**ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΠΡΟΤΑΣΗΣ**

**Επιστημονική Περιοχή:** Εργαστηριακή Αιματολογία

**Λέξεις Κλειδιά:** Αιμόσταση, εξωκυττάρια κυστίδια (EVs ή ΕΚ), ερυθροκύτταρα, νεφρική ανεπάρκεια

**Πανεπιστήμιο/Τμήμα/Τομέας/Εργαστήριο:** Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία (HemQcR)

Γλώσσα: Ελληνική

|  |
| --- |
| **ΤΙΤΛΟΣ ΠΡΟΤΙΝΟΜΕΝΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:** Εξωκυττάρια κυστίδια πλάσματος σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια: Γενεσιουργοί παράγοντες και κλινικές συσχετίσεις με έμφαση στην αιμόσταση |
| **Α. Αναλυτική περιγραφή ερευνητικής πρότασης** |
| **Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια και αναιμία** Η Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια (ΧΝΑ) τελικού σταδίου είναι η σχεδόν ολική απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των νεφρών οι οποίοι έχουν ως κύριο ρόλο την απομάκρυνση των παραπροϊόντων του μεταβολισμού και της περίσσειας νερού από τον οργανισμό. Στην Ελλάδα περίπου 10-11.000 άτομα πάσχουν από χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου και υποβάλλονται σε θεραπεία αιμοκάθαρσης. Η αναιμία αποτελεί το κύριο αιματολογικό σύμπτωμα στη Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια τελικού σταδίου και επηρεάζει τόσο την ποιότητα όσο και το προσδόκιμο ζωής των ασθενών. Εμφανίζεται από τα αρχικά στάδια της νεφρικής ανεπάρκειας, και παρουσιάζει σταδιακή επιδείνωση καθώς η νόσος εξελίσσεται σε επόμενα στάδια ([1](#_ENREF_1)). Προκαλείται από ένα συνδυασμό παραγόντων όπως η μειωμένη παραγωγή ερυθροποιητίνης από τους νεφρούς, η χρόνια φλεγμονή, η ανεπάρκεια σιδήρου αλλά και η μειωμένη διάρκεια ζωής (πρόωρη γήρανση) των ερυθροκυττάρων της κυκλοφορίας λόγω συσσώρευσης βλαβών ([2](#_ENREF_2)). Η αποτελεσματική αντιμετώπισή της αποτελεί μείζον θέμα λόγω της σημαντικής επιβάρυνσης που επιφέρει στην ποιότητα ζωής των ασθενών και των οικογενειών τους αλλά και λόγω της μεγάλης οικονομικής επιβάρυνσης που έχει η θεραπεία της στην κοινωνική ασφάλιση. Η βελτιστοποίηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης βελτιώνει σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών, μειώνει τις ανάγκες για νοσηλεία και τα ποσοστά θνησιμότητας ([3](#_ENREF_3)).Η σταδιακή συσσώρευση των παραπροϊόντων του μεταβολισμού, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες απομακρύνονται από τους νεφρούς, χαρακτηρίζεται ως ουραιμικό σύνδρομο και τα συστατικά που το προκαλούν είναι γνωστά ως *ουραιμικές τοξίνες*. Το ουραιμικό πλάσμα αποτελεί ένα «εχθρικό» περιβάλλον για τα κύτταρα καθώς αποτελεί ένα μείγμα βλαβερών ουσιών, φλεγμονωδών και οξειδωτικών μορίων και άλλων βιοδραστικών ουσιών (π.χ. εξωκυτταρικά κυστίδια), σε συγκεντρώσεις οι οποίες εξαρτώνται από το βαθμό της νεφρικής ανεπάρκειας και τη συχνότητα και αποτελεσματικότητα της αιμοκάθαρσης. Οι ουραιμικές τοξίνες επιδρούν ποικιλοτρόπως στα ερυθροκύτταρα επιφέροντας δομικές, λειτουργικές και μεταβολικές αλλοιώσεις ([4-7](#_ENREF_4)). Οι παραπάνω μεταβολές δυνητικά μπορούν να προκαλέσουν διαταραχές της αιμόστασης, είναι πολυπαραγοντικές και ενδέχεται να εκδηλώνονται με θρόμβωση ή αιμορραγία.Η κλινική σοβαρότητα της ΧΝΑ οδηγεί στην ανάγκη για αιμοκάθαρση (ΑΙΚ), η οποία στοχεύει στην επαναφορά της φυσιολογικής σύστασης του πλάσματος στο αίμα. Παρότι η θεραπεία αυτή συμβάλλει σημαντικά στην απομάκρυνση των μεταβολιτών βελτιώνοντας το περιβάλλον των κυττάρων, ταυτόχρονα προκαλεί και η ίδια μεταβολές μέσω του μηχανικού, μεταβολικού και οξειδωτικού στρες στα οποία εκθέτει τα κύτταρα του αίματος ([6-8](#_ENREF_6)).**Παθολογικές μεταβολές ερυθροκυττάρων και πλάσματος στη Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια** Υπάρχουν πολλές έρευνες οι οποίες καταδεικνύουν τις μεταβολές των ερυθροκυττάρων στη ΧΝΑ σε μορφολογικό, δομικό, λειτουργικό και μεταβολικό επίπεδο. Στο ουραιμικό πλάσμα σημειώνονται αλλαγές στη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, ανεπάρκεια βιταμινών, αυξημένα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών και λιπιδίων, υψηλή ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και αυξημένη συγκέντρωση μικροκυστιδίων. Η ηλικία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η κατάσταση χρόνιας φλεγμονής και η βιολογική ασυμβατότητα των φίλτρων και των διαλυμάτων αιμοκάθαρσης συμβάλουν στην γενικότερη οξειδωτική επιβάρυνση των ασθενών σε επίπεδο οργανισμού. Όσον αφορά στα ερυθροκύτταρα των ασθενών με ΧΝΑ, γενικότερα τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες και μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα. Πιο συγκεκριμένα, έχουν αναφερθεί μεταβολές στην πρωτεϊνική σύσταση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, στην οσμωτική ευθραυστότητα, στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση ελεύθερων ιόντων ασβεστίου και στα επίπεδα εξωτερίκευσης φωσφατιδυλοσερίνης καθώς και μορφολογικές τροποποιήσεις, μεταβολές που στο σύνολό τους πιθανά σχετίζονται με την αναιμία, λόγω πρόωρης απομάκρυνσης ηλικιακά νεαρών ερυθροκυττάρων από την κυκλοφορία ([7](#_ENREF_7)). **Ανθεκτικότητα στην Ερυθροποιητίνη**Η χορήγηση σκευασμάτων που διεγείρουν την ερυθροποίηση (ESAs – Erythropoiesis Stimulating Agents), σε συνδυασμό με τη χορήγηση σιδήρου αποτελούν τον βασικό τρόπο αντιμετώπισης της αναιμίας στους ασθενείς με ΧΝΑ. Τα ESAs ενεργοποιούν τα μονοπάτια ερυθροποίησης μέσω πρόσδεσης στον υποδοχέα της ερυθροποιητίνης των πρόδρομων ερυθροκυττάρων. Παρά, όμως, τη βελτιωτική δράση τους στην αναιμία, οι πολύ υψηλές δόσεις ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ερυθροποιητίνης (rhEpO) στους ασθενείς έχουν συσχετισθεί με υπέρταση και καρδιαγγειακές παθήσεις, φλεγμονή και θρομβώσεις ([9](#_ENREF_9), [10](#_ENREF_10)). Παρότι η πλειονότητα των ασθενών με ΧΝΑ ανταποκρίνεται επαρκώς στη θεραπεία με ESAs, υπάρχει ένα ποσοστό της τάξης του 5-10% που εμφανίζει ανθεκτικότητα (ESA resistance). Ως «ανθεκτικότητα στη θεραπεία με ερυθροποιητίνη» ορίζεται η αδυναμία επίτευξης της αιμοσφαιρίνης αίματος εντός των επιθυμητών ορίων (11-12g/dL), παρά τη χορήγηση φυσιολογικών δόσεων ερυθροποιητίνης (≤300 U/kg/wk για ενδοφλέβια έγχυση ή ≤200 U/kg/wk για υποδόρια έγχυση) ([11](#_ENREF_11)). Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που έχουν σχετιστεί με την ανθεκτικότητα στην ερυθροποιητίνη. Η φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και η ανεπάρκεια σιδήρου θεωρούνται κύριες συνιστώσες ενώ σε μικρότερο βαθμό πιστεύεται ότι συμβάλλουν οι ουραιμικές τοξίνες, η απώλεια αίματος, η έλλειψη βιταμίνης Β12 και φυλλικού οξέος, ο υπερπαραθυρεοειδισμός, η κακή διατροφή, η τοξικότητα από ιόντα αλουμινίου κ.α ([12](#_ENREF_12)).Ως αποτέλεσμα όλων των παραπάνω, οι μη ανταποκρινόμενοι ασθενείς στη θεραπεία με ESAs είναι περισσότερο αναιμικοί. Χαρακτηρίζονται από εντονότερη ανισοκυττάρωση ενώ σύμφωνα με μια μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας ([13](#_ENREF_13)), έχουν βρεθεί σημαντικές διαφορές σε χαρακτηριστικά των ερυθροκυττάρων τους σε σχέση με τους ανταποκρινόμενους, που αφορούν στην πρωτεϊνική σύσταση της μεμβράνης και σε δείκτες κυτταρικής εκκαθάρισης. Πιο συγκεκριμένα, αυτά τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξημένη ευαισθησία στα συστατικά του συμπληρώματος και στην εξωτερίκευση φωσφατιδυλοσερίνης αλλά αυξημένη ανθεκτικότητα στο μηχανικό στρες σε σχέση με τα ερυθροκύτταρα των ανταποκρινόμενων ασθενών. Στο πλάσμα τους παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα αλβουμίνης, αυξημένα επίπεδα δεικτών φλεγμονής, όπως IL-10, IL-6 και CRP ([14](#_ENREF_14)), ενώ η αυξημένη εψιδίνη στον ορό τους σχετίζεται με τη μειωμένη ανταπόκρισή τους στην ερυθροποιητίνη. Επιπλέον, οι μη ανταποκρινόμενοι ασθενείς χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα ερυθροκυτταρικών εξωκυττάριων κυστιδίων στο πλάσμα τους μετά από την αιμοκάθαρση ([13](#_ENREF_13)). **Κυστιδιοποίηση – Καρδιαγγειακά νοσήματα – Διαταραχές αιμόστασης**Η απελευθέρωση εξωκυττάριων κυστιδίων που περιβάλλονται από μεμβράνη είναι μια απόλυτα ελεγχόμενη φυσιολογική διαδικασία ομοιόστασης η οποία όμως πυροδοτείται από πολλά, διαφορετικά στρεσογόνα ερεθίσματα όπως αποπτωτικά σήματα, μηχανικό και οξειδωτικό στρες, κυτταρικές βλάβες ή ενεργοποίηση γενικότερα. Τα εξωκυττάρια κυστίδια αποτελούν βασικούς μεσολαβητές της διακυτταρικής επικοινωνίας η οποία είναι απαραίτητη σε κυτταρικές διαδικασίες όπως οι ανοσολογικές αντιδράσεις, η πήξη και η φλεγμονή. Η φωσφατιδυλοσερίνη (PS), ο ιστικός παράγοντας και μόρια προσκόλλησης είναι κάποια από τα χαρακτηριστικά μόρια που εκτίθενται στην επιφάνεια των κυστιδίων και μέσω των οποίων ενεργοποιούνται αντιδράσεις αιμόστασης ([15](#_ENREF_15)).Παρά τον προστατευτικό εν μέρει ρόλο που έχουν τα μεγαλύτερου μεγέθους ΕΚ ή μικροκυστίδια για τα κύτταρα, απομακρύνοντας ουσίες περιττές ή εν δυνάμει επικίνδυνες για τα κύτταρα, μπορούν να συμβάλλουν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις πυροδοτώντας ή αναστέλλοντας καταστάσεις φλεγμονής και ανοσολογικής απόκρισης. Για παράδειγμα, εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητάς τους σε αιμοσφαιρίνη, συμβάλλουν στη μείωση της διαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου ([16](#_ENREF_16)), ενώ λόγω της παρουσίας PS στην επιφάνειά τους, η οποία δρα καταλυτικά στη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη, παρουσιάζουν αυξημένη θρομβωτική ικανότητα ([17](#_ENREF_17)) και συμβάλλουν σε πολλές καταστάσεις υπερπηκτικότητας ([18](#_ENREF_18)). Επιπλέον, τα ερυθροκυτταρικά εξωκυττάρια κυστίδια είναι πλούσια σε χοληστερόλη, λιπιδικές σχεδίες, μεμβρανικές πρωτεΐνες και οξειδωμένες/αποδιαταγμένες αιμοσφαιρίνες. Έτσι, ο σίδηρος μπορεί να δράσει ως καταλύτης για την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) που προκαλούν βλάβες στους ιστούς και ενεργοποιούν φλεγμονώδεις αντιδράσεις ([19](#_ENREF_19)). Στους ασθενείς με ΧΝΑ, οι ουραιμικές τοξίνες, η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες σε συνδυασμό με τη διαδικασία της ΑΙΚ, αποτελούν παράγοντες οι οποίοι φαίνεται να συμβάλλουν στην απελευθέρωση κυστιδίων στο πλάσμα ([20](#_ENREF_20), [21](#_ENREF_21)), γεγονός το οποίο πιθανά να σχετίζονται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις που αποτελούν τη βασικότερη αιτία θανάτου στους ασθενείς με ΧΝΑ ([22](#_ENREF_22)).Παρότι τα μικροκυστίδια στη ΧΝΑ, ιδιαίτερα εκείνα τα οποία προέρχονται από αιμοπετάλια, έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν χαμηλό προθρομβωτικό δυναμικό σε σχέση με άλλες ασθένειες ([23](#_ENREF_23)), τα υψηλά επίπεδά τους στην κυκλοφορία των ασθενών φαίνεται ότι συμβάλλουν σε ένα βαθμό στα θρομβωτικά επεισόδια ([24](#_ENREF_24)) και την αυξημένη ενεργοποίηση του μηχανισμού της αιμόστασης που παρουσιάζονται στους ασθενείς ([25](#_ENREF_25)).**Κυστιδιοποίηση-Ανθεκτικότητα στην Ερυθροποιητίνη**Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης μελέτης της ερευνητικής μας ομάδας ([13](#_ENREF_13)) για τις επιδράσεις που έχουν οι υψηλές δόσεις ερυθροποιητίνης στα ερυθροκύτταρα και στο πλάσμα ασθενών με ΧΝΑ τελικού σταδίου, φαίνεται να υπάρχει ένας διαφορετικός μηχανισμός κυστιδιοποίησης ανάμεσα στα ερυθροκύτταρα των ανταποκρινόμενων και μη ανταποκρινόμενων ασθενών, ενώ και η διαδικασία της αιμοκάθαρσης φαίνεται επίσης να επιδρά με διαφορετικό τρόπο. Μέσω μελέτης της πρωτεϊνικής σύστασης της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης η οποία υφίσταται αναδιαμόρφωση κατά τη διαδικασία της κυστιδιοποίησης, διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες των ασθενών. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ενός διαφορετικού μηχανισμού κυστιδιοποίησης και στη δημιουργία κυστιδίων διαφορετικού μεγέθους και σύστασης ανάμεσα στις δύο ομάδες των ασθενών ([13](#_ENREF_13)).**Σκοπός του ερευνητικού έργου**Στην παρούσα πρόταση θα μελετηθούν τα μικροκυστίδια πλάσματος από δείγματα ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και θα γίνει προσπάθεια να συσχετιστούν με γενεσιουργούς παράγοντες και κλινικές εκδηλώσεις των ασθενών με έμφαση την αιμόσταση. **Μεθοδολογία του ερευνητικού έργου**1. **Επιλογή Ν=50 ασθενών με ΧΝΑ υπό θεραπεία rhEpO και αιμοκάθαρσης (Ν=30 ασθενείς που ανταποκρίνονται φυσιολογικά σε συνηθισμένες δόσεις rhEpO, N=20 ασθενείς με ανθεκτικότητα στην rhEpO) και Ν=20 υγιών δοτών (μάρτυρες).**

• Επιλογή ασθενών που δεν πάσχουν από διαβήτη και σοβαρά συνοδά νοσήματα (πχ. ηπατίτιδες, καρκίνο κ.α.) και δεν έχουν υποβληθεί σε θεραπεία μετάγγισης τους τελευταίους τρεις (3) μήνες.• Επιλογή υγιών δοτών (μάρτυρες) ν σε ηλικιακό εύρος αντίστοιχο της ομάδας των ασθενών.• Ενυπόγραφη συγκατάθεση όλων των δοτών για τη συμμετοχή τους στη μελέτη και ενημέρωσή τους για τη χρονική διάρκεια της μελέτης, τη συχνότητα των αιμοληψιών καθώς και για τη δυνατότητα να αποσυρθούν οποιαδήποτε στιγμή το επιθυμούν.• Συλλογή δημογραφικών χαρακτηριστικών και χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής όλων των εθελοντών. • Συλλογή δεδομένων που σχετίζονται με τη νόσο, τη θεραπεία αιμοκάθαρσης και ερυθροποιητίνης στους ασθενείς (φίλτρα, έναρξη θεραπείας αιμοκάθαρσης, πρωτοπαθής αιτία της νόσου, δόση ερυθροποιητίνης, φαρμακευτική αγωγή, βιταμίνες κα).• Συλλογή αιματολογικών και βιοχημικών δεδομένων (πχ. λιπιδαιμικό προφίλ, ουραιμικές τοξίνες, δείκτης κάθαρσης κλπ) των τελευταίων τριών μηνών πριν από την αιμοληψία.1. **Αιματολογικός έλεγχος**

Θα πραγματοποιηθεί λήψη ολικού αίματος (~10ml) από τους ασθενείς (**πριν** και αμέσως **μετά** από το τέλος της συνεδρίας αιμοκάθαρσης) και τους υγιείς δότες (σε σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA, κιτρικό νάτριο για τη μελέτη των κυστιδίων, και της αιμόστασης και σε σωληνάρια χωρίς αντιπηκτικό για τη λήψη ορού για τη μελέτη βιοχημικών, οξειδωτικών και φλεγμονωδών δεικτών).Στο αίμα των δοτών (ασθενείς πριν την ΑΙΚ και υγιείς) θα πραγματοποιηθεί:* Κλασσικός αιματολογικό έλεγχος.

• Κλασσικός βιοχημικός έλεγχος ορού.Στο πλάσμα/ορό θα πραγματοποιηθεί:* Πρωτογενής έλεγχος διαταραχών πήξης (χρόνος προθρομβίνης, χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης)
* Μέτρηση δεικτών φλεγμονής με Elisa kit (CRP, IL-6, IL-10, IL-3).
* Μέτρηση των επιπέδων ερυθροποιητίνης με Elisa kit.
* Δείκτες οξείδωσης (καρβονυλίωση πρωτεϊνών, ROS ([6](#_ENREF_6))).
* Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος (εξαρτώμενη και μη εξαρτώμενη από το ουρικό οξύ) ([28](#_ENREF_28)).
* Προθρομβωτικό δυναμικό μικροκυστιδίων με Elisa kit.
* Εψιδίνη με Elisa kit και με χρωματογραφία υγρής στιβάδας.
1. **Απομόνωση και χαρακτηρισμός μικροκυστιδίων και άλλων εξωκυττάριων κυστιδίων πλάσματος**
* Απομόνωση κυστιδίων με υπερφυγοκέντρηση ([29](#_ENREF_29)).
* Παρατήρηση σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (ΗΜΣ) ([6](#_ENREF_6)).
* Mελέτη πρωτεϊνικής σύστασης με ανοσοαποτύπωμα κατά Western([8](#_ENREF_8)).
* Χαρακτηρισμός των εξωκυττάριων κυστιδίων μεγαλύτερου μεγέθους (500-1000nm) με κυτταρομετρία ροής ([30](#_ENREF_30)).

Εκτός από τον κλασσικό αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο, θα πραγματοποιηθεί:**Α. Πρωτογενής έλεγχος (screening test) αιμόστασης:*** Χρόνος προθρομβίνης.
* Χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης.
* Ινωδογόνο.
* Διμερή ινώδους.
* Χρόνος θρομβίνης.
* Αριθμός Αιμοπεταλίων.

**Β. Δευτερογενής έλεγχος της αιμόστασης:*** Λειτουργικότητα αιμοπεταλίων με συσσωρευτικές ουσίες.
* Ιστικός παράγοντας (TF).
* Ανασταλτής του ιστικού παράγοντα (TFPI).

**Γ. Ανάλυση παραγόντων αιμόστασης στα περιστατικά με παθολογικά εργαστηριακά ευρήματα του πρωτογενούς ελέγχου:*** Παράγοντας FII.
* Παράγοντας FX.
* Παράγοντας FV.
* Παράγοντας VII.
* Παράγοντας VIII.
* Παράγοντας IX.
* Παράγοντας Χ.
* Παράγοντας XI.
* Παράγοντας XII.
* Παράγοντας XIII.

Επιπλέον, θα μετρηθούν τα επίπεδα δεικτών φλεγμονής οι οποίοι έχουν συσχετισθεί με την ανθεκτικότητα στη θεραπεία με rhEpO καθώς και τα επίπεδα της ερυθροποιητίνης και εψιδίνης στο πλάσμα των ασθενών. Θα πραγματοποιηθεί μέτρηση της συγκέντρωσης των κυστιδίων του πλάσματος, μελέτη της έκφρασης δεικτών κυτταρικής εκκαθάρισης με κυτταρομετρία ροής και μορφολογική παρατήρηση σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης, ώστε να επιβεβαιωθούν τυχόν διαφορές στο μέγεθος των κυστιδίων. Επιπλέον, θα ακολουθήσει μελέτη της πρωτεϊνικής σύστασης για δείκτες οξειδωτικού στρες, ερυθροφαγοκυττάρωσης (για τα ερυθροκυτταρικά κυστίδια) και ενεργοποίησης συστατικών του συμπληρώματος (ζώνη-3, IgGs, CD47, CD59, Prx-2, sCLU κα.).1. **Στατιστική επεξεργασία**

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων θα χρησιμοποιηθεί το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences, έκδοση 22.0). Ο έλεγχος των διαφορών ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών καθώς και της επίδρασης της αιμοκάθαρσης θα γίνει μέσω t-test (independent samples t-test και paired t-test, αντίστοιχα), ενώ οι διαφορές των ομάδων των ασθενών με τα υγιή άτομα θα ελεγχθούν με ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA, one way analysis of variance), αφού πρώτα επιβεβαιωθεί η απουσία ακραίων τιμών στις διάφορες παραμέτρους (outliers). Για την εύρεση των συσχετίσεων μεταξύ των παραμέτρων θα πραγματοποιηθούν έλεγχοι κατά Pearson και Spearmann, ανάλογα με την κανονικότητα της κατανομής των παραμέτρων (κανονική και μη κανονική κατανομή, αντίστοιχα). Ως στατιστικά σημαντικά θα θεωρηθούν τα αποτελέσματα με P<0,05 ή P<0,01. **Η συνεισφορά στη θεωρητική ή/και εφαρμοσμένη επιστημονική γνώση**Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάλυση σε βάθος των ερεθισμάτων που επάγουν κυστιδιοποίηση στα κύτταρα του αίματος (με έμφαση στα ερυθροκύτταρα) και στα κύτταρα του ενδοθηλίου και η πιθανή συσχέτισή τους με το φλεγμονώδες πρότυπο και διαταραχές της πήξης σε ασθενείς με ΧΝΑ που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση. Συγκεκριμένα η μελέτη θα επικεντρωθεί σε ασθενείς μη ανταποκρινόμενους στη θεραπεία με rhEpO σε σχέση με ανταποκρινόμενους στη θεραπεία ώστε να μελετηθεί η επίδραση της ερυθροποιητίνης στους προαναφερόμενους παράγοντες. Βασιζόμενοι σε ευρήματα της ομάδας μας που υποδεικνύουν διαφορετικό μηχανισμό κυστιδιοποίησης των ερυθροκυττάρων μεταξύ των ανταποκρινόμενων και μη ανταποκρινόμενων στην rhEpO ασθενών, θα μελετηθούν τα ερυθροκυτταρικά κυστίδια σε επίπεδο πρωτεώματος και μηχανισμών εκκαθάρισης, θα αναζητηθούν πιθανές συσχετίσεις των διαφορετικών μηχανισμών κυστιδιοποίησης με δείκτες φλεγμονής και με παράγοντες που σχετίζονται με το θρομβωτικό δυναμικό καθώς και με τα επίπεδα της ερυθροποιητίνης του πλάσματος. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αναμένεται να συμβάλουν στη διαλεύκανση του παθοφυσιολογικού μηχανισμού κυστιδιοποίησης των ουραιμικών ερυθροκυττάρων σε ασθενείς με ΧΝΑ που δεν ανταποκρίνονται στην συνήθη θεραπεία με EpO σε σχέση με το προθρομβωτικό δυναμικό του αίματος των ασθενών και το φλεγμονώδες φορτίο, χαρακτηριστικά τα οποία σχετίζονται άμεσα με την καρδιαγγειακή θνητότητα.  |
| **Β. Καινοτομία της διδακτορικής διατριβής** |
| Μέχρι σήμερα δεν έχει δημοσιευθεί κάποια εργασία που να περιγράφει την κυτταροβιολογική μελέτη των μικροκυστιδίων από ασθενείς με ΧΝΑ. Παρόλο που έχει συσχετιστεί η θνητότητα των ασθενών με ΧΝΑ με τον μηχανισμό της αιμόστασης δεν υπάρχει θετική συσχέτιση με τον αριθμό και την ποιότητα των μικροκυστιδίων. Η ερευνητική προσέγγιση που προτείνεται θα απαντήσει στο ερώτημα της αιμόστασης, ανταπόκρισης στην ερυθροποιητίνη και θνησιμότητας των ασθενών με ΧΝΑ. |
| **Γ. Χρονοδιάγραμμα και ρεαλιστικότητα του χρονοδιαγράμματος** |
| **Αναλυτικό χρονοδιάγραμμα** Η μελέτη αναμένεται να ολοκληρωθεί σε διάστημα **36 μηνών** ως εξής:

|  |  |
| --- | --- |
| Ενημέρωση και επιλογή ασθενών και υγιών δοτών, υπογραφή εγγράφων συγκατάθεσης (Συλλογή βιοχημικών και αιματολογικών δεδομένων, χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής και της θεραπείας αιμοκάθαρσης). | 10 μήνες |
| Παράγοντες αιμόστασης, φλεγμονής κτλ.  | 6 μήνες |
| Αιματολογική μελέτη (Απομόνωση κυστιδίων, παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και ανάλυση πρωτεϊνικής σύστασης). | 10 μήνες |
| Επεξεργασία δεδομένων  | 6 μήνες |
| Συγγραφή ερευνητικών άρθρων | 4 μήνες |
|  |  |

 |
| **Δ. Βιβλιογραφία** |
|  1. Thomas R, Kanso A, Sedor JR. Chronic kidney disease and its complications. Prim Care. 2008; **35**(2): 329-44, vii.2. Ly J, Marticorena R, Donnelly S. Red blood cell survival in chronic renal failure. Am J Kidney Dis. 2004; **44**(4): 715-9.3. Nurko S. Anemia in chronic kidney disease: causes, diagnosis, treatment. Cleve Clin J Med. 2006; **73**(3): 289-97.4. Niwa T, Tsukushi S. 3-deoxyglucosone and AGEs in uremic complications: inactivation of glutathione peroxidase by 3-deoxyglucosone. Kidney Int Suppl. 2001; **78**: S37-41.5. Ahmed MS, Abed M, Voelkl J, Lang F. Triggering of suicidal erythrocyte death by uremic toxin indoxyl sulfate. BMC Nephrol. 2013; **14**: 244.6. Antonelou MH, Kriebardis AG, Velentzas AD, Kokkalis AC, Georgakopoulou SC, Papassideri IS. Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis. J Proteomics. 2011; **74**(11): 2441-52.7. Georgatzakou HT, Antonelou MH, Papassideri IS, Kriebardis AG. Red blood cell abnormalities and the pathogenesis of anemia in end-stage renal disease. Proteomics Clin Appl. 2016; **10**(8): 778-90.8. Antonelou MH, Georgatzakou HT, Tzounakas VL, Velentzas AD, Kokkalis AC, Kriebardis AG, Papassideri IS. Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study. J Proteomics. 2014; **101**: 88-101.9. Seliger SL, Zhang AD, Weir MR, Walker L, Hsu VD, Parsa A, Diamantidis CJ, Fink JC. Erythropoiesis-stimulating agents increase the risk of acute stroke in patients with chronic kidney disease. Kidney Int. 2011; **80**(3): 288-94.10. Fishbane S, Besarab A. Mechanism of increased mortality risk with erythropoietin treatment to higher hemoglobin targets. Clin J Am Soc Nephrol. 2007; **2**(6): 1274-82.11. Badve SV, Beller EM, Cass A, Francis DP, Hawley C, Macdougall IC, Perkovic V, Johnson DW. Interventions for erythropoietin-resistant anaemia in dialysis patients. Cochrane Database Syst Rev. 2013; (8): CD006861.12. Bamgbola OF. Pattern of resistance to erythropoietin-stimulating agents in chronic kidney disease. Kidney Int. 2011; **80**(5): 464-74.13. Georgatzakou HT, Tzounakas VL, Kriebardis AG, Velentzas AD, Papageorgiou EG, Voulgaridou AI, Kokkalis AC, Antonelou MH, Papassideri IS. Pathophysiological aspects of red blood cells in end-stage renal disease patients resistant to recombinant human erythropoietin therapy. Eur J Haematol. 2017; **98**(6): 590-600.14. Costa E, Lima M, Alves JM, Rocha S, Rocha-Pereira P, Castro E, Miranda V, do SF, Loureiro A, Quintanilha A, Belo L, Santos-Silva A. Inflammation, T-cell phenotype, and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy. J Clin Immunol. 2008; **28**(3): 268-75.15. Shai E, Rosa I, Parguina AF, Motahedeh S, Varon D, Garcia A. Comparative analysis of platelet-derived microparticles reveals differences in their amount and proteome depending on the platelet stimulus. J Proteomics. 2012; **76 Spec No.**: 287-96.16. Donadee C, Raat NJ, Kanias T, Tejero J, Lee JS, Kelley EE, Zhao X, Liu C, Reynolds H, Azarov I, Frizzell S, Meyer EM, Donnenberg AD, Qu L, Triulzi D, Kim-Shapiro DB, Gladwin MT. Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. Circulation. 2011; **124**(4): 465-76.17. Bonomini M, Sirolli V, Merciaro G, Antidormi T, Di Liberato L, Brummer U, Papponetti M, Cappelli P, Di Gregorio P, Arduini A. Red blood cells may contribute to hypercoagulability in uraemia via enhanced surface exposure of phosphatidylserine. Nephrol Dial Transplant. 2005; **20**(2): 361-6.18. Tantawy AA, Adly AA, Ismail EA, Habeeb NM. Flow cytometric assessment of circulating platelet and erythrocytes microparticles in young thalassemia major patients: relation to pulmonary hypertension and aortic wall stiffness. Eur J Haematol. 2013; **90**(6): 508-18.19. Rubin O, Canellini G, Delobel J, Lion N, Tissot JD. Red blood cell microparticles: clinical relevance. Transfus Med Hemother. 2012; **39**(5): 342-7.20. Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, Brunet P, Dignat-George F. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. J Thromb Haemost. 2006; **4**(3): 566-73.21. Daniel L, Fakhouri F, Joly D, Mouthon L, Nusbaum P, Grunfeld JP, Schifferli J, Guillevin L, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. Kidney Int. 2006; **69**(8): 1416-23.22. Saran R, Li Y, Robinson B, Abbott KC, Agodoa LY, Ayanian J, Bragg-Gresham J, Balkrishnan R, Chen JL, Cope E, Eggers PW, Gillen D, Gipson D, Hailpern SM, Hall YN, He K, Herman W, Heung M, Hirth RA, Hutton D, Jacobsen SJ, Kalantar-Zadeh K, Kovesdy CP, Lu Y, Molnar MZ, Morgenstern H, Nallamothu B, Nguyen DV, O'Hare AM, Plattner B, Pisoni R, Port FK, Rao P, Rhee CM, Sakhuja A, Schaubel DE, Selewski DT, Shahinian V, Sim JJ, Song P, Streja E, Kurella Tamura M, Tentori F, White S, Woodside K. US Renal Data System 2015 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. Am J Kidney Dis. 2016; **67**(3 Suppl 1): Svii, S1-305.23. Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Frerichs FC, Spronk HM, ten Cate H, de Fijter CW, Terpstra WE, Leyte A. Chronic renal failure is accompanied by endothelial activation and a large increase in microparticle numbers with reduced procoagulant capacity. Nephrol Dial Transplant. 2012; **27**(4): 1446-53.24. Burton JO, Hamali HA, Singh R, Abbasian N, Parsons R, Patel AK, Goodall AH, Brunskill NJ. Elevated levels of procoagulant plasma microvesicles in dialysis patients. PLoS One. 2013; **8**(8): e72663.25. Huang MJ, Wei RB, Wang Y, Su TY, Di P, Li QP, Yang X, Li P, Chen XM. Blood coagulation system in patients with chronic kidney disease: a prospective observational study. BMJ Open. 2017; **7**(5): e014294.26. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzas EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. Cell Mol Life Sci. 2011; **68**(16): 2667-88.27. Panichi V, Rosati A, Bigazzi R, Paoletti S, Mantuano E, Beati S, Marchetti V, Bernabini G, Grazi G, Rizza GM, Migliori M, Giusti R, Lippi A, Casani A, Barsotti G, Tetta C. Anaemia and resistance to erythropoiesis-stimulating agents as prognostic factors in haemodialysis patients: results from the RISCAVID study. Nephrol Dial Transplant. 2011; **26**(8): 2641-8.28. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol. 1999; **299**: 15-27.29. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. Biomed Res Int. 2018; **2018**: 8545347.30. Tzounakas VL, Georgatzakou HT, Kriebardis AG, Voulgaridou AI, Stamoulis KE, Foudoulaki-Paparizos LE, Antonelou MH, Papassideri IS. Donor variation effect on red blood cell storage lesion: a multivariable, yet consistent, story. Transfusion. 2016; **56**(6): 1274-86. |