±46	58±24 ^{a,c}	81±62	92±52
Band 3	107±26	72±41 ^c	74±46	94±40
Band 3 oligomers	622±332 ^a	158±130 ^{b,c}	946±610 ^a	5386±4568 ^b
Calpain	96±73	90±80	75±39	72±53
CD47	39±15 ^{a,b}	21±20 ^{a,b,c}	75±40 ^b	71±34 ^{a,b}
CD59	123±40 ^b	140±63 ^b	79±20 ^b	68±18 ^{a,b}
Flotillin 2	117±24 ^b	85±20 ^c	87±21 ^b	100±13
GAPDH	110±40	69±36 ^c	101±36	117±78
Glucose transporter 1	222±120 ^a	116±58 ^c	161±120	107±58 ^c
Hsp70	190±121	173±78	160±114	178±125
lgGs	754±670 ^{a,b}	397±269 ^{a,c}	240±27 ^{a,b}	203±104
Oxidized Hb	82±60 ^b	37±32 ^b	24±19 ^b	101±56 ^{b,c}
Peroxiredoxin 2	95±32 ^b	71±16 ^{a,b,c}	129±35 ^b	103±38 ^b
sCLU (clusterin)	111±43 ^b	88±39 ^b	53±25 ^{a,b}	$54\pm15^{a,b}$
Spectrin	115±28	83±32 ^c	96±37	104±47
Spectrin proteolysis	103±63	84±40	96±35	138±74
Stomatin	118±32	72±28 ^c	90±22	105±66
Synexin	110±58	101±43 ^b	155±70	169±86 ^b
Ubiquitin	52±21 ^a	60±27 ^a	60±38 ^a	62±48
PCI	124±113	98±30 ^b	101±95	247±165 ^b

TABLE 2Variation in the expressionand carbonylation index of RBC membraneproteins in responder (R) and non-responder (NR) patients pre- and post-HD

^asignificantly different values vs healthy subjects; ^bR vs NR; ^cpre- vs post-HD, P<.05. PCI, Protein Carbonylation Index; RBC, Red blood cells. Values are presented as Mean±SD, after normalization to control (100%).

The protein composition of the RBC membrane differed significantly in patients with ESRD compared to control (Table 2 and Figure S1), and overall, the ESRD RBCs were characterized by excess of band 3 oligomers (B3-O) and membrane-bound IgGs but lower expression of ubiquitinylated proteins compared to healthy counterparts. But in contrast to the plasma and cellular modifications mentioned above, the profile of membrane proteome modifications in R-RBCs was totally different from that observed in NR-RBCs. In fact, excess of membrane-bound IgGs but severe deficiency in CD47 protein were mostly (IgGs) or exclusively (CD47) detected in the membrane of R- compared to the NR-RBCs. On the other side, NR-RBC membrane selectively exhibited lower expression of CD59 and sCLU proteins but more peroxiredoxin 2 (Prx2) compared to R- and/or healthy RBCs. Notably, HD had a sharp effect on the membrane expression of numerous proteins in R- as opposed to the NR-RBCs, including the MVs-associated proteins stomatin, flotillin 2, band 3, IgGs, CD47, GAPDH, Prx2, and aquaporin-1 (Table 2). Statistically significant differences in the membrane expression of certain components including band 3-oligomers, CD47, CD59, Prx2, sCLU, synexin, oxidized/denatured Hb and carbonylated components were observed between R- and NR-cells post-HD.

3.3 | Sorting the data using statistical and bioinformatics tools

Seven subsets of closely interrelated hematological, biochemical, and HD-related parameters in ESRD arose by factor analysis (Figure S2). Variation in rhEPO dose responded similarly to variation in baseline hemolysis (and the closely associated RBC mechanical fragility index). Free Hb, which is the sum of extracellular Hb species (including those enclosed in circulating R-MVs), is a joint component of the Hb/Hct and plasma antioxidant capacity factors. Similar patterns of responses were observed for certain uremic toxins and RBC-related variables, reflecting underlying associations between them, while RBC indexes and shape variables co-segregated along with osmotic fragility one.

Statistically significant correlations (P<.05) between hematological, physiological, and proteome factors in responders and nonresponders were integrated into biologic networks (Figure S3 and Figure 3, respectively). As clearly shown in these constructs, the same parameter was connected with different variables in the two groups of patients. For instance, rhEPO dose was negatively correlated with PS exposure in R-RBCs (Figure S3) but with sCLU expression in NR-RBCs (Figure 3). R-MVs concentration was negatively correlated with serum UA levels in responders, but with serum urea reduction ratio (URR) and



FIGURE 3 Network analysis connecting hematological and biological parameters in non-responders. The edges represent statistically significant (*P*<.05) positive (continuous lines) and negative (dashed lines) correlations among factors (the shortest the edge, the higher *r* value). Dashed circles: hub nodes (parameters of high connectivity). Abbreviations: Alb, albumin; Aqp1, aquaporin1; B3, Band3; Ca, serum calcium; Calp, calpain1; EPO, rhEPO dose; Fer, ferritin; fHb, free Hb; Flot2, flotillin 2; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Glut1, glucose transporter-1; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; HDL, high-density lipoprotein; Hsp70, heat shock protein 70; iCa, intracellular calcium; IRR, irreversibly modified RBCs; iROS, intracellular ROS; K, serum potassium; MCF, mean corpuscular fragility; MCF', mean corpuscular fragility after incubation at 37°C; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; MFI, mechanical fragility index; Neu, neutrophils; oxHb, oxidized/denatured Hb; P, serum phosphorus; PCI, protein carbonylation index; Prot, total serum proteins; Prx2, peroxiredoxin-2; PS, phosphatidylserine; RDW, RBC distribution width; RET, reticulocytes; REV, reversibly modified RBCs; rAC, total antioxidant capacity; TIBC, total iron-binding capacity; UA/AC, uric acid-dependent plasma antioxidant capacity; Ub, ubiquitinylated proteins; URR, urea reduction ratio

total iron-binding capacity (TIBC) in non-responders. Baseline hemolysis in vivo was correlated with duration of HD and RBC oxidative stress markers in responders, while RBC fragility was found reversibly related to severe shape distortions in non-responders (*r*=-.871, *P*=.011, n=12). The antioxidant capacity of the plasma and RBC redox status were correlated with variation in numerous membrane proteins and removal signaling in NR-cells. In fact, TAC, RBC shape-related parameters (i.e, RDW index) and nodes of proteins involved in energy metabolism (i.e, GAPDH, Glut1) were hub points in the biological network of nonresponders (Figure 3).

4 | DISCUSSION

The present study provided insight into the mechanisms underlying RBC lifespan in ESRD and assessed RBC variables that are associated with resistance to erythropoiesis-stimulating agents and HD treatment.

4.1 | Overall modifications in ESRD plasma and RBCs

End-stage renal disease RBCs undergo certain pathophysiological modifications in structure, composition, and signaling potential. Severe shape distortions (IRR), which render RBCs susceptible to clearance, reflect a systemic inflammatory profile in almost all pathologies characterized by oxidative stress, including ESRD.^{17,18} We currently show for the first time that the percentage of irreversibly modified RBCs is a function of baseline Hb concentration, highlighting the close relationship between severe RBC shape distortions, inflammation, and anemia in ESRD. Uremic toxins may induce PS exposure on RBCs, accelerating therefore their clearance and pathophysiological interactions with immune cells, platelets, and endothelium,¹⁹ through molecular pathways involving or not Ca²⁺ influx,²⁰ as highlighted by the segregation pattern of those variables following a factor analysis as well.

Moreover, the current study verified the strong relation between PS exposure and R-MVs formation,²¹ in response to HD and rhEPO dose. Some indolic uremic solutes can induce vesiculation along with PS

WILEY-Haematology

exposure on healthy RBCs.²² Loss of phospholipid asymmetry and additional ESRD-associated pathologies, including shape distortion, mechanical stress, chronic inflammation, oxidative stress, cellular activation, and endothelial dysfunction, also affect vesiculation of endothelial and blood cells. including RBCs.²³⁻²⁵ The majority of previous studies have focused on MVs derived from platelets and endothelial cells for their probable prothrombotic and pro-inflammatory roles.²⁵ Nevertheless, circulating, PS+ RBC-derived MVs modulate NO-redox homeostasis and contribute to several hypercoagulable states in human.²⁶ Membrane vesiculation is an integral part of RBC aging. The majority of the RBC-derived MVs expose PS while their protein composition resembles that of the oldest RBCs.²⁷ In consistence with previous studies,^{2,14} the proteomic profile of the ESRD RBC membrane showed elevated levels of Band 3-based RBC aging model modifications (modified band 3 protein, membranebound IgGs, etc.) but deficiency in the microvesicles-associated²⁷ ubiquitinylated components. Considering that patients with ESRD are characterized by a younger RBC population compared to healthy controls, those markers imply RBC injury and/or premature aging.

On the other side, ESRD RBCs were benefited to some extent by the cytoprotective effects of EPO and probably, of uric acid. ESRD RBCs were found resistant to osmotic lysis as a result of EPO's strengthening effect,⁶ although RBC shape distortions may also account for this resistance, as currently (Figure 3) and previously¹⁵ suggested. In the same wavelength, and despite being subjected to numerous oxidative provocations, ESRD RBCs contained normal basal levels of ROS, probably owning to the ROS scavenging activity of EPO²⁸ and the antioxidant capacity of uric acid (UA)^{29,30} and other natural antioxidants that are eliminated by HD. In accordance with this assumption, in our study, subnormal antioxidant capacity of plasma post-HD appeared along with over-accumulation of intracellular ROS, suggesting uptake of plasma UA by ESRD RBCs, as previously shown in oxidatively stressed and cancer cells.^{31,32} Being on average younger than healthy RBCs, ESRD RBCs are expected to contain more EPO binding sites³³ and thus to be more susceptible to EPO effects.

4.2 | Hypo-responsiveness to EPO is associated with a modified homeostatic context in ESRD RBCs

Despite the aforementioned profile of baseline blood modifications, the current and previous studies in the field of ESRD have highlighted a huge interpatient variability in measures of RBC homeostasis. Differences in primary causes of renal failure, age, comorbidities, time on HD, and therapeutic schemes among patients may account for it. To examine the probable contribution of rhEPO resistance to this phenomenon, we compared the profiles of equally anemic responsive (R) and non-responsive (NR) patients.

With the striking exception of the protein composition of the RBC membrane, the structural and physiological characteristics of ESRD RBCs did not differ significantly between groups before HD. At the peak of the uremic stress that is imposed to patients' RBCs just before the dialysis session, subtle differences in the homeostatic context between the two groups can only be imprinted in a highly dynamic and responsive cellular structure, as the RBC membrane is.

Indeed, low expression of the complement inhibitors CD59 and clusterin was detected in non-responsive patients, suggesting RBC susceptibility to complement-mediated injury (Figure 4). Clusterin



FIGURE 4 Schematic presentation of structural and functional modifications detected in RBCs of patients responsive (R, left panel) or not (NR, right panel) to standard range of rhEPO dose and their probable association with anemia in end-stage renal disease (ESRD). Generally, ESRD erythrocytes are characterized by augmented exovesiculation of the membrane, phosphatidylserine (PS) exposure, band 3 oligomerization, IgGs binding, decreased ubiquitinylated (Ub) components, and severe shape changes. The percentage of shape distortions can be predicted in part by the baseline Hb concentration. R-RBCs further show susceptibility to erythrophagocytosis (through IgGs- and CD47-related changes) in addition to mechanical stress and hemolysis, which seems to be triggered by longer duration under HD treatment (dHD). PS exposure and membrane vesiculation are ameliorated by rhEPO and UA levels, respectively, in R-RBCs. In contrast, complement-mediated injury promoted by low expression of CD59 and sCLU seems to underlie anemia in rhEPO resistance (NR). Hemodialysis (HD) and high EPO dose deteriorate PS exposure and calcium influx, respectively, but TIBC and URR inhibit vesiculation in EPO resistance. Plasma (UA and EPO) and membrane-associated components (Glut1 in R-RBCs and Prx2 in NR-RBCs) probably strengthen the antioxidant defenses in ESRD RBCs

represents a biomarker of redox stress and senescence for RBCs³⁴ and a novel biomarker of kidney injury.³⁵ Decreased levels of clusterin have been found (in general) in ESRD RBCs¹⁴ and in the plasma of long-term ESRD survivors.³⁶ EPO can not only reduce clusterin's rise in plasma as previous studies shown,³⁷ but it can also negatively affect its association with RBCs in NR patients in vivo, as currently reported.

On the other side, although previous studies have reported an accelerated aging phenotype in ESRD RBCs,^{2,14} the current study made clear that this is the case for patients responsive to standard EPO doses, as excess of aging markers and deficiency of RBC membrane in the marker of "self" protein CD47³⁸ were both detected in R-RBCs. In addition to that, R-RBCs were susceptible to hemolysis pre- and post-HD and more fragile to mechanical stress compared to NR-RBCs. It is tempting therefore to speculate that anemia in responders might be in part the result of increased susceptibility to Hb loss, increased opsonization, and reduced CD47-SIRP α inhibitory signaling to splenic macrophages (Figure 4).

In light of higher urea and uric acid levels found in the NR- compared to the R-plasma, one would expect more protein oxidative defects in NR-RBCs. The higher membrane expression of peroxiredoxin 2, typically induced by oxidative stress,³⁹ in NR- than in R-cells reflects this kind of provocation. Oxidative stress might be alleviated by the antioxidant effects of both rhEPO and serum uric acid on mature RBCs, as the current reconstitution experiments and previous studies shown in healthy subjects and in thalassemic or uremic patients.^{7,8,40,41} In contrast, the oxidative provocations imposed by the uremia on R-RBCs seemed to be rather repelled by overexpression of Glut 1 transporter (Figure 4). This modification that was previously reported in unclassified groups of hemodialysis patients,^{14,42} is indicative of the hypermetabolic state of ESRD RBCs,^{43,44} and is expected to promote the preservation of intracellular ascorbate that is lost during HD.⁴²

4.3 | Evidence for different short-term HD effects and probably for a different vesiculation mechanism in R- vs NR-RBCs

By eliminating uremic toxins, HD ameliorated anemia and accumulation of MVs,^{22,23,45} equally in responders and non-responders. On the other side, HD did not affect the concentration of RBC-derived MVs or the protein composition of the RBC membrane in non-responders, and moreover, it aggravated PS exposure on NR-RBCs. In striking contrast, HD had a beneficial effect on responsive patients by leading to a selectively, sharp decrease in the accumulation of RBC-derived MVs. Notably however, that amelioration was not consistent with the extensive remodeling of the RBC membrane in respect to the decreased expression of numerous MVs-associated components (stomatin, flotillin 2, IgGs, band 3 oligomers, CD47, GAPDH, Prx 2, aquaporin, etc.) post-HD, neither with the selective sharp decrease in MCV following HD in responsive patients. These findings are rather consistent with the release of small and/or PS-negative MVs and exosomes that are undetectable by the flow cytometry approach used. Indeed, conventional cytometry cannot detect vesicles <300 nm, the area which harbors the majority of extracellular vesicles in human blood.⁴⁶ Of note, MVs in ESRD appear to be less procoagulant compared to other diseases,²⁴ while RBCs are -Haematology

WILEY

capable of releasing vesicles under conditions of well maintained lipid asymmetry.⁴⁷ Through the potential release of those small and/or AnnVnegative extracellular vesicles, the protein composition of the R-RBC membrane might be appropriately remodeled post-HD in consistence with the proteome analysis findings. Our results suggest generation of different species of extracellular vesicles in responders compared to non-responder patients with ESRD. Cells produce highly dynamic and versatile populations of heterogeneous extracellular vesicles in relation to cell age, stress, and activating stimuli. Considering that extracellular vesicles are functionally associated with coagulation and inflammation⁴⁸ and that endothelium damage or cardiovascular disease is more frequently appeared in rhEPO resistance,⁴⁹ our data deserve further study through methods more suited to assess issues of small particle biology.

4.4 | The different homeostatic contexts in responsive and non-responsive patients can be charted in biological networks

The physiological properties and the protein composition of the RBCs in responsive and non-responsive patients with ESRD revealed variability in molecular lesions and probably in pathways driving erythrocyte signaling and removal. Networks have long been used in biology to show relationships between biologically relevant elements. The currently reported biological networks that integrated statistically significant correlations between hematological and biological parameters in ESRD clearly denoted a different context of interactions in responsive vs non-responsive patients. According to these constructions, EPO dose-range used in responders alleviates PS exposure on RBCs while higher EPO dose in non-responders is associated with clusterin and intracellular Ca²⁺-driven protein variations. Notably, it has been reported that rhEPO induces Ca²⁺ influx in spite of a partial decrease in PS exposure on human mature RBCs in vitro.⁴⁰ Our results suggested that the first effect is mainly observed in non-responders while the second one in responder patients, while the positive correlation between sCLU and CD59 variation verified the previously reported physical interaction between the two proteins in mature human RBCs.⁵⁰ In addition, duration of HD seemed to negatively affect hemolysis and intracellular ROS accumulation in responders while iROS was correlated with plasma soluble factors (albumin, P, total proteins) in non-responders. Plasma factors were correlated with the exovesiculation of RBC membrane in both groups, however, while TIBC and URR were negatively correlated with R-MVs levels in non-responders, UA levels seemed to play a similar role in responders. Of note, UA and TAC levels were correlated with variation in numerous RBC-associated variables supporting a cytoprotective activity of uric acid in human RBCs in vivo. Construction of similar networks enriched in omics data would help to unravel the complexity of RBC homeostasis in the highly multivariable system of ESRD.

5 | CONCLUSIONS

End-stage renal disease RBCs were characterized by severe shape distortions, membrane exovesiculation, and senescence/death signaling 10

WILEY-Haematology

but reduced fragility compared to healthy RBCs. The profile of RBC modifications is the overall result of the negative effect of the uremic toxic environment and of the cytoprotective activity of rhEPO and uric acid. Baseline Hb concentration contributes in part to the extent of irreversible RBC transformation. RBCs in non-responsive patients are characterized by increased susceptibility to complement-mediated injury and by HD-triggered PS exposure. On the other side, anemia in responders might be in part the result of increased susceptibility to Hb loss, increased opsonization, and erythrophagocytosis, and is probably associated with a different erythrocyte vesiculation mechanism compared to non-responders. Deregulation of RBC homeostasis might involve different molecular pathways driving erythrocyte signaling and removal in rhEPO non-responders compared to responsive patients. The high interpatient variability in many hematological and physiological factors, reported by this and numerous other studies in the field, calls for a more individualized approach of this apparently complex disease. In light of the recently adopted consideration for RBCs as vital indicators of health at systemic level, and of the latest NIH guidelines suggesting focusing on precision medicine,¹⁷ the structural and biochemical modifications in RBCs might be used during ESRD diagnosis and following of HD and rhEPO treatments in order to establish not only the anemic but also the inflammatory and oxidative profiles of each individual patient.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank all patients and healthy blood volunteers; they are extremely grateful to Mrs. Vasileia Stoupa Head nurse in the Chronic Hemodialysis Centre "Ionion" for kindly organizing blood donations in a way exhibiting high professional standards, responsibility, and consistency along with excellent collaboration skills.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Georgatzakou HT, Antonelou MH, Papassideri IS, Kriebardis AG. Red blood cell abnormalities and the pathogenesis of anemia in end stage renal disease. *Proteomics Clin Appl.* 2016;10:778-790.
- Antonelou MH, Kriebardis AG, Velentzas AD, Kokkalis AC, Georgakopoulou SC, Papassideri IS. Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. *J Proteomics*. 2011;74:2441-2452.
- Erslev AJ, Schuster SJ, Caro J. Erythropoietin and its clinical promise. Eur J Haematol. 1989;43:367-373.
- Bamgbola OF. Pattern of resistance to erythropoietin-stimulating agents in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2011;80:464-474.
- Costa E, Rocha S, Rocha-Pereira P, et al. Changes in red blood cells membrane protein composition during hemodialysis procedure. *Ren Fail*. 2008;30:971-975.
- Saradhadevi V, Sakthivel R, Vedamoorthy S, Selvam R, Parinandi N. Alterations in band 3 protein and anion exchange in red blood cells of renal failure patients. *Mol Cell Biochem*. 2005;273:11-24.

- 7. Amer J, Dana M, Fibach E. The antioxidant effect of erythropoietin on thalassemic blood cells. *Anemia*. 2010;2010:978710.
- Myssina S, Huber SM, Birka C, et al. Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. J Am Soc Nephrol. 2003;14:2750-2757.
- Costa E, Rocha S, Rocha-Pereira P, et al. Altered erythrocyte membrane protein composition in chronic kidney disease stage 5 patients under haemodialysis and recombinant human erythropoietin therapy. *Blood Purif* 2008;26:267-273.
- Harboe M. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. *Scand J Clin Lab Invest*. 1959;11:66-70.
- Kraus A, Roth HP, Kirchgessner M. Supplementation with vitamin C, vitamin E or beta-carotene influences osmotic fragility and oxidative damage of erythrocytes of zinc-deficient rats. J Nutr. 1997;127:1290-1296.
- Raval JS, Waters JH, Seltsam A, et al. The use of the mechanical fragility test in evaluating sublethal RBC injury during storage. *Vox Sang.* 2010;99:325-331.
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239:70-76.
- Antonelou MH, Georgatzakou HT, Tzounakas VL, et al. Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study. *J Proteomics*. 2014;101:88-101.
- Tzounakas VL, Georgatzakou HT, Kriebardis AG, et al. Donor variation effect on red blood cell storage lesion: a multivariable, yet consistent, story. *Transfusion* 2016;56:1274-1286.
- Assenov Y, Ramirez F, Schelhorn SE, Lengauer T, Albrecht M. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics*. 2008;24:282-284.
- Pretorius E, Olumuyiwa-Akeredolu OO, Mbotwe S, Bester J. Erythrocytes and their role as health indicator: using structure in a patient-orientated precision medicine approach. *Blood Rev* 2016;30:263-274.
- Gyawali P, Richards RS, Bwititi PT, Nwose EU. Association of abnormal erythrocyte morphology with oxidative stress and inflammation in metabolic syndrome. *Blood Cells Mol Dis.* 2015;54:360-363.
- Bonomini M, Sirolli V, Reale M, Arduini A. Involvement of phosphatidylserine exposure in the recognition and phagocytosis of uremic erythrocytes. *Am J Kidney Dis*. 2001;37:807-814.
- Polak-Jonkisz D, Purzyc L, Szcepanska M, Makulska I. Erythrocyte caspase-3 levels in children with chronic kidney disease. *Clin Biochem*. 2013;46:219-224.
- Nguyen DB, Thuy Ly TB, Wesseling MC, et al. Characterization of microvesicles released from human red blood cells. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38:1085-1099.
- 22. Gao C, Ji S, Dong W, et al. Indolic uremic solutes enhance procoagulant activity of red blood cells through phosphatidylserine exposure and microparticle release. *Toxins (Basel)*. 2015;7:4390-4403.
- Faure V, Dou L, Sabatier F, et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. J Thromb Haemost. 2006;4:566-573.
- Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Frerichs FC, et al. Chronic renal failure is accompanied by endothelial activation and a large increase in microparticle numbers with reduced procoagulant capacity. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27:1446-1453.
- Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. J Am Soc Nephrol. 2005;16:3381-3388.
- Tantawy AA, Adly AA, Ismail EA, Habeeb NM. Flow cytometric assessment of circulating platelet and erythrocytes microparticles in young thalassemia major patients: relation to pulmonary hypertension and aortic wall stiffness. *Eur J Haematol.* 2013;90:508-518.

- Bosman GJ, Lasonder E, Groenen- Dopp YA, Willekens FL, Werre JM. The proteome of erythrocyte-derived microparticles from plasma: new clues for erythrocyte aging and vesiculation. *J Proteomics*. 2012;76 Spec No.:203-210.
- Rowley DA, Halliwell B. Superoxide-dependent and ascorbatedependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: a physiologically significant reaction? Arch Biochem Biophys. 1983;225:279-284.
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radicalcaused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:6858-6862.
- Tzounakas VL, Georgatzakou HT, Kriebardis AG, et al. Uric acid variation among regular blood donors is indicative of red blood cell susceptibility to storage lesion markers: a new hypothesis tested. *Transfusion*. 2015;55:2659-2671.
- Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. Free Radic Biol Med. 1993;14:615-631.
- Itahana Y, Han R, Barbier S, Lei Z, Rozen S, Itahana K. The uric acid transporter SLC2A9 is a direct target gene of the tumor suppressor p53 contributing to antioxidant defense. Oncogene 2014;34:1799-1810.
- Mihov D, Vogel J, Gassmann M, Bogdanova A. Erythropoietin activates nitric oxide synthase in murine erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;297:C378-C388.
- Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Trougakos IP, Papassideri IS. Apolipoprotein J/Clusterin is a novel structural component of human erythrocytes and a biomarker of cellular stress and senescence. *PLoS ONE*. 2011;6:e26032.
- Sasaki D, Yamada A, Umeno H, et al. Comparison of the course of biomarker changes and kidney injury in a rat model of drug-induced acute kidney injury. *Biomarkers*. 2011;16:553-566.
- Lin YP, Yang CY, Liao CC, Yu WC, Chi CW, Lin CH. Plasma protein characteristics of long-term hemodialysis survivors. *PLoS ONE*. 2012;7:e40232.
- Patel NS, Kerr-Peterson HL, Brines M, et al. Delayed administration of pyroglutamate helix B surface peptide (pHBSP), a novel nonerythropoietic analog of erythropoietin, attenuates acute kidney injury. *Mol Med.* 2012;18:719-727.
- Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*. 2000;288:2051-2054.
- Rocha S, Costa E, Coimbra S, et al. Linkage of cytosolic peroxiredoxin 2 to erythrocyte membrane imposed by hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Blood Cells Mol Dis.* 2009;43:68-73.
- Vota DM, Maltaneri RE, Wenker SD, Nesse AB, Vittori DC. Differential erythropoietin action upon cells induced to eryptosis by different agents. *Cell Biochem Biophys.* 2013;65:145-157.
- Boran M, Kucukaksu C, Balk M, Cetin S. Red cell lipid peroxidation and antioxidant system in haemodialysed patients: influence of

recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) treatment. Int Urol Nephrol. 1998;30:507-512.

- 42. Wann JG, Lin CS, Chang LC, et al. Enhanced expression of glucose transporter 1 on erythrocyte membrane in hemodialysis patients: the possible role in erythrocyte ascorbate recycling. *Am J Kidney Dis.* 2006;47:1055-1063.
- Marlewski M, Smolenski RT, Szolkiewicz M, Aleksandrowicz Z, Rutkowski B, Swierczynski J. Accelerated degradation of adenine nucleotide in erythrocytes of patients with chronic renal failure. *Mol Cell Biochem.* 2000;213:93-97.
- Marlewski M, Smolenski RT, Szolkiewicz M, Aleksandrowicz Z, Rutkowski B, Swierczynski J. Increased rate of adenine incorporation into adenine nucleotide pool in erythrocytes of patients with chronic renal failure. *Nephron.* 2000;86:281-286.
- Gao C, Xie R, Yu C, et al. Thrombotic role of blood and endothelial cells in uremia through Phosphatidylserine exposure and microparticle release. *PLoS ONE*. 2015;10:e0142835.
- Yuana Y, Bertina RM, Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb Haemost*. 2011;105:396-408.
- Arraud N, Linares R, Tan S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. J Thromb Haemost. 2014;12:614-627.
- Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68:2667-2688.
- Panichi V, Rosati A, Bigazzi R, et al. Anaemia and resistance to erythropoiesis-stimulating agents as prognostic factors in haemodialysis patients: results from the RISCAVID study. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26:2641-2648.
- Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Trougakos IP, Papassideri IS. Apolipoprotein J/clusterin in human erythrocytes is involved in the molecular process of defected material disposal during vesiculation. *PLoS ONE*. 2011;6:e26033.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Georgatzakou HT, Tzounakas VL, Kriebardis AG, et al. Pathophysiological aspects of red blood cells in end-stage renal disease patients resistant to recombinant human erythropoietin therapy. *Eur J Haematol*. 2017;00:1–11. https://doi.org/10.1111/ejh.12875

REVIEW

Red blood cell abnormalities and the pathogenesis of anemia in end-stage renal disease

Hara T. Georgatzakou¹*, Marianna H. Antonelou¹*, Issidora S. Papassideri¹ and Anastasios G. Kriebardis²

- ¹ Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Greece
- ² Department of Medical Laboratories, Faculty of Health and Caring Professions, Technological and Educational Institute of Athens, Greece

Anemia is the most common hematologic complication in end-stage renal disease (ESRD). It is ascribed to decreased erythropoietin production, shortened red blood cell (RBC) lifespan, and inflammation. Uremic toxins severely affect RBC lifespan; however, the implicated molecular pathways are poorly understood. Moreover, current management of anemia in ESRD is controversial due to the "anemia paradox" phenomenon, which underlines the need for a more individualized approach to therapy. RBCs imprint the adverse effects of uremic, inflammatory, and oxidative stresses in a context of structural and functional deterioration that is associated with RBC removal signaling and morbidity risk. RBCs circulate in hostile plasma by raising elegant homeostatic defenses. Variability in primary defect, co-morbidity, and therapeutic approaches add complexity to the pathophysiological background of the anemic ESRD patient. Several blood components have been suggested as biomarkers of anemia-related morbidity and mortality risk in ESRD. However, a holistic view of blood cell and plasma modifications through integrated omics approaches and high-throughput studies might assist the development of new diagnostic tests and therapies that will target the underlying pathophysiologic processes of ESRD anemia.

Keywords:

Anemia / Biomarker / End-stage renal disease / Omics / Red blood cells

1 Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is a major public health problem. The increasing incidence of CKD in combination with population aging, age-associated comorbidities, and greater access to care, resulted in the explosion of the number of dialysis patients during the past decade, with an annual growth rate about six to sevenfold higher than that of the world population [1]. End-stage renal disease (ESRD) is a state of Received: November 30, 2015 Revised: January 14, 2016 Accepted: February 29, 2016

severe kidney damage. It refers to patients exhibiting glomerular filtration rate $<15 \text{ mL/min}/1.73 \text{m}^2$ and/or those treated by dialysis, irrespective of the filtration rate levels. Diabetes and arterial hypertension represent the leading causes of ESRD, although infections and genetic or autoimmune disorders may also result in advanced kidney failure. Anemia, cardiovascular risk, mineral and bone disorders constitute common complications of ESRD [2].

Anemia is ascribed to decreased erythropoietin production by the kidney, shortened red blood cell (RBC) lifespan [3], and inflammation [4]. Erythropoiesis stimulating agents (ESAs) in combination with iron supplementation is the primary treatment strategy for the management of anemia in CKD patients, although anemia is resistant to ESAs in approximately 10–20% of the cases. Iron deficiency, resulting from decreased iron absorption and chronic inflammation, leads to poor ESA response [5]. Hemodialysis (HD) aims to remove accumulated metabolic waste from blood and is the therapy of choice for the vast majority of dialysis patients compared to peritoneal dialysis.

Correspondence: Dr. Anastasios Kriebardis, Laboratory of Hematology and Transfusion Medicine, Department of Medical Laboratories, Faculty of Health and Caring Professions, Technological and Educational Institute of Athens, Ag. Spiridonos, 12243, Egaleo, Athens, Greece E-mail: akrieb@biol.uoa.gr; akrieb@teiath.gr Fax: +30-2105314877

Abbreviations: ATP, adenosine 5'-triphosphate; CKD, chronic kidney disease; CRP, C-reactive protein; ESAs, erythropoiesis stimulating agents; ESRD, end-stage renal disease; Hb, hemoglobin; HD, hemodialysis; IL, interleukin; MPs, microparticles; NO, nitric oxide; PS, phosphatidylserine; RBC, red blood cell; rhEpO, recombinant human erythropoietin; SOD, superoxide dismutase

^{*}These are equal first authors.

Colour Online: See the article online to view Fig. 1 in colour.

Anemia associated with reduced lifespan of uremic RBCs is poorly understood. This review summarizes the profile of RBC and plasma modifications in ESRD patients and their probable association with anemia. The critical reading of the miscellaneous and often contradictory data on uremic anemia, intends to suggest a more integrated approach, which could reveal hidden pieces of the puzzle of the underlying pathophysiology.

2 Uremic plasma: The natural environment of the erythrocytes in ESRD

2.1 Redox status

The total antioxidant capacity of the uremic plasma is higher than in controls but significantly decreases post-HD following the removal of uric acid [6–8]. At the same time, elimination of water during the HD procedure leads to increased concentration of endogenous antioxidants compared to the pre-HD levels [9]. In general, uremic plasma contains low levels of antioxidant vitamins, like C (ascorbate) and E [6,8,10], usually in response to the inflammatory status of the patients [11]. HD negatively affects the concentration of ascorbate [6,8], while variable effects have been reported for other vitamin levels [8, 10].

Regarding the enzymatic antioxidant capacity in ESRD plasma, glutathione reductase (GR) activity has been found increased [12, 13] and glutathione peroxidase (GPx) levels decreased [13–15], compared to controls. Low activity may be the result of protein modifications by oxidation, carbamylation, or glycosylation reactions [16], inhibition by uremic toxins [17], low synthesis by the nephron, [18] or plasma deficiency in micronutrients that are critical cofactors [19]. Indeed, dietary restrictions, inflammatory responses [20], and removal by dialysis, lead to low levels of trace elements, including selenium [13, 19, 21], zinc [19–21], and copper [19], that are partially elevated after HD [22].

As a result of reduced or overwhelmed antioxidant systems, several oxidative modifications have been reported in plasma lipid and protein components, including lipoperoxidation [10, 19], oxidized LDL [23], and protein carbonylation [24]. They usually increase by HD [25] and by the number of years the patients have been on HD treatment [26] (Table 1). Although HD-related issues, such as hemoincompatibility, might trigger ROS release by activated neutrophils, accumulated evidence confirms the hypothesis of Inagi et al. [27], that uremia is per se a state of carbonyl overload and oxidative stress. In this context, biologically active advanced glycation end products produced by oxidative and nonoxidative reactions on plasma components are now considered uremic toxins whose effective removal is related to the quality of HD [28].

Albumin is one of the main scavengers of carbonyl species and the major protein target of oxidative stress in plasma [29]. However, malnutrition and chronic inflammation cause reduced synthesis or increased catabolism of albumin in ESRD [30, 31]. In several studies, uremic albumin in combination with total antioxidant capacity has been positively correlated with hemoglobin (Hb) [31, 32] and negatively with the β 2 microglobulin levels [33] (Table 1).

Finally, plasma nitric oxide (NO) concentration is usually higher in ESRD patients than in control samples [6], probably as a result of either the shear stress imposed on the endothelium by the HD [34] or the cytokine-mediated increased expression of NO synthase [35]. These conditions pose a high risk of cell and tissue injury, thus contributing to anemia, cardiovascular diseases, and other uremia-associated complications.

2.2 Inflammation status

HD and CKD, independently and in combination, trigger an inflammatory response, as revealed by the overexpression of acute phase proteins C-reactive protein (CRP) [36, 37] and ferritin [38], of pro-inflammatory cytokines interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha, and soluble IL2R and of monocyte/neutrophil activation markers [36, 37, 39]. Infections, bacterial contamination and bioincompatible membranes [40], are HD-related causes of monocyte and neutrophil activation [39]. However, HD is only partially responsible for the inflammatory response, as CKD patients who are not on dialysis exhibit inflammatory markers too [41], showing that uremia constitutes an inflammatory state per se. Inflammation markers exhibit positive correlation with elastase and recombinant human erythropoietin (rhEpO) dose [42] but negative correlation with Hb [32] and antioxidant components of uremic plasma [32, 43] (Table 1), highlighting the functional connection of inflammation with anemia and oxidative stress.

In fact, inflammatory cytokines trigger anemia in several ways. They inhibit erythropoiesis by suppressing the expression of EpO [44] and by inducing the expression of the soluble EpO receptor [45], the apoptotic death of erythroid progenitors, and interferon gamma stimulation [46]. Moreover, they may accelerate the destruction of RBCs through macrophage activation. Finally, inflammatory cytokines affect iron metabolism and availability by regulating the expression of transferrin and lactoferrin receptors in erythroid cells and the expression of ferroportin—and thus hepcidin levels—in macrophages [47].

2.3 Circulating microparticles (MPs)

Extracellular vesicles or microparticles (MPs) are small membrane particles ubiquitously released by cells under physiological or pathological conditions [48]. They participate in processes such as immune regulation, coagulation, and inflammation [49]. Elevated levels of circulating MPs have been reported in many diseases, including ESRD [50], as a result of

780 H. T. Georgatzakou et al.

Table 1. Statistically significant (positive \pm of negative \pm) correlations between blood and dreinia parameters	Jarameters
---	------------

Parameter	Correlation with	References
Duration on HD	(+) Spectrin fragmentation	[61]
	(+) Plasma lipid peroxidation	[26]
Duration on rhEpO treatment	(–) Serum and RBC-lipid peroxidation	[31]
	(+) TAC	[31]
rhEpO dose	(–) Hb, albumin, serum iron	[5]
	(–) RBC-SOD	[84]
	(–) Serum albumin and iron	[127]
	(–) Hb	[128]
	(+) CRP	[5, 129]
	(+) CRP, IL-6, TNF-α	[130]
Blood		
Hct	(–) Endothelial MPs	[54]
	(+) Albumin	[131]
Hb	(–) plasma lipid peroxidation	[31]
	(+) albumin	[32]
	(–) RBC-lipid peroxidation	[31, 132]
	(+) TAC	[31]
	(+) RBC-SOD	[84]
	(–) CRP	[32]
RDW	(+) RBC-ROS	[61]
	(–) RBC-spectrin	[62]
Mean cell Hb	(–) RBC-Hsp70	[61]
Mean cell Hb concentration	(–) RBC-Hsp70	[61]
Echinocytes	RBC spectrin fragmentation	[61]
Stomatocytes	RBC membrane stomatin and Peroxiredoxin-2	[61,62,71]
CRP	(–) Serum iron	[127]
	(–) Plasma vitamin C	[11]
	(–) TAC	[31]
	(–) Plasma α-tocopherol	[43]
	(–) Serum albumin	[127]
	(+) Plasma elastase	[42]
	(+) IL-6, IL-10	[36]
	(–) Albumin	[32, 43, 127, 129]
Serum ferritin	(+) Plasma lipid peroxidation	[133]
	(+) CRP	[32]
	(–) RBC-GSH-Px	[133]
	(+) Serum calcium	[7]
	(–) Serum uric acid	[7]
Creatinine	(+) RBC membrane protein carbonylation	[61]
	(+) RBC membrane peroxiredoxin-2	[61]
	(–) Total blood GPx	[134]
	(+) RBC-PS exposure	[97]
β2 microglobulin	(–) Plasma TAC	[33]
Albumin	(–) Ferritin	[131]
	(–) Serum bicarbonate	[131]
	(+) Plasma TAC	[31]
Uric acid	(+) Albumin, creatinine	[135]
	(—) IL-6	[135]
	(+) TAC	[31,33]
Urea	(+) RBC membrane protein carbonylation	[61]
	(+) RBC membrane Hsp70 (post-HD)	[61]
	(–) Total blood GPx	[134]

GPx, glutathione peroxidase; RDW, red blood cell distribution width; SOD, superoxide dismutase; TAC, total antioxidant capacity; TNF-α, tumor necrosis factor alpha.

inflammation, oxidative stress, and cellular activation [51,52]. HD exacerbates vesiculation [50, 52], probably as a result of the repetitive mechanical stress imposed on cells [53]. However, lower levels of MPs have also been reported post-HD, following the removal of uremic toxins [50, 54]. p-cresol toxin triggers vesiculation of endothelial cells [50] but restricts MPs generation from neutrophils by preventing their calciumindependent activation [55, 56]. This might explain why MPs levels do not always correspond to the severity of renal failure [52].

Although MPs, and especially the platelet-derived ones, in ESRD appear to be less procoagulant than in other diseases [57], they might promote atherosclerotic events [54, 58]. Furthermore, the endothelium-derived MPs may decrease the endothelial NO release, thus contributing to endothelial dysfunction [59].

3 RBCs in ESRD

3.1 Physiological characteristics

Uremic patients are characterized by low RBC count and Hb concentration that are partially improved by HD [60, 61]. The high RBC distribution width index [60–63] is associated with increased reticulocyte count, anisocytosis, and iron deficiency. In a context of iron sufficiency, the same index reflects inflammatory response and malnutrition issues, being positively correlated with serum CRP and ESA hyporesponsiveness, but inversely with serum albumin levels [63].

Uremic RBCs exhibit increased rigidity but reduced surface charge [64] and deformability compared to healthy controls [65, 66]. Their susceptibility to osmotic lysis is pathologically increased [65, 67, 68] or decreased [69], as a result of aberrations in RBC membrane lipid content, antioxidant capacity, ATPases activity (where ATP is adenosine 5'-triphosphate) and plasma parathormone levels. Removal of uremic toxins and normalization of serum osmolarity by HD seem to improve osmotic fragility [65, 68]. RBC membrane vesiculation has been reported to be either normal [57] or increased [59]. Release of sialoglycoproteins-containing MPs is associated with reduced surface charge [64]. As a result of ion homeostasis disturbance, cellular volume regulation, oxygen delivery, and calcium-driven signaling are also affected. Indeed, decreased rate of anion transport [69], downregulation of Na⁺/K⁺ pump and lower activity of Na⁺/K⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺ ATPases have been reported in uremic RBCs [69, 70].

Plasma osmolarity, uremic toxins, and structural/ functional modifications in RBC membrane pave the way for RBC shape perturbations to stomatocytes, knizocytes, spherocytes, echinocytes, and target cells [61, 64, 69, 71] that may influence blood rheology in ESRD [72, 73]. Regarding echinocytosis, reconstitution experiments with healthy blood have suggested a plasmatic factor as a probable contributor [72], although elevated levels of membrane cholesterol [67,69], lipid peroxidation [74], and calcium influx [75, 76] may also promote the echinocytic transformation of RBCs. HD induces a reversible increase in echinocytosis [72], however, final removal of uremic toxins lowers echinocyte percentage and improves membrane deformability compared to the pre-HD status [65, 72]. Stomatocytosis might be the result of an increased antioxidant activity [77], since it has been related with intracellular ROS levels and membrane-binding of protein markers of oxidative stress [61] (Table 1).

3.2 Redox homeostasis in ESRD RBCs

Once again, contradictory findings have been reported on the intracellular antioxidant capacity in ESRD. Several studies have reported insufficient antioxidant status in uremic RBCs, reflected in low GSH/GSSG (oxidized glutathione) ratio [78], low vitamin E [79], and antioxidant enzymes activity [13, 19, 79] but high, potentially pro-oxidant, vitamin A levels [10]. In these cases, the antioxidant factors are supposed to be severely affected by the uremia or overwhelmed by the sustained oxidative stress.

On the other side, overexpression or increased activity of antioxidant factors has also been reported in ESRD RBCs [13, 80], probably as a homeostatic response to the sustained oxidative and toxicity stresses, or as a result of reticulocytosis in rhEpO-treated patients. Elevated activity of GST is thought to be as a response of erythroid progenitors to the progressive inactivation of GST in circulating RBCs by uremic toxins [80].

The effect of dialysis on the activity of the RBC antioxidant enzymes is also ambiguous. The reported findings depend on whether HD triggers or not ROS generation in RBCs. GSH and ascorbate levels usually decrease [81] but eGST activity remains increased post-HD, probably due to the usage of undialyzable toxic substances as substrates [82].

Despite conflicting reports on antioxidant activity, there is a consensus regarding the oxidative damage of uremic RBCs. Although not common in all patients [61,71], pathologic accumulation of ROS and oxidative modifications in membrane proteins [61,75] and lipids [83], have been reported in uremic RBCs. Uremic plasma, before and after HD, enhances ROS accumulation in healthy RBCs [75], while HD does not significantly affect it [61], highlighting the adverse effect of renal pathology on redox homeostasis [71]. Conversely, HD has been reported to increase membrane lipid peroxidation [83] and the susceptibility to ROS accumulation following oxidant stimuli [61]. Notably, deterioration of RBC protein carbonylation after HD has been related to cardiovascular mortality risk in retrospective studies [71].

The close relation between anemia and redox status in ESRD is highlighted in patients receiving antioxidant factors. According to various reports, vitamin E, ascorbate, GSH, or L-carnitine administration not only attenuate oxidative stress and promote antioxidant activity [79] but also improve anemia [84], rhEpO dose requirement and RBC functional properties, including membrane fragility and deformability [85,86].

Ascorbate and *N*-acetyl cysteine supplementation further improve the inflammatory response [87]. Notably, rhEpO that mainly targets anemia, exerts additional antioxidant effects on RBCs as shown in normal or thalassemic erythrocytes [88,89]. However, EpO regulates NO synthase activity in RBCs or facilitates GSH oxidation, thus acting either as a pro-oxidant or as an antioxidant factor, depending on L-arginine availability [90]. In fact, this dual effect is true for most of the antioxidant supplements offered to ESRD patients [91,92], indicating the need for further investigation of antioxidant therapies.

These findings in association with the previously reported increased levels of oxidative stress in nondialysis CKD patients, suggest that oxidative stress is an intrinsic state in uremia, and the uremic RBCs have successfully adapted to it. HD does not induce oxidative stress, although it might exacerbate it [93]. This kind of stress, which is very clearly reflected in RBC remodeling, may contribute to anemia through well characterized molecular pathways involving removal signaling and eryptosis.

3.3 RBC membrane composition and properties

The erythrocyte membrane plays a key role in RBC survival. However, uremia itself and the therapeutic strategies (rhEpO, HD), may affect certain RBC membrane proteins and lipids. Membrane remodeling in ESRD RBCs consists of protein deficiencies, aberrant lipid levels [64, 69], binding of cytosolic components (e.g. peroxiredoxin-2), protein aggregation/complexation (e.g. spectrin–Hb complex [94], fragmentation, oxidation /carbonylation (e.g. ankyrin [94]) and activation (e.g. of calpain following increase in cytosolic calcium) (Table 2). This kind of remodeling is the final outcome of elevated oxidative/calcium stress and premature aging.

The frequently reported deficiency in band-3 [61, 69, 95] and skeletal proteins [60, 71] may affect the mechanical properties of the membrane and weaken the adhesion of cytoskeleton to the lipid bilayer, thus promoting vesiculation. Probably due to the fact that the rhEPO-treated patients have a younger RBC population compared to healthy subjects, modifications associated with the band-3-based model of RBC aging are not usually observed [69]. However, aberrations in CD47 marker-of-self protein and IgGs membrane binding have been found. Fluctuation in membrane expression of the water channel protein aquaporin-1 is probably related to the osmolarity of the uremic plasma, while higher expression of β -adducin [96], has been interpreted as a compensatory response to the increased RBC osmotic fragility and disturbed calcium homeostasis.

Removal of uremic toxins and damaged RBCs, restoration of plasma osmolarity, and the increased rate of erythrophagocytosis [97] probably account for the improved expression of some proteins (e.g. spectrin) [61] post-HD (Table 2). MPs release during HD may further assist the selective removal of stress markers. Duration of HD treatment has been associated with overexpression of glucose transporter-1, stomatin, and aquaporin-1 [71]. Interestingly, these proteins contribute to structural integrity [98], metabolism [99], vesiculation [100], and antioxidant activity of the RBCs [81]. In other cases, however, HD had a negative effect on the protein composition and the mechanical properties of the membrane [65].

The membrane proteome of the ESRD erythrocyte exhibits substantial differences compared to that of healthy subjects, but there is a high degree of interpatient variability, probably associated with different primary defects, comorbidities, and treatments. These complex associations indicate that all the factors which, either directly or indirectly, affect anemia, also impact the remodeling of the RBC membrane, with molecular events of defeat or defense in the battlefield of uremia [61, 62, 71, 96].

3.4 Removal signaling

Despite high variation among patients, distorted calcium homeostasis has been repeatedly reported in ESRD RBCs [76]. Extracellularly, the uremic plasma negatively affects the activity of erythrocyte Ca-pump [101] and Ca²⁺-ATPase [102], resulting in calcium excess [75, 102, 103]. Intracellularly, the defective band-3 [95] inhibits the activity of voltage-dependent Ca²⁺ channels [103] and the ATP depletion inhibits the activity of Ca²⁺/Mg²⁺-dependent ATPase [104]. Deficiency of uremic RBCs in Ca²⁺ regulatory proteins [104], in addition to increased serum levels of parathormone have been associated with cytosolic excess and increased membrane permeability of Ca²⁺ [103], respectively, although the contribution of parathormone has not been verified by others [101, 104]. HD has been reported to ameliorate [104] or have no effect [75, 102, 103] on intracellular calcium levels. Notably, even in cases exhibiting similar intracellular calcium concentration pre- and post-HD, post-HD plasma causes significantly lower calcium accumulation in control RBCs compared to pre-HD plasma [75], supporting the Gafter's hypothesis that a dialyzable component of ESRD plasma triggers Ca²⁺ accumulation in uremic RBCs [102].

Increased activity of this universal signaling molecule is expected to activate Ca²⁺-sensitive proteins (calpain, synexin, Gardos channel, scramblase, etc.) and pathways in uremic RBCs [105], such as the release of Hb-containing MPs, cytoskeleton stability, elastic deformation, osmotic resistance, ATP depletion, band-3 cleavage, NO production, shape, volume, and redox state homeostasis. For example, intracellular calcium concentration has been positively correlated with the incidence of echinocytosis and spherocytosis in ESRD [102].

Increased cytosolic Ca^{2+} activity has been further associated with the apoptotic death of uremic erythrocytes [64, 75, 106]. Eryptotic RBCs are characterized by shrinkage, membrane blebbing, ceramide formation, and phosphatidylserine (PS) exposure, and thus, by a rapid clearance from circulation. Although eryptosis may precede and protect against hemolysis, it is a part of anemia and aberrant

Protein	Patients vs. control	RBC pathway	Ref.
Actin	Lower	Structural integrity	[61]
α-Adducin	Lower	Structural integrity	[71]
β-Adducin	Higher (pre-HD)		[96]
Ankyrin	Lower (pre-HD)	Structural integrity	[136]
Aquaporin-1	Lower (pre-HD)	Volume and shape regulation	[137]
	Higher (pre-HD)		[61,71]
Band-3	Lower (pre-HD)	Aging, RBC removal, oxidative stress	[69,95]
	Lower		[61]
	Lower (pre-HD)		[136]
	Higher (pre-HD)		[60]
Calpain-1	Higher	Calcium stress, eryptosis	[71]
CD47	Lower (post-HD)	Aging, RBC removal	[61,71]
Clusterin	Lower	RBC aging, oxidative stress, MPs release	[71]
GAPDH	Higher	Energy metabolism	[60,62]
	Lower		[71]
Glucose Transporter-1	Higher	Energy metabolism, structural integrity, redox homeostasis	[81]
	Lower		[71]
Hsp 71/72	Lower (pre-HD)	Proteome stress	[96]
Pallidin	Lower (post-HD)	Structural integrity	[61]
	Lower		[71]
Peroxiredoxin-2	Higher	Oxidative stress, calcium stress	[61]
	Higher		[71]
Stomatin	Higher (pre-HD)	MPs release	[62]
	Lower (post-HD)		[61]
Spectrin	Lower (pre-HD)	Structural integrity	[60,62]
Spectrin fragments	Higher (pre-HD)	Oxidative stress, MPs release	[61]
			[71]
Spectrin-Hb complex	Higher	Aging, oxidative stress	[61]
Tropomodulin-1	Higher (pre-HD)	Structural integrity calcium stress	[96]
Ubiquitinylated proteins	Higher (post-HD)	Proteome stress, structural integrity	[61]

Table 2. Modifications in the expression of membrane proteins in ESRD erythrocytes compared to healthy subjects

microcirculation. There is evidence that HD, in addition to dialyzable plasma components [75] and uremic toxins [107], triggers eryptosis in uremia, in part by increasing intracellular Ca²⁺, ROS, and ceramide formation. It has been reported that EpO is not able to completely inhibit eryptosis since it favors intracellular calcium influx [88].

Either as a part of an activated program for eryptotic removal or not, uremic state has been related with increased PS exposure on RBCs, regardless of the dialysis treatment [97]. Although the identity of the uremic contributors remains unclear, serum creatinine has been suggested as candidate trigger in undialyzed patients [97]. rhEpO administration ameliorates PS exposure through preventing RBC oxidative imbalance, but it seems unable to inhibit PS externalization in calcium-stressed RBCs [88]. In other studies, a decrease in the number of PS exposing RBCs after EpO supplementation has been reported, resulting from partial inhibition of RBC cation channels [108]. PS exposure is expected to promote erythrophagocytosis [109], procoagulant phenotype [110] (in association with the release of PS-exposing MPs [64]) and increased adhesion to endothelium [111], thus decreasing NO release by endothelial NO synthase, an effect that has been associated with cardiovascular mortality risk in ESRD.

4 Integrated omics tools as a promising approach toward understanding uremic anemia

As analyzed before, uremic anemia is a multifactorial outcome. It is cited to be at the crossroad of inhibited erythropoiesis, shortened RBC survival, uremia, inflammation, and distorted redox and iron homeostasis (Fig. 1), in close interaction with many pathologies and risks for hospitalization, cardiovascular morbidity, and mortality [112, 113]. Although the correlations between the above-mentioned interacting parameters (Table 1) do not prove causality, they reflect the severity of ESRD, the severity of anemia, and other clinical outcomes.

Pathogenesis of anemia in ESRD remains terra incognita, since EpO deficiency is definitely not the sole cause. In the modern era of ESRD management, characterized by technological advances in HD methods and ESAs formulations, uremic RBCs still exhibit half of their normal lifespan. The cause of this detrimental discount is largely unknown, and so are the element(s) of the uremic milieu that contribute to it [3]. Even the management of anemia in ESRD patients is currently controversial due to the "anemia paradox" phenomenon. According to this, targeting Hb to >13g/dL is



Figure 1. The currently established network of contributing (black arrows) and inhibiting (red arrows) factors in ESRD-associated anemia. Indirect effects of inflammation and uremic toxins toward reduced RBC survival (through oxidative stress) are shown by dotted arrows.

associated with increased cardiovascular events but paradoxically, if this level is achieved mortality is lower [114], suggesting that ESAs, especially at very high doses, have off-target effects in other tissues [112]. These findings highlight the need for a better understanding of the molecular mechanisms of anemia in ESRD and for a more individualized approach to anemia therapy, with the hope of developing new schemes that more closely target the underlying pathophysiology of low Hb, reducing in parallel the therapy-related adverse outcomes [96].

Notably, the primary and secondary contributors to anemia are imprinted in blood modifications observed in both cellular and soluble components [61,62,64,71,96]. Integrated omics approaches and high-throughput studies in uremic blood and RBCs may reveal proteins, metabolites, and other factors that mediate anemia and anemia-related morbidity in ESRD. In this direction, proteins differentially expressed between dialyzed and nondialyzed patients [96] and alterations in the lipid pattern [115] have been recently detected in the ESRD RBC membrane by omics analyses. Clinical laboratory markers, including alkaline phosphatase, IL-6 and CRP have already been associated with the clinical manifestations of the disease [116]. These approaches may target specific subpopulations of dialysis patients, e.g. with or without diabetes, responsive or not to rhEpO therapy etc. and thus might be more relevant to the underlying mechanisms involved in any specific pathophysiological sub-background.

There is a yet unexplored network of interactions between causal and contributing factors of anemia in dialyzed patients. Omics represent very sensitive tools for characterizing molecular changes in all the implicating parts: cells, MPs, plasma, urine, and dialysis fluids. They hold the potential for simultaneous identification and quantification of proteins and metabolites involved in oxidative stress, intercellular communication, transport of ions, cellular shape modification, energy metabolism, inflammation signaling, premature aging, cellular clearance, and apoptotic death, in addition to evaluating how they are modified in response to different primary defect backgrounds or ESAs therapy. Refinement of those data by modern bioinformatics tools is an effective way for maximizing the synergy between the current and future knowledge, to advance our understanding of the etiology of anemia and other complications in ESRD and thus to proceed toward the identification of novel uremia and risk

markers in high-risk ESRD patients. The pioneer proteomic [116], metabolomic [117–119], and lipidomic [115, 117, 120] studies on CKD plasma have paved the way to this ultimate goal.

Indeed, novel metabolic markers of ESRD (dicarboxylic acids, amino acid, and nucleotide derivatives, etc.) [117] have been identified in uremic plasma, serum, and urine by targeted and nontargeted metabolomics analyses. The pathophysiologically relevant alterations in glucose, steroid hormone, purine, NO, tryptophan, and lipid metabolism, in patients at different stages of CKD [119, 121] might be used to detect CKD earlier than traditional clinical methods [122]. Arginine derivatives for example, have been considered as promising candidates to identify individuals at risk of renal impairment and mechanisms of kidney disease progression [119]. HD has been associated with unexpected increases in several metabolites that suggest cellular hypoxia and activation of a broad catabolic program, including glycolysis, lipolysis, ketosis, and nucleotide breakdown [117, 118]. In the same context, proteomics approaches resulted in the detection of protein indicators of early CKD, such as a1-microglobulin [123], and of HD effects [124, 125]. Moreover, protein risk factors and mechanisms that promote cardiovascular disease in CKD have been proposed, based on proteomics data that suggest differential pathophysiological pathways involving coagulation, lipoprotein homeostasis, and inflammation in initial and advanced stages of kidney failure [124]. Disturbed triglyceride catabolism, beta-oxidation, and LDL lipidomic profile have been confirmed in advanced CKD [117, 126]. Extending the application of metabolite, proteome, and lipidome profiling to RBCs is a challenging task in the research field of ESRD that might be used to broaden our understanding on uremic anemia.

5 Conclusions

Anemia is associated with poor physical and clinical outcomes in ESRD patients undergoing HD and ESAs therapy. Despite being well described at the clinical laboratory level, its multifactorial nature in combination with the variable disease and therapy profiles among the patients, complicate the elucidation of the underlying molecular mechanisms and consequently, the efficacy of treatment. On the other side, all aspects of uremic anemia, from the multiple contributing factors to the relevant morbidity, are well imprinted in RBC and plasma modifications that are characteristic of the disease. Besides, reduced RBC lifespan is a major contributor to uremic anemia. Close examination of these data has revealed that anemia in ESRD is developed around a complex network of interacting pro-inflammatory and pro-oxidant factors under the orchestration of a highly toxic uremic environment. The therapeutic manipulations, namely ESAs, dialysis and pharmaceutical supplements, do not exhibit uniform effects on any of the variable factors which determine the severity of uremic anemia. Omics approach of uremic blood

components, both cellular and soluble, is probably the most appropriate tool for characterizing molecular changes associated with the uremic anemia and their fluctuation in relation to the variables of the disease. These insights hold promise for the development of new diagnostic tests and therapies that directly target the pathophysiologic processes underlying this specific form of anemia.

The authors would like to thank Dr. T. Ntouroupi for the thorough editing of the manuscript.

The authors have declared no conflict of interest.

6 References

- Williams, M. E., Sandeep, J., Catic, A., Aging and ESRD demographics: consequences for the practice of dialysis. *Semin. Dial.* 2012, 25, 617–622.
- [2] Thomas, R., Kanso, A., Sedor, J. R., Chronic kidney disease and its complications. *Prim. Care* 2008, 35, 329–344, vii.
- [3] Ly, J., Marticorena, R., Donnelly, S., Red blood cell survival in chronic renal failure. *Am. J. Kidney Dis.* 2004, *44*, 715– 719.
- [4] Stenvinkel, P., The role of inflammation in the anaemia of end-stage renal disease. *Nephrol. Dia.l Transplant.* 2001, *16* (Suppl 7), 36–40.
- [5] Locatelli, F., Andrulli, S., Memoli, B., Maffei, C. et al., Nutritional-inflammation status and resistance to erythropoietin therapy in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, *21*, 991–998.
- [6] Clermont, G., Lecour, S., Lahet, J., Siohan, P. et al., Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. *Cardiovasc. Res.* 2000, 47, 618–623.
- [7] Senol, E., Ersoy, A., Erdinc, S., Sarandol, E., Yurtkuran, M., Oxidative stress and ferritin levels in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008, *23*, 665–672.
- [8] Jackson, P., Loughrey, C. M., Lightbody, J. H., McNamee, P. T., Young, I. S., Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin. Chem.* 1995, *41*, 1135–1138.
- [9] Meucci, E., Littarru, C., Deli, G., Luciani, G. et al., Antioxidant status and dialysis: plasma and saliva antioxidant activity in patients with fluctuating urate levels. *Free Radic. Res.* 1998, *29*, 367–376.
- [10] Peuchant, E., Carbonneau, M. A., Dubourg, L., Thomas, M. J. et al., Lipoperoxidation in plasma and red blood cells of patients undergoing haemodialysis: vitamins A, E, and iron status. *Free Radic. Biol. Med.* 1994, *16*, 339–346.
- [11] Zhang, K., Liu, L., Cheng, X., Dong, J. et al., Low levels of vitamin C in dialysis patients is associated with decreased prealbumin and increased C-reactive protein. *BMC Nephrol.* 2011, *12*, 18–24.
- [12] Melissinos, K. G., Delidou, A. Z., Varsou, A. G., Begietti, S. S., Drivas, G. J., Serum and erythrocyte glutathione

reductase activity in chronic renal failure. *Nephron* 1981, 28, 76–79.

- [13] Ceballos-Picot, I., Witko-Sarsat, V., Merad-Boudia, M., Nguyen, A. T. et al., Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic. Biol. Med.* 1996, *21*, 845–853.
- [14] Schiavon, R., Biasioli, S., De Fanti, E., Petrosino, L. et al., The plasma glutathione peroxidase enzyme in hemodialyzed subjects. ASAIO J. 1994, 40, 968–971.
- [15] Roxborough, H. E., Mercer, C., McMaster, D., Maxwell, A. P., Young, I. S., Plasma glutathione peroxidase activity is reduced in haemodialysis patients. *Nephron* 1999, *81*, 278– 283.
- [16] Arai, K., Maguchi, S., Fujii, S., Ishibashi, H. et al., Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. Identification of the in vitro glycated sites. *J. Biol. Chem.* 1987, *262*, 16969–16972.
- [17] Niwa, T., Tsukushi, S., 3-Deoxyglucosone and AGEs in uremic complications: inactivation of glutathione peroxidase by 3-deoxyglucosone. *Kidney Int. Suppl.* 2001, 78, S37–S41.
- [18] Avissar, N., Ornt, D. B., Yagil, Y., Horowitz, S. et al., Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am. J. Physiol.* 1994, *266*, C367– C375.
- [19] Richard, M. J., Arnaud, J., Jurkovitz, C., Hachache, T. et al., Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1991, *57*, 10–15.
- [20] Guo, C. H., Wang, C. L., Chen, P. C., Yang, T. C., Linkage of some trace elements, peripheral blood lymphocytes, inflammation, and oxidative stress in patients undergoing either hemodialysis or peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int.* 2011, *31*, 583–591.
- [21] Tonelli, M., Wiebe, N., Hemmelgarn, B., Klarenbach, S. et al., Trace elements in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 2009, 7, 25–36.
- [22] Lin, T. H., Chen, J. G., Liaw, J. M., Juang, J. G., Trace elements and lipid peroxidation in uremic patients on hemodialysis. *Biol. Trace Elem. Res.* 1996, *51*, 277–283.
- [23] Mahrooz, A., Zargari, M., Sedighi, O., Shaygani, H., Gohari, G., Increased oxidized-LDL levels and arylesterase activity/HDL ratio in ESRD patients treated with hemodialysis. *Clin. Invest. Med.* 2012, *35*, E144–E151.
- [24] Himmelfarb, J., McMonagle, E., McMenamin, E., Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int.* 2000, *58*, 2571–2578.
- [25] Ozden, M., Maral, H., Akaydin, D., Cetinalp, P., Kalender, B., Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients. *Clin. Biochem.* 2002, *35*, 269–273.
- [26] Weinstein, T., Chagnac, A., Korzets, A., Boaz, M. et al., Haemolysis in haemodialysis patients: evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 883–887.
- [27] Inagi, R., Miyata, T., Oxidative protein damage with carbohydrates and lipids in uremia: carbonyl stress. *Blood Purif.* 1999, 17, 95–98.

- [28] Gerdemann, A., Wagner, Z., Solf, A., Bahner, U. et al., Plasma levels of advanced glycation end products during haemodialysis, haemodiafiltration and haemofiltration: potential importance of dialysate quality. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, *17*, 1045–1049.
- [29] Himmelfarb, J., McMonagle, E., Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int.* 2001, *60*, 358–363.
- [30] Kaysen, G. A., Biological basis of hypoalbuminemia in ESRD. J. Am. Soc. Nephrol. 1998, 9, 2368–2376.
- [31] Dimitrijevic, Z. M., Cvetkovic, T. P., Djordjevic, V. M., Pavlovic, D. D. et al., How the duration period of erythropoietin treatment influences the oxidative status of hemodialysis patients. *Int. J. Med. Sci.* 2012, *9*, 808–815.
- [32] Kalender, B., Mutlu, B., Ersoz, M., Kalkan, A., Yilmaz, A., The effects of acute phase proteins on serum albumin, transferrin and haemoglobin in haemodialysis patients. *Int. J. Clin. Pract.* 2002, *56*, 505–508.
- [33] Filiopoulos, V., Hadjiyannakos, D., Takouli, L., Metaxaki, P. et al., Inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease patients treated with hemodialysis or peritoneal dialysis. *Int. J. Artif. Organs* 2009, *32*, 872–882.
- [34] Buga, G. M., Gold, M. E., Fukuto, J. M., Ignarro, L. J., Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* 1991, *17*, 187–193.
- [35] Busse, R., Mulsch, A., Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1990, 275, 87–90.
- [36] Pupim, L. B., Himmelfarb, J., McMonagle, E., Shyr, Y., Ikizler, T. A., Influence of initiation of maintenance hemodialysis on biomarkers of inflammation and oxidative stress. *Kidney Int.* 2004, *65*, 2371–2379.
- [37] Costa, E., Lima, M., Alves, J. M., Rocha, S. et al., Inflammation, T-cell phenotype, and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy. J. Clin. Immunol. 2008, 28, 268–275.
- [38] Rambod, M., Kovesdy, C. P., Kalantar-Zadeh, K., Combined high serum ferritin and low iron saturation in hemodialysis patients: the role of inflammation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2008, *3*, 1691–1701.
- [39] Hakim, R. M., Breillatt, J., Lazarus, J. M., Port, F. K., Complement activation and hypersensitivity reactions to dialysis membranes. *N. Engl. J. Med.* 1984, *311*, 878–882.
- [40] Stenvinkel, P., Inflammation in end-stage renal failure: could it be treated? *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, 17 (Suppl 8), 33–38; discussion 40.
- [41] Stenvinkel, P., Heimburger, O., Paultre, F., Diczfalusy, U. et al., Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999, *55*, 1899–1911.
- [42] Costa, E., Rocha, S., Rocha-Pereira, P., Nascimento, H. et al., Neutrophil activation and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in hemodialysis patients. *Am. J. Nephrol.* 2008, *28*, 935–940.

- [43] Nguyen-Khoa, T., Massy, Z. A., De Bandt, J. P., Kebede, M. et al., Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001, *16*, 335–340.
- [44] La Ferla, K., Reimann, C., Jelkmann, W., Hellwig-Burgel, T., Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB. *FASEB J.* 2002, *16*, 1811–1813.
- [45] Khankin, E. V., Mutter, W. P., Tamez, H., Yuan, H. T. et al., Soluble erythropoietin receptor contributes to erythropoietin resistance in end-stage renal disease. *PLoS One* 2010, *5*, e9246.
- [46] Morceau, F, Dicato, M., Diederich, M., Pro-inflammatory cytokine-mediated anemia: regarding molecular mechanisms of erythropoiesis. *Mediators Inflamm.* 2009, 2009, 405016.
- [47] Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C. et al., IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.* 2004, *113*, 1271–1276.
- [48] Gyorgy, B., Szabo, T. G., Pasztoi, M., Pal, Z. et al., Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011, *68*, 2667–2688.
- [49] Aatonen, M., Gronholm, M., Siljander, P. R., Platelet-derived microvesicles: multitalented participants in intercellular communication. *Semin. Thromb. Hemost.* 2012, *38*, 102– 113.
- [50] Faure, V., Dou, L., Sabatier, F., Cerini, C. et al., Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. J. Thromb. Haemost 2006, 4, 566–573.
- [51] Galle, J., Quaschning, T., Seibold, S., Wanner, C., Endothelial dysfunction and inflammation: what is the link? *Kidney Int. Suppl.* 2003, S45–S49.
- [52] Daniel, L., Fakhouri, F., Joly, D., Mouthon, L. et al., Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int.* 2006, *69*, 1416–1423.
- [53] Miyazaki, Y., Nomura, S., Miyake, T., Kagawa, H. et al., High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* 1996, *88*, 3456–3464.
- [54] Boulanger, C. M., Amabile, N., Guerin, A. P., Pannier, B. et al., In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension* 2007, *49*, 902–908.
- [55] Vanholder, R., De Smet, R., Waterloos, M. A., Van Landschoot, N. et al., Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production: characterization of the role of p-cresol. *Kidney Int.* 1995, *47*, 510–517.
- [56] Caimi, G., Canino, B., Vaccaro, F., Montana, M. et al., Polymorphonuclear cytosolic Ca(2+) concentration before and after activation in chronic renal failure. *Nephron* 2000, *85*, 371–372.
- [57] Trappenburg, M. C., van Schilfgaarde, M., Frerichs, F. C., Spronk, H. M. et al., Chronic renal failure is accompanied by endothelial activation and a large increase in

microparticle numbers with reduced procoagulant capacity. Nephrol. Dial. Transplant. 2012, 27, 1446–1453.

- [58] Ando, M., Iwata, A., Ozeki, Y., Tsuchiya, K. et al., Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients. *Kidney Int.* 2002, *62*, 1757–1763.
- [59] Amabile, N., Guerin, A. P., Leroyer, A., Mallat, Z. et al., Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005, *16*, 3381–3388.
- [60] Costa, E., Rocha, S., Rocha-Pereira, P., Castro, E. et al., Changes in red blood cells membrane protein composition during hemodialysis procedure. *Ren. Fail.* 2008, *30*, 971–975.
- [61] Antonelou, M. H., Kriebardis, A. G., Velentzas, A. D., Kokkalis, A. C. et al., Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. J. Proteomics 2011, 74, 2441–2452.
- [62] Costa, E., Rocha, S., Rocha-Pereira, P., Castro, E. et al., Altered erythrocyte membrane protein composition in chronic kidney disease stage 5 patients under haemodialysis and recombinant human erythropoietin therapy. *Blood Purif.* 2008, *26*, 267–273.
- [63] Tekce, H., Kin Tekce, B., Aktas, G., Tanrisev, M., Sit, M., The evaluation of red cell distribution width in chronic hemodialysis patients. *Int. J. Nephrol.* 2014, 2014, 754370.
- [64] Sakthivel, R., Farooq, S. M., Kalaiselvi, P., Varalakshmi, P., 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* 2007, *382*, 1–7.
- [65] Ibrahim, F. F., Ghannam, M. M., Ali, F. M., Effect of dialysis on erythrocyte membrane of chronically hemodialyzed patients. *Ren. Fail.* 2002, *24*, 779–790.
- [66] Szikszai, Z., Ujhelyi, L., Imre, S. G., Effect of hemodialysis on the deformability and lipid peroxidation of erythrocytes in chronic renal failure. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2003, 28, 201–207.
- [67] Peuchant, E., Salles, C., Vallot, C., Wone, C., Jensen, R., Increase of erythrocyte resistance to hemolysis and modification of membrane lipids induced by hemodialysis. *Clin. Chim. Acta* 1988, *178*, 271–282.
- [68] Wu, S. G., Jeng, F. R., Wei, S. Y., Su, C. Z. et al., Red blood cell osmotic fragility in chronically hemodialyzed patients. *Nephron* 1998, 78, 28–32.
- [69] Saradhadevi, V., Sakthivel, R., Vedamoorthy, S., Selvam, R., Parinandi, N., Alterations in band 3 protein and anion exchange in red blood cells of renal failure patients. *Mol. Cell. Biochem.* 2005, *273*, 11–24.
- [70] Izumo, H., Izumo, S., DeLuise, M., Flier, J. S., Erythrocyte Na,K pump in uremia. Acute correction of a transport defect by hemodialysis. J. Clin. Invest. 1984, 74, 581–588.
- [71] Antonelou, M. H., Georgatzakou, H. T., Tzounakas, V. L., Velentzas, A. D. et al., Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and

cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study. *J. Proteomics* 2014, *101*, 88–101.

- [72] Hasler, C. R., Owen, G. R., Brunner, W., Reinhart, W. H., Echinocytosis induced by haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant*. 1998, *13*, 3132–3137.
- [73] Reinhart, W. H., Chien, S., Red cell rheology in stomatocyteechinocyte transformation: roles of cell geometry and cell shape. *Blood* 1986, *67*, 1110–1118.
- [74] Hashimoto, H., Mio, T., Sumino, K., Lipid abnormalities of erythrocyte membranes in hemodialysis patients with chronic renal failure. *Clin. Chim. Acta* 1996, *252*, 137–145.
- [75] Abed, M., Artunc, F., Alzoubi, K., Honisch, S. et al., Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease. J. Mol Med. (Berlin) 2014, 92, 871–879.
- [76] Wang, J., van Bentum, K., Sester, U., Kaestner, L., Calcium homeostasis in red blood cells of dialysis patients in dependence of erythropoietin treatment. *Front. Physiol.* 2014, 5, 16–19.
- [77] Richards, R. S., Wang, L., Jelinek, H., Erythrocyte oxidative damage in chronic fatigue syndrome. *Arch. Med. Res.* 2007, *38*, 94–98.
- [78] Khazim, K., Giustarini, D., Rossi, R., Verkaik, D. et al., Glutathione redox potential is low and glutathionylated and cysteinylated hemoglobin levels are elevated in maintenance hemodialysis patients. *Transl. Res.* 2013, *162*, 16–25.
- [79] Cristol, J. P., Bosc, J. Y., Badiou, S., Leblanc, M. et al., Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997, *12*, 2312–2317.
- [80] Galli, F., Rovidati, S., Benedetti, S., Buoncristiani, U. et al., Overexpression of erythrocyte glutathione S-transferase in uremia and dialysis. *Clin. Chem.* 1999, 45, 1781–1788.
- [81] Wann, J. G., Lin, C. S., Chang, L. C., Hsu, Y. H. et al., Enhanced expression of glucose transporter 1 on erythrocyte membrane in hemodialysis patients: the possible role in erythrocyte ascorbate recycling. *Am. J. Kidney Dis* 2006, 47, 1055–1063.
- [82] Alin, P., Danielson, U. H., Mannervik, B., 4-Hydroxyalk-2enals are substrates for glutathione transferase. *FEBS Lett.* 1985, *179*, 267–270.
- [83] Durak, I., Kacmaz, M., Elgun, S., Ozturk, H. S., Oxidative stress in patients with chronic renal failure: effects of hemodialysis. *Med. Princ. Pract.* 2004, *13*, 84–87.
- [84] Rusu, A., Rusu, F., Zalutchi, D., Muresan, A. et al., The influence of vitamin E supplementation on erythropoietin responsiveness in chronic hemodialysis patients with low levels of erythrocyte superoxide dismutase. *Int. Urol. Nephrol.* 2013, 45, 495–501.
- [85] Candan, F., Gultekin, F., Effect of vitamin C and zinc on osmotic fragility and lipid peroxidation in zinc-deficient haemodialysis patients. *Cell Biochem. Funct.* 2002, *20*, 95– 98.
- [86] Bonomini, M., Zammit, V., Pusey, C. D., De Vecchi, A., Arduini, A., Pharmacological use of L-carnitine in uremic anemia: has its full potential been exploited? *Pharmacol. Res.* 2011, *63*, 157–164.

- [87] Giancaspro, V., Nuzziello, M., Pallotta, G., Sacchetti, A., Petrarulo, F., Intravenous ascorbic acid in hemodialysis patients with functional iron deficiency: a clinical trial. *J. Nephrol.* 2000, *13*, 444–449.
- [88] Vota, D. M., Maltaneri, R. E., Wenker, S. D., Nesse, A. B., Vittori, D. C., Differential erythropoietin action upon cells induced to eryptosis by different agents. *Cell Biochem. Biophys.* 2013, *65*, 145–157.
- [89] Amer, J., Dana, M., Fibach, E., The antioxidant effect of erythropoietin on thalassemic blood cells. *Anemia* 2010, 2010, 978710.
- [90] Mihov, D., Vogel, J., Gassmann, M., Bogdanova, A., Erythropoietin activates nitric oxide synthase in murine erythrocytes. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2009, 297, C378– C388.
- [91] Chan, D., Irish, A., Croft, K. D., Dogra, G., Effect of ascorbic acid supplementation on plasma isoprostanes in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, *21*, 234–235.
- [92] Fumeron, C., Nguyen-Khoa, T., Saltiel, C., Kebede, M. et al., Effects of oral vitamin C supplementation on oxidative stress and inflammation status in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005, *20*, 1874–1879.
- [93] Hirayama, A., Nagase, S., Gotoh, M., Takemura, K. et al., Hemodialysis does not influence the peroxidative state already present in uremia. *Nephron* 2000, *86*, 436–440.
- [94] Ruskovska, T., Bennett, S. J., Brown, C. R., Dimitrov, S. et al., Ankyrin is the major oxidised protein in erythrocyte membranes from end-stage renal disease patients on chronic haemodialysis and oxidation is decreased by dialysis and vitamin C supplementation. *Free Radic. Res.* 2015, 49, 175– 185.
- [95] Maduell, F., Fernandez, J., Diez, J., Alterations of the Cl-/NaCO3- anion exchanger in erythrocytes of uraemic patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1990, *5*, 1018–1022.
- [96] Alvarez-Llamas, G., Zubiri, I., Maroto, A. S., de la Cuesta, F. et al., A role for the membrane proteome in human chronic kidney disease erythrocytes. *Transl. Res.* 2012, *160*, 374– 383.
- [97] Bonomini, M., Sirolli, V., Settefrati, N., Dottori, S. et al., Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in chronic renal failure. J. Am. Soc. Nephrol. 1999, 10, 1982– 1990.
- [98] Khan, A. A., Hanada, T., Mohseni, M., Jeong, J. J. et al., Dematin and adducin provide a novel link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 14600–14609.
- [99] Boado, R. J., Pardridge, W. M., Glucose deprivation and hypoxia increase the expression of the GLUT1 glucose transporter via a specific mRNA cis-acting regulatory element. *J. Neurochem.* 2002, *80*, 552–554.
- [100] Bosman, G. J., Lasonder, E., Groenen-Dopp, Y. A., Willekens, F. L., Werre, J. M., The proteome of erythrocytederived microparticles from plasma: new clues for erythrocyte aging and vesiculation. *J. Proteomics* 2012, *76*, 203– 210.

- [101] Lindner, A., Gagne, E. R., Zingraff, J., Jungers, P. et al., A circulating inhibitor of the RBC membrane calcium pump in chronic renal failure. *Kidney Int*. 1992, 42, 1328–1335.
- [102] Gafter, U., Malachi, T., Barak, H., Djaldetti, M., Levi, J., Red blood cell calcium homeostasis in patients with end-stage renal disease. J. Lab Clin. Med. 1989, 114, 222–231.
- [103] Soldati, L., Adamo, D., Zerbi, S., Caumo, A. et al., Erythrocyte voltage-dependent calcium influx is reduced in hemodialyzed patients. *Kidney Int*. 1999, *56*, 190–197.
- [104] Polak-Jonkisz, D., Purzyc, L., Zwolinska, D., Ca(2+)-Mg (2+)dependent ATP-ase activity in hemodialyzed children. Effect of a hemodialysis session. *Pediatr. Nephrol.* 2010, *25*, 2501– 2507.
- [105] Bogdanova, A., Makhro, A., Wang, J., Lipp, P., Kaestner, L., Calcium in red blood cells-a perilous balance. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, *14*, 9848–9872.
- [106] Lang, F., Qadri, S. M., Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif.* 2012, *33*, 125–130.
- [107] Ahmed, M. S., Langer, H., Abed, M., Voelkl, J., Lang, F., The uremic toxin acrolein promotes suicidal erythrocyte death. *Kidney Blood Press. Res.* 2013, *37*, 158–167.
- [108] Myssina, S., Huber, S. M., Birka, C., Lang, P. A. et al., Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. J. Am. Soc. Nephrol. 2003, 14, 2750–2757.
- [109] Boas, F. E., Forman, L., Beutler, E., Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1998, *95*, 3077–3081.
- [110] Bonomini, M., Sirolli, V., Merciaro, G., Antidormi, T. et al., Red blood cells may contribute to hypercoagulability in uraemia via enhanced surface exposure of phosphatidylserine. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005, *20*, 361– 366.
- [111] Pandolfi, A., Di Pietro, N., Sirolli, V., Giardinelli, A. et al., Mechanisms of uremic erythrocyte-induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 2007, *213*, 699–709.
- [112] Babitt, J. L., Lin, H. Y., Mechanisms of anemia in CKD. J. Am. Soc. Nephrol. 2012, 23, 1631–1634.
- [113] Jurkovitz, C. T., Abramson, J. L., Vaccarino, L. V., Weintraub, W. S., McClellan, W. M., Association of high serum creatinine and anemia increases the risk of coronary events: results from the prospective community-based atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. J. Am. Soc. Nephrol. 2003, 14, 2919–2925.
- [114] Agarwal, R., Individualizing decision-making-resurrecting the doctor-patient relationship in the anemia debate. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2010, *5*, 1340–1346.
- [115] Zhao, Y. Y., Vaziri, N. D., Lin, R. C., Lipidomics: new insight into kidney disease. Adv. Clin. Chem. 2015, 68, 153–175.
- [116] Ortiz, A., Massy, Z. A., Fliser, D., Lindholm, B. et al., Clinical usefulness of novel prognostic biomarkers in patients on hemodialysis. *Nat. Rev. Nephrol.* 2012, *8*, 141–150.
- [117] Rhee, E. P., Souza, A., Farrell, L., Pollak, M. R. et al., Metabolite profiling identifies markers of uremia. J. Am. Soc. Nephrol. 2010, 21, 1041–1051.

789

- [118] Sato, E., Kohno, M., Yamamoto, M., Fujisawa, T. et al., Metabolomic analysis of human plasma from haemodialysis patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 2011, *41*, 241–255.
- [119] Atzler, D., Schwedhelm, E., Zeller, T., Integrated genomics and metabolomics in nephrology. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2014, 29, 1467–1474.
- [120] Kwan, B. C., Kronenberg, F., Beddhu, S., Cheung, A. K., Lipoprotein metabolism and lipid management in chronic kidney disease. J. Am. Soc. Nephrol. 2007, 18, 1246–1261.
- [121] Toyohara, T., Akiyama, Y., Suzuki, T., Takeuchi, Y. et al., Metabolomic profiling of uremic solutes in CKD patients. *Hypertens. Res.* 2010, *33*, 944–952.
- [122] Zhao, Y. Y., Metabolomics in chronic kidney disease. Clin. Chim. Acta 2013, 422, 59–69.
- [123] Luczak, M., Formanowicz, D., Pawliczak, E., Wanic-Kossowska, M. et al., Chronic kidney disease-related atherosclerosis - proteomic studies of blood plasma. *Proteome Sci.* 2011, *9*, 25–36.
- [124] Luczak, M., Formanowicz, D., Marczak, L., Pawliczak, E. et al., Deeper insight into chronic kidney disease-related atherosclerosis: comparative proteomic studies of blood plasma using 2DE and mass spectrometry. *J. Transl. Med.* 2015, *13*, 20–37.
- [125] Walkowiak, B., Sobol, A. B., Walczynska, M., Kaminska, M., Effect of uremia and hemodialysis on proteome profile of blood platelets and plasma. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2013, *19*, 541–549.
- [126] Reis, A., Rudnitskaya, A., Chariyavilaskul, P., Dhaun, N. et al., Top-down lipidomics of low density lipoprotein reveal altered lipid profiles in advanced chronic kidney disease. J. Lipid Res. 2015, 56, 413–422.
- [127] Barany, P., Divino Filho, J. C., Bergstrom, J., High C-reactive protein is a strong predictor of resistance to erythropoietin in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 1997, *29*, 565– 568.
- [128] Bellinghieri, G., Condemi, C. G., Saitta, S., Trifiro, G. et al., Erythropoiesis-stimulating agents: dose and mortality risk. J. Ren. Nutr. 2015, 25, 164–168.
- [129] Kalantar-Zadeh, K., Rodriguez, R. A., Humphreys, M. H., Association between serum ferritin and measures of inflammation, nutrition and iron in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004, 19, 141–149.
- [130] Kalantar-Zadeh, K., McAllister, C. J., Lehn, R. S., Lee, G. H. et al., Effect of malnutrition-inflammation complex syndrome on EPO hyporesponsiveness in maintenance hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 2003, *42*, 761– 773.
- [131] Leavey, S. F., Strawderman, R. L., Young, E. W., Saran, R. et al., Cross-sectional and longitudinal predictors of serum albumin in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2000, *58*, 2119–2128.
- [132] Gallucci, M. T., Lubrano, R., Meloni, C., Morosetti, M. et al., Red blood cell membrane lipid peroxidation and resistance to erythropoietin therapy in hemodialysis patients. *Clin. Nephrol.* 1999, *52*, 239–245.

- 790 H. T. Georgatzakou et al.
- [133] Lim, P. S., Wei, Y. H., Yu, Y. L., Kho, B., Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol. Dial. Transplant*. 1999, *14*, 2680–2687.
- [134] Roehrs, M., Valentini, J., Paniz, C., Moro, A. et al., The relationships between exogenous and endogenous antioxidants with the lipid profile and oxidative damage in hemodialysis patients. *BMC Nephrol.* 2011, *12*, 59–67.
- [135] Beberashvili, I., Sinuani, I., Azar, A., Shapiro, G. et al., Serum uric acid as a clinically useful nutritional marker

and predictor of outcome in maintenance hemodialysis patients. *Nutrition* 2015, *31*, 138–147.

- [136] Martos, M. R., Hendry, B. M., Rodriguez-Puyol, M., Dwight, J. et al., Haemodialyser biocompatibility and erythrocyte structure and function. *Clin. Chim. Acta* 1997, *265*, 235–246.
- [137] Buemi, M., Floccari, F., Di Pasquale, G., Cutroneo, G. et al., AQP1 in red blood cells of uremic patients during hemodialytic treatment. *Nephron* 2002, *92*, 846–852.

JOURNAL OF PROTEOMICS XX (2014) XXX-XXX



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect



www.elsevier.com/locate/jprot

Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study

Marianna H. Antonelou^{a,1}, Hara T. Georgatzakou^{a,1}, Vasillis L. Tzounakas^a,
 Athanassios D. Velentzas^a, Apostolos C. Kokkalis^b, Anastasios G. Kriebardis^c,

6 Issidora S. Papassideri^{a,*}

⁷ ^aDepartment of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, NKUA, Greece

⁸ ^bChronic Hemodialysis Centre "Ionion", Piraeus, Greece

9 ^cLaboratory of Hematology and Transfusion Medicine, Department of Medical Laboratories, Faculty of Health and Caring Professions,

10 Technological and Educational Institute of Athens, Greece

13 A R T I C L E I N F O

19 Article history:

20 Received 12 December 2013

21 Accepted 4 February 2014

28

11

- 23 45 Keywords:
- <u>44</u> Keywords:<u>46</u> End stage renal disease
- 46 Cardiovascular mortality
- 48 Red blood cell
- 48 Membrane proteins
- 59 Protein carbonylation
- 56 Oxidative stress
- 52
- 32
- 33

34

35

36

ABSTRACT

Chronic kidney disease is a risk factor for cardiovascular mortality. This study uncovers pieces of hematological and erythrocyte protein variability observed in end stage renal disease (ESRD) in relation to disease progression/duration and mortality. Using a variety of experimental approaches, erythropoietin/dialysis-treated patients were compared to healthy individuals and had been followed for 36 months. During that period, half of the patients died from cardiovascular diseases. The high levels of uremic toxins in those patients were associated with damaged erythrocytes, bad tolerance and poor response to hemodialysis therapy. The postmortem study revealed significant variation in alkaline phosphatase, duration of dialysis, erythrocyte transformation and intracellular hemoglobin concentration compared to the survived patients. The erythrocyte proteins showed substantial remodeling characteristic of pathologic regulation of cell hydration and susceptibility to the dialysis-induced oxidation defects. According to the follow-up study, duration of hemodialysis was associated with a trend towards increased intracellular hemoglobin concentration, membrane expression of glucose transporter-1 and stomatin as well as lower levels of circulating stomatocytes. The uremic index variation in long survived patients is accurately reflected in plasma and erythrocyte oxidative stress modifications. The ESRD patients exhibit impressive compensatory responses to the chronic challenges of the uremic milieu.

Abbreviations: ALP, alkaline phosphatase; aquaporin 1, Aqp1; DHA, dehydroascorbic acid; Epo, erythropoietin; ESRD, end stage renal disease; FRAP, ferric reducing ability of plasma (or antioxidant power); Hb, hemoglobin; HCT, hematocrit; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; γGT, gamma-glutamyltransferase; GLUT1, glucose transporter 1; MCH, mean cell Hb; MCHC, mean cell Hb concentration; MCV, mean cell volume; PCI, Proteome Carbonylation Index; Prx2, peroxiredoxin 2; RBCs, red blood cells; RDW, red cell distribution width; SGOT, serum glutamate-oxaloacetate transaminase; SGPT, serum glutamate-pyruvate transaminase; TAC, Total Antioxidant Capacity.

* Corresponding author at: Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, NKUA, Panepistimiopolis, Athens 15784, Greece. Fax: +30 210 7274742.

E-mail address: ipapasid@biol.uoa.gr (I.S. Papassideri).

¹ Equal authors.

http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.009 1874-3919/© 2014 Published by Elsevier B.V.

37

38

39

40

41

42 43

44

 $\frac{54}{56}$

ARTICLE IN PRESS

JOURNAL OF PROTEOMICS XX (2014) XXX-XXX

Biological significance

This study demonstrates novel blood modifications probably associated with the duration of erythropoietin/hemodialysis treatment, disease progression and cardiovascular mortality in end stage renal disease. The observed variability adds new pieces to the erythrocyte pathophysiology puzzle in end stage renal disease and suggests novel hematologic and proteomic factors for consideration in future large scale studies on cardiovascular morbidity and mortality candidate biomarkers in uremic patients.

© 2014 Published by Elsevier B.V.

123

124

58 **1. Introduction**

59 The uremic syndrome is related to a complex set of pathophysiological disturbances resulting in increased mor-60 bidity and mortality rate. The major cause of death in all 61 forms of chronic kidney disease including the end stage renal 62 disease (ESRD) on hemodialysis (HD) [1] is cardiovascular 63 diseases. The high risk of cardiovascular morbidity and 64 mortality in these patients is attributed to a complex interplay 65 of traditional (e.g. age, dyslipidemia, hypertension, and 66 diabetes mellitus) and novel or uremia-specific cardiovascular 67 risk factors, including uremic toxins, uremic bone disease, 68 disturbed calcium-phosphate metabolism [2], inflammation 69 [3], endothelium dysfunction [4], oxidative stress [5] and 70anemia [6]. At the advanced stage of the disease, retention of 71 uremic toxins, metabolic alterations and HD may further 7273 contribute to the high risk of mortality.

74 Anemia in ESRD is the consequence of reduced red blood 75 cell survival and functional erythropoietin (Epo) deficiency. 76 Erythrocytes in hemodialysis patients undergo shear stress 77 generated during blood flow through the dialyzer and 78 peristaltic pumps and metabolic stress caused by the unfavorable plasma environment that is characterized by metab-79 olite accumulation and loss of glucose [7]. The ESRD further 80 represents a high pro-oxidant activity disease due to contrib-81 uting factors like advanced age, chronic inflammation and 82 dialysis material biocompatibility issues [6]. More specifically, 83 erythrocytes are subjected to enhanced oxidative stress as a 84 result of reduced cellular and plasma anti-oxidant factors and 85 inadequate glutathione-defense system. Although hemodial-86 ysis partially improves the endogenous ROS levels, the 87 glutathione antioxidant system as well as the RBC membrane 88 protein defects [8], it has been associated with oxidation of 89 plasma ascorbic to dehydroascorbic acid [9] and aggravation 90 91 of protein carbonylation [10,11].

92Prognosis, risk stratification and monitoring the effects of 93 treatment are fundamental elements in the clinical handling and therapy guidance of uremic patients. A variety of blood 94 biochemical risk markers have been consistently linked to 95cardiovascular disease and reduced survival in patients on 96 dialysis [12,13]. However, biomarker identification in this 97 group of patients has been proven to be a difficult task in 98 that well-known associations between established risk factors 99 100 in the general population do not exist or appeared reversed in 101 ESRD [13], while some of the novel risk factors for cardiovas-102 cular disease seem to play a more important role for morbidity and mortality in uremic patients than in the 103 general population [13-15]. Based on these peculiarities, a 104 multi-marker approach reinforced by additional proteomic 105 tools have been strongly proposed in renal disease biomarker 106

area, as a safe way to refine prognosis in patients on HD, after 107 their full-scale evaluation in large longitudinal studies and 108 clinical trials [15]. 109

It has recently been shown that the RBCs of non-diabetic 110 ESRD patients on HD show substantial membrane remodeling 111 and overexpression of cellular stress and senescence markers 112 [8]. In the present follow-up study, we re-examined the same 113 group of patients three years later in order to retrace blood 114 modifications probably associated with the duration of HD 115 and the progression of the disease, compared to healthy 116 controls studied for the same period. Furthermore, and since 117 half of the patients passed away in the meanwhile by **Q4** cardiovascular diseases, we retrospectively assess a series of 119 blood and erythrocyte factors as novel candidate markers of 120 increased cardiovascular mortality in ESRD patients. 121

2. Materials and methods

2.1. Material supplies

Antibodies against band 3, actin, spectrin and human IgGs 125 as well as HRP-conjugated secondary antibodies and all 126 chemicals (unless otherwise stated) were obtained from 127 Sigma-Aldrich (Munich, Germany). Electron microscopy 128 grade glutaraldehyde solution was from Serva (Heidelberg, 129 Germany). Antibodies against hemoglobin (Hb) and flotillin-2 130 were from Europa Bioproducts (UK) and BD Transduction 131 Laboratories (CA, USA), respectively. Primary antibodies 132 against CD47, HSP70, calpain-1 (μ -calpain), clusterin- α (secre- 133 tory Apolipoprotein J) and band 3 were from Santa Cruz ${\scriptstyle 134}$ Biotechnology (CA, USA). Antibodies against peroxiredoxin 2 135 (Prx2), adducin alpha and glucose transporter 1 (GLUT1) were 136 from Acris GmbH (Herford, Germany). The Oxyblot® detection 137 kit was obtained from Millipore (Temecula, CA) and 5-(and-6) 138 chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, acetyl 139 ester (CMH₂DCFDA) was from Invitrogen, Molecular Probes 140 (Eugene, OR). HRP-conjugated antibodies to rabbit IgGs and 141 ECL Western blot detection kit were from GE Healthcare 142 (Buckinghamshire, UK). HRP-conjugated antibodies to mouse 143 IgGs were from DakoCytomation (Glostrup, Denmark). Brad- 144 ford protein assay was obtained from Bio-Rad (Hercules, CA). 145 Antibodies against aquaporin 1 (Aqp1) and glyceraldehyde 146 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were obtained from 147 Cell Signaling Technology (Beverly, MA) and Abnova, respective- 148 ly. Western lighting Plus ECL was from Perkin Elmer (CA, USA). 149 mAb against stomatin and antiserum against protein 4.1R and $\,150$ pallidin (band 4.2) were kindly provided by Prof. R. Prohaska 151 (Institute of Medical Biochemistry, University of Vienna, 152 Austria) and Prof. J. Delaunay (Laboratoire d'Hématologie, 153

JOURNAL OF PROTEOMICS XX (2014) XXX-XXX

210

154 d'Immunologie et de Cytogénétique, Hopital de Bicetre, Le155 Kremlin-Bicetre, France), respectively.

156 2.2. Study planning and subjects

The demographic characteristics as well as the hematological 157and serum biochemical profiles of healthy controls (n = 12)158and ESRD patients on HD (n = 12) studied in 2009, have 159160 previously been reported [8]. Briefly, the patients were on Epo treatment and standard HD therapy (thrice a week) with 161 highly biocompatible polyarylethersulfone (n = 6) or acryloni-162trile (n = 6) synthetic dialyzers (Gambro-Hospal Ltd). They had 163 no diabetes mellitus, autoimmune diseases, malignancies, 164 infections and hematological disorders but they were all 165clinically stable at the time of investigation. For the 166 follow-up study, the same groups of patients and healthy 167 controls were invited for re-evaluation 3 years after the initial 168 examination (2009-2012). Unfortunately, six of the patients 169had passed away (by cardiovascular diseases and acute 170thrombotic events) while two of the healthy controls did not 171 renew their consent to take part in the investigation. As a 172result, blood samples were collected from the ten healthy 173 subjects (n = 10) as well as from the six uremic patients that 174 175were alive during 2012 (n = 6). During the precedent three year period there was no significant change in Epo medication 176 177 (Darbepoetin, EpoA or Epo B) or dialysis filters (synthetic, 178 highly biocompatible filters of polyarylethersulfone, acryloni-179trile or polyamide type). For the postmortem observational study, the ESRD patients were classified for comparative 180 re-examination on the basis of their survival in subgroups A 181 and B: Group A consisted of those who passed away while 182 Group B consisted of those who were alive during 2012. The 183 hematological, serum biochemical, cell morphology and the 184 majority of the protein expression data represent those 185originally collected in 2009, currently being classified and 186 re-evaluated a posteriori, following the survival criterion 187 (Groups A and B). However, additional analyses have been 188 performed on the appropriately stored blood plasma and 189 membrane extraction samples (e.g. immunoblots for adducin 190 and GLUT-1, as well as the FRAP assay) in all patients and 191 healthy subjects originally studied in 2009. The study was 192 193 conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the Research Bioethics 194and BioSecure Committee of the Faculty of Biology/University 195of Athens. All of the donors gave their written informed 196 197 consent before their participation in this study.

198 2.3. Hematological and biochemical analysis

Blood samples were collected in EDTA anticoagulant before, 199 20020 min after the start and immediately after the completion of the HD session. Red blood cell (RBC) count, hematocrit (HCT), 201 Hb concentration and RBC indexes (mean cell volume, MCV; 202mean cell Hb, MCH; mean cell Hb concentration, MCHC; RBC 203204 distribution width, RDW) were measured by using an automatic blood cell counter (Sysmex K-4500, Roche). Standard 205biochemical tests in the serum (urea, creatinine, etc.) were 206 performed using an automatic analyzer (Hitachi 902, Roche). 207Electrolyte estimation was performed with the electrolyte 208 analyzer 9180 (Roche). 209

2.4. Total Antioxidant Capacity (TAC) of plasma

The measure of Total Antioxidant Capacity (TAC) considers 211 the cumulative and synergistic action of all the antioxidants 212 present in plasma, thus providing an integrated parameter of 213 known and unknown antioxidants, as well as insight into the 214 oxidant/antioxidant balance present in vivo. Freshly isolated 215 and/or stored plasma samples were used from all ESRD 216 patients and standard controls. TAC of plasma was measured 217 by the ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay as 218 previously described [16]. Briefly, 40 µl plasma was mixed 219 with working FRAP solution and samples were incubated at 220 37 °C. Working FRAP solution was freshly prepared by mixing 221 acetate buffer (pH 3.6, 300 mmol/l), 2,4,6-tripyridyl-s-triazine 222 (TPTZ, 10 mmol/l) in HCl (40 mmol/l) and FeCl₃ (20 mmol/l). 223 After 4 min, absorbance was measured at 593 nm versus 224 blank, containing only working FRAP solution. Ascorbic acid 225 standards (100 µM-1000 µM) were tested in parallel. To 226 determine the uric acid-independent antioxidant capacity, 227 the plasma aliquots were treated with 0.005 U uricase and 228 processed as mentioned above [17]. 229

2.5. Determination of intracellular ROS by fluorometry 230

ROS accumulation in RBCs was detected with the membrane 231 permeable, non-fluorescent and redox-sensitive dye 5-(and-6)- 232 chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl 233 ester (CMH₂DCFDA) according to the manufacturer's guidelines 234 with minor modifications, as previously reported [18]. More 235 specifically, leukocyte-depleted (by cellulose columns, see 236 below) and thoroughly washed RBCs (in triplets) were loaded 237 with 5 µM CM-H₂DCFDA for 30 min at 25 °C. The production of 238 fluorescent dichlorofluorescein (DCF) was measured using the 239 VersaFluor™ Fluorometer System from Bio-Rad at an excitation 240 wavelength of 490 nm and an emission wavelength of 520 nm. 241 The intensity records were normalized to the RBC protein 242 level and finally to the corresponding control values (healthy 243 subjects, 100%). 244

2.6. RBC membrane total protein and protein carbonyl analysis 245

RBCs were isolated by the method of Beutler [19]. Purified 246 RBC lysis was performed with hypotonic (5 mmol/l) sodi- 247 um phosphate buffer (pH 8.0) containing a cocktail of 248 protease inhibitors. Membrane fractions were prepared as 249 previously described [20] and total protein concentration 250 of the membrane fractions was determined using the 251 Bradford protein assay with BSA as a standard. Equal 252 amount (12-25 µg) of RBC total membrane protein was 253 loaded in Laemmli gels, transferred to nitrocellulose mem- 254 branes electrophoretically and probed with primary and HRP- 255 conjugated secondary antibodies. Immunoblots were devel- 256 oped using an ECL reagent kit and the relative amount of each 257 protein was quantified by scanning densitometry. For the 258 protein carbonylation analysis, purified RBC plasma mem- 259 brane proteins were processed for the detection of carbonyl 260 groups, using the OxyBlot detection kit as per manufacturer's 261 specifications. For quantification purposes, the Proteome 262 Carbonylation Index (PCI) was calculated as previously 263 described [8]. 264

4

ARTICLE IN PRESS

265 2.7. Scanning electron microscopy

For the analysis of RBCs' morphology with a scanning electron 266 microscope, purified RBCs were fixed with 2% glutaraldehyde 267and post-fixed with 1% osmium tetroxide in 0.1 mmol/l 268sodium cacodylate buffer, pH 7.4. Fixed cells were successive-269ly dehydrated in ascending ethanol series and allowed to 270271settle on standard microscopic cover glasses. Finally, RBCs 272were coated with gold-palladium (Tousimis Samsputter-2a, Rockville, Maryland) before being examined in a microscope 273(Philips SEM515). 274

275 2.8. Scanning densitometry and statistical analysis

Presented experiments have been repeated at least two times, 276unless otherwise stated. Data points correspond to the mean 277value; error bars denote SD. Quantitation of gels and immuno-278blots was performed by lengthwise scanning densitometry 279280using an image-processing program (Gel Analyzer v.1.0, Biosure, Athens, Greece). The electrophoretic protein bands were quanti-281fied in units of intensity, and the relative amount of each band 282was given as a percentage of total. Reference antibodies against 283 ro ucod ac int al loadi

immunoblots. Individual relative protein levels were quantified 285 as a ratio against reference band(s) or percentage of total 286 immunoblotting bands per patient. This relative proportion, 287 further normalized to the controls data (relative % of healthy 288 subjects, Table 2), or to the relative protein expression deter- 289 mined in 2009 analysis of the same samples (100%), is presented 290 in the tables. For statistical analysis the MS Excel and the 291 Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS; version 19.0 for 292 Windows; administrated by NKUA) were used. Significance was 293 evaluated using the one-way ANOVA. Clinical and hematological 294 quantitative variable comparisons between groups of subjects 295 were performed by the independent t-test or the chi-squared test. 296 Significance was accepted at p < 0.05.

3. Results

3.1. Post-mortem study: blood and RBC protein diversification 300 between the patient groups 301

298

The hematological and serum biochemical profiles of de- $_{302}$ ceased (before 2012, Group A) and alive (to 2012, Group B) $_{303}$ ESRD patients are presented in Table 1. According to that $_{304}$

142.2 ± 3.1 73.2 ± 56.1

9.46 ± 0.21

 3.54 ± 1.11

3.75 ± 0.22

 22.3 ± 2.1

 25.8 ± 11.0

 12.9 ± 2.5

82.3 ± 35.8

62.2 ± 25.6

0.013

0.049

$^{3}_{4}$		Group A	Group B	Controls	p < 0.05
5		(n = 6)	(n = 6)	(n = 12)	A vs. B
6	Age (years)	72.2 ± 9.9	59.2 ± 13.9	45.0 ± 11.5	
7	Gender (M/F)	4/2	4/2	7/5	
3	Time on HD (months)	40.8 ± 6.6	24.0 ± 9.2	-	0.029
)	WBCs (×10 ⁹ /l)	6.72 ± 1.49	7.7 ± 3.3	5.78 ± 1.34	
10	RBCs (×10 ⁶ /µl)	4.2 ± 1.2	3.9 ± 0.3	4.6 ± 0.8	
1	Hb (gr/dl)	13.2 ± 2.9	11.1 ± 1.8	12.6 ± 1.0	
2	Hct (%)	39.6 ± 8.5	35.1 ± 4.8	38.9 ± 2.4	
3	MCV (fl)	97.2 ± 7.5	89.2 ± 6.8	88.9 ± 3.5	0.049
4	MCH (pg)	32.3 ± 2.6	28.2 ± 3.0	29.18 ± 1.46	0.042
5	MCHC (gr/dl)	33.2 ± 0.8	31.6 ± 1.2	32.8 ± 0.8	0.021
6	RDW-CV (%)	15.9 ± 0.6	16.5 ± 0.8	13.41 ± 0.39	
.7	PLTs (×10 ³ /µl)	205.0 ± 54.5	249.8 ± 78.6	258.2 ± 23.5	
8	Glucose (mgr/dl)	87.0 ± 7.9	100.0 ± 15.9	85.2 ± 5.8	
19	Urea (mg/dl)	195.6 ± 63.3	154.6 ± 27.9	29.11 ± 3.45	
20	Urea (mg/dl) post-HD	67.8 ± 28.4	55.0 ± 15.1	-	
21	Creatinine (mgr/dl)	12.83 ± 2.24	9.34 ± 2.64	0.74 ± 0.21	0.049
2	Creatinine (mg/dl) post-HD	3.56 ± 0.37	3.18 ± 1.29	-	
3	Cholesterol (mg/dl)	130.0 ± 25.2	169.0 ± 38.8	138.34 ± 19.56	
4	Uric acid (mg/dl)	6.06 ± 1.45	6.93 ± 1.49	4.64 ± 1.26	
5	Triglycerides (mg/dl)	174.6 ± 86.2	232.6 ± 76.0	150.3 ± 34.9	
6	Potassium (mEq/l)	5.54 ± 1.53	5.38 ± 0.96	4.32 ± 0.36	
27	Potassium (mEq/l) post-HD	4.32 ± 0.98	3.78 ± 0.19	-	

 142.0 ± 2.8

52.7 ± 9.2

 9.13 ± 0.13

 4.60 ± 0.45

 4.30 ± 0.29

 49.0 ± 20.8

 30.0 ± 11.1

 22.8 ± 2.3

117.5 ± 36.9

155.0 ± 38.2

t1.38 2009 measurements. Results are presented as mean \pm SD.

t1.49 Bold: pathologic values.

Amylase (IU/l)

Sodium (mEq/l)

Calcium (mg/dl)

Albumin (g/dl)

Phosphorus (mg/dl)

Iron (µg/dl)

SGOT (IU/l)

SGPT (IU/l)

γ-GT (IU/l)

ALP (IU/l)

t1.28

t1.29

t1.30

t1.31

t1.32

t1.33

t1.34

t1.35

t1.36 t1.37

Please cite this article as: Antonelou MH., et al, Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study, J Prot (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.009

 138.8 ± 3.4

55.3 ± 14.8

 9.35 ± 0.29

6.94 ± 3.20

 4.03 ± 0.24

 19.8 ± 6.5

19.8 ± 7.5

 19.8 ± 7.3

66.0 ± 29.0

 107.0 ± 40.1

JOURNAL OF PROTEOMICS XX (2014) XXX-XXX



Fig. 1 – Representative scanning electron microscopy micrographs showing the degree of irreversible transformation (arrows) of pre-HD erythrocytes collected in 2009 from Group A (A) and B (B) patients. Scale bars, 10 µm.

classification of 2009 data, the Group A of ESRD patients was 305 characterized by statistically longer mean duration on HD 306 therapy and increased levels (p < 0.05) of RBC indexes (either 307 above or within the normal range, however, in most of the 308 cases), related to both cellular volume (MCV) and intracellular 309 Hb concentration (MCH and MCHC). Unlike Group B patients, 310 Group A ones were not anemic but exhibited higher pre-311 dialysis levels of creatinine. The liver damage biomarkers 312 serum glutamate-oxaloacetate transaminase (SGOT) and 313 alkaline phosphatase (ALP) were also statistically different 314 315 between the two groups, although ALP values in some 316 patients varied within the normal range.

At the cellular morphology level, SEM analysis of the predialysis collected RBCs had previously revealed severe variations from normal discocyte shape towards intent anisocytosis and poikilocytosis [8]. Following the well established criteria for the classification of reversible and irreversible transformations of circulating RBCs detected by electron microscopy [21,22], we retrospectively found that the spherocytic modifications of RBCs (spherocytes, spheroechinocytes and spherostomatocytes) 324 along with those associated with mainly degenerative shapes 325 (dacryocytes, ovalocytes, elliptocytes, schistocytes etc.) were 326 more frequently met in the peripheral blood of Group A patients 327 compared to the Group B ones $(3.5 \pm 1.2\% \text{ vs}. 1.9 \pm 0.3\%, 328$ respectively, p < 0.05, Fig. 1). The percentage of irreversibly 329 transformed RBCs in the control group of healthy subjects 330 collected at the same period (2009) was $0.9 \pm 0.3\%$ (data 331 not shown). 332

Since the hematological and morphological examination 333 revealed subtle but significant variation of probable diag-334 nostic value between the two subgroups, it was therefore 335 questioned whether there was a similar variation at the RBC 336 membrane protein level with respect to the HD procedure. 337 Although usually pathologically affected compared to the 338 healthy controls (100% of expression), similar membrane 339 expression of stomatin, actin, HSP70, ubiquitinylated compo-340 nents, spectrin–Hb complex and membrane bound Hb and IgGs 341 was observed between Group A and B patients (data not shown). 342

t2.1 Table 2 – Summary of the differentially expressed proteins in the membrane of ESRD patients Group A and B erythrocytes t2.2 with respect to the HD session.

$^{+2.3}_{\pm2.4}$		(Group A $(n = 6)$			Group B (n = 6)	Controls (n = 12)
t2.5		Pro	20 min	Post	Pro	20 min	Post	
t2.6	a-Adducin	84 ± 11	94 ± 10 [*]	90 ± 10	72 ± 15	78 ± 12	79 ± 12	100 ± 8
t2.7	Aberrant bands ^a	135 ± 17	$131 \pm 23^{*}$	$124 \pm 20^{*}$	121 ± 21	112 ± 17	106 ± 14	100 ± 7
t2.8	Aquaporin-1	$171 \pm 22^{*}$	$171 \pm 36^{*}$	111 ± 20	141 ± 20	107 ± 19	120 ± 25	100 ± 17
t2.9	Band 3	86 ± 17 [*]	$82 \pm 10^{*}$	83 ± 17	95 ± 26	94 ± 28	88 ± 26	100 ± 7
t2.10	Band 8 ^a	$186 \pm 27^{*}$	$182 \pm 19^{*}$	160 ± 19	154 ± 12	127 ± 16	156 ± 12	100 ± 26
t2.11	Calpain 1	203 ± 15	$203 \pm 18^{*}$	$237 \pm 25^{*}$	186 ± 35	169 ± 27	169 ± 25	100 ± 19
t2.12	CD47	90 ± 22	52 \pm 13 [*]	56 ± 18	78 ± 22	82 ± 23	67 ± 17	100 ± 20
t2.13	GAPDH	99 ± 16 [*]	$105 \pm 12^{*}$	$90 \pm 12^{*}$	44 ± 11	45 ± 14	36 ± 15	100 ± 12
t2.14	GLUT1	$75 \pm 12^*$	$102 \pm 9^{*}$	72 ± 14	51 ± 12	65 ± 9	49 ± 12	100 ± 9
t2.15	Pallidin (band 4.2)	$65 \pm 13^{*}$	$65 \pm 9^*$	$51 \pm 12^{*}$	101 ± 12	101 ± 17	87 ± 14	100 ± 15
t2.16	Prx2	266 ± 22	$319 \pm 15^{*}$	$436 \pm 25^{*}$	277 ± 27	362 ± 34	372 ± 40	100 ± 18
t2.17	Clusterin	$74 \pm 17^{*^{*}}$	$70 \pm 20^{*}$	66 ± 21	56 ± 21	54 ± 20	63 ± 16	100 ± 19
t2.18	Spectrin 150 kDa	$149 \pm 22^{*^{*}}$	117 ± 10	$135 \pm 18^{*}$	110 ± 15	99 ± 18	99 ± 19	100 ± 11
t2.19	Spectrin 120 kDa	$177 \pm 27^{*}$	$142 \pm 21^{*}$	$142 \pm 16^{*}$	106 ± 14	115 ± 16	97 ± 19	100 ± 16

t2.20 Immunoblotting densitometry results (in the majority of them). Data represent averaged (n = 6 or n = 12) relative membrane protein t2.21 expression \pm SD after normalization to the controls (100% of expression).

t2.23 Bold: p < 0.05 ESRD patients vs. controls.

t2.24 * p < 0.05 Group A vs. Group B.

t2.26 ^a SDS-PAGE densitometry data.

6

ARTICLE IN PRESS

On the opposite, the expression of the proteins shown 343 in Table 2 was significantly different in Group A compared 344 to the Group B patients. Without exception, in the 2009 345 samplings only the Group A RBC membranes were deficient 346 in band 3 and pallidin proteins contained fragmented 347 spectrin (fragments with molecular weight of 150 kDa and 348 120 kDa) and normal amount or minimally affected GAPDH 349 and alpha-adducin proteins (Table 2 and Fig. 2). Moreover, the 350 351 same samples were characterized by excess of Aqp1, band 8, 352calpain 1 and peroxiredoxin 2 (Prx2) proteins compared to the Group B membranes, before, during and/or after the HD 353 procedure (Table 2). The RBC membranes of all ESRD patients, 354especially of Group B ones (p < 0.05), were further deficient in 355 glucose transporter 1 (GLUT1) and clusterin proteins. Soon 356 after the completion of the HD session, Group A erythrocytes 357 contained electrophoretically and immunologically detected 358 aberrant bands, and increased membrane binding of calpain 05 and severe loss of CD47 marker of itself, compared to the 360 pre-HD values (Table 2). 361

The differential effect of HD on the two subgroups' RBCs 362 collected in 2009 was additionally manifested by the com-363 parative analysis of the membrane Proteome Carbonylation 364 Index (PCI). PCI, that is a measure of the protein oxidative 365 366 assaults, was substantially high (p < 0.01) for the Group A 367 RBCs collected during the HD session (Fig. 3A). Furthermore, 368 the post-HD PCI index was significantly different compared to 369 the pre-HD index only in the case of the high mortality group 370 (Fig. 3A), signifying that at a high mortality risk state the erythrocytes are particularly susceptible to the HD-associated 371 oxidative damage. 372







Fig. 3 – Bar graphs showing the variation in the RBC membrane Proteome Carbonylation Index (A) and plasma pre-HD Total Antioxidant Capacity (B) in ESRD patients and healthy controls. Data represent averaged (n = 6 for patients groups and n = 12 for healthy controls) values (of relative protein carbonyl expression and μ M Fe²⁺, respectively) ± SD. ESRD PCI values were normalized against the PCI of the controls (100%). Pre, 20 min and post: before, during and after the HD. TAC, AC(UA), AC(-UA): total, urate-dependent and urate-independent plasma antioxidant capacity. (*) p < 0.05. (**) p < 0.01.

As expected [23], Total Antioxidant Capacity of plasma, 373 measured by the FRAP assay, was increased in the pre-HD 374 collected plasma of all ESRD patients compared to healthy 375 controls (Fig. 3B). Since FRAP-effector components, like the uric 376 acid [24] are subjected to extreme variation in uremic patients 377 on HD, we repeated the measurement in uricase-treated 378 plasma samples. According to the results shown in Fig. 3B, 379 both the urate-dependent and urate-independent antioxidant 380 capacities were higher in ESRD patients than in controls 381 (p < 0.01). A small but significant increase was observed in the 382 urate-independent plasma antioxidant capacity of Group A 383 compared to Group B patients. 384

3.2. Follow-up study: blood and RBC protein diversification 385 after three years on HD 386

Three years after the initial examination, the Group B patients $_{387}$ exhibited some variation in the hematologic profile (Table 1 $_{388}$ and Table 3). The modifications observed were clearly $_{389}$ associated with the ESRD and the HD therapy, since the rate $_{390}$ of change of those parameters in the patients was statistically $_{391}$ higher (p < 0.05) than that of co-studied healthy controls $_{392}$ (asterisks in Table 3) for the same period of time. Uremic index $_{393}$ variation, for better or for worse, in long survived ESRD $_{394}$ patients, was accurately reflected in plasma and erythrocyte $_{395}$

$^{t3.3}_{t3.4}$				Pati	ents		
t3.5		H1	H2	H3	H4	H5	H6
t3.6	RBCs	83.1*-	87.8 [*] -	107.2	102.0-	88.1*-	98.0
t3.7	Hb	90.3 [*] -	107.8-	112.7-	111.1-	87.2 [*] -	95.1-
t3.8	Hct	83.0 [*] -	95.1-	105.6-	100.9-	88.0*-	95.7-
t3.9	MCV	100.1	108.5+	98.5	99.0-	100.1	98.3-
t3.10	MCH	108.7*+	122.8 +	105.1	140.7 *	98.6+	96.8-
t3.11	MCHC	108.6*	113.3 [*] -	106.7*	110.0 [*] -	98.5-	98.6
t3.12	RDW-CV	100.3+	93.1 [*] +	100.7+	101.8+	116.0*+	101.2+
t3.13	Urea	88.4+	87.3+	115.6+	110.1+	87.5+	96.8+
t3.14	Urea (post-HD)	91.1	75.5	85.2+	62.0	112.9	110.2+
t3.15	Creatinine	78.6*+	85.3 [*] +	104.2+	88.2*+	123.0*+	72.6*+
t3.16	Creatinine (post-HD)	81.7+	100.7+	115.9+	93.1+	146.3 [*] +	69.3+
t3.17	Potassium	121.4*+	114.1	72.3*	120.0*	85.0+	103.4+
t3.18	Potassium (post-HD)	92.3	91.9	82.1	83.5	84.7	82.5
t3.19	Uric acid	112.6	67.2*	86.4	71.6*	67.9*	69.9*
t3.20	Cholesterol	68.9 [*]	66.3 [*]	96.0	110.2	96.5	85.5
t3.21	Triglycerides	56.0*	28.6*	32.2*	159.5 [*] +	54.3*	93.7
t3.22	Sodium	100.0-	99.8	96.2-	93.5 [*] -	97.4	98.5
t3.23	Calcium	106.3	101.7	94.4	103.2	102.5	102.5
t3.24	Phosphorus	137.9*	106.3+	107.0	62.9 [*] +	92.2	91.4+
t3.25	Iron	183.0*	113.9	67.2*	71.4 [*] -	77.2*	265.8*
t3.26	Proteins	98.2	89.5	106.0	99.5	116.8*	109.7
t3.27	Albumin	107.6	114.9	97.9	109.5	102.6	100.7
t3.28	SGOT	103.1	163.6*	57.1*	70.0*	73.0*	60.4*
t3.29	SGPT	157.1*	132.8*	85.4	95.0	51.6*	69.3*
t3.30	γ-GT	81.0	196.4*	435.0 [*] +	98.0	164.3 [*] +	71.4*
t3.31	ALP	101.2	91.3	103.3	109.8	288.9*	88.2

t3.32 Data represent modifications in the parameters listed after normalization to the 2009 values (100%).

t3.33 Bold: pathologic values either above (+) or below (-) the normal range (2012 measurement).

 $t_{3.35}$ * Statistically significant difference (p < 0.05) in the rate of change of each parameter compared to the averaged rate of change of the same

t3.36 parameter in healthy controls for the same period (data not shown).

t3.1

t3.2

oxidative stress markers as well as in cellular morphology,irrespective of the dialysis period.

More specifically, although there was not a common 398 variation profile among the patients, a trend towards 399 increased MCH and MCHC indexes without a concomitant 400 decrease in the mean cell volume was obvious (Table 3). 401 Regarding the serum biochemical markers, the pre-HD levels 402403 of uremic solutes (urea, creatinine, potassium, urate) were stable or substantially improved in the majority of the 404patients. Compared to the initial evaluation, creatinine ex-405hibited worse clearance in patient H5. Apart from gamma-406 glutamyltransferase (vGT) that was substantially increased in 407 half of the patients, the serum biochemical profile was overall 408stable or improved. Notably, the comparatively increased 409concentration of pre-HD creatinine in patient H5 was correlated 410 to a wide increase in ALP levels (Table 3). The respective profiles 411 of healthy subjects showed negligible changes for the same 412 period (data not shown). 413

In accordance with the hematological data, three years 414 after the initial examination of the Group B patients, there 415 was an apparent increase (p < 0.01) in the frequency of the 416 normally shaped discocytes (from $44.9 \pm 0.23\%$ to $60.7 \pm 1.57\%$, 417 respectively) at the expense of irreversible and reversible 418 RBC transformations (from $53.5 \pm 1.04\%$ to $39.1 \pm 1.20\%$, 419 respectively) (Fig. 4). It should also be mentioned that 420 a decrease of more than 50% was estimated for the 421

stomatocytes compared to their frequency in 2009. For the 422 same period, there was no significant variation in the percent- 423 age of transformed RBCs among healthy controls (0.9 \pm 0.3% to 424 1.0 \pm 0.25% for the 2009 and 2012 measurements, respectively). 425

It is well-established that uremia represents a pro-oxidant 426 disease state [13]. As a result, we subsequently performed a 427 follow-up evaluation of oxidative stress-related distortions 428 in patients' plasma and RBCs. After 3 years on HD, the 429 antioxidant capacity of plasma measured by the FRAP 430 assay, remained essentially stable or was increased in HD 431 patients with the exception of patients H2 and H5 (Table 4). 432 Low plasma TAC values in those patients seemed to be 433 correlated with worse levels of intracellular ROS compared 434 to the initial examination (see below). The fluctuation in 435 plasma TAC was attributed to shifts in urate (H2, H3) and/or 436 urate-independent factors (H1, H5). The healthy controls 437 exhibited lower values and minimal fluctuation in plasma 438 TAC levels during the 3-year interval compared to the 439 patients (Table 4). 440

The endogenous ROS levels in RBCs of ESRD patients 441 after 3 years on HD were evaluated by a fluorimetric assay. 442 Compared to the minor ROS modifications seen in healthy 443 controls for the same period, most of the patients showed a 444 significant decrease in the intracellular ROS accumulation 445 (Table 5). On the other side, patient H5 exhibited a significant 446 increase in RBC ROS, in accordance with the aggravation in 447

JOURNAL OF PROTEOMICS XX (2014) XXX-XXX



Fig. 4 – Representative scanning electron microscopy micrographs showing the follow-up evaluation of pre-HD RBC morphology in ESRD patients. Arrows indicate stomatocytes and other shape transformations. Scale bars, 10 μm.

serum biochemical status (Table 3, Table 4) and the expression of oxidation stress protein markers in RBC membrane
(see below).

Finally, we performed a follow-up evaluation of RBCs' 451membrane protein modifications in healthy subjects and ESRD 452patients in Group B (Table 6). Compared to the rate of protein 06 modifications for the same period in healthy controls, the 454majority of the patients exhibited statistically significant 455 changes in the expression of GLUT1, stomatin and membrane-456 457bound Hb (Table 6 and Fig. 5). Aqp1, flotillin 2, GAPDH and band 458 3 proteolysis varied significantly in more than half of the patients. Apart from patient H5, Prx2 expression was stable or 459significantly decreased in patients in Group B (Table 6 and 460 Fig. 5). Moreover, calpain expression was pathologically elevat-461 ed in only two patients, including patient H5. Alpha adducin, 462Hsp70, membrane-bound IgGs, band 3 dimerization and clus-463 terin were increased in some cases. Protein carbonylation was 464 proportionally decreased pre- and post-HD in all patients with 465 the exception of patient H5 and, regarding the pre-HD value, of 466 patient H6 too (Table 6). 467

469 **4. Discussion**

Chronic kidney disease is a risk factor for the development of 470cardiovascular complications, which gradually ends up in 471 tenfold mortality rate after the beginning of the HD therapy 472[25]. The present study reports the results extracted from a 473three-year follow up examination of a well-characterized [8] 474 475 ESRD patient group. It was conducted to gain more insight into the pathophysiology of RBCs and the candidate bio-476 markers of mortality risk in ESRD, as well as to identify new 477 molecular changes probably associated with the duration and 478 the progression of the disease. To these purposes, (i) we 479retrospectively analyzed the blood serum and RBC profile of 480

the subgroup of patients that passed away by cardiovascular 481 diseases soon after their initial examination in 2009 compared 482 to those who survived and (ii) we performed a complete 483 follow-up study of the same parameters in the survived 484 patients after three more years on HD therapy. 485

486

4.1. Post-mortem study

Patients who died were characterized by elevated levels of 487 uremic toxins and prolonged HD, compared to the levels seen 488 in the survivor ones, verifying that both parameters represent 489 risk factors for cardiovascular morbidity and mortality [13,26]. 490 Serum ALP and SGOT level variation between the examined 491 patient subgroups verifies the previously established patho-492 genic role of ALP in vascular calcification [27], inflammation 493 [28] and cardiovascular mortality in ESRD [29], in common or 494 independently of the serum liver enzyme levels [30]. 495

A variation currently associated for the first time with both 496 the disease duration and mortality in HD patients was the 497 intra-erythrocyte Hb concentration. Despite discordance in 498 the field [31,32], high HCT [33] and blood Hb levels [34] have 499 been proposed as mortality risk factors in HD, even if found 500 within the physiological normal range, probably in relation to 501 the increased risk of thrombosis, uncontrolled hypertension 502 [35] and HD-related blood viscosity effect [36]. Similarly, in our 503 study, blood Hb and HCT levels were high in the passed-away 504 patients compared to the anemic survivors, but the statistically 505 significant variation refers to the intracellular concentration 506 of Hb. In the follow-up study as well, the duration of HD is 507 associated with a trend to increased MCH and MCHC indexes. 508 Increased concentration of Hb in RBCs under constant Epo 509 supply is most probably correlated to cellular changes, namely, 510 either cell surface loss or pathologic regulation of cell hydration. 511 According to our results, both possibilities could occur in 512 ESRD patients. 513

J O U R N A L O F P R O T E O M I C S X X (2014) X X X – X X X

9

	ΤΛ	TAC		UA		UA		C-UA
	2009	2012	2009	2012	2009	2012		
H1	910	1021*	602	592	308	429*		
H2	1414	1237 *	1019	739*	395	498		
H3	1279	1445 *	760	968*	519	477		
H4	1236	1277	828	765	408	512*		
H5	972	843*	634	565	338	278		
H6	1055	1122	644	648	411	474		
Average ESRD	1144 ± 195	1164 ± 210	765 ± 150	713 ± 148	397 ± 73	445 ± 86		
Average controls	696 ± 117	742 ± 73	432 ± 88	485 ± 66	265 ± 47	258 ± 14		

t4.16 * p < 0.05, 2009 vs. 2012.

Increased microvesiculation leading to erythrocyte surface 514loss has been reported in ESRD [37]. It is probably driven by the 515uremic environment, the cardiovascular disease background [38] 516and the dialysis-associated mechanical stress [39]. Blood micro-517particles are thought as potent procoagulant factors and potential 518 biomarkers of various diseases characterized by thrombotic 519520and inflammatory events. Such as, the levels of the endothelial microparticles are tightly linked to arterial dysfunction in ESRD. 521522Although we did not measure RBC microvesiculation in the 523present study, a wide range of membrane vesiculation promot-524ing factors like shape distortion, intracellular calcium activity, metabolic and oxidative stress [40], as well as protein defects that 525weaken the adhesion of cytoskeleton to the membrane, were all 526encountered in higher levels in HD patients who passed away. In 527those cases, there is substantial membrane remodeling involving 528proteolysis, loss of essential components and oxidative defects, a 529subset of which were found only in Group A patients, suggesting 530that more severe uremia is required for those changes to be 531observed. The calcium-dependent membrane binding of calpain 532[41], which is associated with band 3 and spectrin proteolysis [42] 533was higher in Group A patients compared to Group B ones. 534Interestingly, low activity of membrane ATPases (Na⁺-K⁺, Mg²⁺ 535and Ca²⁺) has been reported in chronic renal disease [43], with 536 obvious consequences in both cell calcium and hydration 537538 regulation. In the same context, the membrane expression profile of Aqp1, which is the main water-transporter in RBCs, 539probably reflects a response to the osmotic provocations of the 540

unstable and complex uremic environment, in order for ESRD 541 RBCs to efficiently regulate their volume and hydration. In 542 consistency, previous studies in chronic renal disease have 543 reported increased resistance of RBCs to osmotic hemolysis [43]. 544

Whatever its origin might be, the intracellular increase of Hb 545 concentration could lead to problematic oxygen access, in- 546 creased rate of Hb auto-oxidation and a series of Hb-mediated 547 oxidative reactions to cells, as previously suggested in heredi- 548 tary spherocytosis [44,45]. In our study the oxidative stress was 549 substantially higher in the passed away ESRD patients. In fact, 550 a variety of RBC oxidative indexes, namely, appearance of 551 aberrant electrophoretic bands (representing proteolytic frag- 552 ments of high molecular weight components), membrane 553 binding of Prx2 as well as protein carbonylation [46-48] were 554 significantly different in Group A patients compared to the 555 Group B ones in relation to the HD procedure. The Prx2 protein 556 is a molecular chaperone with a critical anti-oxidant function in 557 RBCs [47,49,50]. Increased membrane binding of Prx2 has been 558 reported under conditions of high calcium [51] or oxidative 559 stress, including hereditary spherocytosis [52] and ESRD [8]. In a 560 similar way, the cellular and extracellular protein carbonylation 561 stress has been implicated in a wide variety of clinical com- 562 plications in uremia, including atherosclerosis [46]. Although 563 the HD exhibits negative effect on protein carbonylation in the 564 majority of the ESRD patients [53], there was not a common 565 HD-effect profile among them [8]. In the present study we clarify 566 for the first time that this variation is probably associated with 567

t5.1	Table 5 – Follow-up evaluation of RBC intracellular ROS levels in ESRD patients estimated by fluorometry.							
t5.2 t5.4		Patients						
t5.5		H1	H2	H3	H4	H5	H6	
t5.6	2009							
t5.7	Pre-HD	221	80	343	211	203	306	
t5.8	Post-HD	203	160	334	256	193	184	
t5.9 t5.10	2012							
t5.11	Pre-HD	124*	116	104*	114*	300*	146*	
t5.12	Post-HD	162	162	114*	154*	308*	170	

t5.13 Data present the endogenous RBC ROS levels (DCF fluorescence) in ESRD patients after normalization to the corresponding (2009 or 2012) t5.14 control values (100%).

t5.16 Bold: pathologic values compared to healthy controls.

t5.1% * p < 0.05, 2009 vs. 2012.

JOURNAL OF PROTEOMICS XX (2014) XXX-XXX

Table 6 – Follow-up evaluation of the differentially expressed RBC membrane proteins in healthy subjects and survived ESRD patients in group B.

$6.3 \\ 16.4$				Patie	ents			Controls
t6.5		H1	H2	H3	H4	H5	H6	
t6.6 t6.7 t6.8 t6.9 t6.10 t6.11 t6.12 t6.13 t6.14 t6.15 t6.16 t6.17 t6.18 t6.19	a-Adducin Aquaporin-1 Band 3 oligomers Band 3 proteolysis Calpain Flotillin-2 GAPDH GLUT1 Hsp70 IgGs Membrane Hb Prx2 PCI (pre-HD) PCI (post-HD)	80°- 109 98- 719°+ 22°- 147°- 156°- 156°- 45° 62° 91 35°- 32° 75°	106- 396* 88+ 59*+ 37*- 93- 72*- 192*- 89+ 89+ 98 78*- 75* 48*	392 63 1026 304 + 360 163 90- 158 + 98+ 83+ 216 - 94- 72 61	426 *- 94 * 101- 117 *+ 102- 79- 184 *+ 92- 84+ 78+ 134 * 27 *- 62 * 18 *	114+ 1288* 20* 103+ 222* 90+ 103+ 250*- 327*+ 138*+ 165*+ 268*- 232* 332*	108+ 1716 * 24 *- 54 *+ 99 131 *+ 117 *+ 240 *- 141 *+ 135 *+ 124 * 94- 208 * 86	104.0 ± 11.6 114.0 ± 9.5 96.4 ± 8.7 88.1 ± 5.2 94.4 ± 8.2 87.4 ± 8.9 95.0 ± 6.2 101.2 ± 9.4 91.1 ± 8.0 82.2 ± 7.5 85.7 ± 9.3 88.5 ± 8.5 102 ± 23 n.d.
t6.20 t6.21	Clusterin Stomatin	77 140 [*] -	116+ 142 [*] -	2700 [*] + 115–	112+ 102-	121 364 [*]	127+ 265 [*] -	117.4 ± 10.1 109.6 ± 8.4

t6.22 Data represent pre-HD modifications in the relative membrane protein expression after normalization to the immunoblotting data collected in t6.23 2009 (100%).

t6.23 Bold: pathologically increased (+) or decreased (-) protein levels for the 2012 evaluation in ESRD patients compared to the variation range of healthy controls (average ± SD).

 $t_{6.27}$ * p < 0.05 2009 vs. 2012, statistically significant difference in the rate of change of each parameter compared to the rate of change in healthy to controls for the same period.

the cardiovascular mortality risk, since the PCI was deteriorating during and after the HD in the passed away patients while it
was invariable or even improved in all the cases who survived.
This finding suggests that in a background of high mortality risk
the antioxidant defense of RBCs against the HD-related

573 oxidative threats is severely affected.

Interestingly, the RBC membrane of Group B patients was characterized by low expression of GAPDH, GLUT1 and clusterin proteins compared to both the healthy subjects as well as Group A patients. GAPDH profile probably represents an adaptation to the metabolic and oxidative stress. Indeed, membrane binding inhibits enzyme activity and drives the 579 usage of cellular glucose to the phosphate pentose pathway 580 for the regeneration of reduced glutathione [54,55]. GLUT1 581 deficiency is reported for the first time in ESRD patients and as 582 discussed later, it may be associated with numerous intracel-583 lular functions. The small loss of GLUT1 and adducin in 584 Group A membranes compared to Group B ones could be a 585 compensatory response for the observed loss of band 3, since 586 all of these proteins exhibit a critical and probably synergistic 587 structural role in RBC membrane [56]. Clusterin is a ubiqui-588



Fig. 5 – Bar graphs (A) and representative immunoblots (B) showing the follow-up evaluation of RBC membrane protein modifications in healthy subjects (average \pm SD, n = 10) and ESRD patients. Data in (A) represent variation in the relative membrane protein expression after normalization to the 2009 immunoblotting data (100%).

Please cite this article as: Antonelou MH., et al, Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study, J Prot (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.009

tí **Q3** t6.2
ARTICLE IN PRESS

have been considered an index of underlying cardiovascular 590damage [57] while erythrocyte clusterin levels, a sensitive 591biomarker of senescence and cellular, including oxidative 592stress [58]. The currently reported for the first time clusterin 593 downregulation in ESRD RBCs was not a surprising finding 594considering recent reports on clusterin expression in senes-595cent, stressed or diseased erythrocytes [58]. Although it could 596be related to increased vesiculation of ESRD erythrocytes 597598[37,59], its intergroup variability (Group A > Group B) suggests a different degree of protein absorbance from the serum. 599In support, decreased clusterin levels have been reported in 600 the plasma of long-term HD survivors [60]. 601

Finally, the elevated urate-independent plasma antioxidant capacity in the oxidatively challenged ESRD patients probably reflects a homeostatic production of low molecular weight antioxidants, especially of lipophilic ones like the vitamin E, which are not severely cleared during the hemodialysis.

608 4.2. Follow-up study

In the second part of the study, the follow-up examination of 609 the patients after three additional years in HD, revealed stable 610 611 or improved uremic toxin levels in the majority of them, suggesting a positive response to the HD therapy. Uremic 612 613 toxin interaction with RBCs leads to local or extensive 614 oxidative modifications to membrane components. In con-615 trast to Epo that cannot affect this interaction, effective HD can ameliorate the toxin-associated cellular defects. 616

In dialyzed patients, the erythrocyte membrane proteins 617 develop modifications as a probable compensative response 618 to the chronic stress. Interestingly, the uremic index variation 619 in long survived ESRD patients is accurately reflected not only 620 in serum biochemicals but also in plasma and cellular stress 621 factors, even in the erythrocyte shape. For instance, patient 622 H5 who was presented with a relative increase in serum 623 creatinine also exhibited a parallel increase in serum ALP, 624 anisocytosis as well as deterioration in intracellular ROS, 625 membrane-bound Prx2 and calpain, protein carbonylation 626 and plasma TAC levels. The relative increase in γ GT in half of 627 the patients is correlated to a slight aggravation in creatinine 628 629 clearance (post-HD values, Table 4), verifying its role as an independent risk factor of atherosclerosis and cardiovascular 630 mortality [61]. Interestingly, the enormous increase of γ GT in 631 patient H3 was associated with an impressive increase in RBC 632 membrane clusterin, reminding previous reports on serum 633 clusterin as a cardiovascular disease biomarker [57]. 634

Furthermore, at the RBC membrane level, there was a 635 substantial variation in the membrane expression of several 636 components after three years on HD. Augmented membrane 637 638 binding of Hb is probably dictated by the intracellular Hb concentration levels, as previously observed in high MCHC 639 patients [45]. GLUT1 overexpression in relation to the duration 640 of ESRD is reported for the first time. It might be related to the 641 642 improved RBC morphology and vesiculation, since GLUT1 is effectively exocytosed [62]. Most probably it represents a 643 644 compensative response to the prolonged osmotic [63], mechanical, metabolic and oxidative stress imposed by the 645 uremic milieu on RBCs. Increased GLUT1 expression could 646 mean increased glucose uptake for metabolism purposes. 647

Indeed, it has been established that glucose deprivation 648 and hypoxia promote the membrane expression of GLUT1 649 [64] and that plasma levels of glucose are reduced in ESRD [7]. 650 Moreover, it is known that GLUT1 accomplishes a different, 651 structural role in RBCs, the adhesion of skeletal components 652 to the membrane [56]. The amplification of this linkage in the 653 mechanically stressed ESRD RBCs might be compensatory for 654 the currently and previously observed [8,43] loss of the main 655 structural membrane component, the band 3 protein, that 656 also mediates the adhesion of cytoskeleton to the membrane. 657 The same context of protein interactions could probably define 658 the parallel adducin variation in the majority of our patients, 659 similar to other studies [65]. Apart from these functions, the 660 abundant molecules of GLUT1 in the RBC membrane might 661 insure plasma ascorbic regeneration in ESRD. Ascorbic is a 662 critical antioxidant factor, protecting the vitamin E of plasma 663 lipoproteins as well as the RBC membrane components from 664 oxidative defects, a mechanism that is especially important in 665 atherosclerosis [66]. As an effective ROS scavenger, plasma 666 ascorbic acid is oxidized to dehydroascorbic (DHA) that enters 667 RBCs through GLUT1 [67]. Inside RBCs, DHA is quickly reduced 668 to ascorbic and then it slowly diffuses back to plasma. HD has 669 been associated with increased conversion of ascorbic to 670 DHA [9]. Notably, the physical association of GLUT1 with 671 stomatin [68] favors DHA transport [69] at the expense of 672 glucose transport activity [70]. In the light of this evidence, 673 the currently observed common variation profile of GLUT1, 674 stomatin and urate-independent plasma TAC might be well 675 interpreted in our patients. 676

Apart from GLUT1 regulation, stomatin accomplishes critical 677 regulatory interactions with many ionic channels, membrane 678 transporters and proteins including urea transporter, calcium 679 pump, CD47, pallidin, flotillins and aquaporin 1 [71]. Dehydrated 680 hereditary stomatocytosis for instance, has been found to be 681 functionally connected with mechanotransduction pathways 682 mediated by "mechanosensor" proteins and stomatin family 683 members [72,73]. Notably, this disease is characterized by RBC 684 dehydration, increased MCHC, resistance to osmotic lysis, mild 685 stomatocytosis and peripheral edema. In a striking similarity, 686 the mechanically stressed RBCs in ESRD present alike distor- 687 tions regarding intracellular Hb concentration (present study), 688 stomatocytic transformation [8] and resistance to osmotic lysis 689 [43]. Mechanosensor proteins hold critical role in the RBC volume 690 homeostasis [74] through pathways implicating calcium flux. 691 Although a mechanosensory feedback mechanism in ESRD RBCs 692 is needed and reasonably expected, it has not been studied yet. 693 However, to this respect, it is worth noting that in our study the 694 duration of HD parallels the overexpression of stomatin at the 695 expense of the stomatocytic transformation of RBCs. 696

4.3. Conclusions

In conclusion, this study demonstrates novel blood modifi- 698 cations probably associated with the duration of Epo/HD 699 treatment, the disease progression and the cardiovascular 700 mortality in ESRD. The duration of HD is associated with 701 increased intracellular Hb concentration and membrane 702 expression of GLUT1, stomatin and Aqp1. High mortality risk 703 seems to be related to increased levels of uremic toxins, 704 structurally altered and oxidatively damaged erythrocytes 705

Please cite this article as: Antonelou MH., et al, Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study, J Prot (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.009

697

12

IOURNAL OF PROTEOMICS XX (2014) XXX-XXX

probably as a result of poor response to the HD therapy. 706 Contrary, the smooth disease progression in ESRD patients is 707 presented with maintainable or even improved uremic and 708 erythrocyte stress markers. Both erythrocytes and plasma in 709 prolonged HD show compensatory responses to the chal-710 lenges of uremic milieu. Although the currently studied target 711 groups are rather small, the volume of the hematologic and 712 cellular parameters examined adds credibility to our results. 713 714 The currently presented hematological and RBC protein variability adds new pieces to the erythrocyte pathophysiol-715 ogy puzzle in ESRD and suggests novel factors for consider-716 ation in future large scale studies on cardiovascular morbidity 717 and mortality biomarkers in uremic patients. 718

Competing interests 720

721 The authors declare that no competing interests exist.

Acknowledgments 723

The authors are grateful to all blood donors, patients and 724 healthy subjects who have participated in the present study, 725and especially the six ESRD patients and the ten friends who 726 727 donated twice, for their prompt, volunteer response, and exceptional collaboration. They also thank Assistant Prof. I.P. 728 Trougakos (Dept. of Cell Biology & Biophysics, Faculty of 729 Biology, NKUA) for the kind disposal of fluorometer device. 730 This research has been co-funded by the European Union 731 (European Social Fund) and Greek National Resources under 732 733 the framework of the "Archimedes III: Funding of Research 734 Groups in TEI of Athens" project of the "Education & Lifelong Learning" Operational Programme. 735

REFERENCES 73 6

738	[1] Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH. Accelerated
739	atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis.
740	N Engl J Med 1974;290:697–701.

- [2] Slinin Y, Foley RN, Collins AJ. Calcium, phosphorus, parathyroid 741 hormone, and cardiovascular disease in hemodialysis patients: 742 743 the USRDS waves 1, 3, and 4 study. J Am Soc Nephrol 744 2005:16:1788-93.
- [3] Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. 745 746 Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. Kidney Int 1999;55:648-58. 747
- [4] Zoccali C. Cardiovascular risk in uraemic patients—is it fully 748 749 explained by classical risk factors? Nephrol Dial Transplant 2000:15:454-7. 750
- [5] Miyazaki H, Matsuoka H, Itabe H, Usui M, Ueda S, Okuda S, et al. 751752Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress: effects of vitamin E-coated dialyzer. Circulation 2000;101:1002-6. 753
- [6] Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, 754755 Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. Nephrol Dial Transplant 756 757 2003:18:1272-80.
- 758 [7] Eckardt KU. Pathophysiology of renal anemia. Clin Nephrol 759 2000;53:S2-8.
- [8] Antonelou MH, Kriebardis AG, Velentzas AD, Kokkalis AC, 760 761 Georgakopoulou SC, Papassideri IS. Oxidative stress-associated

	shape transformation and membrane proteome remodeling	762
	in erythrocytes of end stage renal disease patients on	763
	hemodialysis. J Proteomics 2011;74:2441–52.	764
[9]	Bakaev VV, Efremov AV, Tityaev II. Low levels of	765
	dehydroascorbic acid in uraemic serum and the	766
	partial correction of denydroascorbic acid deficiency	767
		768
[10]	Pavone B. Sirolli V. Bucci S. Libardi F. Felaco P. Amoroso I	708
[10]	et al. Adsorption and carbonylation of plasma proteins by	771
	dialyser membrane material: in vitro and in vivo proteomics	772
	investigations. Blood Transfus 2010;8(Suppl. 3):s113–9.	773
[11]	Kalogerakis G, Baker AM, Christov S, Rowley KG, Dwyer K,	774
	Winterbourn C, et al. Oxidative stress and high-density	775
	lipoprotein function in Type I diabetes and end-stage renal	776
	disease. Clin Sci (Lond) 2005;108:497–506.	777
[12]	Roberts MA, Hare DL, Ratnaike S, Ienno FL. Cardiovascular	778
	biomarkers in CKD: pathophysiology and implications for	779
	2006-48-241_60	780
[13]	Stenvinkel P. Carrero II. Axelsson I. Lindholm B. Heimburger O.	782
[]	Massy Z. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular	783
	risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces	784
	fit into the uremic puzzle? Clin J Am Soc Nephrol 2008;3:505–21.	785
[14]	Chaykovska L, Tsuprykov O, Hocher B. Biomarkers for the	786
	prediction of mortality and morbidity in patients with renal	787
[4 = 1	replacement therapy. Clin Lab 2011;57:455–67.	788
[15]	Ortiz A, Massy ZA, Fliser D, Lindholm B, Wiecek A,	789
	prognostic higher in patients on hemodialysis. Nat Pev	790
	Nenhrol 2012:8:141–50	791
[16]	Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay:	793
r 1		70
	direct measure of total antioxidant activity of biological fluids	194
	and modified version for simultaneous measurement of total	794 795
	and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods	794 795 796
[47]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27.	794 795 796 797
[17]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid independent	794 795 796 797 797 798
[17]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68	794 795 796 796 797 798 798 799
[17]	and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE,	794 795 796 797 798 798 799 800 801
[17] [18]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage	794 795 796 797 798 799 800 801 802
[17] [18]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling:	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803
[17] [18]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome.	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804
[17] [18]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38.	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805
[17] [18] [19]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 804
[17] [18] [19]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardie AC, Stamoulis KE	794 795 796 797 798 800 801 802 803 804 805 806 806
[17] [18] [19] [20]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Fconomou-Patersen E. Marraritis LH. Papassideri IS	794 795 796 797 798 800 801 802 803 804 805 806 807 808
[17] [18] [19] [20]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 806 806 806 806 808 808
[17] [18] [19] [20]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol.	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 804 805 806 807 808 809 810 811
[17] [18] [19] [20]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate–phosphate–dextrose–saline–adenine–glucose–mannitol. Transfusion 2010;50:376–89.	794 795 796 797 798 800 801 802 803 804 805 806 807 808 807 808 807 808 809 810 811 812
[17] [18] [19] [20]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate–phosphate–dextrose–saline–adenine–glucose–mannitol. Transfusion 2010;50:376–89. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M,	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813
[17] [18] [19] [20] [21]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. Transfusion 2010;50:376–89. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influence of storage on red blood cell	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 804 805 806 806 807 808 806 811 812 813 814
[17] [18] [19] [20] [21]	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. Transfusion 2010;50:376–89. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. J Surg Res 2002;102:6–12.	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 806 810 811 812 813 814 815
 [17] [18] [19] [20] [21] [22] 	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. Transfusion 2010;50:376–89. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. J Surg Res 2002;102:6–12. D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L. Time-course	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 806 806 806 806 806 811 812 813 814 815 816
 [17] [18] [19] [20] [21] [22] 	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. Transfusion 2010;50:376–89. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. J Surg Res 2002;102:6–12. D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red bood cell envestigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red bood cell	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 807 808 807 811 812 813 814 815 816 817
 [17] [18] [19] [20] [21] [22] 	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. Transfusion 2010;50:376–89. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. J Surg Res 2002;102:6–12. D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red bood cell concentrates: from metabolism to proteomics.	794 795 796 797 798 800 801 802 803 804 805 806 807 808 806 807 808 806 811 812 813 814 815 816 817 818
 [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] 	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. Transfusion 2010;50:376-89. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. J Surg Res 2002;102:6–12. D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red bood cell concentrates: from metabolism to proteomics. Haematologica 2012;97:107–15. Jackson P. Loughrey CM, Lightbody IH, McNamee PT. Young	794 795 796 797 798 800 801 802 803 804 805 806 807 808 806 807 808 806 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820
 [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] 	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. Transfusion 2010;50:376-89. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. J Surg Res 2002;102:6–12. D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red bood cell concentrates: from metabolism to proteomics. Haematologica 2012;97:107–15. Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 806 807 808 807 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821
 [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] 	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. Transfusion 2010;50:376-89. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. J Surg Res 2002;102:6–12. D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red bood cell concentrates: from metabolism to proteomics. Haematologica 2012;97:107–15. Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure.	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 806 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822
 [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] 	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. Transfusion 2010;50:376–89. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. J Surg Res 2002;102:6–12. D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red bood cell concentrates: from metabolism to proteomics. Haematologica 2012;97:107–15. Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. Clin Chem 1995;41:1135–8.	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 806 811 812 813 814 815 816 817 818 816 817 818 819 822 823
 [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] [24] 	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. Transfusion 2010;50:376–89. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. J Surg Res 2002;102:6–12. D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red bood cell concentrates: from metabolism to proteomics. Haematologica 2012;97:107–15. Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. Clin Chem 1995;41:1135–8. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma	794 795 796 797 798 800 801 802 803 804 805 806 807 808 806 807 808 807 808 807 808 810 811 812 813 814 815 816 817 818 820 821 822 823 824
 [17] [18] [19] [20] [21] [22] [22] [23] [24] 	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate–phosphate–dextrose–saline–adenine–glucose–mannitol. Transfusion 2010;50:376–89. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. J Surg Res 2002;102:6–12. D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red bood cell concentrates: from metabolism to proteomics. Haematologica 2012;97:107–15. Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. Clin Chem 1995;41:1135–8. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay.	794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 806 811 812 813 814 815 816 817 818 816 817 818 820 821 822 823 824 825
 [17] [18] [19] [20] [21] [22] [22] [23] [24] [24] 	arrect measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999;299:15–27. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. Molecules 2011;16:7058–68. Antonelou MH, Tzounakas VL, Velentzas AD, Stamoulis KE, Kriebardis AG, Papassideri IS. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome. J Proteomics 2012;76 Spec No.:220–38. Beutler E, West C, Blume KG. The removal of leukocytes and platelets from whole blood. J Lab Clin Med 1976;88:328–33. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate–phosphate–dextrose–saline–adenine–glucose–mannitol. Transfusion 2010;50:376–89. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z, et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. J Surg Res 2002;102:6–12. D'Alessandro A, D'Amici GM, Vaglio S, Zolla L. Time-course investigation of SAGM-stored leukocyte-filtered red bood cell concentrates: from metabolism to proteomics. Haematologica 2012;97:107–15. Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. Clin Chem 1995;41:1135–8. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem 1996;239:70–6.	794 795 796 797 798 800 801 802 803 804 803 804 804 805 806 806 807 808 809 811 812 813 814 814 815 816 817 818 822 823 824 825 826

of cardiovascular disease: a statement from the American

Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular

829

830

Please cite this article as: Antonelou MH., et al, Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study, J Prot (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.009

831		Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology,	[44]	Mansouri A, Perry CA. Hemoglobin autoxidation at physiological	900
832		and Epidemiology and Prevention. Hypertension		concentrations. Hemoglobin 1987;11:353–71.	901
833		2003;42:1050–65.	[45]	Margetis P, Antonelou M, Karababa F, Loutradi A, Margaritis L,	902
834	[26]	Iseki K, Tozawa M, Takishita S. Effect of the duration of		Papassideri I. Physiologically important secondary modifications	903
835		dialysis on survival in a cohort of chronic haemodialysis		of red cell membrane in hereditary spherocytosis—evidence for	904
836	[0]]	patients. Nephrol Dial Transplant 2003;18:782–7.		in vivo oxidation and lipid rafts protein variations. Blood Cells	905
837	[27]	Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, Millan JL, O'Neill WC.	[40]	Mol Dis 2007;38:210–20.	906
838		Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate	[46]	Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. Relevance	907
839		as a solution and the second s		of oxidative and carbonyl stress to long-term uternic	908
840 841	[20]	Calcinication. Runley Int 2006,75.1024-50.	[47]	Pocha S. Costa F. Coimbra S. Nascimento H. Catarino C.	909
849	[20]	et al Association between elevated liver enzymes and C-reactive	[47]	Rocha-Pereira P. et al Linkage of cytosolic perovired ovin 2 to	910
843		protein: possible hepatic contribution to systemic inflammation		ervthrocyte membrane imposed by hydrogen peroxide-induced	912
844		in the metabolic syndrome. Arterioscler Thromb Vasc Biol		oxidative stress. Blood Cells Mol Dis 2009;43:68–73.	913
845		2005;25:193–7.	[48]	Rinalducci S, D'Amici GM, Blasi B, Vaglio S, Grazzini G, Zolla L.	914
846	[29]	Blayney MJ, Pisoni RL, Bragg-Gresham JL, Bommer J, Piera L,		Peroxiredoxin-2 as a candidate biomarker to test oxidative	915
847		Saito A, et al. High alkaline phosphatase levels in hemodialysis		stress levels of stored red blood cells under blood bank	916
848		patients are associated with higher risk of hospitalization and		conditions. Transfusion 2011;51:1439–49.	917
849		death. Kidney Int 2008;74:655–63.	[49]	Stuhlmeier KM, Kao JJ, Wallbrandt P, Lindberg M,	918
850	[30]	Beddhu S, Baird B, Ma X, Cheung AK, Greene T. Serum		Hammarstrom B, Broell H, et al. Antioxidant protein 2	919
851		alkaline phosphatase and mortality in hemodialysis patients.		prevents methemoglobin formation in erythrocyte	920
852	[04]	Clin Nephrol 2010;74:91–6.	[[0]	nemolysates. Eur J Blochem 2003;2/0:334–41.	921
853 854	[31]	of higher homoglobin lovels on mortality and hognitalization in	[50]	Low FM, Hampton MB, Winterbourn CC. Peroxiredoxin 2 and	922
855		hemodialyzis nationts. Kidney Int 2003:63:1908_14		Simal 2008:10:1621_30	925
856	[32]	Avram MM. Blaustein D. Fein PA. Goel N. Chattonadhvav I.	[51]	Moore RB, Shriver SK, Protein 7.2b of human erythrocyte	924 925
857	[9-]	Mittman N. Hemoglobin predicts long-term survival in dialysis	[9-]	membranes binds to calpromotin. Biochem Biophys Res	926
858		patients: a 15-year single-center longitudinal study and a		Commun 1997;232:294–7.	927
859		correlation trend between prealbumin and hemoglobin. Kidney	[52]	Rocha S, Vitorino RM, Lemos-Amado FM, Castro EB,	928
860		Int Suppl 2003:S6–S11.		Rocha-Pereira P, Barbot J, et al. Presence of cytosolic	929
861	[33]	Eschbach JW, Adamson JW. Guidelines for recombinant		peroxiredoxin 2 in the erythrocyte membrane of patients	930
862		human erythropoietin therapy. Am J Kidney Dis 1989;14:2–8.		with hereditary spherocytosis. Blood Cells Mol Dis	931
863	[34]	Phrommintikul A, Haas SJ, Elsik M, Krum H. Mortality and target		2008;41:5–9.	932
864		haemoglobin concentrations in anaemic patients with chronic	[53]	Brzeszczynska J, Luciak M, Gwozdzinski K. Alterations of	933
865		kidney disease treated with erythropoletin: a meta-analysis.		erythrocyte structure and cellular susceptibility in patients	934
866	[25]	Lancet 2007;369:381–8.		with chronic renal failure: effect of haemodialysis and	935
868	[22]	Am I Kidney Dis 1999.33.821–8	[54]	Harrison MI Rathinavelu P Arese P Geablen RI Low PS Role	930
869	[36]	Reinhart WH, Cagienard F, Schulzki T, Venzin RM, The	[]]]	of band 3 tyrosine phosphorylation in the regulation of	938
870	[00]	passage of a hemodialysis filter affects hemorheology, red		erythrocyte glycolysis. J Biol Chem 1991;266:4106–11.	939
871		cell shape, and platelet aggregation. Clin Hemorheol	[55]	Walsh SB, Stewart GW. Anion exchanger 1: protean function	940
Q7		Microcirc 2013.		and associations. Int J Biochem Cell Biol 2010;42:1919–22.	941
873	[37]	Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert	[56]	Khan AA, Hanada T, Mohseni M, Jeong JJ, Zeng L, Gaetani M,	942
874		J, et al. Circulating endothelial microparticles are associated		et al. Dematin and adducin provide a novel link between the	943
875		with vascular dysfunction in patients with end-stage renal		spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by	944
876	[0.0]	failure. J Am Soc Nephrol 2005;16:3381–8.		directly interacting with glucose transporter-1. J Biol Chem	945
877	[38]	Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG,	[2008;283:14600-9.	946
878		Freyssinet JM, et al. Elevated levels of shed membrane	[57]	I rougakos IP, Poulakou M, Stathatos M, Chalikia A, Melidonis	947
879		circulating blood of patients with acute coronary syndromes		clusterin/apolinoprotein Lincrease significantly in diabetes	948
881		Circulation 2000:101:841–3		type II and during development of coronary heart disease or	950
882	[39]	Daniel L, Fakhouri F, Joly D, Mouthon L, Nusbaum P, Grunfeld		at myocardial infarction. Exp Gerontol 2002;37:1175–87.	951
883		JP, et al. Increase of circulating neutrophil and platelet	[58]	Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Trougakos IP,	952
884		microparticles during acute vasculitis and hemodialysis.		Papassideri IS. Apolipoprotein J/clusterin is a novel structural	953
885		Kidney Int 2006;69:1416-23.		component of human erythrocytes and a biomarker of	954
886	[40]	Wagner GM, Chiu DT, Qju JH, Heath RH, Lubin BH. Spectrin		cellular stress and senescence. PLoS One 2011;6:e26032.	955
887		oxidation correlates with membrane vesiculation in stored	[59]	Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Trougakos IP,	956
888		RBCs. Blood 1987;69:1777–81.		Papassideri IS. Apolipoprotein J/clusterin in human erythrocytes	957
889	[41]	Glaser T, Schwarz-Benmeir N, Barnoy S, Barak S, Eshhar Z,		is involved in the molecular process of defected material disposal	958
890		Kosower NS. Calpain (Ca(2+)-dependent thiol protease) in	[60]	during vesiculation. PLoS One 2011;6:e26033.	959
891			[60]	notein characteristics of long term hemodialusis survivors	960
892	[42]	Schwarz-Ben Meir N. Glaser T. Kosower NS. Rand 3 protein		PLoS One 2012.7:e40232	965
894	[]	degradation by calpain is enhanced in ervthrocytes of old	[61]	Ruttmann E, Brant LJ, Concin H, Diem G. Rapp K. Ulmer H	963
895		people. Biochem J 1991;275(Pt 1):47–52.	r1	Gamma-glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular	964
896	[43]	Saradhadevi V, Sakthivel R, Vedamoorthy S, Selvam R,		disease mortality: an epidemiological investigation in a cohort	965
897	-	Parinandi N. Alterations in band 3 protein and anion		of 163,944 Austrian adults. Circulation 2005;112:2130–7.	966
898		exchange in red blood cells of renal failure patients. Mol Cell	[62]	Bosman GJ, Lasonder E, Groenen-Dopp YA, Willekens FL,	967
899		Biochem 2005;273:11–24.		Werre JM. The proteome of erythrocyte-derived	968

Please cite this article as: Antonelou MH., et al, Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study, J Prot (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.009

IOURNAL OF PROTEOMICS XX (2014) XXX-XXX

- 969 microparticles from plasma: new clues for erythrocyte 970 aging and vesiculation. J Proteomics 2012;76 Spec No.:203-10.
- [63] Hwang DY, Ismail-Beigi F. Stimulation of GLUT-1 glucose 971 972 transporter expression in response to hyperosmolarity. 973 Am J Physiol Cell Physiol 2001;281:C1365-72.
- [64] Boado RJ, Pardridge WM. Glucose deprivation and hypoxia 974 increase the expression of the GLUT1 glucose transporter via 975976 a specific mRNA cis-acting regulatory element. J Neurochem 2002;80:552-4. 977
- 978 [65] Alvarez-Llamas G, Zubiri I, Maroto AS, de la Cuesta F, Posada-Ayala M, Martin-Lorenzo M, et al. A role for the 979 membrane proteome in human chronic kidney disease 980 981 erythrocytes. Transl Res 2012;160:374-83.
- 982 [66] May JM. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. Front Biosci 1998;3:d1-d10. 983
- [67] Rumsey SC, Kwon O, Xu GW, Burant CF, Simpson I, 984Levine M. Glucose transporter isoforms GLUT1 985986 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. J Biol Chem 1997:272:18982-9. 987
- [68] Zhang JZ, Hayashi H, Ebina Y, Prohaska R, Ismail-Beigi F. 988 Association of stomatin (band 7.2b) with Glut1 glucose 989 990 transporter. Arch Biochem Biophys 1999;372:173-8.
- 1013

Battini JL, et al. Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid 992 uptake in mammals unable to synthesize vitamin C. Cell 993 2008;132:1039-48. 994 [70] Zhang JZ, Abbud W, Prohaska R, Ismail-Beigi F. Overexpression 995 of stomatin depresses GLUT-1 glucose transporter activity. Am 996 J Physiol Cell Physiol 2001;280:C1277-83. 997 [71] Rungaldier S, Oberwagner W, Salzer U, Csaszar E, Prohaska R. 998 Stomatin interacts with GLUT1/SLC2A1, band 3/SLC4A1, and 999 aquaporin-1 in human erythrocyte membrane domains. 1000 Biochim Biophys Acta 1828;2013:956-66. 1001 Zarychanski R, Schulz VP, Houston BL, Maksimova Y, 1002 [72] Houston DS, Smith B, et al. Mutations in the 1003 mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with 1004 hereditary xerocytosis. Blood 2012;120:1908-15. 1005[73] Albuisson J, Murthy SE, Bandell M, Coste B, Louis-Dit-Picard 1006 H, Mathur J, et al. Dehydrated hereditary stomatocytosis 1007 linked to gain-of-function mutations in mechanically 1008 activated PIEZO1 ion channels. Nat Commun 2013;4:1884. 1009 [74] Faucherre A, Kissa K, Nargeot J, Mangoni M, Jopling C. Piezo1 1010

[69] Montel-Hagen A, Kinet S, Manel N, Mongellaz C, Prohaska R,

991

plays a role in erythrocyte volume homeostasis. 1011 Haematologica 2013. Q8

Please cite this article as: Antonelou MH., et al, Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study, J Prot (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.009

240

Contra