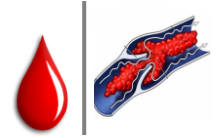




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΤΤΙΣΕΩΝ

Επιστημονική Υπεύθυνη: Ομότιμη Καθηγήτρια Ωρ. Σ. Τραυλού

Διπλωματική Εργασία

«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΣΤΗ ΝΕΦΡΙΚΗ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ- ΠΑΡΟΞΥΝΤΙΚΗ ΝΥΚΤΕΡΙΝΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑ
ΚΑΙ ΝΕΦΡΙΚΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ»

ΟΝΟΜΑ : Μύαρη Αγγελική, Βιολόγος

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ : Στυλιανή Κοκόρη, Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας

Ακαδημαϊκό Έτος : 2013-2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης, για την ολοκλήρωση του κύκλου σπουδών του Μεταπτυχιακού Προγράμματος “Θρόμβωση Αιμορραγία Ιατρική των Μεταγγίσεων”, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική σχολή, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Αιματολογίας κ. Στυλιανή Κοκόρη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Κοκόρη που με δέχτηκε στην ομάδα της, πίστεψε σε εμένα, με ενθάρρυνε, με καθοδήγησε και στήριξε τις προσπάθειες μου, ανοίγοντας μου νέους ορίζοντες και επιτρέποντάς μου να ασχοληθώ με ένα τόσο ερευνητικά ενδιαφέρον θέμα. Την ευχαριστώ επίσης για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κ. Ανθή Τραυλού , Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α. και Πρόεδρο της Συντονιστικής Επιτροπής του Π.Μ.Σ. για την ευκαιρία που μου έδωσε να φοιτήσω στο πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών.

Επίσης, ευχαριστώ την κ. Φωτεινή Παπανάγνου, γραμματέα του προγράμματος, για την πολύτιμη βοήθειά της.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου και τον Γιώργο για τη στήριξή τους καθ’όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Περιεχόμενα

Συντομογραφίες και ξενόγλωσσοι όροι	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Αιμοποίηση	6
1.2 Παράγοντες που ρυθμίζουν την αιμοποίηση	9
1.3 Κύτταρα του αίματος	10
1.3.1 Ερυθρά αιμοσφαίρια	10
1.3.2 Κοκκιώδης (μυελική) σειρά	11
1.3.3 Μονοκύτταρα	12
1.3.4 Αιμοπετάλια	12
1.3.5 Λεμφοκύτταρα	13
1.4 Αιμοσφαιρίνη	13
1.4.1 Δομή αιμοσφαιρίνης	14
1.4.2 Σύνθεση σφαιρινικών αλυσίδων	15
1.4.3 Αίμη	17
1.5 Σίδηρος	18
1.5.1 Μεταβολισμός σιδήρου	19
1.5.2 Ισοζύγιο σιδήρου- Διακίνηση σιδήρου	19
1.6 Αιμόλυση-Αιμολυτικές Αναιμίες	21
1.6.1 Ταξινόμηση των αιμολυτικών αναιμιών	24
2. ΝΥΚΤΕΡΙΝΗ ΠΑΡΟΞΥΝΤΙΚΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑ	25
2.1 Ιστορική αναδρομή	25
2.2 Παθοφυσιολογία	26
2.2.1 Άγκυρα GPI	26
2.2.2 Μοριακή βλάβη	28
2.2.3 Πρωτεΐνες της άγκυρας GPI	31
2.3 Το σύστημα του συμπληρώματος	32
2.3.1 Κλασσική οδός	34
2.3.2 Εναλλακτική οδός	35
2.3.3 Οδός λεκτίνης	36
2.3.4 Λυτική οδός	36
2.4 CD55-DAF (decay accelerating factor)	37
2.4.1 Δομή	37
2.4.2 Λειτουργία	38
2.5 CD59-MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis) ή HRF20 (homologous restriction factor 20)	39
2.5.1 Δομή	39
2.5.2 Λειτουργία	39
2.6 Κυτταρικές διαταραχές στη ΝΠΑ	41
2.7 Εργαστηριακά ευρήματα	43

2.8	Επιδημιολογικά δεδομένα	44
2.9	Κλινικές εκδηλώσεις	44
2.9.1	Απλαστική αναιμία (AA) και νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ)	50
2.9.2	Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) και νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία	50
2.9.3	Οξεία λευχαιμία και νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία	51
2.9.4	Λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα και νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία	51
2.10	Διαγνωστικές δοκιμασίες	52
2.10.1	Δοκιμασία του οξινισθέντος ορού	52
2.10.2	Δοκιμασία αιμόλυσης σε σουκρόζη	53
2.10.3	Μικροσωληνάρια γέλης <i>sephacryl</i>	53
2.10.4	Κυτταρομετρία ροής (KP)	54
2.10.5	FLAER (<i>Fluorescein—labeled proaerolysin variant</i>) Κυτταρομετρία	56
2.10.6	Έλεγχος μεταλλάξεων <i>PIG-A</i>	57
2.11	Εξέλιξη και πρόγνωση	57
2.12	Θεραπεία	58
2.12.1	Μεταμόσχευση μυελού των οστών	58
2.12.2	Μεταγγίσεις	59
2.12.3	Σίδηρος	59
2.12.4	Κορτικοειδή	60
2.12.5	Ερυθροποιητίνη	60
2.12.6	Σπληνεκτομή	60
2.12.7	Ανοσοκατασταλτική αγωγή	60
2.12.8	Ανδρογόνα	60
2.12.9	Αναστολείς συμπληρώματος	61
2.12.10	Αναστολείς του C5 και C3 κλάσματος του συμπληρώματος καθώς και της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος.	62
3.	ΝΕΦΡΟΣ	64
3.1	Ανατομία νεφρού	64
3.1.1	Ενδοθηλιακά κύτταρα	66
3.1.2	Ποδοκύτταρα	66
3.1.3	Μεσαγγειακά κύτταρα	66
3.1.4	Τοιχωματικά κύτταρα (<i>Parietal cells</i>)	66
3.2	Παραγωγή ούρων	67
3.3	Λειτουργίες νεφρού	68

3.4	Μέθοδοι ελέγχου της νεφρικής λειτουργίας	69
3.5	Νεφρική ανεπάρκεια	69
3.5.1	Οξεία νεφρική ανεπάρκεια	69
3.5.1.1	Αίτια	70
3.5.1.2	Παθοφυσιολογία	72
3.5.1.3	Κλινικές εκδηλώσεις	72
3.5.2	Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια	73
3.5.2.1	Παθοφυσιολογία	74
3.5.2.2	Αίτια	75
3.5.2.3	Κλινικές εκδηλώσεις	75
3.5.2.4	Αναιμία στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια	76
3.6	ΠΝΑ και νεφρική συμμετοχή	79
3.6.1	Ενδαγγειακή αιμόλυση	79
3.6.2	Νεφρική συμμετοχή	82
3.6.3	Μηχανισμός βλάβης στο νεφρό	83
	Βιβλιογραφία	98

Συντομογραφίες και ξενόγλωσσοι όροι:

ΣΑΚ: στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα
ΟΝΑ: Οξεία νεφρική ανεπάρκεια
ΧΝΑ: Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια
ΠΝΑ: Παροξυντική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία
MAC: Membrane attack complex
EPO: Erythropoietin
GFR : Glomerular Filtration Rate
RBF : Renal Blood Flow
MBL: mannose-binding lectin
PS: phosphatidyl-serine
ΔΕΚ: δικτυοερυθροκυττάρων
NO: nitric oxide
AGM: αορτή-γονάδες-μεσόνεφρος
NO: nitric oxide
BFU-E : Burst Forming Units-Erythroid
CFU-E: Colony Forming Units-Erythroid
SCF: παράγοντας των στελεχιαίων κυττάρων
G-CSF : αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων
VEGF: αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου
NK: Natural Killers
HnRNA: ετερογενή πυρηνικά RNA
ALA: 5-αμινολεβουλινικό οξύ
PBG: πορφοχολινογόνο
UPG: ουροπορφυρινογόνου I
CPG: κοπροπορφυρινογόνο
HCR: Haem- Controlled-Repressor
G-6PD: αφυδρογονάση της φωσφορικής 6 γλυκόζης
PIG-A: phosphatidylinositol glycan group A
GPI anchor: γλυκοσυλ-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη άγκυρα
PEA: phosphoethanolamine
MIRL : membrane inhibitor of reactive lysis
HRF20: homologous restriction factor 20
CD55-DAF: decay accelerating factor
ΔΕΣ: δικτυοενδοθηλιακό σύστημα
AA: Απλαστική αναιμία
ΜΔΣ: μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο
ΟΜΛ: Οξεία μυελογενής λευχαιμία
ΚΡ: Κυτταρομετρία ροής
FLAER: Fluorescein—labeled proaerolysin variant
Hx: hemorexin
ΑΜΠ: αιμοπετάλια
MDA: malondialdehyde
HNE: hydroxynonenal
LDH: Lactate Dehydrogenase

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Ο όρος αιμοποίηση αναφέρεται στο μηχανισμό με τον οποίο ο ανθρώπινος οργανισμός παράγει συνεχώς κύτταρα του αίματος (Stein, 1998). Περιλαμβάνει την αυτοανανέωση των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων (ΣΑΚ), τη δέσμευση ορισμένων προγονικών κυττάρων προς συγκεκριμένη κατεύθυνση διαφοροποίησης, τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων (πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα) και τη διαφοροποίηση τους προς συγκεκριμένα ώριμα κύτταρα του αίματος (Πάγκαλης, 2008).

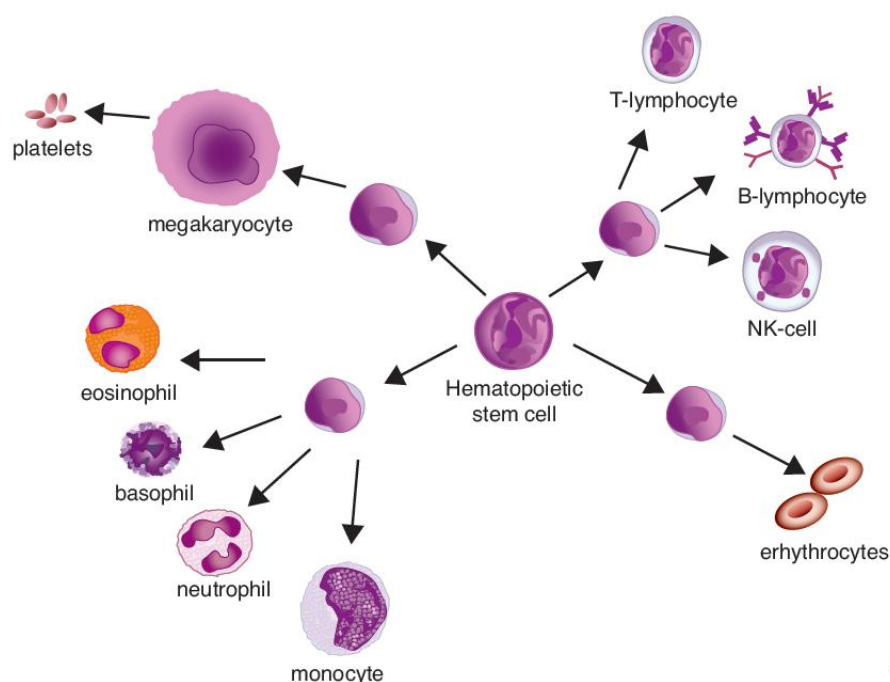


FIGURE 1:
Hematopoiesis.

Εικόνα 1.1 : Αιμοποίηση

Για την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού της αιμοποίησης αναγνωρίστηκαν τέσσερα διαμερίσματα αιμοποιητικών κυττάρων: το διαμέρισμα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, το διαμέρισμα των δεσμευμένων προγονικών κυττάρων, το διαμέρισμα των ωριμαζόντων προγονικών κυττάρων και το διαμέρισμα των ώριμων κυκλοφορούντων κυττάρων (Stein, 1998). Στον άνθρωπο, η αιμοποίηση ξεκινάει την τρίτη εβδομάδα της κύησης και πραγματοποιείται εξωεμβρυϊκά, στο λεκιθικό σάκο, όπου βρίσκονται τα πρώτα αιμοποιητικά κύτταρα. Αυτά προέρχονται από τους αιμαγγειοβλάστες, προγονικά κύτταρα που μπορούν να εξελιχθούν τόσο προς ενδοθηλιακά όσο και προς αιμοποιητικά κύτταρα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ίδια διεργασία πραγματοποιείται και σε μια περιοχή της πρωτοεμβρυϊκής αορτής,

που ονομάζεται αορτή-γονάδες-μεσόνεφρος (AGM). Ενδοεμβρυϊκά μετά την 27^η μέρα παράγονται αιμοποιητικά κύτταρα, όταν ομάδες στελεχειαίων κυττάρων του αίματος σχηματίζονται στην αορτή και στις τοξοειδείς αρτηρίες. Τα ΣΑΚ που προέρχονται από τον λεκιθικό, διαφοροποιούνται μόνο προς τη μυελική και την ερυθρά σειρά, ενώ αυτά που γεννώνται στο έμβρυο είναι και λεμφοποιητικά. Μετά την 5^η εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής, τα αιμοποιητικά κύτταρα μεταναστεύουν σε άλλες αιμοποιητικές περιοχές, με κυρίαρχο ρόλο να παίζει το εμβρυϊκό ήπαρ (Πάγκαλης, 2008). Μετά τη 10^η εβδομάδα της κύησης τα αιμοποιητικά κύτταρα μεταναστεύουν στις οστικές κοιλότητες και παραμένουν εκεί. Προς το τέλος της εμβρυϊκής ζωής η αιμοποίηση πραγματοποιείται σε ένα σύνθετο περιβάλλον μέσα στην κοιλότητα του μυελού των οστών (μικροπεριβάλλον αιμοποίησης), που αποτελεί και τη μοναδική θέση της αιμοποίησης μετά τη γέννηση.

Ο μυελός των οστών είναι χαλαρός συνδετικός ιστός και βρίσκεται μέσα στις μυελικές κοιλότητες (κυψέλες) των οστών. Κάθε κυψέλη επενδύεται με ενδόστεο. Ο μυελός των οστών αποτελείται από την τροφοφόρο αρτηρία, τις περιοστικές αρτηρίες, την κεντρική επιμήκη φλέβα, τα αρτηριόλια και τα κολποειδή (αποτελούν τις θέσεις αιμοποίησης). Τα κολποειδή επενδύονται με ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία περιβάλλονται από εξωτερική στιβάδα κυττάρων του δικτύου (μυοϊνοβλάστες). Μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και της έξω στιβάδας παρεμβάλλεται η βασική μεμβράνη. Ο λειτουργικός μυελός των οστών αποτελείται από το στρώμα και τα αιμοποιητικά κύτταρα. Το στρώμα (αποτελείται από κύτταρα και εξωκυττάρια ουσία), μαζί με τα αγγεία και τα κολποειδή σχηματίζουν το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, το οποίο ελέγχει την αιμοποίηση σε ενήλικα άτομα. Τα κύτταρα του στρώματος είναι τα δικτυοκύτταρα (ινοβλάστες), τα μακροφάγα, τα οστεοκύτταρα (αστεοβλάστες και αστεοκλάστες), τα λιποκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η εξωκυττάρια ουσία, που αποτελείται από κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες, φιβρονεκτίνη, υαλουρονικό οξύ και λαμνίνη, έχει ως ρόλο την οργάνωση του μικροπεριβάλλοντος του μυελού. Η οργάνωση επιτυγχάνεται με αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, κυτταροκινών και κυτταρικών στοιχείων που έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία "φωλιών", στις οποίες πραγματοποιείται η διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων (Πάγκαλης, 2008).

Στον ενήλικο άνθρωπο η παραγωγή των κυττάρων του αίματος πραγματοποιείται στο μυελό των οστών και ξεκινάει από το μη δεσμευμένο πολυδύναμο στελεχειαίο κύτταρο. Το κύτταρο αυτό δεν αναγνωρίζεται μορφολογικά μέσα στο πλήθος των κυττάρων του μυελού. Η ύπαρξή του όμως επιβεβαιώνεται λόγω της ικανότητάς του να επαναφέρει την αιμοποίηση, όταν ένα εναιώρημα φυσιολογικού μυελού χορηγηθεί σε πειραματόζωα, των οποίων ο μυελός έχει καταστραφεί με χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία. Ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το στελεχειαίο πολυδύναμο κύτταρο μπορεί να μοιάζει με μικρομυελοβλάστη και

αναγνωρίζεται από τις πρωτεΐνες-αντιγόνα που αναγνωρίζονται με ειδικούς αντιορούς στην επιφάνειά του (CD41, CD46, c-kit και sca 1). Επιπλέον, στα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ζωής φέρει και το αντιγόνο CD34, ενώ αυτό δεν διαπιστώνεται μετά την 19η εβδομάδα (CD34⁺). Τα αντιγόνα δύναται να ανιχνευθούν με κυτταρομετρία ροής και είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για την μέτρηση του αριθμού ΣΑΚ στο αίμα ή τον μυελό (Richards Goldsby, Thomas Kindt, Barbara Osborne, Janis Kubly). Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, με τη λειτουργία του, ρυθμίζει την τύχη των ΣΑΚ. Τα ΣΑΚ είναι στενά συνδεδεμένα με τους οστεοβλάστες (απαραίτητοι για τη διατήρηση και τον πολλαπλασιασμό τους, μέσω αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών N-cadherin και beta-catenin) και διαθέτουν την ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης. Με τη διαδικασία της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης το ΣΑΚ διαιρείται σε δύο θυγατρικά κύτταρα. Το ένα θυγατρικό κύτταρο παραμένει ως στελεχιαίο, ενώ το άλλο διαφοροποιείται για να παράγει ερυθρά ή λευκά αιμοσφαίρια ή αιμοπετάλια ή λεμφοκύτταρα. Τα στελεχιαία αιμοποιητικά κύτταρα παραμένουν στον μυελό σε φάση ηρεμίας (G₀), και εξασφαλίζουν την ισορροπία της αιμοποίησης πολλαπλασιαζόμενα. Ο πολλαπλασιασμός των ΣΑΚ συμβαίνει πολύ σπάνια, μία φορά κάθε 21 εβδομάδες. Με τον πολύ βραδύ ρυθμό πολλαπλασιασμού το στελεχιαίο αιμοποιητικό κύτταρο δεν εξαντλείται σύντομα.

Το πολυδύναμο στελεχιαίο κύτταρο έχει την ικανότητα να δίνει πολυδύναμα προγονικά κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται ολοένα και περισσότερο προς μονοδύναμα προγονικά κύτταρα. Αυτά συνεχίζουν να είναι ελάχιστα, χωρίς να μπορούν να ανιχνευθούν μορφολογικά, αλλά αναγνωρίζονται διότι σχηματίζουν αποικίες όταν εναιώρημα μυελού εμβολιαστεί σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα μονοδύναμα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς περιλαμβάνουν τα BFU-E και τα CFU-E και αναγνωρίζονται από τις ιδιόμορφες αποικίες που δημιουργούν σε άγαρ. Συγκεκριμένα, τα σχετικά άωρα κύτταρα σχηματίζουν αποικίες που μοιάζουν με έκρηξη (Burst Forming Units-Erythroid), ενώ τα περισσότερο ώριμα σχηματίζουν κανονικές αποικίες (Colony Forming Units-Erythroid). Έπειτα, τα CFU-E μετατρέπονται σε αναγνωρίσιμα κύτταρα (προερυθροβλάστες). Όλες οι παραπάνω διεργασίες ρυθμίζονται από ένα πλήθος εξωγενών παραγόντων. Στη μεμβράνη των εξελισσόμενων κυτταρικών σειρών εκφράζονται οι υποδοχείς αυτών των παραγόντων. Από τους παράγοντες αυτούς, σημαντικός είναι η ερυθροποιητίνη. Στη ρύθμιση συμμετέχουν επιπλέον και διάφοροι ενδογενείς παράγοντες, όπως ο GATA2 και ο GATA1, ο FOG-1, και ο NF-E2.

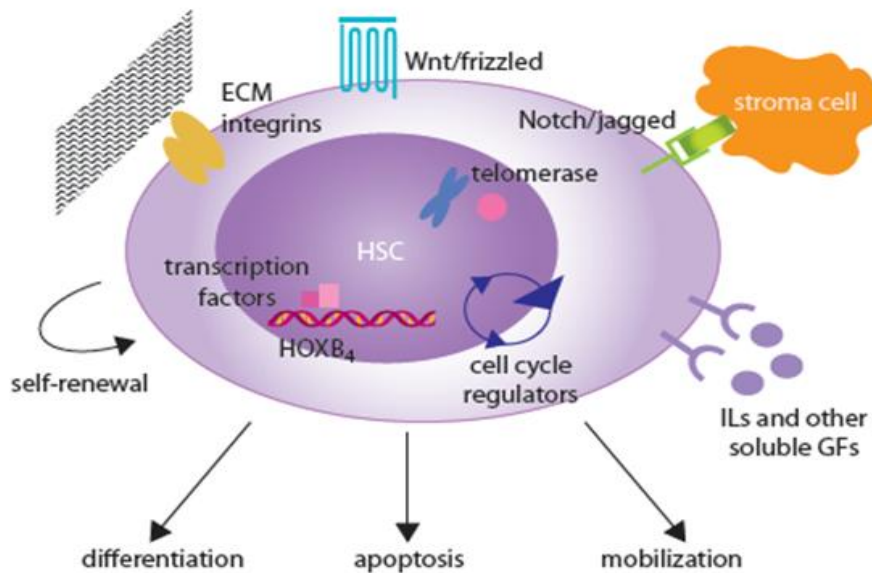
Τα μονοδύναμα κύτταρα των άλλων σειρών αναγνωρίζονται και αυτά διότι σχηματίζουν αποικίες σε καλλιέργειες υπό την επίδραση διαφόρων αυξητικών παραγόντων και περιλαμβάνουν τα κύτταρα CFU-GM (κοκκιώδης και μυελική σειρά), CFU-G (μυελική σειρά), CFU-Meg (μεγακαρυοκυτταρική σειρά) (Stein, 1998, Πάγκαλης, 2008).

1.2 Παράγοντες που ρυθμίζουν την αιμοποίηση

Η αιμοποίηση ρυθμίζεται από ενδοκυττάριους μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται αυτόνομα ή από διάφορους εξωγενείς παράγοντες, που εμφανίζονται διαδοχικά ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησης (κυτταροκίνες, ιντερλευκίνες κ.α). Στους αιμοποιητικούς παράγοντες περιλαμβάνονται ο παράγοντας των στελεχιαίων κυττάρων (SCF), ο αυξητικός παράγοντας των κοκκιοκυττάρων (G-CSF), η ερυθροποιητίνη, η θρομβοποιητίνη, ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF), το σύστημα αγγειοποιητίνης 1, που βρίσκεται στην επιφάνεια των οστεοβλαστών, η ιντερλευκίνη 8, το σύστημα αλληλεπίδρασης μεταξύ οστεοβλαστών και στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων Jagged 1 (συνδέτης που βρίσκεται στην επιφάνεια των οστεοβλαστών) και διάφορες άλλες ομάδες πρωτεϊνών. Οι παράγοντες αυτοί εκκρίνονται από τα κύτταρα του στρώματος και είναι διαλυτοί ή συνδεδεμένοι με τη μεμβράνη. Εξάιρεση αποτελούν η ερυθροποιητίνη, που εκκρίνεται από τα κύτταρα του νεφρού, και η θρομβοποιητίνη, που συντίθεται στο ήπαρ.

Η διαδικασία ξεκινάει με τη σύνδεση των κυτταροκινών (βιολογικά δραστικό προϊόν) σε υποδοχείς που αναπτύσσονται, διαδοχικά, στην επιφάνεια των εξελισσόμενων προγονικών κυττάρων. Η σύνδεση των κυτταροκινών στους υποδοχείς ενεργοποιεί την ενδομεμβρανική πλευρά του υποδοχέα (οι υποδοχείς συνήθως είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες) και αυτή, μεταφέρει το σήμα και ενεργοποιεί άλλες ενδοκυττάριες πρωτεΐνες (μεταγωγή σήματος).

Στη συνέχεια, οι τελικοί ενεργοποιημένοι διαβιβαστές από το κυτταρόπλασμα εισέρχονται στον πυρήνα, συνδέονται με το σύμπλεγμα της πολυμεράσης επάνω στις κατάλληλες νουκλεοτιδικές ακολουθίες (υποκινητές) και ξεκινούν τη σύνθεση πρωτεϊνών, με τις οποίες το κύτταρο επιτελεί τις λειτουργίες του, δηλαδή τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Η δράση των παραγόντων αυτών μπορεί να είναι αυξητική (αυξητικοί παράγοντες), ανασταλτική ή αντι-αποπτωτική. Η απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) είναι σημαντική ιδιότητα των κυττάρων κατά την οποία όταν τα κύτταρα υποστούν ανεπανόρθωτες βλάβες, ενεργοποιούν μια σειρά πρωτεολυτικών ενζύμων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την καταστροφή τους. Ανάμεσα στις δράσεις των αυξητικών παραγόντων είναι η διαφοροποίηση, η προαγωγή των λειτουργιών των κυττάρων στόχων, όπως π.χ. η φαγοκυττάρωση και η ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων των αιμοποιητικών κυττάρων με τα στοιχεία του μικροπεριβάλλοντος. Αν και η δράση των αυξητικών παραγόντων αναμένεται να ασκείται επιλεκτικά σε μια σειρά, συνήθως επεκτείνεται και σε άλλες σειρές, όπου ενισχύει την δράση των ειδικών για αυτές παραγόντων. Σε άλλες περιπτώσεις μία κυτταροκίνη που εκκρίνεται από ένα κύτταρο του στρώματος μπορεί να διεγείρει ή να ενισχύσει την έκκριση μιας άλλης κυτταροκίνης από ένα άλλο κύτταρο του μικροπεριβάλλοντος. (Stein, 1998, Πάγκαλης, 2008).



Εικόνα 1.2: Μοριακή βάση της αιμοποίησης.

1.3 Κύτταρα του αίματος

Οι κύριες ομάδες κυττάρων είναι οι εξής:

- Τα ερυθροκύτταρα, τα οποία είναι απύρρηνα κύτταρα γεμάτα με αιμοσφαιρίνη (μεταφορά οξυγόνου),
- τα κοκκιοκύτταρα και τα μονοκύτταρα με πολύλοβους πυρήνες και κυτταρόπλασμα γεμάτο από κοκκία (άμεση άμυνα),
- τα λεμφοκύτταρα (άμεση και έμμεση άμυνα, ανοσία),
- τα αιμοπετάλια, τα οποία είναι απύρρηνα θραύσματα μεγαλύτερων κυττάρων του μυελού απαραίτητα στον αιμοστατικό μηχανισμό.

Η τελική διαφοροποίηση προς κύτταρα της ερυθράς, της κοκκιώδους (μυελικής), και της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς ξεκινάει με τη δέσμευση των μονοδύναμων κυττάρων στον μυελό. Τα λεμφοειδή κύτταρα ακολουθούν άλλη οδό διαφοροποίησης, που πραγματοποιείται στο θύμο αδένι και τους λεμφαδένες.

1.3.1 Ερυθρά αιμοσφαίρια

Τα πρώτα αναγνωρίσιμα κύτταρα της ερυθράς είναι οι προερυθροβλάστες.

Ο προερυθροβλάστης είναι ένα μεγάλο κύτταρο, με στρογγυλό πυρήνα που περιέχει αδρό δίκτυο χρωματίνης ενώ συχνά σε αυτό υπάρχουν μικρά ψευδοπόδια. Ο προερυθροβλάστης πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται προς βασεόφιλο ερυθροβλάστη, το οποίο είναι ελαφρά μικρότερο κύτταρο, στρογγυλό, με πυκνότερο πυρήνα, του οποίου η χρωματίνη παίρνει τροχοειδή διάταξη. Στη

συνέχεια ακολουθεί ο πολυχρωματόφιλος και έπειτα ο οξύφιλος ερυθροβλάστης, όπου το κυτταρόπλασμα γίνεται προοδευτικά οξύφιλο και ροδίζει (λόγω πλήρωσης με αιμοσφαιρίνη), ενώ ο πυρήνας πυκνώνει περισσότερο και γίνεται ένα βαθύχρωμο σφαιροειδές μόρφωμα. Στο τελικό στάδιο, έπειτα από συσπάσεις του κυτταροπλάσματος και πτυχώσεις, ο πυρήνας αποβάλλεται και προκύπτει το δικτυοερυθροκύτταρο (λόγω των υπολειμμάτων του πυρήνα που δίνουν την εικόνα δικτύου), το οποίο αποδίδεται στην κυκλοφορία αφού παραμένει μία ή δύο ημέρες στο μυελό των οστών. Η διαδικασία ωρίμανσης των πρόδρομων μορφών της ερυθράς σειράς διαρκεί 5 ημέρες περίπου. Τα δικτυοερυθροκύτταρα αφού απελευθερωθούν στην κυκλοφορία, διατηρούν τη μορφολογία τους για μια ακόμα ημέρα. Στη συνέχεια, χάνουν τα ριβοσώματα, τα μιτοχόνδρια και άλλα οργανίδια από το κυτταρόπλασμά τους και μετατρέπονται σε ώριμα ερυθροκύτταρα. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι κύτταρα με υψηλή εξειδίκευση. Η κύρια λειτουργία τους είναι η μεταφορά του οξυγόνου που προσλαμβάνεται από τους πνεύμονες και του διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται από τα κύτταρα μέσω της πρωτεΐνης τους, που ονομάζεται αιμοσφαιρίνη. Τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα έχουν σχήμα αμφίκιουλου δίσκου και σε αυτά η αιμοσφαιρίνη διατάσσεται περιμετρικά. Όλα τα ερυθροκύτταρα είναι ισόχρωμα και ισομεγέθη. Το σχήμα τους και το μικρό τους μέγεθος προσδίδουν σε αυτά μια υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο, έτσι ώστε το οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα να μπορούν να διαχέονται γρήγορα προς και από το εσωτερικό του κυττάρου. Η μεμβράνη τους αποτελείται από πολυσακχαρίδια και πρωτεΐνες που διαφέρουν από άτομο σε άτομο και σχετίζονται με την ομάδα αίματος. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια αποτελούν περισσότερο από το 99% των κυττάρων του αίματος. Η παραγωγή των ερυθροκυττάρων απαιτεί αμινοξέα, λιπίδια και υδατάνθρακες και στοιχεία όπως ο σίδηρος, το φυλλικό οξύ και η βιταμίνη B12. Η μέση διάρκεια ζωής ενός ερυθροκυττάρου είναι περίπου 120 ημέρες. Η καταστροφή των ερυθροκυττάρων πραγματοποιείται στον σπλήνα και στο ήπαρ (Vender, Sherman, Luciano, Τσακόπουλος)

1.3.2 Κοκκιώδης (μυελική) σειρά

Το πρώτο αναγνωρίσιμο κύτταρο της κοκκιώδους σειράς ονομάζεται μυελοβλάστης. Ο μυελοβλάστης είναι ένα μεγάλο κύτταρο με γαλάζιο πρωτόπλασμα χωρίς κοκκία και μεγάλο πυρήνα. Η χρωματίνη του πυρήνα σχηματίζει λεπτό δίκτυο μέσα στο οποίο αναγνωρίζονται ένα ή δύο πυρήνια. Στην πορεία ο μυελοβλάστης εξελίσσεται προς προμυελοκύτταρο, το οποίο έχει μεγαλύτερο μέγεθος, πυκνότερο πυρήνα και το πρωτόπλασμά του γεμίζει με αδρά βαθυκύανα κοκκία. Έπειτα, το προμυελοκύτταρο διαφοροποιείται προς μυελοκύτταρο, με τον πυρήνα του να γίνεται πιο πυκνός, ενώ το πρωτόπλασμά του, το οποίο αποκτά ρόδινο χρώμα, αρχίζει να γεμίζει με κοκκία, που καθορίζουν και την περαιτέρω εξέλιξή του ως ουδετερόφιλο μεταμυελοκύτταρο, ηωσινόφιλο

μεταμυελοκύτταρο και βασεόφιλο μεταμυελοκύτταρο. Καθώς εξελίσσεται το μυελοκύτταρο, ο πυρήνας του γίνεται επιμήκης και αποκτά τη μορφή ραβδίου στο ραβδοπύρρηνο κύτταρο. Τελικά, ο πυρήνας των ραβδοπύρρηνων κυττάρων κατατέμνεται σε δύο ή περισσότερους λοβούς και τα παράγωγα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα, που χαρακτηρίζονται σύμφωνα με τα κοκκία που περιέχουν (ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα), αποδίδονται στην κυκλοφορία για να επιτελέσουν τις λειτουργίες τους.

1.3.3 Μονοκύτταρα

Η εξέλιξη της σειράς των μονοκυττάρων είναι παρόμοια. Το πρωιμότερο αναγνωριζόμενο κύτταρο είναι το προμονοκύτταρο. Έχει διάμετρο 15-20 μm , ο πυρήνας του είναι ωσειδής και έχει 2 έως 5 πυρήνια. Το προμονοκύτταρο εξελίσσεται σε μονοκύτταρο, το οποίο είναι λίγο μικρότερο σε μέγεθος από το προμονοκύτταρο και δεν έχει εμφανή πυρήνια. Το μονοπύρρηνο διαφοροποιείται σε μακροφάγο, όταν μεταναστεύσει στους ιστούς. Το μακροφάγο έχει μεγαλύτερο μέγεθος από το μονοκύτταρο. Έχει ακανόνιστα κυτταροπλασματικά όρια, συχνά με κενोटόπια και ψευδοπόδια. Ο χρόνος ζωής των μονοκυττάρων στο αίμα είναι 8,5 ώρες, ενώ όταν περάσουν στους ιστούς μπορούν να παραμείνουν για μήνες.

1.3.4 Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια αποτελούν τμήματα του πρωτοπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων. Η προγονική μορφή των μεγακαρυοκυττάρων είναι η μεγακαρυοβλάστη. Η μεγακαρυοβλάστη είναι ένα κύτταρο με βαθύχρωμο πρωτόπλασμα, συχνά διαθέτει ψευδοπόδια, ενώ ο πυρήνας της είναι πυκνός και σκοτεινός. Αυτή εξελίσσεται προς άωρο μεγακαρυοκύτταρο, που είναι πολύ μεγαλύτερο από όλα τα άλλα κύτταρα του μυελού, έχει πλούσιο κυτταρόπλασμα και σαφές περίγραμμα. Ο πυρήνας του άωρου μεγακαρυοκυττάρου είναι μονήρης και στρογγυλός στην αρχή και διαιρείται μέσα στο κύτταρο χωρίς αυτό να προχωρεί σε μίτωση. Στην πορεία καταλήγει στο ώριμο μεγακαρυοκύτταρο (διαδικασία που διαρκεί 5 ημέρες στο μυελό των οστών), το οποίο είναι πολύ μεγάλο και πολυπύρρηνο με πρωτόπλασμα, δεν εξέρχεται στην κυκλοφορία και κατατέμνεται άτακτα αποδίδοντας μικρά θραύσματα που αποτελούν τα αιμοπετάλια. Ο μέσος χρόνος επιβίωσής των αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία είναι 8-11 ημέρες. Όσα αιμοπετάλια δεν χρησιμεύουν για να διατηρήσουν την ακεραιότητα των αγγείων ή στην αιμόσταση, απομακρύνονται μέσω του συστήματος μονοκυττάρων-μακροφάγων. (Πάγκαλης, 2008).

1.3.5 Λεμφοκύτταρα

Η λεμφική κυτταρική σειρά προέρχεται από το πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο που βρίσκεται στο μυελό των οστών. Το προγονικό κύτταρο του λεμφοκυττάρου διαφοροποιείται και ωριμάζει στο κατάλληλο μικροπεριβάλλον σε 3 τύπους λεμφοκυττάρων, τα Β-λεμφοκύτταρα, τα Τ- λεμφοκύτταρα και τα ΝΚ κύτταρα (Natural Killers). Η λεμφοποίηση διακρίνεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη, η οποία είναι αντιγονοανεξάρτητη, λαμβάνει χώρα στα πρωτογενή λεμφικά όργανα (μυελό των αστών, θύμος αδένας, εμβρυϊκό ήπαρ, λεκιθικός σάκος και παρααορτική περιοχή). Εκεί αναπτύσσονται τα Β και Τ λεμφοκύτταρα. Η δεύτερη, η οποία είναι αντιγονοεξαρτώμενη, λαμβάνει χώρα στα δευτερογενή λεμφικά όργανα (λεμφαδένες, σπλήνας, λεμφικά όργανα της εντερικής και αναπνευστικής οδού).

Η μητρική μορφή των λεμφοκυττάρων του μυελού ονομάζεται λεμφοβλάστης. Πρόκειται για ένα μεγάλο στρογγυλό κύτταρο με βαθυκύανο πρωτόπλασμα και μεγάλο πυρήνα. Ο πυρήνας συχνά περιορίζει το πρωτόπλασμα σε μια στεφάνη και μπορεί να διαθέτει ένα ή δύο πυρήνια, λιγότερο ευκρινή από εκείνα του μυελοβλάστη. Ο λεμφοβλάστης εξελίσσεται προς προλεμφοκύτταρο και στη συνέχεια σε λεμφοκύτταρο. Τα λεμφοκύτταρα είναι μικρά και στρογγυλά κύτταρα με πυκνό πυρήνα, ο οποίος περιβάλλεται από λιγοστό πρωτόπλασμα. Μερικά λεμφοκύτταρα είναι μεγαλύτερα και περιέχουν αδρά αζουρόφιλα κοκκία. (Πάγκαλης, 2008).

Στην παθοφυσιολογία της ΠΝΑ κύριο λόγο κατέχει το ερυθρό αιμοσφαίριο, του οποίου κύριο δομικό συστατικό είναι η αιμοσφαιρίνη.

1.4 ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ

Η κύρια πρωτεΐνη των ερυθρών είναι η αιμοσφαιρίνη, με την οποία ενώνεται το οξυγόνο και σε μικρότερο βαθμό το διοξείδιο του άνθρακα. Το οξυγόνο ενώνεται με τα άτομα σιδήρου (Fe), τα οποία βρίσκονται σε ένα μόριο αιμοσφαιρίνης. Η αιμοσφαιρίνη αποτελείται από την αίμη (πορφυρίνη και Fe^{++}) και τη σφαιρίνη. Η σφαιρίνη συνίσταται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες είναι ανά δύο όμοιες μεταξύ τους. Κάθε αλυσίδα φέρει μια μοριακή ομάδα, την αίμη και ένα πολυπεπτίδιο συνδεδεμένο με την αίμη. Οι αιμοσφαιρίνες του ενήλικου ατόμου διαφέρουν από αυτές του εμβρύου. Η κύρια αιμοσφαιρίνη κατά την ενήλικη ζωή είναι η HbA, η οποία αποτελείται από δύο α και δύο β πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ενώ σε μικρό ποσοστό απαντάται η αιμοσφαιρίνη HbA₂ (αποτελείται από δύο α και δύο δ πολυπεπτιδικές αλυσίδες). Σε φυσιολογικό ενήλικο άτομο η αιμοσφαιρίνη HbA απαντάται σε ποσοστό άνω του 97%, αντίθετα σε ποσοστό λιγότερο από 3% απαντάται η HbA₂. Η κύρια αιμοσφαιρίνη κατά την εμβρυϊκή ηλικία είναι η HbF με

σύσταση $\alpha_2\gamma_2$, δηλαδή αποτελείται από δύο α και δύο γ πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF) στην ηλικία των 6 εβδομάδων καλύπτει περίπου το 30% του συνόλου των αιμοσφαιρινών του εμβρύου, ενώ στην ηλικία των 10 εβδομάδων φθάνει στο 90%. Ίχνη της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης HbF υπάρχουν και κατά την ενήλικη ζωή.

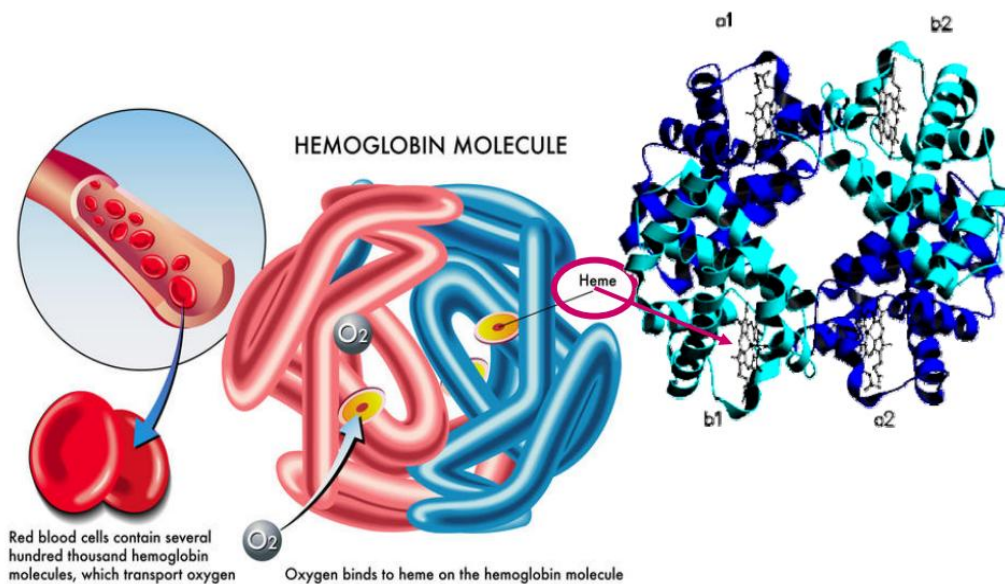
1.4.1 Δομή της αιμοσφαιρίνης

Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης διαθέτει:

A. Πρωτοταγή δομή, που καθορίζεται από το είδος και την αλληλουχία των αμινοξέων της. Η α αλυσίδα αποτελείται από 141 και η β αλυσίδα από 146 αμινοξέα.

B. Δευτεροταγή δομή που καθορίζεται από την ελικοειδή συστροφή της γύρω από τον άξονά της (α έλικα). Η ελικοειδής συστροφή δεν εκτείνεται σε όλο το μήκος της αλυσίδας, αλλά σε ορισμένα τμήματα αυτής. Τα ελικοειδή τμήματα είναι οκτώ (A, B, C, D, E, F, G, H) . Αυτά χωρίζονται από επτά μη συνεστραμμένα τμήματα αλληλουχιών αμινοξέων. Τα μη ελικοειδή τμήματα είναι εύκαμπτα και επιτρέπουν την αναδίπλωση της αλυσίδας.

Γ. Τριτοταγή δομή, η οποία διαμορφώνεται με την αναδίπλωση της αλυσίδας δίνοντάς της συγκεκριμένη στερεοχημική διαμόρφωση στο χώρο. Η δομή αυτή συγκροτείται με μη ειδικούς δεσμούς (δεσμοί υδρογόνου, δεσμοί ηλεκτρονίων, δυνάμεις van der Waals). Κάθε α αλυσίδα συνδέεται και με τις δύο β αλυσίδες. Η σύνδεση με τη μία β αλυσίδα είναι ισχυρότερη σε σχέση με τη σύνδεση με την άλλη. Σε κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα λόγω των πολλαπλών αναδιπλώσεων δημιουργούνται διάφορα εσωτερικά και εξωτερικά ελικοειδή τμήματα. Το μόριο της αίμης εντοπίζεται μεταξύ των E και F ελίκων κάθε σφαιρίνης. Στο σημείο συμβολής των τεσσάρων πολυπεπτιδικών αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης δημιουργείται μία μικρή κοιλότητα στην οποία εισέρχεται και εξέρχεται ένα μόριο 2,3-DPG κάθε φορά που η αίμη αποδίδει και δεσμεύει αντίστοιχα το οξυγόνο.



Εικόνα 1.3 : Δομή της αιμοσφαιρίνης

Δ. Τεταρτοταγή δομή, η οποία είναι αποτέλεσμα της αναδίπλωσης των υπομονάδων της που διατηρούνται σε αυτή τη θέση μέσω δεσμών αλάτων, υδρόφοβων δεσμών και δεσμών υδρογόνου.

(Πάγκαλης, 2008, Richards Goldsby, Thomas Kindt, Barbara Osborne, Janis Kuby).

1.4.2 Σύνθεση σφαιρινικών αλυσίδων

Η βιοσύνθεση των σφαιρινών πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα των ερυθροβλαστών και των δικτυοερυθροκυττάρων και συγκεκριμένα οι πεπτιδικές τους αλυσίδες κατασκευάζονται στα ριβοσώματα. Από το σύνολο του γενετικού υλικού των ερυθροβλαστών για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης μόνο το 5%-10% είναι μεταγραφικά ενεργό. Οι περιοχές αυτές του DNA αποτελούν την ευχρωματίνη του πυρηνικού υλικού. Αντίθετα, τα γονίδια που δεν είναι μεταγραφικά ενεργά έχουν έναν αυξημένο αριθμό μεθυλιωμένων νουκλεοτιδίων και δεν είναι ευαίσθητα στην πέψη με νουκλεάσες. Τα λειτουργικά γονίδια σε όλα τα είδη αποτελούνται από 3 εξώνια. Το δεύτερο εξώνιο είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση των περιοχών που σχηματίζουν την εσοχή, όπου συνδέεται η αίμη. Το τρίτο εξώνιο περιλαμβάνει τις περιοχές σύνδεσης με άλλα μόρια αιμοσφαιρινών. Όλα τα γονίδια των αιμοσφαιρινών προέρχονται από ένα μοναδικό αρχέγονο γονίδιο (μηχανισμός διπλασιασμού και απόκλισης). Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο ομάδες γονιδίων που είναι υπεύθυνες για τη σύνθεση των αιμοσφαιρινών, η α περιοχή (περιλαμβάνει το εμβρυονικό γονίδιο ζ και 2 α γονίδια) και η β περιοχή (αποτελείται από τα γονίδια ε, Gγ, Aγ, δ και β) (Πάγκαλης, 2008). Κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του κυττάρου, τα γονίδια ενεργοποιούνται από την εμφάνιση περιοχών ευαίσθητων στις νουκλεάσες.

Η βιοσύνθεση των σφαιρινικών αλυσίδων δε διαφέρει αρκετά από τη διαδικασία σύνθεσης των πρωτεϊνών. Περιλαμβάνει:

α. τη μεταγραφή (transcription) κατά την οποία παράγεται το αγγελιοφόρο RNA (mRNA).

β. την ωρίμανση (processing).

γ. τη μεταφορά (transport) του mRNA στο κυτταρόπλασμα και

δ. τη μετάφραση του mRNA στα ριβοσώματα.

Στη σύνθεση του RNA παίρνουν μέρος ένζυμα που καλούνται RNA πολυμεράσες. Αρχικά συντίθεται μια πρόδρομη μορφή του σφαιρινικού mRNA που είναι δυο με τρεις φορές μεγαλύτερη σε μήκος από το τελικό μόριο που χρησιμοποιείται ως καλούπι για την πρωτεϊνική σύνθεση. Αυτά τα πρόδρομα μόρια καλούνται ετερογενή πυρηνικά RNA (HnRNA) και έχουν σχετικά μικρούς χρόνους ημιζωής, περίπου 15 με 30 λεπτά. Τα HnRNA υφίστανται ωρίμανση ώστε να μετατραπούν στα τελικά mRNA.

Η διαδικασία της ωρίμανσης του mRNA περιλαμβάνει

α. την προσθήκη καλύμματος στο 5' άκρο (capping): είναι η διαδικασία τροποποίησης του 5' άκρου του mRNA, αμέσως μετά τη μεταγραφή, με την προσθήκη αδενίνης η οποία μαζί με τα επόμενα δυο νουκλεοτίδια μεθυλιώνεται.

β. την προσθήκη poly A ουράς (αποτελείται από 150 βάσεις αδενίνης) στο 3' άκρο

γ. την αποκοπή, την απομάκρυνση των εσωνίων (introns) και στη συνέχεια τη συρραφή των εξωνίων (splicing).

Η προσθήκη καλύμματος στο 5' άκρο και η προσθήκη poly A ομάδας στο 3' άκρο εξασφαλίζουν τη σταθερότητα του mRNA. Η διαδικασία της ωρίμανσης του πρόδρομου mRNA είναι γρήγορη. Το ώριμο mRNA έχει μήκος 650 νουκλεοτίδια. Η περιοχή του mRNA που μεταφράζεται βρίσκεται μεταξύ του κωδικονίου έναρξης AUG (κωδικοποιεί το αμινοξύ μεθειονίνη), από το οποίο ξεκινάει η μετάφραση, και του κωδικονίου λήξης UAA.

Η μετάφραση περιλαμβάνει τρεις φάσεις. Αυτές είναι η έναρξη, η επιμήκυνση και η λήξη, όπου η ολοκληρωμένη πρωτεϊνική αλυσίδα απελευθερώνεται. Η διαδικασία πραγματοποιείται από το 5' προς το 3' άκρο του mRNA. Όταν το ριβόσωμα, το οποίο μετακινείται κατά μήκος του mRNA, συναντήσει ένα από τα κωδικόνια λήξης, UAG, UGA ή UAA, μεταδίδεται το σήμα του τερματισμού, η αλυσίδα ελευθερώνεται και το σύμπλεγμα ριβόσωμα - mRNA αναλύεται στις ριβοσωμικές υπομονάδες και mRNA.

Η ποσότητα και η σταθερότητα του αντίστοιχου mRNA καθορίζει την αναλογία των σφαιρινικών αλυσίδων. Δεν αρκεί όμως μόνο αυτό καθώς στη συνέχεια παρεμβαίνουν και άλλοι δευτερεύοντες ρυθμιστικοί μηχανισμοί που λειτουργούν στα διάφορα επίπεδα λειτουργίας του mRNA (ωρίμανση, μεταφορά και μετάφραση στα ριβοσώματα).

Το mRNA της α αλυσίδας είναι 1,5 φορές περισσότερο από το mRNA της β αλυσίδας. Στην πραγματικότητα όμως η παραγωγή των α και β αλυσίδων είναι πρακτικά ίση. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η μετάφραση του β mRNA γίνεται ταχύτερα από του α mRNA με αποτέλεσμα την παραγωγή περισσότερων β αλυσίδων συγκριτικά με τις α αλυσίδες. Σε αυτό συμβάλλει και η μεγαλύτερη ευαισθησία της ελεύθερης α αλυσίδας στα πρωτεολυτικά ένζυμα του κυτταροπλάσματος.

1.4.3 Αίμη

Η αίμη αποτελεί το μη πρωτεϊνικό τμήμα της αιμοσφαιρίνης. Είναι ένα παράγωγο πορφυρινών (σιδηροπρωτοπορφυρίνη) και αποτελείται από έναν επίπεδο τετραπυρολικό δακτύλιο που συνδέεται με ένα άτομο σιδήρου στο κέντρο. Τα κυριότερα όργανα σύνθεσης της αίμης είναι ο μυελός των οστών και το ήπαρ, η μεγαλύτερη βιοσυνθετική δραστηριότητα παρατηρείται στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα, ενώ μικρότερα ποσά αίμης συνθέτουν και πολλά άλλα όργανα όπως οι νεφροί, ο σπλήνας, η καρδιά, ο εγκέφαλος και οι μύες. Η σύνθεση της αίμης ολοκληρώνεται σε οκτώ διαδοχικά στάδια μέσα ή έξω από τα μιτοχόνδρια με την καταλυτική δράση συγκεκριμένων ενζύμων. Το πρώτο και το τελευταίο στάδιο πραγματοποιούνται στο μιτοχόνδριο, ενώ τα ενδιάμεσα στάδια λαμβάνουν χώρα στο κυτταρόπλασμα ή στην κυτταρική μεμβράνη.

Τα στάδια σύνθεσης της αίμης είναι τα εξής:

Κατά την πρώιμη μιτοχονδριακή φάση η γλυκίνη και το ηλεκτρυλοσυνένζυμο Α (προέρχεται από τον κύκλο του κιτρικού οξέος) συνδέονται και σχηματίζουν ένα αμινοκετοξύ με 5 άτομα άνθρακα, το 5-αμινολεβουλινικό οξύ (ALA), με την επίδραση του ενζύμου ALA συνθετάση (ALA-S). Το ένζυμο αυτό αποτελεί το κύριο σημείο ρύθμισης της βιοσυνθετικής οδού, καθώς η δράση του αναστέλλεται από το τελικό προϊόν της οδού. Δηλαδή, η περίσσεια της αίμης μέσα στο κύτταρο καταστέλλει την ALA-S, ενώ η έλλειψή της τη διεγείρει (αρνητικό feedback).

Η κυτταροπλασματική φάση πραγματοποιείται σε τρία στάδια:

Α. Δυο μόρια ALA ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν, παρουσία της αφυδρογονάσης του 5-ALA, το πορφοχολινογόνο (PBG).

Β. Τέσσερα μόρια πορφοχολινογόνου ενώνονται μεταξύ τους και με τη δράση των ενζύμων ουρο-Ι-συνθετάση και PBG- απαμινάση σχηματίζουν ένα μόριο ουροπορφυρινογόνου Ι (UPG). Από αυτό στη συνέχεια θα προέλθει το ουροπορφυρινογόνο ΙΙΙ με την παρέμβαση μιας ισομεράσης.

Γ. Κατά το τελευταίο στάδιο αφαιρούνται διαδοχικά τέσσερις καρβοξυλικές ομάδες από το οκτακαρβοξυλικό UPG ώστε να σχηματιστεί το τετρακαρβοξυλικό κοπροπορφυρινογόνο (CPG). Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο αποκαρβοξυλάση του ουροπορφυρινογόνου(URO-P).

Στη συνέχεια ακολουθεί η όψιμη μιτοχονδριακή φάση. Στη φάση αυτή το κοπροπορφυρινογόνο III εισέρχεται στο μιτοχόνδριο, όπου σχηματίζεται ο δακτύλιος πρωτοπορφυρίνης με τη δράση της οξειδάσης του κοπροπορφυρινογόνου. Η δράση της δράση της οξειδάσης του κοπροπορφυρινογόνου οδηγεί στην παραγωγή πρωτοπορφυρίνης IX. Με τη βοήθεια της σιδηροχληλατάσης σχηματίζεται η ένωση της πρωτοπορφυρίνης με το σίδηρο (αίμη). Η αίμη εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα όπου συνδέεται με τις αλυσίδες της σφαιρίνης προς σχηματισμό της αιμοσφαιρίνης.

Η αίμη έχει ρυθμιστικό ρόλο τόσο στη σύνθεσή της όσο και στη σύνθεση της σφαιρίνης σε όλα τα επίπεδα. Στο επίπεδο της μεταγραφής αυξάνει την παραγωγή του σφαιρινικού mRNA. Στο επίπεδο της μετάφρασης προάγει τη σύνθεση των αλυσίδων (κυρίως της α αλυσίδας) και βοηθάει στην προστασία τους από τα πρωτεολυτικά ένζυμα.

Η κύρια επίδραση της αίμης στη σύνθεση της σφαιρίνης ασκείται στη φάση της έναρξης της μετάφρασης του mRNA. Όταν απουσιάζει η αίμη παράγεται ένας αναστολέας HCR (Haem- Controlled-Repressor) που λειτουργεί όπως μια πρωτεϊνική κινάση και εμποδίζει το συμπλέγμα έναρξης (αποτελείται από τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα και τον παράγοντα έναρξης, μεθειονυλ-tRNA) να σχηματιστεί. Ο HCR επιβραδύνει τη μετάφραση του σφαιρινικού mRNA στα ριβοσώματα και κυρίως του α mRNA.

(Πάγκαλης, 2008, Ponka P, 1999)

1.5 Σίδηρος

Ο σίδηρος (Fe) αποτελεί το απαραίτητο στοιχείο για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό όλων των ανθρώπινων κυττάρων. Έχει σημαντικό ρόλο σε μεταβολικές κυτταρικές διεργασίες όπως, στη σύνθεση του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών, στη μεταφορά των ηλεκτρονίων, στην κυτταρική αναπνοή (σε αυτόν δεσμεύεται το οξυγόνο μέσα στο ερυθροκύτταρο), στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση καθώς και στη ρύθμιση της έκφρασης πολλών γονιδίων (Πάγκαλης, 2008, Prem Ponka, 1999). Ο σίδηρος υπάρχει σε δύο μορφές, τη δισθενή (Fe^{2+}) και την τρισθενή (Fe^{3+}), όπου μπορεί και μετατρέπεται από τη μία μορφή στην άλλη ανάλογα με την ικανότητά του να αποβάλλει ή να προσλαμβάνει ηλεκτρόνια. Αυτή η ιδιότητα τον καθιστά πολύτιμο για τα κυτταρικά ένζυμα αλλά και επικίνδυνο για το κύτταρο, καθώς η αναγωγή του οξυγόνου (O_2) από τον Fe^{2+} οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδικού ανιόντος (O^{2-}), το οποίο σχηματίζει υδροξυλικές ρίζες ($\text{OH}^\cdot$). Οι ελεύθερες ρίζες O^{2-} και $\text{OH}^\cdot$ είναι τοξικές και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε δομές του κυττάρου (Prem Ponka, 1999).

Ο σίδηρος βρίσκεται σχεδόν πάντα δεσμευμένος με κάποια πρωτεΐνη. Στο πλάσμα τον βρίσκουμε συνδεδεμένο με την τρανσφερρίνη ενώ μέσα στα κύτταρα

αποθηκεύεται με τη μορφή της φερριτίνης. Στον οργανισμό απαντάται σε τρεις μορφές: (α) Λειτουργικός σίδηρος, ο οποίος βρίσκεται στους αναπτυσσόμενους ερυθροβλάστες και στα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια, στη μυοσφαιρίνη και σε μία σειρά ενζύμων, όπως κυτοχρώματα, καταλάσες, υπεροξειδάσες, ριβονουκλεοτιδική αναγωγή, μεταλλοφλαβοπρωτεΐνες. (β) Σίδηρος μεταφοράς, ο οποίος βρίσκεται συνδεδεμένος με την τρανσφερρίνη και διακινείται μέσω του πλάσματος και του εξωκυττάριου υγρού για να καλύψει τις ανάγκες των ιστών. (γ) Σίδηρος αποθήκευσης, ο οποίος βρίσκεται στα ηπατοκύτταρα και στα μακροφάγα του ήπατος, του μυελού των οστών, του σπλήνα και των μυών με τη μορφή αιμοσιδηρίνης και φερριτίνης.

1.5.1 Μεταβολισμός σιδήρου

Στα θηλαστικά η έκφραση μορίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του σιδήρου ρυθμίζεται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του, μέσω ενός παλίνδρομου ανατροφοδοτικού μηχανισμού. Ο μηχανισμός αυτός βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ mRNA και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάζονται σιδηρορυθμιστικές πρωτεΐνες 1 και 2 (IRP1, IRP2). Αυτές συνδέονται με ορισμένα τμήματα mRNA, τα οποία ονομάζονται σιδηροαποκριτικά στοιχεία (IREs) και βρίσκονται στην 3' ή στην 5' αμετάφραστη περιοχή του mRNA των αντίστοιχων γονιδίων. Όταν μια πρωτεΐνη IRP προσδεθεί σε ένα IRE στην 5' αμετάφραστη περιοχή, τότε αναστέλλεται η μεταγραφή του mRNA. Αντίθετα όταν μια πρωτεΐνη IRP προσδεθεί σε ένα IRE στην 3' αμετάφραστη περιοχή, τότε αυξάνεται η σταθερότητα του mRNA, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου. Το γονίδιο της φερριτίνης φέρει IRE στην 5' αμετάφραστη περιοχή, ενώ το γονίδιο του υποδοχέα της τρανσφερρίνης 1 (TfR1) φέρει IRE στην 3' αμετάφραστη περιοχή. Σε καταστάσεις σιδηροπενίας, οι πρωτεΐνες IRP συνδέονται στο IRE της 5' αμετάφραστης περιοχής του mRNA της φερριτίνης και καταστέλλουν τη σύνθεσή της. Αντίθετα, η σύνδεση των πρωτεϊνών στα IRE της 3' αμετάφραστης περιοχής του TfR1 αυξάνει τη ταθερότητα του mRNA και ενισχύει την έκφραση του TfR1 στην επιφάνεια του κυττάρου. (Ponka P et al, 1998, Ponka P, 1999, Πάγκαλης 2008).

1.5.2 Ισοζύγιο σιδήρου-Διακίνηση σιδήρου

Μικρές ποσότητες σιδήρου αποβάλλονται μέσω των ούρων, των κοπράνων, του ιδρώτα και των κυττάρων που αποπίπτουν από το δέρμα και τον εντερικό βλεννογόνο. Οι γυναίκες αποβάλλουν επιπλέον ποσότητες σιδήρου κατά την έμμηνο ρύση. Για να διατηρηθεί το ισοζύγιο σιδήρου, η ποσότητα του σιδήρου που χάνεται από το σώμα πρέπει να αντικαθίσταται με την λήψη εμπλουτισμένων με σίδηρο τροφών. Οι τροφές περιέχουν κυρίως τρισθενή σίδηρο. Ο τρισθενής σίδηρος

διαλύεται ελάχιστα σε pH πάνω από 3 και γι αυτό δεν είναι εύκολα απορροφήσιμος. Μέσω του χαμηλού pH του γαστρικού υγρού, ο ανόργανος σίδηρος ανάγεται στη δισθενή μορφή του (Fe^{2+}), η οποία είναι πιο διαλυτή, και εισέρχεται στο εντεροκύτταρο. Ο σίδηρος μετά την αναγωγή του στην δισθενή μορφή, επανέρχεται στην τρισθενή του μορφή, μέσω μιας σιδηροξειδάσης, της ηφαιστίνης με σκοπό να συνδεθεί με την τρανσφερρίνη. Η τρανσφερρίνη είναι η πρωτεΐνη μεταφοράς του σιδήρου στο πλάσμα και στο εξωκυττάριο υγρό. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από 678 αμινοξέα και παράγεται από τα κύτταρα του ήπατος. Έχει χρόνο ημίσειας ζωής 8 ημέρες και σε καταστάσεις σιδηροπενίας αυξάνεται η σύνθεσή της. Όλες οι θέσεις σύνδεσης της τρανσφερρίνης είναι κατειλημμένες και φυσιολογικά δεν υπάρχουν στην κυκλοφορία του αίματος ελεύθερα ιόντα σιδήρου. Συνδεδεμένα με την τρανσφερρίνη, τα ιόντα σιδήρου διανέμονται στα κύτταρα. Η είσοδός τους εντός των κυττάρων και η αποδέσμευσή τους από την τρανσφερρίνη πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση του υποδοχέα της τρανσφερρίνης. Ο υποδοχέας της τρανσφερρίνης (TfR) είναι μια διμερής διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από δύο όμοια τμήματα συνδεδεμένα μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό. Αφού γίνει η σύνδεση μεταξύ τους, το σύμπλοκο τρανσφερρίνης – υποδοχέα ενδοκυτταρώνεται και καταλήγει εντός κυστιδίου (ενδόσωμα). Εκεί ο σίδηρος αποσυνδέεται από την τρανσφερρίνη. Μετά την αποδέσμευση του σιδήρου, η αποτρανσφερρίνη παραμένει ενωμένη με τον υποδοχέα της και μεταφέρεται με το ενδόσωμα πίσω στην κυτταρική μεμβράνη. Στη θέση αυτή το ουδέτερο pH του πλάσματος μειώνει τη συγγένεια σύνδεσης των δύο μορίων, το σύμπλοκο διασπάται και η τρανσφερρίνη μαζί με τον υποδοχέα της τρανσφερρίνης απελευθερώνονται στην κυκλοφορία για επαναχρησιμοποίηση. Για να βγει από το κυστίδιο ο σίδηρος ενώνεται με το μεταφορέα δισθενών μετάλλων (πρωτεΐνη DMT1). Στη συνέχεια, ο σίδηρος κατευθύνεται στα μιτοχόνδρια για χρήση (Πάγκαλης, 2008).

Ο ομοιοστατικός μηχανισμός του ισοζυγίου του σιδήρου πραγματοποιείται από το εντερικό επιθήλιο. Μόνο ένα μέρος του προσλαμβανόμενου σιδήρου απορροφάται φυσιολογικά, ενώ η απορροφούμενη ποσότητα αυξάνεται ή μειώνεται με μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης. Όσο περισσότερο σίδηρο έχει το σώμα, τόσο λιγότερος σίδηρος απορροφάται από τον εντερικό σωλήνα. Αυξημένη απορρόφηση σιδήρου παρατηρείται στις αναιμίες. Ο σίδηρος που εισέρχεται μέσα στο εντεροκύτταρο μπορεί να ακολουθήσει δύο δρόμους. Μπορεί να αποθηκευτεί ως φερριτίνη εντός του εντεροκυττάρου και να αποβληθεί μαζί με το εντεροκύτταρο, είτε να εισέλθει στο πλάσμα και να βγει εκτός του κυττάρου μέσω της φερροπορτίνης.

Υπάρχουν δύο κύριοι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την απορρόφηση του σιδήρου. Ο ένας μηχανισμός αφορά την αποθήκευση του σιδήρου, που βρίσκεται ενωμένος με

την πρωτεΐνη φερριτίνη. Η φερριτίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη αποθήκευσης του σιδήρου στον οργανισμό, η οποία αποτελείται από 24 συμμετρικές υπομονάδες δύο ειδών, τις ελαφριές L (light) και τις βαριές H (heavy) (Ponka P, 1999). Η διαδικασία αποθήκευσης του σιδήρου εντός της φερριτίνης περιλαμβάνει την οξείδωση του δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) σε τρισθενή (Fe^{3+}), τη μετακίνηση του τρισθενούς σιδήρου στο εσωτερικό της φερριτίνης και την ενσωμάτωσή του στον πυρήνα της με τη μορφή υδροξυφωσφορικού σιδήρου. Με τον μηχανισμό αυτό μειώνεται η απορρόφηση του σιδήρου και επιπλέον προφυλάσσεται ο οργανισμός από την υπερβολική ποσότητα σιδήρου. Ο άλλος μηχανισμός είναι ο 'ερυθροποιητικός' μηχανισμός. Σε καταστάσεις όπου υπάρχει αυξημένη ανάγκη αιμοποίησης πραγματοποιείται ταχεία απορρόφηση σιδήρου, ενώ σε καταστάσεις νεοπλασιών, χρόνιας φλεγμονής ή λοίμωξης η απορρόφηση του μειώνεται (Πάγκαλης, 2008).

Επειδή κύριος μηχανισμός ανάπτυξης αναιμίας στην ΠΝΑ είναι η αιμόλυση, θα παραθέσουμε λίγα στοιχεία αναφορικά της αιμόλυσης.

1.6 Αιμόλυση-Αιμολυτικές αναιμίες

Η πρόωρη καταστροφή των ερυθροκυττάρων ορίζεται ως αιμόλυση. Όταν ο ρυθμός καταστροφής των ερυθρών αιμοσφαιρίων υπερβαίνει την ικανότητα παραγωγής τους από τον μυελό των οστών τότε προκαλείται αναιμία. Η αιμόλυση διακρίνεται σε οξεία και χρόνια, σε εξωαγγειακή και ενδαγγειακή.

Η χρόνια αιμόλυση είναι συνήθως εξωαγγειακή. Σε αυτήν παρατηρείται αναιμία που συνοδεύεται από ωχρότητα δέρματος-βλεννογόνων, ίκτερος που συνοδεύεται από υπέρχρωση των ούρων, ενώ μπορεί να συνυπάρχει σπληνομεγαλία.

Στην οξεία αιμόλυση παρατηρείται αναιμία, η οποία παρουσιάζει οξεία εγκατάσταση, πυρετός, έμετος και oligουρία που συνοδεύεται από σκούρα κοκκινωπά ούρα. Η κλινική εκδήλωση της οξείας αιμόλυσης μπορεί να φτάσει έως και την εμφάνιση shock. Σε περιπτώσεις που η οξεία αιμόλυση εμφανίζεται σε έδαφος χρόνιας αιμόλυσης παρατηρείται σπληνομεγαλία, ενώ ο ίκτερος δεν αποτελεί ένα σταθερό εύρημα (Μελέτης Γ, 2003).

Η εξωαγγειακή αιμόλυση πραγματοποιείται στους φλεβώδεις κόλπους του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (σπλήνας, ήπαρ, μυελός των οστών). Εκεί τα ερυθρά αιμοσφαίρια φαγοκυτταρώνονται και η αιμοσφαιρίνη τους διασπάται από τα μακροφάγα σε αίμη και σφαιρίνη. Η σφαιρίνη με τη σειρά της αποσυντίθεται στα αμινοξέα της, ενώ η αίμη διασπάται σε χολοπρασίνη, σίδηρο και μονοξείδιο του άνθρακα. Στη συνέχεια η χολοπρασίνη ανάγεται σε χολερυθρίνη. Στην εξωαγγειακή αιμόλυση παρατηρείται σφαιροκυττάρωση, αύξηση της έμμεσης χολερυθρίνης, ήπια μείωση των αιμοσφαιρίων, μέτρια αύξηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης

των ερυθρών, LDH (Η LDH είναι ένα ένζυμο, το οποίο βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα στα ερυθρά αιμοσφαίρια και απελευθερώνεται όταν αυτά καταστραφούν), ενώ σπάνια ανιχνεύεται ελεύθερη αιμοσφαιρίνη.

Στην ενδοαγγειακή αιμόλυση, τα ερυθρά αιμοσφαίρια λύνονται μέσα στα αγγεία, χωρίς τη συμμετοχή των μακροφάγων και η αιμοσφαιρίνη δεσμεύεται από την απτοσφαιρίνη. Η απτοσφαιρίνη αποτελεί μια πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες ($\alpha_2\beta_2$), και παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με την αιμοσφαιρίνη (συνδέεται με τη β αλυσίδα). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την απτοσφαιρίνη, στον άνθρωπο, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16 και παρουσιάζει έναν ασυνήθιστο πολυμορφισμό. Μερικοί από τους πολυμορφισμούς σχετίζονται με νεφρικές παθήσεις. Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί 4 αλληλόμορφα γονίδια, Hr1S, Hr1F, Hr2 και Hr3, με τα Hr1 και Hr2 να αποτελούν τα κύρια αλληλόμορφα. Η απτοσφαιρίνη συντίθεται στο ήπαρ, ανιχνεύεται όμως και σε άλλα όργανα συμπεριλαμβανομένου του πνεύμονα, του σπλήνα, του νευρικού συστήματος, του θύμου αδένος και της καρδιάς (Nielsen and Moestrup, 2009). Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της απτοσφαιρίνης πραγματοποιείται σε 3 επίπεδα: αναπτυξιακός έλεγχος (στο εμβρυακό ήπαρ), ιστοειδικός έλεγχος (σχετίζεται με την έκφραση του γονιδίου της απτοσφαιρίνης στα ηπατικά κύτταρα), έλεγχος της έκφρασής της κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης (Oliviero et al, 1987). Έχει βρεθεί ότι παρουσία της ιντερλευκίνης IL-6, αυξάνονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής στο πλάσμα, ενώ η παραγωγή της ρυθμίζεται επιπλέον και από τα γλυκοκορτικοειδή. Έρευνες αναφέρουν την παρουσία της απτοσφαιρίνης σε καταστάσεις φλεγμονής και σε περιπτώσεις καρκίνου (Narisada et al, 2008). Η απτοσφαιρίνη ανιχνεύεται στο πλάσμα του εμβρύου σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αντίθετα σε ενήλικο άτομο τα επίπεδά της κυμαίνονται μεταξύ 0.45-3 mg/ml.

Το σύμπλεγμα αιμοσφαιρίνης-απτοσφαιρίνης μεταφέρεται στο ήπαρ, για να πραγματοποιηθεί η αποδόμηση της αιμοσφαιρίνης. Σε περίπτωση που υπάρχει περίσσεια αιμοσφαιρίνης, δηλαδή υπάρχει κορεσμός της απτοσφαιρίνης, αυτή παραμένει ελεύθερη στο πλάσμα σχηματίζοντας διμερή. Τα διμερή της αιμοσφαιρίνης διηθούνται στους νεφρούς, επανααρροφώνται και μεταβολίζονται σε σφαιρίνη, χολερυθρίνη και σίδηρο. Ο σίδηρος αποθηκεύεται στα κύτταρα των σωληναρίων ως αιμοσιδηρίνη. Ο τρισθενής σίδηρος του μορίου της αιμοσφαιρίνης οξειδώνεται σε δισθενή και σχηματίζεται μεθαιμοσφαιρίνη, ενώ παράλληλα η αιμοσφαιρίνη διηθείται από το νεφρικό σπείραμα και αποβάλλεται με συνέπεια την εμφάνιση της αιμοσφαιρινουρίας. Στην ενδοαγγειακή αιμόλυση παρατηρείται αύξηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, μέτρια αύξηση της έμμεσης χολερυθρίνης, μείωση ή απουσία των απτοσφαιρινών, αύξηση της LDH, ενώ παρατηρείται αιμοσφαιρίνη στα ούρα.

Ο αριθμός των δικτυοερυθροκυττάρων αποτελεί την κατάλληλη εργαστηριακή εξέταση για τη διάγνωση μιας αιμολυτικής αναιμίας. Αυτός δίνει μια εικόνα της παραγωγής νέων ερυθρών αιμοσφαιρίων από το μυελό των οστών. Σε περιπτώσεις πρόσφατης ή και συνεχιζόμενης απώλειας αίματος έπειτα από την έναρξη αιμορραγίας και έπειτα από χορήγηση σιδήρου σε σιδηροπενική αναιμία ή χορήγηση B12 σε κακοήγη αναιμία, παρατηρείται δικτυοερυθροκυττάρωση. Σε περίπτωση που υπάρχει συνύπαρξη αιμολυτικής αναιμίας και υποπλαστικής κρίσης ο αριθμός των δικτυοερυθροκυττάρων είναι φυσιολογικός ή ελαττωμένος. Το πιο συχνό αίτιο υποπλαστικών κρίσεων αποτελεί ο παρβοϊός B19. Αυτός προσωρινά καταστρέφει το μυελό. Η καταστροφή του μυελού έχει μικρή επίδραση σε άτομα που παρουσιάζουν φυσιολογικό χρόνο επιβίωσης των ερυθρών, ενώ μεγάλη είναι η επίδραση σε περιπτώσεις που ο χρόνος επιβίωσης των ερυθρών ελαττώνεται λόγω αιμόλυσης. Αιμολυτική αναιμία με φυσιολογικό αριθμό δικτυοερυθροκυττάρων μπορεί να υπάρχει σε περιπτώσεις νεφρικής ανεπάρκειας εξαιτίας της ελαττωμένης παραγωγής της ερυθροποιητίνης, σε ανεπάρκεια φυλλικού οξέος ή σιδηροπενία εξαιτίας της μείωσης των παραγόντων που απαιτούνται για τη φυσιολογική ερυθροποίηση, σε καταστροφή των κυττάρων της ερυθράς σειράς στο μυελό των οστών που οφείλεται σε ιούς ή φάρμακα (Tabarra IA., 1992).

Υπάρχουν επιπλέον ειδικές εργαστηριακές εξετάσεις για τη διάγνωση της αιμολυτικής αναιμίας. Αυτές είναι η μέτρηση της απτοσφαιρίνης του ορού, η μέτρηση της αιμοπηξίνης, η οποία συνδέει την αίμη και η μέτρηση της αιμοσιδηρίνης των ούρων (αποτελεί μια ένδειξη της πρόσφατης ενδαγγειακής αιμόλυσης λόγω του γεγονότος ότι απελευθερώνεται αργά με τη φυσιολογική αποβολή των κυττάρων των νεφρικών θηλών). Συγκεκριμένα, η απτοσφαιρίνη του ορού είναι μειωμένη, λόγω κορεσμού της με την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, εξαιτίας της αιμόλυσης. Χαμηλά επίπεδα απτοσφαιρίνης παρατηρούνται εκτός από την ενδαγγειακή αιμόλυση και στην εξωαγγειακή αιμόλυση, κυρίως όταν αυτή είναι χρόνια και βαριά με διαφυγή στον ενδαγγειακό χώρο. Η αιμοπηξίνη είναι μια σφαιρίνη, η οποία είναι μειωμένη σε ασθενείς με ενδαγγειακή αιμόλυση.

Η αναιμία στην ενδαγγειακή αιμόλυση κυμαίνεται από ήπια έως σοβαρή. Η μείωση της απτοσφαιρίνης πραγματοποιείται τις πρώτες 6 έως 10 ώρες από την αιμόλυση και διαρκεί 2 με 3 ημέρες, γι αυτό και η μέτρηση της απτοσφαιρίνης αποτελεί μια αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδο. Η αιμοσφαιρινουρία εμφανίζεται 1 με 2 ώρες έπειτα από σοβαρή αιμόλυση και έχει διάρκεια πάνω από 24 ώρες, γι αυτό και αποτελεί ένα μη αξιόπιστο εργαστηριακό εύρημα. Η χολερυθρίνη αυξάνεται μέσα σε 1 έως 6 ώρες και φτάνει στη μέγιστη τιμή της 3 έως 12 ώρες μετά από την αιμόλυση 100ml αίματος.

1.6.1 Ταξινόμηση των αιμολυτικών αναιμιών

Οι αιμολυτικές αναιμίες χωρίζονται σε:

- i. Κυτταρικές ανωμαλίες λόγω ενδογενών ανωμαλιών (της μεμβράνης των ερυθρών, των ενζύμων, της αιμοσφαιρίνης)
- ii. Εξωκυτταρικές ανωμαλίες λόγω ανωμαλιών των ερυθρών που προκαλούνται από εξωγενείς παράγοντες. Τα εξωγενή αίτια περιλαμβάνουν την ανοσολογική καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων (αντισώματα ή το συμπλήρωμα επικαλύπτουν τα ερυθρά και αυτά απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος), τους λοιμώδεις παράγοντες ή τις παθολογικές διαδικασίες, με τις οποίες ενεργοποιείται ο μηχανισμός πήξης ή προκαλούνται μεταβολές στη μικροκυκλοφορία (Stein, 1998).

Η κληρονομική σφαιροκυττάρωση, η κληρονομική ελλειπτοκυττάρωση, η κληρονομική στοματοκυττάρωση, η κληρονομική ακανθοκυττάρωση και η επίκτητη παροξυντική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία ανήκουν στις μεμβρανικές ανωμαλίες. Η ανεπάρκεια της πυρουβικής κινάσης και η ανεπάρκεια της αφυδρογονάσης της φωσφορικής 6 γλυκόζης (G-6PD) ανήκουν στις ενζυμικές ανεπάρκειες. Ενώ στις ανωμαλίες της αιμοσφαιρίνης ανήκουν τα δρεπανοκυτταρικά σύνδρομα, η μεσογειακή αναιμία και οι αιμοσφαιρινοπάθειες C,D,E.

Στις εξωκυτταρικές ανωμαλίες ανήκουν οι άνοσες(αυτοάνοσες ιδιοπαθείς ή δευτεροπαθείς και ισοάνοσες) αιμολυτικές αναιμίες (π.χ λοίμωξη από μυκόπλασμα, ασυμβατότητα ομάδων αίματος κλπ) και οι μη αυτοάνοσες αιμολυτικές αναιμίες (π.χ νόσος Wilson λόγω τοξικής δράσης του ελεύθερου χαλκού στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη κλπ).

Επιπλέον, οι αιμολυτικές αναιμίες μπορούν να διαχωριστούν σε κληρονομικές και επίκτητες. Στις κληρονομικές αιμολυτικές αναιμίες η βλάβη εντοπίζεται στη μεμβράνη των ερυθρών ή σχετίζεται με έλλειψη ενζύμων, αντίθετα στις επίκτητες αιμολυτικές αναιμίες τα ερυθρά αιμοσφαίρια καταστρέφονται στην περιφέρεια και ο μυελός των οστών αντιδρά με αύξηση της ερυθροποίησης. Στις επίκτητες αιμολυτικές αναιμίες άνοσης αιτιολογίας, η άμεση αντίδραση Coombs, η οποία μπορεί να ανιχνεύει αντισώματα ή και το συμπλήρωμα στη μεμβράνη των ερυθρών, είναι θετική. Αντίθετα στις επίκτητες αιμολυτικές αναιμίες μη άνοσης αιτιολογίας, η άμεση αντίδραση Coombs είναι αρνητική.

Επιπλέον, θα πρέπει να αναφερθεί και μια κληρονομική διαταραχή, η οποία δεν μπορεί να ενταχθεί σε καμία από τις παραπάνω κατηγορίες, η α-βήτα-λιποπρωτεϊνέμια. Αυτή είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία αιμόλυσης λόγω της ακανθοκυττάρωσης.

2. ΝΥΚΤΕΡΙΝΗ ΠΑΡΟΞΥΝΤΙΚΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑ (ΠΝΑ)

Η Νυκτερινή Παροξυντική Αιμοσφαιρινουρία (Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria) ή νόσος των Marchiafava-Micheli αποτελεί μια επίκτητη κλωνική διαταραχή του πολυδύναμου αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου. Στην κλασική της έκφραση χαρακτηρίζεται από χρόνια ενδαγγειακή αιμόλυση, παροξυσμούς αιμοσφαιρινουρίας και αιμοσιδηρινουρίας, διαλείποντα θρομβωτικά επεισόδια, δυστονία των λείων μυϊκών μυών και μυελική απλασία. Η ΠΝΑ αποτελεί μια επίκτητη γενετική ανωμαλία, που συνδέεται με το X χρωμόσωμα. Είναι μια ιδιαίτερη νόσος διότι είναι πολυπαραγοντική, μιμείται άλλα νοσήματα γι αυτό και μπορεί να διαλάθει της διάγνωσης.

2.1 Ιστορική αναδρομή

- 1678 : πραγματοποιείται η πρώτη κλινική αναφορά στην ΠΝΑ από τον Γερμανό ιατρό Schmidt.
- 1882: πραγματοποιείται η πρώτη τεκμηριωμένη περιγραφή από τον γερμανό γιατρό Paul Strübing. Παρακολουθώντας έναν ασθενή που παρουσίαζε ένα ιστορικό, με διαλείποντα επεισόδια κόπωσης, κοιλιακού άλγους και σκούρα πρωϊνά ούρα, τα οποία «καθάριζαν» πάντα το μεσημέρι, κατάλαβε ότι η αιμόλυση οφειλόταν σε διαταραχή των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ενώ παράλληλα κάποια συμπτώματα τα ερμήνευσε ως συνέπεια θρόμβωσης. Την εποχή εκείνη ήταν γνωστή μια κλινική οντότητα χαρακτηριζόμενη από οξεία αιμοσφαιρινουρία μετά από έκθεση σε ψύχος, που σχετιζόταν με τη σύφιλη και είχε την ονομασία παροξυντική αιμοσφαιρινουρία εκ ψύχους. Ο Strübing διαχώρισε αυτή την κλινική οντότητα, η οποία αποδείχθηκε ότι οφειλόταν σε αιμόλυση λόγω των ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων Donath-Landsteiner, από την ΠΝΑ.
- 1911: ο Hijmans van den Berg με πειράματα απέδειξε ότι η ΠΝΑ είναι μορφή αιμολυτικής αναιμίας που οφείλεται σε «ελάττωμα» του ίδιου του ερυθρού.
- 1937: ο Thomas Hale Ham και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι το συμπλήρωμα είναι απαραίτητο για την *in vitro* λύση των παθολογικών ερυθροκυττάρων, το οποίο ενεργοποιείται σε οξινισθέντα ορό.
- τέλη της δεκαετίας του 1930: ήταν κοινά αποδεκτό ότι η αιμόλυση εξαρτιώταν από το συμπλήρωμα και το pH. Όταν ανακαλύφθηκε η εναλλακτική οδός του συμπληρώματος, οι Pillemer και συνεργάτες απέδειξαν πως η αυξημένη ευαισθησία στη λύση από το συμπλήρωμα οδηγούσε σε αιμόλυση στους ασθενείς αυτούς. Αυτό αποτέλεσε το υπόβαθρο για την εφαρμογή της δοκιμασίας του οξινισθέντος ορού (δοκιμασία Ham). Η δοκιμασία Ham έγινε η πλέον χρήσιμη δοκιμασία για τη διάγνωση της ΠΝΑ μέχρι την εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής.

- 1944: ο Dacie απέδειξε την ύπαρξη παρατεταμένης απλασίας και ΠΝΑ σε έναν ασθενή με αναιμία Fanconi.
- δεκαετία του 1950: παρατηρήθηκε πως η ουδετεροφιλική αλκαλική φωσφατάση ήταν μειωμένη ή απύσση στη ΝΠΑ και έτσι έγινε φανερό ότι επηρεάζονται και οι υπόλοιπες αιμοποιητικές σειρές. Η νόσος χαρακτηρίστηκε ως κλωνική και αποτέλεσμα μιας επίκτητης διαταραχής του αιμοποιητικού κυττάρου.
- 1970: προσδιορίστηκε η κλωνικότητα της νόσου, όταν παρατηρήθηκε ένας μόνο τύπος του ενζύμου G6PD στα πάσχοντα ερυθροκύτταρα γυναικών. Με αυτό τον τρόπο ενισχύθηκε πειραματικά η υπόθεση του Dacie.
- Με περαιτέρω έρευνες, φάνηκε ότι στην επιφάνεια των κυττάρων του παθολογικού κλώνου ανεπαρκούσαν ή απουσίαζαν διάφορες μεμβρανικές πρωτεΐνες που στο σύνολό τους ήταν συνδεδεμένες στην επιφάνεια των κυττάρων με μια «άγκυρα» γλυκολιπιδίων, γνωστές και ως GPI-APs (glycosyl-phosphatidyl-inositol anchored proteins). Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι η μοριακή βλάβη στην ΠΝΑ ήταν κάποια γενετική μετάλλαξη που διαταράσσει τη βιοσύνθεση της GPI άγκυρας. Η ανακάλυψη της έλλειψης του DAF (decay-accelerating factor) ή CD55 στα παθολογικά ερυθρά καθώς και η απομόνωση του MIRL (membrane-inhibitor of reactive lysis) ή CD59 από φυσιολογικά ερυθρά, που αναστέλλει τη λύση των ερυθροκυττάρων στην ΠΝΑ οδήγησαν στην κατανόηση της παθογένειας της αιμόλυσης στη νόσο.

2.2 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

2.2.1 Άγκυρα GPI

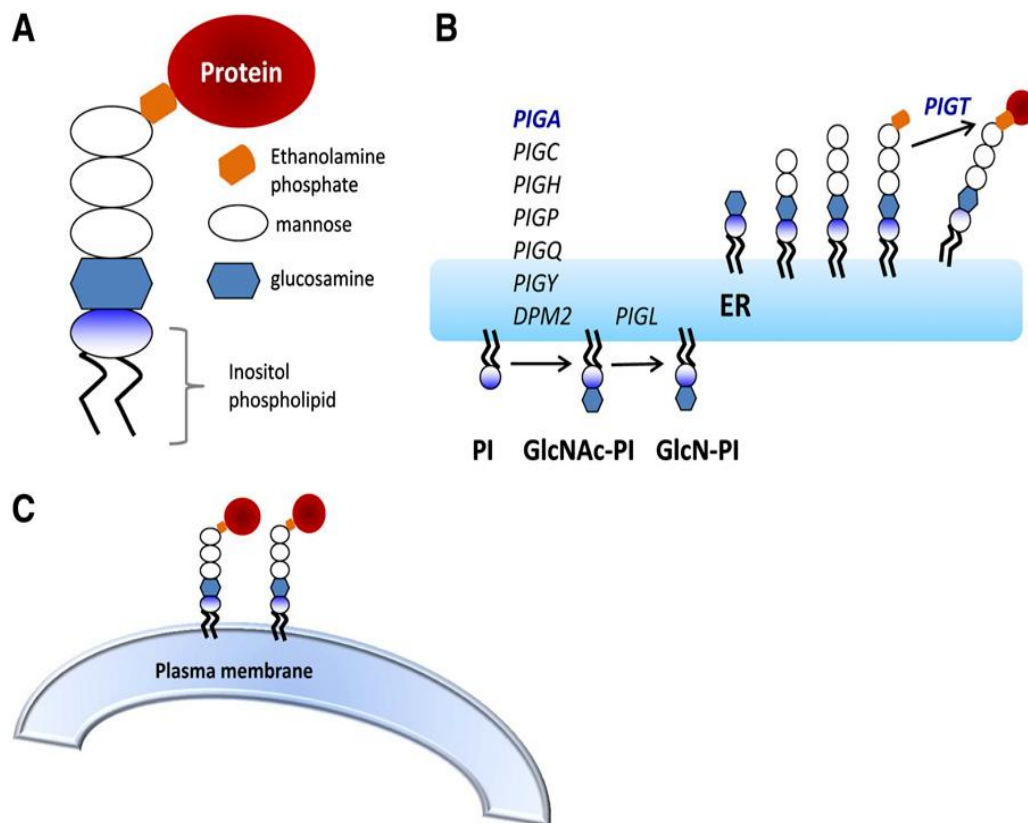
Η ΠΝΑ είναι μία ασθένεια που οφείλεται σε μία ή περισσότερες σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου PIG-A (phosphatidylinositol glycan group A). Το προϊόν του γονιδίου αυτού είναι μια ιδιαίτερη γλυκολιπιδική δομή που ονομάζεται γλυκοσυλ-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη άγκυρα, δηλαδή άγκυρα GPI (GPI anchor). Πολλές πρωτεΐνες (GPI anchor proteins) συνδέονται στη μεμβράνη των κυττάρων μέσω της άγκυρας αυτής.

Η κατασκευή της GPI «άγκυρας» είναι παρόμοια σε όλα τα είδη και αποτελείται από τρία κυρίως τμήματα (Rosse WF, 1995):

1. Ένα μόριο φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI), στο οποίο μπορεί να προσδένεται ένα μόριο λιπαρού οξέος. Η μεμβρανική πρόσδεση της GPI επιτυγχάνεται μέσω της «διείσδυσης» της λιπιδικής ομάδας της PI στο εξωτερικό τμήμα της μεμβράνης.
2. Ένα σώμα γλυκάνης που αποτελείται από ένα μόριο N-γλυκοζαμίνης και μια αλυσίδα από τρία μόρια μαννόζης και

3. Ένα μόριο φωσφοαιθανολαμίνης (phosphoethanolamine, PEA) που προστίθεται στην τελική μαννόζη. Η πρωτεΐνη, που θα συνδεθεί με τη GPI, ενώνεται με τη PEA μέσω δεσμού αμιδίου μεταξύ της αμινομάδας της PEA και του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης. Στα θηλαστικά, τα μόρια της PEA μπορεί να συνδέονται και με τα άλλα δύο μόρια μαννόζης, χωρίς αυτά να συμμετέχουν στη σύνδεση των πρωτεϊνών (Kamitani et al 1992).

Η βιοσύνθεση της «άγκυρας» ξεκινά στην κυτταροπλασματική πλευρά του ενδοπλασματικού δικτύου. Εκεί η N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη (GlcNAc) μεταφέρεται από την ουριδινο-5'-διφωσφορική-N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη (UDP-GlcNAc) σε ένα μεμβρανικό φωσφολιπίδιο, τη φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (PI), με σκοπό να σχηματιστεί η N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (GlcNAc-PI). Στο πρώτο βήμα της βιοσυνθετικής οδού της GPI άγκυρας, για τη σύνδεση της N-ακετυλ-γλυκοζαμίνης με την φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, απαραίτητη είναι η δράση του ενζύμου acetylglucosaminyl τρανσφεράσης. Αυτή είναι ένα ενζυμικό σύμπλοκο, με την Pig-A πρωτεΐνη να αποτελεί μια από τις υποομάδες της. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ενζυματική απο-ακετυλίωση (de-N-acetylation) της GlcNAc-PI, ενώ παράλληλα πραγματοποιείται ακυλίωση της ινοσιτόλης και σχηματίζεται η GlcN-PI (Urakaze et al 1992, Watanabe et al 1999, I B Ασημακόπουλος και συνεργάτες, 2014). Μετά από προσθήκη μορίων, κυρίως μαννόζης δημιουργείται ένα μόριο γλυκοζυλ-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (GPI). Έπειτα η πεπτιδική αλυσίδα μεταφέρεται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, για να συνδεθεί το υδροφιλικό της μέρος, το οποίο αποτελείται από ένα μόριο φωσφοαιθανολαμίνης (PEA), με το καρβοξυτελικό άκρο της προ πρωτεΐνης (Udenfried et al 1991). Το σύμπλεγμα GPI-πρωτεΐνης που έχει πλέον συγκροτηθεί, μεταφέρεται στην συσκευή Golgi και από εκεί μέσω κυστιδίων οδηγείται στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του κυττάρου. Μια οποιαδήποτε βλάβη σε κάποιο στάδιο της βιοσυνθετικής αυτής οδού, μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή έκφραση όλων των πρωτεϊνών που συνδέονται μέσω της GPI άγκυρας στην κυτταρική μεμβράνη. Η ανεπαρκής ή απουσία παραγωγής αυτής της υποομάδας, λόγω μετάλλαξης στο γονίδιο PIG-A που την ελέγχει, αποτελεί την παθοφυσιολογική βάση της νόσου. Υπάρχουν τουλάχιστον 7 διαφορετικά γονίδια που ελέγχουν το πρώτο βήμα της βιοσυνθετικής οδού της άγκυρας, αλλά στη ΝΠΑ η βλάβη αφορά το PIG-A γονίδιο.



Εικόνα 2.1: Βιοσύνθεση της GPI άγκυρας.
Από: Robert A. Brodsky, 2015.

2.2.2 Μοριακή βλάβη

Το 1993, ταυτοποιήθηκε το γονίδιο *PIG-A*, το οποίο χαρακτηρίζει την ΠΝΑ. Βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος X (Χρ22.1) και αποτελείται από 6 εξώνια. Το πρώτο εξώνιο είναι πολύ μικρό και δεν μεταφράζεται. Το δεύτερο εξώνιο ακολουθείται από τρία μικρότερα εξώνια και κωδικοποιεί περίπου το μισό της ώριμης πρωτεΐνης. Το τελευταίο εξώνιο φέρει μια μη μεταφραζόμενη αλληλουχία και κωδικοποιεί την υπόλοιπη πρωτεΐνη. Σε κάθε διπλοειδικό κύτταρο υπάρχει ένα απλό γονίδιο *PIG-A*, ακόμα και στις γυναίκες, λόγω της τυχαίας αδρανοποίησης του ενός εκ των δύο χρωμοσωμάτων X (Kinoshita T, Inoue N. 2006, Μελέτης Γ και συνεργάτες, 2008). Στο γονίδιο έχουν περιγραφεί περισσότερες από 175 σωματικές μεταλλάξεις. Όλοι οι ασθενείς με ΠΝΑ, που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, εμφανίζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIG-A*. Οι περισσότερες είναι μικρές ελλείψεις, μικρές προσθήκες ή ελλείψεις-προσθήκες που προκαλούν τροποποίηση του πλαισίου ανάγνωσης με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια μη λειτουργική πρωτεΐνη *rig-A*. Έχουν βρεθεί μόνο δύο μεγάλες ελλείψεις, μια ολική έλλειψη του *PIG-A* και δύο μικροί διπλασιασμοί. Περίπου το ένα τρίτο των μεταλλάξεων του *PIG-A* είναι σημειακές μεταλλάξεις. Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί τρεις τύποι τέτοιων μεταλλάξεων:

α) Μεταλλάξεις που οδηγούν στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην πρωτεϊνική αλληλουχία (missense) και εμποδίζουν τη φυσιολογική αναδίπλωση του πρωτεϊνικού μορίου (τριτοταγής δομή), με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της ενδοκυττάριας αποδόμησης της πρωτεΐνης,

β) μεταλλάξεις που οδηγούν σε άμεσο κωδικόνιο τερματισμού (nonsense) και παρατηρούνται κυρίως στο εξώνιο 2 και

γ) μεταλλάξεις που επηρεάζουν το μέγεθος και τη σταθερότητα του mRNA (splice site mutations) (Luzzatto L, Jaja K, 2000).

Οι μεταλλάξεις αντικατάστασης ενός αμινοξέος στην πρωτεϊνική αλληλουχία του γονιδίου PIG-A επηρεάζουν σημαντικά την κατασκευή και τη λειτουργία του τελικού προϊόντος του γονιδίου, δηλαδή την άγκυρα GPI. Ελλείψεις στον υποκινητή του γονιδίου μπορούν να προκαλέσουν μείωση αλλά όχι εξαφάνιση των πρωτεϊνών GPI. Όλοι οι τύποι των κυκλοφορούντων αιμοποιητικών κυττάρων εμφανίζουν τις μεταλλάξεις αυτές, έτσι συμπεραίνεται ότι η μετάλλαξη συμβαίνει στο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο και ότι όλα τα παθολογικά κύτταρα ανήκουν στον ίδιο κλώνο. Το γεγονός ότι δεν υπάρχουν μεταλλάξεις στα γεννητικά κύτταρα (πράγμα ασύμβατο με τη ζωή) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ΠΝΑ είναι πάντα επίκτητη και ποτέ κληρονομική. Οι Takeda και συνεργάτες για να καθορίσουν αν οι διαταραχές στο γονίδιο PIG-A ευθύνονται για την ανεπάρκεια των κυττάρων της ΠΝΑ να εκφράσουν GPI-πρωτεΐνες, μετέφεραν PIG-A συμπληρωματικό DNA σε Β κυτταρικές σειρές από 2 ασθενείς με ΠΝΑ, αρνητικές για GPI. Έπειτα ανέλυσαν τα ενεργοποιημένα κύτταρα με φθορισμό και διαπίστωσαν ότι η μεταφορά αποκατέστησε την έκφραση των πρωτεϊνών GPI, υποδεικνύοντας ότι το έλλειμμα στις δύο σειρές της ΠΝΑ εντοπιζόταν στο PIG-A (Μελέτης Γ και συνεργάτες, 2009).

Η επίκτητη μετάλλαξη του γονιδίου PIG-A είναι αναγκαία αλλά όχι ικανή από μόνη της να προκαλέσει τη νόσο ΠΝΑ. Αρχικές μελέτες των Rotoli και Luzzatto έδειξαν ότι για την ανάπτυξη της ΠΝΑ απαιτούνται δύο παράγοντες:

(α) Μια σωματική μετάλλαξη του γονιδίου PIG-A στο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο. Τα GPI αρνητικά κύτταρα δεν παρουσίαζαν πολλαπλασιαστικό πλεονέκτημα.

(β) Στο δεύτερο στάδιο 'ένα γεγονός' (αυτοάνοση ανοσολογική διαδικασία) δίνει πλεονέκτημα επιβίωσης στο PIG-A (-) κλώνου, με τελικό αποτέλεσμα ο παθολογικός κλώνος ΠΝΑ να επικρατεί σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα (Rotoli B, Luzzatto L, 1989).

Η διαδικασία αυτή θεωρείται ως <<η διπλή θεωρία>> (dual theory) για την παθογένεια της νόσου. Δεν είναι ξεκάθαρο ακόμα αν υπάρχει μια θετική επιλογή ανάπτυξης ή ένα εσωτερικό πλεονέκτημα του PIG-A (-) κλώνου ΠΝΑ ή μια αρνητική

επιλογή έναντι του PIG-A (+) κλώνου (φέρει στην επιφάνειά του πρωτεΐνες που συνδέονται με GPI άγκυρα) των αιμοποιητικών κυττάρων. Υπάρχουν διάφορες υποθέσεις αναφορικά με το πλεονέκτημα ανάπτυξης για τον GPI(-) κλώνο.

- Μια από αυτές αναφέρει ότι οφείλεται σε τυχαία επιλογή, ώστε από ένα μεταλλαγμένο αρχέγονο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο (PIG-A(-) HSC) να παραχθεί μεγάλος αριθμός κυκλοφορούντων κυττάρων GPI(-) (genetic drift).
- Άλλη άποψη υποστηρίζει τη συμμετοχή επιπρόσθετων μεταλλάξεων στο ενδογενές πλεονέκτημα ανάπτυξης των μεταλλαγμένων κυττάρων GPI(-) (οι μεταλλάξεις αυτές είναι παρούσες σε γονίδια που συμμετέχουν σε νοσήματα όπως μυελοδυσπλαστικά ή μυελοπερπλαστικά).
- Μια Τρίτη υπόθεση αναφέρει ότι το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών δίνει στον κλώνο GPI(-) το πλεονέκτημα της ανάπτυξης, μέσω ανοσολογικών διεργασιών.

Το ανοσολογικό σύστημα έχει τη δυνατότητα να αναγνωρίζει χημικές δομές που χαρακτηρίζουν τα προγονικά GPI(+) από τα GPI(-) κύτταρα. Μέσω μιας αυτοάνοσης διαδικασίας τα αυτοδραστικά Τ λεμφοκύτταρα στρέφονται έναντι των GPI(+) κυττάρων, ενώ τα GPI(-) κύτταρα διαφεύγουν της επίθεσης (escape hypothesis) και γίνονται ανθεκτικά στην απόπτωση. Ο στόχος των αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων είναι το μόριο GPI-άγκυρα, του οποίου η παρουσία στα CD8+ Τ λεμφοκύτταρα γίνεται μέσω του αντιγονοπαρουσιαστικού μορίου CD1d που υπάρχει πάνω στα HSCs. Τα GPI(-)HSCs δεν συνθέτουν GPI και επομένως τα αυτοδραστικά Τ λεμφοκύτταρα δεν επιτίθενται σε αυτά. Με αυτό τον τρόπο αναπτύσσεται ο ΠΝΑ κλώνος (Karadimitris and Luzzato, 2001, Luzzato L, 2016, Tominaga R et al, 2016, Fraiman YS et al, 2016). Ο πληθυσμός των αυτοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων φαίνεται ότι διαθέτει στον υποδοχέα του μια χαρακτηριστική αμετάβλητη (invariant) TCRα αλυσίδα που αναγνωρίζει το CD1d των HSCs (Gargiulo L et al, 2013). Αυτός ο πληθυσμός μπορεί να είναι υπεύθυνος για τη μυελική ανεπάρκεια στην ΠΝΑ.

Ασθενείς με ΠΝΑ παρουσιάζουν στο μυελό τους αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα με φυσιολογικό GPI (+) και παθολογικό GPI (-) φαινότυπο, που συμμετέχουν και τα δύο στην αιμοποίηση (μωσαϊκός φαινότυπος). Αυτό το γεγονός αποτελεί μια μοναδική εκδήλωση της νόσου. (Meletis J and Terpos E, 2003). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι στη ΠΝΑ συνυπάρχουν διάφοροι παθολογικοί κλώνοι στο μυελό γι αυτό η νόσος δεν θεωρείται μονοκλωνική διαταραχή. Στο μυελό των οστών, φυσιολογικά, σπάνια υπάρχουν GPI(-) πρόδρομα κύτταρα με μεταλλάξεις του γονιδίου PIG-A, τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται. Σε φυσιολογικά άτομα έχουν βρεθεί μικροί πληθυσμοί GPI(-) πολυμορφοκυττάρων και ερυθρών.

2.2.3 Πρωτεΐνες της άγκυρας GPI

Στα φυσιολογικά κύτταρα υπάρχουν περίπου 20–30 διαφορετικές πρωτεΐνες της μεμβράνης που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω της <<άγκυρας>> GPI .

Αντιγόνο	Τύπος έκφρασης
Ενζυμα	
Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)	Ερυθρά
Εκτο-5' νουκλεοτιδάση (CD73)	Αρκετά B- και T-λεμφοκύτταρα
Αλκαλική φωσφατάση πολυμορφοπυρήνων (NAP)	Πολυμορφοπύρηνα
Μόρια προσκόλλησης	
Blast-1/CD48	Λεμφοκύτταρα
LFA-1 ή CD58	Όλα τα κύτταρα του αίματος
CD67	Πολυμορφοπύρηνα, ηωσινόφιλα
CD66	Πολυμορφοπύρηνα, ηωσινόφιλα
Πρωτεΐνες επιφανείας που ρυθμίζουν το συμπλήρωμα	
Decay accelerating factor (DAF ή CD55)	Όλα τα κύτταρα του αίματος
Homologous restriction factor (HRF ή C8bp)	Όλα τα κύτταρα του αίματος
Membrane inhibitor of reactive lysis (MIRL ή CD59)	Όλα τα κύτταρα του αίματος
Υποδοχείς	
Fcγ υποδοχέας III (FcγRIII ή CD16)	Π, NK, μακροφάγα, αρκετά T- λεμφοκύτταρα
Monocyte differentiation antigen (CD14)	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα
Urokinase-type plasminogen activator receptor (u- PAR)	Μονοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα
Αντιγόνα ομάδων αίματος	
Αντιγόνα Cromer (DAF)	Ερυθρά
Αντιγόνα Yt (AChE)	Ερυθρά
Αντιγόνο Holley Gregory	Ερυθρά
Αντιγόνο John Milton Hagen (JMH)	Ερυθρά, λεμφοκύτταρα
Υπόλειμμα Dombrock	Ερυθρά
Αντιγόνα πολυμορφοπυρήνων	
NA1/NA2 (CD16)	Πολυμορφοπύρηνα
NB1/NB2	Πολυμορφοπύρηνα
Άλλες πρωτεΐνες επιφανείας με άγνωστη λειτουργία	
Αντιγόνο CAMPATH-1 (CDw52)	Όλα τα κύτταρα του αίματος
CD24	B- και T-λεμφοκύτταρα, πολυμορφοπύρηνα, ηωσινόφιλα

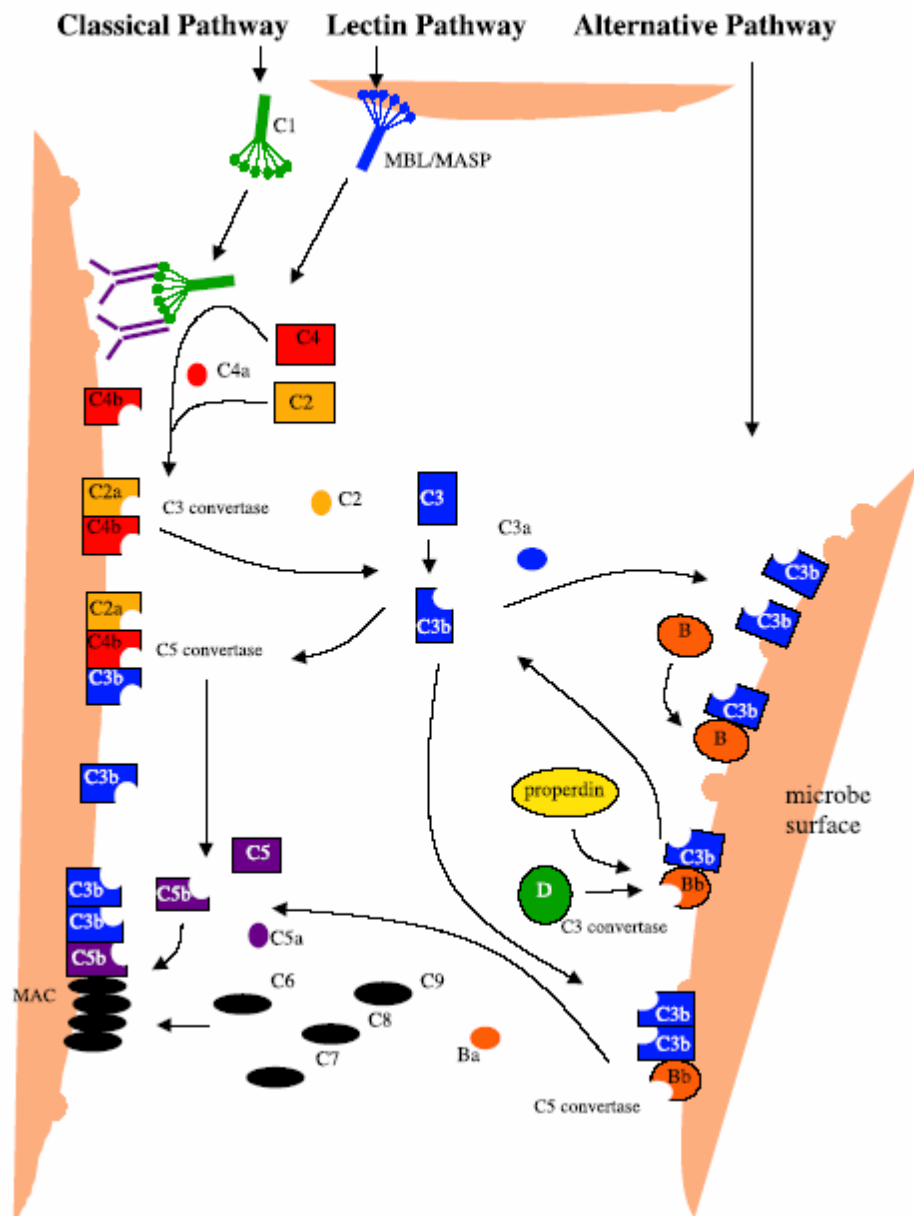
Επιφανειακές πρωτεΐνες που ανεπαρκούν από τα κύτταρα του αίματος στη νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία.

Σε αυτές τις πρωτεΐνες συγκαταλέγονται διάφοροι υποδοχείς, αντιγόνα, μόρια προσκόλλησης, ένζυμα, ενεργοποιητές της μεταγραφικής διαδικασίας και ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συμπληρώματος.

Σε ασθενείς με ΠΝΑ, έχει βρεθεί ότι στα κύτταρά τους απουσιάζουν ή ανεπαρκούν δύο πρωτεΐνες (GPI-anchor proteins): Ο DAF (decay-accelerating factor) ή CD55 και ο MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis) ή CD59. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι σημαντικές γιατί συμμετέχουν στη δράση του συμπληρώματος και η απουσία τους καθιστά τα ερυθρά αιμοσφαίρια ευαίσθητα στη λυτική δράση του συμπληρώματος (Rother RP et al, 1994).

2.3 Το σύστημα του συμπληρώματος

Το σύστημα του συμπληρώματος έχει πολύ σημαντικό ρόλο στη φυσική ανοσία. Μελέτες έχουν αποδείξει τον σημαντικό του ρόλο κατά την ενεργοποίηση της προσαρμοστικής ανοσίας (Mastellos, D. & Lambris, J.D, 2002). Αποτελείται από 35 περίπου διαλυτές και μεμβρανικές πρωτεΐνες που εκφράζονται κυρίως, από ηπατοκύτταρα αλλά και μονοκύτταρα, ιστικά μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού, νευρικού και ουροποιητικού συστήματος. Το συμπλήρωμα διαθέτει τρεις οδούς ενεργοποίησης, που ενεργοποιούνται από διαφορετικά αίτια: (α)την κλασσική, (β)την εναλλακτική και (γ)την οδό της λεκτίνης. Οι τρεις αυτές οδοί καταλήγουν σε μια κοινή οδό, την λυτική οδό, η οποία μέσω του συμπλόκου επίθεσης της μεμβράνης (MAC) οδηγεί στην λύση των παθογόνων μικροοργανισμών.



Εικόνα 2.2: Απεικόνιση της κλασικής, λεκτινικής και εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος. Πηγή: Claire M., Holland H. & Lambris J.D. Fish Shellfish Immunol. 2002 May;12(5):399-420.

Το σύστημα του συμπληρώματος έχει τρεις βασικές λειτουργίες: 1. Συμμετέχει στην άμυνα εναντίον των λοιμώξεων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω οψωνοποίησης αντιγόνων και ανοσοσυμπλεγμάτων που προωθεί την φαγοκυττάρωσή τους (μια διαδικασία η οποία μεσολαβείται από υποδοχείς του συστήματος στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων), μέσω χημειοταξίας και ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων και μέσω λύσεως βακτηρίων και κυττάρων. 2. Αποτελεί κομβικό σημείο μεταξύ φυσικής και προσαρμοστικής ανοσίας, ενισχύοντας την ανοσοβιολογική απάντηση μέσω αντισωμάτων, ενισχύοντας την ανοσοβιολογική μνήμη και ρυθμίζοντας τους μηχανισμούς της προσαρμοστικής ανοσίας μέσω της δέσμευσης πρωτεϊνών του σε ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας των λεμφοκυττάρων και των δενδριτικών

κυττάρων. 3. Συμμετέχει στην απόσυρση ανοσοσυμπλεγμάτων από τους ιστούς μετά το πέρας της ανοσοβιολογικής απόκρισης αλλά και στην απομάκρυνση αποπτωτικών κυττάρων (Carroll M. C. & Prodeus A. P 1998, Sahu A. & Lambris J. D, 2001).

Εκτός όμως από τη συμμετοχή του στην άμυνα του οργανισμού και στην φλεγμονώδη αντίδραση, συμμετέχει και σε αναπτυξιακές διαδικασίες του οργανισμού. Σχετίζεται δηλαδή με τη διαφοροποίηση των κυττάρων, τη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων και την αναγέννηση ιστών και οργάνων (Mastellos D. & Lambris J.D, 2002). Η σύνθεση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος από τα μονοκύτταρα αυξάνεται σημαντικά σε περιοχές που φλεγμαίνουν.

Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες του συστήματος παράγονται αρχικά σε ανενεργή, πρόδρομη μορφή και μπορούν να δράσουν είτε ως ένζυμα είτε ως υποδοχείς, αφού ενεργοποιηθούν από άλλα μόρια. Η κατάτμηση ενός συστατικού του συστήματος από το αντίστοιχό του ένζυμο απομακρύνει ένα μικρό θραύσμα και το υπόλοιπο μόριο αντιδρά με άλλα συστατικά του συστήματος σχηματίζοντας ενεργά σύμπλοκα. Κάποια από αυτά θα δράσουν ως ένζυμα διαδοχικών αντιδράσεων. Επομένως, η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος περιλαμβάνει έναν ενζυματικό καταρράκτη, στον οποίο το προϊόν της διάσπασης ενός προενζύμου αποτελεί το ένζυμο-καταλύτη της επόμενης αντίδρασης (Loos, M. 1985). Τα μικρότερα τμήματα που απομακρύνονται συνήθως δρουν ως αναφυλατοξίνες, συμμετέχοντας έτσι στην φλεγμονώδη αντίδραση. Κάθε συστατικό του συστήματος χαρακτηρίζεται από ένα όνομα ή έναν αριθμό C1-9. Τα θραύσματα που προκύπτουν από την διάσπαση ενός συστατικού ονομάζονται με μικρά γράμματα, χρησιμοποιείται το γράμμα α για τα μικρότερα και β για τα μεγαλύτερα. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος, όπως προαναφέρθηκε μπορεί να επιτευχθεί μέσω τριών οδών: την κλασσική (classical pathway), την εναλλακτική (alternative pathway) και την οδό των λεκτινών (lectin pathway). Και οι τρεις οδοί οδηγούν στην ενεργοποίηση της λυτικής οδού και το σχηματισμό του τελικού συμπλόκου λύσης της μεμβράνης (MAC, Membrane attack complex).

2.3.1 Κλασσική οδός

Η κλασσική οδός, η οποία αποτελεί το πρώτο μονοπάτι που μελετήθηκε, ενεργοποιείται όταν σχηματιστούν διαλυτά συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος ή όταν γίνει σύνδεση ενός αντισώματος στην επιφάνεια ενός βακτηριακού κυττάρου. Δύναται επίσης να ενεργοποιηθεί από πρωτεΐνες, όπως η C-reactive protein (Mollnes, T.E., Song W.C. & Lambris J.D, 2002), ή ακόμη και απευθείας από κάποιους ιούς, βακτήρια και κύτταρα μολυσμένα από ιούς (Claire, M., Holland, H. & Lambris J.D, 2002). Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτή την οδό ονομάζονται με βάση την σειρά που ανακαλύφθηκαν και όχι με την σειρά ενεργοποίησής τους στην οδό. Το πρώτο συστατικό του συμπληρώματος (C1) είναι ένα Ca^{2+} -εξαρτώμενο

πρωτεϊνικό σύμπλοκο, αποτελούμενο από το C1q και από δύο μόρια από καθένα από τα C1r και C1s. Η οδός ενεργοποιείται όταν οι ανοσοσφαιρίνες IgM ή IgG, οι οποίες είναι δεσμευμένες σε επιφάνειες μικροοργανισμών, δεσμεύουν το C1q. Το γεγονός αυτό οδηγεί τελικά στην ενεργοποίηση του C1s, της σερινοπρωτεάσης που αποκόπτεται από το σύμπλοκο. Η ενεργοποιημένη πρωτεάση C1s αρχικά καταλύει την διάσπαση του C4 σε C4a και C4b (που δεσμεύεται ομοιοπολικά στην επιφάνεια των κυττάρων μέσω μιας ελεύθερης θειοεστερικής ομάδας) και κατόπιν την διάσπαση του C2 σε C2a και C2b. Η διάσπαση του C2 από την σερινοπρωτεάση C1s, γίνεται μετά την πρόσδεση του C2 στο C4b. Ένα μόνο μόριο C1s μπορεί να καταλύσει την διάσπαση πολλών μορίων C4. Το ενζυμικό σύμπλοκο C4bC2a, που αποτελεί πια την κομβερτάση του C3, καταλύει την διάσπαση του τρίτου συστατικού του συμπληρώματος (C3) σε C3a και C3b. Το τρίτο συστατικό του συμπληρώματος (C3) είναι μία από τις πρωτεΐνες που υπάρχει σε μεγάλη συγκέντρωση (1mg/ml) στον ορό και παίζει ένα κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Τα C4b και C3b δεσμεύονται στην επιφάνεια των κυττάρων με ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ μιας δικής τους θειοεστερικής ομάδας και μιας υδροξυλομάδας ή μιας αμινομάδας στην επιφάνεια του κυττάρου. Μετά την δέσμευσή του, το C3b λειτουργεί σαν οψωνίνη (π.χ. προωθεί την φαγοκυττάρωση με την δέσμευσή του σε ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας των φαγοκυττάρων) αλλά μπορεί να ενωθεί και με το σύμπλοκο C4bC2a δημιουργώντας την κομβερτάση του C5. Η κομβερτάση του C5 καταλύει την διάσπαση του C5 σε δύο θραύσματα, τα C5a και C5b. Το μικρότερο θραύσμα C5a είναι μία αναφυλατοξίνη που συμμετέχει στην φλεγμονή προσελκύνοντας φαγοκύτταρα στο σημείο της μόλυνσης. Το μεγαλύτερο θραύσμα C5b ενώνεται με το, ήδη δεσμευμένο στην επιφάνεια των μικροοργανισμών C3b, και επιτρέπει την έναρξη της αυτοσυγκρότησης του συμπλέγματος λύσεως της μεμβράνης (membrane attack complex, MAC) από τα C6, C7, C8, C9 που δεσμεύονται διαδοχικά. Η σύνθεση του συμπλέγματος οδηγεί στον σχηματισμό καναλιών ή πόρων στην επιφάνεια των μικροοργανισμών, που οδηγεί τελικά στην λύση τους (Fujita T, 2002).

2.3.2 Εναλλακτική οδός

Η εναλλακτική οδός ενεργοποιείται άμεσα από ιούς, βακτήρια, μύκητες ή ακόμη και καρκινικά κύτταρα ενώ δεν εξαρτάται από τα αντισώματα. Η ενεργοποίηση πραγματοποιείται όταν το θραύσμα C3b, που έχει προκύψει από την διάσπαση του C3, δεσμεύεται σε υδροξυλομάδες ή αμινομάδες υδατανθράκων ή πρωτεϊνών στην επιφάνεια των μικροβίων. Ο παράγοντας B (factor B), μια πρωτεΐνη ομόλογη του C2, δεσμεύεται στο προσκολλημένο C3b και ενεργοποιείται από μια άλλη σερινοπρωτεάση του πλάσματος, τον παράγοντα D. Ο παράγοντας D καταλύει την διάσπαση του B στα θραύσματα Bb και Ba. Το σύμπλοκο C3bBb που προκύπτει δρα ως κομβερτάση του C3 για την εναλλακτική οδό και σταθεροποιείται από μια γλυκοπρωτεΐνη του ορού, την προπερδίνη. Ένα μόριο C3-κομβερτάσης καταλύει την

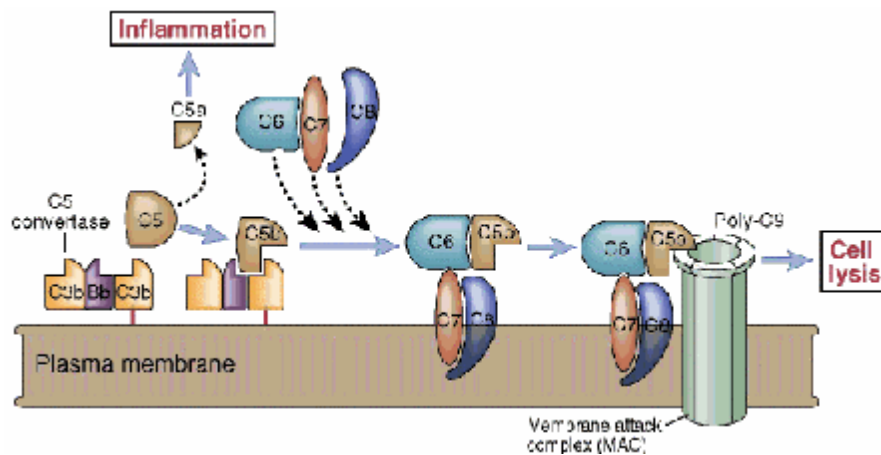
διάσπαση πολλών μορίων C3 ενώ μετατρέπεται σε C5-κομβερτάση με την προσθήκη ενός ακόμη μορίου C3b (C3bBbC3b). Η διάσπαση του C5 από την αντίστοιχη κομβερτάση οδηγεί στον σχηματισμό του MAC και στη λύση του κυττάρου (Fujita T, 2002).

2.3.3 Οδός Λεκτίνης

Η οδός των λεκτινών είναι παρόμοια με την κλασική οδό ενεργοποίησης, με τη μόνη διαφορά να εντοπίζεται στον τρόπο με τον οποίο γίνεται η ενεργοποίηση της. Η ενεργοποίηση δεν γίνεται από συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος. Η οδός αυτή ξεκινά με την δέσμευση ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου, που αποτελείται από την mannose-binding lectin (MBL) και τις σερινοπρωτεάσες MASP-1 και MASP-2 (mannose-binding lectin associated proteases 1 and 2), σε υδατάνθρακες της επιφάνειας των βακτηρίων. Επομένως, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος γίνεται από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς και δεν εξαρτάται από τους μηχανισμούς της προσαρμοστικής ανοσίας. Όταν η MBL δεσμευτεί στους υδατάνθρακες (συνήθως μαννόζες) της επιφάνειας των βακτηρίων ενεργοποιεί τις πρωτεάσες και αυτές καταλύουν τη διάσπαση των συστατικών C2 και C4 του συμπληρώματος. Τα θραύσματα C2a και C4b σχηματίζουν την κομβερτάση του C3 (C4bC2a), η οποία επάγει τη διάσπαση του C3 στα θραύσματα C3a και C3b. Η δέσμευση του θραύσματος C3b στην C3-κομβερτάση, οδηγεί στο σχηματισμό της κομβερτάσης του C5, η οποία καταλύει την διάσπαση του C5. Η λεκτινική οδός, όπως και οι προηγούμενες οδοί, οδηγεί στο σχηματισμό του MAC και στη λύση των βακτηρίων (Fujita T. 2002).

2.3.4 Λυτική οδός

Και οι τρεις οδοί ενεργοποίησης του συμπληρώματος καταλήγουν στη λυτική οδό. Τα συστατικά του συμπληρώματος C5b έως και C9 συγκροτούν το σύμπλοκο λύσεως της μεμβράνης (membrane attack complex-MAC). Ο σχηματισμός του ξεκινά όταν το μόριο C5b δεσμευτεί στο C3b, στην κυτταρική μεμβράνη. Το αποτέλεσμα από αυτή τη δέσμευση είναι η έκθεση της θέσης του C5 στην οποία θα δεσμευτεί το μόριο C6. Η διαδοχική δέσμευση του C7, του C8 και πολλαπλών μορίων C9 στο σύμπλεγμα C5b-C6 καταλήγει στο σχηματισμό του συμπλόκου MAC, το οποίο εισέρχεται στην μεμβράνη και προκαλεί τη λύση του κυττάρου. Τα μόρια C6 έως C9 έχουν προέλθει από ένα κοινό, προγονικό μόριο και μοιάζουν δομικά με την περφορίνη, μια λυτική πρωτεΐνη των φυσικών «κυττάρων-φονιάδων» και των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων. Στον άνθρωπο, τα συστατικά αυτά φέρουν κοινά δομικά μοτίβα, όπως περιοχές θρομβοσπονδίνης, υποδοχέα λιποπρωτεϊνών και EGF περιοχές (epidermal growth factor precursor domain) και την χαρακτηριστική περιοχή MACPF (MAC perforin) (Hobart, M. J., Fernie, B. A. & DiScipio, R. G, 1995).



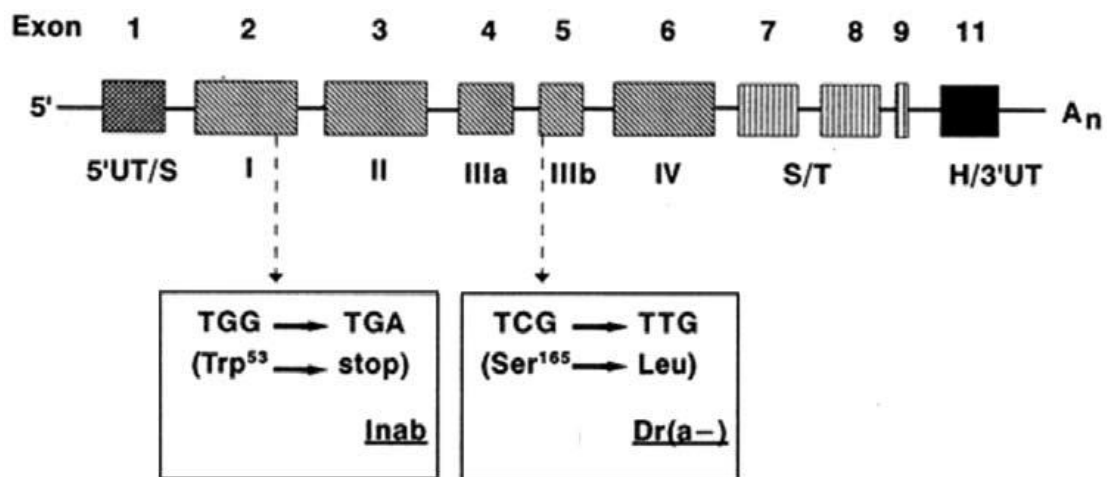
Εικόνα 2.3: Δημιουργία του τελικού συμπλόκου λύσεως της μεμβράνης (MAC).

Ιδιαίτερη αναφορά στις ρυθμιστικές πρωτεΐνες CD55 και CD59 του συμπληρώματος

2.4 CD55-DAF (decay accelerating factor)

2.4.1 Δομή

Το CD55 (μοριακό βάρος 70 kDa) αποτελεί μια γλυκοπρωτεΐνη(GPI-anchor protein) που συνδέεται με GPI άγκυρα στη μεμβράνη των κυττάρων. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το CD55 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 και αποτελείται από 11 εξώνια (Post TW et al, 1990) . Το γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 381 αμινοξέα και περιλαμβάνει ένα οδηγό πεπτίδιο (signal peptide) από 34 βάσεις. Μετά από την ωρίμανση η πρωτεΐνη περιλαμβάνει 4 βραχείες συναινετικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (short consensus repeat, SCR) από 60 αμινοξέα, όπου η καθεμία περιέχει 4 μόρια κυστεΐνης και υπάρχουν ομολογίες με περιοχές άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος. Αμέσως μετά τα SCRs υπάρχει μια αλληλουχία 70 βάσεων που είναι πλούσια σε σερίνη και θρεονίνη. Η πρωτεΐνη τελειώνει με ένα υδρόφοβο τμήμα 24 αμινοξέων, το οποίο αφαιρείται μετά τη μεταγραφή, όταν η πρωτεΐνη προσδένεται στην GPI, με αποτέλεσμα αυτό το τμήμα να μην υπάρχει στην τελική πρωτεΐνη(Lublin DM, Atkinson JP, 1989, Μελέτης Γ και συνεργάτες, 2009).



Εικόνα 2.4: Το γονίδιο του DAF (CD55) (Από: Μελέτης και συνεργάτες, 2009)

2.4.2 Λειτουργία

Η πρωτεΐνη CD55 αποδομεί το σύμπλεγμα της κονβερτάσης, τόσο της κλασικής (C4b2a) όσο και της εναλλακτικής (C3bBb) οδού του συμπληρώματος (Kinoshita T, Medof ME, Nussenzweig V, 1986). Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλει την εναπόθεση των C3 κλασμάτων στην επιφάνεια του κυττάρου και μειώνει την καταστροφή του κυττάρου μέσω του αυτόλογου συμπληρώματος. Η απογλυκοζυλίωσή της, με αφαίρεση μιας N-γλυκάνης (μοριακό βάρος 3 kDa) και πολλών O-γλυκανών, έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργείται μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 46 kDa.

Εφόσον το CD55 ρυθμίζει τη δράση της C3 κονβερτάσης στα φυσιολογικά ερυθρά, η απουσία του από τα κύτταρα της ΠΝΑ ευθύνεται για την αυξημένη ευαισθησία τους στο συμπλήρωμα και για την εμφάνιση της αιμολυτικής αναιμίας που παρατηρείται (Lublin DM, Atkinson JP, 1989). Η απουσία του CD55 δεν είναι ο μόνος υπεύθυνος παράγοντας για την αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων της ΠΝΑ στη λύση του συμπληρώματος. Πειράματα σε τρανσγονιδιακά ποντίκια, τα οποία δεν εκφράζουν το CD55, έδειξαν ότι η έλλειψή του δεν αρκεί από μόνη της για να προκαλέσει ομόλογη αιμόλυση. Αντίθετα, όταν ανεπαρκεί η ρύθμιση του συμπλέγματος προσβολής της μεμβράνης (membrane attack complex, MAC), όπως συμβαίνει στην ετερόλογη ενεργοποίηση του συμπληρώματος ή στους ασθενείς με ΠΝΑ, τότε η ελαττωμένη δραστηριότητα του CD55 μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του ρυθμού αιμόλυσης (Sun X et al, 1999, Μελέτης Γ και συνεργάτες, 2009).

2.5 CD59-MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis) ή HRF20 (homologous restriction factor 20)

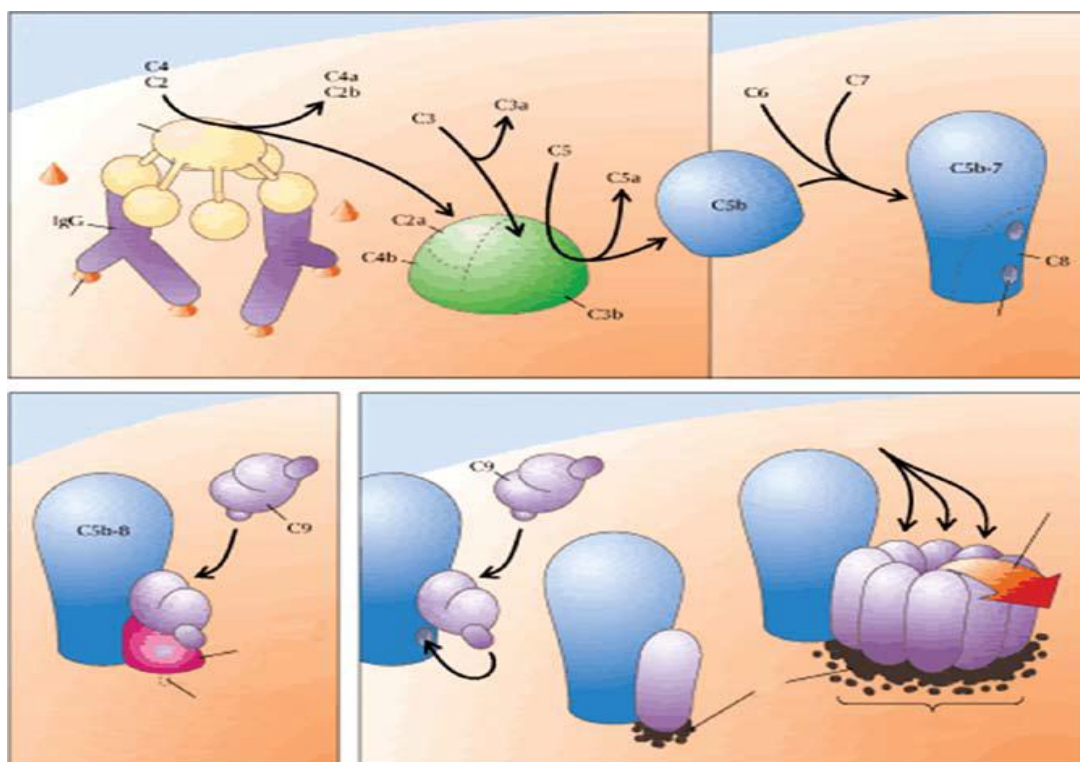
Το γεγονός ότι τα κύτταρα της ΝΠΑ είναι ευαίσθητα στη λύση μέσω του συμπληρώματος συνδέθηκε αρχικά με την απουσία του CD55, αν και η απουσία μόνο του CD55 δεν είναι υπεύθυνη από μόνη της γι' αυτό το φαινόμενο. Οι ενδείξεις ότι άτομα με εκλεκτική ανεπάρκεια του CD55 δεν εμφανίζουν αιμολυτική αναιμία χρησίμευσαν για να τονιστεί η ανάγκη μιας άλλης πιθανής εξήγησης. Ο καθορισμός του CD59 βοήθησε στην κατανόηση του μηχανισμού της αιμόλυσης στη ΝΠΑ.

2.5.1 Δομή

Το CD59 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 18–20 kDa. Συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω της άγκυρας GPI (Tseng JE et al, 1995). Το υπεύθυνο γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με 128 αμινοξέα (οι 25 βάσεις αποτελούν μια αμινοτελική οδηγό αλληλουχία). Όταν η πρωτεΐνη συνδέεται με την άγκυρα GPI, οι 28 τελευταίες βάσεις αποκόπτονται (Davies A, et al, 1989). Η αλληλουχία του cDNA δείχνει δύο δυνητικές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης (ASN8, ASN18) στην ώριμη γλυκοπρωτεΐνη, όμως μόνο η ASN18 είναι ενεργά γλυκοζυλιωμένη. Η επεξεργασία με N-γλυκανάση μειώνει το μοριακό βάρος σε 14 kDa. Η πρωτεΐνη είναι πλούσια σε κυστεΐνη και η διαμόρφωσή της καθορίζεται από στέρεους δισουλφιδικούς δεσμούς. Το γονίδιο για το CD59 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 (Forsberg UH et al, 1989, Μελέτης Γ και συνεργάτες, 2009) .

2.5.2 Λειτουργία

Το CD59 συνδέεται με το C8 κλάσμα του συμπληρώματος και έτσι προλαμβάνεται η ένωση του C9 με το C5b-8 σύμπλεγμα με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η είσοδος του C9 στη μεμβράνη. (Meri S et al, 1990) . Με αυτό τον τρόπο, το CD59 ελέγχει τα απώτερα στάδια ενεργοποίησης του συμπληρώματος και προλαμβάνει την αυτόλογη λύση αναστέλλοντας το σχηματισμό του συμπλέγματος προσβολής της μεμβράνης(MAC) .



Εκόνα 2.5: Δράση του CD59. Από Μελέτης και συνεργάτες.

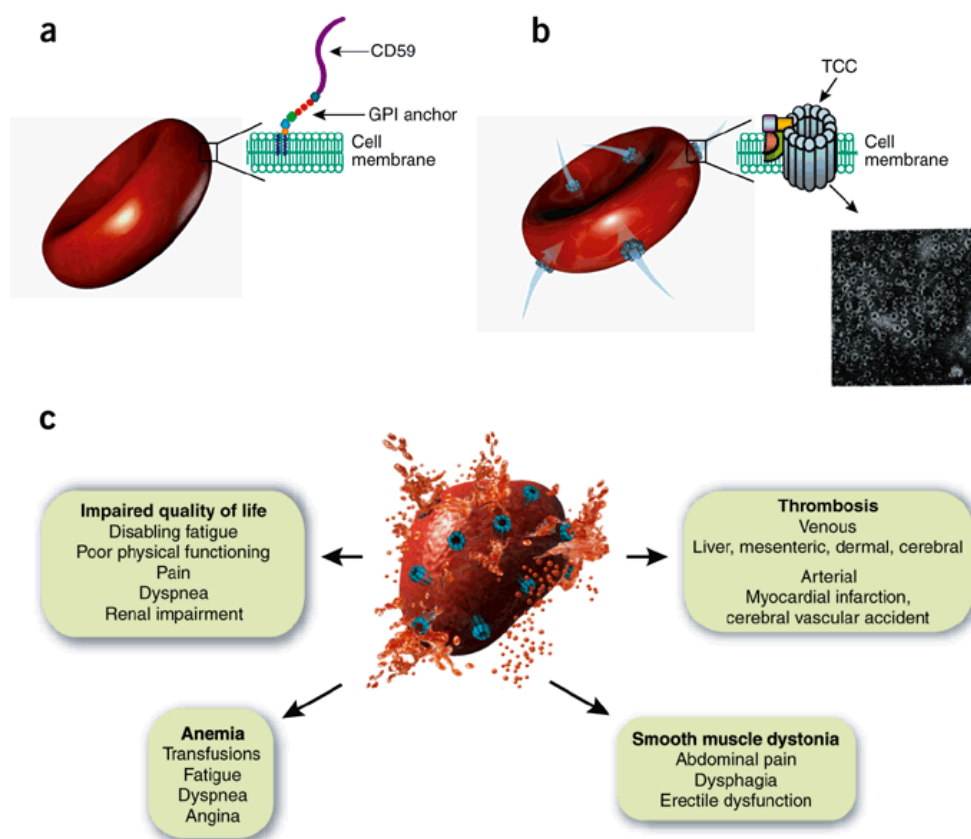
Το πόσο σημαντική είναι η ανεπάρκεια του CD59 έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία με την ανεύρεση ενός Ιάπωνα ασθενή με κληρονομική ανεπάρκεια του CD59. Ο ασθενής 22 ετών άντρας παρουσιάζε ωχρότητα και αιματουρία για χρονικό διάστημα περίπου 9 ετών. Είχε ένα επεισόδιο αιμολυτικής αναιμίας και αιμοσφαιρινουρίας σε ηλικία 13 ετών. Ο ασθενής αυτός παρουσίαζε πλήρη ανεπάρκεια του CD59 τόσο από τα ερυθρά όσο και από τα πολυμορφοπύρηνα (το CD59 απουσίαζε επίσης και από καλλιέργειες ινοβλαστών). Ο ασθενής είχε ιστορικό αιμολυτικών επεισοδίων με αιμοσφαιρινουρία και θετική δοκιμασία οξινισθέντος ορού στη διάρκεια των εννέα ετών. Και οι δύο γονείς του ήταν ξαδέλφια ενώ κανένας απο τους δύο δεν είχε παρουσιάσει αιμολυτική αναιμία ή αιμοσφαιρινουρία. (Yamashina M et al, 1990).

Όπως περιγράφηκε αναλυτικά πιο πάνω, οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες CD55 και CD59 προστατεύουν τα κυκλοφορούντα αιμοποιητικά κύτταρα από τη δράση του συμπληρώματος. Υπό φυσιολογικές συνθήκες πραγματοποιείται τυχαία-αυτόματη υδρόλυση του C3 κλάσματος, έτσι ώστε να έχουμε συνεχή και χαμηλού βαθμού ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα κάθε ερυθροκύτταρο να βομβαρδίζεται καθημερινά με 1000 μόρια C3b, που παράγονται αυτόματα από την κομβερτάση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος. Είναι κατανοητό λοιπόν ότι αν δεν υπήρχαν οι CD55 και CD59 πρωτεΐνες, τα ερυθρά

αιμοσφαίρια υπό φυσιολογικές συνθήκες θα ήταν ευαίσθητα στη λυτική δράση του συμπληρώματος.

2.6 Κυτταρικές διαταραχές στην ΠΝΑ

Όλα τα κύτταρα (λευκά, ερυθρά, αιμοπετάλια) που κυκλοφορούν στο αίμα εμφανίζουν ανεπάρκεια σε πολλές πρωτεΐνες της μεμβράνης, οι οποίες συνδέονται μέσω ενός μορίου GPI. Εκτός από την ανεπάρκεια των πρωτεϊνών στην επιφάνεια των ερυθρών που ρυθμίζουν το συμπλήρωμα, όπως το CD55 (DAF) και το CD59 (MIRL) έχει παρατηρηθεί επίσης ανεπάρκεια του υποδοχέα FcγIII ή CD16 (λειτουργική πρωτεΐνη του πολυμορφοπύρηνου), του LFA-3 ή CD58 (πρωτεΐνη σημαντική για την προσκόλληση των λεμφοκυττάρων) και του CD14 (πρωτεΐνη της μεμβράνης του μονοκυττάρου). Επίσης και άλλα ένζυμα όπως η ακετυλοχολινεστεράση (AChE) των ερυθρών, η LAP των πολυμορφοπυρήνων και η 5'-εκτονουκλεοτιδάση των λεμφοκυττάρων (CD73) λείπουν από τα κύτταρα αυτά.



Εικόνα 2.6: α) Φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια που εκφράζουν ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συμπληρώματος, συμπεριλαμβανομένου του τερματικού αναστολέα συμπληρώματος CD59. Η παρουσία του CD59 προστατεύει αυτά τα κύτταρα από την αυτόλογη δράση του συμπληρώματος. β) ΠΝΑ ερυθρά αιμοσφαίρια με έλλειψη της άγκυρας GPI. γ) Αιμόλυση στο ΠΝΑ ερυθρό αιμοσφαίριο.

(E.R. Podack . Molecular mechanisms of cytolysis by complement and cytolytic lymphocytes. *J. Cell. Biochem.* 30, 133–170 (1986)).

Τα «παθολογικά» ερυθρά στην ΠΝΑ είναι ευαίσθητα στη λυτική δράση του συμπληρώματος λόγω της απουσίας ή της ανεπαρκούς έκφρασης από τη μεμβράνη των CD55 και CD59 (η ευαισθησία τους καθορίζεται από το βαθμό της απουσίας των GPI-anchor proteins). Τα ερυθρά αιμοσφαίρια με ανεπάρκεια του DAF, χαρακτηρίζονται από αυξημένη εναπόθεση του C3 κλάσματος του συμπληρώματος στην επιφάνειά τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλέγματος της C3 κονβερτάσης. Παράλληλα η έλλειψη του MIRL οδηγεί στο σχηματισμό του MAC (C5b-9), γνωστό και ως τελικό σύμπλεγμα του συμπληρώματος (terminal complement complex, TCC). Το σύμπλεγμα αυτό σχηματίζει πόρους στη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα στη μεμβράνη των ερυθρών, γεγονός που επιτρέπει εκλεκτικά την είσοδο νερού, ιόντων και μικρών μορίων στον ενδοκυττάριο χώρο, οδηγώντας το κύτταρο σε λύση. Παράλληλα, μόρια του καταρράκτη του συμπληρώματος προάγουν διεργασίες όπως η χημειοταξία και η οψωνινοποίηση, που επάγουν τη φαγοκυττάρωση.

Οι ασθενείς με ΠΝΑ υφίστανται θεωρητικά και εξωαγγειακή αιμόλυση εξ αιτίας της απουσίας του CD55 από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη, που οδηγεί στην οψωνινοποίηση των παθολογικών ερυθρών από παράγωγα του C3 κλάσματος και την απομάκρυνσή τους από τα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (ΔΕΣ). Με βάση τις δοκιμασίες λύσης των ερυθρών παρουσία ενεργοποιημένου συμπληρώματος, καθορίζονται *in vitro* τρεις ερυθροκυτταρικοί πληθυσμοί. Ο πρώτος πληθυσμός ΠΝΑ κυττάρων (τύπου I) αντιδρά φυσιολογικά, ο άλλος πληθυσμός ΠΝΑ κυττάρων (τύπου III) είναι 15-25 φορές πιο ευαίσθητος στη λύση και υπάρχει και ένας ενδιάμεσος πληθυσμός ΠΝΑ (τύπου II) που είναι 3-5 φορές πιο ευαίσθητος από τον πρώτο (Μελέτης Γ και συνεργάτες, 2009, Amy E. De Zern, Robert A. Brodsky, 2015)

Όσον αφορά στα αιμοπετάλια, η απουσία του CD59 από τη μεμβράνη τους και η δημιουργία του συμπλέγματος επίθεσης της μεμβράνης (membrane attack complex, MAC) οδηγούν στην αυξημένη ενεργοποίησή τους. Η παρουσία του MAC οδηγεί στην έκκριση του παράγοντα V (factor V, FV) από τα α κοκκία, αυξάνει τη δραστηριότητα της προθρομβινάσης και οδηγεί στην απελευθέρωση μικροκυστιδίων *in vitro* (Sims PJ, Wiedmer T, 1995). Φυσιολογικά, οι κυτταρικές μεμβράνες αποτελούνται από ανιονικά, όξινα φωσφολιπίδια, όπως η φωσφατιδυλοσερίνη (phosphatidyl-serine, PS), στο εσωτερικό τους μέρος, και η σφιγγομυελίνη και φωσφατιδυλοχολίνη στο εξωτερικό τους μέρος. Η διέγερση των αιμοπεταλίων από το συμπλήρωμα φαίνεται ότι οδηγεί στην απώλεια αυτής της μεμβρανικής ασυμμετρίας και την έκθεση των όξινων φωσφολιπιδίων (ειδικά PS) προς την

πλευρά του πλάσματος, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση μικροσωματιδίων. Η έκθεση της PS στην επιφάνεια είτε των μικροσωματιδίων είτε της μεμβράνης θεωρείται ότι αποτελεί μια καταλυτική επιφάνεια για τη συναρμολόγηση των προπηκτικών συμπλεγμάτων της προθρομβινάσης (FVa/FXa) και της τενάσης (FVIIIa/FIXa).

Τα πολυμορφοπύρρηνα, αν και παρουσιάζουν την ίδια απουσία πρωτεϊνών που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω της άγκυρας GPI, προστατεύονται από τη λυτική δράση του συμπληρώματος λόγω της παρουσίας στην επιφάνειά τους ενός non-GPI-linked διαμεμβρανικού αναστολέα της ρυθμιστικής πρωτεΐνης MCP CD46.

2.7 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Η ΠΝΑ στην κλασική της μορφή χαρακτηρίζεται από τα ευρήματα αναιμίας αιμολυτικού τύπου με αύξηση των δικτυοερυθροκυττάρων (ΔΕΚ), ελάττωση των απτοσφαιρινών, αύξηση της έμμεσης χολερυθρίνης και αύξηση των επιπέδων της γαλακτικής δεϋδρογενάσης (LDH) (Brodsky 2009). Η αύξηση της LDH μπορεί να φτάσει και πάνω από 3000 /L ανάλογα με το βαθμό της αιμόλυσης. Ο μυελός των οστών μπορεί να παρουσιάζει υπερπλασία της ερυθράς σειράς.

Κυριότερο χαρακτηριστικό εύρημα της κλινικά εμφανούς ΠΝΑ αποτελεί η αιμολυτική αναιμία. Η αιμόλυση μπορεί να είναι ενδοαγγειακή, χρόνια και μερικές φορές παροξυντική. Αυτό εξαρτάται από τη λυτική δράση του MAC στα ερυθροκύτταρα, ανάλογα με το αν υπάρχει μερική ή ολική έλλειψη του CD59. Εμφανίζεται επίσης και εξωαγγειακή αιμόλυση χαμηλότερου βαθμού, η οποία ξεκινά με αύξηση της οψωνοποίησης των ερυθρών από τα θραύσματα του C3 λόγω έλλειψης του CD55 (Risitano 2012). Τα οψωνοποιημένα ερυθρά από τα θραύσματα του συμπληρώματος καθαίρονται και καταστρέφονται από τα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (ΔΕΣ). Λόγω της ταχείας όμως καταστροφής των ερυθρών, η εξωαγγειακή αιμόλυση καθίστανται αφανής. Υπάρχουν όμως και αρκετές φορές που η αναιμία είναι μέτριας βαρύτητας και η ανάδειξή της δεν είναι εύκολη λόγω της φυσιολογικής τιμής της έμμεσης χολερυθρίνης. Η αντίδραση Coombs είναι κατά κανόνα αρνητική.

Σε ένα ποσοστό περίπου 70% παρατηρείται λευκοπενία και ήπια ουδετεροπενία, η οποία οφείλεται σε μειωμένη παραγωγή (Nishimura et al 2004). Η επιβίωση των πολυμορφοπύρρηνων απουσία σπληνομεγαλίας είναι φυσιολογική. Συχνά παρατηρείται μειωμένη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης των πολυμορφοπύρρηνων. Στο 50-70% των περιπτώσεων παρουσιάζεται θρομβοπενία με αριθμό αιμοπεταλίων $<150 \times 10^9/L$. Τα μεγακαρυοκύτταρα στο μυελό μπορεί να

είναι φυσιολογικά ή ελαττωμένα. Οι κυτταροπενίες εξαρτώνται από την υποκείμενη βλάβη στο μυελό των οστών.

Η ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης δείχνει συχνά μικρή αύξηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (Dacie & Lewis 1972). Στη ΠΝΑ παρατηρείται μείωση σε διάφορα αντιγόνα των ομάδων αίματος, όπως τα αντιγόνα A1 αλλά και A, B και H. Πολύ συχνά ανευρίσκεται αυξημένο το αντιγόνο i, το οποίο μαζί με την αύξηση της αιμοσφαιρίνης HbF βεβαιώνει την αυξημένη δραστηριότητα της ερυθράς σειράς. Αντίθετα η μείωση των αντιγόνων A, B και H υποδεικνύει την ανεπάρκεια των τρανσφερασών.

Τέλος σε ασθενείς με ΠΝΑ έχουν βρεθεί σπάνιες κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Κάποιες από αυτές είναι η έλλειψη του χρωμοσώματος Y και η τρισωμία του χρωμοσώματος 9 (Lee 1993). Βέβαια καμία από αυτές δε συμμετέχει στη διάγνωση ή στην επιβεβαίωση της νόσου.

2.8 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Η ΠΝΑ είναι μια σπάνια νόσος (1–2 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο κατοίκων). Η συχνότητά της δεν είναι γνωστή λόγω της ελλιπούς καταγραφής του νοσήματος. Προσβάλλει όλες τις ηλικίες, συχνότερα τα άτομα ηλικίας 30–50 ετών. Περίπου 10% των ασθενών είναι μικρότερο από 20 ετών (Dacie and Lewis 1972, Hillmen et al 1995 b, Nishimura et al 2004, Peffault de Latour et al 2010). Στην Ευρώπη, οι γυναίκες προσβάλλονται συχνότερα σε σχέση με τους άνδρες (1,2/1) (Gramont 1982), ενώ στην Ασία οι άνδρες προσβάλλονται συχνότερα (Pramoongago et al 1999). Στα παιδιά κάτω των 10 ετών η διάγνωση τις περισσότερες φορές δεν πραγματοποιείται έγκαιρα, λόγω της σπανιότητας του νοσήματος.

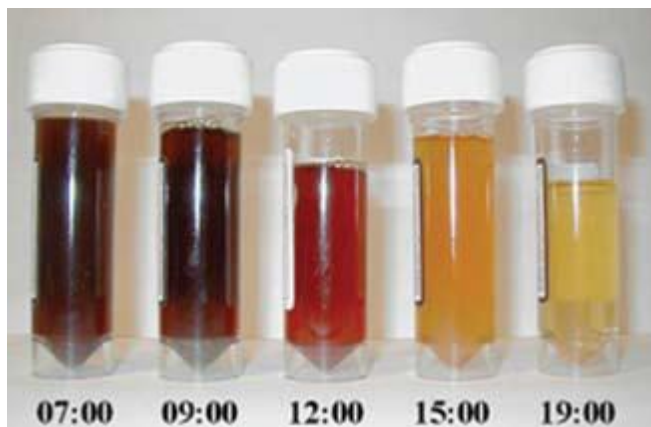
Η ποκίλη έκφραση των συμπτωμάτων της νόσου συχνά προκαλεί σημαντική καθυστέρηση στη διάγνωση της.

2.9 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

Οι τρεις κύριες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου είναι η αιμόλυση, η μυελική ανεπάρκεια και η αυξημένη τάση για ανάπτυξη θρομβώσεων (Risitano AM, 2012, Parker C et al, 2005) . Σύμφωνα με αυτές, οι ασθενείς διακρίνονται σε αυτούς που εμφανίζουν κλασική ή αιμολυτική μορφή ΠΝΑ, σε αυτούς με ΠΝΑ που σχετίζεται με σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας και η υποκλινική μορφή ΠΝΑ.

Χαρακτηριστικό της «κλασικής ΠΝΑ» αποτελεί η χρόνια ενδαγγειακή αιμόλυση, η οποία συνοδεύεται από παροξυντικά επεισόδια οξείας αιμόλυσης, πο συνήθως συνοδεύονται από και από αιμοσφαιρινουρία. Η παρουσία και η βαρύτητα της αιμόλυσης εξαρτάται από την αναλογία των παθολογικών ερυθρών, τη βαρύτητα

της έλλειψης των GPI-anchor πρωτεϊνών και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Η αιμόλυση είναι συνεχής καθ'όλη τη διάρκεια της ημέρας αλλά η δραστηριότητα του συμπληρώματος φαίνεται ότι αυξάνεται τις νυκτερινές ώρες οπότε και οδηγεί σε αιμοσφαιρινουρία που γίνεται αντιληπτή στα πρώτα πρωϊνά ούρα που είναι σκοτεινόχροα και συνήθως γίνονται φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της ημέρας.



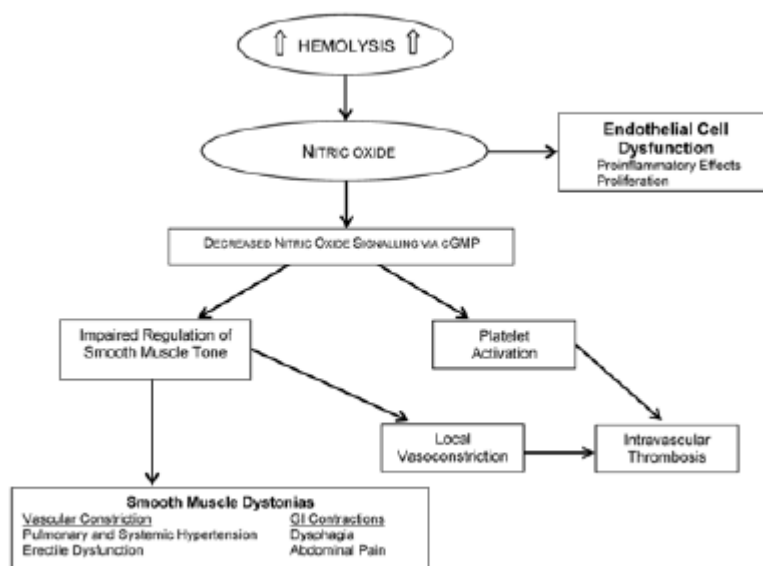
Εικόνα 2.7: Ούρα ασθενών με κλασική νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία κατά τη διάρκεια της ημέρας. (Πηγή: http://www.hmds.org.uk/pnh_review.html).

Είναι πιθανόν σημαντικό ρόλο, στην αιμόλυση κατά τη διάρκεια της νύχτας, να παίζει η μείωση του pH κατά τη διάρκεια του ύπνου. Λόγω του μειωμένου αναπνευστικού ρυθμού πιθανόν να επάγεται η ενεργοποίηση του συμπληρώματος και έτσι να αυξάνεται ο ρυθμός της αιμόλυσης, όμως η υπόθεση αυτή δεν έχει επαληθευτεί (Brodsky 2009). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο πιθανόν να παίζουν και οι διακυμάνσεις της στάθμης της κορτιζόλης κατά τη διάρκεια της ημέρας και της νύκτας. Άλλη μια πιθανή εξήγηση για την εμφάνιση της αιμοσφαιρινουρίας το πρωί είναι η αυξημένη απορρόφηση της λιποπολυσακχαρίδης (lipopolysaccharide, LPS) ενός βακτηριακού παραπροϊόντος Gram(-) μικροοργανισμών της εντερικής χλωρίδας, που ενεργοποιεί κυρίως την κλασική οδό του συμπληρώματος (Simmons et al 1989). Σε πολλές περιπτώσεις η αιμοσφαιρινουρία δεν είναι εμφανής και δεν γίνεται αντιληπτή από τον ασθενή. Συχνά το αιμολυτικό επεισόδιο δεν συνδέεται με κάποιον εκλυτικό παράγοντα, ενώ στο 50% των περιπτώσεων, η παροξυντική αιμοσφαιρινουρία εκλύεται από λοιμώξεις, χειρουργικές επεμβάσεις, φυσική καταπόνηση, έμμηνο ρύση, εμβολιασμούς, μετάγγιση αίματος ή λήψη μερικών φαρμάκων, όπως σουλφοναμιδών, ασπιρίνης, πενικιλίνης, ηπαρίνης, σιδήρου κ.λπ. Μετά από τη χορήγηση σιδήρου επίσης μπορεί να εμφανίζεται αιμόλυση, η οποία φαίνεται να σχετίζεται με τη διέγερση της ερυθροποίησης στα σιδηροπενικά άτομα και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγαλύτερου αριθμού παθολογικών ερυθροκυττάρων.

Το σημαντικότερο κλινικό πρόβλημα είναι οι συνέπειες της αναιμίας. Η αναιμία είναι χαρακτηριστική σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις της νόσου. Πρόκειται για αιμολυτική αναιμία που συνοδεύει είτε από την αρχή είτε δευτεροπαθώς την παροξυντική αιμοσφαιρινουρία. Οι ασθενείς με ΝΠΑ και αναιμία εμφανίζουν αδυναμία, κόπωση, ωχρότητα, δύσπνοια και άλλες διαταραχές στο καρδιοαναπνευστικό σύστημα. Σε ασθενείς με σημαντική αιμόλυση, το μέγεθος της κόπωσης είναι ανάλογο του βαθμού της αναιμίας (Brodsky 2009). Η βαρύτητα της αιμολυτικής αναιμίας κυμαίνεται από ήπια μέχρι βαριά. Στους παροξυσμούς της αιμόλυσης αυξάνει κατά πολύ ο ρυθμός της αιμόλυσης ενώ τα επίπεδα της LDH μπορεί να αυξηθούν έως 25 φορές πάνω από τα φυσιολογικά. Η αιμοσφαιρινουρία παρατηρείται στο 90% των ασθενών σε παροξυσμό αιμόλυσης, ενώ τα σκοτεινόχρωα ούρα διαρκούν 3-7 ημέρες ή περισσότερο και ο ασθενής κινδυνεύει από οξεία νεφρική ανεπάρκεια (ΟΝΑ). Η υπόχρωμη, μικροκυτταρική, σιδηροπενική αναιμία λόγω της χρόνιας απώλειας σιδήρου από τα ούρα (έως και 20mg Fe καθημερινά) μπορεί να επικαλύπτει το αιμολυτικό πρότυπο της νόσου.

Συμπτώματα που έχουν συσχετισθεί σημαντικά με τους παροξυσμούς, οφείλονται στη δέσμευση του κυκλοφορούντος NO από την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη. Το NO είναι σημαντικός ρυθμιστής του τόνου των αγγείων. Η μείωσή του στους ιστούς μπορεί να εξηγήσει αρκετές από τις κλινικές εκδηλώσεις της ΝΠΑ. Φυσιολογικά στο ενδοθήλιο, το οξυγόνο και η αργινίνη αντιδρούν με τη NO-συνθετάση για την παραγωγή NO και κιτρουλίνης. Το παραγόμενο NO διατηρεί φυσιολογικό τον αγγειακό τόνο και περιορίζει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη που εκλύεται στο πλάσμα έχει σημαντική συγγένεια με το NO, με αποτέλεσμα την έκπλυσή του. Στην ΠΝΑ, η αργινίνη(υπόστρωμα) και το NO μειώνονται εξαιτίας της έντονης αιμοσφαιριναιμίας και της απελευθέρωσης της αργινάσης από τα ερυθρά. Τα παραπάνω επιτείνονται, αφού λόγω της ενδοαγγειακής αιμόλυσης μειώνονται οι απτοσφαιρίνες και δεν δεσμεύεται η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη του πλάσματος. Η μειωμένη απόδοση του NO από τους ιστούς εκδηλώνεται με αίσθημα κόπωσης, επηρεασμό της ποιότητας ζωής, άτυπα κοιλιακά άλγη, οισοφαγικό σπασμό και δυσφαγία καθώς και στυτική διαταραχή (Moyo et al 2004, Rother et al 2005).

Αυτά τα κοινά συμπτώματα μπορεί να υποκρύπτουν τις καταστροφικές για την υγεία συνέπειες της ΠΝΑ. Υποκείμενες διαταραχές μπορεί να υποβόσκουν όπως η οξεία και η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, η καρδιακή δυσλειτουργία, η πνευμονική υπέρταση και οι απειλητικές για τη ζωή θρομβώσεις.



Εικόνα 2.8 : Συνέπειες της δέσμευσης και απομάκρυνσης του μονοξειδίου του αζώτου κατά τη διάρκεια της ενδαγγειακής αιμόλυσης (Από: Rother, et al : The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma haemoglobin. A novel mechanism of human disease. JAMA. 2005 Apr 6;293(13):1653-62.)

Η θρόμβωση επέρχεται στο 30-40% των ΠΝΑ ασθενών και αποτελεί κύρια αιτία θανάτου (ευθύνεται για το 40-67% των θανάτων στην ΠΝΑ). Δίκαια ο Luzzato αναφέρει την ΠΝΑ ως την πιο ύπουλη επίκτητη θρομβοφιλική κατάσταση γνωστή στην ιατρική. Πολλαπλοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην παθογένεσή της, με την παθοφυσιολογία της όμως να παραμένει ακόμη δυσνόητη και υπό συνεχή ερευνητική μελέτη. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση των ΑΜΠ, αιμόλυση, βλάβη και ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και στρατολόγηση και ενεργοποίηση των λευκών αιμοσφαιρίων. όλες αυτές οι διαταραχές οδηγούν σε μια υπερπηκτική κατάσταση με επακόλουθο την αυξημένη τάση για θρομβώσεις

Η μερική ή ολική απουσία των GPI-πρωτεϊνών CD55 και CD59 από την μεμβράνη όχι μόνο των ερυθρών, αλλά και των λευκών αιμοσφαιρίων, αιμοπεταλίων και ενδοθηλιακών κυττάρων, οδηγεί σε μεταβολές στη μεμβράνη τους. Η φωσφολιπιδική μεμβρανική ασυμμετρία (που χαρακτηρίζει τη δυναμική της φυσιολογικής κυτταρικής μεμβράνης) χάνεται και η μετακίνηση του αρνητικά φορτισμένου φωσφολιπιδίου φωσφατιδυλοσερίνη από την εσωτερική, στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, αποτελεί τη μεταβολή-κλειδί για την παθογένεση της θρόμβωσης. Η ως άνω μεταβολή κυρίως στα αιμοπετάλια οδηγεί αφενός στην εμφάνιση θέσεων σύνδεσης των προπηκτικών συμπλεγμάτων της τενάσης (FVIIIa/FIXa) και της προθρομβινάσης (FVa/FXa) με επακόλουθη ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης Αφετέρου οδηγεί στο σχηματισμό και την

απόσπαση από την μεμβράνη των ΑΜΠ μικροσωματιδίων με προπηκτικές ιδιότητες.

Για τη θρομβογένεση μπορεί να ευθύνεται και η μειωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα, λόγω απουσίας ενός υποδοχέα ουροκινάσης (urokinase plasminogen activator receptor, UPAR) στα μονοκύτταρα της ΝΠΑ, που έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του σχηματισθέντος θρόμβου. (Kinoshita T et al, 2006, Foley et al, 2016). Ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA) κυκλοφορεί στο πλάσμα και μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα του στην κυτταρική μεμβράνη οδηγεί στη μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη

Ο μεμβρανικός υποδοχέας του, ο uPAR-CD87 αποτελεί τύπου GPI-πρωτεΐνη και υποεκφράζεται από τα PNH μονοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα. Οπότε η απουσία θέσης μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη οδηγεί σε μείωση της διαθεσιμότητας uPA τοπικά και αναστολή της ινωδολυτικής δραστηριότητας.

Επίσης η ενεργοποίηση ουδετεροφίλων, αιμοπεταλίων και ενδοθηλιακών κυττάρων λόγω αυξημένης παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών συμβάλλει στην θρομβογένεση.

Η θρόμβωση μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιαδήποτε θέση και αφορά και το φλεβικό (85%) και το αρτηριακό δίκτυο (15%). ΠΝΑ κλώνος ανευρέθη σε ποσοστό 9-19% ασθενών με θρόμβωση των ηπατικών φλεβών (Budd-Chiari syndrome) και σε 0% - 2% με θρόμβωση της πυλαίας φλέβας. Έλεγχος ΠΝΑ συστήνεται ανεξάρτητα από τα επίπεδα LDH, στους κάτωθι ασθενείς με ανεξήγητη θρόμβωση: 1) σε νέα άτομα, 2) με θρόμβωση σε ασυνήθη θέση (ενδοκοιλιακές, εγκεφαλικές φλέβες, δερματικό φλεβικό δίκτυο), 3) με συνοδές ενδείξεις αιμόλυσης και 4) με συνοδό κυτταροπενία. Έχουν παρατηρηθεί θρομβώσεις των ενδοκοιλιακών φλεβών κυρίως στη σπληνική, στις ηπατικές, στις μεσεντέριες ή στην πυλαία φλέβα. Οι θρομβώσεις αυτές οδηγούν σε έντονο κοιλιακό άλγος, σε σπληνομεγαλία και μερικές φορές σε ρήξη του σπληνός. Το 70% περίπου των ασθενών παρουσιάζουν θρομβώσεις των μεσεντερίων αγγείων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τα υποτροπιάζοντα κοιλιακά άλγη (Dacie & Lewis, 1972). Τα κοιλιακά άλγη μπορεί να είναι πολύ έντονα και επίμονα και μερικές φορές δημιουργούν προβλήματα διαφορικής διάγνωσης οξείας χειρουργικής κοιλίας. Είναι πιθανό η συχνότητα ανάπτυξης σοβαρών θρομβώσεων να σχετίζεται με το ποσοστό των κοκκιοκυττάρων με έλλειψη των GPI πρωτεϊνών. Η έλλειψη σε ποσοστό άνω του 50% των GPI-APs οδηγεί σε θρόμβωση με συχνότητα περίπου 45%, ενώ η έλλειψη σε ποσοστό κάτω του 50% οδηγεί σε θρόμβωση με συχνότητα περίπου 5%. Ο κίνδυνος αυξάνει κατά 1,64 για κάθε επιπλέον 10% έλλειψη των GPA-Aps. Ασθενείς με έλλειψη πάνω από 70% κινδυνεύουν 12 φορές περισσότερο με την εμφάνιση σοβαρής θρόμβωσης σε σχέση με ασθενείς με κλώνο ΝΠΑ 20% (Μελέτης και συνεργάτες, 2009, Moyo VM et al, 2004, Hall C et al 2003). Μια άλλη συνέπεια της θρόμβωσης των ηπατικών φλεβών μπορεί να είναι και η εμφάνιση του συνδρόμου Budd-Chiari, που συνοδεύεται από ίκτερο και αύξηση των

ηπατικών ενζύμων. Οι θρομβώσεις εγκεφαλικών αγγείων κατά την πορεία της νόσου είναι επίσης συχνές και βαριές και συνοδεύονται από κεφαλαλγία και νευρολογικά συμπτώματα λόγω της αυξημένης ενδοκρανιακής πίεσης. Σπανιότερα μπορεί να εμφανιστεί και θρόμβωση στο δερματικό αγγειακό δίκτυο ή θρόμβωση νεφρικών φλεβών ή αρτηριών, ενώ αναφέρεται και θρόμβωση αμφιβληστροειδικής φλέβας.

2.9.1 Απλαστική αναιμία (AA) και νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΠΝΑ)

Οι κυτταροπενίες στην ΠΝΑ είναι συχνές, ήπιες έως σοβαρές (αναιμία 88-94%, λευκοπενία 41-72%, θρομβοπενία 51-80%) και εξαρτώνται και από την υποκείμενη συνυπάρχουσα βλάβη στο μυελό των οστών (σχετική ή απόλυτη μυελική ανεπάρκεια). Κλώνος ΠΝΑ μπορεί επίσης να ανιχνεύεται σε ποσοστό περίπου 50% των ασθενών κατά τη διάγνωση της απλαστικής αναιμίας (AA), καθώς και σε ποσοστό 35% των ασθενών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (ΜΔΣ). Η ΠΝΑ μπορεί να προηγείται ή να ακολουθεί την εμφάνιση του ΜΔΣ. Σε ποσοστό 10-25% η νόσος μπορεί να εξελιχθεί σε δευτεροπαθή AA (Luzzatto & Nafa 2000, Μελέτης και συνεργάτες, 2009). Μερικές φορές, η ΠΝΑ εκδηλώνεται κατά την περίοδο έναρξης της αποκατάστασης της ερυθροποίησης ή αρκετό χρόνο από την εμφάνιση της πλήρους ή μερικής ύφεσης της AA μετά από θεραπεία με αντιλεμφοκυτταρικό ορό. Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, σε ένα ποσοστό 10-57% των ασθενών με AA ανιχνεύονται κύτταρα με φαινότυπο ΠΝΑ, με την κυτταρομετρία ροής, κυρίως μετά από τη χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής. Η ΠΝΑ που αναπτύσσεται σε ασθενείς με AA οι οποίοι έλαβαν αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη ή κυκλοσπορίνη συνήθως δεν ανήκει στην κλασική μορφή, ενώ όλοι οι ασθενείς εμφάνισαν μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A που δεν υπήρχαν όταν είχε τεθεί η διάγνωση της AA (Nagarajan et al 1995, Μελέτης και συνεργάτες, 2009). Για τη διερεύνηση της σχέσης των δύο νοσημάτων σημαντικό θεωρείται το γεγονός ότι ο μυελός της ΠΝΑ στις *in vitro* καλλιέργειες συμπεριφέρεται όπως αυτός της AA, ακόμη και όταν δεν είναι υποκυτταρικός (Dunn et al 1996, Μελέτης και συνεργάτες, 2009). Επίπλέον, και στα δύο αυτά νοσήματα τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα εμφανίζουν παρόμοια αντοχή στην απόπτωση. Μελέτη με διάφορες κυτταροκίνες έδειξε ότι, και στα δύο νοσήματα, όσο χαμηλότερα ήταν τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης και των λευκών αιμοσφαιρίων τόσο υψηλότερες ήταν οι τιμές της ερυθροποιητίνης και του G-CSF. Αντίθετα, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές για την ιντερλευκίνη-6 (IL-6), τον TNF- α , τον παράγοντα ανάπτυξης των αρχέγονων κυττάρων (SCF), τον παράγοντα ανάπτυξης των κοκκιοκυττάρων/μονοκυττάρων (GM-CSF) και την IFN- γ (Astori et al 1997, Nakakuma et al 1997, Μελέτης και συνεργάτες, 2009).

Όπως είναι ήδη γνωστό, τα GPI⁻ κύτταρα δεν εμφανίζουν κάποιο πλεονέκτημα ανάπτυξης στο περιβάλλον του φυσιολογικού μυελού και είναι πολύ πιθανόν να

τους το παρέχει ο υποκυτταρικός μυελός της απλαστικής αναιμίας, με αποτέλεσμα αυτά να πολλαπλασιάζονται και τελικά να επικρατούν. Η μυελική ανεπάρκεια που παρατηρείται στην απλαστική αναιμία, οφείλεται σε αυτοάνοση καταστολή των αρχέγονων κυττάρων από T-λεμφοκύτταρα. Προφανώς, το ανοσολογικό σύστημα έχει τη δυνατότητα να αναγνωρίζει χημικές δομές που χαρακτηρίζουν τα προγονικά GPI(+) από τα GPI(-) κύτταρα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μέσω μιας αυτοάνοσης διαδικασίας τα αυτοδραστικά T- λεμφοκύτταρα στοχεύουν τα GPI(+) και όχι τα GPI(-) τα οποία διαφεύγουν της επίθεσης («escape» hypothesis), και καθίστανται ανθεκτικά στην απόπτωση. Ο στόχος φαίνεται ότι είναι το ίδιο το γλυκολιπιδικό GPI μόριο και η παρουσίασή του στα CD8+ T- λεμφοκύτταρα γίνεται μέσω του πολυμορφικού μορίου που βρίσκεται πάνω στα HSCs, του CD1d. Ένας πληθυσμός αυτοδραστικών T λεμφοκυττάρων έχουν στον υποδοχέα τους μια χαρακτηριστική αμετάβλητη TCRα αλυσίδα (invariant) και αναγνωρίζουν το CD1d των HSCs, οπότε μπορεί να είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη μυελικής ανεπάρκειας στην PNH. Τα GPI (-) HSCs δεν συνθέτουν GPI και διαφεύγουν της επίθεσης των T αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων οπότε αναπτύσσεται ο PNH κλώνος

2.9.2 Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) και νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία

Τα ΜΔΣ είναι μία επίκτητη κλωνική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου και εμφανίζονται κυρίως σε ηλικιωμένα άτομα. Τα χαρακτηριστικά των ΜΔΣ είναι η μη αποδοτική αιμοποίηση, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρου βαθμού κυτταροπενιών στο περιφερικό αίμα, και οι μορφολογικές ανωμαλίες σε μία ή περισσότερες κυτταρικές σειρές. Στα ΜΔΣ έχουν περιγραφεί διάφορες κυτταρογενετικές διαταραχές. Μερικές από αυτές είναι η μονοσωμία 7, 7q-, η μονοσωμία 5, 5q-, η τρισωμία 8 κ.ά., καθώς και μοριακές βλάβες σε πρωτοογκογονίδια (N-ras), ογκοκατασταλτικά γονίδια (p53) και μεταγραφικούς παράγοντες (IRF-1, EVI-1) των αιμοποιητικών κυττάρων (Meletis & Terpos 2003, Μελέτης και συνεργάτες, 2009). Ένα ποσοστό της τάξης του 30% των ασθενών με ΜΔΣ οδηγούνται σε οξεία λευχαιμία. Όλες οι διαταραχές που αναφέρθηκαν καθώς και η εξέλιξη σε οξεία λευχαιμία, υποδηλώνουν ότι υπάρχει κάποια γενετική έλλειψη σταθερότητας στον παθολογικό κλώνο. Επιπλέον, η παρουσία κλώνου ΝΠΑ στους ασθενείς με ΜΔΣ, ενισχύει αυτή την άποψη. Η ΝΠΑ μπορεί να προηγείται ή να ακολουθεί την εμφάνιση του ΜΔΣ. Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με κυτταρομετρία ροής έχουν βρεθεί ερυθρά αιμοσφαίρια και πολυμορφοπύρρηνα με φαινότυπο ΝΠΑ (CD55⁺ και CD59⁺) σε ασθενείς με ΜΔΣ (Meletis et al 1997, Meletis & Terpos 2003). Σε αυτές τις περιπτώσεις, συνήθως δεν υπήρχε σχέση μεταξύ της παρουσίας του κλώνου της ΝΠΑ και της προηγούμενης αγωγής ή του χρόνου διάγνωσης του ΜΔΣ, όμως βρέθηκαν μία ή περισσότερες μεταλλάξεις στο γονίδιο

PIG-A. Σε αντίθεση με τα παραπάνω ευρήματα, οι ασθενείς συνήθως δεν εμφανίζουν *in vivo* ή *in vitro* αιμόλυση. Η ανάπτυξη του κλώνου της ΝΠΑ δεν ευνοείται στο μικροπεριβάλλον του μυελού των ΜΔΣ, γεγονός που εξηγεί τη διαφορά που παρατηρείται στην παρουσία αιμόλυσης μεταξύ ασθενών με ΜΔΣ και κλώνο ΝΠΑ και της κλασικής ΝΠΑ. Περαιτέρω έρευνα κρίνεται απαραίτητη για τη διερεύνηση της σχέσης των δύο αυτών νοσημάτων.

2.9.3 Οξεία λευχαιμία (ΟΜΛ) και νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία

Ασθενείς με ΠΝΑ εμφανίζουν ΟΜΛ σε ποσοστό που κυμαίνεται από 0–4%. Στους ασθενείς αυτούς σπανίως παρουσιάζεται αιμόλυση ή επανεμφάνιση του φαινοτύπου της ΠΝΑ μετά από την πλήρη ύφεση της νόσου. Οι βλάστες της ΟΜΛ συνήθως έχουν φαινότυπο CD55⁺, ενώ η μέτρηση της αλκαλικής φωσφατάσης των λευκών δίνει μειωμένη ή μηδενική τιμή. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, στις οποίες βρέθηκαν λευχαιμικά κύτταρα με έλλειψη των CD55 και CD59 σε ασθενείς με ΠΝΑ οι οποίοι εκτράπηκαν σε ΟΜΛ, δείχνουν ότι τα λευχαιμικά κύτταρα προέρχονται από τον κλώνο της ΠΝΑ (Devine et al 1987). Στους ασθενείς αυτούς, οι βλάστες εμφανίζουν πολλαπλές μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A, σε αντίθεση με τους βλάστες της *de novo* ΟΜΛ. Καρυστυπικές ανωμαλίες που να συσχετίζονται με την εκτροπή της ΠΝΑ σε ΟΜΛ δεν έχουν βρεθεί. Μεγάλο ενδιαφέρον αποτελεί η παρουσία βλαστικών κυττάρων με έλλειψη CD55 ή και CD59 τόσο σε ασθενείς με ΟΜΛ που δεν είχαν προηγούμενο ιστορικό ΝΠΑ ή κληρονομική έλλειψη των CD55 και CD59 όσο και σε πολλές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές λευχαιμικών κυττάρων (Hara et al 1992, Μελέτης και συνεργάτες, 2009). Είναι πιθανό η έλλειψη αυτών των GPI-πρωτεϊνών να οφείλεται είτε σε μειωμένη παραγωγή του αντίστοιχου mRNA, είτε σε διαταραχή της βιοσύνθεσης της GPI-άγκυρας λόγω βλάβης του γονιδίου PIG-A.

2.9.4 Λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα και νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία

Αποτελεί σπάνιο γεγονός η εξέλιξη της ΠΝΑ σε λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα. Ωστόσο, έλλειψη του CD55 έχει αναφερθεί σε ασθενείς με μη Hodgkin λέμφωμα που δεν είχαν ιστορικό προηγηθείσας ΠΝΑ, ενώ έχει εντοπιστεί μείωση ή απουσία των CD55 και CD59 στα ερυθρά αιμοσφαίρια ασθενών με λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα (Meletis & Terpos 2001, Μελέτης και συνεργάτες, 2009).

Υπάρχουν και ασθενείς που δεν ανήκουν σε κάποια από τις παραπάνω κατηγορίες. Αυτοί παρουσιάζουν ένα συνδυασμό αιμόλυσης και μυελικής ανεπάρκειας. Στους ασθενείς αυτούς, ως πρωταρχικό σύμπτωμα μπορεί να είναι η εμφάνιση αιμορραγικών εκδηλώσεων, λόγω της υπάρχουσας θρομβοπενίας, ή εν τω βάθει

θρόμβωσης, ενώ μπορεί να εμφανίζονται και μη αιματολογικές εκδηλώσεις, όπως πνευμονική εμβολή, κοιλιακά άλγη, οσφυαλγία, κεφαλαλγία, σπασμοί και παροδικές παραλύσεις περιφερικών νευρών (Dacie JV, Lewis SM, 1972, Μελέτης και συνεργάτες, 2009). Οι ασθενείς τότε διαγιγνώσκονται είτε με << ΠΝΑ -ΑΑ>> είτε με <<ΑΑ- ΠΝΑ >>, ανάλογα με την κλινική εκδήλωση που επικρατεί.

Τέλος, υπάρχουν και λίγοι ασθενείς, οι οποίοι εμφανίζουν <<ελάχιστη ΠΝΑ >>. Σε αυτούς δεν επικρατεί ούτε η μυελική ανεπάρκεια ούτε η αιμόλυση, αντίθετα υπάρχει ένας μικρός κλώνος ΠΝΑ, που είναι υπεύθυνος για την εμφάνιση κάποιου θρομβωτικού επεισοδίου

2.10 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ

2.10.1 Δοκιμασία του οξινοσθέντος ορού

Η δοκιμασία Ham (1939), η οποία πήρε το όνομά της από τον ερευνητή που την ανακάλυψε, στηρίζεται στην ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού διέγερσης του συμπληρώματος με τη μείωση του ΡΗ. Για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας λαμβάνεται αίμα του ασθενούς και αίμα μάρτυρα ομάδας ΑΒ, ή ομάδας ίδιας με αυτή του ασθενούς. Σε 6 δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται ίσες ποσότητες ορού του μάρτυρα. Οι δύο δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται στους 56° C για 30 λεπτά, ώστε να αδρανοποιηθεί το συμπλήρωμα. Στους σωλήνες με το αδρανοποιημένο συμπλήρωμα και σε ακόμα 2 σωλήνες από τους υπόλοιπους προστίθεται διάλυμα υδροχλωρίου (HCl). Στη συνέχεια σε όλους τους σωλήνες προστίθεται εναιώρημα ερυθροκυττάρων 50% σε NaCl 9gr/l από τον ασθενή και το μάρτυρα και μετά την ανάμιξή τους οι σωλήνες επωάζονται για 30 min στους 37 ° C (Πάγκαλης, 2008). Ανάλογα με τη βαρύτητα της αιμόλυσης καθορίζεται η αναλογία των παθολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στις παραπάνω συνθήκες δεν εμφανίζεται καθόλου λύση των ερυθρών του μάρτυρα. Η δοκιμασία δεν είναι ειδική για τη ΝΠΑ, παρά μόνον όταν είναι θετική στον οξινοσθέντα ορό του ασθενούς, αρνητική στον αδρανοποιημένο ορό μετά από θέρμανση και αρνητική αν ο οξινοσμένος ορός του ασθενούς δοκιμαστεί σε φυσιολογικά ερυθρά.

Με αυτό τον τρόπο μπορούμε να αποκλείσουμε τις διάφορες κληρονομικές ή επίκτητες σφαιροκυτταρώσεις ανοσολογικής αρχής, οι οποίες μπορεί να δώσουν θετική μια συνήθη δοκιμασία Ham.

2.10.2 Δοκιμασία αιμόλυσης σε σουκρόζη

Η δοκιμασία σακχαρόζης αποτελεί μια λιγότερο ειδική δοκιμασία για τη διάγνωση της ΠΝΑ. Τα ερυθρά του ασθενούς και μια μικρή ποσότητα ορού επωάζονται σε διάλυμα σουκρόζης χαμηλής ιοντικής ισχύος. Αυτή η διαδικασία διευκολύνει την καθήλωση του συμπληρώματος στη μεμβράνη των ερυθρών. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος που πραγματοποιείται οφείλεται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος ή στην ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος. Η δοκιμασία έχει μεγάλη σημασία μόνον όταν η αιμόλυση είναι πάνω από 5%. Θα πρέπει να είναι θετική επίσης στο φυσιολογικό ορό, ενώ θα πρέπει να είναι θετική σε αιμόλυση ανοσολογικής αρχής, όταν χρησιμοποιείται μόνον ο ορός του ασθενούς.

Η δοκιμασία σουκρόζης είναι μια απλή και ευαίσθητη δοκιμασία. Όταν είναι αρνητική, απομακρύνει από τη διάγνωση της ΠΝΑ. Εξαίρεση αποτελεί αν ο ασθενής έχει μεταγγιστεί πρόσφατα ή έχει χρησιμοποιηθεί ως αντιπηκτικό ηπαρίνη ή EDTA (Parker CJ, 2002, Μελέτης και συνεργάτες, 2009).

2.10.3 Μικροσωληνάρια γέλης *sephacryl*

Μια ταχεία και απλή ημιποσοτική μέθοδος, για να διαγνώσουμε την παρουσία πληθυσμών ερυθρών αιμοσφαιρίων τύπου ΠΝΑ στο περιφερικό αίμα, είναι η χρήση μικροσωληναρίων γέλης *sephacryl* και μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων CD55 ή και του CD59 (Meletis J et al, 1998).

Η ανίχνευση των ερυθροκυτταρικών πληθυσμών με έλλειψη των CD55 και CD59 γίνεται με τη χρήση του συστήματος μικροτυποποίησης σε γέλη *sephacryl* (DiaMed-ID Micro Typing System-PNH test). Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται φλεβικό αίμα σε EDTA-K. Η δοκιμασία πραγματοποιείται μέσα στις πρώτες 6 ώρες από τη λήψη του δείγματος. Αρχικά παρασκευάζεται εναιώρημα ερυθροκυττάρων 0,8% (v/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος 0,8% (Iddiluent 2, modified LISS) σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, στην άνω επιφάνεια τριών μικροσωληναρίων τοποθετούνται 50 μ L του εναιωρήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων που περιείχαν γέλη *sephacryl* με κονίκλειο ανοσοσφαιρίνη κατά ποντικού. Έπειτα, 50 μ L μονοκλωνικού αντι ανθρώπινου CD55 (clone BRIC 216), CD59 (clone MEM 43) και ID-PNH-αρνητικού μάρτυρα (ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης, dilution buffer, για anti-CD55 και anti-CD59) τοποθετούνται στα αντίστοιχα μικροσωληνάρια και το διάλυμα επωάζεται στους 37 °C για 15 min. Τέλος πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 126 g για 10 min σε ID-φυγόκεντρο 245 (CE conform, DiaMed-Hellas Ltd).

Τα ερυθροκύτταρα, που έχουν στην επιφάνειά τους CD55 ή CD59, παραμένουν στην κορυφή των αντίστοιχων μικροσωληναρίων συνδεδεμένοι με τα σωματίδια της γέλης (θετικοί πληθυσμοί). Τα ερυθροκύτταρα από τα οποία λείπουν τα αντιγόνα CD55 ή CD59 δεν παρουσιάζουν συγκόλληση και καθιζάνουν στον πυθμένα των μικροσωληναρίων (αρνητικοί πληθυσμοί).

Όταν ανιχνεύονται θετικοί και αρνητικοί πληθυσμοί, ένα μόνο τμήμα του αριθμού των ερυθροκυττάρων εμφανίζει την έλλειψη του μελετώμενου αντιγόνου. Σε αρχικά πειράματα, βρέθηκε ότι μπορούσαν να ανιχνευτούν πληθυσμοί ερυθρών με έλλειψη του CD55 ή και του CD59 σε ποσοστό 10% και άνω του συνολικού αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η αξιολόγηση της παρουσίας των υποπληθυσμών ερυθροκυττάρων πραγματοποιείται από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές και εκφράζεται ημιποσοτικά. Οι δοκιμασίες αυτές δεν είναι ευαίσθητες και είναι λιγότερο ακριβείς σε σχέση με την κυτταρομετρία ροής (Μελέτης και συνεργάτες, 2009).

2.10.4 Κυτταρομετρία ροής (KP)

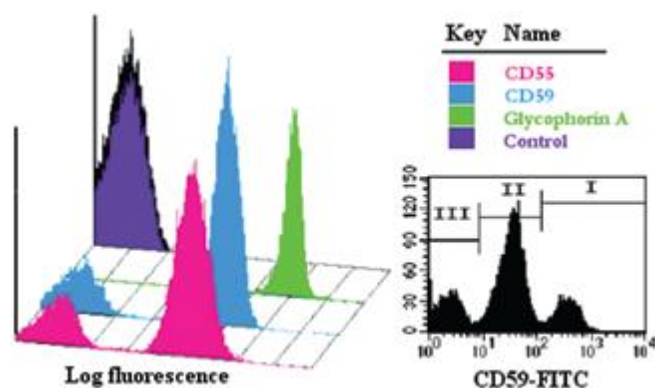
Η μέθοδος αναφοράς για την αναγνώριση της νόσου που χρησιμοποιείται στις μέρες μας είναι η κυτταρομετρία ροής (Schubert J et al, 1991, Richards SJ et al, 2000). Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μέθοδο αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης, με την οποία επιτυγχάνεται η μέτρηση βιοχημικών και βιοφυσικών παραμέτρων μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων κλπ) όταν αυτά αιωρούνται εντός υγρού που ρέει σε νηματοειδή ροή και διέρχονται από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μια ακτίνα laser. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί μονοκλωνικά αντισώματα, που έχουν σημειωθεί με κατάλληλες φθορίζουσες χρωστικές, έναντι των διαφόρων πρωτεϊνών της μεμβράνης που ανεπαρκούν στη ΠΝΑ. Η ΚΡ στηρίζεται στη σκέδαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και στην παραγόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία για τη συλλογή πολλαπλών πληροφοριών από σωματίδια ή κύτταρα με μέγεθος από 0,5-40 μm . Απαραίτητη προϋπόθεση είναι τα κύτταρα να διέρχονται ένα-ένα μέσα από την κυψελίδα ροής και κατά συνέπεια, από το σημείο που συναντώνται με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Η ακτινοβολία προέρχεται από μια πηγή laser και καθώς προσπίπτει στα κύτταρα σκεδάζεται στο χώρο. Η σκέδαση εξαρτάται από τα φυσικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Το σκεδαζόμενο φως μετράται από τον κυτταρομετρητή ροής σε ευθεία (γωνία $1-19^\circ$) και πλάγια (γωνία 90°) σκέδαση. Με αυτό τον τρόπο διαχωρίζονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί ανάλογα με το μέγεθος και την κοκκίωση των κυττάρων. Ο προσδιορισμός των αντιγόνων των κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω των σημάτων φθορισμού που παράγονται, από τα σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές αντισώματα. Καθώς τα κύτταρα συναντούν την πηγή φωτός οι φθορίζουσες χρωστικές διεγείρονται και εκπέμπουν σε διάφορα μήκη κύματος. Η διεγείρουσα ακτινοβολία και η εκπεμπόμενη είναι χαρακτηριστικές και καθορισμένες για κάθε φθορίζουσα ουσία. Μοναδική ιδιότητα της ΚΡ αποτελεί η μέτρηση του φθορισμού ανά κύτταρο. (Πάγκαλης, 2008)

Για τη συλλογή και τη φύλαξη των προς μελέτη δειγμάτων χρησιμοποιούνται αντιπηκτικά όπως η ηπαρίνη και το EDTA. Η χρώση του δείγματος με μονοκλωνικά αντισώματα εξαρτάται από την έκφραση των επιφανειακών αντιγόνων των

κυττάρων. Αντιγόνα με ασθενή έκφραση ανιχνεύονται με αντισώματα, τα οποία είναι συνδεδεμένα με έντονο φθοριόχρωμα, όπως R-phycocerythrin-PE. Αντίθετα, αντιγόνα με έντονη έκφραση αναλύονται με αντισώματα, τα οποία είναι συνδεδεμένα με πιο ασθενή φθοριοχρώματα, όπως FITC(fluorescein-isothiocyanate) ή PerCP. Ο αριθμός των κυττάρων που συλλέγονται για ανάλυση είναι 10000 ή ιδανικότερα 15000, ενώ όταν η ανάλυση αφορά κάποιο συγκεκριμένο υποπληθυσμό τουλάχιστον 1000.

Η ΚΡ δίνει τη δυνατότητα ποιοτικής και ποσοτικής εκτίμησης της έκφρασης των αντιγόνων σε κάθε κυτταρικό πληθυσμό. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων απαιτεί την πλήρη γνώση της έκφρασης των δεικτών στα διάφορα στάδια της φυσιολογικής εξέλιξης και διαφοροποίησης των κυττάρων.

Η ΚΡ, για τη διάγνωση της ΠΝΑ, πραγματοποιείται στο περιφερικό αίμα ή στο μυελό των οστών και είναι ικανή να ανιχνεύσει ακόμα και μικρούς πληθυσμούς κυττάρων του αίματος με ολική ή μερική έλλειψη του CD55 ή και CD59 κυρίως. Το έλλειμμα μπορεί να θεωρηθεί σημαντικό όταν τα αρνητικά κύτταρα αποτελούν ποσοστό μεγαλύτερο του 5%. Επιπλέον μας παρέχει πληροφορίες για το μέγεθος του κλώνου της ΠΝΑ. Το πραγματικό μέγεθος του κλώνου αντανακλάται πιθανόν πιο αξιόπιστα από το ποσοστό των πολυμορφοπύρηνων τύπου ΠΝΑ στο περιφερικό αίμα. Έτσι, η μέτρηση των πολυμορφοπύρηνων, τα οποία εμφανίζουν ανεπάρκεια των συνδεδεμένων με GPI πρωτεϊνών, είναι χρήσιμη για την παρακολούθηση των ασθενών με ΝΠΑ (Parker C et al, 2005).



Εικόνα 2.9: Κυτταρομετρία ερυθρών στη νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ). Το ιστόγραμμα στο κάτω μέρος παρουσιάζει τρεις πληθυσμούς με έλλειψη CD59. Ο πληθυσμός I είναι φυσιολογικός, ο πληθυσμός II εμφανίζει μερική έλλειψη, ενώ ο πληθυσμός III εμφανίζει πλήρη έλλειψη.
(Από http://www.hmb.org.uk/pnh_review.html).

Από το ποσοστό των κυττάρων τύπου ΠΝΑ εξαρτώνται τόσο η πρόγνωση όσο και η θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου. Η μέτρηση των ερυθρών πρέπει να γίνεται πριν από τη μετάγγιση και τουλάχιστον ένα μήνα μετά (Brodsky et al 2005), ώστε να παρέχονται σαφείς πληροφορίες για το ποσοστό των ερυθρών τύπου ΠΝΑ, διότι η

ποσοτική εκτίμηση του μεγέθους του κλώνου ΠΝΑ μπορεί να επηρεαστεί από την ανάγκη ικανών μεταγγίσεων και την αιμόλυση. Επειδή πολλοί ασθενείς παρουσιάζουν σημαντική μεταβολή του παθολογικού κλώνου, είναι προτιμότερο να γίνεται ανάλυση των δικτυοερυθροκυττάρων και των λευκών αιμοσφαιρίων για τον προσδιορισμό του κλώνου ΠΝΑ. Με την κυτταρομετρία ροής μπορεί να ανευρεθούν και CD34+ κύτταρα με έλλειψη CD55 ή και CD59. Η ανάλυση αυτή δεν είναι απαραίτητη για την οριστική διάγνωση της ΠΝΑ.

2.10.5 FLAER (Fluorescein—labeled proaerolysin variant) Κυτταρομετρία

Η αερολυσίνη (aerolysin) είναι μια τοξίνη που εκκρίνεται από το παθογόνο βακτήριο *Aeromonas hydrophila* και ανήκει σε μια μεγάλη ομάδα υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών (όπως π.χ. η τοξίνη α του *Staphylococcus aureus* και η περφορίνη των Τ λεμφοκυττάρων) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν κυτταρικό θάνατο, σχηματίζοντας διαύλους στη μεμβράνη των κυττάρων-στόχων (Parker et al, 1996). Η αερολυσίνη εκκρίνεται εξ ολοκλήρου ως μία ανενεργή προτοξίνη, την προ-αερολυσίνη (proaerolysin) η οποία μετατρέπεται σε ενεργό μορφή, ύστερα από την πρωτεόλυση ενός καρβοξυτελικού πεπτιδίου. Σε αντίθεση με τα μονοκλωνικά αντισώματα, που χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής και που έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται σε μια GPI-anchor πρωτεΐνη, η τοξίνη αερολυσίνη και η ανενεργή προτοξίνη, προ-αερολυσίνη, έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται εκλεκτικά και με υψηλή συγγένεια στην ίδια την GPI άγκυρα και συγκεκριμένα στον πυρήνα του μορίου της GPI (ethanolamine-HPO4-6Man-alpha-1-2Man-alpha-1-6Man-alpha-1-4GlcNH21-6-myo-inositol 1HPO4), που διατηρείται ανάμεσα στα διάφορα είδη και κύτταρα (Brodsky et al, 2000). Ωστόσο έχει βρεθεί ότι μόνο η ενεργός μορφή της τοξίνης μπορεί να ενσωματώνεται στη μεμβράνη και να σχηματίζει διαύλους, οδηγώντας έτσι στον κυτταρικό θάνατο. Είναι γνωστό ότι από τα κύτταρα της ΠΝΑ απουσιάζουν οι GPI-anchor πρωτεΐνες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα η αερολυσίνη και η προ-αερολυσίνη να μην μπορούν να προσδεθούν σε αυτά. Έτσι, τα κύτταρα είναι λιγότερο ευαίσθητα στην τοξίνη σε σχέση με τα φυσιολογικά.

Η FLAER κυτταρομετρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της απουσίας μιας μεγάλης ποικιλίας GPI-APs από την επιφάνεια των κυττάρων του αίματος. Κυρίως χρησιμοποιούνται εμπύρρινα κύτταρα, όπως μονοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια αποτελούν αναξιόπιστους δείκτες καθώς οι ΠΝΑ ασθενείς λαμβάνουν συχνά μεταγγίσεις ερυθρών και επιπλέον τα ερυθρά αιμοσφαίρια με έλλειψη των GPI-anchor πρωτεϊνών είναι ευαίσθητα στη λυτική δράση του συμπληρώματος. Για την FLAER κυτταρομετρία αναπτύχθηκε το Alexa Fluor-labeled T253C/A300C (FLAER), εισάγοντας δύο σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο της αερολυσίνης. Αυτό είναι ένα ανάλογο της προ-αερολυσίνης σημασμένο

με φθορίζουσα ουσία, που διατηρεί την ικανότητα να προσδένεται στα GPI(+) κύτταρα και να τα φθορίζει, χωρίς να τα καταστρέφει (*Brodsky et al 2000, Schubert et al, 2015*).

2.10.6 Έλεγχος μεταλλάξεων PIG-A

Η ανεπάρκεια των πρωτεϊνών GPI στους ασθενείς με ΠΝΑ οφείλεται σε μια επίκτητη σωματική μετάλλαξη στο γονίδιο PIG-A. Αν και δεν απαιτείται μοριακός έλεγχος για τη διάγνωση της ΠΝΑ, αυτός μπορεί να πραγματοποιηθεί για την αναζήτηση μίας ή περισσότερων μεταλλάξεων. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται για ερευνητικούς σκοπούς, αλλά είναι πιθανό στο μέλλον να καταστεί ακόμη και μέθοδος ρουτίνας για τη διάγνωση της ΠΝΑ (Μελέτης Γ και συνεργάτες, 2009).

2.11 ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η βαρύτητα της αναιμίας, η συχνότητα των επεισοδίων οξείας αιμόλυσης, η βαρύτητα της μυελικής ανεπάρκειας και η εμφάνιση ή όχι θρομβωτικών επεισοδίων καθοδηγούν την εξέλιξη της νόσου.

Σε μερικές περιπτώσεις η νόσος παρουσιάζει μοιραία έκβαση σε μερικούς μήνες ή σε μερικά χρόνια από τη διάγνωση, ενώ σε άλλες περιπτώσεις οι ασθενείς επιβιώνουν μακροχρόνια (>20 έτη) (Dacie & Lewis, 1972). Η μέση επιβίωση κυμαίνεται από 10–15 έτη.

Τις συχνότερες αιτίες θανάτου αποτελούν :

- οι θρομβώσεις (30–45%) και
- οι αιμορραγίες (25–40%).

Υπολογίζεται ότι περίπου το 5% οδηγείται στο θάνατο κάθε χρόνο. Οι προγνωστικοί παράγοντες που θεωρούνται δυσμενείς είναι η αναιμία με αιμοσφαιρίνη <9 g/dL, ο αριθμός αιμοπεταλίων $<150 \times 10^9/L$, ο αριθμός πολυμορφοπυρήνων $<1,5 \times 10^9/L$ και η ηλικία άνω των 40 ετών. Ασθενείς που εμφάνισαν ή θα εμφανίσουν επεισόδια θρομβώσεων συχνά παρουσιάζουν θρομβοπενία μέτριας βαρύτητας. Περίπου το 15% των ασθενών παρουσιάζουν ήπιες μορφές της νόσου και δεν εμφανίζουν επιπλοκές, ενώ συνήθως δεν έχουν την ανάγκη των μεταγγίσεων. Μερικοί ασθενείς παρουσιάζουν μακροχρόνια ύφεση της νόσου με ταυτόχρονη μείωση της αναλογίας των παθολογικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα, ενώ κάποιοι άλλοι διατηρούν για μερικά χρόνια τις χαρακτηριστικές βιολογικές διαταραχές της. Υπάρχουν επίσης ασθενείς που εμφανίζουν υποτροπή μετά από ύφεση. Οι περιπτώσεις της νόσου που παρουσιάζουν πλήρη ύφεση οφείλονται στο γεγονός ότι ο παθολογικός κλώνος χάνει το πλεονέκτημα ανάπτυξης, όπως συμβαίνει στο φυσιολογικό μυελικό μικροπεριβάλλον (Dacie & Lewis 1972).

Σε άλλες περιπτώσεις, η κλασική ΝΠΑ εξελίσσεται σε παγκυτταροπενία με πλούσιο ή απλαστικό μυελό των οστών. Περίπου το 10–25% των περιπτώσεων ΠΝΑ οδηγείται σε δευτεροπαθή απλαστική αναιμία. Ένα πολύ μικρό ποσοστό (0–4% στις διάφορες σειρές) καταλήγει σε οξεία λευχαιμία (συνήθως οξεία μη λεμφοβλαστική λευχαιμία, ΟΜΛ). Επιπλέον, έχει περιγραφεί και η ανάπτυξη δευτεροπαθούς μυελοϊνωσης ή λεμφικής λευχαιμίας.

Σοβαρές επιπλοκές αλλά και αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα (20–25%) μπορεί να εμφανιστεί σε γυναίκες με ΝΠΑ. Σε πολλές περιπτώσεις γίνεται διάγνωση της νόσου κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η εγκυμοσύνη κατά την πορεία της νόσου αποτελεί αιτία επίτασης της αιμόλυσης και της μυελικής ανεπάρκειας, καθώς και αιτία των θρομβωτικών επιπλοκών, των λοιμώξεων, των αιμορραγιών, του ενδομήτριου θανάτου του εμβρύου και των αυτόματων αποβολών. Σε άλλες περιπτώσεις, η εγκυμοσύνη ενδέχεται να προχωρήσει χωρίς σοβαρές επιπλοκές.

2.12 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Μέχρι πρόσφατα η θεραπεία της ΠΝΑ ήταν εμπειρική και συμπτωματική και περιλάμβανε τη χορήγηση μεταγγίσεων αίματος, συμπληρωματική αγωγή με φυλλικό οξύ και σίδηρο, αντιπηκτική αγωγή επί θρομβώσεων και επί ενδείξεων ανοσοκατασταλτικής αγωγής. Η μόνη θεραπεία που μπορεί να οδηγήσει στην ίαση της νόσου είναι η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών, αλλά η σύστασή της ακολουθεί απόλυτες θεραπευτικές ενδείξεις λόγω των σοβαρών επιπλοκών της. Στις μέρες μας η ανακάλυψη της εκουλιζουμάμπης (eculizumab), ενός νέου πρωτοποριακού φαρμάκου με δυνατότητα παρέμβασης στον τρόπο δράσης του συμπληρώματος, άλλαξε την προσέγγιση της νόσου και οδήγησε στη δυνατότητα ελέγχου του νοσήματος και στη βελτίωση των συμπτωμάτων και των εργαστηριακών ευρημάτων των ασθενών, καθώς και στην αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσής τους (συγκρίσιμο με αυτό του φυσιολογικού πληθυσμού) (Luzzato et al, 2011).

2.12.1 Μεταμόσχευση μυελού των οστών

Η μόνη θεραπευτική επιλογή που παρέχει τις προϋποθέσεις για την ίαση της νόσου είναι η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών. Δεν αποτελεί όμως τη θεραπεία εκλογής για την κλασική ΠΝΑ. Η μεταμόσχευση μυελού των οστών (ΜΟ) πρέπει να γίνεται σε εξειδικευμένα κέντρα ενώ η επιλογή των ασθενών είναι εξαιρετικά αυστηρή σύμφωνα με τα κριτήρια και τις ενδείξεις της International PNH Interest Group: IPIG. Η μεταμόσχευση μυελού εξαρτάται από παράγοντες όπως η κλινική ετερογένεια της νόσου, η φυσική της ιστορία και ο συνδυασμός της με σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας. Σήμερα, θεραπεία εκλογής για ασθενείς νεαρής ηλικίας που εμφανίζουν βαριές πανκυτταροπενίες, απειλητικές για τη ζωή

θρομβώσεις, ανθεκτική αιμολυτική αναιμία που απαιτεί συχνές μεταγγίσεις και κακοήγη μετατροπή της νόσου αποτελεί η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού από απόλυτα HLA συμβατό αδελφό ή αδελφή δότη. Ακόμα δεν είναι σαφές ποια είναι η κατάλληλη χρονική στιγμή για τη μεταμόσχευση, αν θα πρέπει να χρησιμοποιείται συμβατικό ή ελαττωμένης έντασης σχήμα προετοιμασίας, αφού το τελευταίο συνοδεύεται από μικρότερη περιμεταμοσχευτική θνησιμότητα αλλά και από εντονότερη GvHD, και ποια είναι η θέση της αλλογενούς μεταμόσχευσης από HLA συμβατό μη μέλος της οικογένειας ή της μεταμόσχευσης από μη απόλυτα HLA-συμβατό δότη.

2.12.2 Μεταγγίσεις

Οι απαιτήσεις για μετάγγιση αίματος ποικίλουν από ασθενή σε ασθενή ανάλογα με τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης τους και ποικίλουν ακόμη και στο ίδιο τον ασθενή κατά την πορεία της νόσου.

Η αντιμετώπιση της αναιμίας στην ΠΝΑ είναι συμπτωματική. Η αναιμία συνήθως δεν είναι ανεκτή όταν η αιμοσφαιρίνη πέσει κάτω από 9 g/dL. Η μετάγγιση αίματος γίνεται με λευκαφαιρεμένα συμπυκνωμένα ερυθρά (δεν απαιτούνται πλέον πλυμένα ερυθρά) (Tolulase Olutogun et al, 2015), ενώ η ακτινοβόληση προϊόντων αίματος και παραγώγων συστήνεται όταν ο ασθενής πάσχει από σοβαρή απλαστική αναιμία ή όταν λαμβάνει ανοσοκατασταλτική θεραπεία

Σε περίπτωση αυξημένου ρυθμού ερυθροποίησης χορηγείται φυλλικό οξύ 5 mg/d p.o. και βιταμίνη B12 επί ένδειας της

2.12.3 Σίδηρος

Λόγω της συνεχούς απώλειας σιδήρου, οι ασθενείς γίνονται σιδηροπενικοί με αποτέλεσμα συχνά να απαιτείται χορήγηση σιδήρου. Η έλλειψη σιδήρου αλλά και η χορήγησή του συνοδεύονται από έξαρση της αιμόλυσης. Η χορήγηση σιδήρου από το στόμα συχνά δεν επαρκεί, εφόσον υπάρχει συνεχής απώλειά του από τα ούρα. Η θεραπεία με σίδηρο είναι συνήθως απαραίτητη, αφού η σιδηροπενική αναιμία είναι συχνή ακόμη και στους ασθενείς που λαμβάνουν μεταγγίσεις. Η χορήγηση σιδήρου παρεντερικά αλλά και από το στόμα γίνεται καλά ανεκτή αν και έχει αναφερθεί επίταση της αιμόλυσης ιδιαίτερα με την παρεντερική χορήγηση (Parker C et al, 2005, Hartmann RC et al, 1966). Σε αυτή την περίπτωση, η αιμόλυση οφείλεται στην αύξηση των παθολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων με έλλειψη των GPI-πρωτεϊνών.

Όταν παρατηρείται σπανίως υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο λόγω αυξημένων αναγκών μεταγγίσεων, ιδίως επί μυελικής ανεπάρκειας, συστήνεται η έναρξη αποσιδήρωσης.

2.12.4 Κορτικοειδή

Η χορήγηση κορτικοειδών είναι εμπειρική και χωρίς να συνοδεύεται από τυχαιοποιημένες μελέτες. Έχει θέση στην αντιμετώπιση της οξείας αιμολυτικής κρίσης και της χρόνιας αιμόλυσης, πιθανότατα μέσω αναστολής της δράσης του συμπληρώματος (Parker C et al, 2005). Δεν συστήνεται η συνεχής και χρόνια χορήγησή τους λόγω παρενεργειών και τοξικότητας. Τα κορτικοειδή έχουν χρησιμοποιηθεί για μικρό χρονικό διάστημα στη θεραπεία της οξείας αιμολυτικής κρίσης.

2.12.5 Ερυθροποιητίνη

Ασθενείς που λαμβάνουν ερυθροποιητίνη πρέπει να παρακολουθούνται στενά, διότι η διέγερση της ερυθροποίησης μπορεί να συνοδεύεται από έξαρση της αιμόλυσης λόγω διέγερσης του κλωνικού πληθυσμού ερυθροβλαστών. Αν και η χορήγηση ερυθροποιητίνης έχει εφαρμοστεί σε λίγους ασθενείς με ΠΝΑ και μυελική ανεπάρκεια, έχει βρεθεί ασφαλής (Parker C et al, 2005). Επομένως πιθανόν η ερυθροποιητίνη να είναι ικανή να αυξήσει την τιμή της αιμοσφαιρίνης, ανεξαρτήτως των επιπέδων της στον ορό των ασθενών. Η χορήγησή της είναι ευνοϊκή, παρότι τα επίπεδα της ερυθροποιητίνης στον ορό των ασθενών με ΠΝΑ είναι συνήθως αυξημένα. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν υψηλές δόσεις ερυθροποιητίνης και δαρβεποητίνης ακόμη και σε ασθενείς υπό eculizumab που παραμένουν αναιμικοί και έχουν χαμηλά επίπεδα ερυθροποιητίνης.

2.12.6 Σπληνεκτομή

Η σπληνεκτομή μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές λοιμώξεις και θρομβώσεις, γι' αυτό και θα πρέπει να πραγματοποιείται μόνο σε περιπτώσεις με πολύ μεγάλη και συμπτωματική διόγκωση του οργάνου (Parker C et al, 2005).

2.12.7 Ανοσοκατασταλτική αγωγή

Η χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής με αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη, κυκλοσπορίνη ή συνδυασμό τους, έχει επιχειρηθεί σε ασθενείς με παροξυντική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία και μυελική απλασία, οι οποίοι δεν έχουν συμβατό συγγενή δότη ή των οποίων η κατάσταση δεν επιτρέπει τη μεταμόσχευση μυελού. Τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά.

2.12.8 Ανδρογόνα

Τα ανδρογόνα χρησιμοποιούνται μόνο ή σε συνδυασμό με κορτικοειδή. Η μακροχρόνια χορήγηση ανδρογόνων (οξυμεθολόνη, μετενολόνη ή νταναζόλη σε υψηλές δόσεις) μόνων ή σε συνδυασμό με κορτικοειδή μπορεί να είναι αποτελεσματική και στην ΠΝΑ, με βελτίωση όλων ή μερικών μυελικών σειρών. Ο μηχανισμός δράσης τους είναι άγνωστος. Ανεπιθύμητες ενέργειες αποτελούν η ηπατική δυσλειτουργία, η υπερτρίχωση και στους άνδρες η υπερτροφία προστάτη.

2.12.9 Αναστολείς συμπληρώματος (Κοκόρη Στέλλα, 2016)

Η ανακάλυψη της εκουλιζουμάμπης (eculizumab) άλλαξε την προσέγγιση της νόσου. Το 2007 το FDA ενέκρινε τη χορήγησή της στην ΠΝΑ με βάση την αποτελεσματικότητά της σε δύο μεγάλες κλινικές μελέτες (TRIUMPH Study and SHEPHERD Study). Το 2010 το φάρμακο έλαβε έγκριση και στην Ιαπωνία. Η εκουλιζουμάμπη αποτελεί ένα ανασυνδυασμένο ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύεται εκλεκτικά στην πρωτεΐνη C5 του συμπληρώματος και αναστέλλει τη διάσπασή του σε C5a και C5b και τη δημιουργία του MAC. Με αυτό τον τρόπο αντισταθμίζει την έλλειψη του CD59, οδηγώντας σε αναστολή της ενδοαγγειακής αιμολυτικής διαδικασίας. Η ποιότητα ζωής των ασθενών και το αίσθημα κόπωσης βελτιώνονται, ενώ οι ασθενείς υπό eculizumab παρουσιάζουν σύμφωνα με μελέτες μείωση κατά 92% των θρομβωτικών επεισοδίων (Wong EK et al, 2015). Υπάρχει όμως και ένα ποσοστό των ασθενών υπό eculizumab που συνεχίζουν να εμφανίζουν ήπια έως μέτρια εξωαγγειακή αιμόλυση εξαιτίας της συνεχούς διάσπασης του C3 κλάσματος του συμπληρώματος καθώς και της εναπόθεσης του C3 στα ΠΝΑ ερυθρά που οδηγεί στην πρόωρη απομάκρυνσή τους από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα στο σπλήνα και το ήπαρ. Επιπλέον η γενετική ποικιλομορφία μπορεί να διαμορφώνει τη δέσμευση του C3. Οι ΠΝΑ ασθενείς που φέρουν τον πολυμορφισμό στο γονίδιο του υποδοχέα 1 του συμπληρώματος (CR1/CD35) πιθανότατα να μην έχουν τη βέλτιστη ανταπόκριση στην εκουλιζουμάμπη. Ο CR1 (στα λευκά και τα ερυθρά) δεσμεύει επιλεκτικά τα C3b, iC3b και C4b και ενισχύει τη διάσπαση των C3 και C5 κομβερτασών. Η πυκνότητα του CR1 στην επιφάνεια των ερυθρών ρυθμίζει τη δέσμευση των C3 θραυσμάτων στα GPI(-) ερυθρά όταν το C5 αναστέλλεται. Ο πολυμορφισμός που οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα CR1 (L/L phenotype) είναι πιο πιθανό να οδηγεί σε πτωχή ανταπόκριση στην εκουλιζουμάμπη. Τέλος, πρόσφατα ανακαλύφθηκε στο 3,5% του πληθυσμού των Ιαπώνων ο πολυμορφισμός c.2654GA, → Arg885His του C5(single missence C5 heterozygous mutation), ο οποίος αποτρέπει τη σύνδεση και τον αποκλεισμό του C5 από την εκουλιζουμάμπη και διατηρεί την λειτουργική ικανότητα του C5 να προκαλεί αιμόλυση (Weitz, 2015, NotaroR et al, 2015).

Ο μεγαλύτερος κίνδυνος από την αναστολή της τελικής οδού του συμπληρώματος είναι οι λοιμώξεις από Gram (-) διπλόκοκκους. Γι αυτό είναι σημαντικό οι ασθενείς που θα λάβουν θεραπεία με eculizumab δύο εβδομάδες πριν από την έναρξη της θεραπείας να εμβολιάζονται έναντι της *Neisseria meningitides*, διότι η αναστολή του συμπληρώματος στο επίπεδο του C5 αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης λοιμώξεων από μικροοργανισμούς όπως η *Neisseria meningitides* και η *Neisseria gonorrhoeae*. Ο εμβολιασμός έναντι της *Neisseria meningitides* και *Neisseria gonorrhoeae* πρέπει να επαναλαμβάνεται κάθε 3–5 χρόνια εφόσον ο ασθενής συνεχίζει να λαμβάνει το eculizumab (Brodsky RA et al, 2009). Επίσης χορηγούνται εμβόλια έναντι του

αιμόφιλου ινφλουέντζας B και πνευμονιόκοκκου. Τέλος, συζητείται η συνεχής προφυλακτική χορήγηση πενικιλίνης σε νεώτερους κυρίως ασθενείς (Penicillin V or erythromycin 500mg x2/day). Σε υποψία αιμόλυσης οι ασθενείς λαμβάνουν συπροφλοξασίνη 750mg x2 ημερησίως, μέχρι να μεταβούν στο νοσοκομείο για παρακολούθηση. Σε αιμολυτικό επεισόδιο συνιστάται μείωση του ενδιάμεσου χρόνου χορήγησης ή αύξηση της χορηγούμενης δόσης του φαρμάκου.

Η παρακολούθηση των ασθενών που παίρνουν eculizumab περιλαμβάνει έλεγχο με γενική αίματος, καταμέτρηση ΔΕΚ, προσδιορισμό LDH και πλήρη βιοχημικό έλεγχο εβδομαδιαίως τις πρώτες 4 εβδομάδες και στη συνέχεια μία φορά το μήνα. Η LDH επανέρχεται πολύ γρήγορα στα φυσιολογικά επίπεδα, ενώ τα ΔΕΚ παραμένουν σχεδόν πάντα αυξημένα, καθώς οι ασθενείς συνεχίζουν να έχουν κάποιο μικρό βαθμό εξωαγγειακής αιμόλυσης λόγω απομάκρυνσης ερυθροκυττάρων με περίσσεια C3 από το σπλήνα. Ο έλεγχος με κυτταρομετρία ροής γίνεται ανά έτος, ενώ σε ασθενείς με εμμένουσα αιμόλυση γίνεται με άμεση Coombs (Brodsky RA, 2014).

2.12.10 Αναστολείς του C5 και C3 κλάσματος του συμπληρώματος καθώς και της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος (Κοκόρη Στέλλα, 2016)

Οι αναστολείς του C3, C5 και της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος αποτελούν τις νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις της νόσου ΝΠΑ. Μέχρι τώρα, έχουν αναπτυχθεί τέσσερα νέα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του C5 κλάσματος του συμπληρώματος, σε προκλινικές μελέτες (ALXN1210, ALXN550, LFG316, minibody Mubidona). Σε εξέλιξη βρίσκεται η προκλινική μελέτη (ALN-CC5). Σε αυτήν χρησιμοποιήθηκε ένα παράγωγο της γαλακτόζης (GalNac, N-ακετυλογλυκοζαμίνη), το οποίο ήταν συνδεδεμένο με ένα παρεμβαλλόμενο RNA (small RNA interference), που καταστέλλει τη γονιδιακή έκφραση του mRNA του C5, και έτσι δεν παράγεται αυτό από το ήπαρ, με αποτέλεσμα την αναστολή του συμπληρώματος. Ένα άλλο μόριο που στοχεύει το C5 κλάσμα του συμπληρώματος είναι το Coversin. Αυτό προέρχεται από το τσιμπούρι *Ornithodoros moubata* και αποτελεί μια μικρή πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 16 kDa. Δεσμεύεται στο κλάσμα C5 και αποτρέπει τη διάσπασή του από τη C5 κονβερτάση. Επιπλέον υπάρχουν μελέτες με μικρές πρωτεΐνες που μιμούνται αντισώματα και δεσμεύουν το κλάσμα C5 (Risitano AM, Marotta S, 2016).

Το κλάσμα C3 του συμπληρώματος είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 183 kDa, η οποία εμπλέκεται σε διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και υφίσταται δομικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Η μεγάλη του επιφάνεια προσφέρει δυνητικές θέσεις δέσμευσης σε μόρια, τα οποία δρουν ως αναστολείς της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς. Πρόσφατη

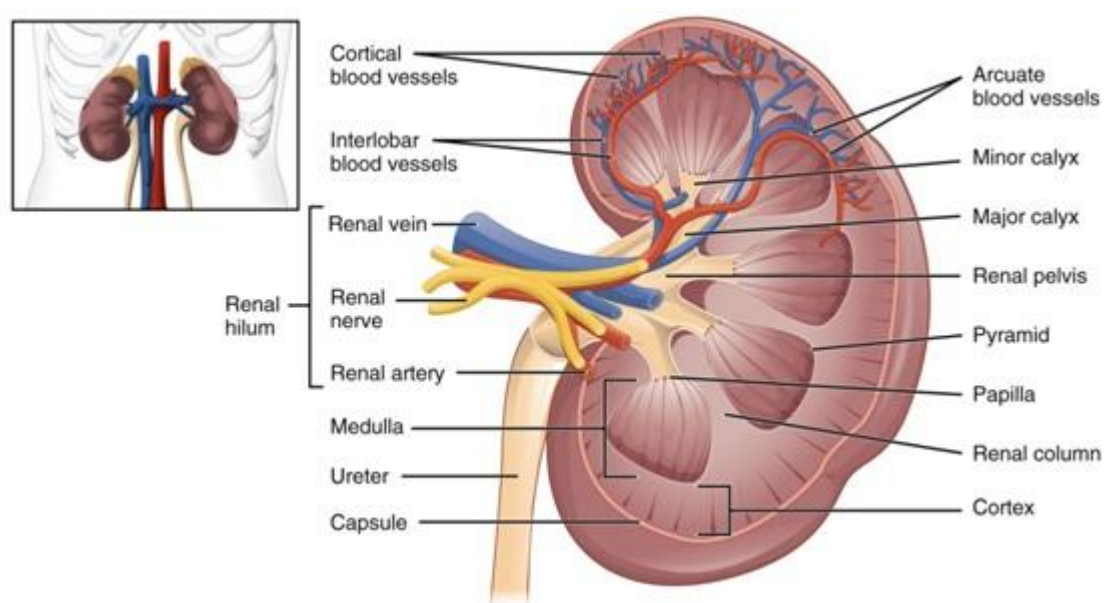
μελέτη αναφέρει τη χρήση ενός μονοκλωνικού αντισώματος (anti-C3b/iC3b mAb) έναντι των ενεργοποιημένων θραυσμάτων του C3 (iC3b/C3b) στα ερυθροκύτταρα (Lindorfer MA et al, 2010). Άλλες μελέτες αναφέρουν τη χρήση ενός πεπτιδίου (compstatin) για την αναστολή της ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Το πεπτίδιο αυτό αναστέλλει τη διάσπαση και την ενεργοποίηση του C3 κλάσματος και του ενεργού θραύσματος C3b, προλαμβάνοντας τη διαδικασία της οψωνοποίησης και το σχηματισμό του C5b-9 στα ΝΠΑ ερυθρά (Risitano AM et al, 2012). Ανάλογο του compstatin αποτελεί το PEG-Cp40 (polyethylene glycol (PEG) derivatives of Cp40), το οποίο δρα ανασταλτικά στην αιμόλυση.

Στους αναστολείς της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος συμπεριλαμβάνεται μια νέα ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (TT30) με μοριακό βάρος 65 kDa, η οποία ελέγχει την ενδοαγγειακή και την εξωαγγειακή αιμόλυση στα ΝΠΑ ερυθρά. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί προϊόν σύζευξης του υποδοχέα CR2 του συμπληρώματος (θέση δέσμευσης του θραύσματος iC3b/C3d) και ενός τμήματος του ανασταλτικού τομέα του ρυθμιστικού παράγοντα H (FH) της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος. Το σύμπλεγμα αυτό απενεργοποιεί τη C3 κομβερτάση και δρα ως συμπαράγοντας του παράγοντα I, προάγοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη μετατροπή του ενεργού C3b σε iC3b (inactive C3b) και στη συνέχεια σε C3dg/C3d. Επομένως προστατεύει από την αρχική ενεργοποίηση του C3 και από την εναπόθεσή του στα ΝΠΑ ερυθρά. Λόγω όμως του μικρού χρόνου ημιζωής του φαρμάκου αυτού παρεμποδίζεται η κλινική αξιολόγησή του (Risitano AM et al, 2012). Παραλλαγή του FH αποτελούν τα Mini-FH, που ως στόχο έχουν να παρεμποδίσουν την εναπόθεση C3 θραυσμάτων στα ΝΠΑ ερυθρά και να αναστείλλουν την αιμόλυσή τους (Schmidt CQ et al, 2016). Τέλος στους αναστολείς της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος συγκαταλλέγονται και οι αναστολείς του παράγοντα D. Αυτοί αναστέλλουν την αιμόλυση των ΝΠΑ κυττάρων in vitro, περιορίζουν τη συσσώρευση των C3 θραυσμάτων και αποτελούν τους πρώτους από του στόματος αναστολείς (Gavriilaki E et al, 2015).

3. ΝΕΦΡΟΣ

3.1 Ανατομία του νεφρού

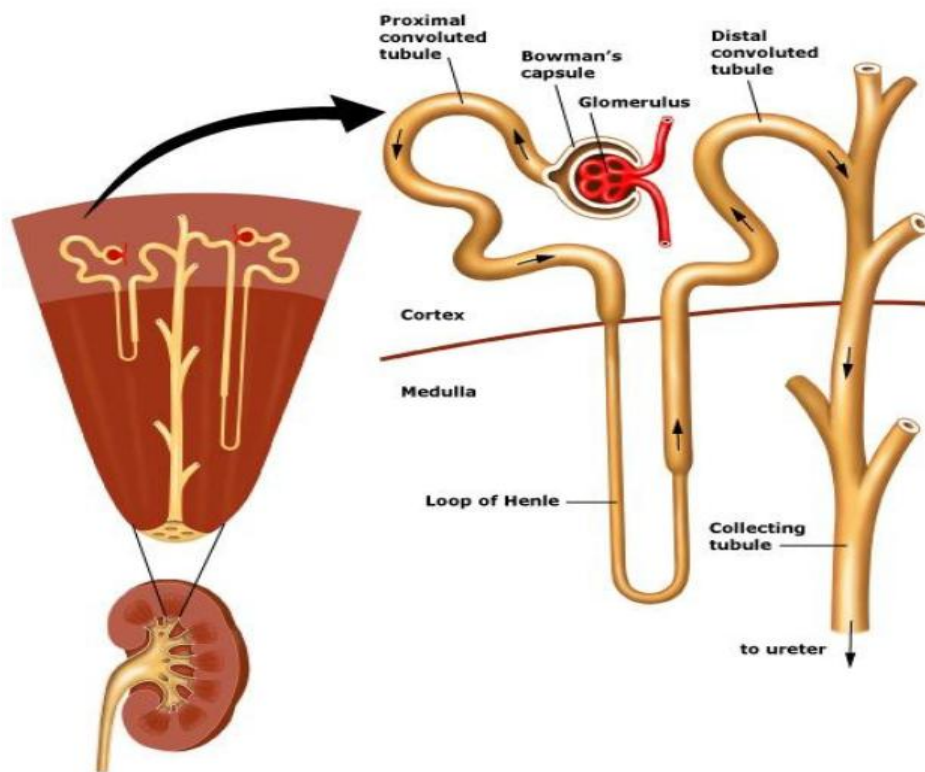
Οι νεφροί βρίσκονται στο πίσω μέρος του κοιλιακού τοιχώματος, εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης. Σε κάθε νεφρό διακρίνονται δύο στρώματα ιστού, ο φλοιός (*cortex*) εξωτερικά και ο μυελός (*medulla*) εσωτερικά, ο οποίος αποτελείται από 8-12 πυραμιδοειδείς σχηματισμούς, τις νεφρικές πυραμίδες (*renal pyramids*). Η βάση των νεφρικών πυραμίδων είναι στραμμένη προς το φλοιό και η κορυφή τους προς τη νεφρική κοιλία. Οι κορυφές των νεφρικών πυραμίδων καταλήγουν στους νεφρικούς κάλυκες (*calyx*), οι οποίοι αποτελούν τον τόπο συλλογής των ούρων. Οι κάλυκες εκβάλλουν στη νεφρική πύελο (*renal pelvis*) από όπου τα ούρα μεταφέρονται μέσω του ουρητήρα (*ureter*) στην ουροδόχο κύστη.



Εικόνα 3.1: Δομή του νεφρού (Πηγή: <http://www.ourodiagnosi.gr/nefros>)

Κάθε νεφρός αποτελείται από όμοιες μονάδες, τους νεφρώνες (*nephron*), που αποτελούν τη μικρότερη ανατομική και λειτουργική μονάδα του νεφρού. Ο ανθρώπινος νεφρός αποτελείται από 1 εκατομμύριο νεφρώνες. Κάθε νεφρώνας αποτελείται από το νεφρικό σωματίο και το ουροφόρο σωληνάριο, το οποίο αποτελεί προέκταση του νεφρικού σωματίου. Το νεφρικό σωματίο αποτελεί διηθητικό 'οργανίδιο' και περιέχει ένα θύσανο αλληλοσυνδεδεμένων τριχοειδών αγγείων, που ονομάζεται νεφρικό σπείραμα. Το νεφρικό σπείραμα θηλुकώνει σε μια κάψουλα γεμάτη υγρό, την κάψα του Bowman. Το σπείραμα και η κάψα του Bowman συνιστούν το νεφρικό σωματίο. Το ουροφόρο σωληνάριο είναι ένας στενός κύλινδρος που επενδύεται από μία στιβάδα επιθηλιακών κυττάρων, τα οποία στηρίζονται πάνω σε μία βασική μεμβράνη. Τα επιθηλιακά αυτά κύτταρα παρουσιάζουν διαφορές στη δομή και στην λειτουργία ανάλογα με τη θέση τους πάνω στο νεφρικό σωληνάριο. Το νεφρικό σωληνάριο διακρίνεται σε τέσσερα τμήματα, ανάλογα με τη λειτουργία που επιτελεί το καθένα. Τα τμήματα αυτά είναι τα εξής: το εγγύς σωληνάριο (*proximal tubule*) στο οποίο εισρέει το διήθημα από

την κάψα του Bowman, η αγκύλη του Henle (μια φουρκέτα που αποτελείται από το κατιόν και το ανιόν σκέλος), το άπω εσπειραμένο σωληνάριο (*distal tubule*) και το αθροιστικό σωληνάριο (*collecting tubule*). (Vander, Sherman, Luciano, Τσακόπουλος, 2001)



Εικόνα 3.2: Σχηματική απεικόνιση του νεφρώνα. Από το νεφρικό σωματίο (glomerulus) ξεκινάει το ουροφόρο σωληνάριο, το οποίο αποτελείται από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (proximal convoluted tubule), την αγκύλη του Henle (loop of Henle), το άπω εσπειραμένο σωληνάριο (distal convoluted tubule) και το αθροιστικό σωληνάριο (collecting tubule).

Στο νεφρικό σωματίο διακρίνονται τέσσερις βασικές κατηγορίες κυττάρων: τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα (ποδοκύτταρα), τα μεσαγγειακά κύτταρα και τα τοιχωματικά κύτταρα (parietal cells).

3.1.1 Ενδοθηλιακά κύτταρα

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλύπτουν την εσωτερική επιφάνεια των αγγείων και συνιστούν το ενδοθήλιο. Το ενδοθήλιο ρυθμίζει την αγγειακή διαπερατότητα και

διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διεργασίες, όπως η ρύθμιση του αγγειακού τόνου, της αιμόστασης, της προσκόλλησης και της διαπίδυσης των λευκοκυττάρων καθώς και η επαγωγή και τροποποίηση των ανοσολογικών και φλεγμονωδών διαδικασιών. Στο σπείραμα το ενδοθήλιο διαθέτει πολυάριθμους πόρους (*fenestrations*) με διάμετρο 60-100 nm. Αυτοί επιτρέπουν την ελεύθερη διήθηση υγρού, διαλυμένων ουσιών στο πλάσμα και πρωτεϊνών, ενώ επιπλέον εξυπηρετούν τη διήθηση του πλάσματος στο σπείραμα για την παραγωγή ούρων (S Savage, 1994).

3.1.2 Ποδοκύτταρα

Τα ποδοκύτταρα είναι τα επιθηλιακά κύτταρα της κάψας του Bowman, που έρχονται σε επαφή με το νεφρικό σπείραμα. Διαφέρουν ανατομικά και λειτουργικά από τα υπόλοιπα απλά επιθηλιακά κύτταρα, διαθέτουν ογκώδες κυτταρικό σώμα και βρίσκονται αποκλειστικά στο νεφρό. Η ονομασία τους οφείλεται στο ιδιαίτερο σχήμα τους καθώς φέρουν στην βασική πλευρά του κυτταρικού σώματος, πολλές προεκβολές που μοιάζουν με “πόδια” (Mundel P, Kriz W, 1995).

3.1.3 Μεσαγγειακά κύτταρα

Τα μεσαγγειακά κύτταρα είναι εξειδικευμένα λεία μυϊκά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται αποκλειστικά γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία στο νεφρό. Συμμετέχουν σε πληθώρα λειτουργιών στο σπείραμα: παρέχουν δομική στήριξη και διατηρούν την αρχιτεκτονική των τριχοειδών αγγείων του σπειράματος, εκφράζουν χυμοκίνες και μόρια προσκόλλησης, και αποτελούν στόχο των μεσολαβητών της φλεγμονής, αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών. Πιθανολογείται επίσης ότι τα μεσαγγειακά κύτταρα παίζουν ρόλο στον έλεγχο της ροής του αίματος μέσα στα τριχοειδή αγγεία, λόγω της ικανότητας συστολής που διαθέτουν. Τέλος, τα μεσαγγειακά κύτταρα συνδέονται με διάφορες νεφρικές παθήσεις (Schlöndorff D, 1996).

3.1.4 Τοιχωματικά κύτταρα (*Parietal cells*)

Η κάψα του Bowman επενδύεται από ένα μονόστιβο πλακώδες επιθήλιο, που αποτελείται από τα τοιχωματικά κύτταρα (*parietal cells*). Οι λειτουργίες των κυττάρων αυτών σχετίζονται με την ανάπτυξη και τη φυσιολογική λειτουργία του νεφρού. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι τα τοιχωματικά κύτταρα αποτελούν μια εν δυνάμει πηγή για την αναγέννηση των ποδοκυττάρων, καθώς λειτουργούν ως προγονικά κύτταρα που θα διαφοροποιηθούν σε ποδοκύτταρα όταν ο αριθμός των τελευταίων έχει μειωθεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις (Poulsom R, Little MH, 2009)

3.2 Παραγωγή ούρων

Το νεφρικό σωματίο αποτελεί τη θέση όπου φιλτράρεται το αίμα. Κάθε σπείραμα

τροφοδοτείται με αίμα από ένα προσαγωγό αρτηρίδιο. Καθώς το αίμα ρέει μέσα στο σπείραμα ένα μέρος του πλάσματος διηθείται μέσα στην κάψα του Bowman ενώ το υπόλοιπο εξέρχεται από το σπείραμα μέσω του απαγωγού αρτηριδίου. Η παραπάνω διαδικασία ονομάζεται σπειραματική διήθηση και το υγρό που παράγεται κατά τη διαδικασία αυτή ονομάζεται σπειραματικό διήθημα. Το σπειραματικό διήθημα περιέχει όλες τις ουσίες του πλάσματος, εκτός από τις πρωτεΐνες, σε ισόποση συγκέντρωση. Το αίμα που εισέρχεται στο σπείραμα διαχωρίζεται από το χώρο του Bowman από ένα φραγμό διήθησης. Αυτός αποτελείται από τρεις στιβάδες: τη στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών αγγείων του σπειράματος, τη στιβάδα επιθηλιακών κυττάρων της κάψας του Bowman (ποδοκύτταρα) και τη βασική μεμβράνη που βρίσκεται ανάμεσα στις δυο στιβάδες.

Το νερό, τα ιόντα και οι μικρομοριακές ενώσεις διακινούνται ελεύθερα, ενώ η διήθηση μακρομορίων είναι εκλεκτική και εξαρτάται από το μέγεθος, το σχήμα και το φορτίο τους. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών του σπειράματος, το σχισμοειδές διάφραγμα (αποτελεί μία εξειδικευμένη μορφή διακυττάριας σύνδεσης) και η σπειραματική βασική μεμβράνη αποτελούν το σημείο όπου γίνεται η διήθηση του πλάσματος και ξεκινάει ο σχηματισμός των ούρων. Καθώς το σπειραματικό διήθημα διέρχεται μέσα από τα σωληνάρια, η σύνθεσή του μεταβάλλεται με μετακίνηση ουσιών από τα σωληνάρια προς τα περισωληναριακά τριχοειδή (σωληναριακή επαναρρόφηση) και αντίστροφα (σωληναριακή έκκριση). Το μεγαλύτερο μέρος του σπειραματικού διηθήματος επαναρροφάται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα επαναρροφάται στα υπόλοιπα τμήματα του νεφρώνα: αγκύλη του Henle, άπω σωληνάριο και αθροιστικό σωληνάριο. Στο εγγύς σωληνάριο επαναρροφώνται νερό καθώς και γλυκόζη, αμινοξέα και διάφορα ιόντα νατρίου, χλωρίου, μαγνησίου, φωσφορικά και διττανθρακικά. Για να παραχθεί η τελική μορφή των ούρων, το αρχικό διήθημα συμπυκνώνεται. Η συμπύκνωση πραγματοποιείται στην αγκύλη του Henle, με μία διαδικασία που ονομάζεται πολλαπλασιασμός αντιρροής, και στο αθροιστικό σωληνάριο, με την επίδραση της αντιδιουρητικής ορμόνης (ADH). Ο ρόλος της ADH είναι να ελέγχει τη διαπερατότητα των αθροιστικών πόρων ανάλογα με την ανάγκη του οργανισμού να αποβάλλει νερό με τα ούρα ή όχι. Στην αγκύλη του Henle εκτός από την συμπύκνωση των ούρων γίνεται και επαναρρόφηση νερού και ιόντων νατρίου και χλωρίου ενώ τέλος, το άπω εσπειραμένο σωληνάριο είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο της οξεοβασικής ισορροπίας και έχει την ικανότητα να αντλεί ιόντα αντίθετα από την κλίση συγκέντρωσης. Η όλη διαδικασία της παραγωγής των ούρων είναι περίπλοκη και περιλαμβάνει πολλά σημεία ελέγχου που ρυθμίζουν κάθε φορά τη σύσταση των ούρων ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού (Vander, Sherman, Luciano, Τσακόπουλος, 2001)

3.3 Λειτουργίες νεφρού

Οι νεφροί διατηρούν σταθερό τον όγκο και τη σύσταση των διαλυμάτων του ανθρώπινου σώματος και εξισορροπούν τυχόν διακυμάνσεις λόγω της λήψης τροφής, του κυτταρικού μεταβολισμού ή άλλων παραγόντων όπως η σωματική κόπωση. Σε πολλές παθολογικές καταστάσεις οι διαταραχές του όγκου και της σύστασης των διαλυμάτων που συμβαίνουν δεν μπορούν να αντιμετωπισθούν από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς των νεφρών, με αποτέλεσμα αυτές να γίνονται μόνιμες και οι νεφροί να αποτελούν μέρος του προβλήματος.

Οι νεφροί έχουν την ικανότητα:

- Να ρυθμίζουν το ισοζύγιο του ύδατος και των ανόργανων ιόντων: Η ρύθμιση του όγκου και της σύστασης των διαλυμάτων πραγματοποιείται με την αποβολή ή την κατακράτηση ύδατος, ηλεκτρολυτών ή οξέων σύμφωνα με την ομοιόσταση του οργανισμού. Η ρύθμιση της αποβολής νατρίου, χλωρίου, ασβεστίου, φωσφόρου, μαγνησίου, ύδατος και ιόντων υδρογόνου εξασφαλίζει τη σταθερότητα της ώσμωσης, των ηλεκτρολυτών και της οξεοβασικής ισορροπίας.
 - Να απομακρύνουν τα μεταβολικά παραπροϊόντα και τις ξένες ουσίες από το αίμα και να τα αποβάλλουν από τα ούρα: Η αποβολή τοξικών προϊόντων αλλά και προϊόντων του μεταβολισμού ή φαρμάκων συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης.
 - Να πραγματοποιούν γλυκονεογένεση κατά τη διάρκεια παρατεταμένης νηστείας και
 - Να εκκρίνουν ορμόνες όπως η ερυθροποιητίνη, η ρενίνη, η 1,25 διυδροξυβιταμίνη D3: Η παραγωγή ενζύμων και ορμονών εξασφαλίζει βασικές λειτουργίες του οργανισμού (αιμοποίηση, μεταβολισμός των οστών, αιμοδυναμική σταθερότητα).
- (Vander, Sherman, Luciano, Τσακόπουλος, 2001).

3.4 Μέθοδοι ελέγχου της νεφρικής λειτουργίας

Ο πιο χρήσιμος δείκτης για τον έλεγχο της ολικής νεφρικής λειτουργίας είναι ο ρυθμός της σπειραματικής διήθησης (*Glomerular Filtration Rate, GFR*). Ο GFR μετράει το ποσό του πλάσματος που διηθείται κατά μήκος του σπειράματος στη

μονάδα του χρόνου και εκφράζεται σε ml/min. Η μέτρησή της πραγματοποιείται με τον υπολογισμό της νεφρικής κάθαρσης μιας συγκεκριμένης ουσίας του πλάσματος. Η ουσία που χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη είναι η κρεατινίνη. Η κρεατινίνη είναι μια ουσία που παράγεται από τους μύς και απεκκρίνεται στα ούρα. Τα επίπεδα της κρεατινίνης, σε φυσιολογικούς άνδρες με μέσο σωματικό μέγεθος, κυμαίνονται από 0,7-1,5 mg/dl. Αντίθετα στις γυναίκες οι τιμές είναι χαμηλότερες και ανέρχονται σε 0,5-1,3 mg/dl. Η κάθαρση της κρεατινίνης ελαττώνεται με την πάροδο της ηλικίας και με την εμφάνιση και επιδείνωση της νεφρικής νόσου. Η νεφρική ροή του αίματος (Renal Blood Flow, RBF) αποτελεί έναν άλλο δείκτη της νεφρικής λειτουργίας που όμως δεν χρησιμοποιείται συνήθως στην κλινική πράξη. Τέλος, η κλασματική απέκκριση νατρίου αποτελεί ακόμη μια μέθοδο για τον υπολογισμό της νεφρικής λειτουργίας. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το ποσό του νατρίου που απεκκρίνεται στα ούρα ισούται με το ποσό του νατρίου που προσλαμβάνεται (Stein, 1998).

3.5 ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

3.5.1 ΟΞΕΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ (ΟΝΑ)

Ως οξεία νεφρική ανεπάρκεια ορίζεται η απότομη έκπτωση ή διακοπή της νεφρικής λειτουργίας, η οποία μπορεί να επηρεάσει τα περισσότερα οργανικά συστήματα (Stein, 1998).

Πρώτη φορά, το 1951, γίνεται αναφορά στην οξεία νεφρική ανεπάρκεια από τον Homer Smith. Ο όρος αναφερόταν στη νεφρική δυσλειτουργία που σχετιζόταν με τραυματικές βλάβες. Από τότε ο συγκεκριμένος όρος έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει μια απότομη και παρατεταμένη μείωση της νεφρικής λειτουργίας. Πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι υπήρχαν τουλάχιστον 35 ορισμοί στη βιβλιογραφία. Η ομάδα εργασίας της πρωτοβουλίας για την ποιότητα της επείγουσας κάθαρσης (acute dialysis quality initiative, ADQI) ανέπτυξε τη σταδιοποίηση κατά RIFLE (risk – injury – failure – loss – end-stage kidney disease) (Bellomo R et al, 2004). Για να είναι πιο ακριβής ο ορισμός της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας, η ομάδα αυτή (acute kidney injury network, AKIN) πρότεινε μια τροποποιημένη εκδοχή της κατηγοριοποίησης κατά RIFLE, η οποία είναι επίσης γνωστή με τον όρο κριτήρια AKIN (Mehta RL et al, 2007).

Κριτήρια κρεατινίνης ορού	Κριτήρια ρυθμού διούρησης
1 Αύξηση κρεατινίνης $\geq 0,3$ mg/dL ή αύξηση $\geq 150-200\%$ από την τιμή αναφοράς	Ρυθμός διούρησης $< 0,5$ mL/kg/ώρα×6 ώρες
2 Αύξηση κρεατινίνης $> 200-300\%$ από την τιμή αναφοράς	Ρυθμός διούρησης $< 0,5$ mL/kg/ώρα×12 ώρες

3 Αύξηση κρεατινίνης >300% από την τιμή αναφοράς (ή κρεατινίνη ορού $\geq 4,0$ mg/dL με οξεία αύξηση τουλάχιστον κατά 0,5 mg/dL)	Ρυθμός διούρησης <0,3 mL/kg/ώρα×24 ώρες ή ανουρία×12 ώρες
--	---

AKIN κριτήρια για τη διάγνωση της οξείας νεφρικής βλάβης (ONB).

AKIN: Acute kidney injury network

ΣΤΑΔΙΟ	ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΡΣΔ	ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΡΥΘΜΟΥ ΔΙΗΘΗΣΗΣ
Risk (R)	Αύξηση κρεατινίνης×1,5 ή μείωση του ΡΣΔ >25%	Ρυθμός διούρησης <0,5 mL/kg/ώρα×6 ώρες
Injury (I)	Αύξηση κρεατινίνης×2 ή μείωση του ΡΣΔ >50%	Ρυθμός διούρησης <0,5 mL/kg/ώρα×12 ώρες
Failure (F)	Αύξηση κρεατινίνης×3 ή μείωση του ΡΣΔ >75% ή κρεατινίνη ≥ 4 mg/dL (οξεία αύξηση $\geq 0,5$ mg/dL)	Ρυθμός διούρησης <0,3 mL/kg/ώρα×24 ώρες ή ανουρία×12 ώρες
Loss (L)	Επίμονη ONB=πλήρης απώλεια νεφρικής λειτουργίας >4 εβδομάδες	
ESKD (E)	Τελικού σταδίου νεφρική νόσος >3 μήνες	

RIFLE κριτήρια για τη διάγνωση της οξείας νεφρικής βλάβης

RIFLE: Risk – Injury – Failure – Loss – End-stage kidney disease, ΡΣΔ: Ρυθμός σπειραματικής διήθησης

3.5.1.1 Αίτια

Τα αίτια της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες:

- Προνεφρική οξεία νεφρική ανεπάρκεια που χαρακτηρίζεται από μειωμένη νεφρική ροή του αίματος (60-70%). Αυτό μπορεί να προκληθεί από μία σοβαρή αιμορραγία, έναν τραυματισμό ή μία σοβαρή λοίμωξη.
- Μετανεφρική οξεία νεφρική ανεπάρκεια παρουσιάζεται εξαιτίας της απόφραξης του ουροποιητικού συστήματος (5-10%).
- Στην οξεία νεφρική ανεπάρκεια από νεφρικά αίτια, υπάρχει βλάβη στο νεφρικό παρέγχυμα (25-40%).

Η ONA προνεφρικής αιτιολογίας μπορεί να οφείλεται σε α) αιμορραγίες, β) νεφρικές απώλειες υγρών γ) απώλειες υγρών από το γαστρεντερικό (εμετοί, διάρροιες), δ)

απώλεια υγρών από το δέρμα (υπερβολική εφίδρωση ,εγκαύματα), ε) ανακατανομή του όγκου σε υπολευκωματιναιμικές καταστάσεις ή αύξηση του τρίτου χώρου (περιτονίτιδα, παγκρεατίτιδα), στ) μεταβολές των αγγειακών αντιστάσεων (μείωση των περιφερικών αγγειακών αντιστάσεων προκαλείται σε σήψη και αναφυλαξία, ενώ αύξηση των νεφρικών αγγειακών καταστάσεων προκαλείται σε στένωση νεφρικής αρτηρίας και σε διαχωρισμό αορτής ή νεφρικής αρτηρίας), ζ) ελάττωση της καρδιακής παροχής , η οποία παρατηρείται σε ασθενείς μετά από εκτεταμένο έμφραγμα του μυοκαρδίου, σε περικαρδική συλλογή επιπλακείσα με επιπωματισμό ή σε πνευμονική εμβολή.

Η Μετανεφρική ONA προκαλείται από απόφραξη των ουρητήρων, της κύστης και της ουρήθρας. Οι αποφράξεις των ουρητήρων διακρίνονται σε ενδογενείς (πέτρες, πήγματα αίματος, απόπτωση θηλών, μυκητώματα) και σε εξωγενείς (κακοήθεια ελάσσονος πυέλου και κοιλίας, οπισθοπεριτοναϊκή ίνωση, απόφραξη των ουρητήρων κατά τη διάρκεια επέμβασης). Παθήσεις που σχετίζονται με την κύστη, και στις οποίες προκαλείται ONA, είναι η καλοήθης υπερτροφία και ο καρκίνος του προστάτη και της κύστης. Τέλος, στενώσεις της ουρήθρας μπορεί να προκαλέσουν ONA.

Οι νεφρικές αιτίες της ONA αφορούν τη δομή του νεφρού (αγγεία, σπειράματα, διάμεσο ιστό, σωληνάκια). Στην οξεία νεφρική ανεπάρκεια από νεφρικά αίτια είναι υπεύθυνοι ενδογενείς ή παρεγχυματικοί παράγοντες. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία ενδογενών νεφρικών παθήσεων που σχετίζονται με ONA. Αγγειακές παθήσεις που μπορεί να προκαλέσουν ONA είναι η θρόμβωση ή εμβολή αμφοτέρων των νεφρικών αρτηριών και η οξώδης πολυαρτηρίτιδα. Τα μικρά αγγεία και τα σπειράματα προσβάλλονται από αθηροεμβολική νόσο, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, θρομβωτική θρομβοπενική πορφυρά, σκληρόδερμα και κακοήγη υπέρταση. Οι βλάβες των σπειραμάτων (σπειραματονεφρίτιδες) περιλαμβάνουν την οξεία μεταλοϊμώδη σπειραματονεφρίτιδα, τη νεφρίτιδα του ΣΕΛ, την αγγειίτιδα Wegener, το σύνδρομο Goodpasture και άλλες παθήσεις. Η φλεγμονή του διαμέσου ιστού, η οποία χαρακτηρίζεται από σημαντικό οίδημα ονομάζεται διάμεση νεφρίτιδα και όταν είναι εκτεταμένη μπορεί να προκαλέσει έκπτωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης. Τις περισσότερες φορές οφείλεται σε αντίδραση υπερευαισθησίας σε φάρμακα όπως την πενικιλίνη, τις κεφαλοσπορίνες, τη ριφαμπικίνη, τις σουλφοναμίδες, την ερυθρομυκίνη, τη φουροσεμίδη, τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη και σπάνια σε λοιμογόνους παράγοντες όπως κόκκους (σταφυλόκοκκους, στρεπτόκοκκους) και ιούς (CMV, EBV). Η οξεία σωληναριακή νέκρωση αποτελεί τη συχνότερη αιτία ONA και χαρακτηρίζεται από βλάβες των σωληναριακών κυττάρων, οι οποίες μπορεί να είναι ήπιες ή να οδηγούν σε νέκρωση των σωληναριακών κυττάρων. Η οξεία σωληναριακή νέκρωση μπορεί να προκαλείται από νεφροτοξίνες, ισχαιμία ή από άλλα αίτια όπως μια μετάγγιση ή δόγμα φιδιού. Μια άλλη σπάνια αιτία ONA αποτελεί η απόφραξη των σωληναρίων από κρυστάλλους ουρικού οξέος, οξαλικού ασβεστίου ή φωσφορικού ασβεστίου.

Τέλος σωληναριακή απόφραξη μπορεί να παρατηρηθεί και στο πολλαπλούν μυέλωμα (Stein, 1998).

3.5.1.2 Παθοφυσιολογία

Μελέτες τόσο σε πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο, δεν έχουν διευκρινίσει πλήρως τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην πρόκληση της νεφρικής βλάβης. Η νεφρική βλάβη μπορεί να δημιουργείται ως αποτέλεσμα της αγγειοσύσπασης των προσαγωγών αρτηριδίων του σπειράματος. Εξαιτίας της αγγειοσύσπασης των προσαγωγών αρτηριδίων ελαττώνεται ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης, προκαλείται ισχαιμία λόγω ελαττωμένης μεταφοράς οξυγόνου στο νεφρό, καταστρέφονται τα νεφρικά σωληνάκια, αυξάνονται τα ιόντα νατρίου (Na^+) στην περιοχή της πυκνής κηλίδας και κατά συνέπεια αυξάνεται η έκκριση ρενίνης από τα κύτταρα της παρασπειραματικής συσκευής και ενεργοποιείται το σύστημα αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης. Επιπλέον υπάρχουν και άλλοι αγγειοσυσπαστικοί παράγοντες, οι οποίοι συμβάλλουν στην πρόκληση νεφρικής βλάβης. Αυτοί είναι οι αναστολείς προσταγλανδινών, η αδενοσίνη και η ενδοθηλίνη.

Η νεφρική βλάβη μπορεί να οφείλεται στην απόφραξη των νεφρικών σωληναρίων από κυτταρικά στοιχεία, πρωτεϊνικούς κυλίνδρους ή χρωστικές. Οι παράγοντες αυτοί βλάπτουν τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια και αποφράσσουν και αυξάνουν την πίεση εντός των σωληναρίων, με αποτέλεσμα τη μείωση της σπειραματικής διήθησης.

Τέλος, η βλάβη της επιθηλιακής μεμβράνης των νεφρικών σωληναρίων έχει ως αποτέλεσμα την επαναρρόφηση ουσιών, οι οποίες υπό φυσιολογικές συνθήκες απεκκρίνονται. Ο μεταβολισμός των νουκλεοτιδίων αδενίνης, οι ελεύθερες ρίζες, οι μεταβολές του ενδοκυττάριου ασβεστίου (Ca^{++}), τα φωσφολιπίδια και οι διαταραχές της πολικότητας των κυττάρων των νεφρικών σωληναρίων παίζουν σημαντικό ρόλο στη νεφρική βλάβη.

3.5.1.3 Κλινικές εκδηλώσεις

Η κλινική πορεία της ΟΝΑ μπορεί να εξαρτάται από την πρωτοπαθή αιτία.

Η κύρια κλινική εκδήλωση της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας είναι η ολιγουρία (εμφανίζεται όταν ο ρυθμός αποβολής ούρων είναι μικρότερος από $350\text{ml}/\text{m}^2/24\text{ωρο}$). Άλλες κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν το οίδημα, την ταχύπνοια ως αποτέλεσμα μεταβολικής οξέωσης, τις διαταραχές του καρδιακού ρυθμού λόγω υπερκαλιαιμίας, τη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια από την κατακράτηση υγρών, το πνευμονικό οίδημα, τη νωθρότητα, τους σπασμούς ή την τετανία λόγω υπασβεστιαιμίας και το κώμα. Η μεταβολική οξέωση είναι αποτέλεσμα της απελευθέρωσης υπερβολικών ποσοτήτων υδρογονοκατιόντων με τη μορφή σουλφουρικού και φωσφορικού οξέος, που δεν μπορούν να απεκκριθούν.

Η υπερκαλιαιμία (οφείλεται σε αδυναμία αποβολής K^+ με τα ούρα) αποτελεί πολύ σοβαρή και επικίνδυνη για τη ζωή επιπλοκή. Επιδεινώνεται από τη μεταβολική οξέωση, από αντιβιοτικά που περιέχουν κάλιο ή φάρμακα που επηρεάζουν την απέκκριση του καλίου. Η υπασβεστιαίμια όπως και η υπονατρίαίμια αποτελούν συχνές ηλεκτρολυτικές διαταραχές. Η υπονατρίαίμια οφείλεται στην αυξημένη πρόσληψη ύδατος, ενώ οι αιτίες που συμβάλλουν στην εμφάνιση υπασβεστιαϊμίας περιλαμβάνουν την υπολευκωματιναιμία, την υπερφωσφαταιμία (αδυναμία αποβολής φωσφόρου από το νεφρό), την αντίσταση στην παραθορμόνη και την ελάττωση της ενεργούς μορφής της βιταμίνης D. Οι αιματολογικές διαταραχές που παρατηρούνται στην ΟΝΑ περιλαμβάνουν την αναιμία και την αιμορραγική διάθεση. Τέλος, παρατηρούνται διαταραχές από το γαστρεντερικό σύστημα, επιπλοκές στο νευρικό σύστημα, ενώ οι μεταβολές στο ανοσοποιητικό σύστημα αποτελούν ένα συχνό εύρημα στην ΟΝΑ. Τα εργαστηριακά ευρήματα διαφοροποιούνται ανάλογα με την αιτία της νεφρικής ανεπάρκειας (Stein, 1998, Leonard G et al, 1986).

3.5.2 ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ (ΧΝΑ)

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια εγκαθίστανται όταν ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης (GFR) μειώνεται τουλάχιστον στο 50% για διάστημα μεγαλύτερο από 3 μήνες, με ή χωρίς ένδειξη νεφρικής βλάβης ή όταν υπάρχει ένδειξη νεφρικής βλάβης με ή χωρίς μειωμένο GFR για περισσότερο από 3 μήνες (Quentin Milner, 2003, Polvin, 2010, Louise Bird, David Walker, 2015). Στη νεφρική νόσο η ικανότητα των νεφρών να αποβάλλουν τις άχρηστες ουσίες και να ρυθμίζουν την ποιότητα και την ποσότητα των υγρών του οργανισμού μειώνεται βαθμιαία και προοδευτικά και οδηγεί τελικά σε ουραιμικό σύνδρομο και τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια.

Ανάλογα με τα επίπεδα της σπειραματικής διήθησης η ΧΝΑ διακρίνεται σε πέντε στάδια:

- στην έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας,
- στην ήπια ΧΝΑ,
- στη μετρίου βαθμού,
- στην προχωρημένη και
- στου τελικού σταδίου.

Stage 1	Kidney damage with normal or ↑ GFR	GFR ≥ 90 ml/min/1.73 m²
Stage 2	Kidney damage with mild ↓ GFR	GFR 60-89
Stage 3	Moderate ↓ GFR	GFR 30-59
Stage 4	Severe ↓ GFR	GFR 15-29
Stage 5	Kidney failure	GFR <15 (or dialysis)

Στάδια Νεφρικής Ανεπάρκειας.

Am J Kidney Dis 2002; 39 (S2): S1-246

3.5.2.1 Παθοφυσιολογία

Τα κλινικά σημεία της ΧΝΑ και του ουραιμικού συνδρόμου (ουραιμία είναι η κατάσταση στην οποία εμφανίζονται κλινικά συμπτώματα και σημεία που σχετίζονται με την κατακράτηση τελικών προϊόντων μεταβολισμού του αζώτου) σχετίζονται με την ελάττωση του αριθμού των λειτουργούντων νεφρώνων. Οι νεφροί, εξαιτίας της προοδευτικής μείωσης της νεφρικής λειτουργίας, έχουν αναπτύξει αντιρροπιστικούς μηχανισμούς, κατά τους οποίους προσαρμόζουν τη λειτουργία τους ώστε να αντιρροπούν την ελάττωση του αριθμού τους. Στα πρώτα στάδια της νόσου, η απώλεια ενός αριθμού νεφρώνων, έχει ως αποτέλεσμα την αιμάτωση των υπόλοιπων λειτουργούντων νεφρώνων και την υπερτροφία τους (η αύξηση του μεγέθους αφορά και τα σπειράματα και τα σωληνάκια), ενώ παράλληλα αυξάνεται η σπειραματική τους διήθηση, η οποία συμπληρώνεται από αύξηση της επαναρρόφησης συστατικών (νάτριο, χλώριο, φώσφορος) καθώς και αύξηση της έκκρισης ουσιών που φυσιολογικά εκκρίνονται από διάφορες περιοχές του νεφρώνα. Οι μεταβολές αυτές βοηθούν στη διατήρηση του ισοζυγίου των υγρών και των διαλυτών ουσιών στον οργανισμό και αποφεύγεται η αύξηση της συγκέντρωσης ουσιών στο αίμα ή της ολικής συγκέντρωσής τους στον οργανισμό, έως τα απώτερα στάδια της νόσου όπου η GFR ελαττώνεται στο 25% του φυσιολογικού. Όταν η GFR βρίσκεται κάτω από 20-25% του φυσιολογικού, δηλαδή παρατηρείται περαιτέρω απώλεια της μάζας των νεφρώνων, ο ασθενής παρουσιάζει νεφρική ανεπάρκεια, η οποία ιστολογικά χαρακτηρίζεται από την παρουσία σπειραματικής σκλήρυνσης, ατροφίας των ουροφόρων σωληναρίων και την εμφάνιση ίνωσης. Εξαιτίας της παρατεταμένης νεφρικής βλάβης προσελκύονται φλεγμονώδη κύτταρα στο διάμεσο χώρο, σχηματίζεται φλεγμονώδες διήθημα ενώ εκφράζονται και εκκρίνονται προ-ινωτικοί παράγοντες

από τα επιθηλιακά σωληναριακά και τα φλεγμονώδη κύτταρα. Η ενεργοποίηση των ινοβλαστών οδηγεί σε ανεξέλεγκτη παραγωγή και εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας με αποτέλεσμα να καταστρέφεται η φυσιολογική αρχιτεκτονική του νεφρού (Stein, 1998, Polvin, 2010, Louise Bird, David Walker, 2015).

3.5.2.2 Αίτια

Τα κυριότερα αίτια της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας είναι:

1. Πρωτοπαθή νεφρικά νοσήματα

- Σπειραματοπάθειες
- Διαμεσο-σωληναριακές νεφροπάθειες, π.χ. χρόνια πυελονεφρίτιδα

2. Αποφρακτικές νεφροπάθειες

- Απόφραξη κατώτερου ουροποιητικού συστήματος, π.χ. υπερτροφία προστάτη
- Απόφραξη ανώτερου ουροποιητικού συστήματος, π.χ. υδρονέφρωση

3. Κληρονομικές ή συγγενείς νεφρικές παθήσεις

- Νεφρική δυσπλασία
- Νεφρική αμυλοείδωση
- Πρωτοπαθείς σπειραματοπάθειες
- Πολυκυστική νόσος των νεφρών
- Οικογενής νεφρίτιδα, π.χ. σύνδρομο Alport

4. Παθήσεις ή τοξικά αίτια που προσβάλλουν τους νεφρούς

- Αρτηριοσκλήρυνση
- Αρτηριακή υπέρταση
- Σακχαρώδης διαβήτης
- Κολλαγονώσεις
- Ουρική αρθρίτιδα
- Νεφροπάθεια από φάρμακα ή τοξίνες (μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη π.χ NSAIDs, σουλφοναμίδες, φάρμακα χημειοθεραπείας)
- Νεοπλασίες

(Stein, 1998, Reynolds and Lefebvre, 2013, Fernandez-del Palacio, 2014)

Τα κυριότερα αίτια του τελικού σταδίου ΧΝΑ αποτελούν η σπειραματονεφρίτιδα, η πυελονεφρίτιδα, ο σακχαρώδης διαβήτης, η νεφραγγειακή νόσος, η κυστική νόσος των νεφρών, η φαρμακευτική νεφροπάθεια και διάφορες κληρονομικές παθήσεις.

3.5.2.3 Κλινικές εκδηλώσεις της ΧΝΑ

Η ΧΝΑ οδηγεί σε διαταραχές της λειτουργίας όλων των οργανικών συστημάτων του σώματος. Οι διαταραχές περιλαμβάνουν το ουραιμικό σύνδρομο (οι πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν στην εκδήλωση ουραιμίας είναι: η συσσώρευση τοξινών όπως η ουρία και το ουρικό οξύ που είναι αποτέλεσμα της ελαττωμένης απέκκρισης

των τελικών προϊόντων μεταβολισμού του αζώτου, οι ενδοκυττάριας και εξωκυττάριας ηλεκτρολυτικές και οξεοβασικές διαταραχές, η συσσώρευση ορμονών και η μείωση της παραγωγής των νεφρικών ορμονών), τις καρδιοαναπνευστικές ανωμαλίες (η συχνότερη επιπλοκή στα τελευταία στάδια της ΧΝΑ είναι η αρτηριακή υπέρταση), τις ενδοκρινικές-μεταβολικές, νευρομυϊκές, δερματολογικές και γαστρεντερικές διαταραχές, τις διαταραχές ύδατος και ηλεκτρολυτών (οι κύριες διαταραχές υγρών και ηλεκτρολυτών στη ΧΝΑ είναι τα υψηλά ή χαμηλά επίπεδα νατρίου, καλίου, ασβεστίου και φωσφόρου και η μεταβολική οξέωση), τις ανοσολογικές καθώς και αιματολογικές διαταραχές (αναιμία, αιμορραγία). (Stein, 1998)

3.5.2.4 Αναιμία στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια

Η αναιμία αποτελεί την πρωιμότερη και σταθερότερη επιπλοκή της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Ως αναιμία ορίζεται η ελάττωση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης σε τιμές χαμηλότερες από 13 g/dL για τους άνδρες ηλικίας άνω των 15 ετών και τις γυναίκες μετεμμηνοπαυσιακού σταδίου, χαμηλότερες από 12 g/dL για τις γυναίκες ηλικίας άνω των 15 ετών και χαμηλότερες από 11 g/dL για τις εγκύους, σύμφωνα με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, με ταυτόχρονη μείωση της τιμής του αιματοκρίτη (< 30%) (Abbasi et al, 2014). Εμφανίζεται περίπου στο 10% των ασθενών με ΧΝΑ 1^{ου} σταδίου και φτάνει μέχρι και στο 70% των νεφροπαθών, που βρίσκονται στο 5^ο στάδιο της νόσου. Είναι ορθόχρωμη, ορθοκυτταρική και εμφανίζεται όταν ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης ελαττώνεται κάτω από 40ml/min (Stein, 1998). Η βαρύτητα της αναιμίας είναι ανάλογη με το στάδιο της νεφρικής ανεπάρκειας. Οι ασθενείς που υπόκεινται σε αιμοκάθαρση παρουσιάζουν αναιμία με υψηλή συχνότητα.

Η αιτιολογία της αναιμίας της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας είναι πολυπαραγοντική. Ως πρωτογενή αίτια θεωρούνται:

- (α) η μειωμένη παραγωγή ερυθροποιητίνης (ΕΡΟ),
- (β) η βράχυνση του χρόνου επιβίωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην περιφέρεια,
- (γ) η απώλεια αίματος οποιασδήποτε αιτιολογίας,
- (δ) οι τοξικοί παράγοντες (ουραιμικές τοξίνες)

Τα δευτερογενή αίτια είναι:

- (α) η έλλειψη των απαραίτητων για το σχηματισμό ερυθρών αιμοσφαιρίων παραγόντων (σίδηρος, φυλλικό οξύ, βιταμίνη Β12, καρνιτίνη, αμινοξέα),
- (β) ο υπερσπληνισμός,
- (γ) ο υπερπαραθυρεοειδισμός,
- (δ) η τοξικότητα από αργίλιο,
- (ε) η αιμόλυση

Η εμφάνιση και η βαρύτητά της αναιμίας σε ασθενείς με ΧΝΑ που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση καθορίζεται κυρίως από τρεις παράγοντες:

Α. Τη μειωμένη επιβίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η οποία προκαλείται από τις κυκλοφορούσες ουραιμικές τοξίνες, που καθιστούν τα ερυθρά ευαίσθητα στο οξειδωτικό, οσμωτικό και μηχανικό στρες, ελαττώνουν το χρόνο ζωής τους στο ήμισυ του φυσιολογικού και προκαλούν την πρόωρη καταστροφή τους. Ανάμεσα στους παράγοντες που προκαλούν την καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η αιμόλυση λόγω του υπερσπληνισμού και η επίδραση αυτών με ουσίες σχετιζόμενες με την αιμοκάθαρση, όπως ψευδάργυρος (Zn), χαλκός (Cu), νιτρικά, χλωραμίνες, φορμαλδεΰδη.

Β. Την απώλεια αίματος, η οποία συναντάται στη διαδικασία της αιμοκάθαρσης. Εξαιτίας της αυξημένης κατακράτησης αίματος εντός του φίλτρου αιμοκάθαρσης ή εξαιτίας της παραμονής του στο κύκλωμα εξωσωματικής κυκλοφορίας μετά το πέρας της συνεδρίας, οι ασθενείς εμφανίζουν απώλεια αίματος. Είναι δυνατόν να προκληθεί και από αιμορραγία από το γαστρεντερικό σωλήνα ή άλλους βλεννογόνους, η οποία επιδεινώνεται από τις διαταραχές της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων και τη χορήγηση ηπαρίνης κατά τη διάρκεια της συνεδρίας της αιμοκάθαρσης και

Γ. Την αναστολή της ερυθροποίησης, η οποία οφείλεται σε έλλειψη φυλλικού οξέος, βιταμίνης B12, βιταμίνης B6, βιταμίνης C, βιταμίνης D και καρνιτίνης, σε δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό (μπορεί να προκαλέσει ίνωση του μυελού), σε ανεπαρκή αιμοκάθαρση, σε τοξικότητα από αλουμίνιο, σε οξείες ή χρόνιες συνυπάρχουσες φλεγμονώδεις καταστάσεις, σε χρήση αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου και κυρίως, στη μειωμένη παραγωγή ερυθροποιητίνης και στην έλλειψη σιδήρου.

Ο πιο σημαντικός παράγοντας, που προκαλεί την εμφάνιση αναιμίας σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι η μειωμένη παραγωγή ερυθροποιητίνης (EPO) από τους μη λειτουργούντες νεφρούς (Abbasi et al, 2014). Το γεγονός αυτό έχει επιβεβαιωθεί από την επιτυχή χορήγηση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ερυθροποιητίνης (rhuEPO) σε ασθενείς που υποβάλλονται σε εξωνεφρική κάθαρση (Humphries J, 1992). Η ερυθροποιητίνη είναι ένα πολυπεπτίδιο που συντίθεται από διάμεσα κύτταρα, που προέρχονται από ινοβλάστες και βρίσκονται κοντά στη βασική επιφάνεια των κυττάρων του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου, στο φλοιό και στην εξωτερική μοίρα του μυελού του νεφρού, ενώ και το ήπαρ παράγει ερυθροποιητίνη σε ποσοστό 10-15%. Η παραγωγή της EPO εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου. Ο αισθητήρας του οξυγόνου που εδράζεται στο νεφρό αντιλαμβάνεται τις καταστάσεις που μειώνουν την παροχή ή και την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου στα ερυθρά αιμοσφαίρια και με αυτό τον τρόπο ρυθμίζεται η παραγωγή της. Η ορμόνη αυτή συνδέεται σε ειδικούς υποδοχείς των πρόδρομων κυττάρων της ερυθράς σειράς και επάγει τη διαφοροποίηση τους σε προερυθροβλάστες. Για όσο διάστημα υπάρχουν σύμπλοκα ερυθροποιητίνης–

υποδοχέα, τα πρόδρομα κύτταρα συνεχίζουν την προκαθορισμένη διαφοροποίησή τους σε ώριμα κύτταρα. Όταν αυτό το σύμπλοκο απουσιάζει, τα κύτταρα απορρυθμίζονται και οδηγούνται σε απόπτωση. Η ερυθροποίηση αναστέλλεται σε περίπτωση που ο αριθμός των ερυθροκυττάρων αυξηθεί πέρα από τα φυσιολογικά επίπεδα (Humphries J, 1992). Η διαδικασία της ερυθροποίησης υπόκειται στον έλεγχο ενός μηχανισμού παλίνδρομης ρύθμισης. Τα φυσιολογικά επίπεδα της ερυθροποιητίνης στο πλάσμα είναι 8-24mU/mL. Στους χρόνια αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς τα επίπεδα ερυθροποιητίνης είναι πολύ χαμηλότερα, διότι η έκκρισή της είναι ελαττωμένη. Στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου ο νεφρός εξακολουθεί να παράγει κάποια ποσότητα ερυθροποιητίνης. Εντούτοις δεν μπορεί να ανταποκριθεί στο ερέθισμα της υποξίας πολλαπλασιάζοντας την παραγωγή της, όπως ακριβώς συμβαίνει σε φυσιολογικά λειτουργούντες νεφρούς. Δηλαδή, αυτός ο μηχανισμός αρνητικής παλίνδρομης τροφοδότησης διαταρράσσεται σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, με αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα EPO να οδηγούν σε απόπτωση των ερυθροβλαστών, ελάττωση της ερυθροποίησης και επιβράδυνση της ωρίμανσης των ερυθροκυττάρων, καθώς και σε επακόλουθη μείωση του πλήθους και της επιβίωσής τους στο αίμα των ασθενών.

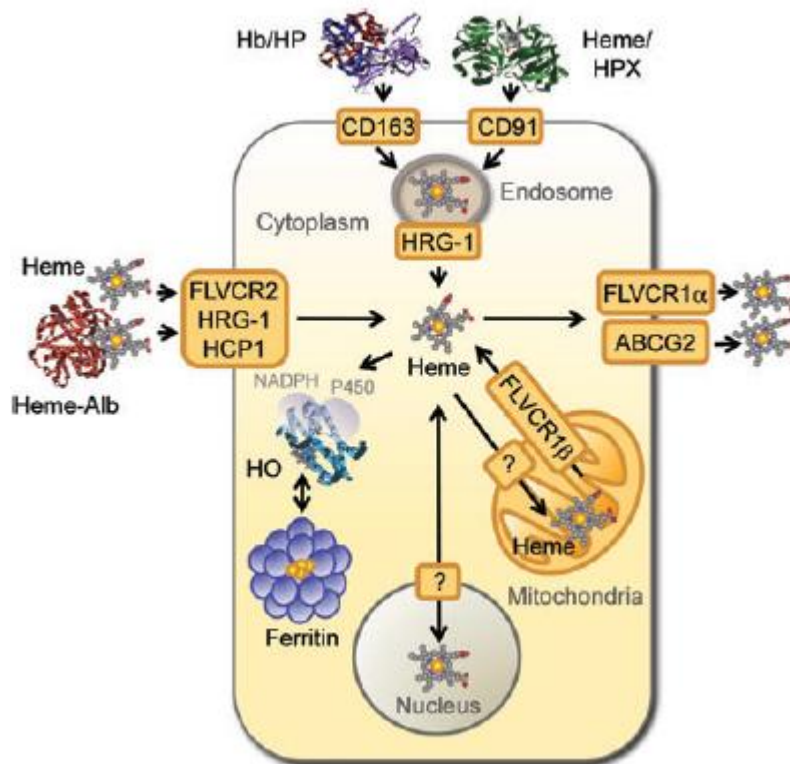
3.6 ΠΝΑ ΚΑΙ ΝΕΦΡΙΚΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η Νυκτερινή Παροξυντική Αιμοσφαιρινουρία στην κλασική της μορφή παρουσιάζεται ως χρόνια αιμολυτική αναιμία που συνοδεύεται συχνά από αιμολυτικές κρίσεις. Η αιμόλυση είναι κυρίως ενδοαγγειακή και οι ασθενείς εμφανίζουν τα συμπτώματα της αιμολυτικής αναιμίας, ενώ σε ένα ποσοστό περίπου 25% εκδηλώνουν αιμοσφαιρινουρία.

3.6.1 Ενδοαγγειακή αιμόλυση

Κατά την ενδοαγγειακή αιμόλυση, τα ερυθρά αιμοσφαίρια που έχουν υποστεί μεμβρανική βλάβη (λόγω επίθεσης του συμπληρώματος) καταστρέφονται, με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται στο πλάσμα η αιμοσφαιρίνη τους. Το τετραμερές μόριο της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης διαχωρίζεται σε αβ ετεροδιμερή. Αυτό το στάδιο είναι απαραίτητο ώστε τα διμερή της αιμοσφαιρίνης να συνδεθούν ανά ζεύγη στο μόριο της απτοσφαιρίνης, συγκροτώντας σύμπλοκα απτοσφαιρίνης-αιμοσφαιρίνης. Τα σύμπλοκα αυτά αναγνωρίζονται στη συνέχεια από τον υποδοχέα CD163, που εδρεύει στην επιφάνεια των μονοκύτταρων/μακροφάγων, και προσδένονται σε αυτόν. Η δέσμευση της αιμοσφαιρίνης από τον υποδοχέα CD163 οδηγεί στην εξουδετέρωση της τοξικής δράσης της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, προάγει αντιφλεγμονώδη απάντηση μέσω της απελευθέρωσης της ιντερλευκίνης-10 (interleukin-10) και της σύνθεσης της HO-1: Heme oxygenase 1 (οξυγενάση της αίμης) και αποκαθιστά την ακεραιότητα των σωληναριακών κυττάρων με αποτέλεσμα τη βελτίωση της νεφρικής λειτουργίας (José Ballarín et al. Nephrol. Dial. Transplant, 2011).

Ο υποδοχέας CD163 ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων cystein-rich scavenger και εκφράζεται στην επιφάνεια των μονοκύτταρων/μακροφάγων (ιστικά μακροφάγα), στο ήπαρ και το σπλήνα (Kristiansen et al, 2001, Nielsen and Moestrup, 2009). Όταν το σύμπλοκο απτοσφαιρίνης-αιμοσφαιρίνης δεσμευτεί από τον υποδοχέα, εξαφανίζεται από την κυκλοφορία, ενδοκυτταρώνεται (δημιουργία ενδοσωμάτων) και στη συνέχεια αποδεσμεύεται από αυτόν. Ο υποδοχέας στη συνέχεια ανακυκλώνεται, ενώ το σύμπλοκο αιμοσφαιρίνης-απτοσφαιρίνης συνεχίζει την πορεία του μέσα στα μονοκύτταρα/μακροφάγα καταλήγοντας στα λυσοσώματα όπου και αποδομείται. Με αυτόν τον τρόπο η απτοσφαιρίνη, δεσμεύοντας την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, μειώνει την απώλεια της μέσω του νεφρικού σπειράματος και προστατεύει τους νεφρούς από τη δράση της. Όμως, κατά την ενδοαγγειακή αιμόλυση, και ιδίως αν αυτή είναι έντονη, η ελεύθερη κυκλοφορούσα αιμοσφαιρίνη ανευρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η απτοσφαιρίνη δεν ανακυκλώνεται, ο σχηματισμός μεγάλης ποσότητας διμερών αιμοσφαιρίνης-απτοσφαιρίνης οδηγεί σε κορεσμό της και κατά συνέπεια μείωση των επιπέδων της κυκλοφορούσας απτοσφαιρίνης.

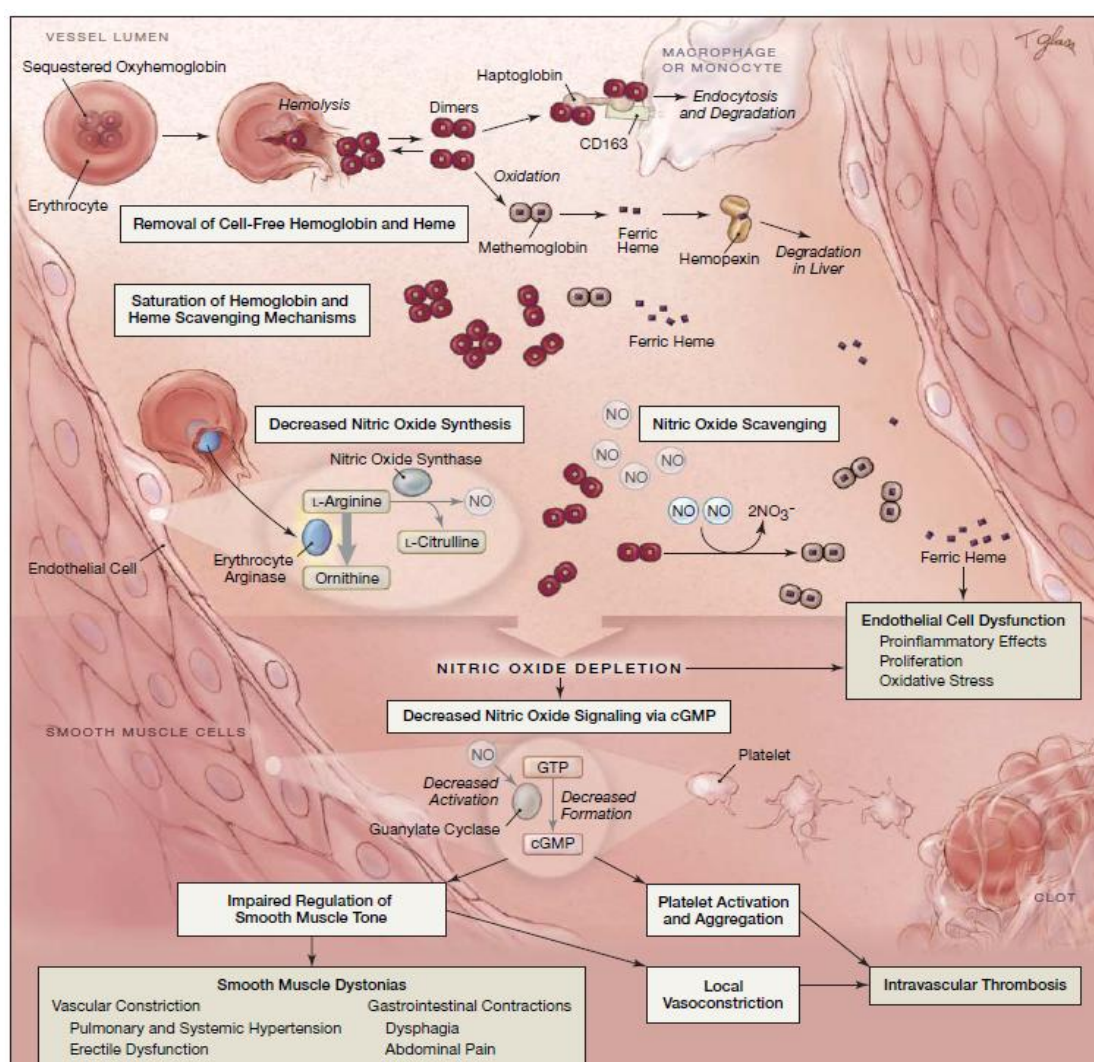


Εικόνα 3.3: Ομοιόσταση της αίμης. (Από: Raffaella Gozzelino and Miguel P. Soares, 2014).

Η περίσσεια της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης δεν μπορεί πλέον να δεσμευτεί στην απτοσφαιρίνη λόγω απουσίας της και υφίσταται οξείδωση σε μεθαιμοσφαιρίνη (ο δισθενής σίδηρος (Fe^{+2}) της αίμης μετατρέπεται σε τρισθενή σίδηρο (Fe^{+3})). Στη συνέχεια το μόριο της αίμης (actually metheme- καταχρηστικά θα χρησιμοποιείται ο όρος «μεθαίμη») διαχωρίζεται από τη σφαιρίνη και δεσμεύεται σε μια άλλη παραγόμενη από το ήπαρ πρωτεΐνη, την αιμοπηξίνη (hemopexin, Hx). Η δέσμευση της «μεθαίμης» στην αιμοπηξίνη αποτελεί τον δεύτερο μηχανισμό, με τον οποίο ο νεφρός προστατεύεται από την απώλεια σιδήρου μέσω των ούρων, σε καταστάσεις αυξημένης αιμόλυσης (Kathryn Doig, 2015: Rodak's Hematology). Η αιμοπηξίνη είναι μία γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος που αποτελείται από μία πεπτιδική αλυσίδα 439 αμινοξέων και εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ. Η πρωτεΐνη αυτή έχει την υψηλότερη συγγένεια με την αίμη από κάθε άλλη πρωτεΐνη που μπορεί να συνδεθεί με την αίμη (Tolosano et al, 2010). Κάθε μόριο αιμοπηξίνης συνδέεται με ένα μόριο «μεθαίμης».

Η αίμη-αιμοπηξίνη δεσμεύεται από ειδικούς ηπατικούς υποδοχείς (όπως ο υποδοχέας LDL receptor-related protein 1: LRP₁-CD91), ενδοκυτταρώνεται και το σύμπλοκο μεθαίμη-αιμοπηξίνη-υποδοχέας αποδομείται στο ήπαρ, με μια σειρά από ενζυματικά βήματα, απελευθερώνοντας τον σίδηρο. Σε αντίθεση με την απτοσφαιρίνη, η αιμοπηξίνη ανακυκλώνεται στο πλάσμα από το ηπατοκύτταρο και έτσι το μόριο αιμοπηξίνης συλλέγει και απομακρύνει περισσότερα μόρια ελεύθερης αίμης (metheme) (Kathryn Doig, 2015: Rodak's Hematology). Κατά την αποδόμηση

των συμπλόκων, η σφαιρίνη της αιμοσφαιρίνης πέπτεται και τα αμινοξέα επαναχρησιμοποιούνται για πρωτεϊνσύνθεση. Το μεγαλύτερο ποσοστό του δισθενούς σιδήρου που απελευθερώνεται επιστρέφει στο πλάσμα μέσω της φερροπορτίνης. Στο πλάσμα, ο απελευθερούμενος σίδηρος οξειδώνεται από την κυκλοφορούσα σερουλοπλασμίνη σε τρισθενή σίδηρο και παραλαμβάνεται από την τρανσφερρίνη, για να επιστρέψει πάλι στα ωριμάζοντα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς και να συμμετάσχει στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Τέλος, έναν τρίτο μηχανισμό προστασίας του νεφρού από τη δράση της αιμοσφαιρίνης και της αίμης αποτελεί η δέσμευση της αίμης στην αλβουμίνη. Η αίμη δεσμεύεται στην αλβουμίνη όταν η αιμοπηξίνη κορεσθεί και με αυτό τον τρόπο μειώνεται περαιτέρω η απώλειά της από τα ούρα (Kathryn Doig, 2015: Rodak's Hematology).



Εικόνα 3.4: Ενδοαγγειακή αιμόλυση. (Από Russell P. Rother et al, 2005).

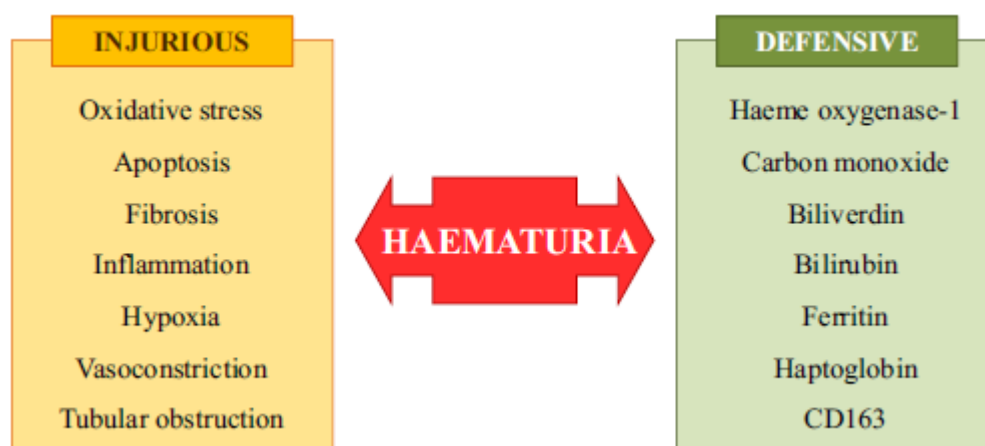
Σε έντονη αιμόλυση όμως, η δεσμευτική ικανότητα της αιμοσφαιρίνης, της αιμοπηξίνης και της αλβουμίνης υπερκεράται με αποτέλεσμα η αιμοσφαιρίνη και η αίμη να φιλτράρονται από τους νεφρούς (Kathryn Doig, 2015: Rodak's Hematology).

Όταν η μέγιστη ικανότητα σωληναριακής επαναρρόφησης ξεπεραστεί (1,4 mg/min) (Willoughby Lathem, 1958) τότε ποσότητα αιμοσφαιρίνης διαφεύγει στα ούρα ενώ ταυτόχρονα ο σίδηρος προκαλεί νεφρική βλάβη, μηχανισμός που θα αναλυθεί πιο κάτω.

Τόσο η αιμοσφαιρίνη όσο και η αίμη επιδρούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα και επάγουν προφλεγμονώδεις και προ-οξειδωτικές διεργασίες. Παράλληλα, η συσσώρευση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα επηρεάζει τα επίπεδα του μονοξειδίου του αζώτου (NO). Το NO, όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο 2.9 ρυθμίζει τον τόνο των αγγείων και γενικά την ομοιόσταση των ζωτικών οργάνων. Η αυξημένη αιμοσφαιρίνη στο πλάσμα μειώνει δραματικά τα επίπεδα του NO με αποτέλεσμα την διατάραξη της ρύθμισης του τόνου των αγγείων. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά με την αιμοσφαιρίνη (η αντίδραση αυτή είναι μη αναστρέψιμη) και παράγει NO₃ (προϊόν οξείδωσης) και μεθαιμοσφαιρίνη. Κατά την αιμόλυση των ερυθροκυττάρων απελευθερώνεται αργινάση στο πλάσμα. Η αργινάση είναι το ένζυμο που μετατρέπει την L-αργινίνη σε ορνιθίνη (Η L-αργινίνη αποτελεί το υπόστρωμα για τη σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου και υπό φυσιολογικές συνθήκες, η L- αργινίνη, που βρίσκεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μετατρέπεται μέσω της συνθετάσης του NO σε L- κιτρουλίνη). Έτσι, μειώνεται περαιτέρω η διαθεσιμότητα του NO (Russell P. Rother et al, 2005).

3.6.2 Νεφρική συμμετοχή

Η νεφρική βλάβη στην παροξυντική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία (ΠΝΑ) ποικίλλει από αναστρέψιμη οξεία δυσλειτουργία έως και χρόνια μη αναστρέψιμη βλάβη. Στις περισσότερες περιπτώσεις η βλάβη δεν είναι κλινικά εμφανής και παραβλέπεται. Παρ' όλα αυτά, η νεφρική δυσλειτουργία αποτελεί την αιτία θανάτου στο 8 ως 18% των ασθενών με ΠΝΑ (Fahri S et al, 2015).



Εικόνα 3.5: Παθοφυσιολογικοί και αμυντικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την αιματουρία (Από: Juan Antonio Moreno et al, 2015).

Η οξεία νεφρική βλάβη (Acute Kidney Injury, AKI) σε ασθενείς με ΠΝΑ εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της απελευθέρωσης της αίμης, λόγω ενδοαγγειακής αιμόλυσης. Ένα οξύ αιμολυτικό επεισόδιο που συνδυάζεται με μαζική αιμοσφαιρινουρία μπορεί να προκαλέσει οξεία νεφρική ανεπάρκεια. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν α) υποογκαιμία και νεφρική ισχαιμία, β) άμεση τοξικότητα της αιμοσφαιρίνης στα σωληναριακά κύτταρα, γ) απόφραξη σωληναρίων από τα κρυστάλλους ουρικού οξέος και αιμοσφαιρινικούς κυλίνδρους (αντίδραση αίμης με την πρωτεΐνη Tamm-Horsfall που αποτελεί εκκριτικό προϊόν των κυττάρων του άπω εσπειραμένου σωληναρίου) και δ) σπειραματική εναπόθεση ινώδους.

Επιπλέον, η εναπόθεση αιμοσιδηρίνης στους νεφρούς, εξαιτίας της χρόνιας κυρίως αιμόλυσης, μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργία στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια (Hussain S, et al, 2013, Fahri S et al, 2015). Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (ΧΝΑ) μπορεί να προκύψει εξαιτίας της μειωμένης νεφρικής ροής του αίματος, της εμφάνισης μικρο-εμφράκτων και της διάμεσης ίνωσης (Rachidi S et al, 2010, Fahri S et al, 2015). Η επίπτωσή της ΧΝΑ στην ΠΝΑ είναι 6,6 φορές υψηλότερη από αυτή που αναφέρεται στο γενικό πληθυσμό και μάλλον υποεκτιμάται στην ΠΝΑ

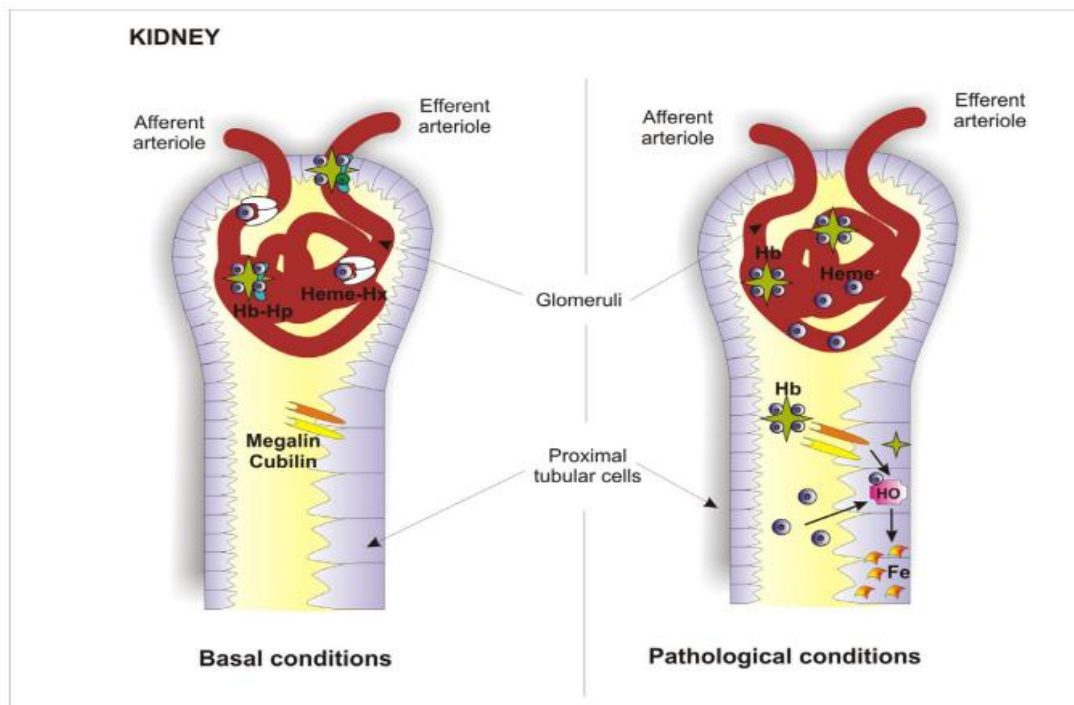
Η επαναλαμβανόμενη έκθεση του νεφρικού επιθηλίου στην αιμοσφαιρίνη οδηγεί σε προοδευτική μείωση της νεφρικής λειτουργίας. Η χρόνια αιμόλυση και αιμοσφαιρινουρία οδηγεί σε προοδευτικά έντονη εναπόθεση σιδήρου (αιμοσιδήρωση) και σωληναριακή βλάβη. Οι υποτροπιάζουσες μικροαγγειακές θρομβώσεις οδηγούν σε νέκρωση της φλοιώδους μοίρας, επακόλουθη απώλεια συμπτωτικής ικανότητας (ε.β.>1025 φ.τ.) και μείωση της κάθαρσης κρεατινίνης. Η ΧΝΑ συνδυάζεται με μικροέμφρακτα στη μυελώδη μοίρα, σωληναριακή ατροφία και διάμεση ίνωση και χαρακτηρίζεται από διαταραχή στο ρυθμό σπειραματικής διήθησης.

Επίσης έχουν αναφερθεί περιστατικά ασθενών με ΠΝΑ και θρόμβωση της νεφρικής αρτηρίας ή φλέβας.

Η εξέταση με την οποία αποδεικνύεται η νεφρική συμμετοχή στην ΠΝΑ είναι η μαγνητική τομογραφία (MRI), η οποία χρησιμοποιεί ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο κυμάτων και ραδιοσυχνοτήτων ώστε να παράγει λεπτομερείς εικόνες των εσωτερικών οργάνων και ιστών.

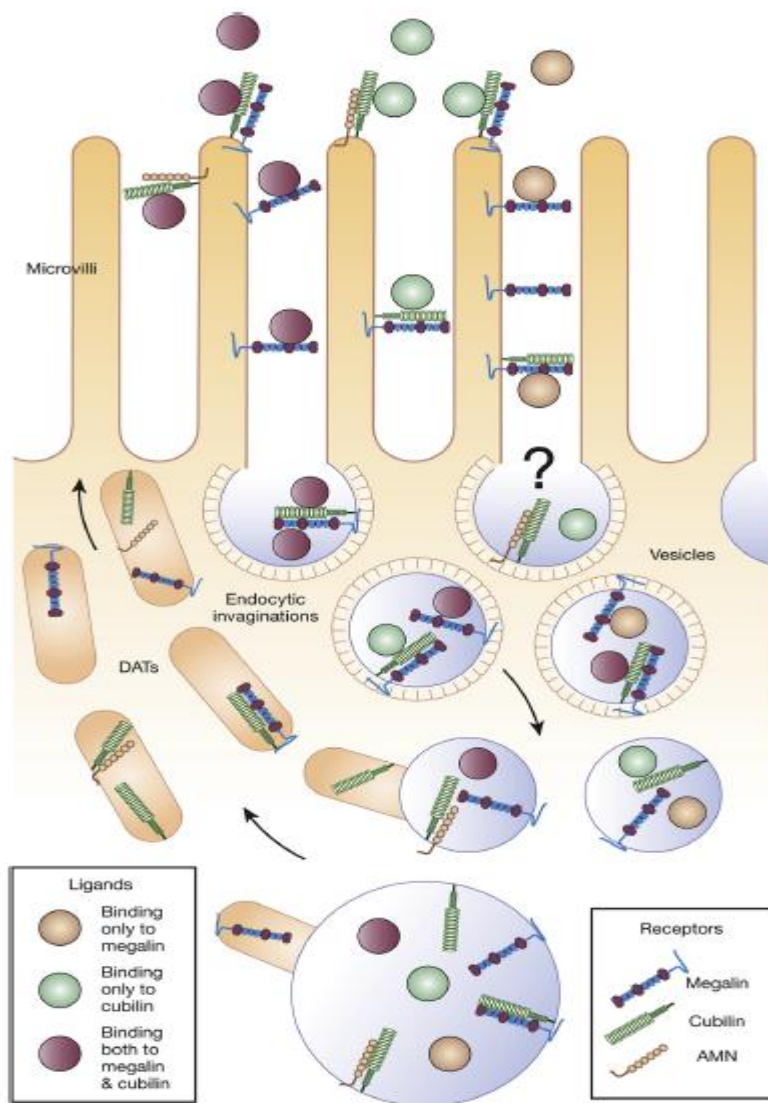
3.6.3 Μηχανισμός βλάβης στο νεφρό

Όπως αναφέρθηκε, η ελεύθερη κυκλοφορούσα αιμοσφαιρίνη διαχωρίζεται σε διμερή, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο κατά το ήμισυ το μέγεθος της. Η περίσσεια διμερών που δεν προσλαμβάνονται από την αιμοσφαιρίνη, λόγω του μικρού τους μοριακού βάρους, διηθούνται ταχέως από το νεφρικό σπείραμα και επαναρροφώνται από τα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων.



Εικόνα 3.6: Η απτοσφαιρίνη και η αιμοπηξίνη προστατεύουν το νεφρό από τη βλάβη. Σε παθολογικές καταστάσεις όταν η δεσμευτική ικανότητα της απτοσφαιρίνης και της αιμοπηξίνης ξεπεραστεί η αιμοσφαιρίνη και η αίμη περνούν το φραγμό της σπειραματικής διήθησης και επαναρροφώνται από τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια. (Από: Francisco Veas, Acute phase proteins, 2011).

Η επαναρρόφηση των διμερών αιμοσφαιρίνης στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια πραγματοποιείται με τη διαμεσολάβηση των ενδοκυτταρικών υποδοχέων μεγαλίνης (megalin) και κουμπιλίνης (cubilin), που εκφράζονται στην κορυφαία (αυλική) μεμβράνη των επιθηλιακών σωληναριακών κυττάρων.



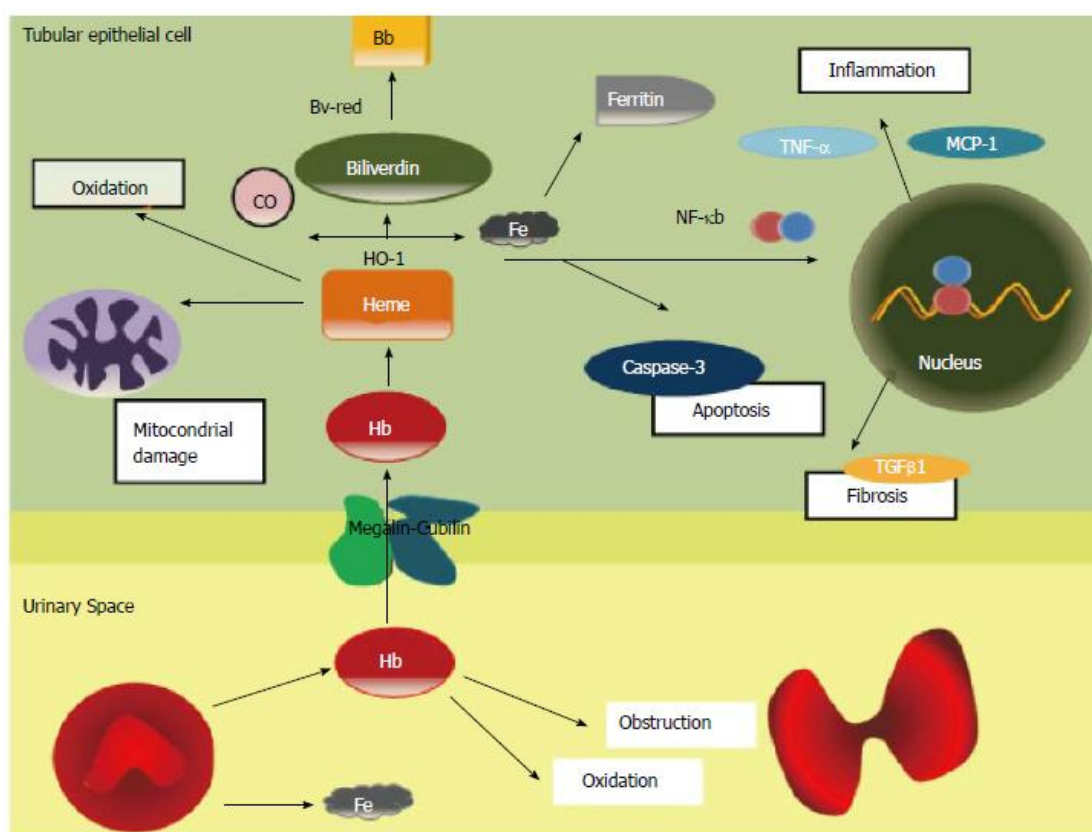
Εικόνα 3.7: Επαναρρόφηση πρωτεϊνών και άλλων μορίων από τους υποδοχείς μεγαλίνη και κουμπιλίνη στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων. Τα μόρια (μωβ, πράσινοι και γκρι κύκλοι) συνδέονται στη μεγαλίνη, στην κουμπιλίνη ή και στους δύο υποδοχείς με διαφορετική συγγένεια. AMN: amnionless, πρωτεΐνη που δεσμεύεται από την κουμπιλίνη. DATs: dense apical tubules, ακραία σωληνάρια. (Από: Rikke Nielsen et al, 2015).

Η μεγαλίνη αναγνωρίστηκε το 1982. Αποτελεί διαμεμβρανικό υποδοχέα 4600 αμινοξέων και αποτελεί μέλος της υπερικογένειας των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνικών υποδοχέων LRP-2 (low-LDL density lipoprotein receptor family). Είναι διαμεμβρανική, έχει μοριακό βάρος 600KDa και αποτελείται από 4 επαναλαμβανόμενες πλούσιες σε κυστεΐνη περιοχές, οι οποίες πιθανότατα συμμετέχουν στην πρόσδεση μικρών μορίων (Rikke N et al, 2015). Η κουμπιλίνη

είναι μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 460kDa. Στο καρβοξυλικό άκρο της υπάρχουν 27 εξελικτικά συντηρημένες περιοχές [CUB domains: complement C1r/C1s, Uegf (epidermal growth factor-related sea urchin protein), and bone morphogenic protein 1], που είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση των μορίων. Η μοριακή δομή της αποτελείται από πολλαπλές περιοχές σύνδεσης συνδετών, ενώ η ενδοκυττάρια κυκλοφορία της είναι πολύπλοκη και ανεξερεύνητη. Οι δύο αυτοί υποδοχείς είναι δομικά διαφορετικοί, αλλά συνδέουν από κοινού διάφορους συνδέτες (Christensen and Birn, 2001, Gburek et al, 2002).

Η κύρια λειτουργία αυτών των υποδοχέων είναι να προσδένουν μικρά μόρια που περνούν το φραγμό της σπειραματικής διήθησης. Έχει αποδειχθεί ότι η αιμοσφαιρίνη αποτελεί ένα μόριο που προσδένεται σε αυτούς τους υποδοχείς (Christensen and Birn, 2001, Gburek et al, 2002).

Το νεφρικό σωληναριακό επιθήλιο απορροφά μέρος των διηθημένων διμερών αιμοσφαιρίνης, που διασπάται σε αίμη και σφαιρίνη. Καθώς η οξυγενάση της αίμης είναι παρούσα και στα νεφρικά σωληναριακά κύτταρα, το νεφρικό επιθήλιο είναι ικανό στο να μετατρέψει την αίμη σε χολερυθρίνη που αποβάλλεται και αυτή ως μη συνδεδεμένη στα ούρα. Η επαναρρόφηση της αιμοσφαιρίνης, προκαλεί βλάβη στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα επάγοντας το οξειδωτικό στρες και την απόπτωσή τους. Παράλληλα προκαλεί φλεγμονή και βλάβη στο νεφρό, η οποία εκδηλώνεται με τη μορφή ίνωσης (Juan Antonio Moreno et al, 2015).



Εικόνα 3.8: Μηχανισμός δημιουργίας νεφρικής βλάβης. Hb: Haemoglobin (αιμοσφαιρίνη), Bb: Bilirubin (χολερυθρίνη), Bv-red: Biliverdin reductase (ρεδουκτάση της χολοπρασίνης), CO: Carbon monoxide (μονοξείδιο του άνθρακα), Fe: Iron (σίδηρος), HO-1:Heme oxygenase 1 (οξυγενάση της αίμης), MCP: Monocyte chemoattractant protein (πρωτεΐνη που προσελκύει τα μακροφάγα), NF-kb: Nuclear factor kappa b (πυρηνικός παράγοντας kb), TGF-β: Transforming growth factor beta (αυξητικός παράγοντας), TNF-α: Tumour necrosis factor alpha (παράγοντας νέκρωσης καρκινικών όγκων). (Από Claudia Yuste et al, 2015).

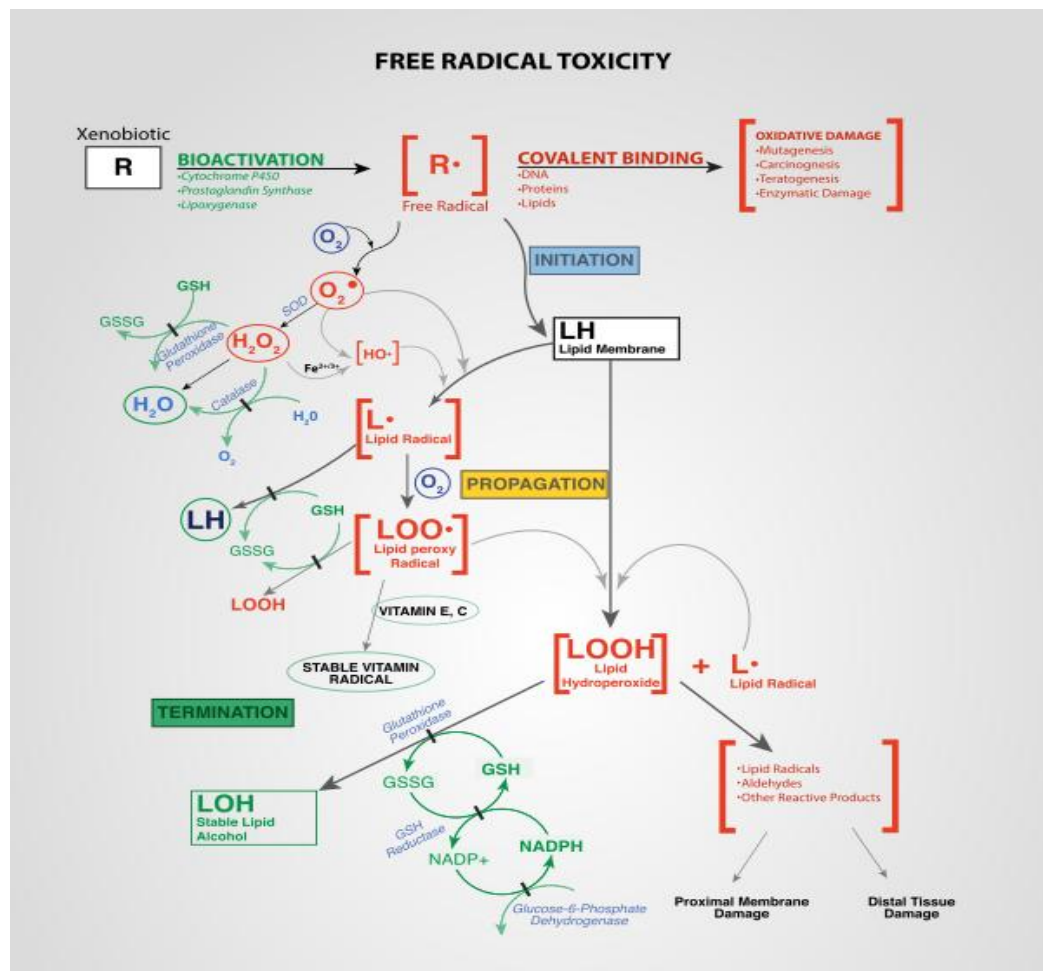
Με την επαναρρόφηση της αιμοσφαιρίνης στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια, αρχίζει η αποδόμησή της με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της αίμης. Η ελεύθερη αίμη είναι εξαιρετικά τοξική καθώς απελευθερώνει τον οξειδωμένο σίδηρο. Στο κυτταρόπλασμα, ο σίδηρος προκαλεί την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) (αντίδραση Fenton: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$, αντίδραση μεταξύ του H_2O_2 και των αλάτων σιδήρου), οι οποίες καταστρέφουν τις λιπιδικές μεμβράνες, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα (Papanikolaou and Pantopoulos, 2005).

Επιπλέον, η αίμη προκαλεί βλάβη στα μιτοχόνδρια των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων, απελευθέρωση προφλεγμονωδών χυμοκινών μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB, μείωση της διαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου (NO), με αποτέλεσμα τη νεφρική αγγειοσύσπαση και την ελάττωση της κυκλοφορίας του αίματος στο νεφρό (ισχαιμία) (Juan Antonio Moreno et al, 2015).

Η μείωση της διαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου οδηγεί σε αγγειοσυστολή και προκαλεί σοβαρή και παρατεταμένη υποξία στο νεφρικό μυελό και σωληναριακή νέκρωση (S. N. Heyman and M. Brezis, 1995). Όπως έχει ήδη αναφερθεί το NO αποτελεί κύριο ρυθμιστή του αγγειακού τόνου. Παράγεται από την L- αργινίνη (είναι το πρωταρχικό συστατικό-αμινοξύ που χρησιμοποιείται ως βάση για τον σχηματισμό του) στο αγγειακό ενδοθήλιο (vascular endothelium), στο λείο μυ και στα κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων του νεφρού. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων το κυτταροπλασματικό ένζυμο συνθετάση του NO (NO synthase: NOS) δρα στο υπόστρωμα L-αργινίνη και οδηγεί στην παραγωγή NO και κιτρουλίνης. Η ενζυμική δραστηριότητα της NOS είναι ελεγχόμενη και βασίζεται στη διαθεσιμότητα υποστρώματος και συμπαραγόντων, τα οποία με τη σειρά τους εμπλέκονται επίσης και σε άλλα βιοχημικά μονοπάτια. Το NO φυσιολογικά δεσμεύεται στο ένζυμο γουανυλική κυκλάση (Soluble guanylate cyclase, sGC) και το ενεργοποιεί. Οι γουανυλικές κυκλάσες είναι μέλη μιας μεγάλης οικογένειας νουκλεοτιδικών κυκλασών, οι οποίες καταλύουν τη μετατροπή ενός πουρινικού τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου της GTP (τριφωσφορική γουανοσίνη) σε ένα κυκλικό μονοφωσφορικό νουκλεοτίδιο την GMP (κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη). Τα κυκλικά αυτά μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια, ακολούθως, δρουν ως δεύτεροι αγγελιοφόροι για μεγάλο αριθμό μοριακών σημάτων μέσα στο κύτταρο (μονοπάτι μετάδοσης σήματος: NO- sGC- GMP) και οδηγούν σε

ενεργοποίηση διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών [πρωτεϊνική κινάση G (protein kinase G): αποτελεί δραστικό παράγοντα φωσφορυλίωσης]. Ο ρόλος του ενζύμου sGC είναι να καταλύει τη μετατροπή της τριφωσφορικής γουανοσίνης (guanosine 5P-triphosphate, GTP) σε κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cyclic guanosine 3,5-monophosphate, cGMP), η οποία ρυθμίζει την κυτταρική απόπτωση και συμμετέχει στη χαλάρωση του λείου μυ (John W. Denninger, Michael A. Marletta, 1999). Το cGMP είναι σημαντικό σηματοδοτικό μόριο, υπεύθυνο για τη ρύθμιση πολλών κυτταρικών λειτουργιών στους ιστούς, με κυρίαρχο το ρόλο του στη χάλαση των λείων μυϊκών ινών και την αναστολή της συσώρευσης και της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (ΑΜΠ). Το γεγονός αυτό οδηγεί σε διαστολή των αιμοφόρων αγγείων και αύξηση της ροής του αίματος. Κατά την έντονη αιμόλυση τα ερυθρά παράγουν το ένζυμο ερυθροκυτταρική αργινάση που δρα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και αποδομεί την L-αργινίνη σε ορνιθίνη, μειώνοντας έτσι την κύρια πηγή παραγωγής και σύνθεσης NO. Από την άλλη, η λύση των ερυθρών οδηγεί σε μεγάλη αύξηση των επιπέδων της κυκλοφορούσας ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, που οδηγεί σε μείωση των επιπέδων και της διαθεσιμότητας του κυκλοφορούντος NO μέσω δέσμευσής του. Η μείωση του NO οδηγεί με τη σειρά της σε μείωση ενεργοποίησης της διαλυτής κυτταροπλασματικής γουανυλικής κυκλάσης (sGC). Η μείωση του NO, εξαιτίας της σύνδεσής του με την αίμη, προκαλεί αγγειοσυστολή, η οποία είναι πιο έντονη στο μυελό του νεφρού (medulla). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ροής του αίματος στο νεφρό άρα και την παρατεταμένη υποξία που τελικά οδηγεί σε σωληναριακή νέκρωση (S. N. Heyman and M. Brezis, 1995).

Η τοξικότητα της αίμης στα μιτοχόνδρια οφείλεται στην παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου αλλά και στην ικανότητά της ως λιπόφιλο μόριο να διεισδύει μεταξύ των λιπιδίων των μεμβρανών. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη διαταραχή της μεμβράνης των μιτοχονδρίων καθώς προκαλείται οξείδωση των συστατικών της και σχηματίζονται υπεροξειδικές ρίζες με τοξική δράση (Karl A. Nath et al, 1998). Ιδιαίτερα ευάλωτα στην επίδραση των δραστικών ριζών οξυγόνου είναι τα υπολείμματα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσfolιπιδίων, τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευαισθησία στην οξείδωση.



Εικόνα 3.9: Επίδραση των ελεύθερων ριζών στην ιστική βλάβη (Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_peroxidation)

Όταν σχηματιστούν, οι ρίζες υπεροξειδίου μετατρέπονται σε ενδοϋπεροξειδία (πρόδρομες μορφές της μαλονδιαλδεΐδης), ενώ τελικό προϊόν της υπεροξειδωσής αποτελεί η μαλονδιαλδεΐδη (malondialdehyde, MDA). Εκτός από την MDA, το άλλο κύριο προϊόν της υπεροξειδωσής των λιπιδίων είναι η αλδεΐδη 4-υδροξυ-2-νονενάλη (4-hydroxynonenal, HNE). Η MDA έχει μεταλλαξιογόνο δράση στα κύτταρα των βακτηρίων και των θηλαστικών, ενώ αποτελεί καρκινογόνο ουσία για τους επίμυες. Η HNE έχει ήπια μεταλλαξιογόνο δράση, αλλά πιθανότατα είναι το κύριο τοξικό προϊόν της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007).

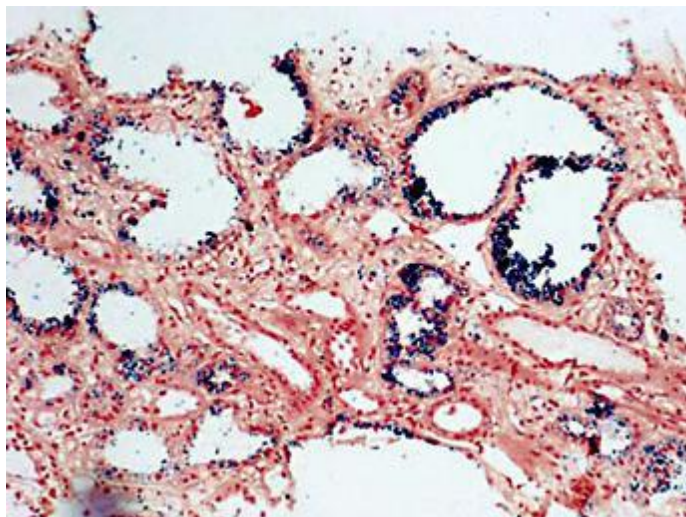
Η υπεροξειδωση των λιπιδίων πραγματοποιείται σε τρία στάδια: έναρξη (initiation), διάδοση (propagation) και λήξη (termination). Κατά την έναρξη, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ($\text{HO}\cdot$, $\text{HOO}\cdot$) αντιδρούν με ένα άτομο υδρογόνου και από την αντίδραση προκύπτει νερό και μία ρίζα λιπαρού οξέος (fatty acid radical), η οποία όμως αποτελεί ένα ασταθές μόριο. Έτσι κατά το στάδιο της διάδοσης, αυτή αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο δημιουργώντας μια υπεροξειδική ρίζα λιπαρού οξέος. Η ρίζα αυτή είναι αρκετά ασταθής και με τη σειρά της αντιδρά με ένα μόριο ελεύθερου λιπαρού

οξέος παράγοντας μια διαφορετική αυτή τη φορά ρίζα λιπαρού οξέος και ένα λιπιδικό υπεροξειδίο ή ένα κυκλικό υπεροξειδίο. Κατά τον τερματισμό δύο ελεύθερες ρίζες αντιδρούν και παράγουν ένα προϊόν που δεν αποτελεί ρίζα. Τελικό προϊόν της υπεροξειδωσής των λιπιδίων είναι η MDA και η HNE. Όταν ο τερματισμός αυτής της διαδικασίας καθυστερήσει, δημιουργούνται βλάβες στις μεμβράνες εξαιτίας της παρουσίας μεγάλης ποσότητας υπεροξειδικών ριζών (Marnette LJ, 1999).

Η ελεύθερη αίμη στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων καταβολίζεται από το ένζυμο οξυγενάση της αίμης (HO-1: Heme Oxygenase-1). Η HO-1 ανακαλύφθηκε το 1989. Είναι μία πρωτεΐνη 32 kDa. Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του ενζύμου HO-1 επάγεται από τα κύτταρα του νεφρού ως μια προσαρμοστική απάντηση με σκοπό την προστασία των κυττάρων αυτών από τις τοξικές επιδράσεις της αίμης. Το γονίδιο της HO εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 22. Η μεταγραφή του γονιδίου της HO-1 (hmox1) ελέγχεται από τον μεταγραφικό παράγοντα Bach1. Ο μεταγραφικός παράγοντας Bach1 είναι ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο (από πρωτεΐνες Maf), που δεσμεύεται στα στοιχεία StRE (stress response elements) του γονιδίου της HO. Η δέσμευση του Bach1 στα StRE οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης της HO-1. Ο μεταγραφικός παράγοντας Bach1 δεσμεύει την αίμη *in vitro* με υψηλή συγγένεια. Αυτή η σύνδεση έχει ως αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η σύνδεση του Bach1 στα StRE. Όταν ο μεταγραφικός παράγοντας Bach1 λείπει, η έκφραση της HO-1 απαιτεί την παρουσία της Nrf2 πρωτεΐνης (ανήκει στην ίδια οικογένεια πρωτεϊνών με τον Bach1). Όπως και ο Bach1, έτσι και η Nrf2 πρωτεΐνη σχηματίζει ετεροδιμερή (με τις Maf proteins) που προσδένονται στα StRE. Τα διμερή Nrf2/Maf λειτουργούν ως επαγωγείς της έκφρασης της HO-1 σε αντίθεση με τα διμερή Bach1/Maf. Υπάρχουν και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή του γονιδίου hmox1, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας NF-kB. Μελέτες σε ανθρώπινα επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα παρέχουν αποδείξεις για 2 πρωτεΐνες (USF1, USF2) οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου hmox1. Οι πρωτεΐνες αυτές διαφέρουν από την πρωτεΐνη Nrf2 και τον μεταγραφικό παράγοντα NF-kB στο γεγονός ότι η πρόσδεσή τους στο γονίδιο hmox1 με σκοπό την ενεργοποίησή του δεν εξαρτάται από την αίμη. Οι πρωτεΐνες USF1 και USF2 προσδένονται σε μια περιοχή του γονιδίου που ονομάζεται E-box element και σε συνεργασία με άλλες πρωτεΐνες ενεργοποιούν το γονίδιο (Michal J, Tracz et al, 2007).

Η HO-1 συμμετέχει στον καταβολισμό της αίμης, μετατρέποντάς την σε χολοπρασίνη. Κατά την διαδικασία αυτή απελευθερώνεται ο σίδηρος της αίμης ενώ παράλληλα παράγεται μονοξειδίο του άνθρακα (CO). Ο απελευθερούμενος σίδηρος αποθηκεύεται ως φεριτίνη στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων και ανιχνεύεται ως αιμοσιδηρίνη, λόγω απόπτωσης των

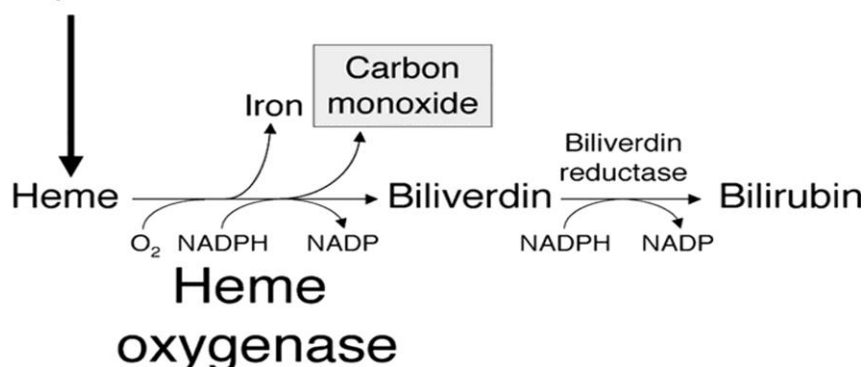
σωληναριακών κυττάρων, σε ιστολογικές τομές νεφρού ΠΝΑ ασθενών (Russell P. Rother et al, 2005, Hussain S et al, 2013).



Εικόνα 3.10: Νέκρωση των επιθηλιακών κυττάρων των Εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων στα οποία εναποτίθεται η αιμοσιδηρίνη. (Από: Hussain S et al 2013)

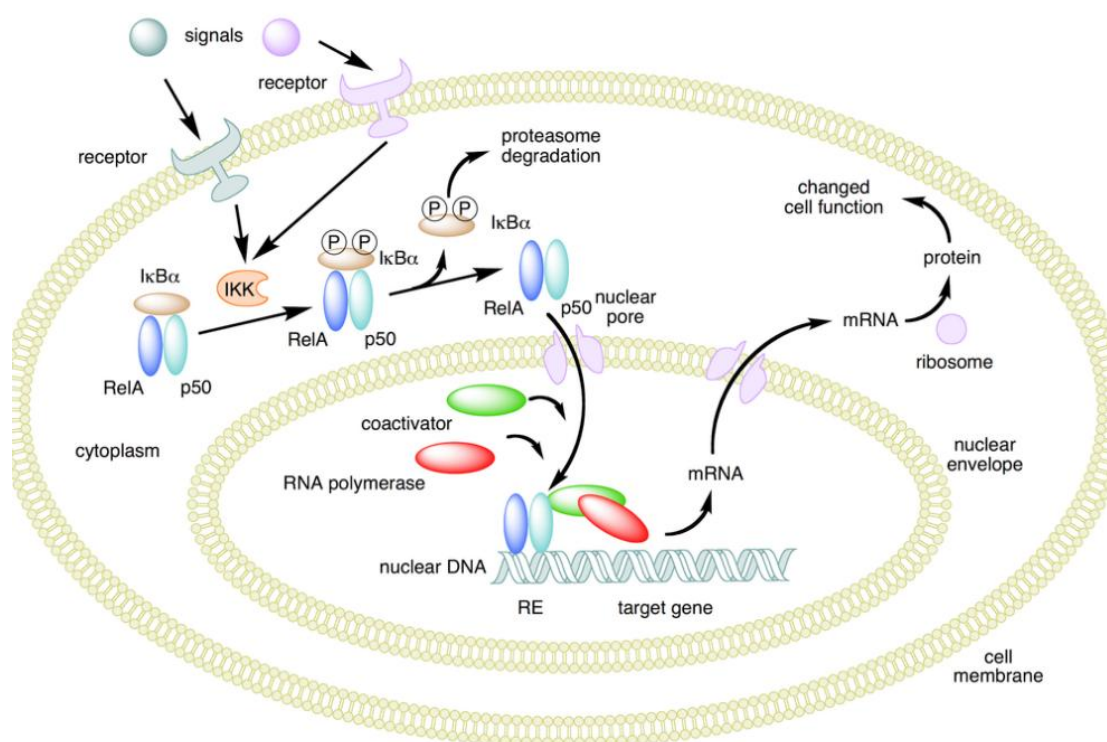
Παράλληλα, η ρεδουκτάση της χολοπρασίνης μετατρέπει τη χολοπρασίνη σε χολερυθρίνη. Σε ΠΝΑ ασθενείς έχει παρατηρηθεί ισχυρή επαγωγή της HO-1 στα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων. Η ίδια αύξηση στην έκφραση της HO-1 έχει παρατηρηθεί και σε πειραματικό μοντέλο αρουραίων, στο οποίο έγινε επαναλαμβανόμενη χορήγηση υπέρτονου διαλύματος γλυκερόλης που επάγει την αιμόλυση (Karl A. Nath et al, 2000). Ο απελευθερούμενος σίδηρος που δεν αποθηκεύεται ως φερριτίνη είναι ιδιαίτερα τοξικός, καθώς η δισθενής μορφή του (Fe^{+2}) επάγει την υπεροξειδωση των λιπιδίων των μεμβρανών, μια διαδικασία που αναλύθηκε πιο πάνω, αλλά και την κυτταροτοξικότητα μέσω της απελευθέρωσης της γαλακτικής αφυδρογονάσης (*Lactate Dehydrogenase*, LDH) (R. A. Zager and C. A. Foerder, 1992).

Heme proteins



Εικόνα 3.11: Δράση του ενζύμου οξυγενάση της αίμης (HO-1). (Από: Jozef Dulak et al, 2008).

Η ελεύθερη αίμη μπορεί επίσης να οδηγήσει σε νεφρική βλάβη δημιουργώντας φλεγμονή, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω. Στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς σωληναρίων, η αίμη οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ (Nuclear factor κΒ).



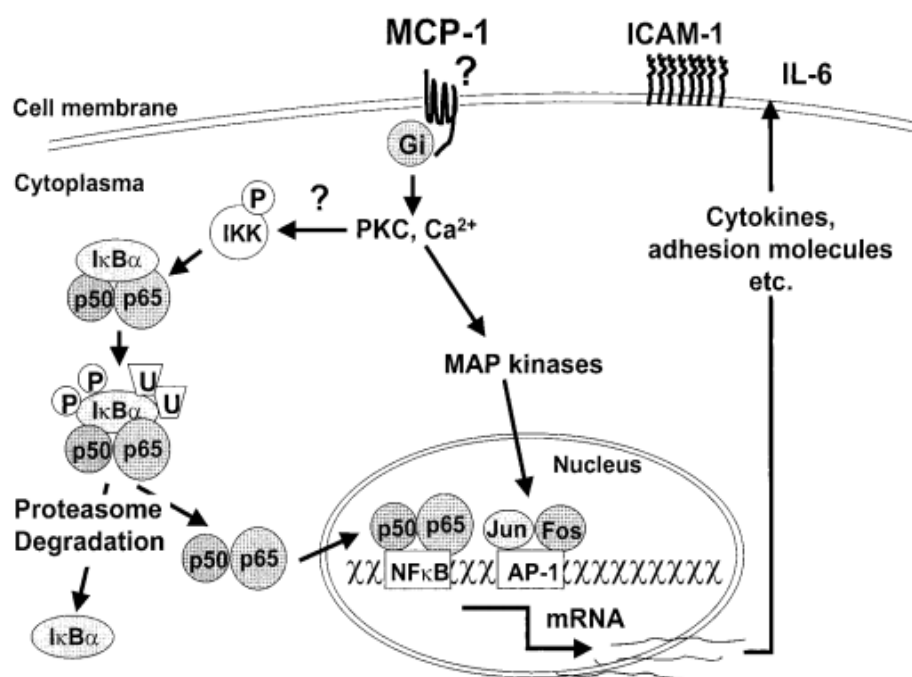
Εικόνα 3.12: Μηχανισμοί ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. (Πηγή: <https://en.wikipedia.org/wiki/NF-κB>).

Ο NF-κΒ είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με κεντρικό ρόλο στον έλεγχο της φλεγμονής. Ελέγχει την έκφραση πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν για προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες (IL-1, IL-2, TNF-α), χημειοτακτικούς παράγοντες (MCP-1, RANTES), μόρια προσκόλλησης (ICAM, VCAM, E-selectin), επαγωγείς του φαινομένου EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition-διέγερση της διαδικασίας της επιθηλιακής προς μεσεγχυματική μετατροπή), όπως ο Snail1, και τέλος αυξητικούς παράγοντες (Miyajima A et al, 2003). Ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κΒ αναπτύσσεται φλεγμονή στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των σωληναρίων (διάμεση νεφρίτιδα).

Η ενεργοποίηση του NF-κΒ πραγματοποιείται με την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών IκΒ [μια οικογένεια πρωτεϊνών που διαθέτουν μια αμινική περιοχή, η οποία ακολουθείται από έξι ή περισσότερες επαναλαμβανόμενες περιοχές αγκυρίνης (ankyrin repeats) και μια περιοχή που καλείται PEST (PEST domain) πλησίον του καρβοξυλικού άκρου]. Αυτό συμβαίνει κυρίως μέσω ενεργοποίησης της κινάσης IκΒ

(IKK), η οποία φωσφορυλιώνει δύο κατάλοιπα σερίνης. Με την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών IκB, ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB εισέρχεται στον πυρήνα και επάγει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που αναφέρθηκαν πιο πάνω (D. E. Nelson, et al, 2004).

Επομένως, η εδραίωση της φλεγμονής πραγματοποιείται με την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, το αυξημένο οξειδωτικό στρές, την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και την εμπλοκή μορίων προσκόλλησης και χημειοτακτικών παραγόντων (Baugé C et al, 2008). Τα επιθηλιακά κύτταρα στην περιοχή της βλάβης εκκρίνουν χημειοτακτικούς και αυξητικούς παράγοντες, που στρατολογούν και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται και εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες και κυττοκίνες (IL-6, IL-13, TNF, TGF-β, EGF, MMPs, TIMPs) ενισχύοντας τη φλεγμονώδη αντίδραση. Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη MCP-1 οδηγεί στην απελευθέρωση της IL-6, αλλά και επάγει την έκφραση του μορίου προσκόλλησης ICAM-1 στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα, μέσω μηχανισμών που εξαρτώνται από την πρωτεΐνη Gi (Gi-protein), την πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C, PKC) και την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου (intracellular Ca^{2+}) (εικόνα 3.13) (Christiane Viedt and Stephan R. Orth, 2002).



Εικόνα 3.13: Σχηματική απεικόνιση των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών της MCP-1 σε ανθρώπινα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα. (Από: Christiane Viedt and Stephan R. Orth, 2002).

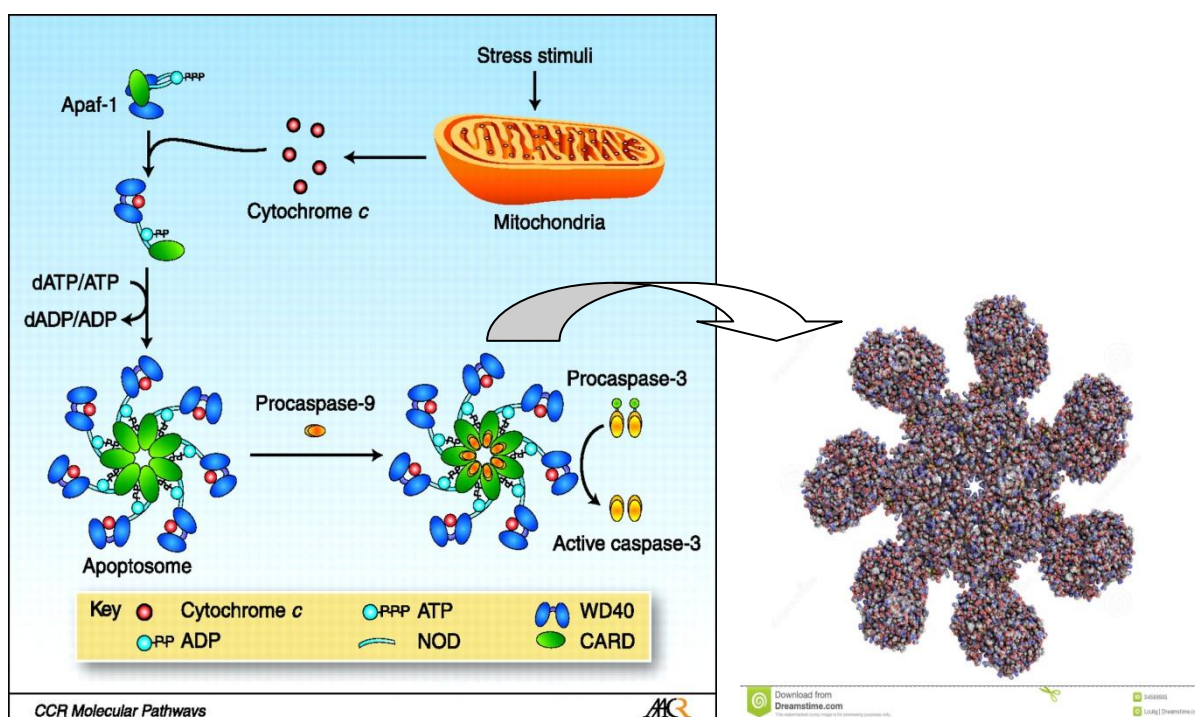
Παράλληλα, διεγείρονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα για το σχηματισμό νέων αγγείων στην περιοχή της βλάβης. Προκειμένου να ολοκληρωθεί η αποκατάσταση της, η IL-

13 και ο TGF- β ενεργοποιούν τους ινοβλάστες για τη σύνθεση εξωκυττάριου στρώματος που θα συμβάλλει στην επούλωση της. Τέλος, τα επιθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και η αναγέννηση του κατεστραμμένου ιστού ολοκληρώνεται (Grande MT, et al, 2010). Όταν οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις είναι χρόνιες, παρατηρείται συνεχής ενεργοποίηση των ινοβλαστών με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη παραγωγή και συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας που οδηγεί τελικά στην δημιουργία της ίνωσης

Τέλος, η αίμη επάγει την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων. Η απόπτωση είναι μια εξελικτικά συντηρημένη κυτταρική λειτουργία, που συναντάται σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Οι κυριότερες μορφολογικές αλλαγές της απόπτωσης περιλαμβάνουν τη συμπύκνωση της χρωματίνης του κυτταρικού πυρήνα, τον κατακερματισμό του πυρηνικού DNA σε θραύσματα διαφορετικών μεγεθών, τη δημιουργία οπών μεγάλης διαμέτρου στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων, την εμφάνιση χαρακτηριστικών προεξοχών (blebbing) στην κυτταρική μεμβράνη και το σχηματισμό φαγοσωμάτων που περιέχουν πυρηνικά και κυτταροπλασματικά υπολείμματα. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης παίζουν οι κασπάσες. Οι κασπάσες συνιστούν μια εξελικτικά συντηρημένη πρωτεϊνική οικογένεια κυτταροπλασματικών πρωτεασών που διακρίνονται από την παρουσία κυστεΐνης στο ενεργό κέντρο τους και την υψηλή συγγένεια σύνδεσης με κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος στα υποστρώματα-στόχους. Οι κασπάσες ανιχνεύονται με τη μορφή πρόδρομων ανενεργών προ-ενζύμων, τα οποία μετατρέπονται σε καταλυτικά ενεργές κασπάσες. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης οι ενεργοποιημένες κασπάσες πρωτεολύουν και απενεργοποιούν λειτουργικά ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών υποστρωμάτων με αποτέλεσμα την κατάργηση της διακυτταρικής επικοινωνίας, την αποδιοργάνωση του κυτταρικού σκελετού, την παρεμπόδιση της αντιγραφής και επιδιόρθωσης του πυρηνικού DNA και τον κατακερματισμό του πυρηνικού DNA.

Η έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας πραγματοποιείται με την εκλεκτική σύνδεση του παράγοντα TNF ή του παράγοντα FASL στον υποδοχέα TNFR ή FAS αντίστοιχα. Η σύνδεση αυτή οδηγεί στη διαδοχική σύνδεση της πρόδρομης μορφής της κασπάσης 8 στο σύμπλεγμα του υποδοχέα. Η στρατολόγηση της προ-κασπάσης 8 στο σύμπλεγμα του ενεργοποιημένου TNFR ή FAS προκαλεί την πρωτεόλυση αυτής σε ενεργό κασπάση 8. Η ενεργός κασπάση 8 απελευθερώνεται από το σύμπλοκο του υποδοχέα και μετακινείται στο κυτοσόλιο, όπου αναγνωρίζει και πρωτεολύει τα υποστρώματα-στόχους της, όπως την προ-κασπάση 3 και την προαποπτωτική πρωτεΐνη Bid. Η ενεργοποιημένη κασπάση 8 δημιουργεί το ενεργό καρβοξυτελικό θραύσμα tBid, το οποίο μετακινείται στα μιτοχόνδρια. Η ενσωμάτωση του tBid στις εξωτερικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων προκαλεί τη μετακίνηση του κυτοχρώματος C από το μεσομεμβρανικό μιτοχονδριακό χώρο στο κυτοσόλιο. Το

κυτόχρωμα C συνδέεται με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Araf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) και προκαλεί αλλαγές στη χωροταξική διαμόρφωσή της με αποτέλεσμα να αποκαλύπτονται θέσεις δέσμευσης με την πρόδρομη μορφή της κασπάσης 9. Το σύμπλεγμα κυτόχρωμα C/Araf-1/κασπάση 9 συγκροτεί το «αποπτώσωμα» (apoptosome), το οποίο επάγει την πρωτεολυτική ενεργότητα της προ-κασπάσης-9. Με αυτό τον τρόπο η προ-κασπάση-9 μετατρέπεται στην ενεργό κασπάση-9. Στη συνέχεια αυτή αναγνωρίζει και πρωτεολύει εκλεκτικά την προ-κασπάση 3 σε ενεργό κασπάση-3. Η ενεργοποιημένη κασπάση 3 πρωτεολύει ένα μεγάλο αριθμό ενδοκυτταρικών υποστρωμάτων-στόχων προκαλώντας τελικά τον αποπτωτικό θάνατο (Λ.Χ Μαργαρίτης και συνεργάτες).



Εικόνα 3.14: Το κυτόχρωμα C επάγει το σχηματισμό του «αποπτωσώματος» και ενεργοποιεί το μονοπάτι των κασπασών. Σε κατάσταση stress, όπως καταστροφή του DNA, το κυτόχρωμα C απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα και δεσμεύεται στην κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Araf-1, γεγονός που αποτελεί την έναρξη της διαδικασίας συγκρότησης του «αποπτωσώματος». (Από: Elizabeth C. Ledgerwood and Ian M. Morison, 2009).

Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν πιο πάνω, η ενδοαγγειακή αιμόλυση που παρατηρείται σε ΠΝΑ ασθενείς μπορεί να οδηγήσει σε: (1) οξεία νεφρική βλάβη προκαλώντας οξεία σωληναριακή νέκρωση και (2) χρόνια νεφρική βλάβη ως αποτέλεσμα της συνεχούς εναπόθεσης σιδήρου στους νεφρούς. Τυπικό ιστολογικό εύρημα στους νεφρούς αποτελεί το ποσό αιμοσιδηρίνης που ανιχνεύεται στα επιθηλιακά κύτταρα των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων του νεφρικού φλοιού, ενώ η εξέταση εκλογής με την οποία αποδεικνύεται η νεφρική συμμετοχή στην ΠΝΑ είναι η μαγνητική τομογραφία (MRI).

Περίληψη

Η Νυκτερινή Παροξυντική Αιμοσφαιρινουρία (Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria) ή νόσος των Marchiafava-Micheli αποτελεί μια επίκτητη κλωνική διαταραχή του πολυδύναμου αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, η οποία συνδέεται με το X χρωμόσωμα και οφείλεται σε μία ή περισσότερες σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου PIG-A. Οι μεταλλάξεις αναστέλλουν τη σύνθεση της γλυκοσυλφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (GPI), που χρησιμεύει ως «άγκυρα» για την πρόσδεση στην κυτταρική μεμβράνη αρκετών πρωτεϊνών. Το αποτέλεσμα των μεταλλάξεων είναι η μείωση ή η εξαφάνιση των πρωτεϊνών GPI. Τα μόρια CD55 και CD59 αποτελούν πρωτεΐνες που προσδένονται στη μεμβράνη μέσω της GPI-άγκυρας και συμμετέχουν στη ρύθμιση του συμπληρώματος. Η απουσία τους από την επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην ΠΝΑ ευθύνεται για την ενδαγγειακή αιμόλυση που αποτελεί κλασικό χαρακτηριστικό της νόσου. Κατά την ενδαγγειακή αιμόλυση, τα ερυθρά αιμοσφαίρια που έχουν υποστεί μεμβρανική βλάβη, λόγω επίθεσης του συμπληρώματος, καταστρέφονται με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται στο πλάσμα η αιμοσφαιρίνη τους. Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη διμερίζεται και συνδέεται με πρωτεΐνες όπως η αιποσφαιρίνη, η αιμοπηξίνη και η αλβουμίνη ώστε ο οργανισμός να προστατευθεί από την τοξική δράση της αιμοσφαιρίνης και της αίμης. Σε έντονη αιμόλυση όμως, η δεσμευτική ικανότητα της αιποσφαιρίνης, της αιμοπηξίνης και της αλβουμίνης υπερκεράται με αποτέλεσμα η αιμοσφαιρίνη και η αίμη να φιλτράρονται από τους νεφρούς. Οι νεφροί έχουν την ικανότητα να επαναρροφούν το μεγαλύτερο μέρος του πειραματικού διηθήματος. Η επαναρρόφηση της αιμοσφαιρίνης, προκαλεί βλάβη στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα με τους εξής μηχανισμούς: α) επάγει το οξειδωτικό στρες, β) επάγει την απόπτωσή τους, μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού των κασπασών, γ) προκαλεί φλεγμονή μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB και δ) οδηγεί στην εμφάνιση νεφρικής ίνωσης όταν οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις είναι χρόνιες. Η νεφρική βλάβη στην παροξυντική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία (ΠΝΑ) ποικίλλει από αναστρέψιμη οξεία δυσλειτουργία έως και χρόνια μη αναστρέψιμη βλάβη. Ως αποτέλεσμα της απελευθέρωσης της αίμης, λόγω ενδοαγγειακής αιμόλυσης εμφανίζεται οξεία νεφρική βλάβη, ενώ εξαιτίας της μειωμένης νεφρικής ροής του αίματος, της εμφάνισης μικρο-έμφρακτων και της διάμεσης ίνωσης δημιουργείται χρόνια νεφρική δυσλειτουργία. Στις περισσότερες περιπτώσεις η βλάβη αποτελεί την αιτία θανάτου στο 8 ως 18% των ασθενών με ΠΝΑ.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbasi A, Verma S and Kaplan JM. Anemia of Chronic Kidney Disease. *Austin J Clin Med*. 2014;1(2): 1006.

Amy E. DeZern, MD, MHSa, and Robert A. Brodsky, MD^b Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: A Complement-Mediated Hemolytic Anemia ^aDivision Hematol Oncol Clin North Am. 2015 June ; 29(3): 479–494. doi:10.1016/j.hoc.2015.01.005.

Astori C, Bonfichi M, Pagnucco G, Bernasconi P, Lazzarino M, Orlandi E, et al. Treatment with recombinant human erythropoietin (rHuEpo) in a patient with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: evaluation of membrane proteins CD55 and CD59 with cytofluorometric assay. *Br J Haematol*, 1997, 97: 586-588.

Baugé C, et al, NFκappaB mediates IL-1β-induced down-regulation of TβetaRII through the modulation of Sp3 expression. *J Cell Mol Med*. 2008, 12: 1754-1766.

BELLOMO R, RONCO C, KELLUM JA, MEHTA RL, PALEVSKY P; ACUTE DIALYSIS QUALITY INITIATIVE WORKGROUP. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: The Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004, 8:R204–R212.

Berangere Devalet, Francois Mullier, Bernard Chatelain, Jean-Michel Dogne, Christian Chatelain. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review *European Journal of Haematology* 95 (190–198).

Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, Nelson KL, Chiurazzi PL, Buckley JT, et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol* 2000, 114: 459-466.

Brodsky RA. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2009, 113: 6522-6527.

Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2014;124:2804-2811.

Carroll, M. C. & Prodeus, A. P. (1998). Linkages of innate and adaptive immunity. *Current Opinions in Immunology* 10, 36–0.

Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: Synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F562–F573, 2001.

Christiane Viedt and Stephan R. Orth. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the kidney: does it more than simply attract monocytes? *Nephrol Dial Transplant* (2002) 17: 2043–2047.

Claire, M., Holland, H. & Lambris J.D.(2002). Complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology* 12, 399-420.

Claudia Yuste, Eduardo Gutierrez, Angel Manuel Sevillano, Alfonso Rubio-Navarro, Juan Manuel Amaro-Villalobos, Alberto Ortiz, Jesus Egido, Manuel Praga, Juan Antonio Moreno. Pathogenesis of glomerular haematuria. *World J Nephrol* 2015 May 6; 4(2): 185-195.

Dacie JV, Lewis SM. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: clinical manifestations, haematology and nature of disease. *Ser Haematol* 1972, 5: 3-23.

Davies A, Simmons DL, Hale G, Harrison RA, Tighe H, Lachmann PJ, et al. CD59, a Ly-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J Exp Med* 1989, 170: 637-654.

D. E. Nelson, A. E. C. Ihekweaba, M. Elliott, J. R. Johnson, C. A. Gibney, B. E. Foreman, G. Nelson, V. See, C. A. Horton, D. G. Spiller, S. W. Edwards, H. P. McDowell, J. F. Unitt, E. Sullivan, R. Grimley, N. Benson, D. Broomhead, D. B. Kell, M. R. H. White. Oscillations in NF- κ B Signaling Control the Dynamics of Gene Expression. *Science* 306, 704 (2004).

Devine DV, Gluck WL, Rosse WF, Weinberg JB. Acute myeloblastic leukemia in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Evidence of evolution from the abnormal paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone. *J Clin Invest* 1987, 79: 314-317 (a)

Devine DV, Siegel RS, Rosse WF. Interactions of the platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with complement. Relationship to defects in the regulation of complement and to platelet survival in vivo. *J Clin Invest* 1987, 79: 131-137 (b).

Dunn DE, Nagarajan S, Devetten M, Weichold FF, Medof ME, Young NS, et al. The knock-out model of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Pig-a(-) hematopoiesis is reconstituted following intercellular transfer of GPI-anchored proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 7938-7943.

E.R. Podack . Molecular mechanisms of cytolysis by complement and cytolytic lymphocytes. J. Cell. Biochem. 30, 133–170 (1986).

Ε. Γιαννακοπούλου. Οξειδωτικό stress – αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί Κλινική σημασία. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 2009, 26(1):23-35.

Elizabeth C. Ledgerwood and Ian M. Morison. Targeting the Apoptosome for Cancer Therapy. Clin Cancer Res 2009;15(2) January 15, 2009.

Fahri Sahin, Melda Comert Ozkan, Nihal Gokmen Mete, Mumtaz Yilmaz, Nevin Oruc, Alev Gurgun, Meral Kayikcioglu, Ayse Guler, Figen Gokcay, Ferda Bilgir, Cengiz Ceylan, Oktay Bilgir, Ismail Hakan Sari, Guray Saydam, Multidisciplinary clinical management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria Am J Blood Res 2015;5(1):1-9.

Fernandez-del Palacio MJ (2014) CKD Risk Factors. Available at: <http://www.iriskidney.com/education/risk-factors.shtml> (accessed 26 November 2014)

Foley JH. Examining coagulation-complement crosstalk: complement activation and thrombosis. Thromb Res 2016;141 Suppl 2:S50-54.

Forsberg UH, Bazil V, Stefanová I, Schröder J. Gene for human CD59 (likely Ly-6 homologue) is located on the short arm of chromosome 11. Immunogenetics 1989, 30: 188-193.

Fraiman YS, Cuka N, Batista D, Vuica-Ross M, Moliterno AR. Development of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in CARL-positive myeloproliferative neoplasm. J Blood Med 2016;7:107-110.

Francisco Veas. Acute Phase Proteins-Regulation and Functions of Acute Phase Proteins. 2011.

Fujita T. (2002). Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. Nature Reviews Immunology.2, 346-53.

Gargiulo L, Papaioannou M, Sica M, Tallini G, Chaidos A, Richichi B et al. Glycosylphosphatidylinositol-specific, CD1d-restricted T cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood 2013;121:2753-2761.

Gavriilaki E, Thanassi J, Yang G, Yuan X, Huang M, Brodsky RA. Small molecule factor D inhibitors block complement activation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2015 126:275.

Grande MT, et al, Role of inflammation in túbulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy. *J Inflamm (Lond)*. 2010, 22: 7-19.

Gramont A de. Hemoglobinurie paroxystique nocturne. Etude clinique et biologique de 142 patients. These Med, Paris, 1982.

Γ.Χ. Μελέτης, Α. Σαραντόπουλος, Ι.Β. Ασημακόπουλος, Ε. Τέρπος. Κλινική εικόνα, διάγνωση και αντιμετώπιση της νυκτερινής παροξυστικής αιμοσφαιρινουρίας. *Αρχεία ελληνικής ιατρικής* 2009, 26(4):454-478.

Hall C, Richards S, Hillmen R. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2003, 102: 3587-3591.

Hara T, Kojima A, Fukuda H, Masaoka T, Fukumori Y, Matsumoto M, et al. Levels of complement regulatory proteins, CD35 (CR1), CD46 (MCP) and CD55 (DAF) in human haematological malignancies. *Br J Haematol* 1992, 82: 368-372.

Hartmann RC, Jenkins DE, McKee LV, Heyssel RM. Clinical and laboratory studies relating to iron metabolism and therapy with androgen and iron. *Medicine* 1966, 45:331-363.

Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzato L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995, 333: 1253-1258 (b).

Hillmen P, Elebute M, Kelly R, et al. Long-term effect of the complement inhibitor eculizumab on kidney function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 2010;85:553-9.

Hobart, M. J., Fernie, B. A. & DiScipio, R. G. (1995). Structure of the human C7 gene and comparison with C6, C8A, C8B, and C9 genes. *Journal of Immunology* 154, 5188-94.

Humphries J: Anemia of renal failure – Use of Erythropoietin. *Med Clin North America*, 76: 711-724, (1992).

Hussain S, Qureshi A, Kazi J. Renal involvement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nephron Clin Pract* 2013; 123: 28-35.

I.B. Ασημακόπουλος, Λ. Παπαγεωργίου, Ο. Καμπουροπούλου, Μ. Σαμάρκος, Ε. Πλάτα, Ε. Βαριάμη, Θ.Π. Βασιλακόπουλος, Π. Τσαφταρίδης, Μ.Κ. Αγγελοπούλου, Κ. Κωνσταντόπουλος, Ε. Τέρπος, Γ. Μελέτης Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία Από τη μοριακή βλάβη και το βιοχημικό έλλειμμα στην κλινική της έκφραση ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2015, 32(4):391-421

JAKUB GBUREK, PIERRE J. VERROUST, THOMAS E. WILLNOW, JOHN C. FYFE, WOJCIECH NOWACKI, CHRISTIAN JACOBSEN, SØREN K. MOESTRUP, and ERIK I. CHRISTENSEN. Megalin and Cubilin are Endocytic Receptors Involved in Renal Clearance of Hemoglobin. *Am Soc Nephrol* 13: 423–430, 2002.

John W. Denninger, Michael A. Marletta. Guanylate cyclase and the cNO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411 (1999) 334-350.

Jorg Schubert, Alexander Roth. Update on paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: on the long way to understand the principles of the disease , *European Journal of Haematology* 94 (464–473).

Jozef Dulak, Jessy Deshane, Alicja Jozkowicz, Anupam Agarwal. Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in Vascular Pathobiology Focus on Angiogenesis. *Circulation* January 15, 2008.

Juan Antonio Moreno, Claudia Yuste, Eduardo Gutiérrez, Ángel M. Sevillano, Alfonso Rubio-Navarro, Juan Manuel Amaro-Villalobos, Manuel Praga, Jesús Egido. Haematuria as a risk factor for chronic kidney disease progression in glomerular diseases: A review. *Pediatr Nephrol*, 2015, DOI 10.1007/s00467-015-3119-1

KAMITANI T, MENON AK, HALLAQ Y, WARREN CD, YEH ET. Complexity of ethanolamine phosphate addition in the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in mammalian cells. *J Biol Chem* 1992, 267:24611–24619.

Karadimitris A, Luzzatto L., The cellular pathogenesis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. , *Leukemia*. 2001 Aug;15(8):1148-52.

KARL A. NATH, GREGORY M. VERCELLOTTI, JOSEPH P. GRANDE, HIROKO MIYOSHI, CARLOS V. PAYA, J. CARLOS MANIVEL, JILL J. HAGGARD, ANTHONY J. CROATT, WILLIAM D. PAYNE, and JAWED ALAM. Heme protein-induced chronic renal inflammation: Suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney International*, Vol. 59 (2001), pp. 106–117.

KARL A. NATH, JOSEPH P. GRANDE, ANTHONY J. CROATT, SCOTT LIKELY, ROBERT P. HEBBEL, and HELEN ENRIGHT. Intracellular targets in heme protein-induced renal injury. *Kidney International*, Vol. 53 (1998), pp. 100–111.

Kathryn Doig. Introduction to increased destruction of erythrocytes. *Rodak's Hematology: Clinical principles and applications*. Elsevier Saunders, 2016, fifth edition.

Kinoshita T, Medof ME, Nussenzweig V. Endogenous association of decay-accelerating factor (DAF) with C4b and C3b on cell membranes. *J Immunol* 1986, 136: 3390-3395.

Kinoshita T, Inoue N. Dissecting and manipulation the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 2006, 4:1233–1243.

Κοκόρη Σ., Καλαντζής Δ., Γρουζή Ε. Παροξυσμική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία. *Αίμα* 2016;7(4):38-46.

Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K., and Moestrup, S.K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409, 198-201.

Λ.Χ. Μαργαρίτης, Β.Κ. Γαλανόπουλος, Κ.Ε. Κεραμάρης, Ε.Σ. Μαρίνος, Ι.Σ. Παπασιδέρη, Δ.Ι. Στραβοπόδης, Ι.Π. Τρουγκάκος. *Βιολογία Κυττάρου. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας*, 2004, τέταρτη έκδοση.

Lee GR. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*, ninth edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 1993: 1232-1244.

Leonard G. Fold, M.D., Ph.D., James E. Springate, M.D., and Robert D. Fildes, M.D., 1986 Acute renal failure. and diagnosis I. *Pathophysiology*.

Loos, M. (1985). The complement system: activation and control. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 121, 7-18.

Louise Bird , David Walker *Pathophysiology of chronic kidney disease. Companion animal* January 2015, Volume 20 No 1.

Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology and function. *Ann Rev Immunol* 1989, 7: 35-58.

Luzzatto L, Jaja K. Genetics of PNH. In: Young NS, Moss J (eds) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the GPI-linked proteins. Academic Press, New York, 2000:21–47

Luzzatto L. Recent advances in the pathogenesis and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. F1000Res. 2016;23;1-5.

Luzzatto L, Nafa K. Genetics of PNH. In: Young NS, Moss J (eds). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins. Academic Press, San Diego, 2000: 21-47.

Marnette LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. Mutation Research 424 (1999). 83–95.

Mastellos, D. & Lambris, J.D (2002). Complement : more than a “guard” against invading pathogens? Trends in Immunology, 23(10), 485- 91.

Μελέτης Γ, Σαραντόπουλος Α, Ασημακόπουλος ΙΒ, Τέρπος Ε. Παθογενετικοί και παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί για την εμφάνιση της νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας. Αρχ Ελλ Ιατρ 2009, 26:206–229.

Meletis J, Michali E, Samarkos M, Konstantopoulos K, Meletis C, Terpos E, et al. Detection of “PNH red cell” populations in hematological disorders using the sephacryl gel test micro typing system. Leuk Lymphoma 1997, 28: 177-182.

Meletis J, Michali E, Samarkos M, Konstantopoulos K, Meletis C, Terpos E et al . Detection of “PNH red cell” populations in hematological disorders using the sephacryl gel test microtyping system. Leuk Lymphoma 1998, 28:177–182.

Meletis J, Terpos E. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: clinical presentation and association with other haematological disorders. Haema 2001, 4: 79-88.

Meletis John, Evangelos Terpos, Recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria Med Sci Monit, 2003; 9(7): RA161-172.

Μελέτης Γ, Αιμολυτικές αναιμίες, 2003.

MEHTA RL, KELLUM JA, SHAH SV, MOLITORIS BA, RONCO C, WARNOCK DG ET AL. Acute kidney injury network: Report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. Crit Care 2007, 11:R31.

Michal J. Tracz, Jawed Alam, and Karl A. Nath. Physiology and Pathophysiology of Heme: Implications for Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 18: 414–420, 2007. doi: 10.1681/ASN.2006080894.

Miyajima A, Kosaka T, Seta K, Asano T, Umezawa K, Hayakawa M. Novel nuclear factor kappa B activation inhibitor prevents inflammatory injury in unilateral ureteral obstruction. *J Urol*. 2003 Apr;169(4):1559-63.

Mollnes, T.E., Song W.C. & Lambris J.D. (2002). Complement in inflammatory tissue damage and disease. *Trend in Immunology*, 23 (2), 61-64.

Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol* 2004, 126: 133-138.

Mundel P1, Kriz W. *Anat Embryol (Berl)*. 1995 Nov;192(5):385-97. Structure and function of podocytes: an update.

Nagarajan S, Brodsky RA, Young NS, Medof ME. Genetic defects underlying paroxysmal nocturnal hemoglobinuria that arises out of aplastic anemia. *Blood* 1995, 86: 4656-4661.

Nakakuma H, Nagakura S, Kawaguchi T, Horikawa K, Iwamoto N, Kagimoto T, et al. Markedly high plasma erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor levels in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Hematol* 1997, 66: 451-457.

Narisada M., Kawamoto S., Kuwamoto K., Moriwaki K., Nakagawa T., Matsumoto H., Asahi M., Koyama N., and Miyoshi E. (2008). Identification of an inducible factor secreted by pancreatic cancer cell lines that stimulates the production of fucosylated haptoglobin in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 792-796.

Nielsen, M.J., and Moestrup, S.K. (2009). Receptor targeting of hemoglobin mediated by the haptoglobins: roles beyond heme scavenging. *Blood* 114, 764-771.

Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE, Shichishima T, Nakakuma H, Ninomiya H, et al. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine* 2004, 83: 193-207.

Notaro R, Gargiulo L, De Angioletti M, Rondelli T, Sica M. Recent advances in pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *DCTH* 2015;5: 53-64.

Oliviero, S., and Cortese, R. (1989). The human haptoglobin gene promoter: interleukin-6- responsive elements interact with a DNA-binding protein induced by interleukin-6. *The EMBO journal* 8, 1145-1151.

Πάγκαλης Α. Γεράσιμος. Αιματολογία στην κλινική πράξη. 2008 Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης ΕΠΕ Γ' Ανατύπωση.

Papanikolaou, G., and Pantopoulos, K. (2005). Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 202, 199-211.

Parker CJ. Historical aspects of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: "Defining the disease". *Br J Haematol* 2002, 117:3–22.

Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R et al . Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005, 106:3699–3709.

Parker MW, van der Goot FG, Buckley JT. Aerolysin--The ins and outs of a model channel-forming toxin. *Mol Microbiol* 1996, 19: 205-212.

Peiffault de Latour R, Amoura Z, Socié G. L' hemoglobinurie paroxystique nocturne. *Rev Med Interne* 2010, 31: 200-207.

Polvin DJ (2010) Chronic kidney disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC (2010) *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Saunders Elsevier, St. Louis, MO: 1990–2021.

Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 1998.

Ponka P. Cellular iron metabolism. *Kidney International*, Vol. 55. Suppl. 69 (1999), pp. S-2-S-11.

Post TW, Arce MA, Liszewski MK, Thomson ES, Atkinson JP, Lublin DM. Structure of the gene for human complement protein decay accelerating factor. *J Immunol* 1990, 144: 740-744.

Poulsom R, Little MH. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Feb;20(2):231-3. doi: 10.1681/ASN.2008121279. Epub 2009 Jan 28. Parietal epithelial cells regenerate podocytes.

Pramoonjago P, Pakdeesuwan K, Siripanyaphinyo U, Chinprasertsuk S, Kinoshita T, Wanachiwanawin W. Genotypic, immunophenotypic and clinical features of Thai

patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol.* 1999, 105: 497-504.

Quentin Milner MB ChB FRCA, 2003 Pathophysiology of chronic renal failure. *British journal of anaesthesia.* CEPD Reviews. Volume 3 Number 5 2003.

R. A. Zager and C. A. Foerder. Effects of Inorganic Iron and Myoglobin on In Vitro Proximal Tubular Lipid Peroxidation and Cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* Volume 89, March 1992, 989-995.

Rachidi S, Musallam KM, Taher AT. A closer look at paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Eur J Intern Med* 2010; 21: 260-267.

Raffaella Gozzelino and Miguel P. Soares. Coupling Heme and Iron Metabolism via Ferritin H Chain. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING.* Volume 20, Number 11, 2014.

Reynolds BS, Lefebvre HP (2013) Feline CKD Pathophysiology and risk factors – what do we know? *J Feline Med Surg* 15(Suppl 1): 3–14. doi:10.1177/1098612X13495234.

Richards SJ, Rawston AC, Hillmen P. Application of flow cytometry to diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry* 2000, 42:223–233.

Richard Goldsby, Thomas Kindt, Barbara Osborne, Janis Kubly. Ανοσολογία. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2007, 5^η έκδοση.

Rikke Nielsen, Erik Ilsø Christensen and Henrik Birn. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney International* (2016) 89, 58–67.

Risitano AM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Silverberg DS, editor, *Anemia.* Rijeka, Croatia: In Tech 2012;331-374.

Risitano AM, Marotta S. Therapeutic complement inhibition in complement-mediated hemolytic anemias: Past, present and future. *Semin Immunol* 2016;28:223-240.

Risitano AM, Notaro R, Pascariello C, Sica M, del Vecchio L, Horvath CJ, et al. The complement receptor 2/factor H fusion protein TT30 protects paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes from complement-mediated hemolysis and C3 fragment. *Blood* 2012;119:6307-6316.

Russell P. Rother, PhD , Leonard Bell, MD, Peter Hillmen, MB, PhD, Mark T. Gladwin, The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin. A Novel Mechanism of Human Disease MD, JAMA, April 6, 2005—Vol 293, No. 13.

Robert A. Brodsky, Galina L. Mukhina, Shiyong Li, Kim L. Nelson, Patricia L. Chiurazzi, J. Thomas Buckley and Michael J. Borowitz. Improved Detection and Characterization of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Using Fluorescent Aerolysin , Am J Clin Pathol. 2000 Sep; 114(3): 459–466.

Rosse WF, Ware RE. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood 1995, 86:3277–3286.

Rother RP, Rollins SA, Mennone J, Chodera A, Fidel SA, Bessler M, et al. Expression of recombinant transmembrane CD59 in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria B cells confers resistance to human complement. Blood 1994, 84: 2604-2611.

Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma haemoglobin. A novel mechanism of human disease. JAMA. 2005 Apr 6;293(13):1653-62.

Rotoli B, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Semin Hematol. 1989, 26: 201-207 (b).

Sahu, A. & Lambris, J. D. (2001). Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. Immunological Reviews 180, 35–8.

S. Hussain a A. Qureshi a J. Kazi b Renal Involvement in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Nephron Clin Pract 2013;123:28–35.

S. N. Heyman and M. Brezis. Acute renal failure in glomerular bleeding: a puzzling phenomenon. Nephrol Dial Transplant 1995.

S. Savage Kidney International (1994) 45, 314–319; doi:10.1038/ki.1994.40 The biology of the glomerulus: Endothelial cells.

Schmidt CQ, Harder MJ, Nichols EM, Hebecker M, Anliker M, Hochsmann B, et al. Selectivity of C3-opsonin targeted complement inhibitors: A distinct advantage in the protection of erythrocytes from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients. Immunobiology 2016;221:503-511.

Schubert J, Alvarado M, Uciechowski P, Zielinska-Sko wronek M, Fre und M, Vogt H. Diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using immunophenotyping of peripheral blood cells. *Br J Haematol* 1991, 79:487–492.

Schubert J, Roth A. Update on paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: on the long way to understand the principles of the disease. *European Journal of Haematology* 94 (464–473).

Schlöndorff D. *Kidney Int.* 1996 Jun;49(6):1583-5. Roles of the mesangium in glomerular function.

Simmons DL, Tan S, Tenen DG, Nicholson-Weller A, Seed B. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 1989, 73: 284-289.

Sims PJ, Wiedmer T. Induction of cellular procoagulant activity by the membrane attack complex of complement. *Semin Cell Biol* 1995, 6:275–282.

Stein H. Jay, Hutton J. John, Kohler O. Peter, O' Rourke A. Robert, Reynolds Y Herbert, Samuels A. Martin, Sande A. Merle, Trier S. Jerry, Zvaifler J. Nathan. *Παθολογία*. 1998 Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη.

Sun X, Funk CD, Deng C, Sahu A, Lambris JD, Song WC. Role of decay-accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocyte surface as revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96: 628-633.

Tabarra IA. Hemolytic anemias in: *Diagnosis and management*, *Med Clin North America* 1992.

Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, Iida Y, Endo Y, Fujita T et al . Deficiency of GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993, 73:703–711.

Tolosano, E., Fagoonee, S., Morello, N., Vinchi, F., and Fiorito, V. (2010). Heme scavenging and the other facets of hemopexin. *Antioxid Redox Signal* 12, 305-320.

Tominaga R, Katagiri T, Kataoka K, Wee RK, Maeda A et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria induced by the occurrence of BCR-ABL in a PIGA mutant hematopoietic progenitor cell. *Leukemia* 2016;30:1208-1210.

Tolulase Olutogun, Ilaria Cutini, Rosario Notaro, Lucio Luzzatto. Complement-mediated haemolysis and the role of blood transfusion in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Blood Transfus* 2015; 13; 363-9 DOI 10.2450/2015.0249-14.

Tseng JE, Hall SE, Howard TA, Ware RE. Phenotypic and functional analysis of lymphocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 1995, 50: 244-253.

Udenfriend S, Micanovic R, Kodukula K. Structural requirements of a nascent protein for processing to a PI-G anchored form: studies in intact cells and cell-free systems. *Cell Biol Int Rep* 1991, 15: 739-759.

Urakaze M, Kamitani T, De Gasperi R, Sugiyama E, Chang HM, Warren CD et al. Identification of a missing link in glycosyl phosphatidylinositol-anchor in mammalian cells. *J Biol Chem* 1992, 267:6459–6452.

Vander, Sherman, Luciano, M. Τσακόπουλος. Φυσιολογία του ανθρώπου. Μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2001, 8^η έκδοση.

Watanabe R, Ohishi K, Maeda Y, Nakamura N, Kinoshita T. Mammalian PIG-L and its yeast homologue Gpi12p are N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-N-acetylases essential in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Biochem J* 1999, 339: 185-192.

Weitz I. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: new concepts in pathophysiology and treatment. *Orphan Drugs: Research and Reviews* 2015;575-581.

Willoughby Lathem. The renal excretion of hemoglobin: Regulatory mechanisms and the differential excretion of free and protein-bound hemoglobin. From the Department of Medicine, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pa. Submitted for publication October 27, 1958; accepted December 5, 1958.

Wong EK, Kavanagh D. Anticomplement C5 therapy with eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and atypical hemolytic uremic syndrome. *Transl Res*. 2015; 165: 306-320.

Yamashina M, Ueda E, Kinoshita T, Takami T, Ojima A, Ono H, et al. Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1990, 323: 1184-1189.

