

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265223





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**“Απόπτωση, Οξειδωτικό στρες
και Καρδιαγγειακή Νόσος σε ασθενείς
με Χρόνια Νεφρική Νόσο”**

Ευαγγελία Ντουνούση
Νεφρολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (N. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος))



Ημερομηνία αίτησης της κ. Ντουνούση Ευαγγελία: 14-6-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 481^α/25-6-2002

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ελισάφ Μωυσής Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μιχάλης Λάμπρος Αναπληρωτής Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 11-9-2002

«Απόπτωση, οξειδωτικό στρες και καρδιαγγειακή νόσος σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 635/15-4-2008

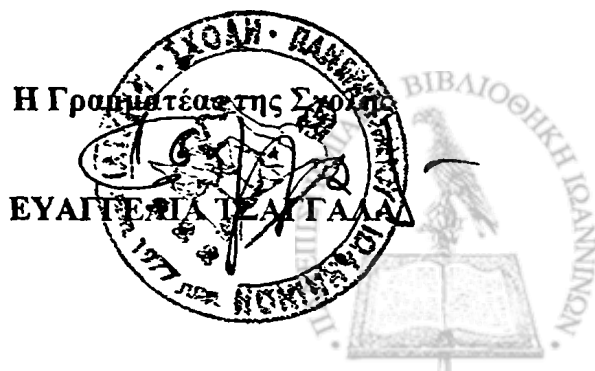
1. Γαλάρης Δημήτριος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Γουδέβενος Ιωάννης Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Ελισάφ Μωυσής, Καθηγητής Παθολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Μιχάλης Λάμπρος, Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Τσελέπης Αλέξανδρος Καθηγητής Βιοχημείας- Κλινικής Χημείας, Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Κατωπόδης Κωνσταντίνος Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 21-4-2008

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας -Καρδιολογίας



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη αφορά στην εξέταση των προτύπων ποιότητας των υπηρεσιών που παρέχονται από τις επιχειρήσεις. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με σκοπό να διερευνηθούν οι αιτίες των ελλείψεων και να προταθούν λύσεις για την βελτίωση της ποιότητας των υπηρεσιών. Η μελέτη βασίστηκε σε μια σειρά από ερωτηματολόγια που απηύχθησαν σε εκπαιδευτικούς και φοιτητές των πανεπιστημίων. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια προσπάθεια να διερευνηθούν οι αιτίες των ελλείψεων και να προταθούν λύσεις για την βελτίωση της ποιότητας των υπηρεσιών. Η μελέτη βασίστηκε σε μια σειρά από ερωτηματολόγια που απηύχθησαν σε εκπαιδευτικούς και φοιτητές των πανεπιστημίων. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια προσπάθεια να διερευνηθούν οι αιτίες των ελλείψεων και να προταθούν λύσεις για την βελτίωση της ποιότητας των υπηρεσιών. Η μελέτη βασίστηκε σε μια σειρά από ερωτηματολόγια που απηύχθησαν σε εκπαιδευτικούς και φοιτητές των πανεπιστημίων. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια προσπάθεια να διερευνηθούν οι αιτίες των ελλείψεων και να προταθούν λύσεις για την βελτίωση της ποιότητας των υπηρεσιών. Η μελέτη βασίστηκε σε μια σειρά από ερωτηματολόγια που απηύχθησαν σε εκπαιδευτικούς και φοιτητές των πανεπιστημίων. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη.

στους γουέις μου

*και
σε αγαπημένα πρόσωπα
που προτίμησαν
τη γειτονιά των αγγέλων
για να συνεχίσουν...*



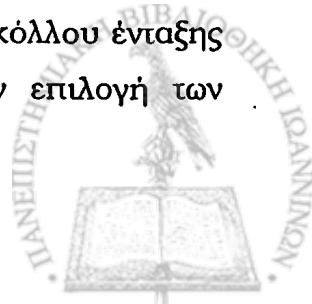
ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η χρόνια νεφρική νόσος (ΧΝΝ) αποτελεί σοβαρό επιδημιολογικό πρόβλημα παγκοσμίως. Από τη στιγμή που εγκαθίσταται η ΧΝΝ πιστεύεται ότι αργά ή γρήγορα εξελίσσεται σε τελικό στάδιο ΧΝΝ. Επιπλέον, η επιδημιολογία της καρδιαγγειακής νόσου στη ΧΝΝ συγκεντρώνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού είναι γνωστό ότι περίπου το 50% των θανάτων των ασθενών με ΧΝΝ οφείλονται σε καρδιαγγειακά αίτια. Παραδοσιακοί και μη παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου ευθύνονται για την εμφάνιση και την παράλληλη εξέλιξη νεφρικής και καρδιαγγειακής βλάβης. Ωστόσο, είναι εξαιρετικά σπάνιες και ιδιαίτερα στην Ελλάδα οι διαχρονικές μελέτες που παρακολούθησαν την εξέλιξη της ΧΝΝ σε συνδυασμό με την παράλληλη εξέλιξη της καρδιαγγειακής νόσου.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει ως σκοπό να μελετήσει την επίπτωση των σταδίων 1-4 ΧΝΝ σε επιλεγμένο πληθυσμό των Εξωτερικών Ιατρείων δύο Νεφρολογικών Κέντρων και να οριστεί η συνοδός καρδιαγγειακή βλάβη και οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την εξέλιξη των καταστάσεων αυτών.

Το μεγαλύτερο μέρος της παρούσας διατριβής εκπονήθηκε στα Εξωτερικά Ιατρεία ΧΝΝ των Νεφρολογικών Τμημάτων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και του Γενικού Νοσοκομείου Βέροιας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Παθολογίας/Νεφρολογίας Κων/νου Ξ. Σιαμόπουλου κατά το διάστημα 2002-2007. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ανάθεση της παρούσας διατριβής. Η καθοδήγησή του, οι ανεκτίμητες επιστημονικές συμβουλές του, η αποτελεσματική του παρέμβαση σε πρακτικά προβλήματα που προέκυψαν στην πορεία, η ουσιαστική συμβολή του στην αξιολόγηση των δεδομένων και στη διόρθωση του κειμένου ήταν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Αισθάνομαι πραγματικά τυχερή που είχα την τύχη να με συμπεριλάβει στους συνεργάτες του και ελπίζω να σταθώ αντάξια της εμπιστοσύνης και της εκτίμησης που μου έδειξε και συνεχίζει να μου δείχνει καθημερινά.

Η έναρξη και ολοκλήρωση της ειδικότητάς μου ως Νεφρολόγος στο Νοσοκομείο της Βέροιας μου έδωσαν την ευκαιρία να γνωρίσω πολλούς και αξιόλογους ανθρώπους. Μεταξύ αυτών θα ήθελα να ευχαριστήσω το συνάδελφο Κυριάκο Ιωάννου για τη συνεργασία του στην υλοποίηση του πρωτοκόλλου ένταξης και παρακολούθησης των ασθενών στη μελέτη καθώς και στην επιλογή των



ασθενών. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους Επιμελητές του Νεφρολογικού Τμήματος, κ. Απόστολο Κελεσίδη και κ. Ιωάννη Τσουκνικά για την ουσιαστική βοήθειά τους στην επιλογή και στρατολόγηση των ασθενών. Ο κ. Νικόλαος Κοτζαδάμης, Αναπληρωτής Διευθυντής του Νεφρολογικού Τμήματος συνέβαλε στην προσπάθεια αυτή με τη συνεχή στήριξή του και την κάλυψη που παρείχε σε κλινικό επίπεδο κατά τη διάρκεια της ερευνητικής μας ενασχόλησης. Η συμβολή της φίλης Μαρίας Παλάσκας ήταν ουσιαστική στη λήψη, επεξεργασία, αποθήκευση και διακίνηση των δειγμάτων αίματος και την ευχαριστώ πολύ.

Η επιλογή και η στρατολόγηση των ασθενών στο Νεφρολογικό Τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων θα ήταν αδύνατη χωρίς τη συμβολή του κ. Κων/νου Κατωπόδη, Επίκουρου Καθηγητή Νεφρολογίας και φυσικά της αγαπημένης φίλης και συναδέλφου Έλλης Κολιούση, η οποία επιπλέον αφιέρωσε πολλές ώρες από τον προσωπικό της χρόνο για την επεξεργασία των δειγμάτων αίματος της απόπτωσης. Στο κλινικό κομμάτι της παρούσας διατριβής συνέβαλαν ουσιαστικά οι καρδιολόγοι, ο κ. Πολυχρόνης Χριστοδουλίδης στη Βέροια και ο κ. Κων/νος Παππάς, Επιμελητής Α' στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Κων/νο Παππά, γιατί εκτός από τη διενέργεια των υπερηχοκαρδιογραφημάτων μας παρείχε αγόγγυστα, παρά το μεγάλο φόρτο εργασίας του, τις πολύτιμες επιστημονικές του συμβουλές.

Οι προσδιορισμοί των εξειδικευμένων παραμέτρων για τις ανάγκες της παρούσας διδακτορικής διατριβής διενεργήθηκαν σε διαφορετικά Εργαστήρια από πολλούς επιστήμονες, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω ονομαστικά. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γεώργιο Βαρθολομάτο, Δρ. Βιοχημείας που μας παρείχε την εργαστηριακή υποδομή του Αιματολογικού Εργαστηρίου – Μονάδας Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για την επεξεργασία των δειγμάτων της απόπτωσης και επιπλέον, με στήριξε και σε θεωρητικό επίπεδο στο εξειδικευμένο αντικείμενο της απόπτωσης. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης, τον Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Τσελέπη, Υπεύθυνο του Ερευνητικού Εργαστηρίου Λιπιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τις πολύτιμες συμβουλές του σε θέματα βασικής έρευνας, καθώς και τη συνεργάτιδά του κα Ελένη Παπαβασιλείου, Δρ. Βιοχημείας για την επεξεργασία των δειγμάτων του οξειδωτικού στρες. Ο Καθηγητής Βιολογικής Χημείας κ. Δημήτριος Γαλάρης βοήθησε σημαντικά στην παρούσα μελέτη με την



υποστήριξη του τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο με τον προσδιορισμό στο Εργαστήριό του κάποιων παραμέτρων του οξειδωτικού στρες. Θα ήθελα λοιπόν να τον ευχαριστήσω μαζί με τη συνεργάτιδά του κα Μαρία Μελίδου, η οποία επεξεργάστηκε τα δείγματα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόθερμα την κα Αικατερίνη Παπαγιάννη, Επίκουρη Καθηγήτρια στο Νεφρολογικό Τμήμα του «Ιπποκράτειου» Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης για την πολύτιμη βοήθειά της, τις χρήσιμες συμβουλές της σε επιστημονικά ζητήματα και τις ατελείωτες ώρες προσωπικής δουλειάς για τον προσδιορισμό των δεικτών φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Ευχαριστίες οφείλω και στην κα Αρετή Μακέδου, Καθηγήτρια Κλινικής Βιοχημείας Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για τη βοήθειά της στον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κα Ιωάννα Μπούμπα Δρ. Βιολόγο, στο Εργαστήριο Γενετικής της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για τη συμμετοχή της στην επεξεργασία και φύλαξη των δειγμάτων αίματος.

Εκτός από τους ανθρώπους που ευχαρίστησα ονομαστικά μέχρι τώρα είναι και πολλοί άλλοι που συνέβαλαν σε αυτό το εγχείρημα. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω έστω και ανώνυμα όλους όσοι έχουν βοηθήσει είτε στο εργαστηριακό κομμάτι, όπως οι εργαζόμενοι στα Αιματολογικά και Βιοχημικά Εργαστήρια των δύο Νοσοκομείων, είτε στο κλινικό κομμάτι της μελέτης, όπως το νοσηλευτικό προσωπικό των δύο Νεφρολογικών Κέντρων. Επίσης, θα ήθελα να συγχαρώ τους συναδέλφους και φίλους Νεφρολόγους που συνεχίζουν να εργάζονται και στα δύο Κέντρα στο προοπτικό κομμάτι της μελέτης αυτής με υπευθυνότητα και αμείωτο ενθουσιασμό, τόσο όσον αφορά στην έρευνα αλλά και στην κλινική φροντίδα των ασθενών.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην αναφερθώ στον επαγγελματισμό και στην πολύπλευρη στήριξη της φίλης και συνεργάτιδας Αλέκας Παπαγεωργίου. Την ευχαριστώ ολόψυχα για τη συμβολή της στην αρχική διαμόρφωση του αλγόριθμου καταγραφής των ασθενών στη μελέτη, για την καταγραφή και επεξεργασία των στοιχείων, για τη διακίνηση των δειγμάτων αίματος και τέλος για την άψογη γραμματειακή υποστήριξη της υπό τη μορφή της εύρεσης βιβλιογραφικών αναφορών και της τελικής διαμόρφωσης του παρόντος κειμένου της διατριβής μου.



Τα λόγια δεν μπορούν να αποδώσουν το μέγεθος της ευγνωμοσύνης μου για τον άνθρωπο και δάσκαλό μου κ. Δρ. Δημήτρη Τσακίρη, Διευθυντή του Νεφρολογικού Τμήματος του Νοσοκομείου Βέροιας. Η συνάντηση μαζί του αποτέλεσε σταθμό στην επαγγελματική και προσωπική μου πορεία. Η δική του ξεχωριστή προσέγγιση και στάση ζωής σε θέματα, όπως η άσκηση της ιατρικής, η εκτίμηση και διαχείριση δύσκολων καταστάσεων στο χώρο της εργασίας αλλά και έξω από αυτόν, το ενδιαφέρον για τον ασθενή και η αγάπη για την έρευνα επηρέασαν βαθύτατα τις μετέπειτα επιστημονικές και προσωπικές μου επιλογές, μία εκ των οποίων και η πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής μελέτης. Η συμβολή του ήταν καταλυτική σε όλα τα στάδια της ερευνητικής αυτής προσπάθειας από τη σύλληψη της ιδέας μέχρι την τελική συγγραφή του κειμένου και τον ευχαριστώ ολόψυχα για όλα.

Τέλος, θα ήθελα να αναφερθώ στους γονείς μου Χρήστο και Ερμιόνη που με την ανιδιοτελή και γνήσια αγάπη τους και την ακούραστη και αδιάλειπτη στήριξη τους μου έδωσαν την ευκαιρία να σπουδάσω κάτι που αυτοί δυστυχώς λόγω αντίξωων συνθηκών δεν κατάφεραν να κάνουν. Ελπίζω να είναι περήφανοι για μένα. Το ευχαριστώ είναι λίγο...



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ	XVII
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
A. ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ (ΧΝΝ)	3
A.1. Εισαγωγή	3
A.2. Ορισμός - Στάδια και επιδημιολογία της ΧΝΝ	4
A.3. Μέθοδοι εκτίμησης της νεφρικής λειτουργίας	9
B. ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΘΝΗΤΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΧΝΝ	13
B.1. Ορισμός	13
B.2. Επιδημιολογία της καρδιαγγειακής νόσου (ΚΑΝ) στη ΧΝΝ	13
B.3. Η ΧΝΝ ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη ΚΑΝ	15
B.4. Καρδιονεφρικό σύνδρομο	16
B.5. Παράγοντες κινδύνου της ΚΑΝ και της εξέλιξης της ΧΝΝ	18
Γ. ΑΠΟΠΤΩΣΗ	21
Γ.1. Εισαγωγή - Ορισμός	21
Γ.2. <i>Caenorhabditis elegans</i> - πρότυπο σύστημα μελέτης κυτταρικού θανάτου	22
Γ.3. Απόπτωση - Νέκρωση: δύο διακριτά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου;	23
Γ.4. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποπτωτικών κυττάρων	24
Γ.5. Τα στάδια και οι μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης	25
Γ.5.1. Το στάδιο της απόφασης	27
Γ.5.1.α. Γονίδια ρυθμιστικά του κυτταρικού κύκλου	27
Γ.5.1.β. Οι υποδοχείς θανάτου και συνδεδεκά μόρια	27
Γ.5.1.γ. Η οικογένεια των Bcl-2 μορίων	30
Γ.5.2. Το στάδιο της δέσμευσης	33
Γ.5.3. Το στάδιο της εκτέλεσης	34
Γ.6. Η απόπτωση σε παθολογικές καταστάσεις και στα νεφρικά νοσήματα	36
Γ.7. Απόπτωση και εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής βλάβης	41
Γ.8. Η απόπτωση στη ΧΝΝ και στην υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας	44
Γ.8.1. Η απόπτωση σε ασθενείς τελικού σταδίου ΧΝΝ υπό υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας	44
Γ.8.1.α. Απόπτωση στα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς	45
Γ.8.1.β. Απόπτωση στα μονοπύρρηνα (λεμφοκύτταρα-μονοκύτταρα) κύτταρα του περιφερικού αίματος σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς	46
Γ.8.2. Η απόπτωση σε ασθενείς με ΧΝΝ πριν και μετά την ένταξη σε θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας	48
Γ.8.2.α. Απόπτωση στα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος σε ασθενείς με ΧΝΝ πριν και μετά την ένταξη σε θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας	48



Γ.8.2.β.	Απόπτωση στα μονοπύρρηνα (λεμφοκύτταρα-μονοκύτταρα) κύτταρα του περιφερικού αίματος σε ασθενείς με ΧΝΝ πριν και μετά την ένταξη σε θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας	50
Γ.9.	Απόπτωση και καρδιαγγειακά νοσήματα	52
Δ.	ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ (ΟΣ)	57
Δ.1.	Εισαγωγή	57
Δ.2.	ΟΣ – Γενικά	58
Δ.2.α.	Ελεύθερες ρίζες, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου – δραστικές μορφές οξυγόνου και δραστικές μορφές αζώτου	59
Δ.2.β.	Ελεύθερες ρίζες και ενδοκυτταρικοί ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί σε βιολογικά συστήματα	62
Δ.2.γ.	Αντιοξειδωτικές εξωκυτταρικές ουσίες στα βιολογικά συστήματα και ο ρόλος τους στην προστασία από οξειδωτικές βλάβες	63
Δ.2.δ.	Λιπιδική υπεροξείδωση	64
Δ.2.δ.1.	Μηχανισμοί οξείδωσης των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών	65
Δ.3.	ΟΣ – Γήρανση - Παθολογικές καταστάσεις και νοσήματα φθοράς στον άνθρωπο	66
Δ.4.	Οξειδωτικό στρες και καρδιαγγειακή νόσος	67
Δ.5.	Η παθοφυσιολογία του ΟΣ στην εξέλιξη της νεφρικής βλάβης	70
Δ.6.	ΟΣ και θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας	73
Δ.7.	ΟΣ και ΧΝΝ	75
Ε.	Η ΧΝΝ ΩΣ ΧΡΟΝΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ	77
Ε.1.	Μόρια προσκόλλησης του ενδοθηλίου	78
Ε.2.	Η απόπτωση στο περιφερικό αίμα και δείκτες φλεγμονής στη ΧΝΝ	78
ΣΤ.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	81
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		83
Ζ.	ΑΣΘΕΝΕΙΣ – ΜΕΘΟΔΟΙ	85
Ζ.1.	Χαρακτηριστικά ασθενών	85
Ζ.2.	Μέθοδοι	88
Ζ.2.1.	Αναλυτική περιγραφή των μεθόδων μέτρησης των εξειδικευμένων παραμέτρων	89
Ζ.2.1.α.	Παράμετροι εκτίμησης της απόπτωσης στο περιφερικό αίμα	89
Ζ.2.1.β.	Παράμετροι εκτίμησης του ΟΣ	92
Ζ.2.1.γ.	Παράμετροι εκτίμησης της φλεγμονής και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας	94
Ζ.2.2.	Υπερηχοκαρδιογράφημα	95
Ζ.2.3.	Στατιστική ανάλυση	97



Η.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	99
H.1.	Γενικά χαρακτηριστικά ασθενών και αποτελέσματα καρδιακής λειτουργίας και υπερηχοκαρδιογραφικών ευρημάτων σε σχέση με την νεφρική λειτουργία	99
H.2.	Αποτελέσματα δεικτών απόπτωσης σε σχέση με τη νεφρική λειτουργία	106
H.3.	Αποτελέσματα δεικτών ΟΣ σε σχέση με τη νεφρική λειτουργία	110
H.4.	Αποτελέσματα δεικτών φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας σε σχέση με τη νεφρική λειτουργία	114
H.5.	Συσχέτιση υπερηχοκαρδιογραφικών ευρημάτων με κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους καθώς και με τους δείκτες της απόπτωσης, του ΟΣ και της φλεγμονής	119
H.6.	Αποτελέσματα συσχετίσεων μεταξύ των δεικτών απόπτωσης, ΟΣ, φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας	121
Θ.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	125
Θ.1.	Συχνότητα, εξέλιξη ΧΝΝ και ευρήματα από το υπερηχοκαρδιογράφημα σε σχέση με τη νεφρική λειτουργία	125
Θ.2.	Απόπτωση και νεφρική λειτουργία	130
Θ.3.	ΟΣ και νεφρική λειτουργία	135
Θ.4.	Φλεγμονή και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε σχέση με τη νεφρική λειτουργία	142
Θ.5.	Συσχέτιση υπερηχοκαρδιογραφικών ευρημάτων με κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους, καθώς και με τους δείκτες της απόπτωσης, του ΟΣ και της φλεγμονής-ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας	148
Θ.6.	Αλληλεπιδράσεις δεικτών απόπτωσης, ΟΣ, φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας	152
Ι.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	155
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	157
	SUMMARY	163
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	169



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ

8-epiPGF2a	8-ισοπροστανία
A	Μέγιστη Ταχύτητα Κολπικής Πλήρωσης
ACEi	Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor
ADP	Adenosine Diphosphate
AGEs	Advanced Glycation Endproducts
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
ANOVA	Μέθοδος Απλής Μη Συσχετισμένης Ανάλυσης Διακύμανσης
Apo-B	Απολιποπρωτεΐνη Β
ARB	Angiotensin Receptor Blocker
ARIC	Atherosclerosis Risk in Communities Study
ATP	Adenosine Triphosphate
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BMI	Δείκτης μάζας σώματος
BSA	Δείκτης Επιφάνειας Σώματος
C.elegans	Caenorhabditis Elegans
CAT	Καταλάση (Catalase)
C-G	Cockroft-Gault Equation
CI	Confidence Interval
Clcr	Κάθαρση Κρεατινίνης (Clearance of Creatinine)
CRP	C-Reactive Protein
DD	Death Domain
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
E	Μέγιστη Ταχύτητα Πρώιμης Διαστολικής Πλήρωσης
EDTA	Αιθυλαινοδιαμινο-τετραοξεϊκό οξύ
EF	Κλάσμα Εξώθησης
eGFR	Εκτιμώμενος Ρυθμός Σπειραματικής Διήθησης
ELISA	Sandwich Enzyme Immunoassay Technique
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
EPO	Ερυθροποιητίνη
FADD	Fas-Associated Death Domain
FasL	Fas-ligand
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FLIP	FLICE-Like Inhibitory Protein
FS	Κλάσμα βράχυσης
FSGS	Τμηματική Εστιακή Σπειραματοσκλήρυνση
GFR	Ρυθμός Σπειραματικής Διήθησης
GPx	Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης
Hb	Αιμοσφαιρίνη
HDL	Υψηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνη
HOCl	Υποχλωριώδες Οξύ
IAPs	Πρωτεΐνες Αναστολείς της Απόπτωσης
ICAD/DFF45	Inhibitor of Caspase Activated DNase ή DNA Fragmentation Factor 45
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IL-6	Ιντερλευκίνη-6
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IVSTd	Πάχος Μεσοκοιλιακού Διαφράγματος
K/DOQI	Kidney Dialysis Outcomes Quality Initiative
KEEP	Kidney Early Evaluation Program
LDL	Χαμηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνη



LMEA	Lymphocytes - Monocytes Early Apoptotic
LMLA	Lymphocytes - Monocytes Late Apoptotic
LOO'	Υπεροξειδία Πολυακόρεστων Λιπαρών Οξέων
LV	Αριστερή Κοιλία
LVdd	Διάμετρος LV στο Τέλος της Διαστολικής Φάσης
LVDs	Διάμετρος LV στο Τέλος της Συστολικής Φάσης
LVH	Υπερτροφία LV
LVmass	Μάζα LV
LVMi	Δείκτης: LVmass/BSA
MDA	Μηλονική Διαλδεϋδη
MDRD	Modification Diet of Renal Disease
n	Αριθμός Ασθενών
NHANES III	Third National Health and Nutrition Examination Survey
NKF	National Kidney Foundation
nNOS	Neuronal Nitric Oxide Synthase
NOS	Nitric Oxide Synthase
ox-LDL	Οξειδωμένη LDL
PBS	Ρυθμιστικό Φωσφορικό Διάλυμα
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PI	Ιωδιούχο Προπίδιο
PPx	Περοξυρεδοξίνες
PS	Φωσφολιπίδια
PT	Μεταβατικός Πόρος
PTH	Παραθορμόνη
PUFA	Οξειδώσεις Πολυακόρεστων Λιπαρών Οξέων
PWTd	Πάχος Οπίσθιου Τοιχώματος
ROS	Reactive Oxygen Species
RWT	Σχετικό Πάχος Τοιχώματος
sAlb	Αλβουμίνη ορού
sCr	Κρεατινίνη ορού
sFas	Διαλυτή Μορφή Fas
sGlu	Γλυκόζη ορού
SOD	Υπεροξειδική Δισμουτάση
sUA	Ουρικό Οξύ ορού
sUr	Ουρία ορού
TAS	Ολική αντιοξειδωτική κατάσταση (Total Antioxidant Status)
TChol	Ολική Χοληστερόλη
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFRSF	TNF Receptor Superfamily
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
TRG	Τριγλυκερίδια
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling assay
USRDS	United States Renal Data System
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
AEE	Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο
AEN	Αγγειακή Εγκεφαλική Νόσος
AMK	Αιμοκάθαρση
ΑΠ	Αρτηριακή Πίεση
ΑΥ	Αρτηριακή Υπέρταση
ΔΑΠ	Διαστολική Αρτηριακή Πίεση
E/A	Κλάσμα (Λόγος) E/A



ΕΕ	Ευρωπαϊκή Ένωση
Εκ.	Εκατομμύριο/α
ΕΜ	Έμφραγμα Μυοκαρδίου
H₂O₂	Υπεροξειδίο του Υδρογόνου
HNO₂	Νιτρώδες Οξύ
I/Ε	Ισχαιμία/Επαναιμάτωση
ΚΑ	Καρδιακή Ανεπάρκεια
και συυ.	Και συνεργάτες
ΚΑΝ	Καρδιαγγειακή Νόσος
ΝΟ'	Μονοξειδίο του Αζώτου
Ο₂	Οξυγόνο
Ο₃	Όζον
ΟΝΑ	Οξεία Νεφρική Ανεπάρκεια
ΟΝΟΟ⁻	Υπεροξυνιτρώδες Οξύ
ΟΝΟΟΗ	Υπεροξυνιτρώδες Ανιόν
ΟΣ	Οξειδωτικό Στρες
ΠΑΝ	Περιφερική Αγγειακή Νόσος
ΠΚ	Περιτοναϊκή Κάθαρση
ΣΑΠ	Συστολική Αρτηριακή Πίεση
ΣΔ	Σακχαρώδης Διαβήτης
ΣΕΛ	Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
ΣΚΑ	Συμφορητική Καρδιακή Ανεπάρκεια
ΣΝ	Σπειραματονεφρίτιδα
ΧΝΝ	Χρόνια Νεφρική Νόσος



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



A. ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

A.1. Εισαγωγή

Η χρόνια νεφρική νόσος (ΧΝΝ) αποτελεί τεράστιο επιδημιολογικό πρόβλημα σε όλο τον κόσμο και κοστίζει πανάκριβα στις εθνικές οικονομίες, μιας και περισσότεροι από 1.6 εκατομμύριο (εκ.) ασθενείς υποβάλλονται σήμερα σε αιμοκάθαρση (ΑΜΚ) (1,2). Οι περισσότεροι από τους ασθενείς αυτούς (90%) ζουν στις αναπτυγμένες χώρες, ενώ 112 κράτη που αντιπροσωπεύουν πληθυσμό 600 εκ. παραμένουν χωρίς ΑΜΚ με αποτέλεσμα 1 εκ. ασθενείς να πεθαίνουν ετησίως από νεφρική ανεπάρκεια.

Τόσο η συχνότητα όσο και ο επιπολασμός βαίνουν αυξανόμενα παγκοσμίως κατά 5-8 % ετησίως (1) και υπολογίζεται ότι οι ασθενείς σε ΑΜΚ σε όλο το κόσμο από 1.1 εκ. το 2001 προβλέπεται να αυξηθούν σε 2 εκ. το 2010 (3). Το κόστος της ΑΜΚ στις ΗΠΑ είναι 66.000 δολάρια το χρόνο για κάθε ασθενή και για τη θεραπεία 600.000 αιμοκαθαιρομένων ασθενών το 2010 υπολογίζεται ότι θα ξοδεύονται περίπου 29 δισεκατομμύρια δολάρια το χρόνο (1,3). Σε παγκόσμιο επίπεδο αν υποθεθεί ότι αυτή η τιμή αντανakλά το μέσο κόστος/ασθενή, προβλέπεται ότι η δαπάνη για την ΑΜΚ παγκοσμίως θα αυξηθεί από 70-75 δισεκατομμύρια δολάρια το 2001 σε πάνω από 1 τρισεκατομμύρια δολάρια το 2010 (3).

Τα τελευταία χρόνια από συσσωρευμένες μαρτυρίες που προέρχονται από επιδημιολογικές μελέτες έγινε σαφές ότι η εξέλιξη της ΧΝΝ σε νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου με τη συνοδό καρδιαγγειακή νοσηρότητα και τον πρώιμο θάνατο είναι δυνατόν να προληφθούν ή να επιβραδυνθεί η εμφάνισή τους. Η διάγνωση της νεφρικής νόσου σε πρώιμα στάδια είναι δυνατόν να γίνει με απλές εργαστηριακές εξετάσεις. Η θεραπευτική παρέμβαση στα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη, στην επιβράδυνση και στη μείωση εμφάνισης των καρδιαγγειακών επιπλοκών, τόσο πριν όσο και μετά την έναρξη υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας. Δυστυχώς όμως τα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ χαρακτηρίζονται από έλλειψη συμπτωμάτων με αποτέλεσμα να υποδιαγιγνώσκονται και να υποθεραπεύονται. Για αυτό το λόγο προέκυψε η ανάγκη καθιέρωσης μιας γενικά αποδεκτής ταξινόμησης των σταδίων της ΧΝΝ και των μεθόδων μέτρησης της



νεφρικής λειτουργίας σε συνδυασμό με τη διερεύνηση παραγόντων κινδύνου που συμβάλλουν στην εξέλιξη της νεφρικής και της καρδιαγγειακής βλάβης στη ΧΝΝ.

A.2. Ορισμός - Στάδια και επιδημιολογία της ΧΝΝ

Το 2000 το National Kidney Foundation (NKF) συνέστησε μια ομάδα εργασίας με σκοπό να συντάξει οδηγίες για τη ΧΝΝ που θα είχαν σκοπό να:

1. Ορίσουν τη ΧΝΝ και να ταξινομήσουν τα στάδια της
2. Να προτείνουν μεθόδους μέτρησης της νεφρικής λειτουργίας
3. Να συσχετίσουν τα επίπεδα της νεφρικής λειτουργίας με τις διάφορες επιπλοκές της ΧΝΝ και
4. Να προσδιορίσουν παράγοντες κινδύνου που επιδρούν στην απώλεια της νεφρικής λειτουργίας και στην ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου (ΚΑΝ) στη ΧΝΝ

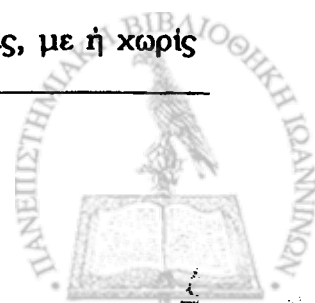
Οι κατευθυντήριες οδηγίες που συντάχθηκαν εξετάστηκαν από διάφορους επιλεγμένους οργανισμούς και φορείς ειδικών και εγκρίθηκαν από το Board of Directors του NKF το 2002 (4).

Σύμφωνα με τις K/DOQI οδηγίες ως ΧΝΝ ορίζονται οι καταστάσεις εκείνες που προσβάλλουν το νεφρό και είναι δυνατό να οδηγήσουν σε προοδευτική απώλεια της νεφρικής λειτουργίας ή σε επιπλοκές που απορρέουν από την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Ως εκ τούτου, ΧΝΝ ορίζεται η παρουσία νεφρικής βλάβης ή έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας για τρεις μήνες ή περισσότερο, ανεξαρτήτως από τη διάγνωση της πρωτοπαθούς νόσου.

Πιο αναλυτικά, ένας λειτουργικός ορισμός της ΧΝΝ πρέπει να περιλαμβάνει τα παρακάτω κριτήρια (Πίνακας 1):

Πίνακας 1. Ορισμός της ΧΝΝ - Κριτήρια

1. Νεφρική βλάβη για περισσότερο από 3 μήνες, όπως ορίζεται από λειτουργικές ή δομικές ανωμαλίες του νεφρού με ή χωρίς έκπτωση του GFR, πιστοποιημένα με:
 - Ιστοπαθολογικές ανωμαλίες, ή
 - Δείκτες νεφρικής βλάβης, συμπεριλαμβανομένων ανωμαλιών στη σύσταση του αίματος ή των ούρων ή ανωμαλιών στις απεικονιστικές μεθόδους
2. GFR <60 mL/min/1.73m² για περισσότερο από 3 μήνες, με ή χωρίς νεφρική βλάβη



Στον πίνακα 2 φαίνεται η ταξινόμηση των σταδίων της ΧΝΝ σε σχέση με το ρυθμό της πειραματικής διήθησης (GFR) και η επίπτωση των σταδίων αυτών στο γενικό πληθυσμό των ΗΠΑ. Τα στοιχεία αυτά για τα στάδια 1-4 προέρχονται από τη μελέτη NHANES III (Third National Health and Nutrition Examination Survey) που σχεδιάστηκε στις ΗΠΑ από το 1988 έως το 1994 για να ορίσει τη συχνότητα των διαφόρων σταδίων της ΧΝΝ στο γενικό πληθυσμό και περιελάμβανε 15.626 ενήλικες (5). Για το στάδιο 5 τα στοιχεία προέρχονται από το United States Renal Data System (USRDS) (1998) που συμπεριλάμβανε περίπου 230.000 ασθενείς σε ΑΜΚ και 70.000 ασθενείς πριν την ένταξη σε ΑΜΚ (6). Ο προσδιορισμός των σταδίων της ΧΝΝ στην κατάταξη αυτή έγινε χρησιμοποιώντας τον τύπο της MDRD (Modification of Diet in Renal Disease), για τον οποίο θα γίνει λόγος παρακάτω.

Πίνακας 2. Στάδια και επίπτωση της ΧΝΝ στις ΗΠΑ σε άτομα ≥20 έτη

Στάδιο	Περιγραφή	GFR (mL/min/1.73m ²)	Επιπολασμός	
		≥90 (με παράγοντες κινδύνου για ΧΝΝ)	N (1000s)	%
1.	Νεφρική βλάβη με φυσιολογικό ή ↑ GFR	≥90	5.900	3.3
2.	Νεφρική βλάβη με ήπια ↓ GFR	60-89	5.300	3.0
3.	Μέτρια ↓ GFR	30-59	7.600	4.3
4.	Βαριά ↓ GFR	15-29	400	0.2
5.	Νεφρική ανεπάρκεια	<15 (ή σε ΑΜΚ)	300	0.1

Από τον πίνακα 2 προσθέτοντας τα ποσοστά των ασθενών με διαφορετικά στάδια ΧΝΝ συνάγεται ότι το συνολικό ποσοστό των ασθενών στο γενικό πληθυσμό των ΗΠΑ με κάποιο βαθμό ΧΝΝ φθάνει περίπου το 11% (περίπου 19 εκ.) που είναι σχεδόν 60 φορές περισσότερο από τον αριθμό των ασθενών που καταλήγει σε ΑΜΚ. Τα στοιχεία αυτά είναι σημαντικά γιατί καταδεικνύουν ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ατόμων στο γενικό πληθυσμό των ΗΠΑ (5.9 εκ.) με ΧΝΝ σταδίου 1 που



έχουν φυσιολογικό GFR και είναι ασυμπτωματικοί. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, οι Coresh και συν. συνέκριναν τη δεξαμενή των ασθενών με ΧΝΝ στο διάστημα μεταξύ 1999 έως 2004 και 1988 έως 1994 και βρήκαν και για τις δύο περιόδους ότι ποσοστό λιγότερο από 2% κατέληξαν σε ΑΜΚ, ενώ για το 98% των ασθενών που δεν εξελίχθηκαν σε τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας οι πληροφορίες είναι σχεδόν ανύπαρκτες (7). Η μελέτη Kaser Permanente σε 30.000 άτομα με GFR κάτω από 90 mL/min/1.73m² έδειξε ότι μέσα σε μια πενταετία ποσοστό 1.1%, 1.3% και 19.9% των ατόμων με στάδιο 2, 3 και 4 ΧΝΝ αντίστοιχα κατέληξε σε θεραπεία υποκατάστασης, ενώ το ποσοστό των ασθενών που πέθαναν ήταν 19.5%, 24.3% και 45.7% για τα ίδια στάδια (8). Συνεπώς, ο θάνατος είναι πολύ πιο συχνός στους ασθενείς με πρώιμα στάδια ΧΝΝ συγκριτικά με την κατάληξη σε τελικό στάδιο ΧΝΝ. Για το λόγο αυτό ο αριθμός των ασθενών σε θεραπεία υποκατάστασης στα Αρχεία Καταγραφής Νεφροπαθών (Registries) δεν αντιπροσωπεύει επακριβώς το τεράστιο επιδημιολογικό πρόβλημα της ΧΝΝ.

Παρόμοιο με το ποσοστό της μελέτης NHANES III (11%) βρέθηκε να είναι το ποσοστό του επιπολασμού της ΧΝΝ και στο γενικό πληθυσμό στην Αυστραλία, Ιαπωνία, Ινδία και Σιγκαπούρη (9-12). Ορισμένες μελέτες ωστόσο, σχεδιάστηκαν για να προσδιορίσουν την επίπτωση της ΧΝΝ σε ειδικές ομάδες υψηλού κινδύνου με το σκεπτικό ότι μια τέτοια προσέγγιση θα ήταν πιο δικαιολογημένη για το αποτέλεσμα της και πιο συμφέρουσα οικονομικά. Έτσι, σε ιθαγενείς της Αυστραλίας στο νησί Tiwi, όπου η επίπτωση της ΧΝΝ είναι πενταπλάσια από τον γενικό πληθυσμό της Αυστραλίας και το 25% των θανάτων οφείλεται σε τελικό στάδιο ΧΝΝ, βρέθηκε ότι το ποσοστό της λευκωματουρίας έφθανε το 44% και η χορήγηση αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτασίνης I (ACEi) βελτίωσε την υπέρταση, τη λευκωματουρία και τη συνολική θνητότητα (13). Στους ινδιάνους Zuni στις ΗΠΑ, όπου η επίπτωση της ΧΝΝ είναι 17.400 ανά εκ. σε σύγκριση με 1.403 στο γενικό πληθυσμό (2), η συχνότητα της λευκωματουρίας ήταν 20% (14). Το πρόγραμμα KEEP (Kidney Early Evaluation Program) στις ΗΠΑ σχεδιάστηκε στο χρονικό διάστημα 1997-1999 για να προσδιορίσει την επίπτωση των διαφόρων σταδίων της ΧΝΝ σε ομάδες υψηλού κινδύνου και μέχρι το 2003 το ποσοστό βρέθηκε να είναι 46% σε περισσότερα από 22.000 άτομα που είχαν συμπεριληφθεί στη μελέτη (15). Από αυτούς, 27% είχαν λευκωματουρία, 16% είχαν αυξημένη



κρεατινίνη ορού (sCr) και 3% είχαν ευρήματα από τη γενική ούρων, συμπεριλαμβανομένης και της μικροσκοπικής αιματουρίας, χωρίς συμπτώματα.

Στην Ευρώπη υπολογίζεται ότι το 2002 περίπου 360.000 ασθενείς υποβάλλονταν σε θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας. Από αυτούς, 66% υποβάλλονταν σε AMK και οι υπόλοιποι ζούσαν με λειτουργούν νεφρικό μόσχευμα, ενώ στα 25 κράτη της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) περίπου 63.000 ασθενείς εντάχθηκαν σε AMK τον ίδιο χρόνο (16). Στις 25 χώρες της ΕΕ ο μέσος όρος των ασθενών που υποβάλλονταν σε AMK (δεξαμενή ασθενών) ήταν 786 ασθενείς ανά εκ. πληθυσμού (διακύμανση, Πορτογαλία 1.097 ασθενείς/εκ. πληθ., Ρωσία 79 ασθενείς/εκ. πληθ.), ενώ ο μέσος αριθμός των νέων ασθενών το χρόνο ήταν 137 ασθενείς ανά εκ. πληθυσμού (διακύμανση, Πορτογαλία 200 ασθενείς/εκ. πληθ., Ρωσία 15 ασθενείς/εκ. πληθ.). Αλλά, ότι ισχύει για τις ΗΠΑ ισχύει και για την Ευρώπη, ότι δηλαδή, ο αριθμός των ασθενών σε AMK υποεκτιμά σε μεγάλο βαθμό το συνολικό αριθμό των ασθενών με πρώιμα στάδια ΧΝΝ, δεδομένου ότι στην AMK γίνονται δεκτοί ασθενείς που είναι κατάλληλοι για θεραπεία ή «επιλέγονται» ανάμεσα σε αυτούς που δεν έχουν πεθάνει μέχρι να καταλήξουν σε τελικό στάδιο ΧΝΝ.

Στην Ευρώπη έγιναν αρκετές μελέτες για να προσδιορισθεί η επίπτωση της ΧΝΝ, οι πιο πολλές σε μικρό αριθμό ατόμων, τόσο στο γενικό πληθυσμό (17-21) όσο και σε επιλεγμένες ομάδες υψηλού κινδύνου (22-25). Σε πρόσφατη μελέτη στο Ηνωμένο Βασίλειο βρέθηκε ότι η επίπτωση της ΧΝΝ (sCr >2.03 mg/dL στους άνδρες και περισσότερο από 1.53 mg/dL στις γυναίκες) ήταν περίπου 5.554 ασθενείς/ εκ. πληθ., ενώ μόλις 626 ασθενείς/εκ. πληθυσμού κατέληξαν σε θεραπεία υποκατάστασης (19). Από τους ασθενείς αυτούς ποσοστό 85% δεν είχε εκτιμηθεί ποτέ από Νεφρολογικό Κέντρο και η μέση επιβίωση των ασθενών αυτών ήταν 28 μήνες. Σε μία άλλη μελέτη από την Ιταλία σε 1.632 ενήλικες στο γενικό πληθυσμό το ποσοστό των ατόμων με GFR <60 mL/min/1.73m² ήταν 4% και η ετήσια συχνότητα στα άτομα ηλικίας πάνω από 80 ήταν δεκαπλάσια συγκριτικά με άτομα ηλικίας 20-49 χρόνων (588 έναντι 58 / εκ. πληθ. αντιστοίχα), ενώ μόνο 54% των ασθενών είχε παραπεμφθεί σε Νεφρολόγο (21). Στο Southampton της Αγγλίας σε αναδρομική μελέτη 405.000 ατόμων στο γενικό πληθυσμό με sCr >1.7 mg/dL για 6 μήνες, η ετήσια συχνότητα ΧΝΝ ήταν 1.700 ασθενείς/εκ. πληθ. και η μέση επιβίωση ήταν 35 μήνες. Από αυτούς, μόνο 4% κατέληξαν σε θεραπεία



υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας (18). Η μελέτη PREVENT (Prospective Randomized Evaluation of the Vascular Effects of Norvasc Trial) στο Croningen της Ολλανδίας εκτίμησε στο μισό πληθυσμό της πόλης (σε περίπου 40.000 άτομα) τη συχνότητα της μικρολευκωματινουρίας που βρέθηκε να είναι 7%, ενώ το ποσοστό των ατόμων με $GFR < 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ ήταν 3.6% στην αρχή της μελέτης και 4.2% μετά από 4 χρόνια παρακολούθησης (26). Στην Ισλανδία σε 18.912 ενήλικες στο γενικό πληθυσμό η συχνότητα ατόμων με τιμή $sCr > 150 \text{ μmol/L}$ ήταν μόλις 0.22%, πολύ χαμηλότερη συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες μελέτες (17). Αυτό καταδεικνύει ότι η χρήση της sCr ως μοναδικό μέτρο εκτίμησης της νεφρικής λειτουργίας, όπως θα συζητηθεί παρακάτω, υποεκτιμά την ύπαρξη νεφρικής βλάβης σε ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με στάδια 1 και 2 ΧΝΝ ($GFR < 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$). Όλες οι παραπάνω μελέτες αποκαλύπτουν ότι ο αριθμός των ασθενών σε ΑΜΚ δεν αντανakλά τον πραγματικό αριθμό των ασθενών με πρώιμα στάδια ΧΝΝ στο γενικό πληθυσμό, οι οποίοι μπορεί να κυκλοφορούν ασυμπτωματικοί χωρίς να έχουν παραπεμφθεί ποτέ σε Νεφρολογικό Κέντρο για εκτίμηση.

Από τη στιγμή που εγκαθίσταται η ΧΝΝ πιστεύεται ότι αργά ή γρήγορα εξελίσσεται σε τελικό στάδιο ΧΝΝ. Ωστόσο, είναι εξαιρετικά σπάνιες οι διαχρονικές μελέτες που παρακολούθησαν τη φυσική εξέλιξη της ΧΝΝ στα διάφορα στάδια της και από τα αποτελέσματά τους δεν συνάγεται ότι το ένα στάδιο αποτελεί βιολογική συνέχεια του προηγούμενου σταδίου. Πιο συγκεκριμένα, οι γνώσεις μας για τη φυσική εξέλιξη του σταδίου 1 και 2 της ΧΝΝ είναι εξαιρετικά περιορισμένες γιατί τα στάδια αυτά διαδράμουν ασυμπτωματικά και σπανίως παραπέμπονται για εκτίμηση σε Νεφρολογικό Κέντρο. Έτσι, είναι άγνωστο σήμερα τι ποσοστό ασθενών με στάδιο 1 και 2 ΧΝΝ θα καταλήξουν σε τελικό στάδιο ΧΝΝ. Όσον αφορά στα προχωρημένα στάδια 3-5 της ΧΝΝ αυτά γνωρίζουμε ότι συνήθως καταλήγουν σε θεραπεία υποκατάστασης. Παρόλα αυτά όμως, υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει ότι ένα σημαντικό ποσοστό και αυτών των ασθενών μπορεί να διατηρήσουν σταθερή νεφρική λειτουργία. Μία μελέτη στο Sheffield έδειξε ότι σε ποσοστό 27%, 34% και 38% των ασθενών με στάδιο 3, 4 και 5 ΧΝΝ δεν επιδεινώθηκε η νεφρική τους λειτουργία σε διάρκεια παρακολούθησης 5 χρόνων (1). Συνεπώς, απαιτούνται μεγάλες καλά σχεδιασμένες προοπτικές μελέτες προκειμένου να διευκρινισθεί η



φυσική εξέλιξη της ΧΝΝ και οι παθοφυσιολογικές μεταβολές που παρακολουθούν την εξέλιξη αυτή.

Στην Ελλάδα, το 2002 υπολογίστηκε ότι ο αριθμός των ζώντων ασθενών (δεξαμενή ασθενών) και των νέων ασθενών που αρχίζουν θεραπεία υποκατάστασης κάθε χρόνο ήταν 841 ασθενείς/εκ. πληθ. και 165 ασθενείς/εκ. πληθυσμού αντίστοιχα, συγκαταλέγοντας τη χώρα μας στα κράτη με τα υψηλότερα ποσοστά στην Ευρώπη. Δυστυχώς όμως υπάρχει παντελής έλλειψη στοιχείων για τον αριθμό των ασθενών με τα διάφορα στάδια ΧΝΝ στο γενικό πληθυσμό. Από τις μελέτες στον υπόλοιπο πληθυσμό της Ευρώπης είναι πολύ πιθανό ο αριθμός των ασθενών αυτών να είναι πολλαπλάσιος από τους ασθενείς που υποδεχόμαστε για ΑΜΚ και οι περισσότεροι από αυτούς να πεθαίνουν πριν εκτιμηθούν από τα Νεφρολογικά Κέντρα της χώρας μας. Με αυτή τη δυσσίωνη διαπίστωση είναι φανερή η επιτακτική ανάγκη για επικέντρωση της ερευνητικής προσπάθειας στη μελέτη του τεράστιου επιδημιολογικού προβλήματος της ΧΝΝ στην Ελλάδα.

A.3. Μέθοδοι εκτίμησης της νεφρικής λειτουργίας

Η ταξινόμηση της ΧΝΝ σε 5 στάδια από το K/DOQI (Kidney Dialysis Outcomes Quality Initiative) έγινε δεκτή με ενθουσιασμό επειδή καθιέρωσε διεθνώς μία τυποποιημένη διαίρεση βασισμένη στα επίπεδα της νεφρικής λειτουργίας (4). Ωστόσο, υπάρχουν εγγενείς περιορισμοί στον ορισμό των σταδίων, κυρίως όσον αφορά στο στάδιο 1, όπου συμπεριλαμβάνονται άτομα με φυσιολογικό GFR και ελάχιστες λειτουργικές ή απεικονιστικές διαταραχές με αμφίβολη μακροχρόνια προγνωστική σημασία. Ίσως θα ήταν σκόπιμο να ορισθούν υποκατηγορίες ασθενών με συγκεκριμένες λειτουργικές ανωμαλίες, όπως αιματουρία ή μικρολευκωματινουρία και ασθενών με ήπια έκπτωση του GFR που θα διακρίνονται από το αν εξελίσσεται η νεφρική τους βλάβη ή αν η έκπτωση του GFR συνοδεύεται από παράγοντες κινδύνου εξέλιξης της νεφρικής βλάβης, όπως υπέρταση ή λευκωματινουρία (27). Είναι πολύ πιθανόν ότι στο άμεσο μέλλον ο ορισμός της ΧΝΝ και η ταξινόμησή της σε στάδια να χρειασθεί αναθεώρηση και κάτι τέτοιο αποτελεί ήδη αντικείμενο πρόσφατης θέσης του KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) (28). Στη μελέτη NHANES III μετρήσεις της



sCr στο γενικό πληθυσμό παρουσίασαν διακύμανση μέχρι 25% (5). Η εκτίμηση του GFR βασισμένη στη sCr πρέπει να τυποποιηθεί επαρκώς, ώστε να αποφεύγονται ανακρίβειες και μεγάλες διακυμάνσεις (29). Επίσης, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και πολλοί άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τις μετρήσεις της sCr, όπως το φύλο, η ηλικία, η φυλή, η μυϊκή μάζα, ο χρόνος της εξέτασης και η διαίτα. Έτσι, φαίνεται ότι η εκτίμηση του GFR και των σταδίων της ΧΝΝ πρέπει να γίνεται με τη χρήση τύπων που λαμβάνουν υπόψη τους παράγοντες αυτούς (30).

Υπάρχουν περίπου 25 διαφορετικοί τύποι για την εκτίμηση του GFR (31) και από αυτούς ορισμένοι φαίνονται στον πίνακα 3. Στην κλινική πράξη και στις περισσότερες πρόσφατες δημοσιεύσεις οι τύποι που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι ο τύπος Cockcroft-Gault (C-G) και ο τύπος που προέκυψε από τη μελέτη MDRD (30-33). Ωστόσο και οι δύο έχουν μειονεκτήματα όσον αφορά στην ακρίβεια να αντανakλούν σωστά τη σταδιοποίηση της ΧΝΝ σε σύγκριση με τη χρήση ραδιοϊσοτοπικών μεθόδων για τον προσδιορισμό του GFR.

Ορισμένα από τα προβλήματα που παρουσιάζουν οι τύποι αυτοί έχουν σχέση με την τυποποίηση της μεθοδολογίας για τη μέτρηση της sCr και την αξιοπιστία τους να αντανakλούν τα στάδια της ΧΝΝ σε διάφορες ομάδες ηλικιών και εθνοτήτων, σε μικρά παιδιά, σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ), σε ασθενείς με ακραίο σωματικό βάρος (παχυσαρκία ή κακή θρέψη) και σε άτομα με ήπια ή απουσία νεφρικής βλάβης (30-33).



Πίνακας 3. Τύποι προσδιορισμού του GFR με βάση την sCr	
Cockcroft-Gault	$(140 - \text{ηλικία}) \times \text{βάρους}/72 \times S_{cr}$ (x 0.85 για γυναίκες)
MDRD 1	$170 \times S_{cr}^{-0.999} \times \text{ηλικία}^{-0.176} \times S_u^{-0.170} \times \text{Alb}^{0.318}$ x (0.762 για γυναίκες) x (1.180 νέγρος)
MDRD 2	$186 \times S_{cr}^{-1.154} \times \text{ηλικία}^{-0.203} \times (1.212 \text{ νέγρος}) \times (0.742 \text{ για γυναίκα})$
Jelliffe	$98 - 0.8 \times (\text{ηλικία} - 20)/S_{cr}$ (x 0.90 για γυναίκα)
Jelliffe	Άνδρες: $100/S_{cr} - 12$ Γυναίκες: $80/S_{cr} - 7$
Mawer	Άνδρες: $\text{βάρους} \times [29.3 - (0.203 \times \text{ηλικία})] \times [1 - (0.03 \times S_{cr})]/$ $(14.4 \times S_{cr}) \times (70/\text{βάρους})$ Γυναίκες: $\text{βάρους} \times [25.3 - (0.175 \times \text{ηλικία})] \times [1 - (0.03 \times S_{cr})]/$ $(14.4 \times S_{cr}) \times (70/\text{βάρους})$
Bjornsson	Άνδρες: $[27 - (0.173 \times \text{ηλικία})] \times \text{βάρους} \times 0.07/S_{cr}$ Γυναίκες: $[25 - (0.175 \times \text{ηλικία})] \times \text{βάρους} \times 0.07/S_{cr}$
Gates	Άνδρες: $(89.4 \times S_{cr}^{-1.2}) + (55 - \text{ηλικία}) \times (0.447 \times S_{cr}^{-1.1})$ Γυναίκες: $(60 \times S_{cr}^{-1.1}) + (56 - \text{ηλικία}) \times (0.3 \times S_{cr}^{-1.1})$

Έτσι, οι περισσότεροι μελετητές συμφωνούν ότι ο τύπος MDRD πλεονεκτεί έναντι του τύπου C-G, διότι λαμβάνει υπόψη την επιφάνεια σώματος και τη φυλή (MDRD, 4 παράμετροι) και επιπλέον δίνει τη δυνατότητα να συνυπολογισθούν η ουρία και η αλβουμίνη του ορού (sAlb) που αντανακλούν καλύτερα την κατάσταση της θρέψης (MDRD, 6 παράμετροι). Επειδή η περιγραφή των πλεονεκτημάτων ή μειονεκτημάτων των τύπων αυτών ξεφεύγει από το σκοπό της παρούσας διατριβής, αρκεί να συνοψισθούν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

1. Σε τιμές $GFR > 60 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$ (στάδιο XNN 1) και σε άτομα με απουσία νεφρικής βλάβης ($GFR > 60 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$ και απουσία βιοχημικών ή απεικονιστικών ευρημάτων) ο τύπος MDRD υποεκτιμά το GFR, ενώ ο τύπος C-G τον υπερεκτιμά (31-34).
2. Η εφαρμογή των τύπων σε μελέτες στο γενικό πληθυσμό εμπεριέχει τον κίνδυνο να υπάρξει ψευδώς θετική κατάταξη φυσιολογικών ατόμων στο στάδιο 1 της XNN (35-37).
3. Σε τιμές $GFR < 30 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$ και κυρίως στους υπερήλικες, (στάδιο XNN 4 και 5) ο τύπος C-G υποεκτιμά το GFR, ενώ ο τύπος MDRD τον υπερεκτιμά (38).



4. Στους διαβητικούς ασθενείς ο τύπος MDRD πλεονεκτεί σαφώς έναντι του τύπου C-G (39,40).
5. Σε παιδιά κάτω των 12 ετών και οι δύο τύποι δεν εκφράζουν επαρκώς το GFR και πρέπει να προτιμώνται οι τύποι Schwartz και Counahan-Barratt (41,42).
6. Ο προσδιορισμός του GFR που στηρίζεται στη μέτρηση της συστατινης C μπορεί να πλεονεκτεί σε υψηλές τιμές GFR και κυρίως όταν τα στάδια της ΧΝΝ συσχετίζονται με τη CRP (C-reactive protein) και άλλους δείκτες της ΚΑΝ (32,33).
7. Σε ασθενείς με μυοπάθειες, ακρωτηριασμούς, καχεξία, σε μονάδες εντατικής θεραπείας, με μεταμόσχευση νεφρού και σε άλλες καταστάσεις, όπου ο GFR έχει ταχείες μεταβολές και διακυμάνσεις (απουσία steady state), οι τύποι MDRD και C-G δεν είναι ακριβείς και πρέπει να χρησιμοποιούνται με μεγάλη επιφύλαξη (32,43,44).

Αλλά ο σκεπτικισμός για τη χρήση των τύπων MDRD και C-G για όλους τους παραπάνω λόγους πρέπει να εστιαστεί λιγότερο στην ακρίβεια της μέτρησης και περισσότερο στο τι είναι εφικτό και εύχρηστο για την κλινική αξιολόγηση των ασθενών με ΧΝΝ και τη λήψη αποφάσεων. Και από αυτήν την άποψη είναι γενικά αποδεκτό ότι οι τύποι C-G και MDRD εξυπηρετούν αυτόν το σκοπό και βελτιώνουν την κατανόηση της νεφρικής λειτουργίας στη σχέση γιατρού-ασθενούς (32).



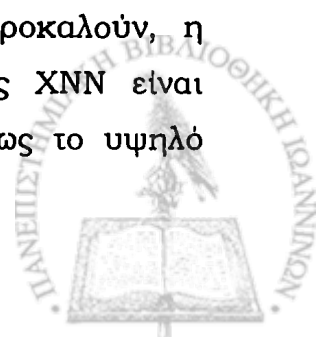
B. ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΘΝΗΤΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΧΝΝ

B.1. Ορισμός

Με τον όρο ΚΑΝ συνήθως ορίζεται ένα άθροισμα από διακριτές κλινικές οντότητες, όπως η στηθάγχη, το έμφραγμα μυοκαρδίου (ΕΜ), η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (ΣΚΑ), το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) και η περιφερειακή αγγειακή νόσος (ΠΑΝ) (45). Όσον αφορά στην καρδιά, παθοφυσιολογικά οι καταστάσεις αυτές διακρίνονται σε εκείνες που επηρεάζουν την καρδιακή παροχή αίματος (ισχαιμικές) και σε εκείνες που επηρεάζουν ανατομικά και λειτουργικά το τοίχωμα του μυοκαρδίου [υπερτροφία της αριστερής κοιλίας (LVH) και διάταση], χωρίς να αποκλείει αμοιβαία η μία την άλλη (46). Αλλά, εκτός από τις διαταραχές της καρδιάς και άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως η αρτηριοσκλήρυνση, η αθηρωμάτωση και μεταβολικά αίτια μπορεί να επηρεάσουν το αγγειακό δίκτυο. Έτσι, είναι προφανές ότι ο κλινικός ορισμός της ΚΑΝ δεν είναι σαφής και μπορεί να υποεκτιμά την αυξημένη αθηροσκλήρυνση που παρατηρείται στη ΧΝΝ (47).

B.2. Επιδημιολογία της ΚΑΝ στη ΧΝΝ

Την τελευταία δεκαετία η επιδημιολογία της ΚΑΝ στη ΧΝΝ απασχολεί όλο και περισσότερο την κλινική νεφρολογία, αφού είναι γνωστό ότι περίπου 50% των θανάτων οφείλονται σε καρδιαγγειακά αίτια (48). Οι ασθενείς με ΧΝΝ είναι ασθενείς υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση ΚΑΝ για αρκετούς λόγους όπως: α) στη ΧΝΝ η επίπτωση των παραγόντων κινδύνου για ανάπτυξη ΚΑΝ είναι μεγαλύτερη, β) η ίδια η ΧΝΝ θεωρείται παράγοντας κινδύνου για ΚΑΝ, γ) οι παράγοντες κινδύνου της ΚΑΝ προάγουν την εξέλιξη της ΧΝΝ προκαλώντας ένα φαύλο κύκλο για την περαιτέρω εξέλιξη της ΚΑΝ και δ) η παρουσία ΚΑΝ αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη ΧΝΝ (49). Ωστόσο, παρά το τεράστιο πρόβλημα της ΚΑΝ και των παραγόντων κινδύνου που την προκαλούν, η κατανόησή μας για την επίπτωσή τους στα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ είναι περιορισμένη, λόγω παραγόντων που ανταγωνίζονται την ΧΝΝ, όπως το υψηλό



ποσοστό θανάτων, η AMK, ο ατελής ορισμός της KAN και η απουσία προοπτικών μελετών με μεγάλη παρακολούθηση. Παρόλα αυτά όμως, υπάρχουν αρκετές μαρτυρίες που συνοψίζονται με αρκετές ανασκοπήσεις στα παρακάτω (45,50-53):

1. Ο κίνδυνος καρδιαγγειακού θανάτου σε ασθενείς με τελικό στάδιο ΧΝΝ ηλικίας πάνω από 85, 45-54 και 25-35 χρόνων είναι 5, 65 και 500 φορές μεγαλύτερος συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό.
2. Η επίπτωση της KAN στους ασθενείς σε AMK και περιτοναϊκή κάθαρση (ΠΚ) είναι 40%, με ετήσια θνητότητα 9%, που είναι 10-20 φορές μεγαλύτερη του γενικού πληθυσμού.
3. Στην έναρξη της AMK 52% των ασθενών έχουν ιστορικό KAN (ΣΚΑ 35%, ισχαιμική καρδιακή νόσος 32%, ΠΑΝ 17% και ΑΕΕ 10%).
4. Το ποσοστό των ασθενών με LVH στην έναρξη της AMK είναι συνήθως 75-80% [μισοί ασθενείς έχουν συγκεντρική υπερτροφία και οι άλλοι μισοί διάταση της αριστερής κοιλίας (LV)]. Το ποσοστό των ασθενών με φυσιολογικά ευρήματα στο υπερηχοκαρδιογράφημα είναι μόνο 16%, ενώ 15% έχουν συστολική δυσλειτουργία.
5. Η καρδιαγγειακή θνητότητα σε ασθενείς σε AMK έχει κλιμακωτή συσχέτιση (step-wise) με τη βαρύτητα των υπερηχοκαρδιογραφικών ευρημάτων στην έναρξη της AMK.
6. Η συχνότητα εμφάνισης νέων επεισοδίων/χρόνο ισχαιμικής καρδιακής νόσου, ΣΚΑ, ΑΕΕ και ΠΑΝ σε ασθενείς σε AMK είναι 10.2%, 13.6%, 2.2% και 14% αντίστοιχα.
7. Η KAN εμφανίζεται νωρίς από τα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ και εξελίσσεται παράλληλα με την εξέλιξη της ΧΝΝ.
8. Μελέτες που έγιναν στο γενικό πληθυσμό και σε άτομα με ήπια έως μέτρια ΧΝΝ έδειξαν ότι τα άτομα με ΧΝΝ έχουν 19-38% μεγαλύτερο κίνδυνο αθηροσκληρυντικών επιπλοκών και καρδιαγγειακού θανάτου συγκριτικά με άτομα με φυσιολογική νεφρική λειτουργία.

Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι η νεφρική και η καρδιακή βλάβη συνυπάρχουν και εξελίσσονται ταυτόχρονα. Η κατάσταση περιγράφεται τα τελευταία χρόνια ως «καρδιονεφρικό σύνδρομο» και θα περιγραφεί παρακάτω. Επίσης, είναι πια γνωστό ότι όταν οι ασθενείς με τελικό στάδιο ΧΝΝ καταλήγουν στην AMK εμφανίζουν μη αναστρέψιμες συνήθως καρδιαγγειακές διαταραχές που



τους οδηγούν σε σύντομο χρονικό διάστημα στο θάνατο. Είναι εύλογο, λοιπόν, το επιστημονικό ενδιαφέρον να εστιασθεί στην εκτίμηση των ασθενών αυτών για ΚΑΝ στα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ καθώς και στο πιθανό όφελος που θα προκύψει από αυτήν την προσέγγιση. Στην Ελλάδα δεν υπάρχει καμία προοπτική μελέτη που να καταγράφει το πρόβλημα της ΚΑΝ στη ΧΝΝ και αυτός είναι ένας από τους κύριους λόγους που μας ώθησαν να σχεδιάσουμε και να υλοποιήσουμε τη μελέτη αυτή.

Β.3. Η ΧΝΝ ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη ΚΑΝ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, προσφάτως έχει καθιερωθεί η αντίληψη ότι η ΧΝΝ είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη της ΚΑΝ που συνήθως επιδεινώνεται με την εξέλιξη της ΧΝΝ. Υπάρχει πληθώρα ευρημάτων από μελέτες στο γενικό και σε επιλεγμένο πληθυσμό με διαφορετικά στάδια ΧΝΝ που επιβεβαιώνουν αυτή τη συσχέτιση.

Σε μία μεγάλη μετα-ανάλυση τεσσάρων μελετών στο γενικό πληθυσμό (συμπεριλαμβανομένων της Framingham Heart Study και της Atherosclerosis Risk in Communities Study, ARIC) φάνηκε ότι μετρίου βαθμού ΧΝΝ σχετιζόταν με 19% υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακών επιπλοκών (54). Σε μία μελέτη στην Ιταλία σε 2.000 άτομα με ιδιοπαθή υπέρταση και οριακά φυσιολογική sCr, αύξηση της sCr κατά 0.23 mg/dl σχετίστηκε με 30% μεγαλύτερο κίνδυνο ΚΑΝ (55). Στη μελέτη Syst-Eur πτώση του GFR στους υπερήλικες είχε ως αποτέλεσμα 5% αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης de novo καρδιαγγειακών επιπλοκών (56), ενώ στη μελέτη VALIANT (Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial) πτώση του GFR κατά 10 ml/min/1.73m² σηματοδοτούσε 10% αύξηση των καρδιαγγειακών θανάτων, ανεξαρτήτως από τη θεραπεία ή μη με βαλοσαρτάνη και καπτοπρίλη (57). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και στην Canadian Heart Failure Study (58) και στη μελέτη Digitalis Intervention Group (59). Τέλος, η μελέτη των Go και συν. βασισμένη σε στοιχεία από το Kaser Permanente Renal Registry που συμπεριέλαβε 1.120.295 άτομα με GFR <60 ml/min/1.73m², έδειξε ότι μέσα σε μια πενταετία μόνο ένα μικρό ποσοστό περίπου 1% των ατόμων με ήπια προς μέτρια ΧΝΝ κατέληξε σε θεραπεία υποκατάστασης, ενώ το ποσοστό των ασθενών που πέθαναν κυρίως από αθηροσκληρωτικές επιπλοκές ήταν 19% και 24%



αντίστοιχα (60). Συνεπώς, ο θάνατος είναι πολύ πιο συχνός στους ασθενείς με πρώιμα στάδια ΧΝΝ συγκριτικά με την κατάληξη σε τελικό στάδιο ΧΝΝ.

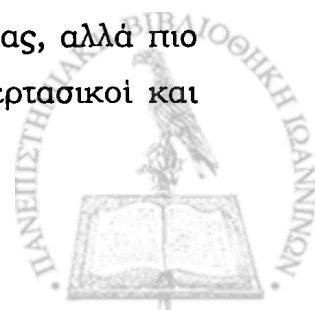
B.4. Καρδιονεφρικό σύνδρομο

Το καρδιονεφρικό σύνδρομο ως κλινική οντότητα δεν είναι πλήρως κατανοητό και δεν υπάρχει ορισμός που να είναι γενικά αποδεκτός. Ωστόσο, είναι σαφές ότι χαρακτηρίζεται από τη συνύπαρξη της έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας στα πλαίσια προχωρημένης ΣΚΑ, αν και αυτό από μόνο του δεν είναι δυνατό να αποδώσει την πολύπλοκη και αμφίδρομη αλληλοσυσχέτιση που υπάρχει μεταξύ των δύο οργάνων. Ήδη παραπάνω αναφέρθηκαν ευρήματα από μεγάλες μελέτες που αποδεικνύουν ότι η καρδιαγγειακή δυσλειτουργία κατά την εξέλιξη της νεφρικής βλάβης μπορεί να αρχίσει στα πρώιμα στάδια και όταν ο ασθενής καταλήγει στο τελικό στάδιο και στη θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας οι καρδιαγγειακές βλάβες είναι σοβαρές και συνήθως μη αναστρέψιμες. Αντίστροφα και πιο πρόσφατα, πολλές «καρδιαγγειακές» μελέτες στο γενικό πληθυσμό και σε επιλεγμένους πληθυσμούς ασθενών με καρδιακές παθήσεις, όπως με έμφραγμα ή μετά το ΕΜ, με στηθάγχη, μετά από στεφανιαία αγγειογραφία ή αγγειοπλαστική επέμβαση στεφανιαίων, καθώς και ασθενών υψηλού κινδύνου να αναπτύξουν ΚΑΝ έδειξαν ότι η συνύπαρξη ή η εμφάνιση έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας κυμάνθηκε από 2-64% (οι αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές παραθέτονται στο πίνακα 4).



Πίνακας 4. Επίπτωση ΧΝΝ σε πληθυσμούς με ΚΑΝ						
<i>Author</i>	<i>Study</i>	<i>Year</i>	<i>CVD pts</i>	<i>Study Condition</i>	<i>Definition of CKD</i>	<i>% CKD</i>
Matts et al (61)	POSCH	1993	417	Post-MI	Scr >1.4 mg/dl	3.2
Wright et al (62)	-	2002	3062	MI	Cl _{cr} ≤77 ml/min	43.2
Shlipak et al (63)	CCP	2002	13,00	Post-MI	Scr ≥1.5 mg/dl	36.7
Reis et al (64)	-	2002	1309	Angiogram	Scr 1.2-1.9 mg/dl	56.1
Best et al (65)	-	2002	5277	PCI	Cl _{cr} <70 ml/min	49.1
Anderson et al (66)	-	1999	3954	Post-CABG	Scr ≥1.5 mg/dl	17.3
Czezech et al (67)	BARI	2001	3608	CAD	Scr >1.5 mg/dl	2.1
Mann et al (68)	HOPE	2001	9287	High risk CVD	Scr ≥1.4 mg/dl	10.6
Tonelli et al (69)	CARE	2003	4156	Post-MI	Cl _{cr} ≤75 ml/min	41.1
Culleton et al (58)	FHS	1999	749	Population-based	Men: Scr >135 μmol/L Women: Scr >120 μmol/L	10.9 15.9
Shlipak et al (70)	CHS	2002	2449	Population-based	Men: Scr ≥1.5 mg/dl Women: Scr ≥1.3 mg/dl	15.1
Muntner (71)	NHANES	2002	351	Population-based	GFR <70 ml/min	63.5
Manjunath et al (72)	ARIC	2003	1382	Population-based	GFR <60 ml/min per 1.73m ²	6.2

Ωστόσο, η «συμβίωση» της δυσλειτουργίας των δύο οργάνων δεν αφορά μόνο στη συχνότητα, αλλά έχει επίπτωση και στην επιβίωση των ασθενών. Ήδη έχει περιγραφεί η αυξημένη θνητότητα από ΚΑΝ των ασθενών με ΧΝΝ και φαίνεται ότι αυτή η συσχέτιση είναι αμφίδρομη. Οι MacLealan και συν. έδειξαν ότι σε 755 ασθενείς που νοσηλεύονταν με ΣΚΑ η ΧΝΝ σχετιζονταν με αυξημένο κίνδυνο θανάτου κατά 26%, ενώ η ετήσια θνητότητα των ασθενών που είχαν ΧΝΝ και ΣΚΑ ήταν 45% (73). Σε μία άλλη προοπτική μελέτη με 372 ασθενείς με ΣΚΑ, βρέθηκε ότι ο κίνδυνος θανάτου στους ασθενείς που είχαν εκτιμώμενο GFR (eGFR) <44 ml/min/1.73m² ήταν τρεις φορές μεγαλύτερος συγκριτικά με αυτούς που είχαν eGFR >76 ml/min/1.73m² (74). Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν πρόσφατα ευρήματα, σύμφωνα με τα οποία, αύξηση της sCr ίση ή μεγαλύτερη από 0.3 mg/dl έχει 65% ευαισθησία και 81% εξειδίκευση στην πρόβλεψη ενδονοσοκομειακού θανάτου (75), ενώ πιο πρόσφατα φάνηκε ότι η έκπτωση του GFR μπορεί να προβλέψει τον κίνδυνο καρδιαγγειακού θανάτου καλύτερα από το κλάσμα εξώθησης και την ταξινόμηση κατά NYHA της καρδιακής ανεπάρκειας (ΚΑ) (76). Τέλος, σε ασθενείς με ΣΚΑ πολλά κλινικά χαρακτηριστικά μπορεί να είναι πιο συχνά σε αυτούς που εμφανίζουν επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας, αλλά πιο συχνά συνήθως οι ασθενείς αυτοί είναι υπερήλικες, διαβητικοί, υπέρταστοι και



έχουν αναιμία (77). Το επιμύθιο προφανώς, όλων αυτών των ευρημάτων είναι ότι η έγκαιρη εκτίμηση και η αποτελεσματική θεραπευτική παρέμβαση στις ομάδες υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη καρδιονεφρικής βλάβης μπορεί να εξασφαλίσει αμοιβαίο όφελος των δύο οργάνων και ίσως καλύτερη έκβαση της πορείας των ασθενών.

B.5. Παράγοντες κινδύνου της ΚΑΝ και της εξέλιξης της ΧΝΝ

Η αυξημένη καρδιαγγειακή θνητότητα στη ΧΝΝ μπορεί να εξηγηθεί μερικώς από τους παράγοντες κινδύνου που βρέθηκαν να σχετίζονται σημαντικά με την ΚΑΝ. Οι παράγοντες αυτοί περιγράφονται ως παραδοσιακοί και αναφέρονται στους παράγοντες που προέκυψαν από τη μελέτη Framingham και ως μη παραδοσιακοί που περιγράφηκαν πιο πρόσφατα και σχετίζονται με την ουραιμία (Πίνακας 5) (78).

Πίνακας 5. Παραδοσιακοί και μη- παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου εμφάνισης ΚΑΝ στη ΧΝΝ	
Παραδοσιακοί	Σχετιζόμενοι με την ουραιμία (μη- παραδοσιακοί)
Ηλικία	Μικρο- και μακρολευκωματουρία
Φύλο (άνδρες)	Λιποπρωτεΐνη(a), ισομορφές Apo-A
Υπέρταση	Λιποπρωτεϊνικά κατάλοιπα
Υψηλή LDL	Αναιμία
Χαμηλή HDL	Παθολογικός μεταβολισμός Ca/P
Σακχαρώδης Διαβήτης	Αύξηση εξωκυττάριου χώρου
Κάπνισμα	Ηλεκτρολυτικές διαταραχές
Έλλειψη φυσικής άσκησης	Οξειδωτικό στρες
Εμμηνόπαυση	Φλεγμονή
Οικογενειακό ιστορικό ΚΑΝ	Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία
	Κακή θρέψη
Υπερτροφία αριστερής κοιλίας	Αυξημένη θρομβογένεση
	Υπερδραστηριότητα συμπαθητικού

Στο γενικό πληθυσμό ποσοστό μέχρι και 75% επιπρόσθετου κινδύνου ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου μπορεί να εξηγηθεί από τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου (79). Ωστόσο, η χρήση των παραδοσιακών παραγόντων



κινδύνου δεν φαίνεται να είναι επαρκής στο να εξηγήσει το μέγεθος του προβλήματος της ΚΑΝ στη ΧΝΝ και το προγνωστικό μοντέλο που στηρίζεται στους παράγοντες κινδύνου της μελέτης Framingham δείχνει μάλλον φτωχή συσχέτιση με την εμφάνιση καρδιαγγειακών επεισοδίων στη ΧΝΝ (80,81). Επιπλέον, οι παραδοσιακοί παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου βρέθηκε να σχετίζονται με την έκβαση ασθενών σε ΑΜΚ προς την αντίθετη κατεύθυνση από την αναμενόμενη, ένα φαινόμενο που ορίσθηκε ως «αντίστροφη επιδημιολογία» (82).

Η ανάπτυξη όλων των παραδοσιακών και μη παραγόντων κινδύνου ξεφεύγει από το αντικείμενο της διατριβής αυτής που περιορίζεται στη μελέτη ορισμένων από τους παράγοντες που σχετίζονται με το ουραιμικό περιβάλλον, όπως είναι η απόπτωση, το οξειδωτικό στρες (ΟΣ) και η φλεγμονή και θα αναπτυχθούν εκτενώς παρακάτω. Από πληθώρα μελετών, φαίνεται ότι μη-παραδοσιακοί ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που σχετίζονται με την ουραιμία, μέσω του ΟΣ που προκαλούν και το οποίο έχει περιγραφεί ότι κατέχει κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της ΚΑΝ στην ΧΝΝ και χαρακτηρίστηκε από τον Himmelfarb ως ο «ελέφαντας στην ουραιμία» (83), οδηγούν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, αγγειακή αναδιαμόρφωση και τελικά στην «αθηρονεφρική κακοήθεια» με τη μορφή της επιταχυνόμενης αθηροσκλήρυνσης (84).

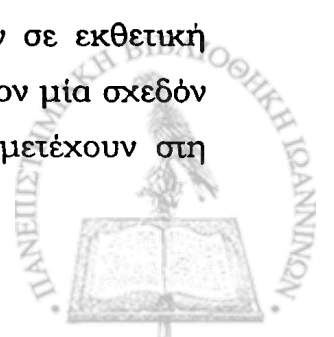


Γ. ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Γ.1. Εισαγωγή - Ορισμός

Ως απόπτωση ορίζουμε την ελεγχόμενη διαδικασία του γενετικά προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που επιτρέπει την ασφαλή απομάκρυνση των κυττάρων τη χρονική στιγμή, στην οποία έχουν ολοκληρώσει την προκαθορισμένη βιολογική τους λειτουργία (85). Αποτελεί ζωτικής σημασίας διαδικασία τόσο κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη, ανισταθμίζοντας τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των κυττάρων κατά τη μίτωση, όσο και κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής πολλών ζωντανών οργανισμών. Η απόπτωση μαζί με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αποτελούν τις πρωταρχικές λειτουργίες, στις οποίες βασίζονται η οργανογένεση, η άμυνα και η ομοιόσταση του οργανισμού (86). Ρυθμίζεται δε, από ποικίλους ενδοκυττάριους και εξωκυττάριους παράγοντες. Σε όλα τα στάδια της απόπτωσης, τα οποία θα αναφερθούν παρακάτω, τα ερεθίσματα και τα γονίδια που ενέχονται αλληλεπιδρούν και είτε ευοδώνουν είτε αναστέλλουν την απόπτωση. Όπως και για κάθε άλλο όργανο, η απόπτωση κατέχει καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη των νεφρών, ενώ η διαταραχή των μηχανισμών της έχει ενοχοποιηθεί για τη συμβολή της σε πολλές νεφρικές παθήσεις (87). Επιπλέον, στον άνθρωπο η διαταραχή της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση νεοπλασιών (88), φλεγμονωδών, αυτοάνοσων (89) και εκφυλιστικών παθήσεων (90).

Το 1972 ήταν η πρώτη φορά που μία ομάδα Παθολόγων στο Εδιμβούργο, οι Kerr, Wyllie και Currie, σε συνεργασία με τον J. Cormack (Καθηγητή ελληνικών του πανεπιστημίου του Aberdeen) πρότειναν την καθιέρωση του ορισμού της απόπτωσης προκειμένου να περιγράψουν τη μία από τις δύο μορφές κυτταρικού θανάτου (91). Η συνειδητοποίηση της μεγάλης σημασίας που έχει η απόπτωση για την ανθρώπινη φυσιολογία και παθολογία είχε ως συνέπεια μια μεγάλη ερευνητική προσπάθεια για την αποκρυπτογράφηση του φαινομένου και τη διευκρίνιση της σημασίας της απόπτωσης στην παθογένεια πληθώρας νοσημάτων. Από τότε έχουν μεσολαβήσει περισσότερο από τρεις δεκαετίες κατά τη διάρκεια των οποίων πάρα πολλά έχουν ανακαλυφθεί όσον αφορά στο ιδιαίτερα πολύπλοκο φαινόμενο της απόπτωσης. Εξελιγμένες γενετικές και μοριακές τεχνικές οδήγησαν σε εκθετική αύξηση της γνώσης για την απόπτωση, ώστε να έχει διαμορφωθεί πλέον μία σχεδόν ολοκληρωμένη άποψη για τα εκατομμύρια των γονιδίων που συμμετέχουν στη

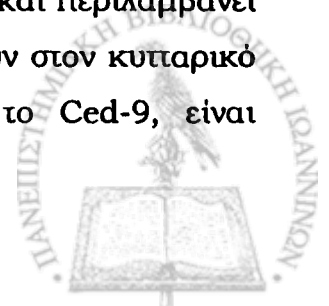


ρύθμιση της διαδικασίας του φαινομένου. Η προσπάθεια τώρα επικεντρώνεται στην κατανόηση των πολύπλοκων, αλληλεπιδρώντων μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών που τη διέπουν, με την ελπίδα ότι πιο λεπτομερής γνώση θα οδηγήσει στη σχεδίαση ειδικών στρατηγικών για την αντιμετώπιση των παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με την απόπτωση.

Γ.2. *Caenorhabditis elegans* – πρότυπο σύστημα μελέτης κυτταρικού θανάτου

Ο νηματώδης σκώληκας *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) προσφέρεται ως πρότυπο σύστημα για την ανάλυση της κυτταρικής και μοριακής βιολογίας των πολυκύτταρων οργανισμών. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη του *C.elegans* είναι αναπαραγόμενη και έχει χαρτογραφηθεί επακριβώς. Χίλια ενενήντα σωματικά κύτταρα ολοκληρώνουν την ανάπτυξη τελικά στον ενήλικα ερμαφρόδιτο σκώληκα και 131 από αυτά εμφανίζουν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (92). Ο θάνατος αυτών των κυττάρων είναι τόσο προβλέψιμος, όσο και η διαίρεση και διαφοροποίηση που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και αφού ο θάνατος είναι φαινόμενο που μπορεί να παρατηρηθεί στους ζωντανούς οργανισμούς με το μικροσκόπιο του Nomarski, γίνεται κατανοητό ότι η ανάλυση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στο *C.elegans* έχει προσφέρει σημαντικές πληροφορίες. Η εξέλιξη του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στο *C.elegans* παρουσιάζει σε πολλά επίπεδα ομοιότητες με την απόπτωση στα θηλαστικά.

Μεταλλαγμένοι σκώληκες έχουν απομονωθεί με διαταραχές σε διάφορα σημεία της διαδικασίας του κυτταρικού θανάτου, γεγονός που επέτρεψε την καταγραφή ενός γενετικού δρόμου του τελευταίου. Τα γονίδια που αναγνωρίστηκαν μπορούν να διαιρεθούν σε διάφορες ομάδες: γονίδια που εμπλέκονται στην πυροδότηση του κυτταρικού θανάτου, αυτά που συμμετέχουν στην ίδια τη διαδικασία του θανάτου, αυτά που χρειάζονται για τη φαγοκυττάρωση και τελικά αυτά που εμπλέκονται στην απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων. Όπως αναφέρθηκε, το φαινόμενο εμφανίζει πολλές ομοιότητες με την απόπτωση στα θηλαστικά, μόνο που σε αυτά η διαδικασία είναι πιο πολύπλοκη και περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό γονιδίων. Αρκετά από τα γονίδια που συμμετέχουν στον κυτταρικό θάνατο του σκώληκα έχουν κλωνοποιηθεί και ταξινομηθεί: το *Ced-9*, είναι

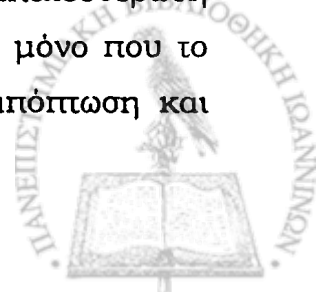


ανασταλτικό γονίδιο της απόπτωσης, ομόλογο με την οικογένεια πρωτεϊνών του Bcl-2 γονιδίου, ενώ το Ced-3 είναι ομόλογο με το μετατρεπτικό ένζυμο της ιντερλευκίνης-1β (93). Το γονίδιο Ced-4 έχει επίσης κλωνοποιηθεί και ταξινομηθεί και ενώ αρχικά δεν είχε βρεθεί σημαντική ομοιότητα με καμία από τις γνωστές πρωτεΐνες των θηλαστικών, πρόσφατα θεωρήθηκε ανάλογο του Araf-1. Βέβαια, παρά το γεγονός ότι ο *C.elegans* παρουσιάζει ομοιότητες με τα θηλαστικά δεν αποτελεί το τέλειο μοντέλο.

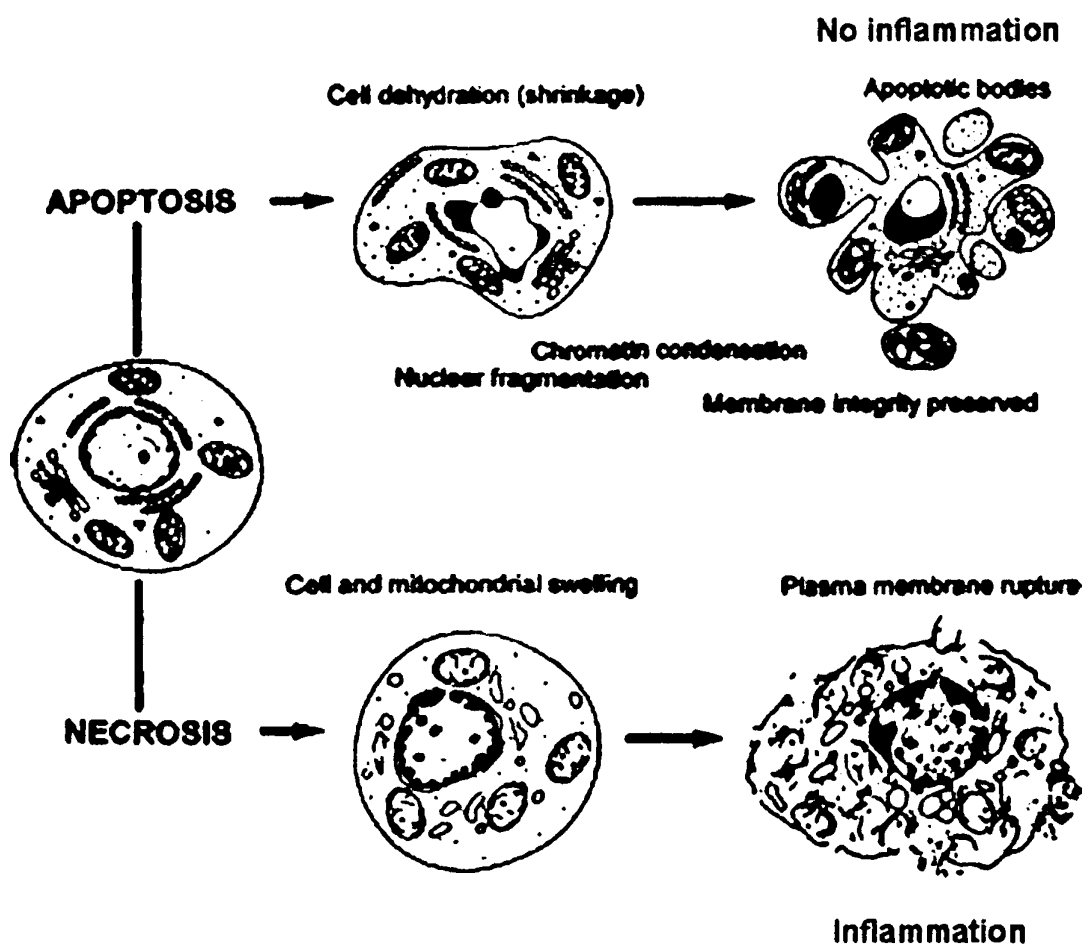
Γ.3. Απόπτωση – Νέκρωση: δύο διακριτά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου;

Είναι σημαντική η κατανόηση ότι και οι δύο όροι περιγράφουν μόνο «μορφολογικά» το φαινόμενο του θανάτου ενώ παραμένει το ενδεχόμενο οι δύο διαδικασίες να αποτελούν συνέχεια του ίδιου φαινομένου, με τη μορφολογική νέκρωση να αποτελεί την τελική μοίρα, ακόμα και για κύτταρα τα οποία εμφανίζουν αρχικά χαρακτηριστικά απόπτωσης (94).

Και οι δύο μορφές κυτταρικού θανάτου εμφανίζουν χαρακτηριστικό αριθμό μορφολογικών αλλαγών, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου ένα αποθνήσκον κύτταρο να χαρακτηριστεί ως νεκρούμενο ή αποπτωτικό. Η νέκρωση είναι αποτέλεσμα επίδρασης κάποιου βλαπτικού παράγοντα και αφορά όλα τα κύτταρα στο σημείο δράσης του παράγοντα αυτού. Τα νεκρούμενα κύτταρα στα τελικά στάδια χάνουν την κυτταροδομή τους με απελευθέρωση πρωτεασών, νουκλεασών και λυσοσωματικού περιεχομένου. Η χρωματίνη κροκιδώνεται και στη συνέχεια διασκορπίζεται. Τελικά, η διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης και η απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου και των προ-φλεγμονωδών κυττοκινών στο περιβάλλον οδηγεί στην προσέλκυση μονοκυττάρων και μακροφάγων στην περιοχή (95). Αντίθετα, η απόπτωση είναι εστιακό φαινόμενο και αφορά διάφορα κύτταρα μιας περιοχής και την κινητοποίηση ενός ενδογενούς προγράμματος αυτοκαταστροφής, το οποίο εκτελείται με τη συμμετοχή μιας σειράς προ-ενζύμων με σύγχρονη κατανάλωση ενέργειας. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η διάσπαση του πυρηνικού DNA που συνεπάγεται το θάνατο του κυττάρου χωρίς όμως να επέρχεται διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης ούτε και απελευθέρωση φλεγμονωδών στοιχείων στο περιβάλλον (Σχήμα 1). Στην περίπτωση μόνο που το αποπτωτικό κύτταρο δεν αναγνωρίζεται ή που συμβαίνει μαζική απόπτωση και



ανεπαρκής φαγοκυττάρωση, τότε επισυμβαίνει «δευτερογενής νέκρωση» και εμπλοκή πλήρους φλεγμονώδους απάντησης.

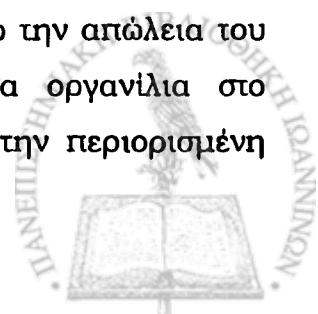


Σχήμα 1. Μορφολογικές αλλαγές στα δύο διακριτά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου: Απόπτωση - Νέκρωση

Γ.4. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποπτωτικών κυττάρων

Τα αποπτωτικά κύτταρα ακολουθούν χαρακτηριστική και διακριτή αλληλουχία μορφολογικών μεταβολών, οι οποίες είναι ίδιες ανεξαρτήτως του τύπου του κυττάρου ή της αιτίας που προκαλεί τη βλάβη.

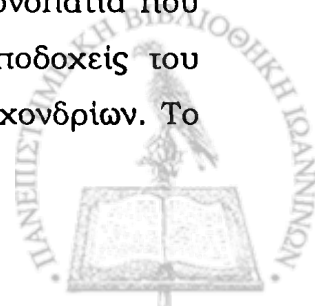
Σε πρώιμο στάδιο της απόπτωσης παρατηρείται συρρίκνωση του κυττάρου που οδηγεί σε αλλοιώσεις του μεγέθους και του σχήματος. Ακολουθεί η συμπίκνωση της χρωματίνης στο εσωτερικό του πυρήνα που συνοδεύεται από την απώλεια του πυρηνικού μανδύα και από τη διάσπαση του πυρήνα. Τα οργανίδια στο κυτταρόπλασμα παραμένουν ανέπαφα με μοναδική μεταβολή την περιορισμένη



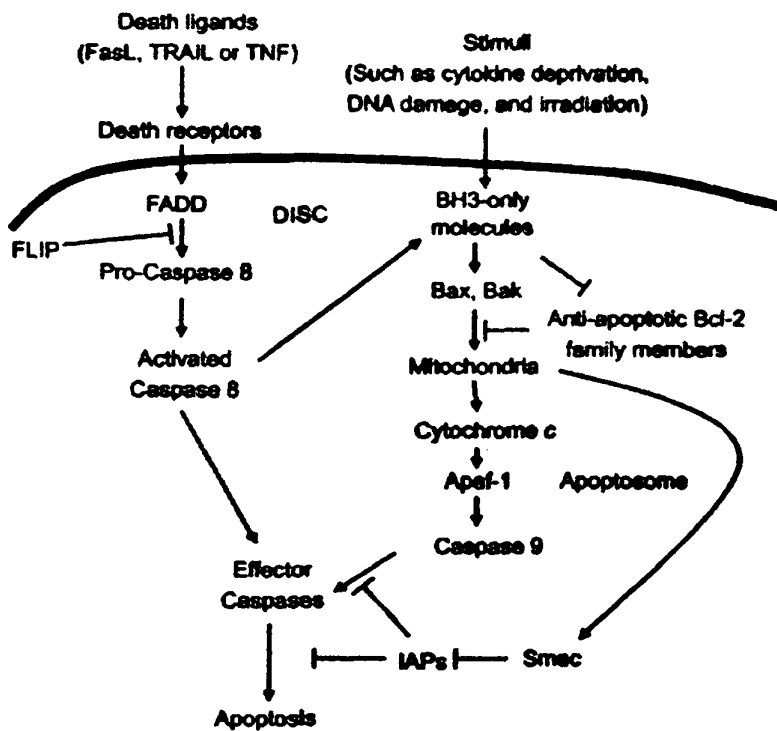
εξοίδηση του ενδογλασματικού δικτύου. Χαρακτηριστική είναι η διάσπαση του DNA σε μικρότερες μονάδες μεγέθους περίπου 180-200 bp (ζεύγη βάσεων), οι οποίες στην ηλεκτροφόρηση του DNA σε γέλη αгарόζης λαμβάνουν μία χαρακτηριστική κλιμακωτή διάταξη (ladder pattern). Η κυτταρική μεμβράνη παραμένει ακέραια, σε αντίθεση με τη νέκρωση, παρατηρούνται όμως ακανόνιστες προεκβολές (blebs) που τελικά αποσπώνται από το κυτταρικό σώμα ως αποπτωτικά σωματίδια (apoptotic bodies). Αυτά περικλείουν τα ακέραια στοιχεία του κυτταροπλάσματος και μερικές φορές συμπυκνωμένη χρωματίνη και φαγοκυτταρώνονται από διπλανά κύτταρα ή μακροφάγα (96,97). Με αυτόν το μηχανισμό, όπως αναφέρθηκε, δεν απελευθερώνονται ενδοκυττάρια ένζυμα στο περιβάλλον και αποφεύγεται η φλεγμονή που αποτελεί την κύρια διαφορά της απόπτωσης από τη νέκρωση. Χαρακτηριστικό των αποπτωτικών κυτάρων (και μάλιστα πριν την εμφάνιση της διάσπασης του DNA) αποτελούν κάποιες αλλαγές στη συμμετρικότητα των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης με την έκφραση πάνω στην επιφάνεια του κυτάρου μορίων φωσφατιδυλσερίνης, τα οποία ανιχνεύονται με χρώση φθορίζουσας Αννεξίνης V (98) καθώς και η εμφάνιση εγκοπών (nicks) που οφείλονται στη διάσπαση της διπλής έλικας του DNA, οι οποίες ανιχνεύονται με τη μέθοδο της τελικής τρανσφεράσης των 3' - άκρων (μέθοδος TUNEL – TdT-mediated dUTP nick-end labeling assay) (99).

Γ.5. Τα στάδια και οι μοριακοί μηχανισμοί της απόπτωσης

Η αρχική κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν το φαινόμενο της απόπτωσης ξεκίνησε από μελέτες που χρησιμοποίησαν ως πρότυπο σύστημα μελέτης κυτταρικού θανάτου το νηματώδη σκώληκα *C.elegans* (93). Οι μηχανισμοί αυτοί επεκτάθηκαν στη συνέχεια στα συστήματα των θηλαστικών και στον άνθρωπο. Μία πληθώρα πρωτεϊνών και ενζύμων έχουν αναγνωριστεί να συμμετέχουν στην έναρξη, στην ενίσχυση ή στην καταστολή της απόπτωσης (86). Στα περισσότερα κύτταρα, η πυροδότηση της απόπτωσης οδηγεί συνήθως στην ενεργοποίηση των κασπασών, η οποία οδηγεί τελικά στην αυτοκαταστροφή του κυτάρου, όπως περιγράφεται στη συνέχεια. Υπάρχουν δύο κύρια μονοπάτια που οδηγούν στην απόπτωση: ένα εξωγενές που ξεκινάει από τους «υποδοχείς του θανάτου» και ένα ενδογενές, το οποίο λαμβάνει χώρα μέσω των μιτοχονδρίων. Το



εξωγενές σηματοδοτικό μονοπάτι εξαρτάται από τη σύνδεση των κατάλληλων εξωγενών μεσολαβητών στους «υποδοχείς του θανάτου» που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου. Σε αντίθεση με το εξωγενές μονοπάτι, το ενδογενές, αποτελεί την απάντηση του κυττάρου σε ενδοκυττάρια σήματα, όπως βλάβες που προκαλούνται από ακτινοβολία και διάφορους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, με αποτέλεσμα την πυροδότηση της απόπτωσης μέσω απελευθέρωσης μιτοχονδριακών παραγόντων (Σχήμα 2).



Σχήμα 2.

Σχηματικό διάγραμμα των μοριακών μονοπατιών της απόπτωσης. Η αριστερή πλευρά του σχήματος απεικονίζει το εξωγενές σηματοδοτικό μονοπάτι, ενώ η δεξιά πλευρά, το ενδογενές μονοπάτι. Τα δύο μονοπάτια συγκλίνουν στην ενεργοποίηση των κασπασών

Το όλο φαινόμενο της απόπτωσης, από τη χρονική στιγμή δημιουργίας ενός αποπτωτικού ερεθίσματος ως την αυτοκαταστροφή του κυττάρου, μπορεί κάπως αυθαίρετα μιν, για λόγους κατανόησης δε, να διαιρεθεί σε τρία στάδια: της απόφασης, της δέσμευσης και της εκτέλεσης.



Γ.5.1. Το στάδιο της απόφασης

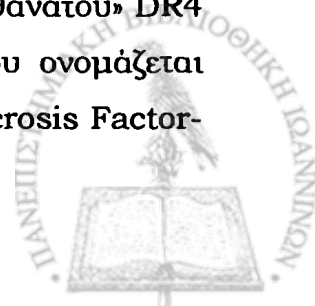
Το πρώτο στάδιο της απόπτωσης δεν ορίζεται από μορφολογικά κριτήρια. Πρόκειται περισσότερο για τη φάση που εικάζεται ότι συμβαίνει όταν εξωγενή και ενδογενή προ- και αντι-αποπτωτικά ερεθίσματα προσλαμβάνονται και γίνονται αντιληπτά από το κύτταρο. Ένας μεγάλος αριθμός μορίων εμφανίζει δράση σε αυτή τη φάση, η αναφορά των οποίων ακολουθεί.

Γ.5.1.α. Γονίδια ρυθμιστικά του κυτταρικού κύκλου

Πολλά από τα γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου κατέχουν σημαντικό ρόλο και στον έλεγχο του κυτταρικού θανάτου. Τα προϊόντα των γονιδίων c-myc, E2F, c-fos, ras και c-abl έχει φανεί ότι ελέγχουν κατά ένα βαθμό την ικανότητα των κυττάρων για απόπτωση (100). Οι ρυθμιστικές του κυτταρικού κύκλου πρωτεΐνες p53 και Rb μπορούν επίσης να επηρεάσουν την ικανότητα του κυττάρου για επιβίωση (101). Συγκεκριμένα, για το p53 έχει δειχθεί ότι ευοδώνει την απόπτωση λόγω επαγωγής των οξειδοαναγωγικών ενζύμων παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου και προκαλώντας τελικά ρήξη των μιτοχονδρίων (87).

Γ.5.1.β. Οι υποδοχείς θανάτου και συνδετικά μόρια

Οι υποδοχείς θανάτου είναι μέλη της υπερ-οικογένειας του παράγοντα νέκρωσης των όγκων, ο οποίος είναι και ο κυριότερος εξωγενής μεσολαβητής της απόπτωσης (TNF Receptor Superfamily, TNFRSF) (102). Κάθε ένας από τους TNFRSF συνδέεται με ένα ή περισσότερα συνδετικά μόρια θανάτου (death-ligands) (Πίνακας 6). Η σύνδεση αυτή αποτελεί και το έναυσμα της έναρξης του εξωγενούς μονοπατιού. Οι υποδοχείς θανάτου μπορούν να ενεργοποιήσουν σε δευτερόλεπτα τις κασπάσες και από το σημείο αυτό και μετά ο θάνατος του κυττάρου είναι θέμα ωρών. Τρία κύρια, ειδικά ζευγάρια υποδοχέων θανάτου-συνδετικών μορίων θανάτου έχουν περιγραφεί: α) Fas και Fas-ligand (FasL) (ο υποδοχέας Fas ονομάζεται επίσης Apo-1, CD95 ή TNFRSF6 και το μόριο FasL ονομάζεται διαφορετικά CD178, CD95L ή TNFSF6) (103,104), β) οι «υποδοχείς θανάτου» DR4 και DR5 και ο TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL που ονομάζεται επίσης Apo2L ή TNFSF10) (105,106) και γ) ο TNF-α και (Tumor Necrosis Factor-



α) ο TNF υποδοχέας (TNF-R1). Όλα τα μέλη της TNFRSF είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς τύπου I. Διαθέτουν ένα ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό τμήμα και ένα εξωκυττάριο αμινοτελικό τμήμα. Μια καθορισμένη περιοχή του ενδοκυττάριου αυτού τμήματος αποκαλείται περιοχή θανάτου (death domain, DD) και αυτό γιατί αποτελεί την περιοχή διασύνδεσης με άλλα μόρια για την ενεργοποίηση της απόπτωσης (107). Πιο συγκεκριμένα, η DD αποδείχθηκε ότι είναι μία περιοχή αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών, η οποία διευκολύνει τη σύνδεση ενός αριθμού από «προσαρμοσμένες» πρωτεΐνες (adaptor proteins) που εμπλέκονται στην παραγωγή σημάτων μέσα στο κύτταρο (108). Τα συνδετικά μόρια θανάτου είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου II (με εξαίρεση το LTaII) και ο προσανατολισμός τους είναι αντίστροφος από αυτόν των υποδοχέων (109).

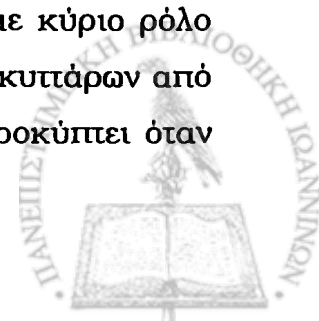
Οι υποδοχείς θανάτου που ευοδώνουν την απόπτωση υπάρχουν στην επιφάνεια του κυττάρου ως προ-σχηματισμένα τριμερή και έχει δείχθει ότι ο συγκεκριμένος τριμερής σχηματισμός επιτρέπει την ενεργοποίηση των υποδοχέων θανάτου με τη σύνδεση (110). Η σύνδεση των υποδοχέων οδηγεί στην απόπτωση μέσω ενός κοινού μεταγραφικού/μεταφραστικού-ανεξάρτητου μονοπατιού: η σύνδεση του συνδετικού μορίου θανάτου οδηγεί στο σχηματισμό του death-inducing signaling complex (DISC), το οποίο με τη σειρά του διασπά και ενεργοποιεί τις κασπάσες που συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της απόπτωσης (initiator caspases). Το σύμπλεγμα DISC αποτελείται από τον υποδοχέα Fas, μία πρωτεΐνη που ονομάζεται Fas-associated death domain (FADD) (11) και την προκασπάση 8. Η πρωτεΐνη FADD είναι μία «adaptor» πρωτεΐνη που μεσολαβεί στη μεταβίβαση των σημάτων από τα μέλη της TNFRSF που διαθέτουν DD. Κάθε βήμα του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης υφίσταται ρύθμιση. Πρωτεΐνες, όπως η ανασταλτική πρωτεΐνη που ονομάζεται FLICE-like inhibitory protein (FLIP) και η οποία ελέγχει την ενεργοποίηση της κασπάσης 8 από το Fas-DISC σύμπλεγμα (112), πρωτεΐνες μέλη της οικογένειας Bcl-2 καθώς και πρωτεΐνες αναστολές της απόπτωσης (inhibitors of apoptosis, IAPs) ελέγχουν και κάποιες φορές προλαμβάνουν την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών αναστέλλοντας έτσι το θάνατο του κυττάρου (113).



Πίνακας 6. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ TNF υποδοχέων και TNF συνδεδετικών μορίων θανάτου

Receptor	Interacting ligand	Signalling complex
TNF-R1 (<i>CD120a</i>)	TNF α , LT α	TRADD, RAIDD, TRAFs, RIP, cIAP1, SOD
TNF-R2 (<i>CD120b</i>) CD95 (<i>Fas/Apo1</i>)	TNF α , LT α CD95L	TRAFs, cIAP1, 2 FADD, RIP, Daxx, UBD-FAP, FAF-1, FAP-1, sentrin
DR3 (<i>ws1-1, APO-3, TRAMP, LARD</i>)	Apo3L/Tweak	TRADD
DR4 (<i>TRAIL-R1</i>)	TRAIL	TRADD, FADD, RIP
DR5 (<i>TRAIL-R2, TRICK2, KILLER</i>)	TRAIL	TRADD, FADD, RIP
DR6		TRADD, TRAFs?
Osteoprotegerin (<i>OPG, OCIF</i>)	TRAIL, TRANCE	Unknown
RANK	TRANCE (<i>ODF, RANKL, OPGL</i>)	TRAF1, 2, 3, 5, 6
CAR1	Unknown	Unknown
LT β -R	LT β	Unknown
GITR	Unknown	Unknown
CD27	CD70	TRAF2, 5
CD30	CD30L	TRAF1, 2
CD40	CD40L	TRAF2, 3, 5, 6
ATAR	Unknown	TRAF2, 5
4-IBB	4-IBBL	TRAF1, 2, 3
OX-40	OX-40L	TRAF2, 3, 5
p75 ^{NTR}	NGF	Unknown
DcR1 (<i>LIT, TRIDD, TRAIL-R3</i>)	TRAIL	Unknown
DcR2 (<i>TRUNDD, TRAILOR4</i>)	TRAIL	Unknown
DcR3	CD95L	Unknown

Εκτός από τις μορφές των υποδοχέων θανάτου και των συνδεδετικών μορίων τους που βρίσκονται δεσμευμένοι στην επιφάνεια των διαφόρων τύπων κυττάρων υπάρχουν και οι διαλυτές μορφές των πρωτεϊνών αυτών, οι οποίες αποκόπτονται από την επιφάνεια των κυττάρων με τη μεσολάβηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Όσον αφορά στον υποδοχέα θανάτου Fas, εκτός από τη διαμεμβρανική μορφή του έχει ανευρεθεί μία διαφορετική μορφή που ονομάζεται «εναλλακτικό μάτισμα (splicing) του Fas mRNA». Αυτή η μορφή στερείται διαμεμβρανικού τμήματος και πιθανολογείται ότι εκκρίνεται ως διαλυτή μορφή πρωτεΐνης (sFas) με κύριο ρόλο την παρεμπόδιση αλληλεπίδρασης Fas-FasL και την προστασία των κυττάρων από την Fas-επαγόμενη απόπτωση (114). Η διαλυτή μορφή του FasL προκύπτει όταν



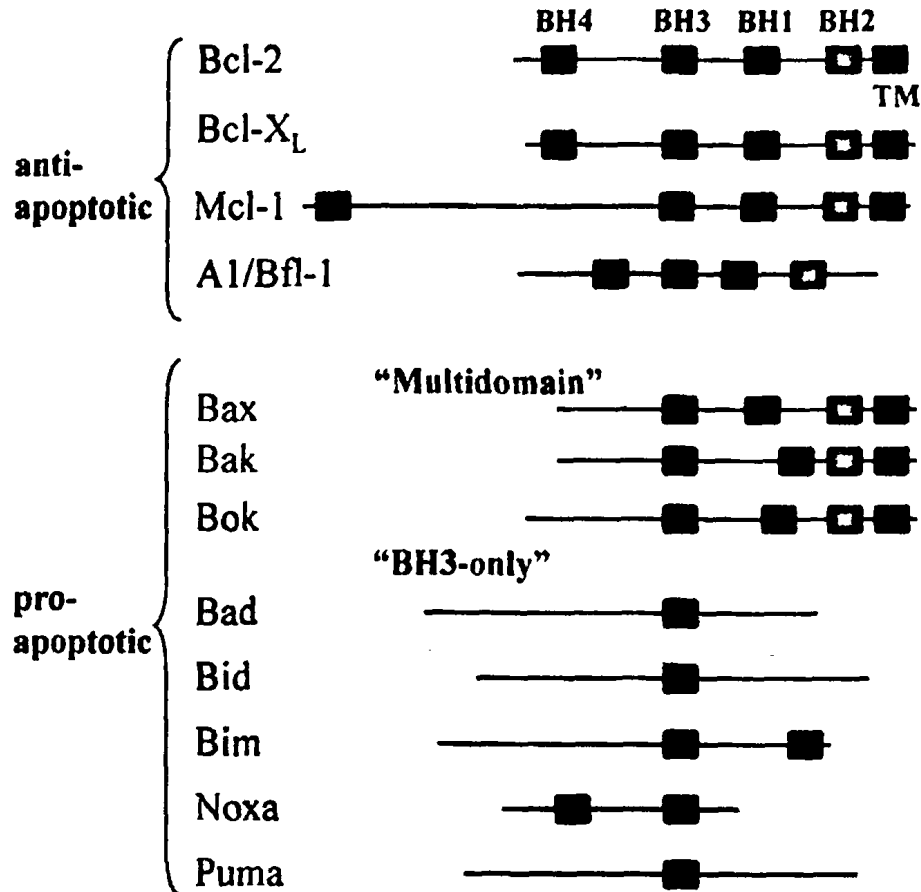
μία εξωγενής πρωτεΐνάση σερίνης της θεμέλιας ουσίας, η μεταλλο-πρωτεΐνάση 7 (MMP-7) κόβει το διαμεμβρανικό FasL σε μία συγκεκριμένη θέση. Η διαλυτή μορφή του FasL είναι λιγότερο ενεργή από τη διαμεμβρανική μορφή και δεν προκαλεί τον τριμερισμό του υποδοχέα ούτε τη δημιουργία του συμπλέγματος DISC (114). Όμοια με τις διαλυτές μορφές των Fas-FasL υπάρχει και η διαλυτή μορφή του συνδετικού μορίου TNF. Είναι μία ομοτριμερής κυττοκίνη, η οποία προκύπτει όταν η διαμεμβρανική πρωτεΐνη κόβεται από το μετατρεπτικό ένζυμο της μεταλλο-πρωτεΐνάσης TNF-α (TNF-α converting enzyme: TACE / ADAM17). Η διαλυτή αυτή τριμερής μορφή του TNF έχει την τάση να μειώνεται σε συγκεντρώσεις της τάξης των νανο-μορίων οπότε και κάνει τη βιολογική της ενεργότητα (115).

Γ.5.1.γ. Η οικογένεια των Bcl-2 μορίων

Η οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών κατέχει κριτικό ρόλο στον έλεγχο της απόπτωσης. Αποτελείται από προ-αποπτωτικά και αντι-αποπτωτικά μόρια και από το ισοζύγιο της έκφρασης τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό η απόφαση για την επιβίωση ή όχι του κυττάρου (116). Αρχικά, το Bcl-2 μόριο είχε ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο ως ογκογονίδιο που ενεργοποιούνταν από τη t(14;18) χρωμοσωμική μετάθεση στο θυλακιώδες λέμφωμα των B λεμφοκυττάρων (117).

Όλα τα μόρια της οικογένειας αυτής χαρακτηρίζονται από την παρουσία στο μόριό τους τουλάχιστον ενός από τα τέσσερα χαρακτηριστικά της οικογένειας μοτίβα που ονομάζονται «Bcl-2 ομόλογα υποτιμήματα» (Bcl-2 homology) και είναι τα BH1, BH2, BH3 και BH4. Η συνεχώς αυξανόμενη σε μέλη οικογένεια των Bcl-2 μορίων ταξινομείται σε τρεις υπο-οικογένειες με βάση την αλληλουχία των Bcl-2 ομόλογων υποτιμημάτων και τη δράση της κάθε πρωτεΐνης (Σχήμα 3).





Σχήμα 3. Η κατάταξη των Bcl-2 μορίων με βάση την αλληλουχία των Bcl-2 ομόλογων υπομημάτων και την δράση της κάθε πρωτεΐνης

Οι τρεις αυτές υπο-οικογένειες είναι οι εξής:

1. Η Bcl-2 υπο-οικογένεια, όλα τα μέλη της οποίας εμφανίζουν αντι-αποπτωτική δραστηριότητα και μοιράζονται ομόλογη αλληλουχία και στα τέσσερα Bcl-2 ομόλογα υπομημάτια. Σε αυτήν ανήκουν τα Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bcl-B, A1 και Mcl-1.
2. Η Bax υπο-οικογένεια, όλα τα μέλη της οποίας εμφανίζουν προ-αποπτωτική δραστηριότητα και μοιράζονται ομόλογη αλληλουχία στα τρία Bcl-2 ομόλογα υπομημάτια, BH1, BH2, BH3 αλλά όχι στο BH4, με εξαίρεση κάποια μέλη όπως το Mtd που εμφανίζουν κάποιες ομοιότητες στην αλληλουχία του BH4. Σε αυτήν ανήκουν τα Bax, Bak, Bcl-x_s, Bok και Bcl-G_L.

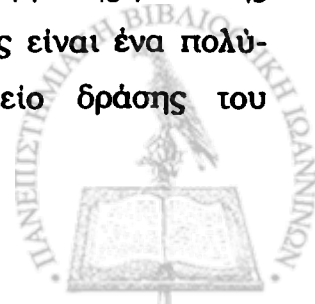


3. Η BH3 υπο-οικογένεια, όλα τα μέλη της οποίας εμφανίζουν προ-αποπτωτική δραστηριότητα και μοιράζονται ομόλογη αλληλουχία μόνο στο BH3 ομόλογο υποτομήμα. Σε αυτήν ανήκουν τα Bik, Bid, Bim, Noxa, Puma, Bcl-G_s, Blk, Bmf και Hrk.

Έχει φανεί ότι ο τρόπος με τον οποίο τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας αποφασίζουν για το αν ένα κύτταρο θα οδηγηθεί σε απόπτωση ή όχι επιτελείται μέσω δύο κύριων μηχανισμών, είτε μέσω του ετεροδιμερισμού μεταξύ των αντι-αποπτωτικών και προ-αποπτωτικών μορίων (118), είτε μέσω ανεξάρτητων δράσεων αυτών των πρωτεϊνών (119). Συγκεκριμένα, όσον αφορά στο δεύτερο μηχανισμό έχει δειχθεί από μελέτες σε Bcl-2 και Bax knockout και διαγονιδιακά ποντίκια ότι οι πρωτεΐνες αυτές ρυθμίζουν ανεξάρτητα την απόπτωση (120).

Όσον αφορά στις βιοχημικές δράσεις της οικογένειας των Bcl-2 μορίων έχει φανεί ότι τα αντι-αποπτωτικά μέλη αποκλείουν το ανοδικό μονοπάτι μετάδοσης του σήματος για την ενεργοποίηση των κασπασών (121) και επιπλέον φαίνεται να δρουν στις κασπάσες τις επιφέρουσες το τελικό αποτέλεσμα (effector ή executioner caspases) (122). Μετά τον εντοπισμό των Bcl-2 μορίων στα μιτοχόνδρια το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στις δράσεις αυτών των Bcl-2 μορίων και στο αποτέλεσμα των δράσεων αυτών στις λειτουργίες και ακεραιότητα των μιτοχονδρίων (123). Αξίζει να αναφερθούν τρεις κύριες δράσεις των Bcl-2 μορίων εντοπιζόμενων στα μιτοχόνδρια:

1. Η αποτροπή της απελευθέρωσης παραγόντων που ευοδώνουν την απόπτωση από την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Συγκεκριμένα, οι μιτοχονδριακές Bcl-2 και Bcl-x_L πρωτεΐνες εμποδίζουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη προς το κυτταρόπλασμα (124). Όταν το κυτόχρωμα c φθάνει στο κυτταρόπλασμα, ενώνεται με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη γνωστή ως Araf-1. Αυτό το σύμπλοκο ενσωματώνει και ενεργοποιεί την προ-κασπάση-9 ευοδώνοντας τον ολιγομερισμό της (125). Έτσι, αναστέλλεται και ο σχηματισμός ενός πολύπλοκου μακρομορίου που ονομάζεται αποπτώσωμα.
2. Η ρύθμιση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω της διαπερατότητας του μεταβατικού πόρου (PT), ο οποίος είναι ένα πολυ-πρωτεϊνικό κανάλι. Ο PT αποτελεί και το σημείο δράσης του

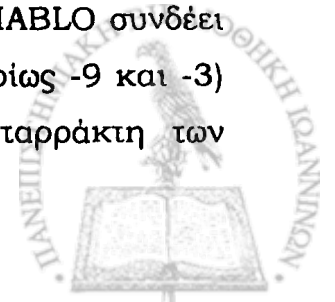


ανοσοκατασταλτικού φαρμάκου κυκλοσπορίνη Α, η οποία στοχεύει στην κυκλοφιλίνη, ένα από τα τμήματα του ΡΤ. Συγκεκριμένα, η κυκλοσπορίνη Α αναστέλλει τις εξαρτώμενες από το Ca^{2+} μιτοχονδριακές αλλαγές που προκαλούν τα πεπτιδία Bax, Bak και BH3 (126).

3. Πιθανή επίδραση στην F_0F_1 ATPase. Είναι πιθανό η F_0F_1 ATPase να ρυθμίζει έμμεσα τον ΡΤ μέσω ρύθμισης του ATP/ADP λόγου. Σε συνέχεια αυτής της υπόθεσης, το Bax μόριο δεν φαίνεται να δεσμεύει την F_0F_1 ATPase (127).

Γ.5.2. Το στάδιο της δέσμευσης

Σε αυτή τη φάση της απόπτωσης τα βασικά ερωτήματα που παραμένουν αναπάντητα, αφορούν στις μοριακές αλλαγές που συμβαίνουν στο κύτταρο που έχει δεσμευτεί να «αυτοκτονήσει» και στα μόρια που συμμετέχουν. Πιστεύεται ότι η φάση της δέσμευσης διαφέρει αναλόγως με το ερέθισμα και τον τύπο του κυττάρου. Ένα παράδειγμα αποτελούν τα ποντίκια που έχουν έλλειψη του μορίου Araf-1 και τα οποία εμφανίζουν περιγεννητική θνητότητα και βλάβες που αφορούν στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (128). Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι ο Araf-1 είναι σημαντικός στην ενεργοποίηση των κασπασών στην έναρξη της φάσης εκτέλεσης αν και η απουσία του φάνηκε ότι δεν εμποδίζει τον θάνατο που προκαλείται με τη μεσολάβηση των υποδοχέων θανάτου. Άρα, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο Araf-1 δεν είναι απαραίτητος για το θάνατο όλων των αποπτωτικών κυττάρων. Άλλοι υποψήφιοι ρυθμιστές της φάσης αυτής είναι το κυτόχρωμα c και ο παράγοντας ευόδωσης της απόπτωσης (apoptosis-inducing factor, AIF), τα οποία απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c δεν οδηγεί υποχρεωτικά σε απόπτωση, αφού όταν χορηγείται σε κύτταρα, αυτά δεν εμφανίζουν μορφολογικές αλλαγές χαρακτηριστικές της απόπτωσης σε απουσία άλλων προ-αποπτωτικών σημάτων (129). Ο πρόσφατα περιγραφόμενος παράγοντας με το όνομα Smac ή DIABLO αποτελεί ένα ακόμα παράδειγμα. Το μόριο αυτό συνδέει μία ιδιαίτερη κλάση IAPs οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναστείλουν την ενεργοποίηση των κασπασών που αποτελούν στόχο του. Ο Smac/DIABLO συνδέει τις IAPs που έχουν συνδεθεί με τις ενεργοποιημένες κασπάσες (κυρίως -9 και -3) και τις απομακρύνει εμποδίζοντας έτσι την αναστολή του καταρράκτη των



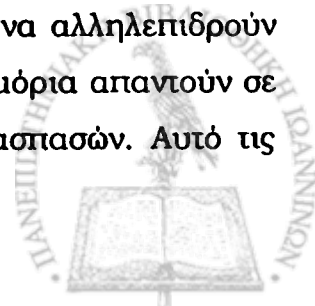
κασπασών (130). Η κασπάση-8, όμως δεν αποτελεί στόχο των IAPs και άρα η ενεργοποίηση του CD95 υποδοχέα που ενεργοποιεί την κασπάση-8 δεν θα επηρεαστεί από την παρουσία του Smac/ DIABLO (131).

Γ.5.3. Το στάδιο της εκτέλεσης

Το στάδιο αυτό ορίζει το χρονικό σημείο κατά το οποίο όλες οι μορφολογικές αλλαγές της απόπτωσης γίνονται εμφανείς (132). Οι κυριότεροι μεσολαβητές αυτής της φάσης είναι οι κασπάσες (133). Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες κυστεΐνης οι οποίες διασπούν το υπόστρωμά τους επί ασπαρτικού οξέος. Έχουν αναγνωριστεί 14 κασπάσες στα κύτταρα των θηλαστικών, εκ των οποίων οι 11 στον άνθρωπο, με ύπαρξη ομολόγων κασπασών στο νηματώδη σκώληκα, *C.elegans* και στη δροσόφylla. Οι κασπάσες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

1. σε αυτές που συμμετέχουν στα αρχικά στάδια της απόπτωσης, ενεργητικές (initiator ή apical), όπως είναι οι CASP2, CASP8 και CASP10 που διασπούν ανενεργές προ-κασπάσες ή κασπάσες που ανήκουν στην δεύτερη κατηγορία και τις ενεργοποιούν
2. σε αυτές που επιφέρουν το τελικό αποτέλεσμα, εκτελεστικές (effector ή executioner), όπως οι CASP3, CASP6, CASP7 που διασπούν άλλα πρωτεϊνικά υποστρώματα μέσα στο κύτταρο και οδηγούν σε απόπτωση (134)

Οι κασπάσες εμφανίζουν καταρράκτη δράσης, η έναρξη του οποίου ρυθμίζεται από τις initiator κασπάσες. Η αλληλουχία των κασπασών ρυθμίζεται σε προ-μεταφραστικό (pro-translational) επίπεδο εξασφαλίζοντας έτσι την ταχύτατη ενεργοποίησή τους. Αρχικά είναι ανενεργά ένζυμα, οι προ-κασπάσες που αποτελούνται από μία πρόδρομη περιοχή, μία βραχεία και μία μακρά υπομονάδα. Η διάσπαση των προ-κασπασών οδηγεί στη γένεση των δραστικών μορφών τους. Οι initiator κασπάσες έχουν μεγαλύτερο πρόδρομο τμήμα συγκριτικά με τις effector κασπάσες. Το πρόδρομο τμήμα των initiator κασπασών περιέχει τμήματα συναθροισμού (caspase recruitment domain – CARD) (παράδειγμα οι κασπάσες -2 και -9) ή τμήματα που αποκαλούνται death effector domain – DED (παράδειγμα οι κασπάσες -8 και -10), τα οποία διευκολύνουν τις κασπάσες να αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια που ρυθμίζουν την ενεργοποίησή τους. Αυτά τα μόρια απαντούν σε ερεθίσματα, τα οποία προκαλούν τη διάσπαση των initiator κασπασών. Αυτό τις



επιτρέπει να αυτό-ενεργοποιούνται ώστε να μπορούν εν συνεχεία να ενεργοποιούν τις effector κασπάσες.

Ο καταρράκτης των κασπασών μπορεί να ενεργοποιηθεί από:

1. το granzyme B (που εκκρίνεται από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα), το οποίο έχει δείχθει ότι ενεργοποιεί τις κασπάσες -3 και -7
2. τους υποδοχείς θανάτου (όπως οι Fas, TRAIL υποδοχείς και TNFR), οι οποίοι μπορούν να ενεργοποιήσουν τις κασπάσες -8 και -10
3. το αποπτώσωμα (το οποίο ρυθμίζεται από το κυτόχρωμα c και τη Bcl-2 οικογένεια) που ενεργοποιεί την κασπάση -9

Τα ακόλουθα μόρια αποτελούν κάποιους από τους τελικούς στόχους των effector κασπασών (135):

1. πυρηνικές λαμινίνες (lamins) (πρωτεΐνες που συντηρούν το σχήμα του πυρήνα και μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ χρωματινής και πυρηνικής μεμβράνης)
2. ICAD/DFF45 (Inhibitor of Caspase Activated DNase ή DNA Fragmentation Factor 45)
3. PARP [Poly(ADP) Ribose Polymerase] (ένζυμο σημαντικό στην επανόρθωση του DNA)
4. PAK2 (P21-Aktivated Kinase 2)

Η ακριβής συνεισφορά της διάσπασης πολλών υποστρωμάτων των κασπασών στη βιοχημεία και στη μορφολογία της απόπτωσης εξακολουθεί να παραμένει αδιευκρίνιστη. Παρόλα αυτά, η λειτουργία του ICAD/DFF45 είναι να αναστείλει τη λυσιτελή δράση της ενδονουκλεάσης CAD/DFF40 (Caspase Activated DNase DNA Fragmentation Factor 40). Η διάσπαση και η απενεργοποίηση του ICAD/DFF45 από μία κασπάση, όπως η κασπάση-3, επιτρέπει στο CAD να εισέλθει στον πυρήνα και να προκαλέσει τη διάσπαση του DNA, το οποίο παίρνει τη χαρακτηριστική κλιμακωτή διάταξη (ladder pattern). Έτσι ολοκληρώνεται η αποπτωτική διαδικασία.



Γ.6. Η απόπτωση σε παθολογικές καταστάσεις και στα νεφρικά νοσήματα

Η ρήξη του ισοζυγίου μεταξύ των προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών παραγόντων που ρυθμίζουν την απόπτωση πιθανολογείται ότι αποτελεί την κύρια αιτία εμφάνισης μεγάλου αριθμού νοσηρών καταστάσεων. Έχει αποδειχθεί πλέον, ότι η απόπτωση διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παθογένεια, στην έκβαση και στην αντιμετώπιση μεγάλου αριθμού νοσημάτων με τεράστιο κοινωνικό αντίκτυπο. Στον πίνακα 7 αναφέρονται νοσήματα, τα οποία αποδεδειγμένα ως σήμερα σχετίζονται με διέγερση ή αναστολή της απόπτωσης (87)

Πίνακας 7. Νοσήματα που σχετίζονται με αναστολή ή διέγερση της απόπτωσης	
Αναστολή Απόπτωσης	Αυξημένη Απόπτωση
<ol style="list-style-type: none"> 1. Καρκίνος <ul style="list-style-type: none"> Θυλακιώδη λεμφώματα Καρκινώματα με μεταλλάξεις p53 Αιματολογικές κακοήθειες Λέμφωμα Ορμονοεξαρτώμενοι όγκοι Καρκίνος μαστού Καρκίνος προστάτη Καρκίνος ωοθηκών 2. Αυτοανοσοποιητικές διαταραχές <ul style="list-style-type: none"> Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ) Ανοσολογικής αιτιολογίας ΣΝ Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου I 3. Λοιμώξεις με ιούς <ul style="list-style-type: none"> Ερπητοϊοί Αδενοϊοί Ιός της ευλογιάς 	<ol style="list-style-type: none"> 1. AIDS 2. Εκφυλιστικές δια/χές νευρικού συστήματος <ul style="list-style-type: none"> Νόσος του Alzheimer Νόσος του Parkinson Πλαγιοαμυνοτροφική σκλήρυνση Μελαγχρωστική αμφι/πάθεια Εκφύλιση παρεγκεφαλίδας Σχιζοφρένεια 3. Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα <ul style="list-style-type: none"> Απλαστική αναιμία 4. Ισχαιμική βλάβη <ul style="list-style-type: none"> Έμφραγμα μυοκαρδίου Εγκεφαλικό επεισόδιο Βλάβη επαναιμάτωσης 5. Τοξική ηπατίτιδα <ul style="list-style-type: none"> Αλκοόλη

Η εκτενέστερη αναφορά στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που εμφανίζουν οι μηχανισμοί της απόπτωσης σε κάθε ένα από τα ανωτέρω νοσήματα, αν και παρουσιάζει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον, ξεφεύγει από το στόχο του παρόντος συγγράμματος. Αξίζει στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι η ερευνητική προσπάθεια των επιστημόνων, εκτός από τη διευκρίνιση του μηχανισμού της απόπτωσης στην παθογένεια των νόσων έχει στραφεί και στην ανακάλυψη θεραπευτικών στρατηγικών που μέσω της ρύθμισης της απόπτωσης θα μπορούσαν να έχουν ευεργετικό αποτέλεσμα στην αντιμετώπιση των νόσων στις οποίες αυτή εμπλέκεται (85).



Η διαταραχή της ρύθμισης της απόπτωσης έχει ενοχοποιηθεί για τη συμβολή της στην παθογένεια σημαντικού αριθμού νεφρικών νοσημάτων τα οποία παρατίθενται στον πίνακα 8 (87).

Πίνακας 8. Απόπτωση στα νεφρικά νοσήματα

1. Πολυκυστική νόσος των νεφρών
 2. Οξεία νεφρική ανεπάρκεια (ενδοτοξιναιμία, νεφροτοξικοί παράγοντες, φάρμακα, ακτινοβολία, ισχαιμία/επαναιμάτωση)
 3. Σπειραματονεφρίτιδα (υποστροφή σπειραματικής υπερπλασίας, απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών)
 4. Νεφροπάθεια του ΣΕΛ
 5. Οξεία και χρόνια απόρριψη νεφρικού μοσχεύματος
 6. Νεφροπάθεια συνδρόμου ανοσοανεπάρκειας
 7. Καρκινώματα νεφρού
 8. Χρόνια αποφρακτική ουροπάθεια
 9. Τμηματική νεφρική δυσπλασία
 10. Διαβητική νεφροπάθεια
 11. Εξέλιξη νεφρικής βλάβης
-

Όσον αφορά στην πολυκυστική νόσο των νεφρών αυτή χαρακτηρίζεται από δημιουργία νεφρικών κύστεων, διάμεση ίνωση και σταδιακή απώλεια φυσιολογικού νεφρικού ιστού σε συνδυασμό με προοδευτική επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας. Η υπεύθυνη διαδικασία για τη σταδιακή απώλεια φυσιολογικού νεφρικού ιστού δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί αλλά έχει δείχθει ότι μπορεί να είναι αποτέλεσμα του φαινόμενου της απόπτωσης (136). Οι Woo και συν. σε δείγματα νεφρικού ιστού από ασθενείς με πολυκυστική νόσο των νεφρών, χρησιμοποίησαν τη μέθοδο TUNEL και έδειξαν ότι η απόπτωση είναι αυξημένη στα νεφρικά σπειράματα, στα τοιχώματα των κύστεων, καθώς και στα κυστικά και μη κυστικά σωληνάκια των ασθενών αυτών. Πιθανολόγησαν με βάση τα αποτελέσματά τους ότι η αύξηση της απόπτωσης σχετίζεται και με την προοδευτική επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας. Σε ασθενείς με την αυτοσωματική επικρατούσα μορφή της πολυκυστικής νόσου των νεφρών έχει μετρηθεί αυξημένη έκφραση των γονιδίων c-myc και Bcl-2 έως και 15 με 20 φορές, ενώ δεν υπήρχε σημαντική μεταβολή στην έκφραση του μορίου p53. Προφανώς όμως η αύξηση της έκφρασης του αντι-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-2 δεν ήταν ικανή να αναστείλει την απόπτωση (137). Σε πειραματικό επίπεδο, πολλά διαγονιδιακά μοντέλα πειραματόζων έχουν δημιουργηθεί με σκοπό τη μελέτη των μηχανισμών της πολυκυστικής νόσου των νεφρών. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι διαγονιδιακά πειραματόζωα με υπερέκφραση



του ογκογονιδίου c-myc αναπτύσσουν πολυκυστικούς νεφρούς, ανεξάρτητα από τη δράση του Bcl-2 και του p53 (138,139).

Η ισχαιμική οξεία νεφρική ανεπάρκεια (ONA) που ακολουθείται από την επαναιμάτωση του νεφρικού ιστού αποτελεί συχνό κλινικό πρόβλημα, το οποίο εξακολουθεί να σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα. Ο συνδυασμός ισχαιμίας/επαναιμάτωσης (I/E) ενεργοποιεί μία πολύπλοκη αλληλουχία γεγονότων, τα οποία οδηγούν στη βλάβη και μοιραία στο θάνατο των νεφρικών κυττάρων και κυρίως των σωληναριακών νεφρικών κυττάρων, ο οποίος επέρχεται ως συνδυασμός απόπτωσης και νέκρωσης (140,141). Η απόπτωση όμως παρατηρείται στη συνέχεια και στη φάση ανάρρωσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι παίζει κάποιο ρόλο στην απομάκρυνση των περίσσιων υπερπλαστικών, επιθηλιακών κυττάρων συνεισφέροντας έτσι στην ανάκτηση της σωληναριακής μορφολογίας (142). Στην προσπάθεια διαλεύκανσης των μηχανισμών που συμμετέχουν στην παθογένεια του φαινομένου έχουν περιγραφεί πολλά πειραματικά μοντέλα ισχαιμικής ONA, τα οποία και επιβεβαιώνουν τη συμμετοχή της απόπτωσης στις βλάβες των νεφρικών κυττάρων ενώ κάποια από αυτά προσπαθούν χρησιμοποιώντας αναστολείς της απόπτωσης να μειώσουν την έκταση της βλάβης. Οι Gobé και συν. (143) σε μοντέλο ισχαιμικής ONA σε αρουραίους εκτίμησαν την έκφραση προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών παραγόντων της οικογένειας Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L, Bax), καθώς και την έκφραση αυξητικών παραγόντων [EGF, IGF-1, TGF-β (transforming growth factor-β)]. Διαπίστωσαν λοιπόν, αύξηση της απόπτωσης τόσο στο εγγύς όσο και στο άπω σωληνάριο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, καθώς και ανάλογη αύξηση της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων. Μία άλλη ομάδα ερευνητών σε μοντέλο ισχαιμικής ONA σε αρουραίους, έδειξε ότι το μόριο p53 αποτελεί σημαντικό μεσολαβητή της απόπτωσης κατά το στάδιο της έλλειψης του GTP (Guanosine triphosphate), ενώ η χορήγηση του αναστολέα του p53 που ονομάζεται πιφιθρίνη-α, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ενεργοποίησης της μεταγραφής στόχων του όπως οι p21 και Bax καθώς και την αναστολή της μετακίνησης του p53 προς τα μιτοχόνδρια (144). Πρόσφατα, οι Spandou και συν. έδειξαν ότι σε αρουραίους που είχαν υποστεί ισχαιμική νεφρική βλάβη και εν συνεχεία επαναιμάτωση, η βλάβη αυτή οδήγησε σε αύξηση της απόπτωσης που εκτιμήθηκε με τη μέθοδο TUNEL, την ανοσοϊστοχημική εντόπιση των μορίων Bax και NF-κβ και με βάση τα



μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποπτωτικών κυττάρων. Επιπλέον, έδειξαν ότι η προηγούμενη χορήγηση ερυθροποιητίνης (EPO) σε μία ομάδα αρουραίων περιορίζει το μέγεθος της βλάβης των νεφρικών σωληναρίων σε σχέση με την ομάδα που δεν έλαβε EPO (145). Τέλος, έχει δειχθεί ότι οι κασπάσες 1 και 3 είναι βασικοί μεσολαβητές στο μονοπάτι του θανάτου είτε μέσω νέκρωσης είτε μέσω απόπτωσης και ότι κατέχουν ρόλο κλειδί στην νεφρική βλάβη από I/E (146).

Η απόπτωση έχει περιγραφεί σε αρκετά πειραματικά μοντέλα σπειραματονεφριτίδων (ΣΝ), καθώς και σε βιοψίες ασθενών που έπασχαν από διάφορες μορφές ΣΝ. Πιστεύεται ότι η δράση της απόπτωσης μπορεί να είναι τόσο ευεργετική, όσο και καταστροφική όσον αφορά στις διάφορες μορφές ΣΝ (147). Η απόπτωση είναι γνωστό ότι παρατηρείται στο νεφρό στα πλαίσια της φυσιολογικής ομοίωσης του οργάνου. Η απόπτωση, η οποία λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια φλεγμονής του νεφρικού ιστού μπορεί να έχει θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα αναλόγως με το βιολογικό πλαίσιο στο οποίο συμμετέχει. Έτσι, στα ευεργετικά αποτελέσματα της απόπτωσης περιλαμβάνονται η απομάκρυνση των διηθούντων ουδετερόφιλων, η απόπτωση μεσαγγειακών κυττάρων σε περιοχές αυξημένης κυτταροβρίθειας ώστε να διατηρηθεί η αρχιτεκτονική του σπειράματος, καθώς και η απομάκρυνση των ινοβλαστών κατά τη διάρκεια της λύσης της βλάβης ώστε να περιοριστεί η ίνωση. Αντίθετα, στις καταστροφικές συνέπειες περιλαμβάνονται η απώλεια των ποδοκυττάρων με έκθεση της βασικής σπειραματικής μεμβράνης, η προοδευτική απώλεια των μεσαγγειακών κυττάρων, η οποία οδηγεί σε κυτταρική ένδεια και σπειραματοσκλήρυνση, η προϊούσα απόπτωση των σωληναριακών κυττάρων με επακόλουθη ατροφία των σωληναρίων και τέλος, η απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών με αποτέλεσμα την ισχαιμία και την υποξία του ιστού.

Στον άνθρωπο, ο ρυθμός της απόπτωσης των σπειραματικών κυττάρων σε φυσιολογικούς νεφρούς είναι χαμηλός αλλά αυξάνει σημαντικά σε ΣΝ, όπως η οξεία μεταλοιμώδης ΣΝ (148), η IgA νεφροπάθεια (149) ή η ΣΝ του ΣΕΛ (150). Η απόπτωση των κυττάρων του σπειράματος έχει φανεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο είτε στη λύση της βλάβης, όπως στη μεταλοιμώδη ΣΝ, είτε στην προϊούσα επιδείνωση της βλάβης προς σπειραματοσκλήρυνση, όπως στην περίπτωση της IgA νεφροπάθειας ή της ΣΝ του ΣΕΛ. Σε πειραματικό επίπεδο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το μοντέλο της υπερπλαστικής μεσαγγειακής ΣΝ σε



αρουραίους μετά από χορήγηση αντι-Thy1.1, το οποίο προσομοιάζει με την υπερπλαστική ΣΝ στον άνθρωπο (151). Στο μοντέλο αυτό διαπιστώθηκε αύξηση των αποπτωτικών κυττάρων παράλληλα με την εμφάνιση της σπειραματικής κυτταροβρίθειας και στη συνέχεια παρατηρήθηκε ικανότητα αυτό-περιορισμού της μεσαγγειακής υπερπλασίας με πλήρη υποστροφή της κυτταροβρίθειας. Στην παρατήρηση αυτή στηρίζεται η υπόθεση ότι η απόπτωση μπορεί να απομακρύνει επιτυχώς όλα τα επιπλέον μεσαγγειακά κύτταρα και να περιορίσει τη νεφρική βλάβη. Η ανακάλυψη στρατηγικών που θα επηρεάζουν την απόπτωση με σκοπό τη θεραπεία των ΣΝ αποτελεί το επίκεντρο μιας μεγάλης ερευνητικής προσπάθειας παγκοσμίως. Κάποιες θεραπευτικές παρεμβάσεις, όπως η χρήση «αντιφλεγμονωδών παραγόντων» (κορτικοστεροειδή, κυτταροτοξικά φάρμακα) εφαρμόζονται σε κλινικό επίπεδο με σκοπό την άμεση ή έμμεση μείωση του θανάτου των νεφρικών κυττάρων (152).

Η απόρριψη του νεφρικού μοσχεύματος αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα πολλαπλών αλληλεπιδράσεων, στις οποίες η απόπτωση πιθανόν να παίζει κάποιο ρόλο ρυθμίζοντας τους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων και/ή απομακρύνοντας κύτταρα του νεφρικού μοσχεύματος που εκτίθενται σε κυτταροτοξική βλάβη (153). Οι Meehan και συν. περιέγραψαν το μοντέλο της απόπτωσης που παρατηρείται σε οξεία κυτταρική απόρριψη με εστιακές βλάβες που περιλαμβάνουν φλεγμονή των ενδοθηλιακών και σωληναριακών κυττάρων, καθώς και σωληναριακή νέκρωση (154).

Η διαβητική νεφροπάθεια αποτελεί την κύρια αιτία χρόνιας και τελικού σταδίου νεφρικής νόσου στις ΗΠΑ αλλά και παγκοσμίως (155). Αρκετά είναι γνωστά για την εξέλιξη της σπειραματοσκλήρυνσης και της διαμεσοσωληναριακής ίνωσης στη διαβητική νεφροπάθεια μετά από την εμφάνιση της μικροαλβουμινουρίας, όπως αυτή προκαλείται από τον αυξητικό παράγοντα TGF-β, την αγγειοτασίνη II και τα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycation Endproducts – AGEs) (156,157). Παρόλα αυτά, τα κυτταρικά γεγονότα τα οποία οδηγούν στην εμφάνιση της μικροαλβουμινουρίας δεν έχουν ξεκάθαρα διασαφηνιστεί. Υπάρχει αυξανόμενος όγκος πληροφοριών που προτείνει ότι η απώλεια των ποδοκυττάρων αποτελεί πρώιμο εύρημα στη διαβητική νεφροπάθεια (158). Στο σημείο αυτό οι Susztak και συν. σε μια πρόσφατη μελέτη ανέπτυξαν την απόπτωση αφού έδειξαν ότι η υπεργλυκαιμία προκαλεί απόπτωση των

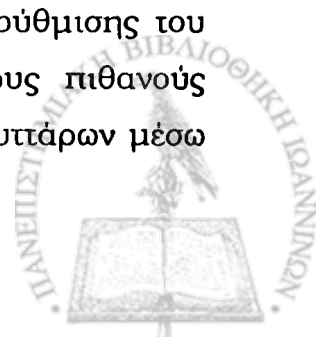


ποδοκυττάρων μέσω ενεργοποίησης δραστικών ριζών οξυγόνου στα πρώιμα στάδια της διαβητικής νεφροπάθειας (159). Ακόμα πιο πρόσφατα, οι Chuang και συν. έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ AGE-RAGE, όπου RAGE είναι ένας υποδοχέας για τα AGEs που εντοπίζεται συνήθως στα ποδοκύτταρα και αυξάνει η έκφρασή του στο ΣΔ, συμβάλλει στην απόπτωση των ποδοκυττάρων μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα FOXO4 (160).

Επιλεκτικά και εν συντομία έγινε αναφορά σε κάποια από τα νεφρικά νοσήματα στην παθογένεια των οποίων η απόπτωση έχει δείχθει ότι κατέχει σημαντικό ρόλο. Η αναφορά του ρόλου της απόπτωσης στην επιδείνωση της νεφρικής βλάβης, στη ΧΝΝ και στις επιλοκές αυτής, καθώς και στη θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας περιγράφεται στα κεφάλαια που ακολουθούν.

Γ.7. Απόπτωση και εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής βλάβης

Στη νεφρική βλάβη που οφείλεται σε διάφορες αιτίες, από τις ΣΝ ως την υπέρταση, οι ασθενείς συχνά εμφανίζουν μία προοδευτική απώλεια νεφρικής λειτουργίας, χωρίς η απώλεια αυτή να μπορεί πάντοτε να αποδοθεί στην ενεργότητα της πρωτοπαθούς νόσου (161). Όσον αφορά στους μηχανισμούς, οι οποίοι ευθύνονται για την εξέλιξη της νεφρικής βλάβης και την επακόλουθη έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας, έχουν διατυπωθεί αρκετές υποθέσεις. Η υπόθεση της ελαττωμένης παροχής-αυξημένης διήθησης προτείνει τη σκλήρυνση των εναπομεινάντων σπειραμάτων ως αποτέλεσμα αιμοδυναμικής επιβάρυνσης μετά από μία μη αναστρέψιμη καταστροφή ενός αριθμού νεφρώνων (162). Άλλη υπόθεση είναι αυτή της διάμεσης φλεγμονής και ίνωσης (163) με τη μεσολάβηση ενός αριθμού κυττοκινών όπως ο PDGF (platelet derived growth factor) (164) και ο TGF-β (165). Σύμφωνα με τον Savill καμία από τις παραπάνω υποθέσεις δεν λαμβάνει υπόψη ένα από τα πολύ σημαντικά ευρήματα των νεφρικών βιοψιών από ασθενείς με προχωρημένη νεφρική νόσο, το γεγονός δηλαδή ότι υπάρχουν πολύ λίγα νεφρικά κύτταρα (161). Διατυπώνει λοιπόν την υπόθεση ότι η εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής βλάβης μπορεί να οφείλεται στη διαταραχή της ρύθμισης του αριθμού των νεφρικών κυττάρων και προτείνει ως έναν από τους πιθανούς μηχανισμούς του φαινομένου την ανεπιθύμητη απώλεια νεφρικών κυττάρων μέσω



της διαδικασίας της απόπτωσης. Στηρίζει την υπόθεσή του σε μία από τις πρώτες λεπτομερείς εργασίες που μελετούν την απόπτωση στη νεφρική βλάβη, συγκεκριμένα σε πειραματικό μοντέλο ουρητηρικής απόφραξης και ενοχοποιούν ως ένα βαθμό την απόπτωση για την ταχεία απώλεια νεφρικού ιστού και κυρίως των σωληναριακών κυττάρων (166).

Μία άλλη υπόθεση είναι αυτή του Brenner και συν. σύμφωνα με την οποία το χαμηλό σωματικό βάρος γέννησης φαίνεται ότι σχετίζεται με συγγενή μείωση του αριθμού των νεφρώνων, γεγονός που προδιαθέτει μεταγενέστερα στην εμφάνιση ιδιοπαθούς αρτηριακής υπέρτασης (AY) (167). Στη συνέχεια μέσω του μηχανισμού της αντισταθμιστικής υπερτροφίας και υπερδιήθησης των εναπομεινάντων σπειραμάτων, ο νεφρός οδηγείται σε ένα φαύλο κύκλο απώλειας νεφρώνων. Ο ακριβής μηχανισμός που ευθύνεται για τη συγγενή μείωση του αριθμού των νεφρώνων δεν έχει διευκρινιστεί. Έχουν διατυπωθεί διάφορες υποθέσεις, μία εκ των οποίων είναι και η αυξημένη απόπτωση στον αναπτυσσόμενο νεφρό (168).

Ένας σημαντικός αριθμός μελετών έρχεται να επιβεβαιώσει σε πειραματικό επίπεδο την εμπλοκή της απόπτωσης στην προοδευτική απώλεια νεφρικών κυττάρων που παρατηρείται στην εξέλιξη της ΧΝΝ. Οι Schelling και συν. έδειξαν σε πειραματικό μοντέλο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, ότι τα σωληναριακά κύτταρα «αυτοκτονούν» μέσω του Fas-FasL εξαρτώμενου, εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης με αποτέλεσμα τη σωληναριακή ατροφία που αποτελεί ως γνωστό ισχυρό προγνωστικό παράγοντα στην εξέλιξη της νόσου (169). Σε πειραματικό μοντέλο ταχείας εξελισσόμενης ΣΝ προς τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια φάνηκε ότι η απόπτωση κατέχει ρόλο κλειδί στη λύση της ενδο- και εξωπειραματικής φλεγμονής, αν και η απώλεια των αυτοχθόνων νεφρικών κυττάρων από ανεξέλεγκτη απόπτωση είναι ολέθρια αφού πιθανόν οδηγεί σε μείωση του λειτουργικού νεφρικού ιστού και νεφρική ανεπάρκεια (170). Η ομάδα των Thomas και συν. έδειξαν σε ποντίκια που είχαν υποστεί υφολική νεφρεκτομή μία αύξηση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων στα σπειράματα, στα σωληνάρια και στο διάμεσο ιστό. Διαπίστωσαν ότι υπήρχε συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων και στις παραμέτρους της νεφρικής βλάβης, στοιχείο που μπορεί να υποδηλώνει ότι η απόπτωση των νεφρικών κυττάρων πιθανά να συμβάλλει στην εξέλιξη της σωληναριακής ατροφίας και στη χρόνια νεφρική ίνωση (171). Η ίδια ομάδα σε μεταγενέστερη μελέτη έδειξε στο ίδιο



πειραματικό μοντέλο ότι η αύξηση της απόπτωσης στον εναπομείναντα νεφρικό ιστό οφείλεται ως ένα βαθμό στο ρυθμιστικό ρόλο των αντι-αποπτωτικών και προ-αποπτωτικών παραγόντων της οικογένειας Bcl-2 και συγκεκριμένα του Bcl-2 και Bax αντίστοιχα (172).

Η συμμετοχή της απόπτωσης ως κοινός μηχανισμός εξέλιξης της ΧΝΝ, ανεξαρτήτως αιτιολογίας, μέσω της απώλειας των αυτοχθόνων νεφρικών κυττάρων έχει πλέον αποδειχθεί και σε μελέτες που χρησιμοποίησαν νεφρικό ιστό από βιοψίες ασθενών. Αυξημένη απόπτωση έχει δείχθει ότι συμβάλλει στη σωληναριακή ατροφία, στη σπειραματοσκλήρυνση και στη διάμεση βλάβη σε ασθενείς που έπασχαν από ΧΝΝ οφειλόμενη σε IgA νεφροπάθεια, (149) νεφροπάθεια του ΣΕΛ (150), καθώς και στην τμηματική εστιακή σπειραματοσκλήρυνση (FSGS) (173). Όσον αφορά στην FSGS, πρόσφατα, οι Erkan και συν. μελέτησαν αναδρομικά 30 δείγματα βιοψιών από παιδιά με ιδιοπαθή, πρώιμη FSGS που εμφάνιζαν πρωτεϊνουρία. Διαπίστωσαν λοιπόν αυξημένη απόπτωση στα σωληναριακά κύτταρα και του εγγύς αλλά και του άπω σωληναρίου, καθώς επίσης και ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στο βαθμό της πρωτεϊνουρίας και στον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων. Το σημαντικότερο εύρημα της μελέτης είναι το γεγονός ότι η αυξημένη απόπτωση των σωληναριακών κυττάρων αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη εξέλιξης της των ασθενών με FSGS σε τελικό στάδιο ΧΝΝ, ανεξάρτητα ακόμα και από το βαθμό της πρωτεϊνουρίας (173). Σε μία ακόμη πιο πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη, οι Teteris και συν. διερεύνησαν τη συμμετοχή της απόπτωσης στην εξέλιξη της ΧΝΝ. Χρησιμοποίησαν υλικό βιοψιών από ασθενείς με νόσο ελαχίστων αλλοιώσεων, IgA νεφροπάθεια, FSGS, υπερτασική νεφροπάθεια, νεφροπάθεια από κυκλοσπορίνη, νεφροπάθεια του ΣΕΛ, καθώς και από υγιή άτομα που χρησιμοποίησαν ως ομάδα ελέγχου. Εκτός από τον προσδιορισμό της απόπτωσης μέτρησαν και αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι εμπλέκονται στην έναρξη ή στην καταστολή της απόπτωσης. Κατέληξαν στο πολύ ενδιαφέρον συμπέρασμα ότι η αυξημένη σωληναροδιάμεση απόπτωση σχετίζεται θετικά με τη σωληναροδιάμεση βλάβη, το βαθμό της νεφρικής δυσλειτουργίας, καθώς και με την αυξημένη έκφραση των προ-αποπτωτικών κυττοκινών TNF- α και TGF β ₁ και με την ελαττωμένη έκφραση του παράγοντα επιβίωσης EGF (epidermal growth factor) (174).

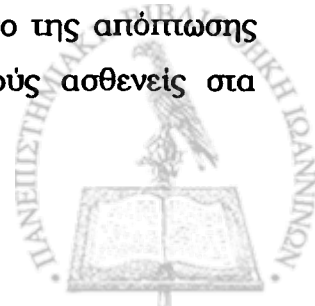


Γ.8. Η απόπτωση στη ΧΝΝ και στην υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας

Γ.8.1. Η απόπτωση σε ασθενείς τελικού σταδίου ΧΝΝ υπό υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας

Η είσοδος του ασθενή με ΧΝΝ στο τελικό στάδιο της νόσου συνδέεται με την ανάγκη έναρξης υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας εφόσον δεν υπάρχει δυνατότητα νεφρικής μεταμόσχευσης από ζώντα συγγενή δότη πριν την έναρξη της θεραπείας. Έτσι, όταν ο θεράπωντας Νεφρολόγος κρίνει με βάση τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα ότι απαιτείται η έναρξη υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, ο ασθενής ξεκινάει τον τύπο της θεραπείας, την οποία είχε προαποφασίσει ιδανικά σε πρωιμότερο στάδιο της νόσου. Δύο είναι οι διαθέσιμες θεραπείες υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, η ΑΜΚ και η ΠΚ. Η ΑΜΚ είναι η διαδικασία απομάκρυνσης από το αίμα της περίσσειας των υγρών και των συσσωρευμένων άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού με τη βοήθεια του ειδικά σχεδιασμένου φίλτρου ΑΜΚ. Η ΠΚ επιτελεί το ίδιο έργο χρησιμοποιώντας την περιτοναϊκή κοιλότητα του ασθενή για το διάλυμα κάθαρσης και το περιτόναιο ως ημιδιαπερατή μεμβράνη για την απομάκρυνση των υγρών και των ουραιμικών τοξινών. Η αναγκαιότητα της υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας είναι αδιαμφισβήτητη στο τελικό στάδιο της ΧΝΝ, αφού μόνο έτσι είναι δυνατή η επιβίωση του ασθενή και η εξασφάλιση κάποιου επιπέδου ποιότητας ζωής. Παρόλα αυτά καμιά από τις δύο μεθόδους δεν είναι άμοιρες επιπλοκών.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στην ΑΜΚ, αυτή οδηγεί σε μία πληθώρα επιπλοκών -μέσω της ενεργοποίησης του καταρράκτη του συμπληρώματος, της απελευθέρωσης πρωτεασών, της παραγωγής κυττοκινών και δραστικών ριζών Οξυγόνου- οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την κλινική έκβαση των αιμοκαθαιρομένων ασθενών (175). Η επιβίωση των ασθενών μειώνεται δραματικά λόγω των παραδοσιακών και μη, ουραιμικών παραγόντων, οι οποίοι επιταχύνουν την ΚΑΝ και τη θνητότητα, καθώς και της ίδιας της διαδικασίας της θεραπείας υποκατάστασης. Η επιστημονική κοινότητα συνεχώς αναζητά νέους μηχανισμούς υπεύθυνους για το φαινόμενο αυτό με σκοπό τη βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών. Στα μονοπάτια της έρευνας απαντάται και το φαινόμενο της απόπτωσης των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος στους ουραιμικούς ασθενείς στα



διάφορα στάδια της ΧΝΝ, καθώς και στην υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας. Λίγα είναι γνωστά για τους παράγοντες που επηρεάζουν, την αποδεδειγμένα πλέον, αυξημένη απόπτωση σε αυτήν την ομάδα των ασθενών, καθώς και για τις συνέπειες του φαινομένου. Έτσι, την τελευταία δεκαετία πλήθος μελετών έρχονται να διαλευκάνουν το φαινόμενο. Σχεδόν όλες οι μελέτες προσπαθούν να συνδέσουν την απόπτωση με τις διαταραχές στους μηχανισμούς άμυνας που παρατηρούνται στην ουραιμία -διαταραχές της κυτταρικής ανοσίας οι οποίες αφορούν τα Τ-λεμφοκύτταρα, μεταβολές της χυμικής ανοσίας που επηρεάζουν τα Β-λεμφοκύτταρα, καθώς και διαταραχή της χημειοταξίας, της φαγοκυττάρωσης και της αναπνευστικής έκρηξης των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων- με συνέπεια τον αυξημένο κίνδυνο λοιμώξεων και κακοηθειών στους ασθενείς αυτούς (176). Οι μελέτες που προηγούνται χρονικά είναι διαστρωματικές (cross-sectional) μελέτες σε ασθενείς τελικού σταδίου ΧΝΝ υπό υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας. Αφορούν κυρίως αιμοκαθαρόμενους ασθενείς και μελετούν την απόπτωση των πολυμορφοπύρηνων και των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος καθώς και πως αυτή επηρεάζεται από τις διαφορετικές μεμβράνες των φίλτρων ΑΜΚ.

Γ.8.1.α. Απόπτωση στα πολυμορφοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος σε αιμοκαθαρόμενους ασθενείς .

Οι Cendoroglo και συν. ήταν ανάμεσα στους πρώτους που μελέτησαν την απόπτωση *in vitro* των ουδετερόφιλων του περιφερικού αίματος από αιμοκαθαρόμενους ασθενείς και τη βρήκαν σημαντικά αυξημένη συγκριτικά με των ουδετερόφιλων από υγιή άτομα (177). Η επώαση των φυσιολογικών ουδετερόφιλων στο ουραιμικό πλάσμα των ασθενών οδήγησε σε αύξηση της απόπτωσης τους, με συνέπεια μία δυσλειτουργία παρόμοια με αυτή που εμφάνιζαν τα ουδετερόφιλα των ουραιμικών ασθενών. Επιπρόσθετα, διατύπωσαν την πρόταση ότι ο συνδυασμός κυτταρικών και διαλυτών παραγόντων του πλάσματος ευθύνεται για την αύξηση της απόπτωσης, η οποία οδηγεί σε κυτταρική δυσλειτουργία των ουδετερόφιλων και κατά επέκταση σε διαταραχή της ανοσολογικής απάντησης των αιμοκαθαρομένων ασθενών. Η ίδια ομάδα ερευνητών έδειξε ότι κατά τη διάρκεια της ΑΜΚ, η ιδιότητα του ουραιμικού πλάσματος να αυξάνει την απόπτωση των



ουδετερόφιλων από υγιείς εθελοντές διαφέρει ανάλογα με τη βιοσυμβατότητα της μεμβράνης του χρησιμοποιούμενου φίλτρου (178).

Μία άλλη ομάδα ερευνητών, μελέτησαν την απόπτωση των ουδετερόφιλων από υγιείς εθελοντές όταν τα επώασαν με ίνες από βιοσυμβατές μεμβράνες πολυσουλφόνης και βιοασύμβατες μεμβράνες κουπροφάνης, παρουσία ανθρώπινου ορού. Διαπιστώσαν αυξημένο ποσοστό απόπτωσης των ουδετερόφιλων *in vitro*, το οποίο ποσοστό ήταν μεγαλύτερο με τις βιοασύμβατες μεμβράνες συγκριτικά με τις βιοσυμβατές. Επιπλέον, διατύπωσαν την πρόταση ότι το φαινόμενο αυτό πολύ πιθανό να εξαρτάται από την παρουσία του παράγοντα C3 του συμπληρώματος (179).

Μερικά χρόνια αργότερα οι Koller και συν. έρχονται να επιβεβαιώσουν την αύξηση της απόπτωσης *in vitro* των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων στο περιφερικό αίμα ασθενών που υποβάλλονται σε AMK με βιοασύμβατες μεμβράνες κουπροφάνης, αλλά όχι σε αυτούς που αιμοκαθαίρονται με βιοσυμβατές μεμβράνες (180). Επιπλέον, κατέληξαν ότι η επιτάχυνση της απόπτωσης των πολυμορφοπύρηνων με τη χρήση μεμβρανών κουπροφάνης διενεργείται μέσω της ενεργοποίησης αντισώματος του κλασικού δρόμου του συμπληρώματος με τη χρήση μονοπατιών εξαρτημένων και ανεξαρτητών από τις κασπάσες.

Γ.8.1.β. Απόπτωση στα μονοπύρηνια (λεμφοκύτταρα-μονοκύτταρα) κύτταρα του περιφερικού αίματος σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς

Τα αποτελέσματα των Cendoroglio και συν. έρχονται σε συμφωνία με αυτά των Matsumoto και συν., οι οποίοι διαπίστωσαν αυξημένη απόπτωση *in vitro* στα λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα περιφερικού αίματος από ουραιμικούς αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς (181). Επιπρόσθετα, τα ουραιμικά T-λεμφοκύτταρα *in vivo* εκφράζανε τον υποδοχέα θανάτου Fas σε υψηλότερη ένταση συγκριτικά με τα T κύτταρα της ομάδας ελέγχου, δηλώνοντας έτσι ότι η απόπτωση των T-λεμφοκυττάρων μπορεί να ελέγχεται από το Fas σύστημα. Όταν συγκρίνανε την έκφραση του Fas από τα T-κύτταρα των δύο υπο-ομάδων των ουραιμικών ασθενών, αυτή ήταν εντονότερη στους ασθενείς που δεν υποβάλλονταν σε θεραπεία υποκατάστασης και η πιθανή εξήγηση που δόθηκε από τους συγγραφείς ήταν ότι το Fas σύστημα μπορεί να αναστέλλεται εν μέρει από την AMK.



Αυξημένη απόπτωση *in vitro* στα μονοκύτταρα ουραιμικών ασθενών διαπιστώθηκε και από άλλη ομάδα ερευνητών. Η αύξηση αυτή συνοδεύονταν από μείωση στην παραγωγή του TNF- α , ενώ η προσθήκη TNF- α εξωγενώς σε καλλιέργειες μονοκυττάρων μείωνε το βαθμό της απόπτωσης, γεγονός που προτείνει ότι προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές μπορεί να ρυθμίζουν την επιβίωση των γηρασμένων μονοκυττάρων (182).

Οι Galli και συν. μελέτησαν την απόπτωση *in vitro* και μέτρησαν τα επίπεδα των ενδοκυττάρων θειολών στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος σε ουραιμικούς ασθενείς υπό θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας (30 ασθενείς σε AMK και 10 σε ΠΚ) σε σχέση με κύτταρα από υγιή άτομα (183). Επιπλέον, διερεύνησαν την πιθανή μεταβολή των επιπέδων των υπό παρακολούθηση παραμέτρων πριν και μετά τη θεραπεία των αιμοκαθαιρομένων ασθενών με μεμβράνες επικαλυμμένες με βιταμίνη E. Διαπίστωσαν λοιπόν αυξημένο ρυθμό απόπτωσης και ελαττωμένα επίπεδα ενδοκυττάρων θειολών στα μονοπύρρηνα κύτταρα των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών αλλά όχι στους ασθενείς σε ΠΚ. Επίσης, υπήρχε σημαντική αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στο ρυθμό της απόπτωσης και στα επίπεδα των θειολών τόσο στους ασθενείς όσο και στην ομάδα ελέγχου. Τέλος, η θεραπεία των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών με μεμβράνες επικαλυμμένες με βιταμίνη E οδηγούσε σε μείωση του ρυθμού της απόπτωσης, καθώς και σε μερική διατήρηση των επιπέδων των ενδοκυττάρων θειολών. Η διαφορά στην απόπτωση στις δύο υπο-ομάδες ασθενών ερμηνεύτηκε ως αποτέλεσμα των διαφορετικών προ-αποπτωτικών παραγόντων που αθροίζονται στο πλάσμα των ασθενών στις δύο διαφορετικές μορφές υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας.

Τέλος, οι Kolioussi και συν., πολύ πρόσφατα, μελέτησαν την επίδραση της συνεδρίας της AMK στην απόπτωση *in vivo* σε μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος ουραιμικών ασθενών (184). Διαπίστωσαν ότι η έκφραση του ογκογονιδίου Bcl-2 αυξανόταν σημαντικά στο τέλος της συνεδρίας στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος των ασθενών, άρα μειώνονταν η απόπτωση των λεμφοκυττάρων και μάλιστα ανεξάρτητα από τον τύπο της χρησιμοποιούμενης μεμβράνης.



Γ.8.2. Η απόπτωση σε ασθενείς με ΧΝΝ πριν και μετά την ένταξη σε θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας

Παρά τα διφορούμενα, κάποιες φορές, αποτελέσματα των ερευνητών σε ότι αφορά στην επίδραση της απόπτωσης στα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος σε ασθενείς υπό υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας, αποτελεί πλέον τεκμηριωμένη γνώση το γεγονός ότι η απόπτωση εμπλέκεται στις διαταραχές των ανοσιακών μηχανισμών στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς. Στις μέρες μας όμως είναι επιπλέον γνωστό ότι η διαταραχές αυτές εμφανίζονται αρκετά νωρίτερα στην εξέλιξη της ΧΝΝ και η ότι ουραιμία *per se* ευθύνεται για το φαινόμενο. Οι μελέτες που θα αναφερθούν στη συνέχεια έρχονται να δείξουν πως η αρχική υπόθεση μετατράπηκε σε «evidenced based» γνώση. Σχεδόν όλες αφορούν ουραιμικούς ασθενείς με ΧΝΝ σταδίου 3-5 πριν την ένταξη σε θεραπεία υποκατάστασης και αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς. Μελετούν το φαινόμενο της απόπτωσης *in vitro* στους διάφορους υποπληθυσμούς των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος, συγκρίνουν το ρυθμό απόπτωσης στις ομάδες των ασθενών αιμοκαθαιρόμενων και μη και συνδέουν τα αποτελέσματα με τις διαταραχές του ανοσολογικού συστήματος ως επιπλοκή της ουραιμίας.

Γ.8.2.α. Απόπτωση στα πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος σε ασθενείς με ΧΝΝ πριν και μετά την ένταξη σε θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας

Οι Jaber και συν. μελέτησαν την απόπτωση εκτιμώντας την συν-έκφραση των Fas-FasL στα ουδετερόφιλα ασθενών με ΧΝΝ (15 ασθενείς με sCr 3.1 ± 0.6 mg/dl), ασθενών σε ΑΜΚ και ΠΚ (16 και 7 ασθενείς αντίστοιχα) καθώς και σε υγιή άτομα (185). Διαπίστωσαν μία παράλληλη αύξηση της έκφρασης των Fas-FasL στην επιφάνεια των ουδετερόφιλων και μία αυξημένη ευαισθησία στη Fas-ελεγχόμενη απόπτωση με την εξέλιξη της νεφρικής νόσου. Υπήρχε σημαντική αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην κάθαρση κρεατινίνης (Clcr) και στην απόπτωση των ουδετερόφιλων του περιφερικού αίματος στους ασθενείς με ΧΝΝ. Επιπλέον, διαπίστωσαν ότι ο ουραιμικός ορός αύξανε την έκφραση των Fas-FasL από τα φυσιολογικά ουδετερόφιλα προτείνοντας έτσι ότι το ουραιμικό περιβάλλον μπορεί να προάγει την απόπτωση.



Μία άλλη ομάδα ερευνητών μελέτησε την απόπτωση *in vitro* σε ουδετερόφιλα ασθενών με ΧΝΝ [8 ασθενείς με $Clcr$ $20.3 \pm 7.5 ml/min/1.73m^2$], σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς (16 ασθενείς), καθώς και σε υγιή άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (186). Διαπίστωσαν τα εξής όσον αφορά στην απόπτωση των ουδετερόφιλων: α) ο αριθμός των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων ήταν μεγαλύτερος στους ασθενείς σε ΑΜΚ από ότι στους ασθενείς με ΧΝΝ και στους υγιείς αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική, β) ο συνολικός αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων ήταν σημαντικά μεγαλύτερος στους ασθενείς με ΧΝΝ συγκριτικά με τους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς και τους υγιείς, γ) ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων, τόσο των πρώιμων όσο και ο συνολικός μειωνόταν σημαντικά μεν, παροδικά δε, με τη διαδικασία της ΑΜΚ 20 λεπτά μετά την έναρξη και επανερχόταν στα προ-έναρξης επίπεδα στις 4 ώρες, δ) η έκφραση του αντι-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-2 στα ουδετερόφιλα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στους ασθενείς με ΧΝΝ και ακολουθούσε τους υγιείς και εν συνεχεία στους αιμοκαθαιρόμενους, ε) η έκφραση του Fas ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς από ότι στους ασθενείς με ΧΝΝ και στους υγιείς, στ) η έκφραση του p53 στα ουδετερόφιλα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στους αιμοκαθαιρόμενους συγκριτικά με τους υγιείς αλλά όχι και με τους ασθενείς με ΧΝΝ. Μετά από αυτά τα ενδιαφέροντα αποτελέσματα κατέληξαν ότι η ουραιμία αυξάνει το ρυθμό της απόπτωσης των ουδετερόφιλων, το ίδιο και η ΑΜΚ αλλά όχι περισσότερο από την ουραιμία. Οι Sela και συν. έδειξαν ότι το ποσοστό των πολυμορφοπύρηνων που αποπίπτουν είναι σημαντικά μεγαλύτερο στους ουραιμικούς ασθενείς με ΧΝΝ (30 ασθενείς με GFR $16.7 \pm 2.4 ml/min/1.73m^2$), στους αιμοκαθαιρόμενους (30 ασθενείς) και στους ασθενείς σε ΠΚ (30 ασθενείς) συγκριτικά με τους υγιείς της ομάδας ελέγχου (187). Έδειξαν επίσης ότι το ποσοστό της διέγερσης των πολυμορφοπύρηνων του περιφερικού αίματος σχετίζεται θετικά με τη βαρύτητα της ΧΝΝ και επιδεινώνεται από τη θεραπεία υποκατάστασης και κυρίως από τη διαδικασία ΑΜΚ.

Τα αποτελέσματα των Sardenberg και συν. διαφέρουν κάπως από αυτά της προηγούμενης ομάδας, όσον αφορά στην *in vivo* απόπτωση των πολυμορφοπύρηνων στους ουραιμικούς ασθενείς (188). Οι ερευνητές αυτοί διαπίστωσαν ότι ο ρυθμός της απόπτωσης των πολυμορφοπύρηνων είναι σημαντικά αυξημένος στους ασθενείς με ΧΝΝ (28 ασθενείς με $Clcr$ $< 48 ml/min$), ενώ είναι στα



ιδία επίπεδα περίπου όσον αφορά στους αιμοκαθαιρόμενους, στους ασθενείς σε ΠΚ και στους υγιείς. Κατέληξαν λοιπόν στο ότι τόσο η ουραιμία, όσο και η μέθοδος της υποκατάστασης μάλλον εμπλέκονται στην απόπτωση και στη λειτουργία των πολυμορφοπύρηνων, ενώ η ΑΜΚ φαίνεται να επαναφέρει στο φυσιολογικό τον αυξημένο ρυθμό απόπτωσης που εμφανίζουν οι ασθενείς σε ΧΝΝ.

Γ.8.2.β. Απόπτωση στα μονοπύρηνια (λεμφοκύτταρα-μονοκύτταρα) κύτταρα του περιφερικού αίματος σε ασθενείς με ΧΝΝ πριν και μετά την ένταξη σε θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας

Οι Martin-Malo και συν. μελέτησαν την επίδραση της ουραιμίας και των διαφόρων μεμβρανών ΑΜΚ στην απόπτωση των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος σε τέσσερις ομάδες ασθενών, ασθενείς με ΧΝΝ σταδίου 4-5, αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, ασθενείς σε ΠΚ και σε υγιείς εθελοντές (189). Διαπίστωσαν ότι η απόπτωση ήταν σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς με ΧΝΝ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και τους ασθενείς σε ΠΚ και μάλιστα απόπτωση και Clcr βρέθηκε ότι εμφάνιζαν αντίστροφη συσχέτιση. Στους ασθενείς σε ΑΜΚ η απόπτωση ήταν υψηλότερη συγκριτικά με τους ασθενείς με ΧΝΝ, τους ασθενείς σε ΠΚ και την ομάδα ελέγχου. Η μεμβράνη αιμοφάνης εμφάνιζε την υψηλότερη απόπτωση συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν.

Οι Fernández-Fresnedo και συν. εξέτασαν την απόπτωση *in vitro* στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με ΧΝΝ λίγο πριν την ένταξη σε θεραπεία υποκατάστασης και σε ασθενείς σε ΑΜΚ (190). Διαπίστωσαν αύξηση της απόπτωσης στις δύο ομάδες ασθενών με υψηλότερα επίπεδα στην πρώτη ομάδα. Επιπλέον, έδειξαν ότι η Β-λεμφοπενία στη ΧΝΝ μπορεί να οφείλεται μερικώς σε αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων προς απόπτωση η οποία σχετίζεται με ελαττωμένη έκφραση του Bcl-2.

Οι Meier και συν. έδειξαν ότι τα Τ-λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με ΧΝΝ σταδίου 5 (8 ασθενείς με Clcr 12.5 ± 2.1 ml/min) και αιμοκαθαιρόμενων ασθενών (18 ασθενείς με Clcr 5.1 ± 3.9 ml/min) εμφανίζουν αυξημένη απόπτωση *ex vivo*, με μεγαλύτερη αύξηση στην ομάδα των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών (191). Κατέληξαν έτσι στο συμπέρασμα, ότι η αυξημένη ευαισθησία των Τ-λεμφοκυττάρων να αποπίπτουν σχετίζεται με την



ουραιμία αλλά και επιδεινώνεται με τη διαδικασία της AMK και πιθανόν να ευθύνεται ως ένα βαθμό και για την T-λεμφοπενία των ασθενών αυτών.

Τέλος, μία ενδιαφέρουσα προοπτική μελέτη της απόπτωσης κυττάρων του περιφερικού αίματος, σε μικρό δείγμα ουραιμικών ασθενών και υγιών ατόμων διεξαχθεί από τους D'Intini και συν. Εκτίμησαν την απόπτωση στα μονοκύτταρα ασθενών με ΧΝΝ (5 ασθενείς με $Cl_{cr} < 16 \text{ ml/min}$), ασθενών σε AMK (5 ασθενείς) και σε ΠΚ (4 ασθενείς) για χρονικό διάστημα 10 εβδομάδων (192). Μέτρησαν επίσης φλεγμονώδεις παράγοντες και κυττοκίνες. Διαπίστωσαν ότι ο ρυθμός απόπτωσης των μονοκυττάρων *in vitro* ήταν μεγαλύτερος στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς και σε αυτούς με ΧΝΝ συγκριτικά με τους ασθενείς σε ΠΚ και τους υγιείς. Από τους υπόλοιπους παράγοντες που εκτίμησαν μόνο ο TNF-α έδειξε συσχέτιση με το βαθμό της απόπτωσης.

Φάνηκε λοιπόν από τις παραπάνω μελέτες, ότι η ουραιμία μπορεί να ευθύνεται για τις διαταραχές του ανοσολογικού συστήματος και ότι το φαινόμενο της απόπτωσης μπορεί να συμβάλλει σε αυτό. Είναι εμφανές, ότι ελάχιστες από αυτές τις μελέτες περιλάμβαναν ικανό αριθμό ασθενών με ΧΝΝ που να επιτρέπει στους ερευνητές να διαπιστώσουν αν ο ρυθμός της απόπτωσης μεταβάλλεται με την εξέλιξη της νεφρικής νόσου. Σε όποιες από τις μελέτες υπήρχαν οι προϋποθέσεις και έγινε η συσχέτιση, διαπιστώθηκε μια επιδείνωση του ρυθμού της απόπτωσης με την εξέλιξη της ΧΝΝ (185,187). Η συσχέτιση αυτή ερμηνεύεται στα πλαίσια της επίδρασης του ουραιμικού περιβάλλοντος, με την άθροιση των τοξινών, την αύξηση του ΟΣ και τη χρόνια υποκλινική φλεγμονή στην απόπτωση του λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Ο αυξημένος ρυθμός της απόπτωσης με τη σειρά του ευθύνεται ως ένα βαθμό για τις ανοσολογικές διαταραχές της ουραιμίας με συνέπεια το αυξημένο ποσοστό λοιμώξεων των ασθενών και έτσι φαίνεται ότι δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος. Οι υπάρχουσες μελέτες, ο τρόπος με τον οποίο μελετούν την απόπτωση -στα κύτταρα του περιφερικού αίματος-, οι περιορισμοί τους -η δυσκολία μελέτης του φαινομένου, ο μικρός αριθμός των ασθενών- δεν επιτρέπουν σε καμία περίπτωση να υποτεθεί κάποιου άλλου είδους ερμηνεία των αποτελεσμάτων όπως αν η επιδείνωση αυτή αντικατοπτρίζει την ίδια την επιδείνωση της νεφρικής βλάβης. Καθιστά επίσης τελείως αυθαίρετο έναν συλλογισμό ο οποίος θα θεωρούσε την απόπτωση συν-υπεύθυνη ως ένα βαθμό και για τις άλλες επιπλοκές της ουραιμίας, όπως η αναιμία και η ΚΑΝ. Παρά όμως το αυθαίρετο του



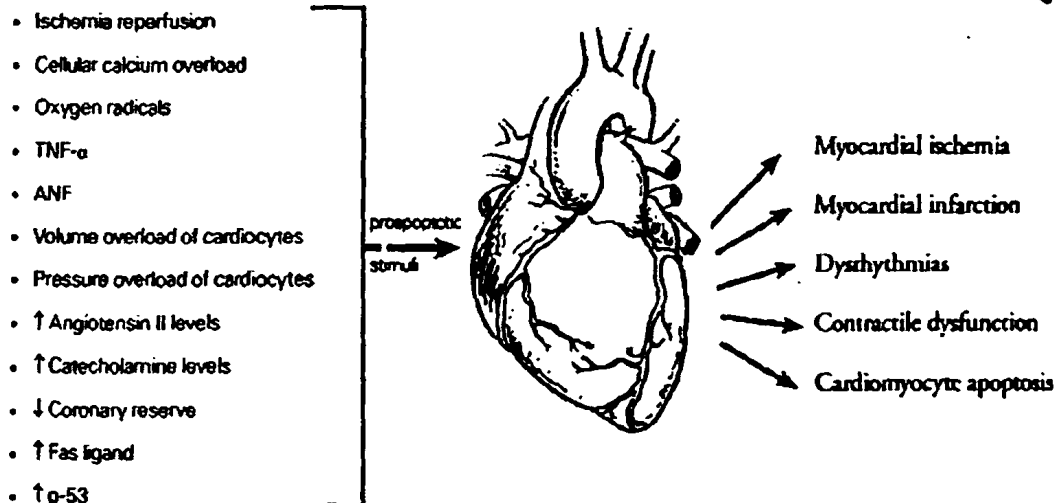
συλλογισμού και με βάση τη γνώση ότι οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στην εξέλιξη της ΧΝΝ και στις επιπλοκές αυτής είναι τόσο περίπλοκοι και αλληλο-επηρεαζόμενοι, φαντάζει δελεαστική η υπόθεση να συμπεριληφθεί η απόπτωση σε αυτόν τον περίπλοκο γρίφο. Για να διατυπωθεί κάτι παραπάνω από μία δελεαστική υπόθεση πρέπει να σχεδιαστούν μεγαλύτερες μελέτες, προοπτικές με ικανό αριθμό ασθενών στα διάφορα στάδια της ΧΝΝ οι οποίες θα χρησιμοποιήσουν τέτοιες μεθόδους μελέτης του φαινομένου της απόπτωσης που θα καθιστά δυνατή τη διατύπωση μίας επιστημονικά τεκμηριωμένης πρότασης για τη σχέση ανάμεσα στην απόπτωση και στη ΧΝΝ και τις επιπλοκές αυτής της.

Γ.9. Απόπτωση και καρδιαγγειακά νοσήματα

Η απόπτωση τεκμηριωμένα πλέον αποτελεί χαρακτηριστικό των διαφοροποιημένων μυοκαρδιακών κυττάρων (193). Από τελεολογικής άποψης, φαντάζει παράλογο το ότι τα μυοκαρδιακά κύτταρα του ενήλικα ανθρώπου υφίστανται το μοριακό μηχανισμό της απόπτωσης. Τα μυοκαρδιακά κύτταρα σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής ή κατά την πρώιμη περιγεννητική περίοδο και πρέπει να διατηρηθούν σε όλη τη διάρκεια της ζωής, αφού οι περισσότερες μαρτυρίες συνηγορούν στο ότι σε περίπτωση καταστροφής δεν έχουν την ικανότητα ανάπλασης. Η ικανότητα του μυοκαρδίου να συσπάται με λιγότερα μυοκαρδιακά κύτταρα είναι περιορισμένη και κλινική ΚΑ εγκαθίσταται όταν ο αριθμός των κυττάρων αυτών μειωθεί κάτω από ένα κριτικό όριο. Παρόλα αυτά, τα μυοκαρδιακά κύτταρα του ενήλικα φαίνεται ότι υφίστανται απόπτωση και τα αίτια για αυτό είναι ένας αριθμός στρεσογόνων, παθολογικών καταστάσεων οι οποίες περιλαμβάνουν την ισχαιμία, την Ι/Ε και την υπερφόρτωση πίεσης ή/και όγκου με αποτέλεσμα την αντίρροπο υπερτροφία των μυοκαρδιακών κυττάρων με απώτερη συνέπεια την προϊούσα ΚΑ (194).

Η απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων αποτελεί σημαντικό στοιχείο της διαδικασίας αναδιαμόρφωσης του μυοκαρδίου και της μετάπτωσης από μία αντιρροπούμενη κατάσταση στην τελικού σταδίου ΚΑ. Οι πιο γνωστές καταστάσεις και παράγοντες που αποδεδειγμένα διεγείρουν την απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων εμφανίζονται στο σχήμα 4 και οδηγούν στις διάφορες κλινικές οντότητες (195).

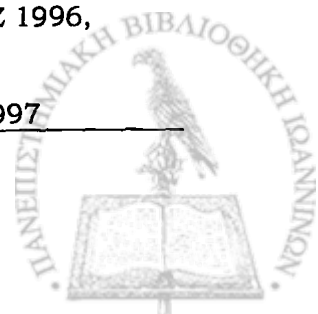




Σχήμα 4. Παράγοντες και καταστάσεις που ευδώνουν την απόπτωση του μυοκαρδίου (αριστερή πλευρά σχήματος) και επακόλουθες κλινικές οντότητες (δεξιά πλευρά σχήματος) (195)

Πιο συγκεκριμένα, οι κλινικές καταστάσεις στις οποίες έχει ανιχνευτεί αυξημένη απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων αναφέρονται στον πίνακα 9 (196).

Πίνακας 9. Κλινικές καταστάσεις με αυξημένη απόπτωση στα μυοκαρδιακά κύτταρα	
ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ
Απουσία καρδιακής ανεπάρκειας	
Μεταγενετική μορφογένεση	James TN 1994, James TN 1996
Οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου	Bardales RH 1996, Hofstra L 2000, Olivetti G 1996, Saraste A 1997, Baldi A 2002, Abbate A 2003
Ιδιοπαθής υπέρταση	González A 2002, Yamamoto S 2000
Απόρριψη καρδιακού μοσχεύματος	Narula J 2001, Panizo-Santos A 2000, Puig M 2000
Παρουσία καρδιακής ανεπάρκειας	
Ισχαιμική καρδιοπάθεια	Narula J 2001, Guerra S 1999, Latif N 2000, Narula 1996, Olivetti G 1997, Rayment NB 1999, Saraste A 1999
Ιδιοπαθής διατακτική μυοκαρδιοπάθεια	Narula J 2001, Guerra S 1999, Latif N 2000, Narula 1996, Olivetti G 1997, Rayment NB 1999, Saraste A 1999, Yao M 1996, Kostin S 2003
Ακρομεγαλική καρδιοπάθεια	Frustaci A 1999
ΣΔ/Υπέρταση	Frustaci A 2000
Αρρυθμιογενής δυσπλασία της δεξιάς κοιλίας	Kavantzias NG 2000, Mallat Z 1996, Valente M 1998
Μυοκαρδίτιδα	Toyozaki T 1998
Υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια	Kavantzias NG 2000, Ino T 1997



Η απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων έχει δείξει ότι συνεισφέρει σημαντικά στην απώλεια των κυττάρων αυτών σε οξεία ισχαιμική βλάβη τόσο σε πειραματικά μοντέλα όσο και σε κλινικό επίπεδο (197). Σε μόνιμη στένωση των στεφανιαίων αρτηριών σε μοντέλο εμφράγματος μυοκαρδίου έχει δείξει η ύπαρξη αποπτωτικών μυοκαρδιακών κυττάρων και ενεργοποιημένης CASP-3 (198,199,200). Η απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων έχει αναγνωριστεί επίσης ως σημαντικός τύπος κυτταρικού θανάτου σε μοντέλα I/E, τα οποία μιμούνται το κλινικό σενάριο του οξέος εμφράγματος μυοκαρδίου με ανύψωση του ST διαστήματος στο ηλεκτροκαρδιογράφημα που αντιμετωπίζεται με θρομβόλυση ή διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση (201,202). Οι προαναφερθείσες πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η απόπτωση συνεισφέρει σημαντικά στην απώλεια των μυοκαρδιακών κυττάρων τόσο στην περιοχή του εμφράκτου καθώς και στις περιβάλλουσες το έμφρακτο περιοχές. Οι υπάρχουσες κλινικές μελέτες στηρίζουν τη θεωρία αυτή. Αξιόλογες μελέτες βιοψιών σε ασθενείς έχουν δείξει ότι τα μυοκαρδιακά κύτταρα της φυσιολογικής καρδιάς υφίστανται κυτταρικό θάνατο με πολύ βραδύ ρυθμό (203), ενώ ο ρυθμός της απόπτωσης αυξάνεται απότομα στους οξέος ισχαιμούντες καρδιακούς μύες (204). Βιοψίες από ασθενείς που κατέληξαν από οξύ έμφραγμα έδειξαν σημαντική αύξηση της απόπτωσης των μυοκαρδιακών κυττάρων στις εμφρακτικές και περι-εμφρακτικές περιοχές (205). Οι Baldi και συν. αναφέρουν ότι το μέσο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων στην εμφρακτική περιοχή ήταν 25% (206). Τέλος, οι Abbate και συν. αναφέρουν ότι ο βαθμός της απόπτωσης των μυοκαρδιακών κυττάρων σε ασθενείς με έμφραγμα σχετίζεται με δυσμενέστερη καρδιακή αναδιαμόρφωση και αυξημένη θνητότητα (207). Υποστηρίζουν έτσι τη συμμετοχή της απόπτωσης του μυοκαρδίου στον κυτταρικό θάνατο μετά από οξύ έμφραγμα και το γεγονός ότι ο βαθμός της απόπτωσης σχετίζεται άμεσα με την καρδιακή αναδιαμόρφωση και την ΚΑ.

Την τελευταία δεκαετία αυξήθηκε εκθετικά ο αριθμός των πειραματικών και κλινικών μελετών που προτείνουν ότι η απόπτωση συμβάλει σημαντικά στην παθογένεια της ΚΑ ισχαιμικής ή/και άλλης αιτιολογίας (195). Σε μοντέλα πειραματόζων με χρόνια και σταδιακά επιδεινούμενη ΚΑ, η απόπτωση του μυοκαρδίου παρατηρείται σε αυξημένο ρυθμό σε σύγκριση με τα «sham or control» ζώα. Σε μοντέλο υπερφόρτωσης όγκου οι Cardonelli και συν. έδειξαν αυξημένη απόπτωση μυοκαρδιακών κυττάρων κατά τη μετάπτωση από



αντιρροπούμενη υπερτροφία σε δυσλειτουργία της LV (208). Σε πειραματικό μοντέλο εμφράγματος οι Sam και συν. διαπίστωσαν σε χρονικό διάστημα 6 μηνών σταδιακά αυξανόμενη απόπτωση στο μη-εμφρακτικό μυοκάρδιο που σχετιζόταν με επιδεινούμενη διάταση της LV και ΚΑ (209). Επιπλέον, διαγονιδιακά μοντέλα διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα απόπτωσης. Έτσι, διαγονιδιακά ποντίκια με καρδιακή υπερέκφραση του TNF-α εμφάνισαν αυξημένη απόπτωση μυοκαρδιακών κυττάρων, δυσλειτουργία της LV, ΚΑ και οδηγήθηκαν σε πρώιμο θάνατο (210).

Πολλές είναι οι κλινικές μελέτες που έχουν δείξει ευρήματα αυξημένης απόπτωσης του μυοκαρδίου στη χρόνια ΚΑ (211). Σε καρδιακές βιοψίες οι Saraste και συν. παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα απόπτωσης του μυοκαρδίου ασθενών με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια και ΚΑ (212). Σε αυτή τη μελέτη, το ποσοστό των αποπτωτικών μυοκαρδιακών κυττάρων σχετιζονταν με την ταχύτητα εξέλιξης της ΚΑ. Οι Nagula και συν. αναφέρουν αυξημένο αριθμό TUNEL θετικών μυοκαρδιακών κυττάρων στο ανεπαρκές μυοκάρδιο και έδειξαν αυξημένα επίπεδα κυτταροπλασματικού κυτοχρώματος c και ενεργοποιημένης CASP-3 συγκριτικά με τον πληθυσμό ελέγχου (213). Τα παραπάνω πειραματικά και κλινικά ευρήματα συνηγορούν στο ότι η απόπτωση του μυοκαρδίου παρατηρείται σε αυξημένα επίπεδα στη χρόνια ανεπαρκούσα κάρδια και ότι η απώλεια των μυοκαρδιακών κυττάρων μπορεί να συμβάλλει με αυτόν τον τρόπο στην εξέλιξη της ΚΑ.

Σχετικά πρόσφατα, προτάθηκε ο ρόλος της απόπτωσης των μυοκαρδιακών κυττάρων στην παθοφυσιολογία της υπερτασικής μυοκαρδιοπάθειας, η οποία ορίζεται ως μεγαλύτερη του φυσιολογικού μάζα LV απουσία οποιασδήποτε άλλης αιτίας, εκτός από την ΑΥ (196). Αυξημένη λοιπόν απόπτωση έχει παρατηρηθεί στην υπερτροφική αριστερή κοιλία αυθόρμητα υπερτασικών αρουραίων (spontaneously hypertensive rats, SHR) (214-216), αρουραίων με υπέρταση νεφρικής αιτιολογίας (217), αρουραίων με υπέρταση οφειλόμενη στην αγγειοτασίνη II (218), καθώς και σε Dahl νατριο-ευαίσθητους υπερτασικούς αρουραίους (219) σε σύγκριση με τα νορμοτασικά πειραματόζωα ελέγχου. Αποτελέσματα από κλινικές μελέτες έδειξαν μη φυσιολογική διέγερση της απόπτωσης στην υπερτροφική καρδιά ασθενών με ιδιοπαθή υπέρταση χωρίς ένδειξη στεφανιαίας νόσου και οι οποίοι είχαν φυσιολογικούς δείκτες καρδιακής λειτουργίας (220). Η ίδια ομάδα ερευνητών παρατήρησαν ότι η απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων ήταν αυξημένη στην



καρδιά υπερτασικών ασθενών με χρόνια ΚΑ συγκριτικά με υπερτασικούς ασθενείς με LVH αλλά φυσιολογική καρδιακή λειτουργία (196). Πιο συγκεκριμένα, αυξημένος αποπρωτικός δείκτης μυοκαρδιακών κυττάρων και ενεργοποιημένη CASP-3 βρέθηκαν στην υπερτασική, ανεπαρκούσα καρδιά συγκριτικά με την υπερτασική υπερτροφική καρδιά και τη νορμοτασική καρδιά. Από τη άλλη πλευρά, μέτρια απώλεια μυοκαρδιακών κυττάρων έχει παρατηρηθεί στη μακροχρόνια συστηματική ΑΥ χωρίς στοιχεία ΚΑ (221). Με βάση τα ευρήματα των μελετών, φαίνεται ότι η απόπτωση και η απώλεια των μυοκαρδιακών κυττάρων προηγείται της διαταραχής της κοιλιακής λειτουργίας και η επιδείνωσή της συμβάλλει στην εμφάνιση της ΚΑ στους υπερτασικούς ασθενείς.

Γίνεται αντιληπτό, ότι είναι μεγάλη η ερευνητική προσπάθεια με αντικείμενο τους μηχανισμούς και τα αποτελέσματα της απόπτωσης των μυοκαρδιακών κυττάρων στα διάφορα καρδιακά νοσήματα, αλλά πολλά θέματα κατανόησης και μεθοδολογίας εξακολουθούν να παραμένουν άλυτα. Η διευκρίνιση αυτών των θεμάτων είναι εξαιρετικά επείγουσα αν αναλογιστεί κανείς ότι η ανάπτυξη μη επεμβατικών εργαλείων για την παρακολούθηση της καρδιακής απόπτωσης, καθώς και φαρμακολογικών στρατηγικών με στόχο την αναστολή των παθολογικών αποπρωτικών διαδικασιών μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην πρόληψη της εξέλιξης της καρδιακής βλάβης στις διάφορες κλινικές παθολογικές οντότητες.



Δ. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ (ΟΣ)

Δ.1. Εισαγωγή

Η ΚΑΝ αποτελεί την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνητότητας των ασθενών με ΧΝΝ σε ΑΜΚ (222). Επιπλέον, αρκετοί από τους ασθενείς σταδίου 3-5 ΧΝΝ θα καταλήξουν από κάποιο μείζον καρδιαγγειακό επεισόδιο πριν την έναρξη υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας (48). Οι παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την εμφάνιση της ΚΑΝ και έχουν περιγραφεί από την μελέτη Framingham, όπως η μεγάλη ηλικία, το κάπνισμα, η ΑΥ, ο ΣΔ, η δυσλιπιδαιμία, η LVH, ανευρίσκονται σε μεγάλο βαθμό στους ασθενείς με ΧΝΝ, αλλά όπως αναφέρθηκε, δεν φαίνεται να δίνουν ικανοποιητική ερμηνεία στο φαινόμενο αυτό (223-225). Τα τελευταία χρόνια, φάνηκε ότι ασθενείς με ΧΝΝ είναι εκτεθειμένοι και σε άλλους μη παραδοσιακούς, σχετικούς με την ουραιμία παράγοντες κινδύνου, όπως η αναιμία, η διαταραχή του μεταβολισμού ασβεστίου-φωσφόρου, η φλεγμονή, η υποθρεψία και το ΟΣ (223,224). Οι μη παραδοσιακοί αυτοί παράγοντες, οι οποίοι φαίνεται ότι εμφανίζονται ήδη από τα πρώιμα στάδια της νεφρικής βλάβης, είναι πιθανόν οι κύριοι υπεύθυνοι για την τεράστια διαφορά που παρουσιάζει η καρδιαγγειακή θνητότητα ανάμεσα στους ασθενείς με ΧΝΝ και το γενικό πληθυσμό (50).

Από αυτούς τους μη παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου, το ΟΣ έχει προταθεί ότι κατέχει κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ουραιμίας, καθώς και στις επιπλοκές της, συμπεριλαμβανομένης και της ΚΑΝ (83). Επίσης, το ΟΣ με βάση τις σύγχρονες, στοχαστικές θεωρίες της γήρανσης προκαλεί τις κύριες βλάβες στη διαδικασία της γήρανσης (226). Επιπλέον, θεωρείται ως ένα μεγάλο βαθμό υπεύθυνο για μια πληθώρα σοβαρών παθολογικών καταστάσεων, όπως ο ΣΔ, η αθηροσκλήρυνση και τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η βλάβη Ι/Ε, τα κακοήθη νεοπλασμάτα, οι νευροεκφυλιστικές και άλλες παθήσεις (227).



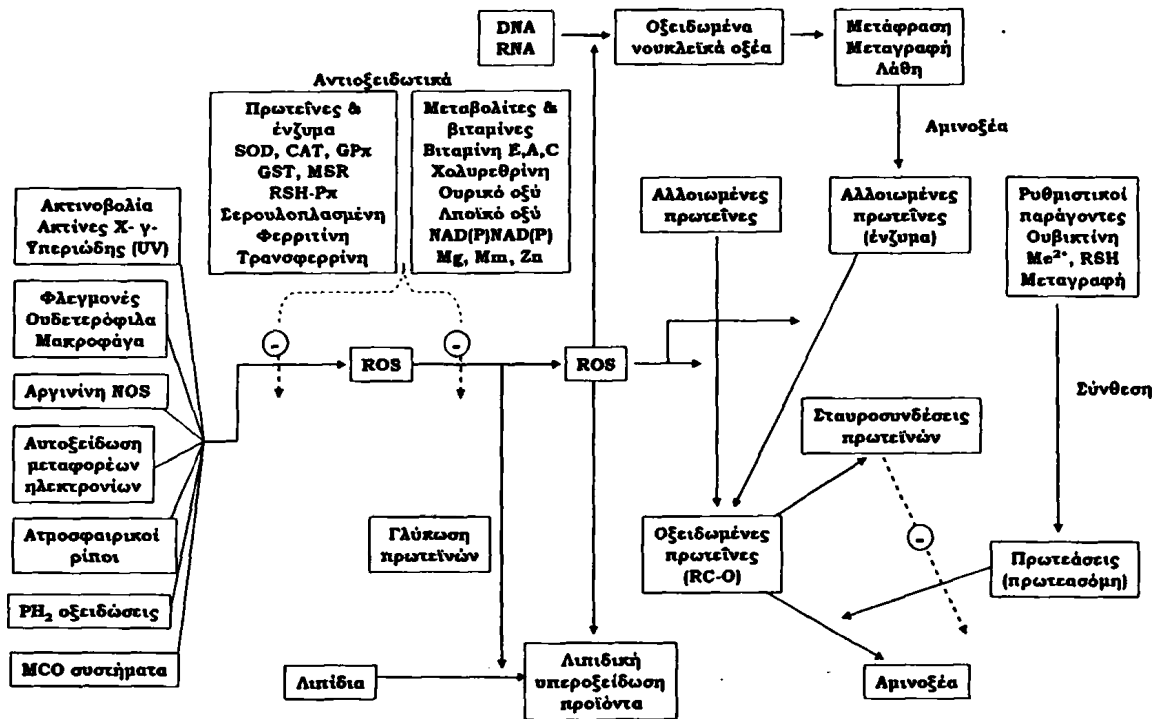
Δ.2. ΟΞ - Γενικά

Το οξυγόνο και οι ενώσεις του είναι απαραίτητα για τη ζωή και λειτουργία των αερόβιων οργανισμών, οι οποίοι στις διάφορες μεταβολικές διεργασίες χρησιμοποιούν το οξυγόνο και την ενέργεια του φωτός υπό μορφή αλυσίδας ηλεκτρονίων για να συντηρήσουν τις πολυάριθμες δραστηριότητες των κυττάρων, ιστών και οργάνων τους (228). Αλλά το οξυγόνο και οι δραστικές του ενώσεις προκαλούν συγχρόνως οξειδωτικές βλάβες σε βασικά κυτταρικά βιομόρια με αποτέλεσμα να τα αλλοιώνουν ή να τα απενεργοποιούν. Οξειδωτικό στρες σε ένα κύτταρο ή οργανισμό ονομάζεται η κατάσταση στην οποία τα επίπεδα των προ-οξειδωτικών παραγόντων υπερβαίνουν τα φυσιολογικά. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και αζώτου, κάποιες από τις οποίες είναι ελεύθερες ρίζες. Η αύξηση αυτή μπορεί να είναι αποτέλεσμα, είτε της υπέρμετρης παραγωγής τους, είτε της μειωμένης ικανότητας απομάκρυνσής τους (229,230).

Κατά τη φυσιολογική μεταβολική δραστηριότητα, οι βιολογικοί οργανισμοί σε συνεργασία με ορισμένα δομικά συστατικά του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος, είναι ικανοί να αντιμετωπίσουν και να προστατεύσουν βιομόρια και ιστούς με αμυντικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς από τις βλαβερές επιπτώσεις του ΟΞ. Κατά πόσο ένα όργανο ή συστήματα οργάνων υπόκεινται σε ΟΞ είναι αποτέλεσμα της ολικής ισορροπίας μεταξύ παραγόντων με οξειδωτικές δράσεις και αμυντικών αντιοξειδωτικών συστημάτων, ενζυμικών και μη ενζυμικών (231). Επιπρόσθετα, υπάρχουν και εξωγενείς παράγοντες, στους οποίους εκτίθενται καθημερινά οι βιολογικοί οργανισμοί και οι οποίοι συμβάλλουν στη δημιουργία ΟΞ. Αυτοί πρέπει να αντιμετωπισθούν με επιπρόσθετες αντιοξειδωτικές ουσίες (Σχήμα 5) (232,233).

Είναι φανερό ότι ενώ οι ελεύθερες ρίζες σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητες για την κυτταρική λειτουργία και την άμυνα του οργανισμού, σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι υπεύθυνες για κριτικές κυτταρικές βλάβες. Οι κυριότερες βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες στους οργανισμούς είναι η λιπιδική υπεροξείδωση σε λιπίδια των μεμβρανών των κυττάρων και άλλες λιποπρωτεΐνες, οι αλλοιώσεις στη δομή των πρωτεϊνών (γλύκωση, νίτρωση, διάσπαση πεπτιδικού δεσμού, σταυροσυνθέσεις πρωτεϊνικών αλυσίδων) που επηρεάζουν ή αναστέλλουν τη δράση ενζύμων, οι βλάβες σε υδατάνθρακες και οι οξειδωτικές βλάβες στα νουκλεϊκά οξέα (DNA).



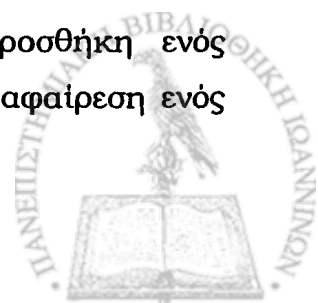


Σχήμα 5. ΟΣ και διάγραμμα μηχανισμών οξειδωτικών βλαβών σε βασικά βιομόρια

Δ.2.α. Ελεύθερες ρίζες, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου - δραστικές μορφές οξυγόνου και δραστικές μορφές αζώτου

Ελεύθερες ρίζες καλούνται άτομα, μόρια ή στοιχεία που φέρουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (234). Ο ευρύς αυτός ορισμός συμπεριλαμβάνει το άτομο του υδρογόνου (H) και το οξείδιο του αζώτου που έχουν από ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, το μόριο του οξυγόνου (O₂) που έχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια και τα περισσότερα μεταβατικά μέταλλα. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με δύο τρόπους (235):

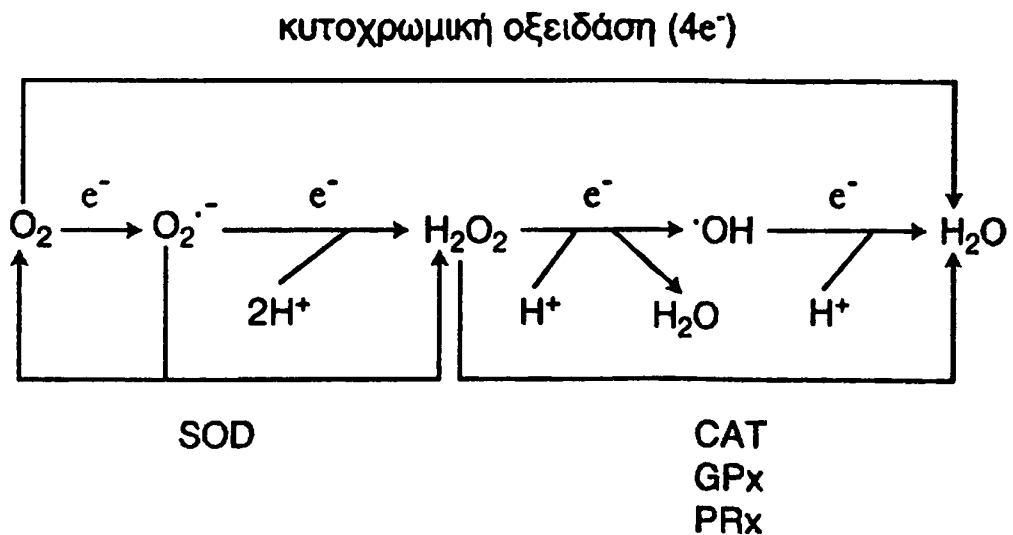
- α) Με ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού κανονικού μορίου, η οποία απαιτεί γενικά μεγάλη ποσότητα ενέργειας, όπως είναι αυτή που περιέχεται στις ακτινοβολίες ιονισμού, στις ακτινοβολίες UV και στη θερμότητα.
- β) Με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, δηλαδή με την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου σε ένα κανονικό μόριο (αναγωγή) ή με την αφαίρεση ενός



ηλεκτρονίου από ένα κανονικό μόριο (οξειδωση). Στα βιολογικά συστήματα η παραγωγή ελευθέρων ριζών γίνεται συνήθως με αυτόν τον τρόπο διότι οι αντιδράσεις αυτές δεν απαιτούν μεγάλη ενέργεια.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς – δραστικές ενώσεις γιατί εμφανίζουν ισχυρή τάση να ζευγαρώσουν το ασύζευκτό τους ηλεκτρόνιο. Η χαρακτηριστική αυτή ιδιότητα καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ικανές να συμμετέχουν σε εκατοντάδες αλυσιδωτές αντιδράσεις που μπορεί σε βιολογικά συστήματα να προκαλέσουν τοξικές βλάβες σε βιομόρια όπως υπεροξειδωση λιπιδίων μεμβρανών κυττάρων ή θραύσεις κλώνων σε DNA (229). Από το πλήθος των ελευθέρων ριζών εκείνες που παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον στα βιολογικά συστήματα είναι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (oxygen free radicals) και ιδιαίτερα οι ROS.

Το οξυγόνο λαμβάνει τα ηλεκτρόνια που προέρχονται από τις βασικές οξειδωτικές διαδικασίες των κυττάρων και ανάγεται σε νερό (H_2O) (230). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και καταλύεται από το ένζυμο κυτοχρωμική οξειδάση. Η αναγωγή του μοριακού O_2 σε H_2O απαιτεί 4 ηλεκτρόνια ενώ δεν παρατηρείται απελευθέρωση ενδιάμεσων μορφών αναγωγής από το ενεργό κέντρο του ένζυμου (Σχήμα 6) (230).



Σχήμα 6. Απεικόνιση του σχηματισμού ενδιάμεσων μορφών αναγωγής του O_2 με σταδιακά βήματα του ενός ηλεκτρονίου. Απεικονίζεται ακόμα η μετατροπή του $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O και O_2 από το ένζυμο SOD, καθώς και η αναγωγή H_2O_2 σε H_2O από τα CAT, GPx και PRx



Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ένα μικρό ποσοστό (περίπου 1%-2%) από το O_2 που καταναλώνεται στα μιτοχόνδρια διαφεύγει και ανάγεται με μονά ηλεκτρόνια, μέσω άλλων οδών, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενδιάμεσων μορφών αναγωγής του που καλούνται ROS. Τα μόρια αυτά που δεν είναι όλα ελεύθερες ρίζες, μπορούν κάτω από ορισμένες συνθήκες να συμμετέχουν σε μηχανισμούς ελευθέρων ριζών και πολύ εύκολα να παράγουν ελεύθερες ρίζες (επίδραση ιόντων μετάλλων όπως ο Fe^{2+} και ο Cu^{2+} - αντίδραση Fenton) (236). Αρκετές από τις ROS έχουν ισχυρή οξειδωτική δράση όπως το όζον (O_3), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το νιτρώδες οξύ (HNO_2), το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), το υπεροξυνιτρώδες οξύ ($ONOO^-$) και το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ($ONOOH$) (233).

Τα οξείδια του αζώτου (NO^* , NO_2^* , N_2O) και άλλα προϊόντα αντιδράσεών τους ($ONOO^-$) αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα ελευθέρων ριζών, λόγω της σημαντικής φυσιολογικής και παθοφυσιολογικής σημασίας που έχουν, με τον τίτλο δραστικές μορφές αζώτου (230). Επιστημονικό ενδιαφέρον για τα οξείδια του αζώτου ανέκλυψε τη δεκαετία του '80, όταν ταυτοποιήθηκε ότι ο ενδοθηλιακός παράγοντας χάλασης των αγγείων (EDRF, endothelial derived relaxing factor) είναι το μονοξείδιο του αζώτου (NO^*) (237). Αποτελέσματα ερευνών έχουν δείξει ότι το NO^* είναι μικρής διάρκειας ζωής ενδοκυτταρικός χημικός διαβιβαστής (μεσολαβητής σημάτων) και οι φυσιολογικοί του ρόλοι είναι καθοριστικοί για την πίεση του αίματος (αγγειοδιαστολή), την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, τη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών, τη συναπτική πλαστικότητα του εγκεφάλου και την κεντρική και περιφερική νευροδιαβίβαση.

Τρία είδη ενζύμων είναι υπεύθυνα για την παραγωγή του NO^* που ονομάζονται συνθετάσες του NO^* (NOS) και καταλύουν την οξείδωση του αμινοξέος αργινίνη, με πέντε ηλεκτρόνια, σε κιτρουλίνη και το σχηματισμό του NO^* . Η πρώτη από τις συνθετάσες εντοπίστηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα (eNOS), η δεύτερη στο νευρικό ιστό (nNOS), ενώ η τρίτη είναι ένα επαγόμενο ένζυμο, το οποίο δημιουργείται μόνο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (όπως ΟΣ) σε διαφορετικούς ιστούς (iNOS). Η βιοσύνθεση σχετικά μικρών ποσοτήτων NO^* από τις eNOS και nNOS φαίνεται να σχετίζεται με τη φυσιολογική δράση του NO^* στο καρδιαγγειακό, το νευρικό και το ανοσολογικό σύστημα. Η βιοσύνθεση όμως μεγαλύτερων ποσοτήτων NO^* από την iNOS συνδέεται με τοξικότητα του NO^* , η



οποία στρέφεται εναντίον όχι μόνο ξένων εισβολέων αλλά και εναντίον κυττάρων του ίδιου του οργανισμού.

Δ.2.β. Ελεύθερες ρίζες και ενδοκυτταρικοί ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί σε βιολογικά συστήματα

Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται κατά τις κυτταρικές διεργασίες από ενδογενείς φυσιολογικούς μηχανισμούς ή υπό την επίδραση εξωτερικών παραγόντων. Σε ενδοκυττάριο επίπεδο, ιδιαίτερα στα μιτοχόνδρια, οι συγκεντρώσεις O_2 είναι πολύ πιο χαμηλές από το περιβαλλοντικό O_2 , γεγονός που περιορίζει τις οξειδωτικές βλάβες. Παρά το γεγονός αυτό, οι πηγές ελευθέρων ριζών σε ενδοκυττάρια περιοχές είναι αρκετές και διαχωρίζονται σε ενδογενείς (μικροσωμική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, οξειδωτικά ένζυμα, φαγοκύτταρα, αντιδράσεις αυτό-οξειδωσης) (238) και εξωγενείς (οξειδώσεις φαρμάκων, καπνός του τσιγάρου, ιοντίζουσα ακτινοβολία, ηλιακή ακτινοβολία, θερμικό shock, καρκινογόνες ουσίες, οξειδωτικά αέρια της ατμοσφαιρικής ρύπανσης και άλλα). Οι ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών και ROS αντιμετωπίζονται με τους ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και τις μικρού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικές ουσίες (κυρίως στο πλάσμα του αίματος). Οι εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών, εφόσον υπερβούν τους αμυντικούς μηχανισμούς και την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, προκαλούν βλάβες στα βιομόρια, ΟΣ, παθολογικές καταστάσεις και ασθένειες.

Ειδικά ένζυμα με συγκεκριμένους αντιοξειδωτικούς στόχους προστατεύουν τους ενδοκυττάρους μηχανισμούς από οξειδωτικές βλάβες. Τέτοια ένζυμα είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η καταλάση (CAT) και διάφορες περοξυρεδοξίνες (PRx). Η αντιοξειδωτική προστασία δεν επιτυγχάνεται μόνο με ενζυμικές και μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες, αλλά και με τον περιορισμό βιοχημικών μηχανισμών με μεταλλικά ιόντα (σίδηρος, χαλκός) που δημιουργούν τοξικές οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες. Οι κυριότερες πρωτεΐνες που συγκρατούν το σίδηρο και το χαλκό δεσμευμένους και τους απελευθερώνουν όταν το απαιτούν οι φυσιολογικές συνθήκες είναι για μεν το σίδηρο η τρανσφερρίνη, η λακτοφερρίνη και κυρίως η ενδοκυττάρια φερριτίνη, για το δε χαλκό η σερουλοπλασμίνη (239-241).



Δ.2.γ. Αντιοξειδωτικές εξωκυτταρικές ουσίες στα βιολογικά συστήματα και ο ρόλος τους στην προστασία από οξειδωτικές βλάβες

Στα εξωκυτάρια υγρά των οργανισμών, η αντιοξειδωτική δράση δημιουργήθηκε για να προφυλάξει τις επιφάνειες των λιπιδικών μεμβρανών των κυττάρων (242). Για να επιτευχθεί η αντιοξειδωτική δράση χρησιμοποιούνται κυρίως αντιοξειδωτικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους και μικρό ποσοστό ενζυμικών ουσιών. Μέρος των αντιοξειδωτικών ουσιών παράγονται *in vivo*, ενώ σημαντικός αριθμός προσλαμβάνεται με τη διατροφή (229,243). Τέτοιες αντιοξειδωτικές ουσίες είναι οι (244,245):

- Αλβουμίνη: ενώνεται εύκολα με δισθενή χαλκό. Ισχυρός εκκαθαριστής του υποχλωριώδους οξέος.
- Χολερυθρίνη: προστατεύει τα λιπαρά οξέα από υπεροξείδωση.
- Γλυκόζη: εκκαθαριστής ριζών υδροξυλίου, ισχυρό αντιοξειδωτικό όπως η μαννιτόλη. Δυνητικά προ-οξειδωτική μετά από γλυκόλυση πρωτεϊνών.
- Σερουλοπλασμίνη: περιορίζει αντιδράσεις παραγωγής ριζών υδροξυλίου, εμποδίζει τη λιπιδική υπεροξείδωση από προϊόντα σιδήρου και χαλκού. Καταλυτικά οξειδώνει Fe^{2+} σε Fe^{3+} χωρίς την απελευθέρωση οξυγονούχων ελευθέρων ριζών.
- Ουρικό οξύ: εκκαθαριστής οξυγονούχων και αζωτούχων ελευθέρων ριζών. Προστασία έναντι στη λιπιδική υπεροξείδωση.
- Ερυθροκύτταρα: ικανά να παραλάβουν υπεροξειδικό ανιόν και H_2O_2 για μεταβολισμό με ενδοκυτάρια ένζυμα.
- Λακτοφερρίνη
- Τρανσφερρίνη
- Απιογλοβουλίνη και αιμοπηξίνη
- α-λιποϊκό οξύ
- Μελατονίνη-Σερατονίνη
- Ουβικινόνη (συνένζυμο Q)
- Μελανίνες
- Τοκοφερόλες (α-τοκοφερόλη, βιταμίνη E): σημαντικός λιποδιαλυτός αντιοξειδωτικός παράγοντας υπεροξυλοριζών. Προστατεύει από λιπιδική υπεροξείδωση.



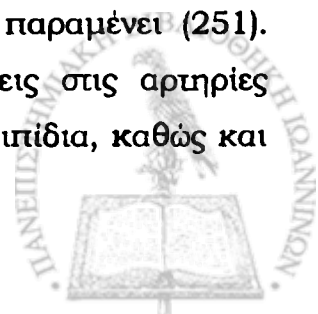
- Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C): εξαιρετικά διαλυτό στο νερό. In vino απαιτείται ως συν-παράγοντας 8 ενζύμων. Ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

Εκτός από τις βιταμίνες C και E υπάρχουν και άλλες βιταμίνες και μικρού μοριακού βάρους ενώσεις με έντονη αντιοξειδωτική δράση που παίζουν σημαντικό ρόλο, μόνες τους ή κατά ομάδες και συνεργάζονται στην πρόληψη του ΟΣ, των χρόνιων ασθενειών, αρκετών τύπων κακοηθών νεοπλασμάτων και νοσημάτων φθοράς στους βιολογικούς οργανισμούς και στον άνθρωπο. Οι βιταμίνες αυτές είναι: η βιταμίνη A, η βιταμίνη B, B6 και B12, η βιταμίνη D, η βιταμίνη K, η θειαμίνη, η ριβοφλαβίνη, η νιασίνη, το φυλλικό οξύ, τα καροτενοειδή, τα ρετινοειδή, τα φλαβονοειδή και οι διάφορες πολυφαινόλες των φυτικών τροφίμων (246).

4.2.6. Λιπιδική υπεροξειδωση

Η λιπιδική υπεροξειδωση αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη παθοφυσιολογία του σχηματισμού των αθηρωματικών πλακών και της αρτηριοσκλήρυνσης που οδηγούν στην προαγωγή καρδιαγγειακών και άλλων νοσημάτων. Η παθογένεια των νόσων αυτών έχει βρεθεί ότι οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην οξειδωτική δράση των ελευθέρων ριζών (247,248). Η υπόθεση ότι οι ενδογενείς οξειδωτικές διεργασίες οδηγούν στην παθογένεση της αθηροσκλήρυνσης προτάθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '80 από δύο ομάδες επιστημόνων. Η πρώτη ομάδα πρότεινε ότι η υπεροξειδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (low density lipoprotein, LDL) προωθεί τοξικές βλάβες σε καλλιέργειες κυττάρων που αργότερα οδηγούν σε αθηροσκλήρυνση (249). Η δεύτερη ομάδα ερευνητών απέδειξε ότι καλλιέργειες LDL, παρουσία ενδοθηλιακών κυττάρων, μετατρέπονται σε μορφές που μπορούν να παραληφθούν από υποδοχείς μακροφάγων εκκαθαριστών, μέσω διεργασιών που περιλαμβάνουν την οξειδωτική μεταβολή των λιποπρωτεϊνών (250).

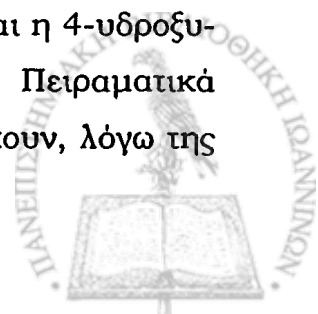
Η ανακάλυψη ότι η οξειδωμένη LDL (ox-LDL) συμμετέχει στην παθογένεια της αθηρογένεσης σήμανε την ανάπτυξη ολόκληρης «σχολής» ερευνητικών μελετών της λιπιδικής υπεροξειδωσης, αλλά παρά όλες τις προσπάθειες το βασικό ερώτημα για τη σημαντικότητα του ρόλου της ox-LDL στην αθηροσκλήρυνση παραμένει (251). Είναι γνωστό ότι οι πρωταρχικές αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις στις αρτηρίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία κυττάρων που εγκλωβίζουν λιπίδια, καθώς και



λιποπρωτεΐνες του αίματος που έχουν υποστεί οξειδωτικές βλάβες από ROS. Έρευνες έδειξαν ότι οι αθηρωματικές πλάκες που σχηματίζονται στις κύριες αρτηρίες αποτελούνται κυρίως από κύτταρα, τα οποία καλούνται αφρώδη κύτταρα (foam cells) (252,253). Τα αφρώδη κύτταρα έχουν αναγνωριστεί ως μακροφάγα που προήλθαν από κυκλοφορούντα στο αίμα μονοκύτταρα και κύτταρα μαλακών μυών που πολλαπλασιάζονται στην περιοχή της αθηρωματικής πλάκας (252,254). Οι σημαντικές μεταβολές στη σύστασή τους επέρχονται με την είσοδο των λιπιδίων και τα οποία ξεπερνούν τις ελεγχόμενες διόδους των υποδοχέων στις επιφάνειες των κυττάρων (255). Αρκετές έρευνες δείχνουν ότι οι βασικές λιποπρωτεΐνες που υπόκεινται σε αυτές τις μεταβολές και οδηγούν στη δημιουργία των αφρωδών κυττάρων είναι οι LDL (256). Νεότερες έρευνες δείχνουν ότι η πιο πιθανή μεταβολή στις LDL είναι η μετατροπή στην απολιποπρωτεΐνη Β (apo-B), καθιστώντας την τελευταία πιο ηλεκτροαρνητική και αναγνωρίσιμη μόνο από τον εκκαθαριστή υποδοχέα ακετυλο-LDL των μακροφάγων, από προϊόντα διάσπασης των λιπιδικών υπεροξειδίων, ενώ η λιπιδική υπεροξείδωση προέρχεται κυρίως από οξειδωτικούς παράγοντες στο αρτηριακό σύστημα (257,258).

4.2.6.1. Μηχανισμοί οξείδωσης των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών

Οι μηχανισμοί που διέπουν την οξείδωση των LDL εμφανίζουν τρεις φάσεις. Στην πρώτη φάση, οι ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες (κυρίως α-τοκοφερόλη) αντιστέκονται στις οξειδωτικές επιδράσεις των ελευθέρων οξυγονούχων ριζών και αναλώνονται στην προσπάθεια αυτή. Στη δεύτερη φάση επικρατούν οξειδώσεις των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) προς λιπιδικά υπεροξείδια και με αλυσιδωτές αντιδράσεις δημιουργούνται υδροϋπεροξείδια. Τα PUFA είναι βασικά συστατικά των μεμβρανών των αερόβιων οργανισμών. Προσφέρουν στη δομή τους υψηλή ευκαμψία και ρευστότητα, αλλά τα PUFA είναι συγχρόνως πολύ ευάλωτα σε οξειδωτικές δράσεις, ιδιαίτερα σε υπεροξειδώσεις. Η σημαντικότερη πηγή σχηματισμού υπεροξειδίων PUFA (LOO[•]) είναι η ενδογενής αναπνευστική αλυσίδα των εσωτερικών μεμβρανών των μιτοχονδρίων. Στην τρίτη φάση, επικρατούν μηχανισμοί που αποσυνθέτουν τα λιπιδικά υδροϋπεροξείδια σε δραστικές αλδεϋδικές ενώσεις, όπως η μηλονική διαλδεϋδη (MDA) και η 4-υδροξυ-2-εννεάλη (HNE) που είναι και οι πιο δραστικές (259). Πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι αυτές οι καρβονυλικές ενώσεις συμμετέχουν, λόγω της

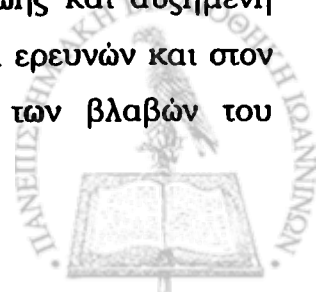


υψηλής κυτταροτοξικής τους δράσης, στη μετατροπή των LDL, στην παθοφυσιολογία της αθηρογένεσης και στην αύξηση των καρδιαγγειακών νοσημάτων (260).

Δ.3. ΟΞ – Γήρανση – Παθολογικές καταστάσεις και νοσήματα φθοράς στον άνθρωπο

Οι ελεύθερες ρίζες και ιδιαίτερα οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι ρίζες αζώτου και χλωρίου θεωρούνται σημαντικά προϊόντα βιολογικού μεταβολισμού που συμβάλλουν σε κυτταρικές βλάβες. Οι ενώσεις αυτές λόγω της τοξικής τους επίδρασης στη δομή των βασικών βιομορίων ενοχοποιούνται για το φαινόμενο της γήρανσης και άμεσα ή έμμεσα είναι υπεύθυνες για σημαντικό αριθμό παθολογικών καταστάσεων, ασθενειών φθοράς και κακοηθών νεοπλασιών στον άνθρωπο (261,262).

Οι θεωρίες που επικρατούν σήμερα για την ερμηνεία του φυσιολογικού φαινομένου της γήρανσης των πολυκύτταρων οργανισμών και του ανθρώπου διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: στις θεωρίες προγραμματισμού ή γενετικές και στις θεωρίες συσσώρευσης βλαβών ή στοχαστικές θεωρίες (226,263). Οι στοχαστικές θεωρίες της γήρανσης υποστηρίζουν ότι οι κύριες διεργασίες είναι μηχανισμοί συσσώρευσης βλαβών σε βασικά βιομόρια, ιστούς και κύτταρα, οι οποίες δεν μπορούν να επιδιορθωθούν και επιφέρουν πολλαπλές ανωμαλίες στο μεταβολισμό, εκφυλισμό και θάνατο των κυττάρων. Οι κύριες βλάβες είναι οξειδωτικές, μέσω μηχανισμού ελευθέρων ριζών που δεν αντιμετωπίζονται από τους αμυντικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Οι σημαντικότερες βλάβες που προκαλούν οι ROS κατά τη γήρανση αφορούν τα μιτοχόνδρια (μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA), τις πρωτεΐνες (διάσπαση, οξείδωση), τα λιπίδια (υπεροξείδωση) και το DNA (σωματικές μεταλλάξεις). Δεδομένα από πειράματα γενετικής έρχονται να επιβεβαιώσουν τη σύνδεση του ΟΞ με τη διάρκεια της ζωής σε αρκετά είδη ζώων. Στο νηματώδες *C.elegans* η μετάλλαξη *daf-2* προκαλεί μακροβιότητα μέσω της αυξημένης έκφρασης της Mn-SOD (264). Στη *Drosophila* η μετάλλαξη μεθειονίνης συνδυάζεται με αυξημένη διάρκεια ζωής και αυξημένη αντίσταση στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (265). Αποτελέσματα ερευνητών και στον άνθρωπο δείχνουν θετική συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό των βλαβών του

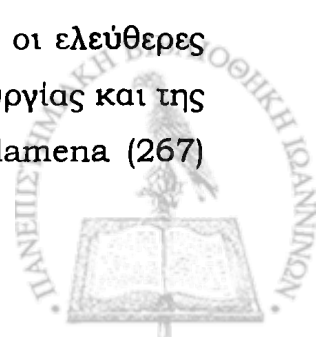


πυρηνικού DNA που συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της ζωής και της γήρανσης, ανάλογα με την αντιοξειδωτική κατάσταση του οργανισμού (266).

Συνεχώς αυξάνεται ο όγκος των πληροφοριών σύμφωνα με τις οποίες το ΟΣ φαίνεται να κατέχει κάποιο ρόλο στην αιτιοπαθογένεια διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις φθοράς της τρίτης ηλικίας (Alzheimer's disease, Parkinson's disease), ο ΣΔ, χρόνιες φλεγμονώδεις διαταραχές, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και παθήσεις των πνευμόνων, η αθηροσκλήρυνση και τα νοσήματα του καρδιαγγειακού συστήματος, η βλάβη Ι/Ε, η λοίμωξη από τον ιό της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου (HIV) και τα κακοήγη νεοπλασμάτα όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του μαστού, αποτελούν μερικές από τις σημαντικότερες νοσηρές καταστάσεις στις οποίες το ΟΣ εμπλέκεται άμεσα ή έμμεσα (261,262). Οι περισσότερες από τις παραπάνω παθήσεις διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες, όσον αφορά στο είδος των διαταραχών της οξειδωτικής ισορροπίας (227). Στην πρώτη κατηγορία ο καρκίνος και ο ΣΔ εμφανίζουν μία προ-οξειδωτική αλλαγή στη συστηματική θειολο/δισουλφίδο οξειδοαναγωγική ισορροπία και μία μειονεκτική κάθαρση της γλυκόζης, στοιχεία που καθιστούν ως πιθανότερη διαταραχή την αυξημένη παραγωγή ROS από μιτοχόνδρια των σκελετικών μυών. Αυτές οι καταστάσεις μπορούν να αναφέρονται ως «μιτοχόνδριακό ΟΣ». Οι παθήσεις που ανήκουν στη δεύτερη κατηγορία μπορούν να αναφέρονται ως «φλεγμονώδεις οξειδωτικές καταστάσεις» γιατί τυπικά σχετίζονται με υπερβολική διέγερση της δραστηριότητας της NAD(P)H (Nicotinamide adenine dinucleotide) οξειδάσης από κυττοκίνες και άλλους παράγοντες. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα αυξημένα επίπεδα των ROS ή οι αλλαγές στα ενδοκυττάρια επίπεδα της γλουταθειόνης συνήθως σχετίζονται με παθολογικές αλλαγές ενδεικτικές δυσλειτουργίας σηματοδοτικών καταρρακτών ή/και έκφρασης γονιδίων οι οποίες ενισχύονται από μεταβολές στην έκφραση των μορίων προσκόλλησης.

Δ.4. Οξειδωτικό στρες και καρδιαγγειακή νόσος

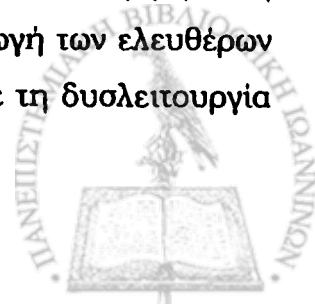
Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών έγινε σαφές ότι οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν σημαντικούς μεσολαβητές της καρδιαγγειακής λειτουργίας και της παθολογίας της. Σε μία πρόσφατη ανασκόπηση, οι Zweier και Villamena (267)



παρουσιάζουν τις ROS ως παράγοντα κλειδί στη βλάβη που υφίσταται η καρδιά κατά τη διάρκεια ενός οξέος ΕΜ, καθώς και κατά τη διαδικασία της Ι/Ε. Οι ελεύθερες ρίζες ενοχοποιούνται ως ένα βαθμό στη δημιουργία της αρτηριοσκληρώσεως καθώς και στην οξεία ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. Πρόσφατες αναφορές εμπλέκουν τις ελεύθερες ρίζες στην παθογένεια της ΑΥ και της αγγειακής ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Έχει επίσης αναφερθεί ότι οι ROS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καρδιομυοπάθεια και στην ΚΑ, ανεξάρτητα από το αν αυτή οφείλεται σε ισχαιμική, υπερτασική, αυτοάνοση ή μεταλοιμώδη αιτία.

Αρκετές ενδείξεις από πειραματικά μοντέλα προτείνουν την αύξηση του ΟΣ στην ΚΑ. Στη δεκαετία του '90 άρχισαν να εμφανίζονται και κλινικά δεδομένα, τα οποία υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση. Το 1991 οι Blech και συν. προσδιόρισαν τα επίπεδα της MDA και των θειολών του πλάσματος σε 45 ασθενείς με ΚΑ σε σύγκριση με υγιή άτομα και βρήκαν ότι οι συγκεντρώσεις της MDA ήταν σαφώς υψηλότερες, ενώ οι αντιοξειδωτικές θειόλες ήταν σαφώς χαμηλότερες στους ασθενείς σε σχέση με τον πληθυσμό των υγιών (268). Πιο πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι η παραγωγή ελευθέρων ριζών συνδέεται με τη βαρύτητα της ΚΑ. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των F2-ισοπροστανίων που είναι ισομερή της προσταγλανδίνης F2a και αποτελούν δείκτη ενδογενούς οξείδωσης των λιπιδίων, τόσο στο περικαρδιακό υγρό όσο και στα ούρα ασθενών με ΚΑ, ήταν υψηλότερα από εκείνα του υγιή πληθυσμού ελέγχου και επιπλέον τα επίπεδα των F2-ισοπροστανίων των ούρων αυξανόταν σημαντικά με την επιδείνωση των σταδίων της ΚΑ (269,270).

Όσον αφορά στο μηχανισμό με τον οποίο οι ελεύθερες ρίζες επιδεινώνουν τη μυοκαρδιακή λειτουργία φάνηκε από πειραματικά μοντέλα ότι προκαλούν διαταραχή στο μεταβολισμό και τη συσταλτικότητα των μυοκαρδιακών κυττάρων (271). Το ΟΣ διαταράσσει τη λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου με την οξείδωση των σουλφυδρυλικών ομάδων της Ca^{2+} -ATPase προκαλώντας στο κύτταρο υπερφόρτωση Ca^{2+} (272). Οι ελεύθερες ρίζες προδιαθέτουν σε διαταραχές του καρδιακού ρυθμού με αποτέλεσμα επιδείνωση της λειτουργίας της LV (273). Επίσης, τα αυξημένα επίπεδα των κατεχολαμινών και η χρόνια υπερφόρτωση όγκου που συνοδεύουν την ΚΑ πιθανώς να αυξάνουν την παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Τέλος, το ΟΣ συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της ΚΑ με τη δυσλειτουργία

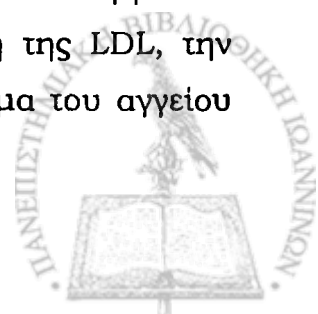


του ενδοθηλίου που προκαλεί είτε μέσω της αδρανοποίησης του NO, είτε μέσω των πολλαπλών δράσεων της αγγειοτασίνης II (274,275).

Το OS φαίνεται ότι εμπλέκεται αιτιολογικά στην παθολογία των στεφανιαίων αγγείων. Τα επίπεδα των F2-ισοπροστανίων βρέθηκαν διπλάσια των φυσιολογικών σε ασθενείς με ασταθή στηθάγχη (276). Οι Vassalle και συν. βρήκαν σε ασθενείς με διαπιστωμένη αγγειογραφικά στεφανιαία νόσο αυξημένα επίπεδα F2-ισοπροστανίων πλάσματος και ελαττωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με υγιή άτομα (277). Επιπλέον, τα επίπεδα αυτών των δεικτών του OS σχετιζόνταν με τη βαρύτητα της νόσου και τον αριθμό των συνυπαρχόντων αθηρογενετικών παραγόντων κινδύνου. Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι τα ισομερή των F2-ισοπροστανίων εκτός από δείκτες OS είναι και μεσολαβητές της οξειδωτικής βλάβης των κυττάρων, αφού τα ίδια προκαλούν αγγειοσύσπαση των χοίρειων και βόειων στεφανιαίων αγγείων (278).

Η μαζική παραγωγή ROS έχει ενοχοποιηθεί ως σημαντικός παράγοντας στην αιτιολογία της βαριάς ιστικής βλάβης κατά το φαινόμενο της I/E που συμβαίνει κυρίως σε επεμβάσεις καρδιοπνευμονικής παράκαμψης, σε θρομβολύσεις, εμβολεκτομές και μεταμοσχεύσεις οργάνων (227). Πειραματικά και κλινικά δεδομένα στηρίζουν την υπόθεση ότι η επαναιμάτωση, παρά η ισχαιμία per se, προκαλεί την ενδοθηλιακή βλάβη. Κατά τη φάση της ισχαιμίας η υπερβολική κατανάλωση ATP οδηγεί στην άθροιση των προϊόντων καταβολισμού των πουρινών, υποξανθίνης και ξανθίνης, οι οποίες κατά τη φάση της επαναιμάτωσης με την επακόλουθη επαναπροσφορά οξυγόνου μεταβολίζονται από την οξειδάση της ξανθίνης σε υπεροξειδίο του οξυγόνου και H₂O₂. Επίσης, έχει φανεί σε μελέτες ότι τα επίπεδα των ισοπροστανίων στα βιολογικά υγρά και στους ιστούς αποτελούν ένα ιδιαίτερα ευαίσθητο και ειδικό εργαλείο για την ποσοτική εκτίμηση της βλάβης από I/E (279).

Η «φλεγμονώδης υπόθεση» της αθηροσκλήρυνσης αξιώνει ότι τα κριτικά γεγονότα που εμπλέκονται στην έναρξη και την εξέλιξη της βλάβης είναι κυρίως η φλεγμονή και ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων που πυροδοτούνται από κυττοκίνες και αυξητικούς παράγοντες (280). Επιπλέον, στην έναρξη και την εξέλιξη της αγγειακής βλάβης φαίνεται ότι το OS συμβάλλει αιτιολογικά και ρυθμίζει μέσω των ελευθέρων ριζών την οξείδωση της LDL, την βιοδιαθεσιμότητα του NO και τη φλεγμονώδη απάντηση στο τοίχωμα του αγγείου



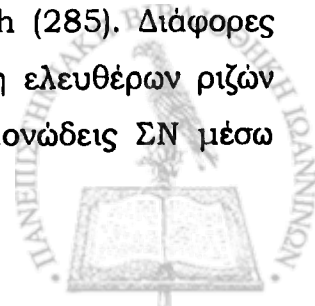
(281). Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι εξακριβωμένος, φαίνεται ότι το ΟΣ μέσω των προαναφερθέντων παθογενετικών μονοπατιών προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η οποία είναι πρώιμο χαρακτηριστικό των καρδιαγγειακών παθήσεων και καθοριστικής σημασίας για την εξέλιξη τους (282).

Αναφέρθηκε ήδη ότι οι ασθενείς με ΧΝΝ είναι εκτεθειμένοι στους σχετικούς με την ουραιμία παράγοντες κινδύνου, όπως η αναιμία, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, η φλεγμονή, η υποθρεψία και το ΟΣ (223,224). Οι μη παραδοσιακοί αυτοί παράγοντες, οι οποίοι αλληλεπιδρούν, σε συνδυασμό με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της ίδιας της νεφρικής βλάβης είναι πιθανόν οι κύριοι υπεύθυνοι για την αυξημένη επίπτωση που παρουσιάζει η καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα στους ασθενείς με ΧΝΝ συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό (50).

Δ.5. Η παθοφυσιολογία του ΟΣ στην εξέλιξη της νεφρικής βλάβης

Πληθώρα παθογενετικών μηχανισμών έχουν ενοχοποιηθεί για την εξέλιξη της νεφρικής νόσου μεταξύ των οποίων και η διαταραχή ή/και η αύξηση της παραγωγής των ROS (283). Η υπόθεση ότι οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία υποστηρίζεται από ένα συνεχώς αυξανόμενο όγκο ενδείξεων οι οποίες συνίστανται στην αύξηση του ΟΣ στη χρόνια νεφρική βλάβη, στα ευεργετικά αποτελέσματα της εφαρμογής αντιοξειδωτικών στρατηγικών σε μοντέλα χρόνιας νεφρικής βλάβης καθώς και στο γεγονός ότι το ΟΣ μπορεί να προκαλέσει αλλαγές σε έναν κατά τα άλλα υγιή νεφρό, οι οποίες προσομοιάζουν με αυτές που παρατηρούνται στη χρόνια νεφρική νόσο.

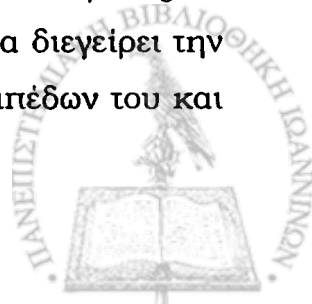
Τα δυνητικά επιβλαβή προϊόντα της επίδρασης του ΟΣ μπορούν να παραχθούν μέσω πληθώρας μηχανισμών, από πολλούς τύπους κυττάρων μεταξύ των οποίων και τα αυτόχθονα νεφρικά κύτταρα καθώς και τα φλεγμονώδη κύτταρα που διηθούν το νεφρό. Το γεγονός ότι ο νεφρός παράγει H_2O_2 ακόμα και σε επίπεδα φυσιολογικού μεταβολισμού έχει αναγνωριστεί από τους Rondini και Cudkowicz πριν από 50 χρόνια περίπου (284) και η σημαντική αυτή παρατήρηση επιβεβαιώθηκε αργότερα από τις μελέτες των Guidet και Shah (285). Διάφορες παθολογικές διαδικασίες μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα φυσικά και διηθούντα το νεφρό κύτταρα όπως φλεγμονώδεις ΣΝ μέσω



συγκεκριμένων κυττοκινών (283). Άλλος μηχανισμός πρόκλησης ΟΣ από το νεφρό περιλαμβάνει τη μεταφορά στα νεφρικά σωληνάρια πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο, όπως η τρανσφερρίνη, η οποία διηθείται στα ουροφόρα σωληνάρια σε καταστάσεις πρωτεϊνουρίας (286). Στην εξέλιξη της νεφρικής βλάβης, ανεξαρτήτως αιτιολογίας, η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορεί να προέλθει από τις μεταβολικές προσαρμογές των εναπομεινάντων νεφρών που υποχρεώνονται σε υπερλειτουργία και αυξημένη κατανάλωση O_2 (287). Επίσης, συγκεκριμένα πρωτοπαθή νεφρικά νοσήματα συμβάλλουν στη δημιουργία του ΟΣ, όπως η διαβητική νεφροπάθεια μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν την προ-οξειδωτική δράση των τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης, την αυτό-οξείδωση της γλυκόζης, τη δράση της ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης C και γενικότερα την αυξημένη παραγωγή δραστικών ριζών από τον υπερλειτουργούντα διαβητικό νεφρό (288).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να δειχθεί κατά πόσο η χρόνια αύξηση των ROS μπορεί να προκαλέσει χρόνια νεφρική βλάβη (289,290). Χρησιμοποιήθηκαν αρουραίοι, στους οποίους προκλήθηκε διαταραχή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών μέσω της διαιτητικής στέρσης σεληνίου και Vit E, στοιχεία απαραίτητα για τη αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι διαίτα ελλιπή σε αντιοξειδωτικά οδηγεί σε αύξηση της νεφρικής μάζας μέσω διέγερσης της σύνθεσης του DNA και της έκφρασης πρωτο-ογκογονοδίων και επιπλέον προκαλεί νεφρική βλάβη με την αύξηση της έκφρασης του κολλαγόνου στο διάμεσο χώρο και στη βασική μεμβράνη, καθώς και της κυττοκίνης TGF- β 1. Οι ερευνητές κατέληξαν λοιπόν στο συμπέρασμα ότι διαίτα φτωχή σε σεληνίο και βιταμίνη E, αντιοξειδωτικά τα οποία συνήθως εμφανίζουν ελαττωμένες συγκεντρώσεις στη νεφρική ανεπάρκεια, προκαλεί μία προ-οξειδωτική κατάσταση στο νεφρό και οδηγεί στην εμφάνιση χαρακτηριστικών που προσομοιάζουν με αυτά που παρατηρούνται στη ΧΝΝ.

Οι αναγνωρισμένες παθοφυσιολογικές και βιολογικές συνέπειες του ΟΣ σχετίζονται με αρκετά από τα χαρακτηριστικά, κλειδιά στην εξέλιξη της νεφρικής νόσου. Η ετερογένεια της φύσης των οξειδωτικών ουσιών σε συνδυασμό με τις ποικίλες δράσεις τους φαίνεται ότι αποτελούν τη βάση για τη συμμετοχή τους σε ένα τόσο ευρύ φάσμα παθοβιολογικών διαδικασιών. Το ΟΣ μπορεί να διεγείρει την παραγωγή μιας ποικιλίας αγγειοδραστικών ουσιών αναλόγως των επιπέδων του και



το είδος της οξειδωτικής ουσίας (291). Σε χαμηλές δόσεις το H_2O_2 μπορεί να διεγείρει την παραγωγή της γουανλικής κυκλάσης και να ευοδώσει την cGMP (cyclic guanosine monophosphate) εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή. Επιπλέον, μπορεί να διεγείρει την παραγωγή της προστακυκλίνης και άλλων αγγειοδιασταλτικών ουσιών, ενώ αντιθέτως ευθύνεται και για την παραγωγή αγγειοσυσπαστικών ουσιών, όπως οι θρομβοξάνες, η ενδοθηλίνη και τα ισοπροσάνια. Καθίσταται λοιπόν προφανές ότι το ΟΣ μέσω αυτών των δράσεων μπορεί να εμπλακεί στην αιμοδυναμική του νεφρού και να προκαλέσει τέτοιες μεταβολές που έχουν ως συνέπεια την εξέλιξη της νεφρικής βλάβης.

Η παρουσία οξειδωτικών ουσιών σε μεγάλες συγκεντρώσεις έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει πρωτεϊνουρία σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η βλαπτική αυτή επίδραση μπορεί να είναι συνέπεια είτε μιας λυτικής βλάβης των κυττάρων που συμμετέχουν στο σπειραματικό φραγμό διήθησης, δηλαδή των σπειραματικών επιθηλιακών και των ενδοθηλιακών κυττάρων, είτε άμεσης βλάβης των συστατικών της βασικής σπειραματικής μεμβράνης, είτε τέλος συνέπεια της ενεργοποίησης μεταλλοπρωτεϊνών που κατακερματίζουν τα συστατικά της μεμβράνης και διαταράσσουν την εκλεκτικότητα του φραγμού (292,293). Πειραματικά δεδομένα που στηρίζουν την πρόκληση πρωτεϊνουρίας από το ΟΣ προέρχονται από τις μελέτες των Yoshiooka και συν., οι οποίοι μετά την έγχυση H_2O_2 στη νεφρική αρτηρία διαπίστωσαν αύξηση της αποβαλλόμενης ποσότητας πρωτεϊνών στα ούρα κατά 50 φορές (294).

Οι ROS σε μικρότερες συγκεντρώσεις φαίνεται ότι εμφανίζουν διαφορετικού τύπου δράσεις, συμπεριλαμβανομένων της ενεργοποίησης των μονοπατιών μετάδοσης σημάτων, της διέγερσης της σύνθεσης του DNA, καθώς και της μιτογένεσης (295,296). Τέτοιες δράσεις των ROS μπορεί να ευοδώσουν και να συμβάλλουν στην αυξητική απάντηση που παρατηρείται από κάποιες υποομάδες εναπομεινάντων νεφρώνων στη χρόνια νεφρική βλάβη και αυτή η υπερτροφία των νεφρώνων συγκαταλέγεται στους μηχανισμούς εξέλιξης της βλάβης.

Έχει ήδη αναφερθεί η σημασία του ΟΣ στη διαδικασία της γήρανσης. Δεδομένα μελετών υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η βασική έκφραση της γήρανσης, δηλαδή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος μέσω του φαινομένου της απόπτωσης μπορεί να ευοδωθεί από οξειδωτικές ουσίες σε χαμηλές δόσεις και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (297,298). Η απόπτωση, όπως ήδη

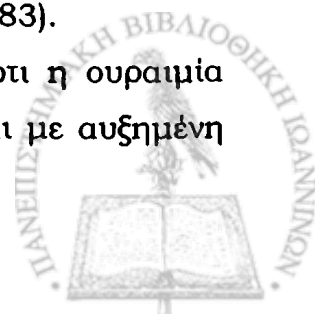


αναφέρθηκε, έχει αναγνωριστεί στη χρόνια νεφρική βλάβη και αποτελεί τουλάχιστον ένα μηχανισμό μέσω του οποίου τα ατροφικά σωληναριακά κύτταρα απομακρύνονται και η μάζα του νεφρού προοδευτικά ελαττώνεται. Ένας άλλος μηχανισμός, ο οποίος έχει αναγνωριστεί ότι συμμετέχει στην εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής βλάβης είναι η φλεγμονή. Υπάρχουν δεδομένα σύμφωνα με τα οποία συγκεκριμένα είδη δραστικών ριζών μπορούν να προκαλέσουν αύξηση των επιπέδων των λευκοκυτταρικών μορίων προσκόλλησης, καθώς και κάποιων προφλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως για παράδειγμα των σελεκτινών P και E και των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) και VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) (299). Ένα επιπλέον στοιχείο της συμμετοχής του ΟΣ στη διαδικασία της φλεγμονής αποτελεί το γεγονός ότι αρκετές κυττοκίνες και προφλεγμονώδεις παράγοντες, όπως ο PDGF και ο TNF-α εμπλέκονται στην αύξηση των επιπέδων του ΟΣ. Επομένως, το ΟΣ προάγει τη φλεγμονή και οι προφλεγμονώδεις μεσολαβητές συμβάλουν στην κυτταρική παραγωγή των δραστικών ριζών που ακολουθεί.

Δ.6. ΟΣ και θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας

Οι παθολογικές καταστάσεις που προκύπτουν από την ουραιμία και τη χρόνια ΑΜΚ φαίνεται ότι αποτελούν τις κυριότερες αιτίες νοσηρότητας ή/και θνητότητας των ασθενών σε θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας και συγκεντρώνουν το κύριο ενδιαφέρον των νεφρολόγων (300). Οι συχνότερες από τις επιπλοκές αυτές είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η αμυλοείδωση από β2-μικροσφαιρίνη, οι λοιμώξεις και η υποθρεψία. Η ΚΑΝ με τη μορφή της επιταχυνόμενης αθηροσκλήρωσης, της ισχαιμικής καρδιοπάθειας και της LVH αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε την κύρια αιτία θνητότητας στους ασθενείς σε θεραπεία υποκατάστασης υπεύθυνη για το 50%-60% των θανάτων (48,222). Παρά την επικρατούσα θεωρία σύμφωνα, με την οποία διάφοροι παθογενετικοί μηχανισμοί δρουν συνεργιστικά στην πρόκληση των επιπλοκών της ΑΜΚ, αυξάνεται συνεχώς ο όγκος των στοιχείων που προτείνουν το ΟΣ ως τον κύριο παθογενετικό μηχανισμό, υπεύθυνο για τις ποικίλες ιστικές βλάβες (83).

Την τελευταία δεκαετία αναφέρεται σε σειρά δημοσιεύσεων ότι η ουραιμία γενικά και ανεξάρτητα από την πρωτοπαθή νεφρική νόσο σχετίζεται με αυξημένη



δραστηριότητα του ΟΣ (83,301). Η έναρξη θεραπείας με ΑΜΚ φαίνεται ότι είναι αναποτελεσματική στο να ελέγξει τη φλεγμονή και το ΟΣ στους ασθενείς αυτούς (302) και επιπλέον η θεραπεία με ΑΜΚ ή ΠΚ συντηρεί τα αυξημένα επίπεδα του ΟΣ και συμβάλλει στην ελάττωση των αντιοξειδωτικών εφεδρειών (303). Αναφορικά, η βλαπτική επίδραση του ΟΣ στους ασθενείς υπό ΑΜΚ εικάζεται ότι προκαλείται από τρεις κύριες κατηγορίες παραγόντων: τις διαταραχές τις σχετιζόμενες με το ουραιμικό περιβάλλον, τη διαδικασία της ΑΜΚ *per se* και τη συγχορηγούμενη φαρμακευτική αγωγή (304). Παρά τη γνώση ότι το ΟΣ κατέχει κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ουραιμίας, καθώς και στις επιπλοκές της, ο αριθμός των μελετών στη διεθνή βιβλιογραφία, με αντικείμενο την έρευνα του ΟΣ στα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ είναι περιορισμένος και περιέχει αντιφατικά αποτελέσματα (305-308). Αναφορά στις μελέτες που έχουν ως αντικείμενο το ΟΣ στα πρώιμα στάδια της ΧΧΝ γίνεται στην επόμενη θεματική υπο-ενότητα.

Στους ασθενείς με ΧΝΝ σε ΑΜΚ έχει τεκμηριωθεί επαρκώς η αυξημένη συχνότητα και τα υψηλά επίπεδα του ΟΣ, καθώς και οι συνέπειές του στην καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα (83,309,310). Σχετικά πρόσφατα ευρήματα έχουν δείξει ότι τα επίπεδα των ισοπροστανίων του πλάσματος είναι δύο με τέσσερις φορές υψηλότερα στους ασθενείς υπό ΑΜΚ σε σχέση με υγιή άτομα του ίδιου φύλου και της ίδιας ηλικίας και ότι σχετίζονται με τα επίπεδα της CRP (C-reactive protein) (311,312). Σε ανάλογο συμπέρασμα κατέληξε και άλλη μία ομάδα ερευνητών, οι οποίοι προσδιόρισαν τα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων (8-epiPGF2a) σε 65 ασθενείς υπό ΑΜΚ και ΠΚ. Το αποτέλεσμα της μελέτης ήταν η αύξηση των 8-epiPGF2a στους ασθενείς αυτούς σε σχέση με υγιή άτομα, καθώς και η συσχέτισή τους με τα επίπεδα της CRP του ορού, sAlb και της απογλοβίνης (303). Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές μελέτες, στις οποίες η μέτρηση δεικτών του ΟΣ χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να προβλεφθεί η έκβαση ασθενών σε χρόνια ΑΜΚ. Έτσι, οι Bayers και συν. διαπίστωσαν ότι τα αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων έναντι της ox-LDL σχετίζονται με μείωση της 24μηνιας επιβίωσης σε μία ομάδα 94 ασθενών σε ΑΜΚ (313), ενώ οι Scott και συν. αφού παρακολούθησαν τα επίπεδα της MDA, της καρδιακής Τροπονίνης T και της CRP κατέληξαν στο ότι τα αυξημένα επίπεδα του κάθε παράγοντα σχετίζονται ανεξάρτητα με ελαττωμένη ετήσια επιβίωση σε μία ομάδα 71 ηλικιωμένων αιμοκαθαιρόμενων ασθενών (314).

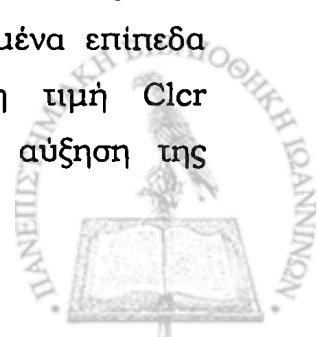


Δ.7. ΟΣ και ΧΝΝ

Παρά τη γνώση ότι το ΟΣ κατέχει κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ουραιμίας, καθώς και στις επιπλοκές της, οι μελέτες που προσπάθησαν να εκτιμήσουν την εμφάνιση του ΟΣ και την αύξησή του στα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ είναι εξαιρετικά λίγες και περιέχουν αντιφατικά αποτελέσματα (282,305-309). Η ομάδα των Himmelfarb και συν. έλεγξαν έναν μικρό αριθμό 30 ατόμων, εκ των οποίων 10 υγείς, 10 σε προχωρημένο στάδιο ΧΝΝ και 10 σε ΑΜΚ. Ως δείκτες προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής δραστηριότητας χρησιμοποίησαν τα καρβονύλια και τις θειόλες αντίστοιχα και ανέδειξαν ότι οι πιο επιβαρημένοι ήταν οι ασθενείς σε ΑΜΚ και στη συνέχεια οι ασθενείς με ΧΝΝ που εμφάνιζαν μειωμένες αντιοξειδωτικές εφεδρείες και αυξημένο ΟΣ (305). Οι Annuk και συν. μελέτησαν 37 ασθενείς με μέση τιμή Clcr τα 25 ml/min/1.73m² και παρατήρησαν αύξηση στα τελικά προϊόντα παραγωγής των οξειδωμένων λιπιδίων, καθώς και στα επίπεδα γλουταθειόνης, τα οποία συσχέτισαν με τη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που εμφανίζουν αυτοί οι ασθενείς (282).

Οι Oberg και συν. προσπάθησαν να συσχετίσουν σε 60 ασθενείς σταδίου 3-5 ΧΝΝ πριν την ένταξή τους σε θεραπεία υποκατάστασης τα επίπεδα του ΟΣ με το GFR. Το ΟΣ εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας τις αναχθείσες θειόλες, τα F2-ισοπροστάνια και τα καρβονύλια του πλάσματος, αλλά απέτυχαν να περιγράψουν συσχέτιση ανάμεσα στους δείκτες αυτούς και τον GFR. Περιορισμοί της μελέτης ήταν ο περιορισμένος αριθμός των ασθενών και η μη αντιπροσωπευτική κατανομή τους στα τρία στάδια της ΧΝΝ μιας και το 60% των ασθενών ανήκαν στο στάδιο 4 και 5 (306).

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν τρεις μελέτες, οι οποίες περιγράφουν αρνητική συσχέτιση μεταξύ ΟΣ και του GFR στους ασθενείς με διάφορα στάδια ΧΝΝ. Συγκεκριμένα, οι Witko-Sarsat και συν. μελέτησαν τα τελικά προϊόντα οξείδωσης των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων, τη MDA και την PGx σε 162 ασθενείς πριν την ΑΜΚ, με Clcr μεταξύ 80 έως και κάτω από 20 ml/min/1.73m², καθώς και σε υγιή άτομα. Βρέθηκε ότι τα τελικά προϊόντα οξείδωσης των πρωτεϊνών ήταν αυξημένα σε σχέση με τους υγείς και σχετιζονταν αρνητικά με την Clcr (308). Οι Terawaki και συν. βρήκαν αυξημένα επίπεδα οξειδωμένης sAlb σε 55 ασθενείς πριν την ΑΜΚ με μέση τιμή Clcr 40 ml/min/1.73m². Στα αποτελέσματά τους φάνηκε σταδιακή αύξηση της



οξειδωμένης sAlb με την επιδείνωση του GFR (307). Πιο πρόσφατα, σε 159 ασθενείς με ΧΝΝ σταδίου 1-5, οι Yilmaz και συν. έδειξαν ότι τα επίπεδα δεικτών ΟΣ όπως η MDA και η οx-LDL αυξάνονταν, ενώ οι αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως η SOD, η GPx, το σελήνιο του πλάσματος, ο ψευδάργυρος και ο χαλκός των ερυθροκυττάρων ελαττώνονταν, καθώς το στάδιο της ΧΝΝ επιδεινώνονταν (309). Παρά όμως το γεγονός ότι οι παραπάνω μελέτες κατορθώνουν να αναδείξουν ως ένα βαθμό τη σημασία του ΟΣ στην εξέλιξη της ΧΝΝ, η χρονική στιγμή, στην οποία σπάει η ισορροπία μεταξύ των προ-οξειδωτικών και αντι-οξειδωτικών παραγόντων, καθώς και οι παθογενετικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων το ΟΣ ασκεί τις καταστροφικές του δράσεις στην εξέλιξη της νεφρικής και καρδιακής βλάβης παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστα.



Ε. Η ΧΝΝ ΩΣ ΧΡΟΝΙΑ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΝΟΣΟΣ

Πολλοί παράγοντες κινδύνου παραδοσιακοί και μη παραδοσιακοί, στους οποίους έγινε αναφορά σε προηγούμενο κεφάλαιο, καθώς και μεταβολικές διαταραχές που παρατηρούνται στο ουραιμικό περιβάλλον μπορεί να συμβάλλουν στο δυσανάλογα αυξημένο κίνδυνο για ΚΑΝ στη ΧΝΝ. Τα τελευταία χρόνια, ύστερα από καλά τεκμηριωμένες μαρτυρίες, έγινε αποδεκτό ότι η χρόνια φλεγμονή που περιλαμβάνεται στη λίστα των μη παραδοσιακών παραγόντων κινδύνου, παίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεια της αθηροσκλήρυνσης μέσω διαφόρων μηχανισμών, τόσο στο γενικό πληθυσμό όσο και σε επιλεγμένους πληθυσμούς, όπως αυτός της ΧΝΝ (310).

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αποτελεί ένα πρώιμο φαινόμενο στην αθηροσκλήρυνση, το οποίο προηγείται των δομικών μεταβολών και των κλινικών εκδηλώσεων (311). Η φλεγμονή με τη σειρά της προάγει την ενδοθηλιακή βλάβη λόγω μεταβολών στη δομή και λειτουργία των λιποπρωτεϊνών, μεταβολών στην σύνθεση πρωτεϊνών του πλάσματος και μεταβολών στην ανατομική ακεραιότητα του ενδοθηλίου. Επίσης, τροποποιεί την έκφραση των μορίων προσκόλλησης και ειδικών ligands στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, των ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων που προάγουν την προσκόλληση και τη διαπίδυση, μια διεργασία πρωτίστως σημαντική στην έναρξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρυνσης (312). Επιπλέον, υπάρχουν πειστικές μαρτυρίες που συνηγορούν στην άποψη ότι η ΧΝΝ θεωρείται χρόνια φλεγμονώδης διαδικασία, επειδή υπάρχει ιδιαίτερα ισχυρή συσχέτιση μεταξύ μιας ενεργούς φλεγμονώδους αντίδρασης και της αθηροσκλήρυνσης σε αυτούς τους ασθενείς (313-315). Υπάρχουν αρκετές μελέτες που έδειξαν αύξηση προ-φλεγμονωδών κυττοκινών και μορίων αντίδρασης οξείας φάσης, τόσο στους ασθενείς σε ΑΜΚ όσο και στη ΧΝΝ και η αύξηση αυτή σχετιζόταν ισχυρά και ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες κινδύνου με την ΚΑΝ (306,314-318).

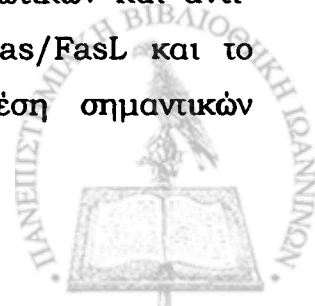


E.1. Μόρια προσκόλλησης του ενδοθηλίου

Το ενδοκυττάριο μόριο πρόσκλησης -1 (ICAM-1) και το μόριο πρόσκλησης -1 των αγγειακών κυττάρων (VCAM-1) ανήκουν στην οικογένεια των μορίων προσκόλλησης που συντίθενται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (319). Η παρουσία φλεγμονωδών διεργασιών προκαλεί μια δραματική αύξηση της έκφρασης των στην επιφάνεια των κυττάρων, προάγοντας τη σταθερή προσκόλληση των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων στο αγγειακό τοίχωμα και στη συνέχεια τη διατοικωματική μετανάστευσή τους που θεωρείται το γεγονός-κλειδί στην έναρξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρυνσης (320). Τα μόρια προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1 έχουν απομονωθεί με ανοσοϊστοχημεία σε αθηροσκληρυντικές εστίες στον άνθρωπο και η έκφρασή των συσχετίζονταν με το βαθμό της διήθησης του μέσου χιτώνα με λευκοκύτταρα (321). Αυξημένα επίπεδα τιμών ICAM-1 και VCAM-1 έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ΧΝΝ αλλά και στην ΑΜΚ (322-325), ενώ η γνώση για την αξία τους ως προγνωστικοί δείκτες στην ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης στα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ είναι περιορισμένη (325).

E.2. Η απόπτωση στο περιφερικό αίμα και δείκτες φλεγμονής στη ΧΝΝ

Είναι γνωστό ότι η ΧΝΝ συνοδεύεται με διαταραχές στην ανοσιακή απάντηση και κλινικά αυτό εκδηλώνεται με αυξημένη επίπτωση βακτηριακών και ιογενών λοιμώξεων, μειωμένη αντίδραση παραγωγής αντισωμάτων στα εμβόλια, μειωμένη αντίδραση επιβραδυνόμενης ευαισθησίας και αυξημένη συχνότητα νεοπλασιών (326-328). Ο μηχανισμός των διαταραχών αυτών δεν είναι απολύτως διευκρινισμένος. Ωστόσο, έχουν περιγραφεί σε πληθώρα εργασιών μειονεκτική λειτουργία των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων και ελάττωση των CD3 λεμφοκυττάρων, του λόγου των CD4/CD8 κυττάρων και του αριθμού των Β λεμφοκυττάρων λόγω της παθολογικής διαφοροποίησης και της απόπτωσης των κυττάρων αυτών (177,190,192,329). Όπως αναφέρθηκε εκτενώς παραπάνω, η απόπτωση είναι αυξημένη στην ΑΜΚ και στη ΧΝΝ μέσω μια πολύπλοκης διαδικασίας, η οποία ελέγχεται από μια ισορροπία προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών συστημάτων, μεταξύ των οποίων το σύστημα Fas/FasL και το σύστημα της οικογένειας των γονιδίων Bcl-2 κατέχουν θέση σημαντικών



μεσολαβητών (330,331). Οι κυττοκίνες της φλεγμονής φαίνεται να εμπλέκονται στη διεγερση των προ- και αντι-αποπτωτικών μηχανισμών (332,333), αλλά είναι άγνωστο σε πιο στάδιο της εξέλιξης της ΧΝΝ επισυμβαίνουν οι διαταραχές αυτές.



ΣΤ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της μελέτης ήταν:

1. Να διερευνηθεί σε ασθενείς με ΧΝΝ η ΚΑΝ και συγκεκριμένα, η συσχέτιση των υπερηχοκαρδιογραφικών παραμέτρων και των μεταβολών της γεωμετρίας της καρδιάς με τα στάδια 1-4 της ΧΝΝ.
2. Να εκτιμηθούν οι δείκτες της απόπτωσης, του ΟΣ, της φλεγμονής και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στα στάδια 1-4 της ΧΝΝ και να διερευνηθεί η συσχέτιση πιθανών μεταβολών τους με τις διαταραχές της γεωμετρίας της καρδιάς.
3. Να διερευνηθούν οι πιθανές αλληλοσυσχετίσεις των δεικτών της απόπτωσης, του ΟΣ, της φλεγμονής και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στα στάδια 1-4 της ΧΝΝ.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



Z. ΑΣΘΕΝΕΙΣ – ΜΕΘΟΔΟΙ

Z.1. Χαρακτηριστικά ασθενών

Μελετήθηκαν 229 ενήλικοι ασθενείς από τα Εξωτερικά Ιατρεία ΧΝΝ των δύο Νοσοκομείων (Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων και Γενικό Νοσοκομείο Βέροιας). Από το σύνολο των ασθενών, 119 ήταν άνδρες (52%) και 110 ήταν γυναίκες (48%), με μέση ηλικία 64.8 έτη (εύρος 25-88). Από τη μελέτη αποκλείστηκαν ασθενείς με γνωστή, ενεργό κακοήθεια, ενεργό λοίμωξη κατά τη χρονική στιγμή της ένταξης, καθώς και ασθενείς που εμφάνισαν μείζον καρδιαγγειακό επεισόδιο (σηπτάγχη, οξύ ΕΜ, οξύ πνευμονικό οίδημα, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, σύμβαμα ΠΑΝ) το τελευταίο τρίμηνο. Όλοι οι ασθενείς που προσήλθαν στα Εξωτερικά Ιατρεία ΧΝΝ των Νεφρολογικών Τμημάτων των δύο Νοσοκομείων υποβλήθηκαν σε λεπτομερή λήψη ατομικού ιστορικού, σε κλινική εξέταση και συμπληρώθηκε η ατομική κάρτα τους. Στα πλαίσια της μελέτης καταγράφηκαν τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών, οι συνήθειες του καπνίσματος και της κατανάλωσης αλκοόλ, τα συνυπάρχοντα νοσήματα σύμφωνα με τη σταδιοποίηση των νοσημάτων, όπως φαίνεται στον πίνακα 10. Επίσης, καταγράφηκαν η φαρμακευτική αγωγή, τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά [σωματικό βάρος, ύψος, περίμετρος μέσης, δείκτης μάζας σώματος (BMI)], η αρτηριακή πίεση (ΑΠ) [συστολική ΑΠ (ΣΑΠ), διαστολική ΑΠ (ΔΑΠ) σε όρθια και καθιστή θέση, διαφορική πίεση και εύρος πίεσης] και ο καρδιακός ρυθμός.

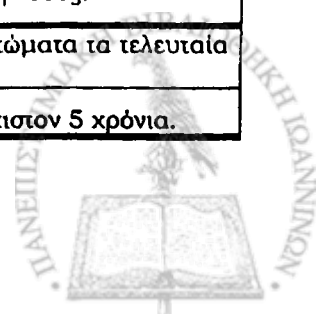
Η επίπτωση των πρωτοπαθών νεφρικών νοσημάτων στους ασθενείς φαίνεται στο πίνακα 11.

Ο υπολογισμός του GFR έγινε αρχικά και με τις δύο εξισώσεις, των C-G και τη MDRD. Η κατανομή των ασθενών στα διάφορα στάδια της ΧΝΝ με βάση τον υπολογισμό του GFR με τις εξισώσεις των C-G και MDRD φαίνεται στον πίνακα 12.



Πίνακας 10. Ορισμοί και επεξηγήσεις συνυπάρχουσας νοσηρότητας

A/a	Πάθηση	Κωδικός	Επεξηγήσεις
1	Αρτηριακή υπέρταση Αγωγή	1	ΑΠ≥140 / 90 mmHg ή λήψη αντιυπερτασικών
		2	Υπό αγωγή
2	Σακχαρώδης διαβήτης	1	Χωρίς αγωγή
		2	Νεανικός διαβήτης
3	Καρδιακή ανεπάρκεια (NYHA grades)	1	Διαβήτης τύπου ενηλίκων
		2	Συνήθης δραστηριότητα χωρίς συμπτώματα (δύσπνοια- κόπωση- αίσθημα παλμών ή στηθάγχη)
		3	Συνήθης δραστηριότητα με συμπτώματα. Χωρίς συμπτώματα στην ανάπαυση.
		4	Συμπτώματα σε λιγότερο της συνήθους δραστηριότητας. Χωρίς συμπτώματα στην ανάπαυση.
4 α	Στεφανιαία νόσος (ορισμός)	1	Συμπτώματα σε οποιαδήποτε φυσική δραστηριότητα. Δυνατόν συμπτώματα στην ανάπαυση.
		2	Παθολογική στεφανιογραφία
		3	Εμφραγμα μυοκαρδίου
		4	Στεφανιαία αγγειοπλαστική
		5	Αορτο-Στεφανιαία παράκαμψη
4 β	Στεφανιαία νόσος (συμπτώματα) (CCS grades)	1	Τίποτα από τα παραπάνω
		2	Συνήθης φυσική δραστηριότητα (περίπατος-ανέβασμα σκάλας) χωρίς στηθάγχη. Στηθάγχη σε γρήγορη και παρατεταμένη άσκηση.
		3	Ήπια ελάττωση της συνήθους φυσικής δραστηριότητας. Στηθάγχη συμβαίνει σε γρήγορο περπάτημα -ανέβασμα σκάλας-περπάτημα σε ανηφόρα -περπάτημα ή ανέβασμα σκαλιών, μετά το γεύμα ή στο κρύο ή σε αέρα ή σε συναισθηματικό stress ή αμέσως μετά την αφύπνιση.
		4	Σημαντική ελάττωση της συνήθους φυσικής δραστηριότητας. Αδυναμία να εκτελέσει οποιαδήποτε φυσική δραστηριότητα, χωρίς δυσφορία. Συμπτώματα στηθάγχης και σε ανάπαυση.
5	Περιφερική αγγειοπάθεια	1	Διαλείπουσα κωλότητα.
		2	Πόνος ισχαιμίας στην ανάπαυση.
		3	Μικρή ή μεγάλη απώλεια μυϊκής μάζας (ακρωτηριασμός)
6	Αγγειακή εγκεφαλική νόσος (AEN)	1	Ιστορικό παροδικού ΑΕΕ ή εγκεφαλικού με πλήρη ανάρρωση.
		2	Ιστορικό εγκεφαλικού με μόνιμη αναπηρία.
		3	Κώμα οποιασδήποτε αιτιολογίας στην έναρξη της διάλυσης.
7	Καρδιαγγειακή νόσος σε συγγενή 1 ^{ου} βαθμού		Αρτηριακή υπέρταση, καρδιακή ανεπάρκεια, στεφανιαία νόσος, περιφερική αγγειοπάθεια ή αγγειακή εγκεφαλική νόσος.
8	Κακοήθεια	1	Ιστορικό θεραπευμένης κακοήθειας-χωρίς συμπτώματα τα τελευταία 5 τουλάχιστον χρόνια.
		2	Κακοήθεια (όχι δερματική), όχι σε ύφεση τουλάχιστον 5 χρόνια.



Πίνακας 11. Πρωτοπαθή νεφρικά νοσήματα στους 229 ασθενείς

<i>Πρωτοπαθές νεφρικό νόσημα</i>	<i>Αριθμός ασθενών</i>	<i>Ποσοστό (%)</i>
<i>Σπειραματονεφρίτιδες</i>	21	9.2
<i>Διαβητική νεφροπάθεια</i>	33	14.4
<i>Διάμεση νεφροπάθεια</i>	24	10.5
<i>Υπερτασική Νεφροσκλήρυνση</i>	35	15.3
<i>Πολυκυστική νόσος</i>	10	4.4
<i>Αγγείιδα</i>	3	1.3
<i>Διάφορα</i>	21	9.2
<i>Άγνωστο</i>	82	35.5

Πίνακας 12. Εκτίμηση του GFR με τις εξισώσεις των Cockcroft-Gault και MDRD στους 229 ασθενείς και αντίστοιχη ταξινόμηση των ασθενών στα στάδια 1-4 της ΧΝΝ

<i>Στάδια ΧΝΝ</i>		<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
<i>Cockcroft-Gault</i>	<i>n, (%)</i>	38 (16.6%)	59 (25.8%)	82 (35.8%)	50 (21.8%)
	<i>Μέσος GFR (ml/min/1.73m²)</i>	119.4±36.2	75.5±8.9	43±8.4	23.6±4.5
<i>MDRD</i>	<i>n, (%)</i>	24 (10.5%)	58 (25.3%)	85 (37.1%)	62 (27.1%)
	<i>Μέσος GFR (ml/min/1.73m²)</i>	110.5±19.2	73.4±7.8	43.8±8.3	22±5

Για την ανάλυση και παρουσίαση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η ταξινόμηση των ασθενών με βάση την εξίσωση MDRD, η οποία σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα φαίνεται να πλεονεκτεί στην εκτίμηση του GFR συγκριτικά με την εξίσωση των C-G, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή. Στους ασθενείς που ο υπολογιζόμενος GFR ήταν μεγαλύτερος από 60 ml/min/1.73m² η ύπαρξη ή όχι ΧΝΝ εκτιμήθηκε με βάση τον ορισμό της ΧΝΝ, όπως αυτός διατυπώνεται στις σχετικές κατευθυντήριες οδηγίες (4). Η συμμετοχή των ασθενών έγινε μετά από προφορική ενημέρωσή τους από τους θεράποντες ιατρούς και μετά από τη λήψη συναίνεσης σύμφωνα με τους όρους των Επιστημονικών Συμβουλίων των δύο Νοσοκομείων.



2.2. Μέθοδοι

Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε πλήρη αιματολογικό (άμεση επεξεργασία δειγμάτων ολικού, φλεβικού αίματος σε αιματολογικό αναλυτή ABX Pentra 120) και βιοχημικό έλεγχο (άμεση επεξεργασία δειγμάτων σε βιοχημικό αναλυτή INTEGRA 800 Roche) την ημέρα της ένταξης των στη μελέτη. Στους ασθενείς προσδιορίστηκαν εξειδικευμένες παράμετροι εκτίμησης της απόπτωσης, του ΟΣ, της χρόνιας φλεγμονώδους διαδικασίας και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Τα δείγματα αίματος ελήφθησαν ταυτόχρονα από περιφερική φλέβα του άνω άκρου κατά τις πρωινές ώρες μετά από οκτάωρη, τουλάχιστον, νηστεία. Μετά τη λήψη των δειγμάτων και τη φυγοκέντρωσή τους, αποθηκεύτηκαν σε βαθιά κατάψυξη (-80° C) μέχρι τη στιγμή της τελικής επεξεργασίας τους. Εξαιρέση όσον αφορά στις ειδικευμένες παραμέτρους αποτελούν τα δείγματα αίματος, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της έκφρασης των επιπέδων του Bcl-2 και των επιπέδων της Αννεξίνης V - Ιωδιούκου Προπιδίου (PI) στα μονοπύρρηνα του περιφερικού αίματος, τα οποία επεξεργάστηκαν μέσα σε 24 ώρες από τη στιγμή της αιμοληψίας. Επίσης, άμεσα επεξεργάστηκαν και τα δείγματα αίματος που ελήφθησαν για τον προσδιορισμό των CRP και ινωδογόνου. Στα πλαίσια εκτίμησης της καρδιαγγειακής κατάστασης όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε υπερηχοκαρδιογράφημα μέσα σε ένα μήνα από την ημέρα της ένταξης των στη μελέτη.

Παρά την προσπάθεια που καταβλήθηκε ώστε να υποβληθούν όλοι οι ασθενείς σε υπερηχοκαρδιογράφημα και να καταμετρηθεί το σύνολο των δεικτών της απόπτωσης, του ΟΣ και της φλεγμονής σε όλους τους ασθενείς, αυτό δεν κατέστη εφικτό. Για να εξασφαλιστεί καλύτερη στατιστική δύναμη στην ανάλυση και παρουσίαση των δεδομένων ο αριθμός των ασθενών δεν περιορίστηκε μόνο σε αυτούς που είχαν αποτελέσματα για το σύνολο των παραμέτρων αλλά χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση ο αριθμός των ασθενών που διέθεταν αποτέλεσμα για την αντίστοιχη παράμετρο. Σε κάθε περίπτωση ο αριθμός αυτός αποτελεί τουλάχιστον το 70% του συνόλου των ασθενών (n=229). Στην παράθεση των αποτελεσμάτων γίνεται μνεία του αριθμού των ασθενών που συμπεριλήφθηκε στις επιμέρους αναλύσεις.



Ζ.2.1. Αναλυτική περιγραφή των μεθόδων μέτρησης των εξειδικευμένων παραμέτρων

Ζ.2.1.α. Παράμετροι εκτίμησης της απόπτωσης στο περιφερικό αίμα

Ως παράμετροι εκτίμησης του φαινομένου της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν η έκφραση των επιπέδων του Bcl-2, καθώς και η έκφραση των Αννεξίνη V – PI στα μονοπύρηννα του περιφερικού αίματος (λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα), τα επίπεδα ορού των Fas και FasL και ο TNF-α.

Μέτρηση Bcl-2: 2 ml φλεβικού αίματος τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια που περιείχαν αιθυλαινοδιάμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA) και τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20-24 ώρες χωρίς την προσθήκη κάποιου μέσου κυτταρικής καλλιέργειας. Στη συνέχεια, τα δείγματα αίματος προετοιμάστηκαν για τη μέτρηση της έκφρασης του Bcl-2 με κυτταρομετρία ροής. Για τον διαχωρισμό των ερυθροκυττάρων από το δείγμα αίματος προστέθηκαν 2 ml ειδικού διαλύματος λύσης. Μετά την παρέλευση 10 λεπτών τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν, ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα (PBS) και επανατοποθετήθηκαν σε 500 μl διαλύματος σταθεροποίησης. Μετά από επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι τα δείγματα ξεπλύθηκαν και 10 μl Bcl-2-PE QuantiBRITE® (1:1) (Becton Dickinson) προστέθηκε στα κύτταρα. Τα δείγματα επώαστηκαν για 20 λεπτά στο σκοτάδι, μετά ξεπλύθηκαν με PBS και τελικά επανατοποθετήθηκαν σε 500 μl PBS.

Η μέτρηση της έκφρασης του Bcl-2 έγινε με κυτταρομετρία ροής (FACScan flow cytometry instrument). Η ποσοτική έκφραση υπολογίστηκε με το αναλυτικό πρόγραμμα QuantiCALC® που επέτρεπε τη μέτρηση και έκφραση των αποτελεσμάτων από το κυτταρόμετρο με τη μορφή αντισωμάτων συνδεδεμένων ανά κύτταρο (molecules/cell) (339). Η σύνδεση του Bcl-2 στα κύτταρα εκφράστηκε ως αντισώματα/κύτταρο σε τρεις ζώνες: υψηλή, μεσαία και χαμηλή. Για τις ανάγκες της μελέτης χρησιμοποιήθηκε η κεντρική τιμή της μεσαίας ζώνης επειδή περίπου το 90% των θετικών κυττάρων ανευρίσκονταν σε αυτήν την περιοχή.

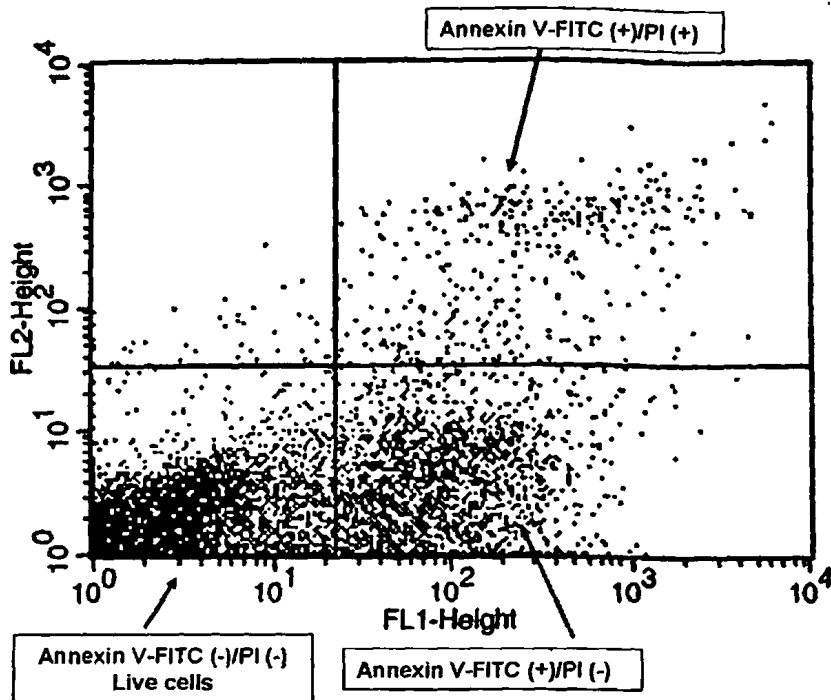
Μέτρηση Αννεξίνης V – Ιωδιούχου Προπιδίου: η απόπτωση των μονοπύρηννων του περιφερικού αίματος εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό της σύνδεσης της Αννεξίνης V και του PI στην επιφάνεια των κυττάρων με



κυτταρομετρία ροής. Μία από τις μεταβολές της κυτταρικής μεμβράνης στα πρώιμα και στα ενδιάμεσα στάδια της απόπτωσης είναι η μετάθεση των φωσφολιπιδίων (PS) από την εσωτερική στην εξωτερική στοιβάδα της μεμβράνης. Η Αννεξίνη V είναι μία 35-36 kDa Ca^{2+} πρωτεΐνη σύνδεσης, η οποία εμφανίζει μεγάλη συγγένεια για τα PS στις καταλήξεις των οποίων και συνδέεται. Η Αννεξίνη V τυπικά συνδέεται σε μία φθορίζουσα ουσία, όπως είναι η ισοθειοκυανική φλουορεσκίνη (Fluorescein Isothiocyanate, FITC) για την εύκολη αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων με την κυτταρομετρία ροής. Η μετάθεση όμως των PS συμβαίνει και κατά το φαινόμενο της νέκρωσης και για αυτό το λόγο η Αννεξίνη V-FITC τυπικά χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μία χρωστική, όπως το PI, προκειμένου να μπορέσει να γίνει η διάκριση των αποπτωτικών κυττάρων (Αννεξίνη V-FITC θετικά, PI αρνητικά) από τα νεκρωτικά κύτταρα (Αννεξίνη V-FITC θετικά, PI θετικά). Η μέθοδος δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ των ήδη νεκρωμένων κυττάρων αν δηλαδή έχουν νεκρωθεί μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης και αυτό γιατί και οι δύο μορφές συνδέουν τόσο την Αννεξίνη V όσο και το PI. Για την εκτίμηση της απόπτωσης τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και η πυκνότητα προσαρμόστηκε σε $1 \times 10^6/ml$. Εκατό μl του διαλύματος μεταφέρονταν σε δοκιμαστικό σωλήνα των 5 ml. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 5 μl Αννεξίνης V-FITC και 10 μl PI στα κύτταρα και τα δείγματα επώαστηκαν για 15 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από την επώαση 400 μl σταθεροποιητικού διαλύματος προστέθηκαν σε κάθε σωλήνα.

Η εκτίμηση της σύνδεσης των Αννεξίνη V-FITC και PI έγινε με κυτταρομετρία ροής (FACScan flow cytometry instrument) σε χρονικό διάστημα 1 ώρας από το τέλος της διαδικασίας προετοιμασίας των δειγμάτων. Υπολογίστηκε το ποσοστό των κυττάρων -λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων- που ήταν θετικά μόνο για την Αννεξίνη V-FITC, τα οποία θεωρήθηκαν ως πρώιμα αποπτωτικά (Annexin V-PI/LMEA), το ποσοστό των κυττάρων που ήταν θετικά για την Αννεξίνη V-FITC και το PI, τα οποία θεωρήθηκαν ως καθυστερημένα αποπτωτικά ή/και νεκρωτικά (Annexin V-PI/LMLA) και το συνολικό ποσοστό των παραπάνω κυττάρων (Annexin V-PI/LMtotal) επί του συνόλου των κυττάρων (Σχήμα 7).





Σχήμα 7. Προσδιορισμός μεταβολών μεταβολών φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης με τη μέθοδο Αννεξίνης V-FITC/PI

Μέτρηση των Fas και Fas ligand: τα επίπεδα των διαλυτών μορφών Fas και FasL στον ορό μετρήθηκαν με την τεχνική «sandwich enzyme immunoassay technique (ELISA)» χρησιμοποιώντας τα διαθέσιμα στο εμπόριο αντιδραστήρια (Quantikine human sFas and FasL, Research & Diagnostic Systems Europe Ltd, Abington UK). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του Fas έγινε αραιώση του ορού 1/10. Η ευαισθησία της μεθόδου ELISA ήταν μικρότερη από 30 pg/ml για το Fas και μικρότερη από 20 pg/ml για το FasL.

Μέτρηση του TNF- α: ελήφθησαν 4 ml φλεβικού αίματος και το δείγμα τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο χωρίς αντιπηκτικό. Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε (1500 στροφές/min) για 10 min και ελήφθηκε ο υπερκείμενος ορός, ο οποίος αποθηκεύτηκε σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) έως τη στιγμή της επεξεργασίας των δειγμάτων. Τα επίπεδα του TNF- α στον ορό μετρήθηκαν με υψηλής ευαισθησίας τεχνική ELISA (Quantikine HS human TNF-α, Research & Diagnostic Systems Europe Ltd, Abington UK). Δεν έγινε αραιώση του ορού. Η ευαισθησία της μεθόδου ELISA ήταν μικρότερη από 0.5 pg/ml.



Z.2.1.β. Παράμετροι εκτίμησης του ΟΣ

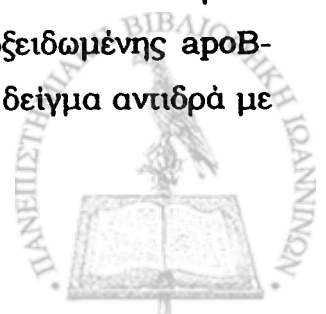
Ως παράμετροι εκτίμησης της οξειδωτικής δραστηριότητας τη στιγμή της ένταξης στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα των 8-epiPGF2a του ορού, της ox-LDL του ορού, των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών και της ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης (TAS).

Μέτρηση των 8-epiPGF2a: Τα 8-epiPGF2a έχουν προταθεί ως αξιόπιστος δείκτης ΟΣ στην ουραιμία (303,340). Είναι μία οικογένεια ενώσεων που παράγονται από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μέσω μηχανισμών που καταλύονται από ελεύθερες ρίζες. Τα F2-ισοπροστάνια είναι ισομερή της προσταγλανδίνης F2a που προκύπτουν από μη-ενζυματική, μέσω ελευθέρων ριζών υπεροξείδωση του αραχιδονικού οξέος. Από τα ισομερή των F2-ισοπροστανίων αυτά που ανευρίσκονται σε αφθονία είναι τα 8-epiPGF2a, τα οποία αποτελούν δείκτη ενδογενούς οξείδωσης των λιπιδίων.

Προκειμένου για τη μέτρηση των 8-epiPGF2a, 3 ml φλεβικού αίματος τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια που περιείχαν EDTA και τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση (3000 στροφές για 10 min). Ελήφθηκε ο υπερκείμενος ορός που αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -80°C μέχρι τη στιγμή της τελικής επεξεργασίας τους για τον υπολογισμό των τιμών. Ο προσδιορισμός των επιπέδων των 8-epiPGF2a έγινε με αντιδραστήρια που κυκλοφορούν στο εμπόριο, με τη μέθοδο ELISA (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA).

Μέτρηση της ox-LDL: Προκειμένου για τη μέτρηση της ox-LDL, 4 ml φλεβικού αίματος τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια χωρίς αντιπηκτικό και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση (3000 στροφές για 10 min). Ελήφθηκε ο υπερκείμενος ορός που αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -80°C μέχρι τη στιγμή της τελικής επεξεργασίας τους για τον υπολογισμό των τιμών. Ο προσδιορισμός των επιπέδων της ox-LDL έγινε με αντιδραστήριο που κυκλοφορεί στο εμπόριο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ELISA (Mercodia Oxidized LDL ELISA Kit).

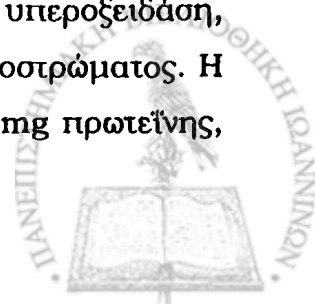
Ο προσδιορισμός των επιπέδων ox-LDL με ELISA στηρίζεται στην άμεση τεχνική τύπου «sandwich», στην οποία δύο μονοκλωνικά αντισώματα κατευθύνονται έναντι διαφορετικών αντιγονικών επιτόπων της οξειδωμένης apoB-100. Κατά τη διάρκεια της επώασης, η ox-LDL που υπάρχει στο δείγμα αντιδρά με



anti-ox-LDL αντίσωμα, το οποίο είναι ακινητοποιημένο στον πυθμένα κάθε θέσης του πλακιδίου. Μετά την έκπλυση, η οποία απομακρύνει τα μη αντιδρώντα συστατικά του πλάσματος ή ορού, ένα επισημασμένο με υπεροξειδάση anti-human αντίσωμα έναντι της apoB-100 αναγνωρίζει την ox-LDL που είναι ακινητοποιημένη στη στερεή επιφάνεια. Μετά από δεύτερη επώαση και έκπλυση, η οποία απομακρύνει το επισημασμένο αντίσωμα που δεν έχει αντιδράσει, γίνεται η ανίχνευση του προσδεμένου επισημασμένου αντισώματος με την προσθήκη της 3,3',5, 5'-τετραμεθυλ-βενζιδίνης (TMB). Η αντίδραση διακόπεται με την προσθήκη οξέος δίνοντας ένα έγχρωμο προϊόν, το οποίο απορροφά στα 450 nm. Για τη μέτρηση της απορρόφησης χρησιμοποιείται το αρχείο «Serum ox-LDL levels-Mercodia» το οποίο υπάρχει αποθηκευμένο στο λογισμικό λειτουργίας του μετρητή microELISA (SpectraMAX 190, Molecular Devices).

Μέτρηση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών: Η χρήση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών, ως βιολογικού δείκτη του ΟΣ πλεονεκτεί έναντι άλλων προϊόντων οξείδωσης, εξαιτίας του γρήγορου σχηματισμού τους και της σταθερότητας τους, η οποία επιτρέπει τόσο την ανίχνευση τους, όσο και την αποθήκευση των βιολογικών δειγμάτων. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ανίχνευση τους περιλαμβάνει την τροποποίηση των καρβονυλίων με την 2,4-δινιτροφαιλυδραζίνη που οδηγεί στο σχηματισμό ενός σταθερού προϊόντος. Στην συνέχεια, το προϊόν αυτό μπορεί να ανιχνευτεί φωτομετρικά, με τη χρήση HPLC, καθώς και με ELISA.

Για της ανάγκες της παρούσας διδακτορικής μελέτης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ELISA. Η αξιολόγηση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών με την χρήση της ELISA, πλεονεκτεί έναντι των άλλων μεθοδολογιών, λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας, της υψηλής εξειδίκευσης, καθώς της σχετικά εύκολης εφαρμογής της. Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες των βιολογικών δειγμάτων, αφού τροποποιηθούν με την χρήση της δινιτροφαιλυδραζίνης (DNPH), προσροφώνται μη ειδικά στα πηγαδάκια του ELISA-plate, ενώ στη συνέχεια όσες έχουν υποστεί την τροποποίηση, δηλαδή όσες ήταν καρβονυλιωμένες, σημαίνονται με ένα ειδικό αντίσωμα. Το αρχικό αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με βιοτίνη αλληλεπιδρά με το δεύτερο αντίσωμα στρέπταβιδίνης που φέρει και τη horseradish υπεροξειδάση, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση με τη χρήση κατάλληλου υποστρώματος. Η μέθοδος προσδιορίζει την ποσότητα των καρβονυλίων σε nmol ανά mg πρωτεΐνης,



ενώ σύμφωνα με μελέτες, σε ορό ή πλάσμα φυσιολογικών ατόμων οι τιμές κυμαίνονται από 0.01 έως 0.1 nmol carbonyls/mg πρωτεΐνης, ενώ για τους ασθενείς οι τιμές είναι μεγαλύτερες του 0.1 nmol carbonyls/mg πρωτεΐνης.

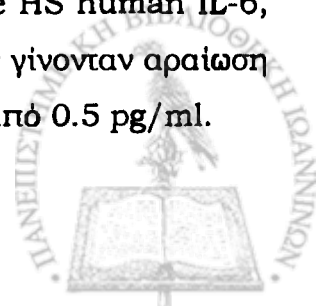
Μέτρηση της TAS: τα ολικά αντιοξειδωτικά προσδιορίστηκαν ποσοτικά με έτοιμα αντιδραστήρια που κυκλοφορούν στο εμπόριο (Total Antioxidant Status, TAS). Η μέθοδος στηρίζεται στην παραγωγή μιας σταθερής κατιονικής ρίζας μετά από επώαση της ασταθούς μορφής της ρίζας αυτής με υπεροξειδάση και το H_2O_2 . Από την αντίδραση αυτή παράγεται ένα σταθερό μπλε-πράσινο χρώμα που επί παρουσίας αντιοξειδωτικών ελαττώνεται ανάλογα με τον βαθμό της συγκέντρωσής τους.

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων της TAS χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική μέθοδος Randox (RANDOX laboratories Ltd, Ardmore, UK).

Z.2.1.γ. Παράμετροι εκτίμησης της φλεγμονής και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας

Ως παράμετροι εκτίμησης της χρόνιας υποκλινικής φλεγμονής και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας τη στιγμή της ένταξης στη μελέτη προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των CRP, ICAM-1, VCAM-1 και της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) στον ορό των ασθενών, καθώς και τα επίπεδα του ινωδογόνου στο πλάσμα.

Τα δείγματα ορού διαχωρίστηκαν από το πήγμα αίματος (30 λεπτά μετά την αιμοληψία) με φυγοκέντρηση (10-15 λεπτά περίπου στις 3000 στροφές/λεπτό) και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο που αποθηκεύτηκε στους $-80^{\circ}C$ μέχρι τη στιγμή της επεξεργασίας. Τα επίπεδα των μορίων ICAM-1 και VCAM-1 στον ορό μετρήθηκαν με την τεχνική ELISA (sandwich enzyme-linked immunoassay) χρησιμοποιώντας τα διαθέσιμα στο εμπόριο αντιδραστήρια (Quantikine human sICAM-1, VCAM-1, Research & Diagnostic Systems Europe Ltd, Abington UK). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ICAM-1 και VCAM-1 έγινε αραιώση του ορού 1/20. Η ευαισθησία του συστήματος ELISA ήταν μικρότερη από 2 ng/ml τόσο για τα ICAM-1 όσο και για τα VCAM-1. Τα επίπεδα της IL-6 στον ορό μετρήθηκαν με υψηλής ευαισθησίας τεχνική ELISA (Quantikine HS human IL-6, Research & Diagnostic Systems Europe Ltd, Abington UK). Δεν γίνονταν αραιώση του ορού. Η ευαισθησία του συστήματος ELISA ήταν μικρότερη από 0.5 pg/ml.



Οι συγκεντρώσεις όλων των μορίων υπολογίστηκαν στον ορό με διπλές μετρήσεις έχοντας ως σημείο αναφοράς καμπύλες υγιών μαρτύρων για τη μέτρηση της κάθε παραμέτρου.

Προκειμένου για τον προσδιορισμό των CRP στον ορό και ινωδογόνου στο πλάσμα τα δείγματα φλεβικού αίματος μετά τη λήψη τοποθετήθηκαν στα αντίστοιχα φιαλίδια χωρίς αντιπηκτικό για τη CRP και με συντηρητικό κιτρικού νατρίου 3.2% για το ινωδογόνο και επεξεργάστηκαν άμεσα στα βιοχημικά εργαστήρια των δύο νοσοκομείων. Η μεν CRP προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ανοσοθολοσυμμετρίας (βιοχημικός αναλυτής INTEGRA 800 Roche), το δε ινωδογόνο στο πλάσμα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της οπτικής ανίχνευσης πήγματος σε αναλυτή (THROMBOLYZER Biomerieux).

2.2.2. Υπερηχοκαρδιογράφημα

Έγινε αναλυτική υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη 2-διαστάσεων με τη χρήση υπερηχογραφικού μηχανήματος (HDI 5000; Philips, USA) και όλες οι μετρήσεις καταγράφηκαν με VHS βίντεο τεχνική. Οι υπερηχογραφικές παράμετροι μετρήθηκαν από δύο ανεξάρτητους, έμπειρους Καρδιολόγους οι οποίοι δεν γνώριζαν το μεταβολικό προφίλ και το βαθμό νεφρικής νόσου των ασθενών. Οι μετρήσεις περιλάμβαναν τη διάσταση του αριστερού κόλπου, το πάχος του μεσοκοιλιακού διαφράγματος (IVSTd), το πάχος του οπισθίου τοιχώματος (PWTd), τη διάμετρο της LV στο τέλος της διαστολικής φάσης (LVDd) και τη διάμετρο της LV στο τέλος της συστολικής φάσης (LVDs). Χρησιμοποιώντας M-mode υπερηχοκαρδιογραφική τεχνική υπολογίστηκαν το κλάσμα βράχυνσης (FS) και το κλάσμα εξώθησης (EF) της LV από τις τιμές της τελο-συστολικής και τελο-διαστολικής διάστασης της LV. Η μάζα της LV (LVmass) υπολογίστηκε με την εξίσωση των Devereux-Reichek (341):

$$LVmass(g) = 1.04 \times [(IVSTd+PWTd+LVDd)^3+LVDd^3] - 13.6$$

Η LVmass προσαρμόστηκε στη επιφάνεια σώματος (BSA) και εκφράστηκε ως LVmass index (LVMI). Το σχετικό πάχος τοιχώματος (RWT) υπολογίστηκε από τον τύπο:



(2 x PWTD) / LV internal diameter

και θεωρήθηκε αυξημένο όταν η τιμή ήταν μεγαλύτερη από 0.42. Οι μετρήσεις θεωρήθηκαν θετικές για LVH όταν ο δείκτης LVMI ήταν μεγαλύτερος από 115 g/m² στους άνδρες και μεγαλύτερος από 95 g/m² στις γυναίκες (342).

Με βάση τα παραπάνω, φυσιολογική γεωμετρία καρδιάς υπήρχε όταν το LVMI και το RWT ήταν εντός των προ-καθορισμένων φυσιολογικών τιμών, ενώ οι παθολογικές μορφές της καρδιακής γεωμετρίας και τα χαρακτηριστικά τους φαίνονται στον πίνακα 13 (343).

Πίνακας 13. Παθολογικές μορφές γεωμετρίας της καρδιάς και τα χαρακτηριστικά τους

	<i>LVMI</i>		<i>RWT</i>
<i>Συγκεντρικό Remodeling (αναδιαμόρφωση)</i>	φυσιολογικό	+	αυξημένο
<i>Έκκεντρη Υπερτροφία</i>	αυξημένο	-	φυσιολογικό
<i>Συγκεντρική Υπερτροφία</i>	αυξημένο		αυξημένο

Για την εκτίμηση της διαστολικής λειτουργίας της LV, μετρήθηκε η διαστολική πλήρωση της LV με τη χρήση Doppler υπερηχοκαρδιογραφήματος. Καταγράφηκαν η μέγιστη ταχύτητα της πρώιμης διαστολικής πλήρωσης (E) και η μέγιστη ταχύτητα της ακόλουθης κολπικής πλήρωσης (A) και υπολογίστηκε το κλάσμα E προς A (E/A). Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Καρδιολογικής Εταιρείας παθολογικό θεωρήθηκε το κλάσμα E/A όταν αυτό ήταν μικρότερο της μονάδας σε ασθενείς με ηλικία κάτω των 50 ετών και μικρότερο του 0.5 σε ασθενείς ηλικίας άνω των 50 ετών (344).

Αναφορικά με τη συστολική λειτουργία αυτή θεωρήθηκε παθολογική όταν το EF ήταν μικρότερο από 50 ή όταν το FS ήταν μικρότερο από 25. Οι ασθενείς αυτοί, ελάχιστοι σε αριθμό (5) αποκλείστηκαν από την ανάλυση των υπερηχοκαρδιογραφικών ευρημάτων και τις συσχετίσεις αυτών με άλλες παραμέτρους.



2.2.3. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα SPSS 11. Τα αποτελέσματα των συνεχών παραμέτρων εκφράστηκαν ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση ή τυπικό σφάλμα, όπου κρίθηκε απαραίτητο. Η σύγκριση των τιμών των διαφόρων παραμέτρων στα στάδια 1-4 της ΧΝΝ έγινε με τη μέθοδο της απλής μη συσχετισμένης ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA). Η συσχέτιση μεταξύ δύο συνεχών μεταβλητών υπολογίστηκε με τη μη παραμετρική μέθοδο του Spearman μιας και οι τιμές εμφάνιζαν ασύμμετρη κατανομή. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η στατιστική διαδικασία της βηματικής πολλαπλής παλινδρόμησης (stepwise multiple regression) για να προσδιοριστούν ιεραρχικά κατά σημαντικότητα οι συσχετίσεις μεταξύ εξέλιξης της νεφρικής βλάβης και των αποτελεσμάτων από τα υπερηχοκαρδιογραφήματα και τις ειδικές εξετάσεις της απόπτωσης, του ΟΣ και της φλεγμονής-ενδοθηλιακής βλάβης. Στα προσαρμοσμένα μοντέλα, ένας παράγοντας πρόβλεψης θεωρήθηκε ότι επηρεάζει στατιστικά σημαντικά τη συσχέτιση του eGFR με την αντίστοιχη εξαρτημένη παράμετρο όταν το ποσοστό μεταβολής του β ήταν μεγαλύτερο από 10%.

Η συσχέτιση θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική για τιμή του $p < 0.05$.



Η. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η.1. Γενικά χαρακτηριστικά ασθενών και αποτελέσματα καρδιακής λειτουργίας και υπερηχοκαρδιογραφικών ευρημάτων σε σχέση με την νεφρική λειτουργία

Στην μελέτη εντάχθηκαν 229 ενήλικοι ασθενείς από τα Εξωτερικά Ιατρεία ΧΝΝ των δύο Νοσοκομείων (Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, Γενικό Νοσοκομείο Βέροιας). Στον πίνακα 14 φαίνονται τα χαρακτηριστικά βασικών κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων των 229 ασθενών ταξινομημένων στα στάδια 1-4 της ΧΝΝ και παρουσιάζονται επιλεκτικά τα αποτελέσματα των παραμέτρων που πιθανόν να επηρεάζουν ως παράγοντες πρόβλεψης (confounders) τις συσχετίσεις των ευρημάτων από το υπερηχοκαρδιογράφημα, των δεικτών της απόπτωσης, του ΟΣ και της φλεγμονής με τη νεφρική λειτουργία.

Ασθενείς με προχωρημένο στάδιο ΧΝΝ (στάδιο 3-4) ήταν αναμενόμενα μεγαλύτεροι σε ηλικία σε σύγκριση με τα πρώιμα στάδια (στάδια 1-2). Η διαφορική ΑΠ αυξήθηκε σημαντικά με την πρόοδο των σταδίων, γεγονός ενδεικτικό επιδεινούμενης αρτηριοσκλήρυνσης, παράλληλα με αύξηση της ηλικίας και την επιδείνωση της νεφρικής βλάβης. Όσον αφορά στο ιατρικό ιστορικό και στη συνυπάρχουσα νοσηρότητα των ασθενών παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα στεφανιαίας νόσου στους ασθενείς με προχωρημένα στάδια ΧΝΝ. Ενώ, οι υπόλοιπες συνυπάρχουσες παθολογικές καταστάσεις δεν διέφεραν σημαντικά στα στάδια 1-4 ΧΝΝ.

Οι τιμές των παραμέτρων στο σύνολο των ασθενών που υποβλήθηκαν σε υπερηχοκαρδιογράφημα, καθώς και στις υποομάδες των τεσσάρων σταδίων της ΧΝΝ φαίνονται στον πίνακα 15. Οι παράμετροι IVSTd, PWTd, RWT, LVmass και LVMI (Σχήμα 8) αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά με την πρόοδο των σταδίων της ΧΝΝ ενισχύοντας τη θεωρία της παράλληλης εξέλιξης καρδιακής και νεφρικής βλάβης από τα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ.



Πίνακας 14. Χαρακτηριστικά βασικών κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων των 229 ασθενών ταξινομημένων στα στάδια 1-4 ΧΝΝ

	Στάδια ΧΝΝ				
	1	2	3	4	p
Αριθμός ασθενών	24	58	85	62	
eGFR (ml/min/1.73m ²)	110.5±19.2	73.4±7.8	43.8±8.3	22±5	<0.001
Χαρακτηριστικά ασθενών					
Ηλικία (έτη) *	61.2 (49.6-65.4)	65.3 (58.6-73.3)	70 (63-74.7)	71 (60-73.9)	0.01
Φύλο (άνδρες) (n), (%)	10 (41.7)	30 (51.7)	45 (52.9)	34 (54.8)	NS
BMI (kg/m ²) †	30.5±4.7	29.8±5.1	29.4±5.3	27.9±5	NS
ΣΑΠ (mmHg)	134±18	139±17	141±16	144±23	NS
ΔΑΠ (mmHg)	78±9	83±9	81±10	80±13	NS
Διαφορική ΑΠ (mmHg)	56±17	56±15	60±16	65±19	0.009
Hb (g/dl)	13.6±1.3	14±1.3	13.2±1.6	12.2±1.4	<0.001
sUA (mg/dl)	5.6±1.4	5.6±1.4	7±1.7	7.3±1.5	<0.001
sAlb (g/dl)	4.3±0.35	4.2±0.2	4.2±0.3	4±0.4	<0.05
TChol (mg/dl)	203±29	216±42	211±44	214±54	NS
TRG(mg/dl)	148±83	144±75	160±85	180±88	NS
HDL (mg/dl)	56±13	53±13	52±11	49±15	NS
LDL (mg/dl) ‡	117±24	136±35	129±36	124±38	NS
Ιατρικό Ιστορικό αριθμός ασθενών, (%)					
ΑΥ 205 (89.5)	20 (83.3)	49 (84.5)	78 (91.8)	58 (93.5)	NS
ΣΔ 70 (30.8)	11 (47.8)	12 (20.7)	26 (31)	21 (33.9)	NS
ΚΑ# 57 (25.4)	4 (17.4)	15 (26.3)	15 (18.3)	23 (37.1)	NS
Στεφανιαία Νόσος § 34 (15.2)	1 (4.3)	2 (3.5)	18 (21.7)	13 (21.3)	0.005
ΑΕΝ 20 (8.8)	1 (4.3)	5 (8.6)	8 (9.6)	6 (9.7)	NS
ΠΑΝ 24 (10.7)	2 (8.7)	4 (6.9)	10 (12.2)	8 (12.9)	NS
Καπνιστές 39 (17)	6 (25)	11 (19)	12 (14.1)	10 (16.1)	NS
Οικογ. Ιστορικό ΚΑΝ 64 (28.1)	11 (45.8)	17 (29.3)	22 (26.2)	14 (28.1)	NS
Φαρμακευτική Αγωγή αριθμός ασθενών, (%)					
ACEi 89 (38.9)	11 (45.8)	22 (37.9)	31 (36.5)	25 (40.3)	NS
ARB 54 (23.6)	5 (20.8)	16 (27.6)	22 (25.9)	11 (17.7)	NS
EPO 18 (7.9)	0	1 (1.7)	4 (4.7)	13 (21)	<0.001
Στατίνη 79 (34.5)	12 (50)	17 (29.3)	27 (31.8)	23 (37.1)	NS



* Η ηλικία είναι εκφρασμένη ως κεντρική τιμή με το αντίστοιχο 25^ο και 75^ο εκατοστημόριο.

† Όλες οι συνεχόμενες παράμετροι εκφράστηκαν ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση.

‡ Τύπος για τον υπολογισμό της τιμής της LDL: $LDL = TChol - HDL - (TRG/5)$ για τιμή τριγλυκεριδίων <300 mg/dl, πέραν της οποίας η τιμή της LDL που προκύπτει από τον τύπο δεν θεωρείται αξιόπιστη και ως εκ τούτου αυτές οι τιμές δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση των στοιχείων (αποκλείστηκαν από την ανάλυση 16 ασθενείς)

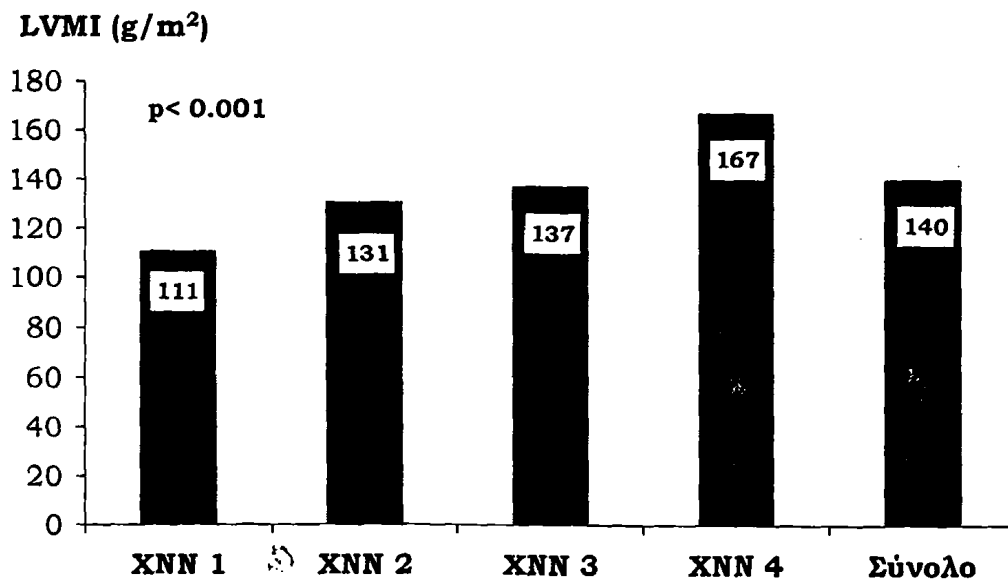
Η ΚΑ εκτιμήθηκε με βάση τα κλινικά συμπτώματα του ασθενή και ταξινομήθηκε σύμφωνα με τα στάδια 4 της New York Heart Association.

§ Ο ορισμός της στεφανιαίας νόσου περιλαμβάνει παθολογική στεφανιογραφία ή/και έμφραγμα μυοκαρδίου ή/και στεφανιαία αγγειοπλαστική ή/και αορτοστεφανιαία παράκαμψη.

Πίνακας 15. Οι τιμές των υπερηχοκαρδιογραφικών παραμέτρων στο σύνολο των ασθενών, καθώς και στις υποομάδες τους στα τέσσερα στάδια της ΧΝΝ

Παράμετρος (μονάδες μέτρησης)*	Στάδια ΧΝΝ						ANOVA p
	n	Σύνολο	1	2	3	4	
eGFR (ml/min)	217	53±29	110±19	73±8	44±8	22±5	<0.001
LVDd (cm)	210	5.5±0.8	5.4±0.8	5.6±0.9	5.4±0.8	5.5±0.9	NS
LVDs (cm)	210	3.5±0.9	3.5±0.8	3.6±0.9	3.4±0.9	3.4±0.9	NS
IVSTd (cm)	210	1.09±0.3	0.95±0.2	1±0.3	1.1±0.3	1.2±0.3	<0.001
- PWTd (cm)	210	0.95±0.2	0.8±0.1	0.9±0.2	0.95±0.2	1±0.25	<0.001
RWT	206	0.39±0.1	0.33±0.06	0.36±0.1	0.39±0.1	0.43±0.1	0.001
LVmass (g)	206	263±95	216±95	248±73	257±93	305±102	<0.001
LVMI (g/m ²)	206	140±47	111±39	131±34	137±45	167±52	<0.001
EF (%)	211	70±10	72±8	68±9	70±9	70±11	NS
FS (%)	210	37±8	36±7	35±8	37±9	38±8	NS

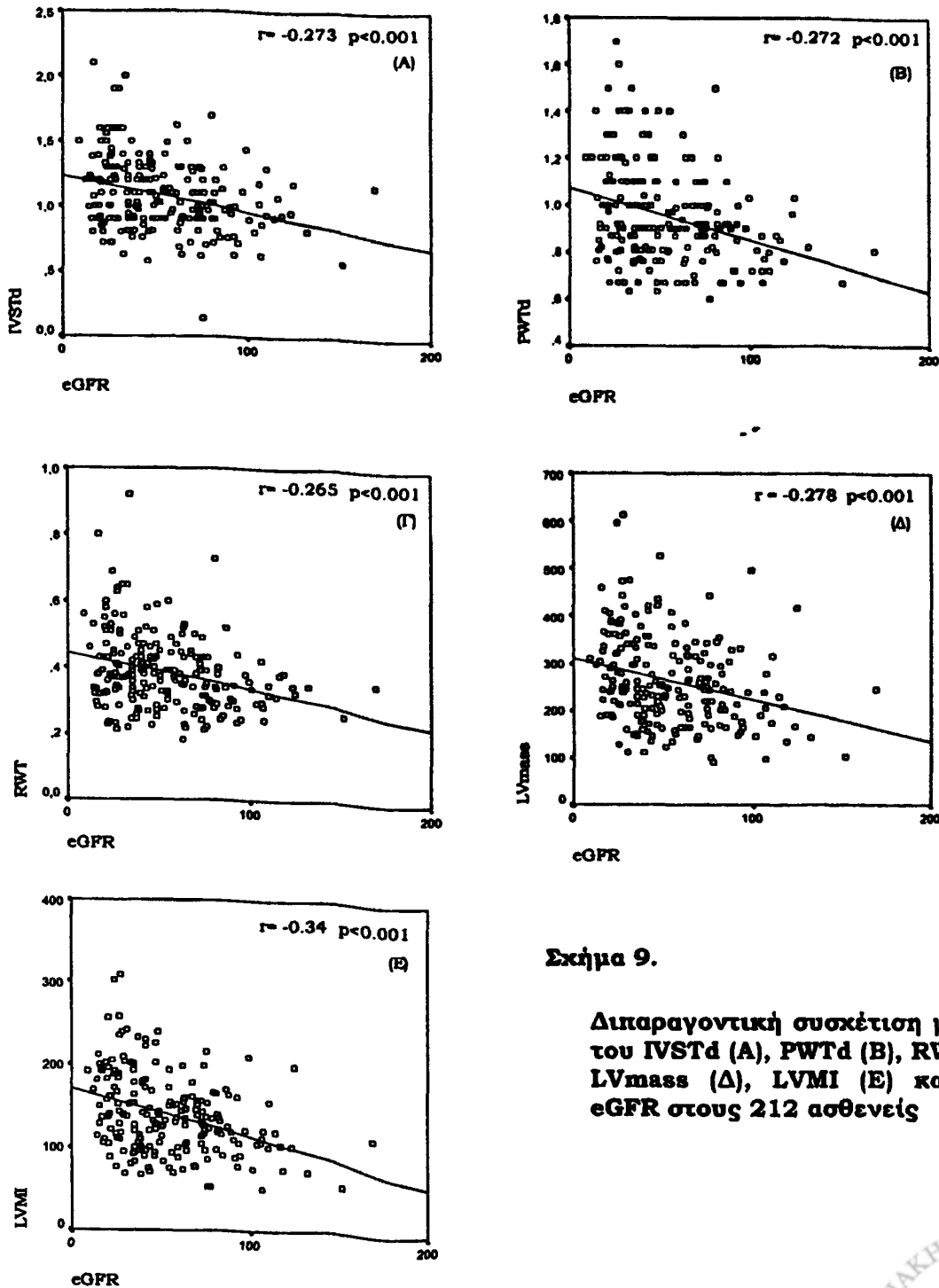
[* Όλες οι παράμετροι έχουν εκφραστεί ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση]



Σχήμα 8. Σταδιακή αύξηση των τιμών του LVMI με την επιδείνωση των σταδίων 1-4 της ΧΝΝ



Επιπλέον, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της διπαραγοντικής συσχέτισης βρέθηκε για τις υπερηχοκαρδιογραφικές παραμέτρους που εκτιμήθηκαν σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ των τιμών των: IVSTd ($r=-0.273$ $p<0.001$), PWTd ($r=-0.272$ $p<0.001$), RWT (Spearman's $r=-0.265$ $p<0.001$), LVmass (Spearman's $r=-0.278$ $p<0.001$), LVMI (Spearman's $r=-0.34$ $p<0.001$) και του eGFR (Σχήμα 9).



Σχήμα 9.

Διπαραγοντική συσχέτιση μεταξύ του IVSTd (Α), PWTd (Β), RWT (Γ), LVmass (Δ), LVMI (Ε) και του eGFR στους 212 ασθενείς



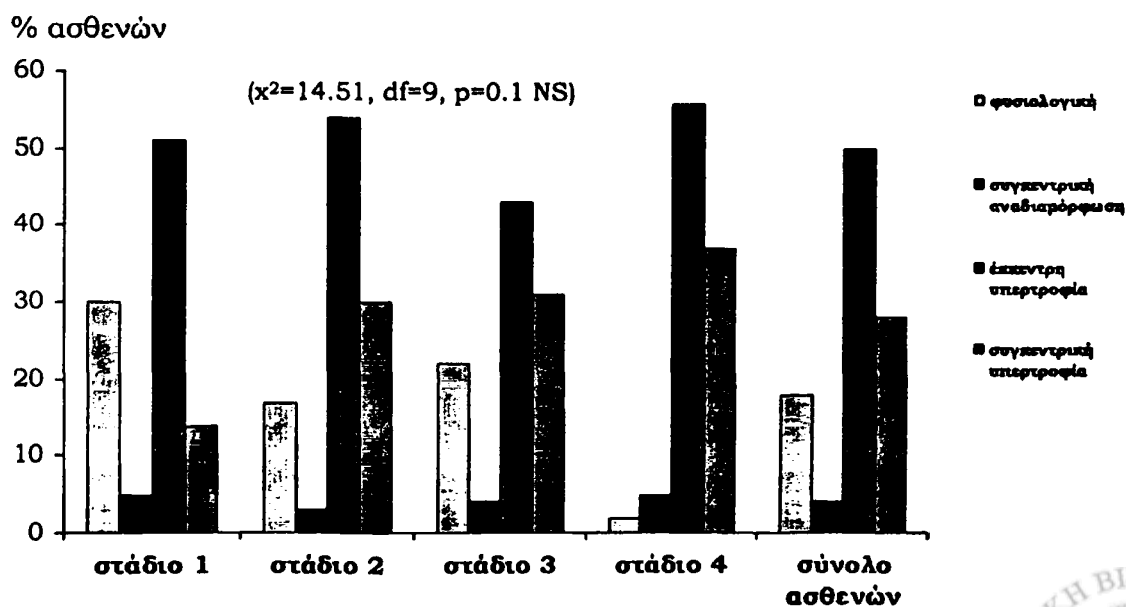
Η μέθοδος της πολλαπλής παλινδρόμησης έδειξε μία σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του eGFR και του LVMI [$\beta=-0.524$, 95% διάστημα εμπιστοσύνης, (confidence interval, CI)=-72.45 έως -46.96, $p<0.001$]. Το αρχικό μη προσαρμοσμένο μοντέλο προσαρμόστηκε στη συνέχεια για έναν αριθμό κλινικών παραγόντων πρόβλεψης, καθώς και για έναν αριθμό εργαστηριακών παραγόντων πρόβλεψης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 16. Φάνηκε ότι από τους κλινικούς παράγοντες πρόβλεψης μόνο η ηλικία επηρέασε σημαντικά την ισχυρή συσχέτιση των δύο μεταβλητών, του eGFR και του LVMI (% μεταβολής $\beta=16\%$, $p<0.001$). Από τους εργαστηριακούς παράγοντες, τα επίπεδα ινωδογόνου του πλάσματος (% μεταβολής $\beta=19.5\%$, $p<0.001$), τα επίπεδα VCAM-1 του ορού (% μεταβολής $\beta=13\%$, $p<0.001$), καθώς και τα επίπεδα του αποπτωτικού παράγοντα Fas (% μεταβολής $\beta=14\%$, $p<0.001$) βρέθηκε ότι επηρέασαν σημαντικά τη συσχέτιση των δύο μεταβλητών. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να στηρίξουν την πιθανή αλληλεπίδραση αποπτωτικών και φλεγμονωδών παραγόντων και τις επιδράσεις αυτών στην παράλληλη εξέλιξη νεφρικής και καρδιαγγειακής βλάβης.

Όσον αφορά στη γεωμετρία της καρδιάς, με τις τέσσερις μορφές της, όπως αυτές περιγράφηκαν στην υπο-ενότητα ασθενείς-μέθοδοι, διαπιστώθηκαν τα εξής: με την επιδείνωση της νεφρικής νόσου μειώθηκε το ποσοστό των ασθενών με φυσιολογική καρδιακή γεωμετρία ενώ αυξήθηκε το ποσοστό των ασθενών που εμφάνιζε συγκεντρική υπερτροφία, χωρίς αυτές οι δύο μεταβολές να φτάσουν το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (Σχήμα 10). Πιο συγκεκριμένα, στο σύνολο των 206 ασθενών, οι οποίοι διέθεταν τις απαραίτητες μετρήσεις για τη γεωμετρία της καρδιάς, μόλις 37 (18%) είχαν φυσιολογικά ευρήματα (στάδιο 1: 11 ασθενείς (30%), στάδιο 2: 9 ασθενείς (17%), στάδιο 3: 16 ασθενείς (21.5%), στάδιο 4: 1 ασθενής (2.5%)), 9 ασθενείς (4.5%) είχαν ευρήματα συγκεντρικής αναδιαμόρφωσης, οι οποίοι και κατανέμονταν ομοιόμορφα και στα 4 στάδια της ΧΝΝ και 57 (28%) ασθενείς είχαν ευρήματα συγκεντρικής υπερτροφίας. Η έκκεντρη υπερτροφία διαπιστώθηκε να αποτελεί την επικρατούσα διαταραχή της καρδιακής γεωμετρίας, τόσο σε κάθε ένα από τα τέσσερα στάδια της ΧΝΝ με ποσοστά 51.5%, 54%, 43% και 56% στα στάδια 1, 2, 3 και 4 αντίστοιχα, όσο και στο σύνολο των ασθενών (103 ασθενείς) με ποσοστό 50%.

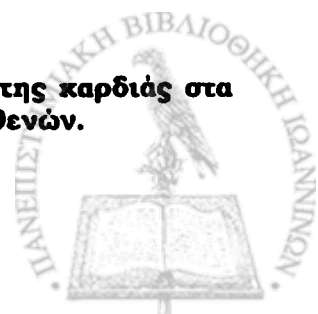


Πίνακας 16. Ανάλυση παλινδρόμησης της συσχέτισης του eGFR με το LVMI στους 206 ασθενείς. Μοντέλο μη προσαρμοσμένο και μοντέλα προσαρμοσμένα για κλινικούς και εργαστηριακούς παράγοντες πρόβλεψης

LVMI									
Μη προσαρμοσμένο μοντέλο πρόβλεψης									
eGFR	β	95% CI		<i>p</i>					
	-0.348	-0.766 έως -0.351		<0.001					
Προσαρμοσμένα μοντέλα πρόβλεψης									
Κλινικός παράγοντας	β	95% CI		<i>p</i>	Εργ/κός παράγοντας	β	95% CI		<i>p</i>
Ηλικία	-0.292	-0.666 έως -0.272		<0.001	TChol	-0.341	-0.72 έως -0.325		NS
Φύλο	-0.314	-0.702 έως -0.306		NS	HDL	-0.328	-0.734 έως -0.318		NS
Κάπνισμα	-0.335	-0.747 έως -0.328		NS	LDL	-0.348	-0.767 έως -0.35		NS
BMI	-0.36	-0.79 έως -0.366		NS	Hb	-0.347	-0.78 έως -0.334		NS
ΣΔ	-0.35	-0.775 έως -0.356		NS	sAlb	-0.316	-0.716 έως -0.299		NS
ΣΑΠ	-0.325	-0.73 έως -0.31		NS	CRP	-0.349	-0.763 έως -0.348		NS
Λήψη σαιτίνης	-0.348	-0.767 έως -0.351		NS	Ινωδογόνο	-0.289	-0.681 έως -0.241		<0.001
Λήψη ACEi ή/και ARB	-0.344	-0.761 έως -0.344		NS	VCAM-1	-0.3	-0.705 έως -0.257		<0.001
Λήψη EPO	-0.319	-0.729 έως -0.296		NS	8-epiPGF2a	-0.331	-0.729 έως -0.321		NS
					Fas	-0.297	-0.721 έως -0.232		<0.001
					TNF- α	-0.345	-0.769 έως -0.334		NS

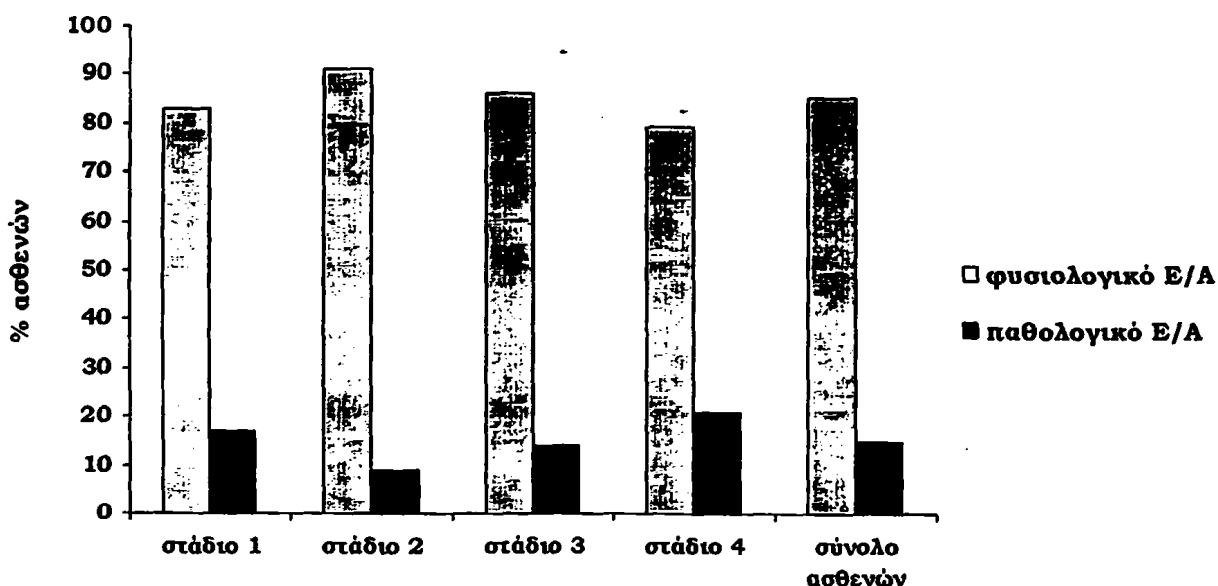


Σχήμα 10. Ποσοστό εμφάνισης των 4 μορφών της γεωμετρίας της καρδιάς στα 4 στάδια της ΧΝΝ καθώς και στο σύνολο των 206 ασθενών.



Η διαστολική λειτουργία εκτιμήθηκε από την τιμή του κλάσματος E/A. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Καρδιολογικής Εταιρείας, το κλάσμα E/A θεωρήθηκε παθολογικό όταν αυτό ήταν μικρότερο της μονάδας σε ασθενείς ηλικίας κάτω των 50 ετών και μικρότερο του 0.5 σε ασθενείς ηλικίας άνω των 50 ετών. Με βάση τον ορισμό αυτό, στους 204 ασθενείς, στους οποίους υπολογίστηκε το κλάσμα E/A διαπιστώθηκαν τα εξής: η πλειονότητα των ασθενών, 173 είχαν φυσιολογικό κλάσμα (ποσοστό 85%) (χωρίς όμως να μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση το κλάσμα να είναι ψευδώς φυσιολογικό ή να υποκρύπτεται διαταραχή χάλασης), ενώ 31 ασθενείς (ποσοστό 15%) είχαν παθολογικό κλάσμα εκ των οποίων σε 12 ασθενείς το κλάσμα ήταν μεγαλύτερο του 1.5 γεγονός που δηλώνει αναστρέψιμη ή μόνιμη περιοριστική διαταραχή της διαστολικής λειτουργίας (Σχήμα 11).

Τέλος, 5 ασθενείς από το σύνολο των 217 ασθενών που υποβλήθηκαν σε υπερηχοκαρδιογράφημα, ποσοστό 2.3%, είχαν EF μικρότερο του 50%, το οποίο είναι ενδεικτικό διαταραχής της συστολικής λειτουργίας της LV. Να σημειωθεί ότι όλοι αυτοί οι ασθενείς έπασχαν από στεφανιαία νόσο.



Σχήμα 11. Ποσοστά ασθενών με φυσιολογικό και παθολογικό κλάσμα E/A στα 4 στάδια της ΧΝΝ και στο σύνολο των 204 ασθενών



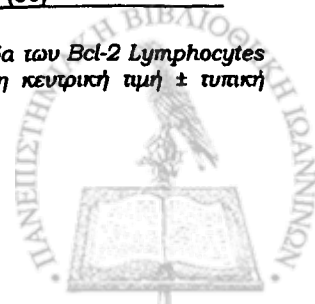
Η.2. Αποτελέσματα δεικτών απόπτωσης σε σχέση με τη νεφρική λειτουργία

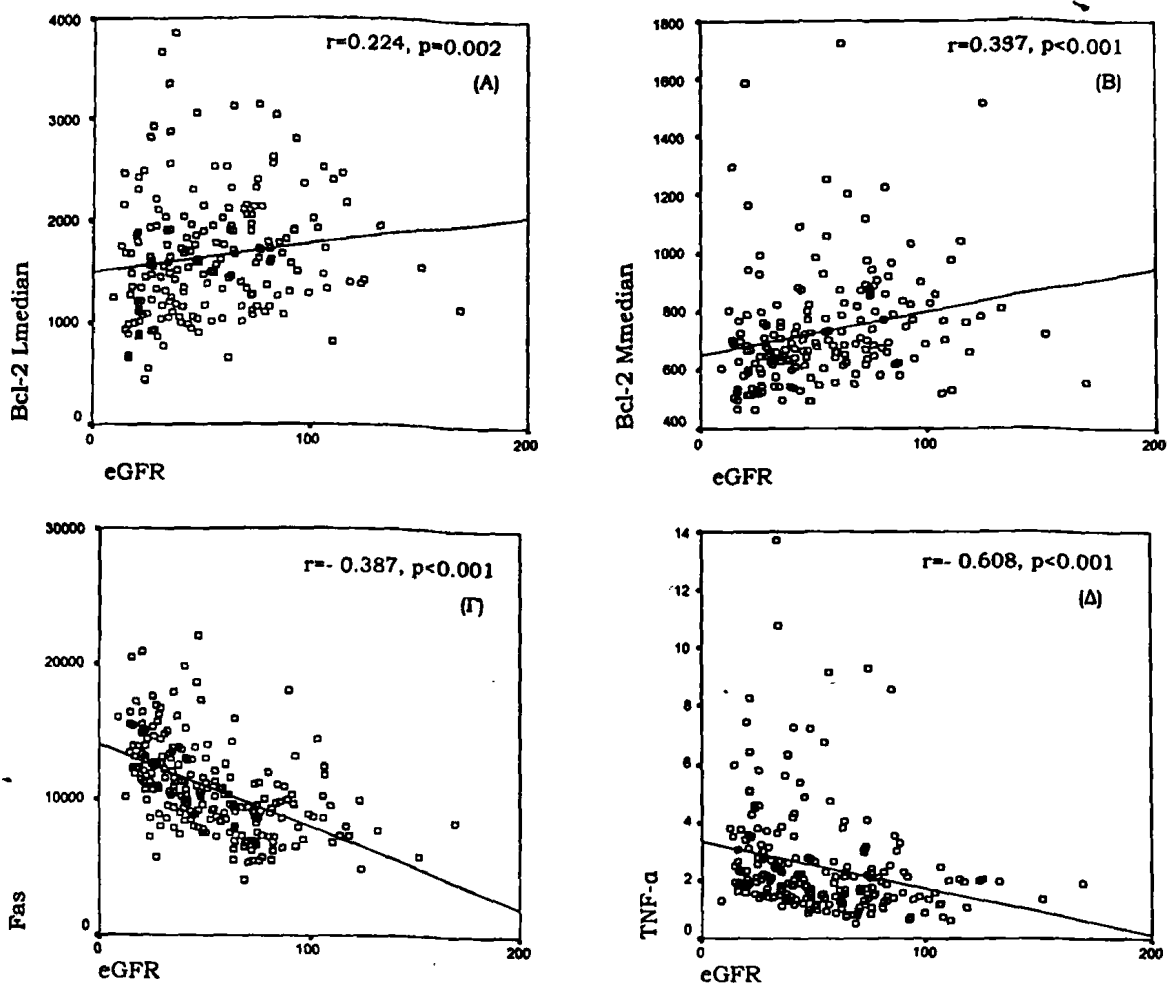
Τα επίπεδα των δεικτών της απόπτωσης στο σύνολο των ασθενών, καθώς και στις υποομάδες τους στα τέσσερα στάδια της ΧΝΝ φαίνονται στον πίνακα 17. Η έκφραση του Bcl-2 βρέθηκε να μειώνεται σημαντικά, τόσο στα λεμφοκύτταρα όσο και στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος με την πρόοδο των σταδίων της ΧΝΝ, υποδηλώνοντας έτσι ότι η αντι-αποπτωτική δραστηριότητα μειώνεται με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας. Αντίθετα, η δραστηριότητα της διαλυτής μορφής του αποπτωτικού μορίου Fas αυξήθηκε σημαντικά και το ίδιο παρατηρήθηκε και με τα επίπεδα στο ορό του TNF-α από το στάδιο 1 προς το στάδιο 4 της ΧΝΝ. Η σύνδεση της Annexin V- PI στα λεμφοκύτταρα και στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, καθώς και τα επίπεδα του FasL στον ορό δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων σταδίων της ΧΝΝ.

Από τους δείκτες της απόπτωσης που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του φαινομένου θετική, σημαντική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ των επιπέδων των Bcl-2 Lymphocytes-median και Bcl-2 Monocytes-median με τον eGFR (Spearman's $p=0.002$ και $p<0.001$ αντίστοιχα), ενώ αντίθετα αρνητική σημαντική συσχέτιση με τον eGFR βρέθηκε να έχουν οι δείκτες Fas και TNF-α (Spearman's $p<0.001$ και $p<0.001$ αντίστοιχα) (Σχήμα 12).

Παράμετρος (μονάδες μέτρησης)*	n	Επίπεδα των δεικτών της απόπτωσης στο σύνολο των ασθενών καθώς και στις υποομάδες των ασθενών στα τέσσερα στάδια της ΧΝΝ					ANOVA P
		Σύνολο	1	2	3	4	
Bcl-2 Lymphocytes (molecules/cell)	196	1647.4±590	1760.4±501 (24)	1776.7±559 (51)	1645.2±619.7 (70)	1467.8±587 (51)	0.04
Bcl-2 Monocytes (molecules/cell)	183	731.8±195.3	800.4±213 (22)	798±207 (48)	691±141.3 (65)	689.5±216 (48)	0.003
Annexin V- PI LMEA (%)	190	12±8.3	11.5±6.8 (23)	13.6±9.2 (45)	12.2±8 (70)	10±8.4 (52)	NS
Fas (pg/ml)	227	10868±3274	9323±2947 (24)	8443±2222 (58)	11214±2874 (85)	13341±2827 (50)	<0.001
FasL (pg/ml)	227	79.8±30	72.5±21 (24)	80.2±23 (58)	79.9±33 (85)	82±32 (60)	NS
TNF-α (pg/ml)	224	2.48±1.8	1.47±0.6 (24)	2±1.6 (57)	2.63±2.3 (83)	3±1.5 (60)	0.001

[* Όλες οι παράμετροι έχουν εκφραστεί ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση με εξαίρεση τα επίπεδα των Bcl-2 Lymphocytes και Bcl-2 Monocytes στα οποία προκειμένου για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η κεντρική τιμή ± τυπική απόκλιση επειδή οι κατανομές των τιμών ήταν έντονα ασύμμετρες]





Σχήμα 12. Διπαραγοντική συσχέτιση μεταξύ Bcl-2 Lmedian (A), Bcl-2 Mmedian (B), Fas (Γ), TNF-α (Δ) και eGFR

Με τη μέθοδο της πολλαπλής παλινδρόμησης βρέθηκε μία σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του eGFR και του αποπτωτικού μορίου Fas ($\beta=-0.524$, 95% CI=-72.45 έως -46.96, $p<0.001$), καθώς και μία όχι εξίσου ισχυρή αλλά επίσης σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του eGFR και του TNF-α ($\beta=-0.253$, 95% CI=-0.024 έως -0.008, $p<0.001$). Τα δύο αυτά μη προσαρμοσμένα μοντέλα πρόβλεψης προσαρμόστηκαν στη συνέχεια για έναν αριθμό κλινικών παραγόντων πρόβλεψης, καθώς και για έναν αριθμό εργαστηριακών παραγόντων πρόβλεψης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες 18 και 19.



Πίνακας 18. Ανάλυση παλινδρόμησης της συσχέτισης του eGFR και των δεικτών απόπτωσης Fas και TNF-α στο σύνολο των ασθενών. Μοντέλο μη προσαρμοσμένο και μοντέλο προσαρμοσμένο για κλινικούς παράγοντες πρόβλεψης

Παράγοντας πρόβλεψης	Fas			TNF-α		
	β	95% CI	p	β	95% CI	p
Μη προσαρμοσμένο μοντέλο πρόβλεψης						
eGFR	-0.524	-72.45 έως -46.96	<0.001	-0.253	-0.024 έως -0.008	0.001
Προσαρμοσμένο μοντέλο πρόβλεψης						
Ηλικία	-0.531	-73.4 έως -47.5	NS	-0.237	-0.023 έως -0.007	NS
Φύλο	-0.527	-72.8 έως -47.1	NS	-0.267	-0.025 έως -0.009	NS
Κάπνισμα	-0.526	-72.8 έως -46.9	NS	-0.242	-0.023 έως -0.007	NS
BMI	-0.533	-73.6 έως -47.7	NS	-0.295	-0.027 έως -0.011	0.001
ΣΔ	-0.527	-72.7 έως -47.2	NS	-0.252	-0.024 έως -0.008	NS
ΣΑΠ	-0.509	-71 έως -45	NS	-0.235	-0.023 έως -0.007	NS
Λήψη στατίνης	-0.526	-72.6 έως -47.2	NS	-0.253	-0.024 έως -0.008	NS
Λήψη ACEi ή/και ARB	-0.534	-73.6 έως -48.1	NS	-0.258	-0.024 έως -0.008	NS
Λήψη EPO	-0.505	-70.6 έως -44.3	NS	-0.26	-0.025 έως -0.008	NS



Πίνακας 19. Ανάλυση παλινδρόμησης της συσχέτισης του eGFR και των δεικτών απόπτωσης Fas και TNF-α στο σύνολο των ασθενών. Μοντέλο μη προσαρμοσμένο και μοντέλο προσαρμοσμένο για εργαστηριακούς παράγοντες πρόβλεψης

Παράγοντας πρόβλεψης	Fas			TNF-α		
	β	95% CI	p	β	95% CI	p
Μη προσαρμοσμένο μοντέλο πρόβλεψης						
eGFR	-0.524	-72.45 έως -46.96	<0.001	-0.253	-0.024 έως -0.008	0.001
Προσαρμοσμένο μοντέλο πρόβλεψης						
TChol	-0.526	-73 έως -47.3	NS	-0.254	-0.024 έως -0.008	NS
HDL	-0.525	-72.7 έως -46.8	NS	-0.249	-0.024 έως -0.008	NS
LDL	-0.524	-72.5 έως -46.9	NS	-0.253	-0.024 έως -0.008	NS
Hb	-0.485	-68.7 έως -41.7	NS	-0.238	-0.024 έως -0.006	NS
sAlb	-0.503	-70.2 έως -44.3	NS	-0.27	-0.025 έως -0.009	NS
CRP	-0.529	-73.3 έως -47.6	NS	-0.257	-0.024 έως -0.008	NS
Ινωδογόνο	-0.486	-69.5 έως -42.3	NS	-0.247	-0.025 έως -0.007	NS
VCAM-1	-0.424	-61.4 έως -35	<0.001	-0.207	-0.022 έως -0.004	0.003
LVMi	-0.496	-69.6 έως -41.5	NS	-0.256	-0.026 έως -0.007	NS

Από την ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης, φάνηκε ότι η ισχυρή συσχέτιση του eGFR με το δείκτη απόπτωσης Fas δεν επηρεάστηκε σημαντικά από κανένα από τους κλινικούς παράγοντες πρόβλεψης που επιλέχθηκαν για το προσαρμοσμένο μοντέλο, ενώ από τους εργαστηριακούς παράγοντες τα επίπεδα ορού των VCAM-1 βρέθηκε ότι επηρέασαν σημαντικά τη συσχέτιση των δύο μεταβλητών (% μεταβολής $\beta=19.08\%$, $p=0.001$). Τα επίπεδα VCAM-1 του ορού βρέθηκε επίσης ότι επηρέασαν σημαντικά τη συσχέτιση του eGFR με τον TNF-α (% μεταβολής $\beta=18.18\%$, $p=0.003$) πιθανολογώντας την αλληλεπίδραση αποπτωτικών και φλεγμονωδών μηχανισμών στην εξέλιξη της ΧΝΝ. Τέλος, από τους κλινικούς παράγοντες πρόβλεψης διαπιστώθηκε ότι οι τιμές του BMI επηρέασαν σημαντικά τη συσχέτιση των δύο μεταβλητών, eGFR και TNF-α (% μεταβολής $\beta=16.6\%$, $p=0.001$).



Η.3. Αποτελέσματα δεικτών ΟΣ σε σχέση με τη νεφρική λειτουργία

Τα επίπεδα των παραμέτρων του ΟΣ στο σύνολο των ασθενών, καθώς και στις υποομάδες τους στα τέσσερα στάδια της ΧΝΝ φαίνονται στον πίνακα 20. Από τους δείκτες του ΟΣ που μετρήθηκαν μόνο τα επίπεδα των 8-epiPGF2a αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά με την επιδείνωση του σταδίου της ΧΝΝ ($p < 0.001$). Οι τιμές των καρβονυλίων και της ΤΑΣ σημείωσαν μεταβολή με την επιδείνωση της ΧΝΝ, με τα μεν καρβονύλια να αυξάνονταν σταδιακά, τη δε ΤΑΣ να μειώνεται, όμως οι μεταβολές αυτές δεν έφτασαν σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας. Τέλος, η ox-LDL δεν εμφάνισε καμία αξιοσημείωτη μεταβολή.

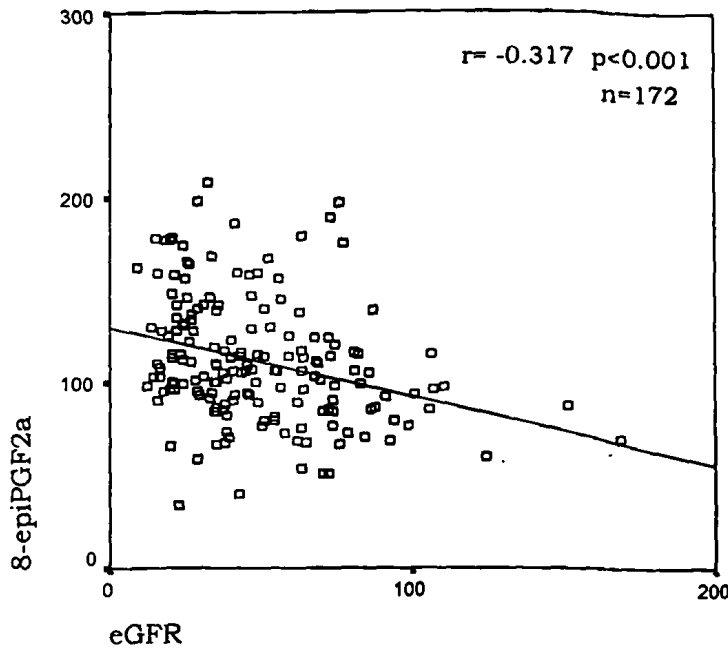
Πίνακας 20. Τα επίπεδα των δεικτών ΟΣ στο σύνολο των ασθενών, καθώς και στις υποομάδες τους στα τέσσερα στάδια της ΧΝΝ

Παράμετρος (μονάδες μέτρησης) *	Στάδια ΧΝΝ						ANOVA p
	n	Σύνολο	1	2	3	4	
8-epiPGF2a (pg/ml)	172	112±33	85±15 (12)	104±35 (41)	111±31 (67)	125±33 (52)	<0.001
Καρβονύλια (nmol/mg)	223	0.11±0.14	0.09±0.07 (23)	0.1±0.11 (57)	0.11±0.16 (85)	0.13±0.17 (58)	NS
TAS (mmol/l)	152	0.37±0.3	0.47±0.3 (12)	0.41±0.3 (35)	0.35±0.3 (60)	0.33±0.3 (45)	NS
ox-LDL (U/l)	175	79±24	82±21 (13)	78±20 (40)	79±26 (68)	79±24 (54)	NS

[* Όλες οι παράμετροι έχουν εκφραστεί ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση]

Τα επίπεδα των 8-epiPGF2a βρέθηκε να σχετίζονται αρνητικά με το eGFR (Spearman's $p < 0.001$) (Σχήμα 13). Κανένας άλλος δείκτης του ΟΣ δεν βρέθηκε να συσχετίζεται σημαντικά με τον eGFR χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της διπαραγοντικής συσχέτισης.





Σχήμα 13. Διπαράγοντική συσχέτιση μεταξύ 8-epiPGF2a και eGFR

Με τη μέθοδο της πολλαπλής παλινδρόμησης βρέθηκε μία σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του eGFR και των επιπέδων των 8-epiPGF2a ($\beta = -0.302$, 95% CI = -0.549 έως -0.194, $p < 0.001$). Το αρχικό μη προσαρμοσμένο μοντέλο πρόβλεψης προσαρμόστηκε στη συνέχεια για έναν αριθμό κλινικών παραγόντων πρόβλεψης, καθώς και για έναν αριθμό εργαστηριακών παραγόντων πρόβλεψης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 21. Η συσχέτιση του eGFR με τα επίπεδα των 8-epiPGF2a επηρεάστηκε σημαντικά από την ηλικία (% μεταβολής $\beta = 12.9\%$, $p < 0.001$) και το BMI (% μεταβολής $\beta = 13.9\%$, $p = 0.001$) όσον αφορά στους κλινικούς παράγοντες πρόβλεψης που επιλέχθηκαν για το προσαρμοσμένο μοντέλο. Από τους εργαστηριακούς παράγοντες, η Hb βρέθηκε ότι επηρέασε σημαντικά τη συσχέτιση των δύο μεταβλητών (% μεταβολής $\beta = 17.22\%$, $p < 0.001$), η sAlb (% μεταβολής $\beta = 16.56\%$, $p = 0.001$), καθώς και τα επίπεδα ορού των VCAM-1 (% μεταβολής $\beta = 15.23\%$, $p = 0.003$) και του αποπτωτικού μορίου Fas (% μεταβολής $\beta = 15\%$, $p < 0.001$). Με τα αποτελέσματα αυτά ενισχύεται η σημασία

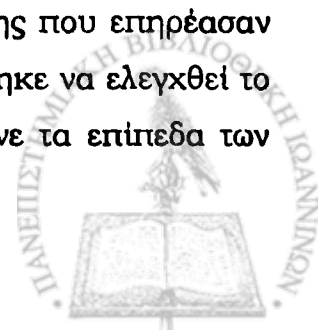


του ρόλου τόσο των παραδοσιακών παραγόντων, όπως η ηλικία και το αυξημένο σωματικό βάρος, όσο και των μη παραδοσιακών παραγόντων όπως η αναιμία, η ανεπαρκής θρέψη και η φλεγμονή στα αρχικά στάδια της ΧΝΝ και πιθανολογείται κάποιου είδους αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

Πίνακας 21. Ανάλυση παλινδρόμησης της συσχέτισης του eGFR και των επιπέδων των 8-epiPGF2a στο σύνολο των ασθενών. Μοντέλο μη προσαρμοσμένο και μοντέλα προσαρμοσμένα για κλινικούς και εργαστηριακούς παράγοντες πρόβλεψης

8-epiPGF2a							
Μη προσαρμοσμένο μοντέλο πρόβλεψης							
	β	95% CI		<i>p</i>			
eGFR	-0.302	-0.549 έως -0.194		<0.001			
Προσαρμοσμένα μοντέλα πρόβλεψης (παράγοντες)							
Κλινικός	β	95% CI	<i>p</i>	Εργ/κός	β	95% CI	<i>p</i>
Ηλικία	-0.341	-0.594 έως -0.246	<0.001	TChol	-0.321	-0.56 έως -0.214	NS
Φύλο	-0.292	-0.535 έως -0.184	NS	HDL	-0.302	-0.55 έως -0.193	NS
Κάπνισμα	-0.329	-0.583 έως -0.228	NS	LDL	-0.302	-0.55 έως -0.195	NS
BMI	-0.26	-0.501 έως -0.138	0.001	Hb	-0.354	-0.62 έως -0.24	<0.001
ΣΔ	-0.301	-0.546 έως -0.194	NS	sAlb	-0.252	-0.49 έως -0.13	0.001
ΣΑΠ	-0.318	-0.573 έως -0.2	NS	CRP	-0.294	-0.53 έως -0.183	NS
Λήψη στατίνης	-0.302	-0.55 έως -0.194	NS	Ινωδογόνο	-0.289	-0.54 έως -0.165	NS
Λήψη ACEi ή/και ARB	-0.3	-0.549 έως -0.188	NS	VCAM-1	-0.256	-0.519 έως -0.11	0.003
Λήψη EPO	-0.32	-0.578 έως -0.2	NS	LVMI	-0.288	-0.547 έως -0.158	NS
				Fas	-0.347	-0.645 έως -0.2	<0.001
				TNF- α	-0.324	-0.576 έως -0.214	NS

Στη συνέχεια, για καθένα από τους παράγοντες πρόβλεψης που επηρέασαν σημαντικά τη συσχέτιση του eGFR με τα 8-epiPGF2a, επιχειρήθηκε να ελεγχθεί το ποσοστό, με το οποίο ο κάθε παράγοντας ξεχωριστά διαμόρφωνε τα επίπεδα των



8-epiPGF2a. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της παλινδρόμησης μεταξύ του εκάστοτε παράγοντα και των 8-epiPGF2a που θεωρήθηκε η εξαρτημένη μεταβλητή και διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό αυτό ήταν σε όλες τις περιπτώσεις μικρότερο από εκείνο με το οποίο τα επίπεδα των 8-epiPGF2a διαμορφώνονταν από τον eGFR. Αξίζει να τονιστεί ότι η Hb και ο Fas από μόνοι τους δεν είχαν καμία επίδραση στην διαμόρφωση των επιπέδων των 8-epiPGF2a, γεγονός που θα μπορούσε ίσως να αποδοθεί μερικώς στο ότι τα επίπεδα των παραμέτρων αυτών εξαρτώνται άμεσα από την ίδια τη νεφρική λειτουργία, η οποία και τα διαμορφώνει σε ένα μεγάλο ποσοστό (το ποσοστό για την Hb είναι 34% και για τον Fas είναι 52.4%) και άρα η επίδρασή τους στη συσχέτιση των eGFR με τα 8-epiPGF2a ίσως ήταν ένα επιφανίδμενο (Πίνακας 22). Συμπερασματικά, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι ο eGFR εξακολουθεί να αποτελεί τον ισχυρότερο προγνωστικό παράγοντα πρόβλεψης των επιπέδων των 8-epiPGF2a, παρά το γεγονός ότι η συσχέτιση αυτή επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες.

Πίνακας 22. Ανάλυση παλινδρόμησης μεταξύ των 8-epiPGF2a και του eGFR, της ηλικίας, του BMI, της Hb, της sAlb, των VCAM-1 και του Fas

8-epiPGF2a			
Μη προσαρμοσμένο μοντέλο πρόβλεψης			
	β	95% CI	p
eGFR	-0.302	-0.549 έως -0.194	<0.001
Ηλικία	-0.207	-0.96 έως -0.158	0.007
BMI	-0.232	-2.34 έως -0.522	0.002
Hb	0.007	-2.99 έως 3.279	NS
sAlb	-0.26	-37.51 έως -10.52	0.001
VCAM-1	0.219	0.007 έως 0.034	0.004
Fas	0.121	0 έως 0.003	NS



Η.4. Αποτελέσματα δεικτών φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας σε σχέση με τη νεφρική λειτουργία

Τα επίπεδα των δεικτών φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στο σύνολο των ασθενών, καθώς και στις υποομάδες τους στα τέσσερα στάδια της ΧΝΝ φαίνονται στον πίνακα 23. Με την πρόοδο των σταδίων της ΧΝΝ αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά οι τιμές των VCAM-1 ($p < 0.001$), της IL-6 ($p = 0.05$) στον ορό και του ινωδογόνου στο πλάσμα ($p < 0.001$). Τα επίπεδα των ICAM-1 και CRP δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων σταδίων της ΧΝΝ.

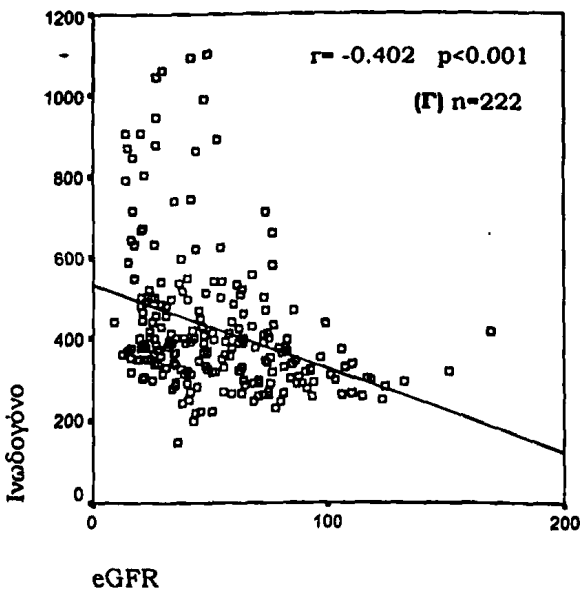
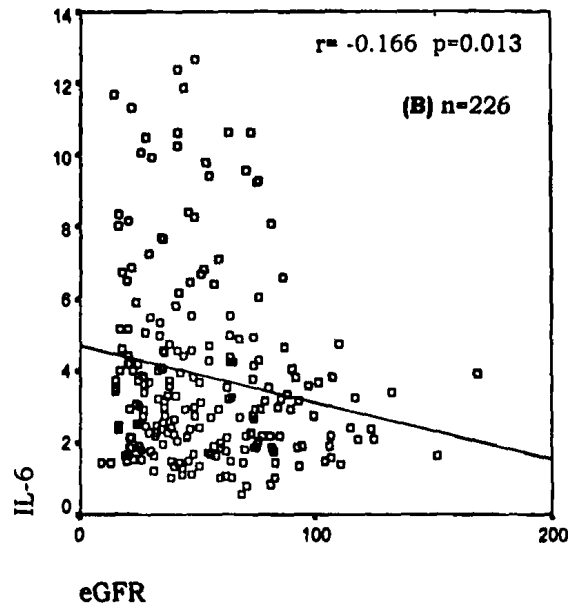
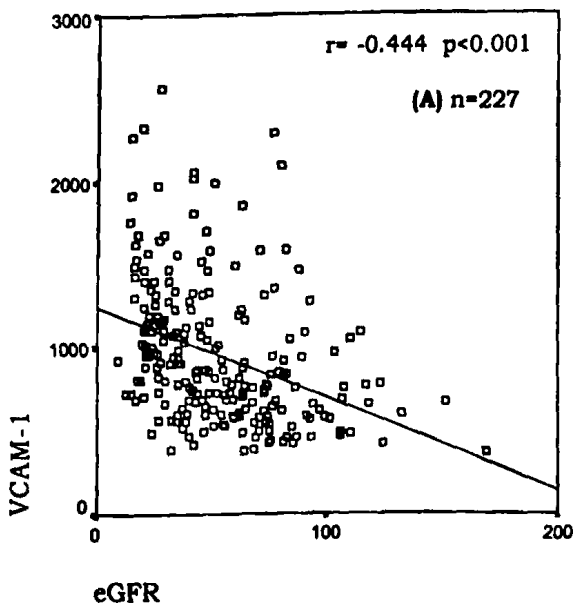
Πίνακας 23. Επίπεδα των δεικτών φλεγμονής στο σύνολο των ασθενών καθώς και στις υποομάδες των ασθενών στα τέσσερα στάδια της ΧΝΝ

Παράμετρος (μονάδες μέτρησης)*	Στάδια ΧΝΝ						ANOVA p
	n	Σύνολο	1	2	3	4	
VCAM-1 (ng/ml)	227	954±425	690±236 (24)	824±418 (58)	947±383 (85)	1197±432 (60)	<0.001
ICAM-1 (ng/ml)	227	280±100	275±91 (24)	299±104 (58)	268±101 (85)	282±98 (60)	NS
IL-6 (pg/ml)	226	3.8±2.6	2.7±1 (24)	3.5±2.5 (57)	4±2.8 (85)	4.2±2.7 (60)	0.05
CRP (mg/l)	225	3.7±0.3	2.6±0.6 (24)	4±0.7 (58)	3.8±0.5 (83)	3.7±0.6 (60)	NS
Ινωδογόνο (mg/dl)	222	425±175	313±48 (23)	374±104 (57)	426±184 (81)	514±203 (61)	<0.001

[* Όλες οι παράμετροι έχουν εκφραστεί ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση εκτός από την τιμή της CRP που εκφράστηκε ως μέση τιμή ± τυπικό λάθος]

Από τους δείκτες της φλεγμονής που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του φαινομένου, σημαντική αρνητική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ των επιπέδων των VCAM-1 ($p < 0.001$), της IL-6 ($p = 0.013$) και του ινωδογόνου ($p < 0.001$) με τον eGFR (Σχήμα 14). Αντίθετα, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των ICAM-1, CRP και της νεφρικής λειτουργίας.





Σχήμα 14.

Διπαραγοντική συσχέτιση
μεταξύ VCAM-1 (Α),
IL-6 (Β), ινωδογόνου (Γ)
και eGFR

Με τη μέθοδο της πολλαπλής παλινδρόμησης βρέθηκε μία σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του eGFR και των επιπέδων των VCAM-1 ($\beta = -0.374$, 95% CI = -7.325 έως -3.722, $p < 0.001$), καθώς και μία εξίσου ισχυρή σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του eGFR και του ινωδογόνου πλάσματος ($\beta = -0.334$, 95% CI = -2.775 έως -1.255, $p < 0.001$). Τα δύο αυτά μη προσαρμοσμένα μοντέλα προσαρμόστηκαν στη συνέχεια για έναν αριθμό κλινικών παραγόντων πρόβλεψης, καθώς και για έναν αριθμό εργαστηριακών παραγόντων πρόβλεψης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες 24 και 25.



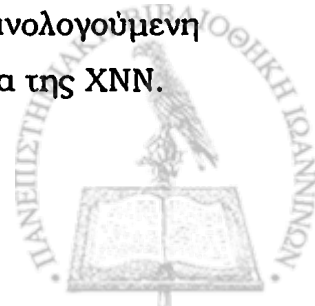
Πίνακας 24. Ανάλυση παλινδρόμησης της συσχέτισης του eGFR και των δεικτών φλεγμονής VCAM-1 και ινωδογόνου στο σύνολο των ασθενών. Μοντέλο μη προσαρμοσμένο και μοντέλο προσαρμοσμένο για κλινικούς παράγοντες πρόβλεψης

Παράγοντας πρόβλεψης	VCAM-1			Ινωδογόνο		
	β	95% CI	p	β	95% CI	p
Μη προσαρμοσμένο μοντέλο πρόβλεψης						
eGFR	-0.374	-7.32 έως -3.72	<0.001	-0.334	-2.77 έως -1.25	<0.001
Προσαρμοσμένο μοντέλο πρόβλεψης						
Ηλικία	-0.347	-6.93 έως -3.32	NS	-0.318	-2.7 έως - 1.15	NS
Φύλο	-0.378	-7.39 έως -3.77	NS	-0.325	-2.7 έως -1.2	NS
Κάπνισμα	-0.348	-6.95 έως -3.35	NS	-0.319	-2.7 έως -1.16	NS
BMI	-0.392	-7.62 έως -3.97	NS	-0.331	-2.77 έως -1.22	NS
ΣΔ	-0.378	-7.39 έως -3.79	NS	-0.336	-2.78 έως -1.2	NS
ΣΑΠ	-0.352	-7.03 έως -3.37	NS	-0.3	-2.58 έως -1	<0.05
Λήψη στατίνης	-0.374	-7.33 έως -3.72	NS	-0.334	-2.77 έως -1.26	NS
Λήψη ACEi ή/και ARB	-0.364	-7.2 έως -3.57	NS	-0.329	-2.75 έως -1.22	NS
Λήψη EPO	-0.355	-7.1 έως -3.38	NS	-0.319	-2.7 έως -1.2	NS

Πίνακας 25. Ανάλυση παλινδρόμησης της συσχέτισης του eGFR και των δεικτών φλεγμονής VCAM-1 και ινωδογόνου στο σύνολο των ασθενών. Μοντέλο μη προσαρμοσμένο και μοντέλο προσαρμοσμένο για εργαστηριακούς παράγοντες πρόβλεψης

Παράγοντας πρόβλεψης	VCAM-1			Ινωδογόνο		
	β	95% CI	p	β	95% CI	p
Μη προσαρμοσμένο μοντέλο πρόβλεψης						
eGFR	-0.374	-7.32 έως -3.72	<0.001	-0.334	-2.77 έως -1.25	0.001
Προσαρμοσμένο μοντέλο πρόβλεψης						
TChol	-0.383	-7.49 έως -3.87	NS	-0.331	-2.77 έως -1.25	NS
HDL	-0.367	-7.25 έως -3.6	NS	-0.33	-2.76 έως -1.22	NS
LDL	-0.378	-7.37 έως -3.79	NS	-0.33	-2.75 έως -1.23	NS
Hb	-0.347	-7 έως -3.57	NS	-0.313	-2.7 έως -1	NS
sAlb	-0.354	-7 έως -3.2	NS	-0.269	-2.36 έως -0.9	<0.001
LVMi	-0.335	-6.73 έως -2.82	<0.05	-0.291	-2.37 έως -0.84	0.005
Fas	-0.206	-5.08 έως -1.02	0.003	-0.234	-2.3 έως -0.5	0.002
TNF- α	-0.349	-7 έως -3.28	NS	-0.332	-2.79 έως -1.2	NS

Από την ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης φάνηκε ότι η σημαντική αρνητική συσχέτιση του eGFR με το δείκτη φλεγμονής-ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας VCAM-1 δεν επηρεάστηκε σημαντικά από κανένα από τους κλινικούς παράγοντες πρόβλεψης που επιλέχθηκαν για το προσαρμοσμένο μοντέλο, ενώ από τους εργαστηριακούς παράγοντες ο παράγοντας πρόβλεψης που επηρέασε σημαντικότερα τη συσχέτιση ήταν το αποπτωτικό μόριο Fas (% μεταβολής $\beta=45\%$, $p=0.003$), γεγονός που ενισχύει την πιθανολογούμενη αλληλοεπίδραση απόπτωσης και φλεγμονής ήδη από τα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ.



Επιπλέον, ο LVMI επηρέασε οριακά σημαντικά τη συσχέτιση των δύο μεταβλητών eGFR και VCAM-1 (% μεταβολής $\beta=10.58\%$, $p<0.05$). Όσον αφορά στη συσχέτιση του eGFR με το ινωδογόνο, αυτή επηρεάστηκε οριακά σημαντικά από τη ΣΑΠ (% μεταβολής $\beta=10.2\%$, $p<0.05$), ενώ από τους εργαστηριακούς παράγοντες πρόβλεψης η sAlb (% μεταβολής $\beta=19.76\%$, $p<0.001$), ο παράγοντας Fas (% μεταβολής $\beta=30\%$, $p=0.002$) και ο LVMI επηρέασαν σημαντικά τη συσχέτιση των δύο μεταβλητών (% μεταβολής $\beta=19.61\%$, $p=0.005$). Τέλος, η ανάλυση παλινδρόμησης ανάδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση και μεταξύ των IL-6 και eGFR ($\beta=-0.172$ 95% CI=-0.027 έως -0.004 $p=0.009$) όμως δεν έγινε προσαρμογή του αρχικού μοντέλου για άλλους παράγοντες πρόβλεψης γιατί η συσχέτιση δεν θεωρήθηκε αρκετά ισχυρή.



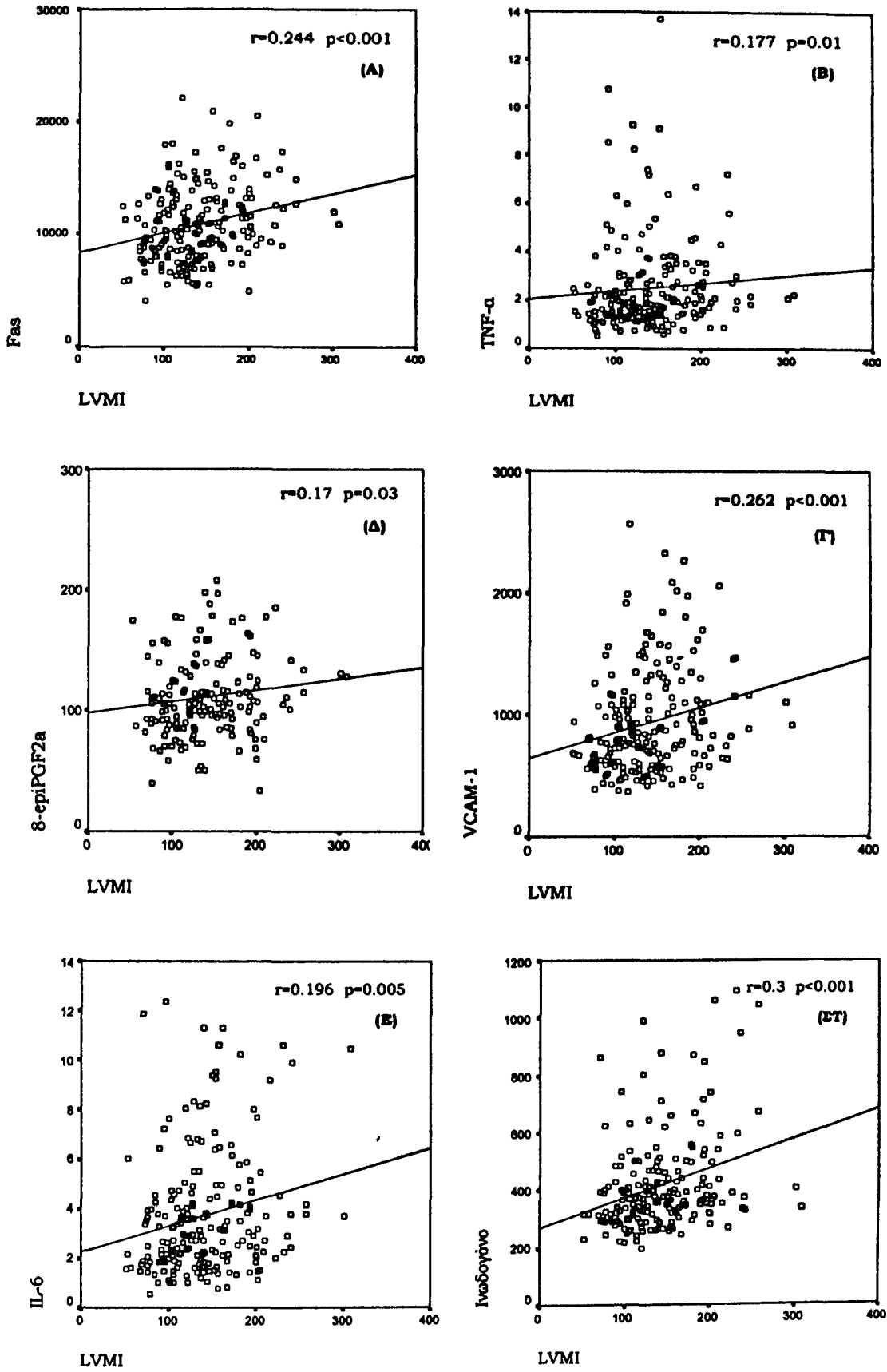
Η.5. Συσχέτιση υπερηχοκαρδιογραφικών ευρημάτων με κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους καθώς και με τους δείκτες της απόπτωσης, του ΟΣ και της φλεγμονής

Από τις υπερηχοκαρδιογραφικές παραμέτρους επιλέχθηκε ο δείκτης LVMI, ως ο πιο αντιπροσωπευτικός ύπαρξης υπερτροφίας της LV, ώστε να διερευνηθούν οι συσχετίσεις του με βασικές κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους. Με τη μέθοδο της διπαραγοντικής συσχέτισης ανευρέθηκαν οι εξής συσχετίσεις, οι οποίες φαίνονται στον Πίνακα 26.

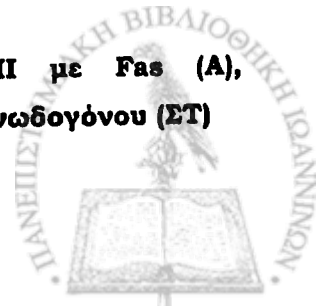
Παράμετρος	Διπαραγοντικές συσχετίσεις μεταξύ του LVMI και κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων	
	r	p
Ηλικία	0.389	<0.001
BMI	-0.1	NS
ΣΑΠ	0.174	0.01
ΔΑΠ	-0.074	NS
Διαφορική ΑΠ	0.22	0.001
sCr	0.366	<0.001
sUr	0.353	<0.001
Λεύκωμα/κρεατινίνη ούρων	0.296	<0.001
Hb	-0.075	NS
sGlu	0.15	0.03
sUA	0.24	<0.001
sAlb	-0.193	0.006
TChol	0.03	NS
HDL	-0.13	NS
LDL	0.02	NS
TRG	0.138	0.05
PTH	0.342	<0.001

Από τη συσχέτιση του δείκτη LVMI με τις εξειδικευμένες παραμέτρους της απόπτωσης, του ΟΣ και της φλεγμονής, διαπιστώθηκαν οι παρακάτω σημαντικές συσχετίσεις: ο LVMI βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά με το αποπτωτικό μόριο Fas (Spearman's $p < 0.001$), με τον TNF- α (Spearman's $p = 0.01$), τα επίπεδα των 8-epiPGF2a (Spearman's $p = 0.03$), τα επίπεδα των VCAM-1 (Spearman's $p < 0.001$), της IL-6 (Spearman's $p = 0.005$) και του ινωδογόνου (Spearman's $p < 0.001$). Το σχήμα 15 αποδίδει οχηματικά τις συσχετίσεις αυτές.





Σχήμα 15. Διπαραγοντική συσχέτιση μεταξύ των LVMI με Fas (Α), TNF- α (Β), 8-epiPGF2a (Γ), VCAM-1 (Δ), IL-6 (Ε), ινωδογόνου (ΕΤ)



Η.6. Αποτελέσματα συσχετίσεων μεταξύ των δεικτών απόπτωσης, ΟΣ, φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας

Στον πίνακα 27 φαίνονται οι σχέσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των δεικτών της απόπτωσης, του ΟΣ της φλεγμονής και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στο σύνολο των ασθενών, στους οποίους μετρήθηκε η εκάστοτε παράμετρος.

Διαπιστώθηκαν αρκετές ενδιαφέρουσες συσχετίσεις μεταξύ των εξειδικευμένων δεικτών που εκτιμήθηκαν. Όσον αφορά στους δείκτες απόπτωσης, η έκφραση του Bcl-2 στα λεμφοκύτταρα βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με τους περισσότερους από τους υπόλοιπους δείκτες της απόπτωσης Bcl2-Monocytes median, Annexin V/PI-LMEA, Annexin V/PI-LMLA, Annexin V/PI-LMTotal, ενώ βρέθηκε να σχετίζεται αρνητικά με το αποπτωτικό μόριο Fas και τα επίπεδα των καρβονυλίων. Η έκφραση του Bcl-2 στα μονοκύτταρα βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα σύνδεσης της Αννεξίνης V-PI τόσο στα πρώιμα αποπτωτικά, στα καθυστερημένα ή/και νεκρωτικά μονοπύρρηνα όσο και στο σύνολο τους. Σημαντική αρνητική συσχέτιση βρέθηκε να έχει η έκφραση του Bcl-2 στα μονοκύτταρα με τα επίπεδα του Fas, των καρβονυλίων, της IL-6 και του ινωδογόνου. Στο σημείο αυτό πρέπει να διευκρινιστεί ότι η συσχέτιση της ποσοτικής έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 στα μονοπύρρηνα του περιφερικού αίματος που προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής με τις υπόλοιπες παραμέτρους τόσο της απόπτωσης όσο και του ΟΣ και της φλεγμονής στις οποίες μετρήθηκαν οι διαλυτές μορφές, γίνεται με όλες τις επιφυλάξεις που μπορεί να έχει μία συσχέτιση ανάμεσα σε στοιχεία που προέρχονται από μελέτη κυτταροδομής, όπως αυτή γίνεται με την κυτταρομετρία ροής και σε στοιχεία που εκτιμώνται ως ποσοτική έκφραση της διαλυτής μορφής κάποιου δείκτη στο αίμα.

Η σύνδεση της Annexin V στην επιφάνεια των πρώιμα αποπτωτικών μονοπύρρηνων (LMEA) βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα της ox-LDL, της TAS, της CRP και των ICAM-1, ενώ αρνητικά με τα επίπεδα του FasL, των καρβονυλίων και των VCAM-1. Η σύνδεση των Annexin V/PI στα καθυστερημένα αποπτωτικά ή/και νεκρωτικά μονοπύρρηνα (LMLA) βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα των 8-epiPGF2a καθώς και των ICAM-1. Το ποσοστό του συνόλου των μονοπύρρηνων που συνέδεαν τα Annexin V/PI (LMTotal) βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα των 8-epiPGF2a, της ox-LDL, της TAS, των ICAM-1 και της



CRP, ενώ διαπιστώθηκε αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα του FasL και των καρβονυλίων.

Τα επίπεδα των διαλυτών μορφών του Fas και του FasL, εκτός από τις συσχετίσεις που ήδη αναφέρθηκαν με τους υπόλοιπους δείκτες της απόπτωσης, βρέθηκε ο μιν Fas να σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα του TNF-α, των VCAM-1, της IL-6 και του ινωδογόνου, ο δε FasL να σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα των VCAM-1 και αρνητικά με τα επίπεδα του ινωδογόνου. Τέλος, από τους δείκτες της απόπτωσης ο TNF-α εκτός από τη θετική συσχέτιση με το Fas που προαναφέρθηκε, βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά, θετικά και με τα επίπεδα των VCAM-1, των ICAM-1, της IL-6 και του ινωδογόνου.

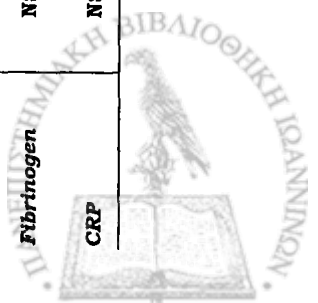
Για τους δείκτες του ΟΣ, εκτός από τις προαναφερθείσες συσχετίσεις τους με τους δείκτες της απόπτωσης, διαπιστώθηκαν τα εξής: τα επίπεδα των 8-epiPGF2α βρέθηκε να σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα των VCAM-1, των ICAM-1, του ινωδογόνου και της CRP.

Οι δείκτες φλεγμονής στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους έδειξαν τις εξής συσχετίσεις: τα επίπεδα των VCAM-1 βρέθηκε να σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα των ICAM-1, της IL-6 και του ινωδογόνου. Τα επίπεδα των ICAM-1 σχετίζονταν θετικά με τη CRP. Τα επίπεδα της IL-6 σχετίζονταν επίσης θετικά με το ινωδογόνο και τη CRP, ενώ τέλος το ινωδογόνο πλάσματος και η CRP ορού βρέθηκε να έχουν σημαντική, θετική συσχέτιση μεταξύ τους.



Πίνακας 27. Διαταραγμένες συσχετίσεις μεταξύ των Bcl-2-Lymphocytes median, Bcl-2-Monocytes median, Annexin V/PI-LMEA, Annexin V/PI-LMLA, Annexin V/PI-LMTotal, Fas, FasL, TNF-α, 8-epiPGF2α, ox-DL, carbonyls, VICAM-1, ICAM-1 IL-6, Fibrinogen, CRP

	Bcl-2-Lmd	Bcl-2-Mmd	AnV/PI-LMEA	AnV/PI-LMLA	AnV/PI-LMtot	Fas	FasL	TNF-α	8-epiPGF2α	ox-LDL	Carbonyls	VCAM-1	ICAM-1	IL-6	Fibrinogen
Bcl-2-Lmd	-														
Bcl-2-Mmd	0.59 (<0.001)														
AnV/PI-LMEA	0.29 (<0.001)	0.31 (<0.001)													
AnV/PI-LMLA	0.16 (0.04)	0.16 (0.04)													
AnV/PI-LMtot	0.28 (<0.001)	0.31 (<0.001)													
Fas	-0.15 (0.04)	-0.18 (0.01)	NS	NS	NS										
FasL	NS	NS	-0.17 (0.02)	NS	-0.16 (0.03)	NS									
TNFα	NS	NS	NS	NS	NS	0.23 (<0.001)	NS								
8-epiPGF2α	NS	NS	NS	0.21 (0.01)	0.18 (0.04)	NS	NS	NS							
ox-LDL	NS	NS	0.20 (0.02)	NS	0.19 (0.02)	NS	NS	NS	NS						
Carbonyls	-0.22 (0.003)	-0.27 (<0.001)	-0.29 (<0.001)	NS	-0.28 (<0.001)	NS	NS	NS	NS	NS	NS				
VCAM-1	NS	NS	-0.15 (0.04)	NS	NS	0.45 (<0.001)	0.27 (<0.001)	0.37 (<0.001)	0.25 (0.001)	NS	NS				
ICAM-1	NS	NS	0.21 (0.003)	0.19 (0.009)	0.21 (0.003)	NS	NS	0.33 (<0.001)	0.26 (0.001)	NS	NS	0.33 (<0.001)			
IL-6	NS	-0.16 (0.03)	NS	NS	NS	0.15 (0.02)	NS	0.26 (<0.001)	NS	NS	NS	0.29 (<0.001)	NS		
Fibrinogen	NS	-0.21 (0.005)	NS	NS	NS	0.33 (<0.001)	-0.18 (0.007)	0.38 (<0.001)	0.18 (0.02)	NS	NS	0.18 (0.009)	NS	0.25 (<0.001)	
CRP	NS	NS	0.19 (0.008)	NS	0.2 (0.006)	NS	NS	NS	0.28 (<0.001)	NS	NS	NS	0.36 (<0.001)	0.31 (<0.001)	0.37 (<0.001)



Θ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Θ.1. Συχνότητα, εξέλιξη ΧΝΝ και ευρήματα από το υπερηχοκαρδιογράφημα σε σχέση με τη νεφρική λειτουργία

Από τη μελέτη NHANES III στο γενικό πληθυσμό των ΗΠΑ βρέθηκε ότι το ποσοστό των ασθενών με στάδια ΧΝΝ 1-4 αγγίζει το 11%, που είναι σχεδόν 60 φορές μεγαλύτερο από τον αριθμό των ασθενών που καταλήγει σε ΑΜΚ. Ένας μεγάλος αριθμός από αυτούς που ανήκουν στα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ είναι ασυμπτωματικοί με αποτέλεσμα να υποδιαγιγνώσκονται και να υποθεραπεύονται (5). Παρόμοιο ποσοστό βρέθηκε και στο γενικό πληθυσμό στην Αυστραλία, Ιαπωνία, Ινδία και Σιγκαπούρη (9-12). Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε σε αναφερόμενο πληθυσμό στα Εξωτερικά Ιατρεία δύο Νεφρολογικών Κέντρων με γνωστή νεφρική νόσο και συνεπώς δεν σκόπευε να περιγράψει τη συχνότητα των σταδίων της ΧΝΝ στο γενικό πληθυσμό. Ωστόσο, η επιλογή των 229 ασθενών έγινε κατά χρονολογική σειρά εμφάνισής των στα Εξωτερικά Ιατρεία και η κατανομή τους σε ποσοστά 11%, 25%, 37% και 27% στα στάδια 1, 2, 3 και 4 της ΧΝΝ αντίστοιχα, αντανακλά αδρά και αναλογικά και το μέγεθος του ποσοστού των ασθενών με αυτά τα στάδια στο γενικό πληθυσμό της χώρας μας (με εξαίρεση το στάδιο 1, όπου έγινε κάποια επιλογή και πιθανότατα είναι μεγαλύτερο). Ενδεικτικά, οι περισσότεροι ασθενείς μας ανήκαν στο στάδιο 3 (37%) και το ποσοστό αυτό αναλογικά είναι περίπου ίδιο με το ποσοστό από τη μελέτη NHANES III στο γενικό πληθυσμό των ΗΠΑ, όπου βρέθηκε 4.3% από το συνολικό 11% (5).

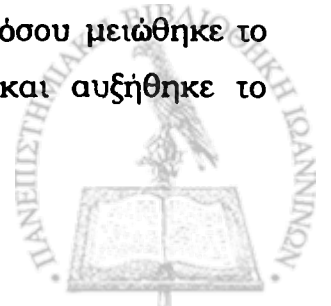
Την τελευταία δεκαετία, η επιδημιολογία της ΚΑΝ στη ΧΝΝ απασχολεί όλο και περισσότερο την κλινική νεφρολογία, επειδή είναι γνωστό ότι περίπου 50% των θανάτων οφείλονται σε καρδιαγγειακά αίτια (48), ενώ ο κίνδυνος καρδιαγγειακού θανάτου σε ασθενείς με τελικό στάδιο ΧΝΝ ηλικίας πάνω από 85, 45-54 και 25-35 χρόνων είναι 5, 65 και 500 φορές μεγαλύτερος συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό (50). Οι ασθενείς με ΧΝΝ, όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή, είναι ασθενείς υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση ΚΑΝ για αρκετούς λόγους, όπως: α) στη ΧΝΝ η επίπτωση των παραγόντων κινδύνου για ανάπτυξη ΚΑΝ είναι μεγαλύτερη, β) η ίδια η ΧΝΝ θεωρείται παράγοντας κινδύνου για ΚΑΝ, γ) οι παράγοντες κινδύνου της ΚΑΝ προάγουν την εξέλιξη της ΧΝΝ προκαλώντας ένα φαύλο κύκλο για την



περαιτέρω ανάπτυξη ΚΑΝ και δ) η παρουσία ΚΑΝ είναι παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη ΧΝΝ (49).

Οι περισσότερες μελέτες που περιέγραψαν το πρόβλημα της ΚΑΝ στη ΧΝΝ και στην ΑΜΚ χρησιμοποίησαν ευρήματα από το υπερηχοκαρδιογράφημα και κυρίως τον LVMI και τη γεωμετρία της καρδιάς (45,50,52,345-347). Σε μία διαχρονική μελέτη από τον Καναδά, οι Parfrey και συν. περιέγραψαν σε 432 ασθενείς με τελικό στάδιο νεφρικής ανεπάρκειας, ότι στην έναρξη της ΑΜΚ μόνο 16% των ασθενών είχαν φυσιολογικά ευρήματα στο υπερηχοκαρδιογράφημα, 41% είχαν συγκεντρική LVH, 28% διάταση της LV και 16% συστολική δυσλειτουργία (52). Σε πιο πρόσφατη μελέτη, σε 103 αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, οι Conic και συν. ανέφεραν παρόμοια ποσοστά, με LVH σε 86% των ασθενών, από τους οποίους 56% με συγκεντρική υπερτροφία, 30% με έκκεντρη υπερτροφία, 7% με συγκεντρική αναδιαμόρφωση (remodeling) και μόνο 7% με φυσιολογικά ευρήματα (347).

Στην παρούσα μελέτη που δεν περιλάμβανε ασθενείς σε στάδιο 5 ΧΝΝ και ΑΜΚ, βρέθηκε ότι 18% είχαν φυσιολογικά ευρήματα, ενώ από τα παθολογικά ευρήματα υπερερούσε η έκκεντρη υπερτροφία που διαπιστώθηκε σε ποσοστό 50% των ασθενών. Από του υπόλοιπους ασθενείς, 28% είχαν ευρήματα συγκεντρικής υπερτροφίας και 4.5% ευρήματα συγκεντρικής αναδιαμόρφωσης, ενώ το ποσοστό της διαστολικής δυσλειτουργίας ήταν μικρότερο (2.3%). Τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν σε σύγκριση με τα ευρήματα των μελετών στην ΑΜΚ, δεδομένου ότι οι η καρδιακή βλάβη και τα υπερηχοκαρδιογραφικά ευρήματα επιδεινώνονται με την εξέλιξη της ΧΝΝ. Ωστόσο, παρόλο που το ένα τρίτο των ασθενών της παρούσας μελέτης ανήκαν σε πρώιμα στάδια της ΧΝΝ (1 και 2) το ποσοστό των ασθενών με φυσιολογικά ευρήματα δεν διέφερε σημαντικά από τις δύο μελέτες των ασθενών σε ΑΜΚ (18% έναντι 16% και 7%) και η διαφορά εντοπίζεται στη βαρύτητα των παθολογικών ευρημάτων. Στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε ότι τα ποσοστά των ασθενών με διαστολική και συστολική δυσλειτουργία ήταν μόλις 15% και 2.4% αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα ποσοστά 69% και 16% στην ΑΜΚ (52). Από την ανάλυση όμως των τιμών του LVMI στα στάδια 1-4 προκύπτει ότι επήλθε μια σημαντική προοδευτική αύξηση κατά 19% από το στάδιο 1 στο στάδιο 4 (140 σε 167 g/m², Πίνακας 15), ενώ με την επιδείνωση της νεφρικής νόσου μειώθηκε το ποσοστό των ασθενών με φυσιολογική καρδιακή γεωμετρία και αυξήθηκε το



ποσοστό των ασθενών που εμφάνιζε συγκεντρική υπερτροφία χωρίς αυτές οι δύο μεταβολές να φτάσουν το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (Σχήμα 9), προφανώς λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών που προκύπτει από την κατανομή των διαφόρων τύπων της γεωμετρίας της καρδιάς στα επιμέρους στάδια 1-4 της ΧΝΝ. Οι Levin και συν. βρήκαν παρόμοια ευρήματα, όπου η LVH αυξάνει προοδευτικά με την επιδείνωση του GFR (348).

Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι οι διαταραχές του μυοκαρδίου εμφανίζονται σε πολύ πρώιμα στάδια της ΧΝΝ σε υψηλά σχετικά ποσοστά και εξελίσσονται προοδευτικά σε βαρύτερες μορφές καρδιακής βλάβης, οι οποίες συνήθως είναι μη αναστρέψιμες στο τελικό στάδιο της ΧΝΝ και οδηγούν μαθηματικά σε γρήγορο θάνατο. Οι Parfrey και συν. έδειξαν ότι η επιβίωση και η καρδιαγγειακή θνητότητα σε ασθενείς σε AMK είχε κλιμακωτή συσχέτιση (step-wise) με τη βαρύτητα των υπερηχοκαρδιογραφικών ευρημάτων στην έναρξη της AMK (52). Η μέση επιβίωση των ασθενών με φυσιολογικά ευρήματα ήταν 66 μήνες, με συγκεντρική υπερτροφία 56 μήνες, με διάταση καρδιάς 48 μήνες και με συστολική δυσλειτουργία 38 μήνες. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από μια σειρά δημοσιεύσεων, οι οποίες έδειξαν ότι η επιβίωση των ασθενών σε AMK έχει μια φθίνουσα πορεία ανάλογα με τον τύπο της LVH με την εξής σειρά: φυσιολογικά ευρήματα < συγκεντρική υπερτροφία < έκκεντρη υπερτροφία (διάταση LV) με φυσιολογική συστολική λειτουργία < συστολική δυσλειτουργία που αντιστοιχεί με ΚΑ (50,52,349- 351).

Ωστόσο, οι γνώσεις για τη φυσική εξέλιξη των σταδίων της ΧΝΝ, πριν την ένταξη στην AMK είναι εξαιρετικά περιορισμένες γιατί τα στάδια αυτά διαδράμουν ασυμπτωματικά, και ειδικά τα πρώιμα στάδια και ασθενείς τέτοιων σταδίων σπανίως παραπέμπονται για εκτίμηση σε Νεφρολογικά Κέντρα. Έτσι, είναι άγνωστο σήμερα τι ποσοστό ασθενών με στάδιο 1 και 2 ΧΝΝ θα καταλήξει σε τελικό στάδιο ΧΝΝ. Στο Southampton της Αγγλίας σε αναδρομική μελέτη 405.000 ατόμων στο γενικό πληθυσμό με sCr >1.7 mg/dL σε χρονικό διάστημα 6 μηνών μόνο 4% κατέληξαν σε θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας (18). Η μελέτη των Go και συν. που συμπεριέλαβε 1.120.295 άτομα με GFR <60 ml/min/1.73m², έδειξε ότι μέσα σε μια πενταετία μόνο ένα μικρό ποσοστό, περίπου 1%, των ατόμων με ήπια προς μέτρια ΧΝΝ κατέληξε σε θεραπεία υποκατάστασης, ενώ το ποσοστό των ασθενών που πέθαναν κυρίως από



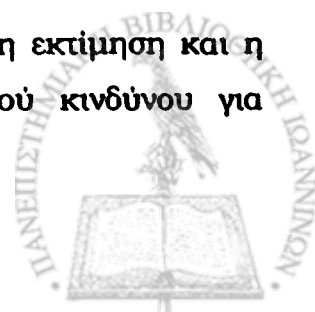
αθηροσκληρωτικές επιπλοκές ήταν πολλαπλάσιο (60). Η μελέτη Kaser Permanente σε 30,000 άτομα με $GFR < 90 \text{ ml/min/1.73m}^2$ έδειξε ότι, μέσα σε μια πενταετία ποσοστό 1.1% 1.3% και 19.9% των ατόμων με στάδιο 2, 3 και 4 αντίστοιχα κατέληξε σε θεραπεία υποκατάστασης, ενώ το ποσοστό των ασθενών που πέθαναν ήταν 19.5%, 24.3% και 45.7% για τα ίδια στάδια (8). Συνεπώς, ο θάνατος είναι πολύ πιο συχνός στους ασθενείς με πρώιμα στάδια ΧΝΝ συγκριτικά με την κατάληξη σε τελικό στάδιο ΧΝΝ.

Οι μελέτες που χρησιμοποίησαν την LVH ως δείκτη της ΚΑΝ σε ασθενείς σε στάδια 1-4 της ΧΝΝ είναι περιορισμένες σε σύγκριση με τις μελέτες στο τελικό στάδιο της ΧΝΝ και στην ΑΜΚ. Οι Paoletti και συν σε σύνολο 244 ασθενών που περιλάμβανε 57 ασθενείς με στάδια ΧΝΝ 1 και 2, και 187 ασθενείς με στάδια ΧΝΝ 3-5 βρήκαν LVH σε ποσοστά 51% και 78% αντίστοιχα (345). Τα ευρήματα αυτά είναι συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα της συχνότητας της LVH στην παρούσα μελέτη στα στάδια 1-4 της ΧΝΝ.

Οι μελέτες των Nardi και Paoletti (345,346) περιέγραψαν έναν αριθμό προγνωστικών δεικτών για τη συσχέτιση μεταξύ GFR και LVH, όπως η ηλικία, η ΑΠ, το εύρος παλμού και η αρτηριακή ακαμψία, η Hb και η πρωτεϊνουρία. Από την ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε ότι ένας αριθμός από τους κλινικούς και εργαστηριακούς παράγοντες πρόβλεψης επηρέασαν σημαντικά την ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών, του $eGFR$ και του LVMI και θα συζητηθούν παρακάτω.

Από τα παραπάνω, γίνεται σαφές ότι η «συμβίωση» της δυσλειτουργίας των νεφρών και της καρδιάς δεν αφορά μόνο τη συχνότητα, αλλά έχει επίπτωση και στην επιβίωση των ασθενών. Ήδη έχει περιγραφεί η αυξημένη θνητότητα από ΚΑΝ των ασθενών με ΧΝΝ και φαίνεται ότι αυτή η συσχέτιση είναι αμφίδρομη. Οι MacLealan και συν. έδειξαν ότι σε 755 ασθενείς που νοσηλεύονταν με ΣΚΑ ή ΧΝΝ σχετιζονταν με αυξημένο κίνδυνο θανάτου κατά 26%, ενώ η ετήσια θνητότητα των ασθενών που είχαν συγχρόνως ΧΝΝ και ΣΚΑ ήταν 45% (73). Σε μία άλλη προοπτική μελέτη, με 372 ασθενείς με ΣΚΑ, βρέθηκε ότι ο κίνδυνος θανάτου στους ασθενείς που είχαν $eGFR < 44 \text{ ml/min/1.73m}^2$ ήταν τρεις φορές αυξημένος συγκριτικά με αυτούς που είχαν $eGFR > 76 \text{ ml/min}$ (74).

Το μήνυμα όλων αυτών των ευρημάτων είναι ότι η έγκαιρη εκτίμηση και η αποτελεσματική θεραπευτική παρέμβαση στις ομάδες υψηλού κινδύνου για



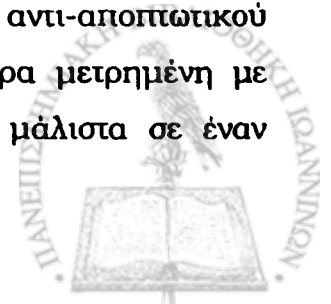
ανάπτυξη καρδιονεφρικής βλάβης μπορεί να εξασφαλίσει αμοιβαίο όφελος για τα δύο όργανα και να βελτιώσει πιθανώς την πρόγνωση και επιβίωση των ασθενών.



Θ.2. Απόπτωση και νεφρική λειτουργία

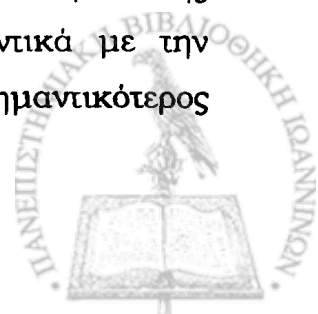
Η ουραιμία έχει συνδεθεί με διαταραχή της λειτουργίας του ανοσολογικού συστήματος. Η δυσλειτουργία της ομοιόστασης του συστήματος έχει προταθεί ότι σχετίζεται άμεσα με παθολογική ρύθμιση της απόπτωσης. Ικανός αριθμός μελετών εκτιμούν το φαινόμενο της απόπτωσης σε ασθενείς σε υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας και παρά τα διφορούμενα αποτελέσματα των ερευνητών σε ό,τι αφορά στην απόπτωση των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος στους ασθενείς αυτούς, αποτελεί πλέον τεκμηριωμένη γνώση ότι η απόπτωση εμπλέκεται στις διαταραχές των ανοσιακών μηχανισμών στους αιμοκαθαρόμενους ασθενείς (176,191). Σήμερα, είναι επιπλέον γνωστό ότι οι διαταραχές της απόπτωσης εμφανίζονται αρκετά νωρίς στην πορεία της ΧΝΝ και ότι το ουραιμικό περιβάλλον *per se* ευθύνεται ως ένα βαθμό για το φαινόμενο, χωρίς όμως να είναι γνωστή η χρονική στιγμή που εμφανίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών μηχανισμών, ούτε και οι πιθανές συνέπειες. Η μελέτη της συμπεριφοράς συγκεκριμένων δεικτών απόπτωσης στα τέσσερα στάδια της ΧΝΝ και η πιθανή συσχέτιση αυτών με τη νεφρική λειτουργία ήταν μέσα τους σκοπούς της παρούσας μελέτης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η απόπτωση αυξήθηκε σταδιακά με την εξέλιξη των σταδίων της ΧΝΝ, αφού βρέθηκε να μειώνεται σημαντικά η έκφραση του αντι-αποπτωτικού ογκογονιδίου Bcl-2 στα μονοπύρρηνα, ενώ αντίθετα, αλλά παράλληλα με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας αυξήθηκαν τα επίπεδα των διαλυτών μορφών των αποπτωτικών μορίων Fas και TNF-α.

Από όσο είναι γνωστό, στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες μελέτες, οι οποίες συμπεριλαμβάνουν μικρό αλλά ικανό αριθμό ασθενών με ΧΝΝ σταδίου 3-5 πριν την υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας ώστε να μπορούν να διαπιστώσουν ότι κάποιοι από τους δείκτες της απόπτωσης σχετίζονται με τα επίπεδα της νεφρικής λειτουργίας και πιο συγκεκριμένα, ότι η απόπτωση αυξάνεται παράλληλα με την επιδείνωσή της (141,185,187,189,352). Σε καμία από τις παραπάνω μελέτες δεν χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του Bcl-2 των μονοπύρρηνων του περιφερικού αίματος ως δείκτης απόπτωσης. Έτσι, είναι η πρώτη φορά που βρίσκεται ότι η *in vivo* ποσοτική έκφραση του αντι-αποπτωτικού ογκογονιδίου τόσο στα λεμφοκύτταρα όσο και στα μονοκύτταρα μετρημένη με κυτταρομετρία ροής σχετίζεται αντίστροφα με τον eGFR και μάλιστα σε έναν



ικανοποιητικό αριθμό ασθενών με ΧΝΝ 1-4. Η οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών κατέχει κριτικό ρόλο στον έλεγχο της απόπτωσης και από το ισοζύγιο της έκφρασης των αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών αυτών μορίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό η απόφαση για την επιβίωση ή όχι του κυττάρου (116). Στην πρώτη υπο-οικογένεια της υπερ-οικογένειας αυτής ανήκει και το Bcl-2 μία από τις κυριότερες δράσεις του οποίου είναι η αποτροπή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c προς το κυτταρόπλασμα και κατά επέκταση η αναστολή του σχηματισμού του αποπτωσώματος που ενεργοποιεί την CASP-9 (124). Υπάρχουν αποτελέσματα μελετών που δείχνουν ότι υπάρχει μεταβολή της έκφρασης του Bcl-2 *in vitro* στα πολυμορφοπύρρηνα και στα λεμφοκύτταρα ασθενών σε AMK και ασθενών με ΧΝΝ συγκριτικά με τα υγιή άτομα που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου, η οποία μεταβολή σχετίζεται πιθανώς με τις ανοσολογικές διαταραχές σε αυτούς τους ασθενείς αλλά σε καμία από αυτές δεν συσχετίζεται η βαρύτητα της νεφρικής δυσλειτουργίας με το ρυθμό της απόπτωσης των υπό μελέτη κυττάρων (186,190). Η αιτία της μείωσης της έκφρασης του Bcl-2 από τα μονοπύρρηνα που περιγράψαμε δεν είναι γνωστή όπως δεν είναι γνωστή και η κλινική σημασία του φαινομένου. Επίσης, δεν είναι γνωστή η τύχη των κυττάρων που έδειξαν ελαττωμένη έκφραση του ογκογονιδίου, αν δηλαδή θα αποπέσουν τελικά ή όχι, ή αν αντίθετα θα νεκρωθούν μιας και είναι απαραίτητη η χρήση τουλάχιστον τριών διαφορετικών μεθόδων μελέτης της απόπτωσης σε κυτταρικό επίπεδο ώστε να διασφαλιστεί ότι το συγκεκριμένο κύτταρο αποπίπτει. Το αποτέλεσμα της μείωσης του Bcl-2 αναδεικνύει απλώς μία διαταραχή της απόπτωσης στη ΧΝΝ η οποία ίσως παρακολουθεί ως προς τη βαρύτητα την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας και αυτό ενισχύεται και από τη σταδιακή αύξηση των διαλυτών μορφών των Fas και TNF-α χωρίς βέβαια να μπορούν να συνδεθούν αιτιολογικά αυτά τα αποτελέσματα.

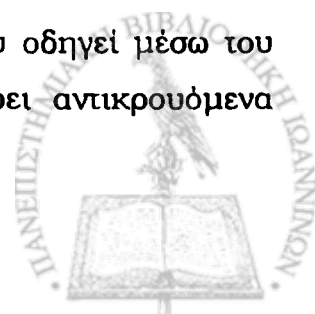
Το αντιγόνο Fas είναι ένας υποδοχέας της κυτταρικής επιφάνειας, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των TNF υποδοχέων που μέσω της σύνδεσής του με το φυσικό συνδέτη του, τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη FasL, μεταδίδει αποπτωτικά σήματα. Εκτός από τις διαμεμβρανικές μορφές, διαλυτές μορφές των δύο μορίων έχουν ανιχνευτεί, οι οποίες πιθανολογείται ότι λειτουργούν με τρόπο παρακρινή ή αυτοκρινή στη ρύθμιση της απόπτωσης (353). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, η διαλυτή μορφή του Fas αυξήθηκε σημαντικά με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας. Ο eGFR αναδείχθηκε ο σημαντικότερος



παράγοντας πρόβλεψης των επιπέδων του Fas και ο μοναδικός παράγοντας που επηρέασε σημαντικά τη συσχέτιση αυτήν ήταν τα επίπεδα ορού των VCAM-1 ενισχύοντας τη θεωρία της αλληλεπίδρασης απόπτωσης και φλεγμονής ήδη από τα αρχικά στάδια της ΧΝΝ. Αντίθετα, τα επίπεδα της διαλυτής μορφής του FasL δεν διέφεραν μεταξύ των τεσσάρων σταδίων της ΧΝΝ και επιπλέον δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ των Fas-FasL. Τα αποτελέσματα έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα δύο άλλων ερευνητικών ομάδων, οι οποίες έδειξαν ότι τα επίπεδα του διαλυτού Fas αυξάνονται συνακόλουθα με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας, ανεξάρτητα από την πρωτοπαθή νεφρική νόσο και χωρίς να αντανakλούν βλάβη σε επίπεδο νεφρικού ιστού (114,352). Επιπλέον, η μία εκ των δύο ομάδων έδειξε ότι τα επίπεδα του FasL δεν σχετίζονται ούτε με τη νεφρική λειτουργία αλλά ούτε και με τα επίπεδα του Fas. Πιθανές ερμηνείες για τη μη μεταβολή των επιπέδων του FasL, όπως φάνηκε και στην παρούσα μελέτη, μπορεί να είναι το γεγονός ότι το διαλυτό FasL πιθανά να συνδέεται με τους κυτταρικούς Fas υποδοχείς του και έτσι να μην αθροίζεται στον ορό ή ίσως το ότι η μορφή αυτή είναι πιο ασταθής στο ουραιμικό περιβάλλον (352). Όσον αφορά στη συμπεριφορά του Fas, η ερμηνεία που δίδεται από τους ερευνητές και που ενισχύεται και από τα αποτελέσματά μας, είναι ότι η αυξημένη συγκέντρωση της διαλυτής μορφής του Fas στον ορό των ασθενών, πιθανά να έχει δράση προστατευτική έναντι των καταστροφικών συνεπειών που μπορεί να έχει η διαλυτή μορφή του FasL παρεμποδίζοντας έτσι τη Fas-επαγομένη απόπτωση.

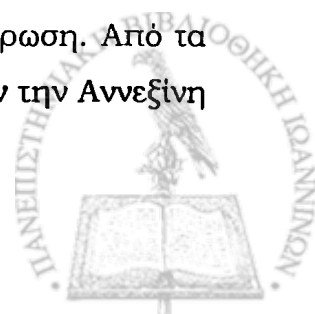
Ο TNF-α είναι μία κυττοκίνη που συμμετέχει στη συστηματική φλεγμονή και στην αντίδραση οξείας φάσης με αρχικό ρόλο τη ρύθμιση των ανοσοκυττάρων. Εκτός από αυτό όμως, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, προκαλεί απόπτωση μέσω της σύνδεσής του με τους δύο υποδοχείς του TNF-R1 και TNF-R2. Από αυτούς ο TNF-R1 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς και μπορεί να ενεργοποιηθεί πλήρως και από τις δύο μορφές του TNF-α, τη συνδεδεμένη στην κυτταρική επιφάνεια και τη διαλυτή τριμερή μορφή, την οποία και μετρήσαμε για της ανάγκες της παρούσας μελέτης.

Ο δεύτερος υποδοχέας TNF-R2 ανευρίσκεται μόνο στα ανοσοκύτταρα, απαντάει μόνο στη συνδεδεμένη μορφή του TNF-α και ο ρόλος του είναι πιθανά υποεκτιμημένος. Η σύνδεση του TNF-α με τους υποδοχείς του οδηγεί μέσω του TNF-R1 σε κυτταρική απόπτωση. Ο TNF-α μπορεί να εγείρει αντικρουόμενα



σήματα, τόσο για τα μονοπάτια επιβίωσης, όσο και για τα αποπτωτικά μονοπάτια μέσω των δύο υποδοχέων του και ο ρόλος του είναι ακόμα αρκετά ασαφής όσον αφορά στην απόπτωση (337). Σύμφωνα με τα παρόντα αποτελέσματα, τα επίπεδα της διαλυτής μορφής του TNF-α αυξήθηκαν σημαντικά με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας και ο eGFR βρέθηκε να καθορίζει τα επίπεδα του σε ποσοστό 25% ($\beta = -0.253$, $p = 0.001$). Άλλοι παράγοντες, οι οποίοι βρέθηκαν να διαμορφώνουν τα επίπεδα του TNF-α και να επηρεάζουν σημαντικά τη συσχέτισή του με το eGFR στη μέθοδο της πολλαπλής παλινδρόμησης ήταν τα επίπεδα των VCAM-1 και ο δείκτης BMI, οι οποίοι βρέθηκε ότι σχετίζονται θετικά με τον TNF-α. Αυτές οι συσχετίσεις μπορούν ίσως να ερμηνευτούν από τα όσα είναι γνωστά μέχρι σήμερα για τις πολλαπλές και περίπλοκες αλληλεπιδράσεις του TNF-α με πληθώρα άλλων φλεγμονωδών δεικτών και δεικτών βλάβης ενδοθηλίου, ιδιαίτερα βέβαια με τις IL-1 και IL-6. Επιπλέον, όσον αφορά στο BMI είναι γνωστό ότι τα λιπώδη κύτταρα παράγουν έναν αριθμό βιολογικά ενεργών μορίων μέσα στα οποία συμπεριλαμβάνεται και ο TNF-α (354). Δεδομένου ότι οι ασθενείς της μελέτης σε ένα ποσοστό 75% είχαν παθολογικό BMI (ποσοστά υπέρβαρων και παχύσαρκων 36% και 39% αντίστοιχα στο σύνολο των 229 ασθενών), χωρίς όμως να διαφέρει η τιμή του BMI μεταξύ των τεσσάρων σταδίων θα μπορούσε να υποθεθεί ότι το γεγονός ευθύνεται μερικώς για το σημαντικό ποσοστό, στο οποίο ο BMI καθορίζει τα επίπεδα του TNF-α ανεξάρτητα από την τιμή του eGFR που ήταν ο κυριότερος παράγοντας πρόβλεψης. Τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με εκείνα άλλων μελετών, οι οποίες έδειξαν ότι τα επίπεδα του TNF-α είναι αυξημένα στους ασθενείς σε AMK και σε ασθενείς με XNN πριν την AMK συγκριτικά με το δείγμα των υγιών ατόμων (192,329). Οι Witko-Sarsat και συν. έχουν βρει κατά αναλογία με τα παρόντα αποτελέσματα και συσχέτιση των επιπέδων της νεφρικής λειτουργίας των ασθενών με XNN με τα επίπεδα του TNF-α (308).

Εκμεταλλεούμενοι μία από τις μορφολογικές μεταβολές των αποπτωτικών κυττάρων, δηλαδή την ανακατανομή των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης χρησιμοποιήσαμε το συνδυασμό Αννεξίνης V και PI προκειμένου να διακρίνουμε τα μη αποπτωτικά μονοπύρηννα, από τα πρώιμα αποπτωτικά μονοπύρηννα με κυτταρομετρία ροής γνωρίζοντας ότι η μέθοδος δεν μπορεί να διακρίνει αν τα κύτταρα Αννεξίνη V θετικά/PI θετικά έχουν υποστεί απόπτωση ή νέκρωση. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι τα ποσοστά των μονοπύρηννων που συνέδεαν την Αννεξίνη



V δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων σταδίων της ΧΝΝ. Υπάρχουν κάποιες μελέτες που αναφέρουν αυξημένο αριθμό αποπτωτικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα ασθενών σε ΑΜΚ και με ΧΝΝ πριν την ένταξη σε υποκατάσταση σε σχέση με υγιή άτομα, τα οποία αποπτωτικά κύτταρα εντοπίστηκαν με τη χρήση της Αννεξίνης V (191,192). Στην παρούσα μελέτη βέβαια, δεν υπήρχαν ούτε αιμοκαθαιρόμενοι αλλά ούτε υγιής πληθυσμός ελέγχου ώστε να υπάρχουν μεγάλες διαφορές όσον αφορά στην έκφραση της Αννεξίνης V στην επιφάνεια των μονοπύρηνων. Βέβαια, τα αποτελέσματα των Martin-Malo και συν. έρχονται να συμπεράνουν ότι η ουραιμία *per se* ευθύνεται ως ένα βαθμό για την αύξηση της απόπτωσης, αφού με μικρό αριθμό ασθενών πριν την ΑΜΚ (16 ασθενείς με $Clcr < 20 \text{ ml/min/1.73m}^2$) κατόρθωσαν να αποδείξουν εκτιμώντας την έκφραση της Αννεξίνης V ότι ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων αυξάνει με την επιδείνωση της $Clcr$ (189).

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθούν κάποιιοι περιορισμοί της μελέτης: ένας από αυτούς ήταν το γεγονός ότι το δείγμα των ασθενών ιδανικά θα μπορούσε να είναι και μεγαλύτερο και η κατανομή των ασθενών στα τέσσερα στάδια της ΧΝΝ δεν ήταν ισότιμη. Επίσης, η μελέτη ήταν διαστρωματική και μπορεί να αναδείξει μόνο συσχέτιση και όχι αιτιολογική σχέση μεταξύ των μελετημένων παραμέτρων. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στη μελέτη της απόπτωσης *in vivo*, αυτό είναι πολύ δύσκολο να γίνει τεχνικά αφού τα αποπτωτικά κύτταρα απομακρύνονται ταχύτατα από τα γειτονικά φαγοκύτταρα και επιπλέον η ιστική κατανομή των δεικτών απόπτωσης πιθανά να αντανakλά καλύτερα την νεφρική βλάβη από τις διαλυτές μορφές που εκτιμήσαμε. Παρόλα αυτά, δείχθηκε αύξηση της απόπτωσης με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας μέσω τριών διαφορετικών δεικτών της, την έκφραση του Bcl-2, τα επίπεδα των διαλυτών μορφών του Fas και TNF-α στηρίζοντας τη θεωρία ότι πιθανώς η ουραιμία *per se* ευθύνεται ως ένα βαθμό για το φαινόμενο αυτό. Βέβαια, η βιολογική σημασία των εκτιμώμενων δεικτών στο περιφερικό αίμα των ασθενών στα διάφορα στάδια της ΧΝΝ παραμένει αδιευκρίνιστη.

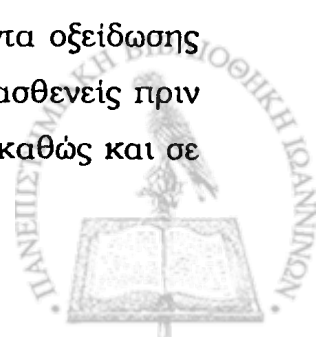


Θ.3. ΟΣ και νεφρική λειτουργία

Οι παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου θεωρούνται ότι κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην εμφάνιση της αρχικής νεφρικής και καρδιαγγειακής βλάβης στο γενικό πληθυσμό. Ωστόσο, όλο και περισσότερες μελέτες αναδεικνύουν τους μη παραδοσιακούς παράγοντες μεταξύ των οποίων και το ΟΣ ως εξαιρετικά σημαντικούς στην πορεία της επιδεινούμενης νεφρικής λειτουργίας (53). Ένας από τους σκοπούς της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της δραστηριότητας του ΟΣ σε ασθενείς με ΧΝΝ σταδίου 1 έως 4. Από τα αποτελέσματά μας έγινε φανερό ότι το ΟΣ εμφανίζεται πρώιμα στην εξέλιξη της ΧΝΝ, αφού τα επίπεδα των 8-epiPGF2a αυξάνονται με την επιδείνωση νεφρικής λειτουργίας και επιπλέον ο eGFR αποτελεί τον πιο σημαντικό από τους παράγοντες καθορισμού των επιπέδων των 8-epiPGF2a. Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι οι μεταβολές των καρβονυλίων και της ΤΑΣ δεν άγγιξαν το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας, παρόλα αυτά είναι αξιοσημείωτη η τάση μεταβολής που έδειξαν με την πρόοδο των σταδίων της ΧΝΝ, με τα μεν καρβονύλια να αυξάνουν και τη δε ΤΑΣ να μειώνεται.

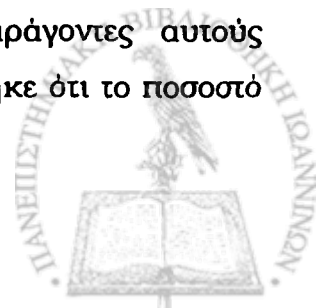
Τα τελευταία χρόνια, σε σειρά δημοσιεύσεων αναφέρεται ότι η ουραιμία σχετίζεται με αυξημένη δραστηριότητα του ΟΣ γενικά και ανεξάρτητα από την πρωτοπαθή νεφρική νόσο (83,301). Η έναρξη θεραπείας με ΑΜΚ φαίνεται ότι είναι αναποτελεσματική στο να ελέγξει τη φλεγμονή και το ΟΣ στους ασθενείς αυτούς (302) και επιπλέον η θεραπεία με ΑΜΚ ή ΠΚ συντηρεί τα αυξημένα επίπεδα του ΟΣ και συμβάλλει στην ελάττωση των αντιοξειδωτικών εφεδρειών (303). Ήδη αναφέρθηκαν ευρήματα σύμφωνα με τα οποία τα επίπεδα των 8-epiPGF2a του πλάσματος είναι δύο με τέσσερις φορές υψηλότερα στους ασθενείς υπό ΑΜΚ σε σχέση με υγιή άτομα του ίδιου φύλου και της ίδιας ηλικίας και ότι σχετίζονται με τα επίπεδα της CRP (312,313) της Alb και της απογλοβίνης (303).

Παρόλα αυτά, ο αριθμός των μελετών με σκοπό τη μελέτη της δραστηριότητας του ΟΣ και πιο συγκεκριμένα την οξείδωση των λιπιδίων στα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ είναι περιορισμένος και περιέχει αντιφατικά αποτελέσματα (282,306,307,309). Όσον αφορά στη συσχέτιση μεταξύ ΟΣ και του GFR των ασθενών σε διάφορα στάδια ΧΝΝ οι μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία ήταν μόλις 3. Συγκεκριμένα, οι Witko-Sarsat και συν. μελέτησαν τα τελικά προϊόντα οξείδωσης των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων, τη MDA και την PGx σε 162 ασθενείς πριν την ΑΜΚ, με C_{cr} μεταξύ 80 έως και κάτω από 20 ml/min/1.73m², καθώς και σε



υγιή άτομα. Βρέθηκε ότι τα τελικά προϊόντα οξείδωσης των πρωτεϊνών ήταν αυξημένα σε σχέση με τους υγιείς και σχετιζόνταν αρνητικά με την C₁c_r (308). Οι Terawaki και συν. βρήκαν αυξημένα επίπεδα οξειδωμένης sAlb σε 55 ασθενείς πριν την AMK με μέση τιμή C₁c_r 40 ml/min/1.73m². Στα αποτελέσματά τους φάνηκε σταδιακή αύξηση της οξειδωμένης sAlb με την επιδείνωση του GFR (307). Πιο πρόσφατα, σε 159 ασθενείς με ΧΝΝ σταδίου 1-5, οι Yilmaz και συν. έδειξαν ότι τα επίπεδα δεικτών ΟΣ όπως η MDA και η ox-LDL αυξάνονται, ενώ οι αντιοξειδωτικές ουσίες όπως η SOD, η GPx, το σελήνιο του πλάσματος, ο ψευδάργυρος και ο χαλκός των ερυθροκυττάρων ελαττώνονται, καθώς το στάδιο της ΧΝΝ επιδεινώνεται (309). Στην παρούσα μελέτη, αυτό που δείχθηκε καθαρά ήταν μία ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των eGFR και 8-epiPGF2a, εύρημα που είναι σε συμφωνία με τις τρεις αυτές μελέτες. Βέβαια, πρέπει να σημειωθεί ότι η κατανομή των ασθενών στη μελέτη μας ήταν πιο αντιπροσωπευτική των τεσσάρων σταδίων 1 έως 4 της ΧΝΝ συγκριτικά με τις μελέτες των Witko-Sarsat και Terawaki, ενώ ήταν παρόμοια με τη μελέτη των Yilmaz και συνεργατών.

Είναι τεκμηριωμένο, ότι διάφοροι παράγοντες, εκτός από τον GFR, συμβάλλουν στην αύξηση του ΟΣ στους ασθενείς με ΧΝΝ, όπως η μεγάλη ηλικία, το αυξημένο σωματικό βάρος, ο ΣΔ, η δυσλιπιδαιμία, η χρόνια φλεγμονή, η υποθρεψία, η ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου και παράγοντες που σχετίζονται με την AMK *per se* (340,355). Αντίθετα, από μικρό αριθμό μελετών έχει φανεί ότι η λήψη διαφόρων φαρμάκων, όπως των στατινών, σχετίστηκε με χαμηλότερα επίπεδα ΟΣ (306) και ακόμη περισσότερο η χορήγηση αντι-οξειδωτικών, όπως η βιταμίνη Ε και η Ν-ακετυλοκυστεΐνη οδήγησε σε μείωση των καρδιαγγειακών επεισοδίων σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς (356,357). Τα 8-epiPGF2a έχουν προταθεί ως αξιόπιστος δείκτης ΟΣ στην ουραιμία (340). Στην παρούσα μελέτη, η ανάλυση παλινδρόμησης έδειξε ότι ο eGFR αποτελεί τον πιο σημαντικό από τους παράγοντες που καθορίζουν τα επίπεδα των 8-epiPGF2a ($\beta = -0.302$, 95% CI = -0.549 έως -0.194 , $p < 0.001$). Από τους κλινικούς και εργαστηριακούς παράγοντες που επιλέχθηκαν ως confounders στο προσαρμοσμένο μοντέλο φάνηκε ότι η συσχέτιση των δύο μεταβλητών επηρεάστηκε σημαντικά από την ηλικία, το BMI, την sAlb, την Hb, τα επίπεδα των VCAM-1 και την τιμή του Fas (Πίνακας 21). Παρόλα αυτά, όταν ελέγχθηκε το ποσοστό που ο καθένας από τους παράγοντες αυτούς διαμόρφωνε μεμονωμένα τα επίπεδα των 8-epiPGF2a διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό



αυτό ήταν σε όλες τις περιπτώσεις μικρότερο από εκείνο του eGFR, ενώ η Hb και ο Fas δεν είχαν καμία πρωτογενή επίδραση στη διαμόρφωση των επιπέδων των 8-eriPGF2a (Πίνακας 22). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε ίσως να αποδοθεί μερικώς στο ότι τα επίπεδα των παραμέτρων αυτών εξαρτιόνταν άμεσα από την ίδια τη νεφρική λειτουργία, η οποία και τα διαμόρφωνε σε ένα μεγάλο ποσοστό (το ποσοστό για την Hb είναι 34% και για τον Fas είναι 52.4%) και άρα η επίδρασή τους στη συσχέτιση των eGFR με τα 8-eriPGF2a ίσως ήταν ένα επιφανόμενο. Βέβαια, δεν θα μπορούσε να παραβλεφθεί το γεγονός ότι και τα επίπεδα της sAlb, όπως και των VCAM-1 καθορίζονταν και αυτά σε ένα ποσοστό περίπου 30%-35% από τα επίπεδα της νεφρικής λειτουργίας και οι ότι οι δύο αυτοί παράγοντες μετέβαλαν σημαντικά τη συσχέτιση του eGFR με τα επίπεδα των 8-eriPGF2a. Θα μπορούσε όμως να υποτεθεί ότι το ΟΣ και συγκεκριμένα ο δείκτης των 8-eriPGF2a εμφανίζει ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τη φλεγμονή και τη διαταραχή θρέψης, εκφρασμένες με τους αντίστοιχους δείκτες από ότι με την αναιμία και την απόπτωση. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει πληθώρα μελετών που στηρίζουν τη στενή σχέση μεταξύ ΟΣ, φλεγμονής και διαταραχής της θρέψης στην ουραιμία (310,316). Βέβαια, το πρόβλημα δεν υφίσταται για τις παραμέτρους της ηλικίας και του BMI, αφού η μεν ηλικία δεν σχετίζεται αιτιολογικά με το eGFR, ο δε BMI δεν βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων σταδίων της ΧΝΝ.

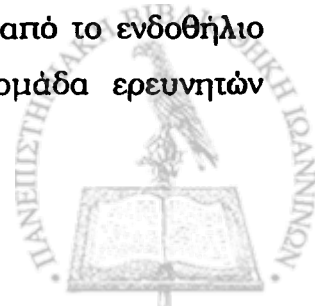
Στο σημείο αυτό θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθούν τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σε 87 ασθενείς, στους οποίους μετρήθηκαν τα επίπεδα των 8-eriPGF2a, από το σύνολο των 172 ασθενών που συμπεριλήφθηκαν τελικά, σύμφωνα με τα οποία ο eGFR ήταν ο μοναδικός παράγοντας καθορισμού των επιπέδων των 8-eriPGF2a, αφού η ισχυρή αυτή συσχέτιση δεν επηρεάστηκε από κανένα από τους κλινικούς ή εργαστηριακούς παράγοντες πρόβλεψης (358). Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων θα μπορούσε να αποδοθεί μερικώς στο διαφορετικό αριθμό των ασθενών, στα διαφορετικά χαρακτηριστικά των ασθενών και στη διαφορετική κατανομή των ασθενών στα στάδια της ΧΝΝ. Επιπλέον, αναδεικνύονται μέσω αυτής της διαφοράς κάποιοι περιορισμοί των μελετών, όπως ο μικρός σχετικά αριθμός ασθενών που αφορά κυρίως στην προκαταρκτική μελέτη, καθώς και η μη ισότιμη κατανομή των ασθενών στα στάδια της ΧΝΝ που αφορά στην παρούσα μελέτη. Συγκριτικά στοιχεία από άλλες μελέτες που να θίγουν το θέμα αυτό, δηλαδή άλλων



παραμέτρων που μπορεί να εξηγήσουν τα επίπεδα του ΟΣ δεν υπάρχουν με εξαίρεση τη μελέτη των Terawaki και συν., οι οποίοι με ανάλυση παλινδρόμησης, διαπίστωσαν ότι η αύξηση των επιπέδων της ολικής HNA (ανθρώπινη μερκαπτοαλβουμίνη) με την επιδείνωση της ΧΝΝ εξηγούνταν, εκτός από την sCr και από το UA και των επιπέδων του κλάσματος HNA-2 από την sCr, το sMg και την ηλικία (307). Στη μελέτη των Yilmaz και συν. δεν υπήρχε τέτοιο πρόβλημα αφού είχαν αποκλειστεί οι καπνιστές, οι ασθενείς με ΣΔ, με ΚΑΝ, κανένας δεν λάμβανε στατίνη ή αποκλειστή του άξονα ΡΑΑ (ρενίνης-αγγειοτασίνης-αλδοστερόνης) και τα χαρακτηριστικά των ασθενών δεν διέφεραν μεταξύ των 5 ομάδων (309).

Στην παρούσα μελέτη, εκτός από την ισομορφή των 8-epiPGF2a εκτιμήθηκαν και τα επίπεδα της ox-LDL ως δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης, τα οποία όμως δεν ανέδειξαν συσχέτιση με το eGFR. Είναι πλέον τεκμηριωμένος ο ρόλος της λιπιδικής υπεροξειδωσης στην παθοφυσιολογία του σχηματισμού των αθηρωματικών πλακών και της αρτηριοσκλήρυνσης που οδηγούν στην προαγωγή της ΚΑΝ, καθώς και η συμμετοχή της ox-LDL στην παθογένεια της αθηρογένεσης (251). Η LDL είναι πιθανότερο να οξειδωθεί σε μία φλεγμονώδη κατάσταση και ως τέτοια θεωρείται η ΧΝΝ, αφού τα επίπεδα της HDL, καθώς και η ικανότητά της να προστατεύει τη LDL είναι ελαττωμένα ως συνέπεια, αφενός της μειωμένης της παραγωγής από το ήπαρ, καθώς και της αυξημένης δραστηριότητας της μυελοϋπεροξειδάσης (359).

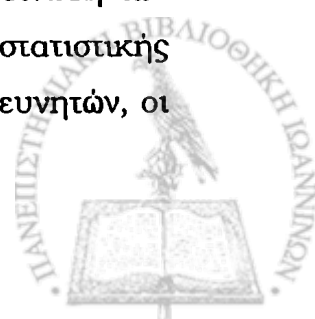
Τα αποτελέσματα μελετών που αφορούν σε ασθενείς διαφόρων σταδίων ΧΝΝ και μελετούν την οξείδωση της LDL σε σχέση με τα επίπεδα της νεφρικής λειτουργίας, την ενδοθηλιακή αγγειακή βλάβη και κατά επέκταση τις καρδιαγγειακές επιπλοκές είναι αντιφατικά. Οι Bolton και συν. βρήκαν ότι τα επίπεδα της ox-LDL ήταν παρόμοια σε όλες τις υπο-ομάδες ασθενών (ασθενείς σε ΑΜΚ, ασθενείς με ΧΝΝ πριν την ΑΜΚ και ασθενείς με σταθερή στηθάγχη χωρίς νεφρική δυσλειτουργία) και υγιών ατόμων που μελέτησαν, ενώ τα αυτο-αντισώματα έναντι της ox-LDL ήταν αυξημένα στους προ-ΑΜΚ ασθενείς και σε αυτούς με στηθάγχη (360). Η μελέτη των Yilmaz και συν. αντίθετα, έρχεται να ενισχύσει τη θεωρία ότι η οξείδωση της LDL αυξάνει στην ουραιμία, αφού διαπίστωσε ότι η ox-LDL αυξάνονταν με την επιδείνωση του σταδίου της ΧΝΝ και επιπλέον τα επίπεδά της ήταν ανεξάρτητη παράμετρος καθορισμού της εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολής της βραχιονίου αρτηρίας (309). Μια άλλη ομάδα ερευνητών



μελέτησαν 30 ασθενείς σε θεραπεία υποκατάστασης (15 σε AMK, 15 σε ΠΚ), 15 ασθενείς με XNN σταδίου 4-5 και 15 υγιή άτομα, στους οποίους μέτρησαν μεταξύ των άλλων παραμέτρων και τα επίπεδα της ox-LDL και βρήκαν ότι ήταν σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς σε AMK συγκριτικά με τους υπόλοιπους ασθενείς και τους υγιείς (361). Οι ερευνητές στηρίζουν το εύρημά τους στο γεγονός ότι η AMK μπορεί να μεταβάλλει τη σύνθεση της αθηρωματικής πλάκας με συνέπεια να γίνεται πιο ευάλωτη σε ρήξη, και όταν αυτό συμβεί, να αυξάνονται τα επίπεδα της ox-LDL, η οποία ανευρίσκεται σε αφθονία στις αθηρωματικές πλάκες ασθενών σε AMK (362).

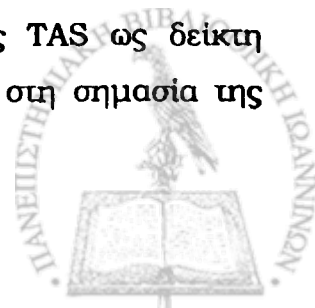
Στο σημείο αυτό κρίνεται σκόπιμο να γίνει αναφορά και στη μέθοδο προσδιορισμού της ox-LDL με ELISA, η οποία χρησιμοποιεί μονοκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο τύπο της ox-LDL ή ένα συγκεκριμένο επίτοπο της ox-LDL και η οποία χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης. Πρόσφατη βιβλιογραφία διατυπώνει σκεπτικισμό για την ειδικότητα της μεθόδου στον προσδιορισμό της ox-LDL στο πλάσμα αφού φάνηκε ότι τα επίπεδα της ox-LDL εξαρτώνται σε σημαντικό βαθμό από την LDL χοληστερόλη την οποία και ανιχνεύει στο πλάσμα καθώς και τα επίπεδα της apoB-100 (363). Το πιθανολογούμενο μειονέκτημα της μεθόδου που σύμφωνα με τους ερευνητές θα πρέπει να διερευνηθεί και με άλλες μελέτες ίσως εξηγεί ως ένα βαθμό και το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης που δεν ανέδειξε συσχέτιση μεταξύ της βαρύτητας της νεφρικής βλάβης και των επιπέδων της ox-LDL.

Οι πρωτεΐνες αποτελούν πολύ σημαντικό στόχο των ελευθέρων ριζών, ενώ οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου μπορούν να τροποποιήσουν με διαφορετικούς τρόπους τις πρωτεΐνες, όπως η νιτροσουλίωση τους, η κλωρίωσή τους, καθώς και η καρβονυλίωσή τους (83). Στην τελευταία περίπτωση, οι ελεύθερες ρίζες μετατρέπουν τις πλάγιες αλυσίδες των ευαίσθητων κυρίως καταλοίπων λυσίνης, αργινίνης, προλίνης και ιστιδίνης, σε ελεύθερα καρβονύλια, τα οποία μπορούν να ανιχνευτούν με ευκολία. Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες, οι οποίες επελέγησαν ως βιολογικός δείκτης του ΟΣ λόγω του γρήγορου σχηματισμού τους και της σταθερότητας τους. Βρέθηκε ότι τα επίπεδα των καρβονυλίων εμφάνισαν σαφή αυξητική τάση με την επιδείνωση των σταδίων της XNN, η οποία όμως δεν έφτασε τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας. Τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με αυτά άλλων ερευνητών, οι



οποίοι διαπίστωσαν αυξημένα επίπεδα καρβονυλίων σε ασθενείς με ΧΝΝ πριν την ΑΜΚ και σε ασθενείς σε ΑΜΚ συγκριτικά με τους υγιείς, αλλά δεν μπόρεσαν ούτε αυτοί να αναδείξουν συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των καρβονυλίων και του GFR πιθανότατα λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών με ΧΝΝ που συμπεριέλαβαν στις μελέτες τους, ενώ μία δεύτερη πιθανή ερμηνεία που παραθέτουν είναι ο μηχανισμός της απομάκρυνσης των δεικτών αυτών που μπορεί να γίνεται κυρίως μέσω σωληναριακού μεταβολισμού παρά μέσω σπειραματικής διήθησης (305,306).

Κατά πόσο ένα όργανο ή συστήματα οργάνων υπόκεινται σε ΟΣ είναι αποτέλεσμα της ολικής ισορροπίας μεταξύ παραγόντων με οξειδωτικές δράσεις και αμυντικών αντιοξειδωτικών συστημάτων, ενζυμικών και μη ενζυμικών (231). Χρησιμοποιήθηκε η ΤΑΣ προκειμένου να εκτιμηθούν οι αντιοξειδωτικές εφεδρείες των ασθενών. Διαπιστώθηκε σταδιακή μείωση των επιπέδων της ΤΑΣ με την πρόοδο των σταδίων της ΧΝΝ όμως η μεταβολή μεταξύ των σταδίων δεν ήταν σημαντική και η ΤΑΣ δεν βρέθηκε να σχετίζεται με τον eGFR. Η σταδιακή, μικρή μείωση των επιπέδων της ΤΑΣ που παρατηρήθηκε ήταν σε συμφωνία με αποτελέσματα άλλων μελετών, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μάλλον πιο αξιόπιστοι δείκτες εκτίμησης της αντι-οξειδωτικής κατάστασης, όπως οι αναχθείσες θειόλες, η υπεροξειδική δισμουτάση των ερυθροκυττάρων, η PGx και στις οποίες φάνηκε ότι οι αντιοξειδωτικές εφεδρείες μειώνονται με την επιδείνωση της ουραιμίας (83,305,307,309). Η επιλογή της ΤΑΣ δεν αποδείχθηκε επιτυχής αφού πρέπει να αναφερθεί ότι το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης έρχεται σε πλήρη αντίθεση με το προκαταρκτικό αποτέλεσμα, στο οποίο είχαμε καταλήξει όταν μετρήθηκε η ΤΑΣ σε 87 ασθενείς και σύμφωνα με το οποίο τα επίπεδα της ΤΑΣ αυξάνονταν σημαντικά με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας (358). Βέβαια, η ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης είχε δείξει ότι στη διαμόρφωση των επιπέδων της ΤΑΣ συμμετείχαν αρκετοί άλλοι παράγοντες εκτός από τον eGFR και κυρίως τα επίπεδα του sUA, με το οποίο βρέθηκε να έχει ισχυρή συσχέτιση. Την ίδια ισχυρή συσχέτιση εξακολουθεί να έχει και στην παρούσα μελέτη, παρά το ότι σε αυτήν την περίπτωση τα επίπεδα μειώνονται. Σε αυτό μπορεί να συνέβαλε και ο διαφορετικός πληθυσμός των ασθενών μεταξύ των δύο μελετών, οι οποίοι είχαν διαφορετικά χαρακτηριστικά. Έτσι, φάνηκε ότι η εκτίμηση της αντι-οξειδωτικής κατάστασης των ασθενών δεν αποδόθηκε αξιόπιστα με τη χρησιμοποίηση της ΤΑΣ ως δείκτη αντιοξειδωτικής κατάστασης και το γεγονός αυτό δίνει έμφαση στη σημασία της



σωστής επιλογής αξιόπιστων δεικτών για την εκτίμηση του ΟΣ στους ασθενείς με ΧΝΝ (364).

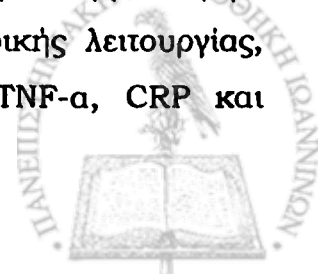
Οι περιορισμοί της μελέτης, οι οποίοι έχουν ήδη επισημανθεί, ισχύουν και στην περίπτωση της εκτίμησης των δεικτών του ΟΣ. Παρόλα αυτά, δείχθηκε ότι το ΟΣ, κυρίως εκφρασμένο με τη μορφή ενός δείκτη λιπιδικής οξειδωσης, όπως η ισομορφή των 8-epiPGF2a, αυξάνει με την επιδείνωση της ΧΝΝ και ότι οι κύριοι παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτό είναι πρωτίστως ο eGFR και εν συνεχεία η ηλικία, το αυξημένο σωματικό βάρος η φλεγμονή, η μειωμένη θρέψη και δευτερευόντως, η αναιμία και η απόπτωση. Τα αποτελέσματα δεν θα μπορούσαν σε καμία περίπτωση να στηρίξουν αιτιολογική σχέση μεταξύ των αλληλεπιδρώντων παραγόντων. Παρόλα αυτά, με τη συσχέτισή τους φαίνεται να ενισχύουν τη σημασία του ρόλου που αποδίδεται από πλήθος μελετών και ανασκοπήσεων στους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου, όπως η ηλικία και το αυξημένο σωματικό βάρος αλλά και στους μη παραδοσιακούς παράγοντες όπως το ΟΣ, η αναιμία, η ανέπαρκής θρέψη και η φλεγμονή στην έναρξη της ΧΝΝ, στην εξέλιξή της, καθώς και στις επιπλοκές αυτής όπως η ΚΑΝ. Επιπλέον, ενισχύουν και τη θεωρία της αλληλεπίδρασης των παραγόντων μεταξύ τους ώστε η ερμηνεία της παθοφυσιολογίας της παράλληλης εξέλιξης νεφρικής και καρδιαγγειακής βλάβης στους ασθενείς αυτούς να αποτελεί ένα δύσκολο, άλυτο ακόμα σε μεγάλο βαθμό γρίφο.



Θ.4. Φλεγμονή και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε σχέση με τη νεφρική λειτουργία

Καλά τεκμηριωμένες μαρτυρίες στηρίζουν τη θεωρία σύμφωνα με την οποία η φλεγμονή που περιλαμβάνεται στη λίστα των μη παραδοσιακών παραγόντων κινδύνου, παίζει κεντρικό ρόλο στη παθογένεια της αθηροσκλήρυνσης μέσω διαφόρων μηχανισμών, τόσο στο γενικό πληθυσμό όσο και σε επιλεγμένους πληθυσμούς, όπως αυτός της ΧΝΝ (316). Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αποτελεί ένα πρώιμο φαινόμενο στην αθηροσκλήρυνση το οποίο προηγείται των δομικών μεταβολών και των κλινικών εκδηλώσεων (317). Η φλεγμονή, με τη σειρά της και με κύριους μεσολαβητές της, τις κυττοκίνες προάγει την ενδοθηλιακή βλάβη. Αυτό διενεργείται μέσω μεταβολών στη δομή και λειτουργία των λιποπρωτεϊνών, μεταβολών στη σύνθεση πρωτεϊνών του πλάσματος, όπως η αύξηση της παραγωγής των πρωτεϊνών οξείας φάσης και μεταβολών στην ανατομική ακεραιότητα του ενδοθηλίου. Επιπλέον, υπάρχουν πειστικές μαρτυρίες που συνηγορούν στην άποψη ότι η ΧΝΝ θεωρείται χρόνια φλεγμονώδης διαδικασία, επειδή υπάρχει ιδιαίτερα ισχυρή συσχέτιση μεταξύ μιας ενεργού φλεγμονώδους αντίδρασης και της αθηροσκλήρυνσης σε αυτούς τους ασθενείς (310,319,320). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, η προ-φλεγμονώδης κυττοκίνη IL-6, η πρωτεΐνη οξείας φάσης ινωδογόνο και τα μόρια προσκόλλησης VCAM-1 βρέθηκαν να αυξάνονται με την επιδείνωση των σταδίων της ΧΝΝ αναδεικνύοντας σημαντική αρνητική συσχέτιση με το eGFR. Τα αποτελέσματα αυτά ίσως συμβάλλουν στην ενίσχυση της προαναφερθείσας θεωρίας που παρουσιάζει τη ΧΝΝ ως μία κατάσταση «αλλόστασης» με κύρια χαρακτηριστικά τη φλεγμονή, την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και την επιταχυνόμενη αθηροσκλήρυνση ήδη από τα πρώιμα στάδια νεφρικής δυσλειτουργίας.

Η IL-6 είναι μία προ-φλεγμονώδης κυττοκίνη που αντικατοπτρίζει την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς μεσολαβητές της αντίδρασης οξείας φάσης. Η διαλυτή μορφή της IL-6 έχει βρεθεί σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με ΧΝΝ και πιθανολογείται ότι παίζει κεντρικό ρυθμιστικό ρόλο στην έναρξη της νεφρικής και καρδιαγγειακής βλάβης (322,323,365). Πιο συγκεκριμένα, οι Bolton και συν. σε διαστρωματική μελέτη, με μόλις 16 ασθενείς με ΧΝΝ πριν την υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας, διαπίστωσαν μεταξύ των άλλων ότι τα επίπεδα των IL-6, TNF-α, CRP και



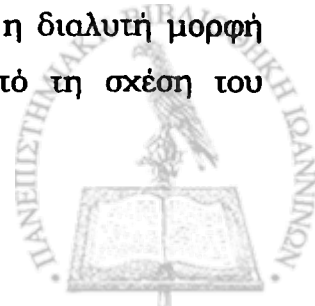
ινωδογόνου ήταν υψηλότερα στους ασθενείς αυτούς συγκριτικά με ασθενείς με στεφανιαία νόσο και με υγιή άτομα και σχετιζονταν με το βαθμό της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας χωρίς όμως να μελετήσουν τη συσχέτιση των επιπέδων των δεικτών αυτών με το βαθμό της νεφρικής δυσλειτουργίας (360). Σε πλήρη συμφωνία με τα παρόντα αποτελέσματα όσον αφορά στην IL-6 είναι αυτά που προέρχονται από τους Sela και συν., οι οποίοι μεταξύ άλλων έδειξαν ότι τα επίπεδα της IL-6 στον ορό σχετιζονταν αντιστρόφως ανάλογα με το GFR σε 30 ασθενείς με ΧΝΝ (GFR $16.7 \pm 2.4 \text{ ml/min/1.73m}^2$) (187). Παρόλα αυτά, η αιτιολογία γι' αυτά τα αυξημένα επίπεδα των προ-φλεγμονωδών κυττοκινών στη ΧΝΝ παραμένει εν πολλής άγνωστη.

Άμεση συνέπεια της αύξησης των προ-φλεγμονωδών κυττοκινών είναι και η αύξηση των μορίων αντίδρασης οξείας φάσης που έχει δειχθεί τόσο στους ασθενείς σε ΑΜΚ όσο και στη ΧΝΝ και η αύξηση αυτή σχετιζονταν ισχυρά και ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες με την ΚΑΝ (310,320,321,323). Μία τέτοια πρωτεΐνη οξείας φάσης είναι και το ινωδογόνο, το οποίο συντίθεται στο ήπαρ, ανευρίσκεται στο πλάσμα και κατέχει ζωτικό ρόλο σε μία σειρά παθοφυσιολογικών διαδικασιών περιλαμβάνοντας εκτός από τη φλεγμονή, τη θρομβογένεση και την αθηρογένεση. Τα αποτελέσματά μας, έδειξαν ότι το ινωδογόνο σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τον eGFR, ο οποίος καθόριζε τα επίπεδά του σε ποσοστό περίπου 33%, χωρίς όμως να αποτελεί και το μοναδικό παράγοντα πρόβλεψης, μιας και τη μεταξύ τους ισχυρή συσχέτιση βρέθηκαν να επηρεάζουν η ΣΑΠ, η sAlb, το Fas και το LVMI. Παρόμοια αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου έχουν δειχθεί σε αρκετές άλλες μελέτες και το γεγονός μπορεί να αποδοθεί μερικώς στην αύξηση του ρυθμού παραγωγής του (366). Πολύ ενδιαφέρουσα είναι η προοπτική μελέτη των Fried και συν., στην οποία στηρίζεται η εκδοχή ότι το ινωδογόνο συμβάλλει στην επιδείνωση και εξέλιξη της νεφρικής βλάβης μέσω του μηχανισμού της αθηροσκλήρυνσης και κατά επέκταση της σπειραματοσκλήρυνσης. Η ίδια ομάδα έδειξε ότι σε ηλικιωμένους ασθενείς του γενικού πληθυσμού η αύξηση της sCr και η μείωση του eGFR σχετιζονταν με υψηλότερα επίπεδα ινωδογόνου και μάλιστα η σημαντικότητα διατηρούνταν και μετά την προσαρμογή για ηλικία, φύλο, φυλή, sCr ένταξης, ΣΑΠ και ΔΑΠ, λιπίδια, σωματικό βάρος και κάπνισμα (367). Η παρούσα μελέτη δεν μπορεί να στηρίξει μία τέτοια εκδοχή, μιας και είναι διαστρωματική και επιπλέον



οι πληθυσμοί είναι μάλλον ανομοιογενείς αφού οι ασθενείς που μελετήθηκαν ήταν λιγότεροι σε αριθμό, είχαν κάποιου βαθμού ΧΝΝ και μικρότερη μέση ηλικία.

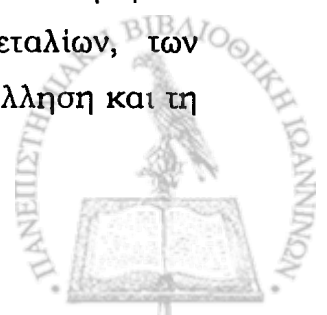
Ήδη αναφέρθηκε ότι και άλλοι παράγοντες πρόβλεψης εκτός του eGFR συμμετείχαν στη διαμόρφωση των επιπέδων του ινωδογόνου. Οι εφεδρείες παραγωγής αλβουμίνης από το φυσιολογικό ήπαρ είναι μεγάλες. Παρά το γεγονός αυτό η συγκέντρωση της sAlb των ασθενών με ΧΝΝ και ειδικά στους ασθενείς με νόσο τελικού σταδίου, συνήθως μειώνεται αφενός λόγω της μειωμένης εξωγενούς πρόσληψης λευκωμάτων, αφετέρου λόγω της χρόνιας φλεγμονώδους κατάστασης και της εκτροπής της ηπατικής λειτουργίας προς την παραγωγή άλλων πρωτεϊνών όπως οι πρωτεΐνες οξείας φάσης. Εξαιρέση αποτελούν οι ασθενείς με νεφρωσικό σύνδρομο, στους οποίους η αιτιολογία της υπολευκωματιναιμίας είναι διαφορετική. Στην παρούσα μελέτη, ο αριθμός των ασθενών με sAlb μικρότερη του φυσιολογικού (μικρότερη από 3.5g/dl) περιοριζόταν στους 7 ασθενείς (χαμηλότερη τιμή: 2.9g/dl) και δεν κρίθηκε σκόπιμη η εξαιρέσή τους κατά την ανάλυση των δεδομένων. Με βάση τα όσα αναφερθήκαν, δικαιολογείται ίσως εν μέρει μία συσχέτιση και αλληλεπίδραση μεταξύ της sAlb και του ινωδογόνου στον υπό μελέτη πληθυσμό. Βέβαια, το αν η συσχέτιση αυτή προκύπτει αιτιολογικά από την ίδια τη ΧΝΝ ή όχι αυτό δεν μπορεί να διευκρινιστεί. Θετική συσχέτιση μεταξύ ινωδογόνου και ΣΑΠ έχει περιγραφεί και από άλλους ερευνητές, τόσο σε ασθενείς με ΧΝΝ όσο και σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο (360). Επιπλέον, οι Zoccali και συν. μελετώντας τη σχέση ινωδογόνου και υπερηχοκαρδιογραφικών ευρημάτων σε 192 αιμοκαθαρόμενους ασθενείς έδειξαν ότι το ινωδογόνο σχετίζεται ανεξάρτητα με την υπερτροφία της LV, καθώς επίσης και με τη συστολική δυσλειτουργία σε αυτούς τους ασθενείς (368). Και στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι στη διαμόρφωση των επιπέδων του ινωδογόνου συμμετείχαν σε κάποιο βαθμό η ΣΑΠ και ο LVMI. Ωστόσο, σε μερική αντίθεση με τη μελέτη της ομάδας των Zoccali και συν., η σχέση ινωδογόνου και LVH δεν ήταν ανεξάρτητη αφού η βασική παράμετρος που καθόριζε τα επίπεδα του ινωδογόνου ήταν ο eGFR, γεγονός που ενισχύει το ρόλο της φλεγμονής ήδη από τα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ τόσο στην επιδείνωση της νεφρικής βλάβης όσο και στην καρδιαγγειακή επιβάρυνση των ασθενών αυτών για να φτάσει στο τελικό στάδιο με μηδενική νεφρική λειτουργία και να αποτελεί πλέον ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου. Τέλος, η διαλυτή μορφή του αποπτωτικού μορίου Fas βρέθηκε να επηρεάζει και αυτό τη σχέση του



ινωδογόνου με το eGFR. Όλες αυτές οι συσχετίσεις, χωρίς να είναι αιτιολογικές, ίσως αναδεικνύουν την πολυπαραγοντική παθοφυσιολογία της εξέλιξης της νεφρικής βλάβης παράλληλα με την επιδεινούμενη καρδιαγγειακή νοσηρότητα σε αυτόν τον πληθυσμό και υπερτονίζουν την ανάγκη της έγκαιρης και πολυδιάστατης θεραπευτικής παρέμβασης από τα αρχικά στάδια της ΧΝΝ.

Σε αντίθεση με το ινωδογόνο, δεν αναδείχθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της άλλης πρωτεΐνης οξείας φάσης, της CRP με τον eGFR. Η CRP βέβαια βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με την IL-6, η οποία ουσιαστικά είναι η κύρια αιτία αύξησης των επιπέδων της CRP σε καταστάσεις φλεγμονής. Επίσης, θετικά σχετιζόνταν η CRP και με το ινωδογόνο. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η CRP αποτελεί, τεκμηριωμένα, δείκτη κινδύνου για καρδιαγγειακά επεισόδια και πιθανά να κατέχει άμεσο ρόλο στη διαδικασία της αθηρογένεσης, τόσο στο γενικό πληθυσμό, όσο και σε επιλεγμένους πληθυσμούς, όπως της ΧΝΝ (369). Ασθενείς τελικού σταδίου σε υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας έχουν αυξημένα επίπεδα μικρο-φλεγμονής (CRP: 0.1-10-15 mg/l), τα οποία μεταβάλλονται στο χρόνο με κύματα «αληθινής» φλεγμονής (CRP >10-15 mg/l) να προστίθενται περιοδικά, κυρίως λόγω λοιμώξεων (370). Τα αποτελέσματα μελετών σε ασθενείς πριν την υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας είναι αντιφατικά όσον αφορά στη CRP. Οι περισσότερες διαπιστώνουν αύξηση των επιπέδων της CRP σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό αλλά όχι και συσχέτιση της CRP με το βαθμό της νεφρικής δυσλειτουργίας (360,366,371). Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μία μέτρηση της CRP, ενώ ιδανικά χρειάζονται πολλαπλές, δεν μετρήθηκε η τιμή της υψηλής ευαισθησίας CRP (high-sensitivity CRP/hs-CRP) και κριτήριο ένταξης στη μελέτη ήταν η σταθερή καρδιαγγειακή κατάσταση για τους 2 προηγούμενους μήνες, καθώς και η απουσία ενεργής λοίμωξης. Ίσως έτσι μπορεί να εξηγηθεί από πρακτικής πλευράς το αποτέλεσμα, ενώ μία άλλη ερμηνεία επί θεωρητικής βάσης μπορεί να είναι το γεγονός ότι η CRP αποτελεί ευαίσθητο δείκτη καρδιαγγειακού κινδύνου αλλά ίσως δεν μπορεί να σχετιστεί με τη βαρύτητα της νεφρικής βλάβης τουλάχιστον στα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ, κάτι το οποίο όπως φάνηκε από τα αποτελέσματά μας ότι ισχύει και για το ινωδογόνο και την IL-6.

Η φλεγμονή μέσω των κυττοκινών τροποποιεί την έκφραση των μορίων προσκόλλησης και ειδικών ligands στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων, των ουδετερόφιλων και μονοπύρηνων κυττάρων που προάγουν την προσκόλληση και τη



διαπίδυση, μια διεργασία πρωτίστως σημαντική στην έναρξη και εξέλιξη της αθηροσκλήρυνσης (280,325). Κυττοκίνες, όπως η IL-1α και -1β και ο TNF-α αυξάνουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1, τα οποία είναι μόρια παρόμοια με Ig και συντίθενται στα ενδοθηλιακά κύτταρα (324). Τα μόρια προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1 θεωρούνται σήμερα μαζί με την ενδοθηλιακή σελεκτίνη (E-selectin) και τον παράγοντα von Willebrand ως οι πιο αξιόπιστοι δείκτες ενδοθηλιακής βλάβης (372). Αυξημένα επίπεδα τιμών ICAM-1 και VCAM-1 έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ΧΝΝ και στην ΑΜΚ (327-330).

Σύμφωνα με τα παρόντα αποτελέσματα, τα επίπεδα της διαλυτής μορφής των VCAM-1 βρέθηκαν να αυξάνονται σταδιακά με την επιδείνωση των σταδίων της ΧΝΝ και ο eGFR καθόριζε τα επίπεδά τους σε ένα σημαντικό ποσοστό 37.4%. Αντίθετα, δεν βρέθηκε ανάλογη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των ICAM-1 και του eGFR. Σε ανάλογο αποτέλεσμα κατέληξαν και δύο άλλες ανεξάρτητες ομάδες ερευνητών, οι οποίοι μεταξύ των άλλων διαπίστωσαν αυξητική τάση των VCAM-1 στην ομάδα των ασθενών με ΧΝΝ πριν την ένταξη σε υποκατάσταση σε σχέση με τους υγιείς αλλά όχι και των ICAM-1 (360). Η πιθανή έρμηνεία που δίδεται από τους συγγραφείς για την αυξημένη τιμή των VCAM-1 και που ενισχύεται και από τα αποτελέσματά μας είναι ότι τα αυξημένα επίπεδα των κυττοκινών, καθώς και η μειωμένη νεφρική κάθαρσή τους μπορεί να ευθύνονται μερικώς για το γεγονός. Όσον αφορά στους παράγοντες πρόβλεψης που επιλέχθηκαν προκειμένου να ελεγχθεί το αν VCAM-1 και eGFR σχετίζονται ανεξάρτητα ή όχι, διαπιστώθηκε ότι ο LVMI και το αποπτωτικό μόριο Fas επηρέαζαν σημαντικά τη συσχέτιση. Αυξημένα επίπεδα VCAM-1 σε υπερτασικούς ασθενείς με LVH έχουν περιγραφεί από τους Kuroda και συν. αλλά αντίστοιχη συσχέτιση σε ασθενείς με ΧΝΝ από όσο είναι γνωστό, δεν έχει περιγραφεί (373).

Οι συσχετίσεις που προκύπτουν από τα αποτελέσματά μας, παρά το γεγονός ότι δεν έχουν ξεκάθαρη κλινική σημασία, μπορούν παρόλα αυτά να ερμηνευτούν ίσως στα πλαίσια της θεώρησης της ΧΝΝ ως μία κατάσταση «αλλόστασης», όπως αναφέρουν χαρακτηριστικά οι Stenvinkel και συν. σε πρόσφατη ανασκόπησή τους, σύμφωνα με την οποία η αλληλοεπίδραση παραδοσιακών και μη παραδοσιακών παραγόντων κινδύνου είναι εξαιρετικά περίπλοκη (316). Κατά την άποψή μας απαιτείται συνδυασμός αποκρυπτογράφησης των παθοφυσιολογικών μηχανισμών



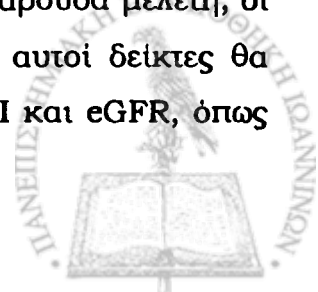
σε επίπεδο εργαστηρίου με σχεδιασμό μεγάλων προοπτικών κλινικών μελετών προκειμένου να αρχίσει να λύνεται σταδιακά ο γρίφος.



Θ.5. Συσχέτιση υπερηχοκαρδιογραφικών ευρημάτων με κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους, καθώς και με τους δείκτες της απόπτωσης, του ΟΣ και της φλεγμονής-ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας

Η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα πρόγνωσης για καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα στους ασθενείς με τελικού σταδίου ΧΝΝ, στους υπερτασικούς ασθενείς, στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο, καθώς και στο γενικό πληθυσμό (374). Έχει δειχθεί ότι οι μεταβολές του LVMI με το χρόνο σχετίζονται με καρδιαγγειακή πρόγνωση και η LVH θεωρείται στις μέρες μας ένα σημαντικό ενδιάμεσο τελικό σημείο στη θεραπεία των υπερτασικών αλλά και των ασθενών σε υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας (347,375). Υψηλότερη επίπτωση της LVH έχει αναφερθεί στους ασθενείς με ΧΝΝ συμβάλλοντας πιθανά στο μεγαλύτερο κίνδυνο για καρδιαγγειακά συμβάματα που παρατηρούνται σε αυτούς τους ασθενείς (376). Εκτός όμως από τη LVH, αρκετοί άλλοι παραδοσιακοί και μη παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου συμβάλλουν στον υπέρμετρο καρδιαγγειακό κίνδυνο των ασθενών με ΧΝΝ, μεταξύ των οποίων και η απόπτωση, το ΟΣ, η φλεγμονή και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία όπως έχουμε ήδη αναφέρει. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά, μας ο LVMI, ο οποίος επιλέχθηκε ως ο πιο αντιπροσωπευτικός δείκτης ύπαρξης υπερτροφίας της LV, βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά με το αποπτωτικό μόριο Fas, με τον TNF-α, τα επίπεδα των 8-epiPGF2α, τα επίπεδα των VCAM-1, της IL-6 και του ινωδογόνου, στηρίζοντας έτσι τη θεωρία των κοινών, αλληλοεπιδρώντων παραγόντων κινδύνου στην εξέλιξη της καρδιονεφρικής βλάβης στους ασθενείς με ΧΝΝ και μάλιστα από τα πρώιμα στάδια της νόσου.

Ο LVMI και η LVH έχει δειχθεί ότι σχετίζονται σημαντικά και με τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου στον πληθυσμό των ασθενών με ΧΝΝ και μάλιστα από τα πρώιμα στάδια (53,345). Ανάλογα αποτελέσματα βρέθηκαν και στην παρούσα μελέτη, όταν ελέγχθηκαν οι πιθανές συσχετίσεις του LVMI με παραμέτρους που αντανakλούν κάποιους από τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου. Έτσι, βρέθηκε ότι ο LVMI συσχετιζόνταν θετικά με την ηλικία, τη ΣΑΠ και τη διαφορική ΑΠ, την sCr και την sUr, το λόγο λεύκωμα/κρεατινίνη ούρων, τη sGlu, τη sAlb, το ουρικό οξύ (sUA), τα TRG και την PTH. Στην παρούσα μελέτη, οι συσχετίσεις αυτές έγιναν με το σκεπτικό ότι οι παραδοσιακοί αυτοί δείκτες θα χρησιμοποιηθούν ως «confounders» στη σχέση μεταξύ των LVMI και eGFR, όπως

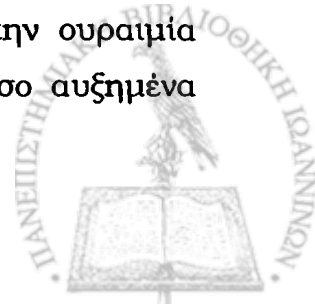


και έγινε και κρίθηκε σκόπιμο να ελεγχθεί η άμεση σχέση τους με τον LVMI. Παρόλα αυτά, ο περαιτέρω σχολιασμός των συσχετίσεων αυτών παρά το γεγονός ότι συγκεντρώνει επιστημονικό ενδιαφέρον ξεφεύγει από τους σκοπούς της παρούσας μελέτης.

Συνεχώς αθροίζεται η γνώση που προτείνει ότι η διαταραχή της απόπτωσης στο τοίχωμα των αγγείων αποτελεί σημαντικό στοιχείο για την εμφάνιση και εξέλιξη της αθηροσκλήρυνσης, τόσο σε πειραματικά μοντέλα, όσο και σε ασθενείς. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η υπερέκφραση του Fas συμμετέχει στη δημιουργία εκτεταμένων αθηροσκληρυντικών βλαβών και πολύ πιθανόν να καθορίζει μερικώς τον όγκο του μυϊκού ιστού στα προσβαλλόμενα αγγεία (377). Οι Hebert και συν. έδειξαν ότι ασθενείς με τελικού σταδίου ΧΝΝ και στεφανιαία νόσο ή/και ΠΑΝ έχουν και υψηλά επίπεδα της διαλυτής μορφής του Fas στον ορό τους (378). Σύμφωνα με όσα είναι γνωστά, δεν έχει γίνει μέχρι τώρα συσχέτιση μεταξύ της διαλυτής μορφής του Fas και του LVMI σε πληθυσμό ασθενών με ΧΝΝ. Μία τέτοια συσχέτιση, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα, είναι πιθανή αφού η απόπτωση και μάλιστα εκφρασμένη με τη μορφή του Fas έχει ενοχοποιηθεί ότι συμμετέχει στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρυνσης και στην καρδιαγγειακή θνητότητα των ασθενών με ΧΝΝ και η LVH αποτελεί ένα ενδιάμεσο τελικό σημείο αυτής.

Οι ερευνητές, οι οποίοι έχουν μελετήσει το δείκτη TNF-α ως παράγοντα πρόβλεψης για καρδιαγγειακή θνησιμότητα, κυρίως σε ασθενείς σε υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας, κατέληξαν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα (379). Παρόλα αυτά, είναι αδιαμφισβήτητη η συμμετοχή του TNF-α στη διαδικασία της φλεγμονής, η οποία με τη σειρά της τεκμηριωμένα ευθύνεται για την καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα των ασθενών αυτών. Στην παρούσα μελέτη, φάνηκε ότι ο TNF-α σχετίζονταν σημαντικά με το LVMI. Σε αναλογία με τα παρόντα αποτελέσματα οι Cottone και συν. έδειξαν ότι οι ασθενείς με ΧΝΝ και LVH είχαν υψηλότερα επίπεδα TNF-α σε σχέση με εκείνους που δεν είχαν LVH (380). Οι ερευνητές αυτοί δεν μπόρεσαν να αναδείξουν συσχέτιση μεταξύ του TNF-α με το LVMI μιας και ο αριθμός των ασθενών ήταν μικρός, μόλις 30 ασθενείς.

Το ΟΣ έχει προταθεί ότι κατέχει κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ουραιμίας, καθώς και στις επιπλοκές της, συμπεριλαμβανομένης και της ΚΑΝ (83). Τα 8-epiPGF2a έχουν προταθεί ως αξιόπιστος δείκτης ΟΣ στην ουραιμία (340). Οι Vassalle και συν. βρήκαν σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο αυξημένα



επίπεδα F2-ισοπροστανίων πλάσματος και ελαττωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με υγιή άτομα (277). Σύμφωνα με τα παρόντα αποτελέσματα, τα επίπεδα των 8-epiPGF2a σχετιζόνταν θετικά με το LVMI. Ανάλογα αποτελέσματα σε ασθενείς με ΧΝΝ δεν εντοπίστηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία με εξαίρεση τα αποτελέσματα των Siems και συν., οι οποίοι βρήκαν σχεδόν γραμμική συσχέτιση μεταξύ ενός άλλου δείκτη οξείδωσης των λιπιδίων, της HNE (4-hydroxynonenal) και του LVMI σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς χωρίς όμως να αναδείξουν ανάλογη σχέση και μεταξύ των F2-ισοπροστανίων με το LVMI (381).

Η IL-6 ως κύριος μεσολαβητής της φλεγμονής έχει αναδειχθεί σε πολλές μελέτες ως ο πιο αξιόπιστος από τους δείκτες που έχουν μελετηθεί ως παράγοντες πρόβλεψης για καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα των ασθενών με ΧΝΝ (379,382). Αντίθετα, στη μελέτη των Triperi και συν. δεν κατάφεραν να αναδείξουν τα επίπεδα των VCAM-1 ως παράγοντα πρόβλεψης καρδιαγγειακού τελικού σημείου παρά το γεγονός ότι αποτελεί αδιαμφισβήτητα δείκτη ενδοθηλιακής βλάβης (372). Στην παρούσα μελέτη, αναδείχθηκε μία σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της IL-6 και των VCAM-1 στον ορό με το LVMI, χωρίς βέβαια να είναι γνωστή η κλινική σημασία αυτών των συσχετίσεων.

Βρέθηκε επίσης, όσον αφορά στους δείκτες της φλεγμονής, συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του ινωδογόνου πλάσματος και του LVMI. Το ινωδογόνο εκτός από πρωτεΐνη οξείας φάσης συμμετέχει και στην ενδοθηλιακή λειτουργία αφού προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών ινών, ενώ επιπλέον προκαλεί ρεολογικές μεταβολές λόγω αυξημένης γλοιότητας του αίματος. Το εύρημα αυτό τονίζει τη σημασία του ινωδογόνου ως δείκτη των δομικών μεταβολών του μυοκαρδίου. Επίσης, ίσως πιθανολογεί και τη συμβολή του στην παθογένεια αυτών των μεταβολών μιας και η αύξηση της γλοιότητας του πλάσματος, την οποία και αντανακλούν τα επίπεδα του ινωδογόνου, προκαλεί με τη σειρά της αυξημένο καρδιακό έργο και επακόλουθη LVH. Αρκετές επιδημιολογικές, προοπτικές μελέτες παρέχουν στοιχεία για τα επίπεδα του ινωδογόνου σε σχέση με τη ΚΑΝ. Μία μετα-ανάλυση 6 επιδημιολογικών μελετών με πληθυσμούς αντιπροσωπευτικούς του γενικού πληθυσμού ανέδειξε το ινωδογόνο ως ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για ΚΑΝ (383). Οι Zoccali και συν. ανέδειξαν την ίδια ανεξάρτητη σχέση μεταξύ ινωδογόνου και ολικής και καρδιαγγειακής θνητότητας σε ασθενείς σε υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας (384). Επιπλέον, η ίδια



ομάδα ερευνητών, κατά αναλογία με τα παρόντα αποτελέσματα, βρήκαν σε 192 ασθενείς τελικού σταδίου σε υποκατάσταση ότι αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου σχετίζονταν ανεξάρτητα με τη συγκεντρική LVH και τη συστολική δυσλειτουργία στους ασθενείς αυτούς (368).

Όσον αφορά στις σημαντικές συσχετίσεις του LVMI που αντανακλούν την ύπαρξη LVH με τους δείκτες της απόπτωσης, ΟΣ, φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας ίσως να στηρίζουν τη συμμετοχή των φαινομένων αυτών στην καρδιαγγειακή επιβάρυνση των ασθενών με ΧΝΝ, ήδη από τα αρχικά στάδια της νόσου. Η πιθανότητα οι συσχετίσεις αυτές να εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ίδια τη νεφρική λειτουργία, αφού οι ίδιοι δείκτες φάνηκε ότι διαμορφώνονται σε μεγάλο ποσοστό από τη τιμή του eGFR, λόγω ελαττωμένης απομάκρυνσής τους από τους υπολειπουμένους νεφρούς, δεν μπορεί να αποκλειστεί. Αυτός ήταν και ο λόγος που δεν ελέγχθηκε η μεταξύ τους σχέση με ανάλυση παλινδρόμησης και δεν προσαρμόστηκε για τον eGFR. Βέβαια, αρκετοί από αυτούς τους δείκτες έχουν αναγνωριστεί ως παράγοντες ΚΑΝ και στο γενικό πληθυσμό και σε άλλους επιλεγμένους πληθυσμούς χωρίς νεφρική δυσλειτουργία. Ερευνητές που ασχολούνται με το πρόβλημα της καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνητότητας στη ΧΝΝ διατυπώνουν την άποψη ότι οι δείκτες αυτοί δρουν και αλληλεπιδρούν στο ουραιμικό περιβάλλον με τέτοιο τρόπο, ώστε τα αποτελέσματα είναι δυσανάλογα συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό και ολέθρια για τους ασθενείς με ΧΝΝ (53). Καλά σχεδιασμένες, προοπτικές μελέτες είναι απαραίτητες για τη διευκρίνιση των μηχανισμών και της κλινικής σημασίας τέτοιων αλληλεπιδράσεων στο πληθυσμό της ΧΝΝ.

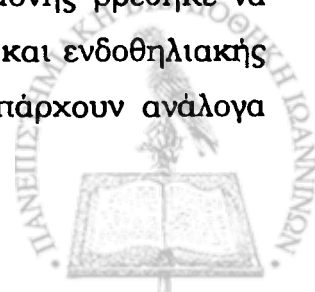


Θ.6. Αλληλεπιδράσεις δεικτών απόπτωσης, ΟΣ, φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας

Ήδη αναφέρθηκε, ότι οι παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην έναρξη της νεφρικής βλάβης και στην εμφάνιση καρδιαγγειακών επεισοδίων στο γενικό πληθυσμό, αλλά διαφαίνεται ότι οι μη-παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου κατέχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας και της καρδιαγγειακής βλάβης στους ασθενείς με ΧΝΝ (53). Στους μη παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου συμπεριλαμβάνονται και έχουν εξέχουσα θέση το ΟΣ, η φλεγμονή και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (83,316). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η ΧΝΝ συνοδεύεται από αυξημένη απόπτωση των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος με κύρια συνέπεια διαταραχές στην ανοσιακή απάντηση των ασθενών (177,192,331). Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκαν αρκετές ενδιαφέρουσες συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών απόπτωσης, ΟΣ και φλεγμονής.

Όσον αφορά στην έκφραση του Bcl-2 από τα μνοπύρρηνα, βρέθηκε να σχετίζεται αρνητικά με τα επίπεδα των καρβονυλίων, της IL-6 και του ινωδογόνου, χωρίς να γνωρίζουμε τη σημασία αυτών των συσχετίσεων. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες, τόσο σε πειραματικό όσο και σε κλινικό επίπεδο που μελετούν και συσχετίζουν την αλληλοεπίδραση των δεικτών της απόπτωσης με κυττοκίνες και με δείκτες ΟΣ. Συγκεκριμένα, για το Bcl-2 εκτός από την άμεση δράση του στον καταρράκτη των κασπασών με σκοπό την αποτροπή της απόπτωσης, έχει φανεί ότι πιθανώς έχει δράσεις δεσμευτή (scavenger) ελευθέρων ριζών προσπαθώντας μέσω μείωσης του ΟΣ να ρυθμίσει και την απόπτωση αν και σε μεταγενέστερες μελέτες αμφισβητήθηκε η συγκεκριμένη δράση (176,361,385).

Τα επίπεδα του Fas και του FasL δεν συσχετίζονταν μεταξύ τους, κάτι το οποίο έχει φανεί και σε άλλες μελέτες (352). Οι Fas και FasL έδειξαν να συσχετίζονται ο καθένας με διαφορετική ισχύ με κάποιους από τους δείκτες της φλεγμονής και της ενδοθηλιακής βλάβης και όπως αναφέρθηκε υπάρχουν δεδομένα που θέλουν τις φλεγμονώδεις κυττοκίνες να εμπλέκονται στην πορεία των αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών μονοπατιών (337). Τέλος, από τους δείκτες της απόπτωσης ο TNF-α, ο οποίος είναι συνάμα και δείκτης φλεγμονής βρέθηκε να σχετίζεται με σχεδόν όλους τους υπόλοιπους δείκτες φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας που εκτιμήθηκαν. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ανάλογα

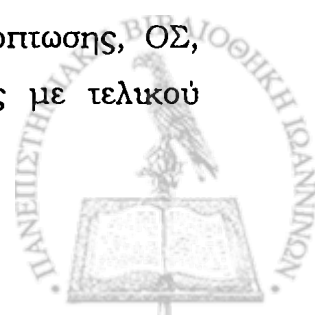


αποτελέσματα που στηρίζουν τον «εκτεταμένο διάλογο» του TNF-α με πληθώρα άλλων γονιδίων, πρωτεϊνών και δεικτών (187,192,360). Βέβαια, τα αποτελέσματα είναι πολλές φορές διφορούμενα ή και αντιφατικά, όσον αφορά στον TNF-α και η πολυπλοκότητα αυτή επιβεβαιώνει μόνο το γεγονός ότι όποτε παράγεται ο TNF-α πολλά κύτταρα με διαφορετικές δράσεις απαντούν κατάλληλα στη φλεγμονή.

Για τους δείκτες του ΟΣ, εκτός από τις προαναφερθείσες συσχετίσεις τους με τους δείκτες της απόπτωσης, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα των 8-epiPGF2a σχετίζονταν θετικά με τα επίπεδα όλων των εκτιμώμενων δεικτών φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας εκτός από την IL-6. Σύμφωνα με τα όσα γνωρίζουμε, μελέτες που να συσχετίζουν συγκεκριμένα τα 8-epiPGF2a με δείκτες φλεγμονής σε πληθυσμό με ΧΝΝ δεν υπάρχουν. Παρόλα αυτά, έχουν γίνει συσχετίσεις μεταξύ άλλων δεικτών ΟΣ, όπως της ox-LDL και δεικτών φλεγμονής (360). Γενικότερα, έχει διατυπωθεί ότι η σχέση ΟΣ και φλεγμονής στη ΧΝΝ φαίνεται να είναι αμοιβαία και αμφίδρομη (316).

Όσον αφορά στους δείκτες φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, τα επίπεδα των VCAM-1 σχετίζονταν θετικά με τα επίπεδα όλων των άλλων δεικτών φλεγμονής, εκτός από τη CRP, ενώ τα επίπεδα των ICAM-1 σχετίζονταν θετικά με τη CRP. Αντίστοιχες συσχετίσεις μεταξύ αυτών των δεικτών έχουν δειχθεί και από άλλες μελέτες (329,360). Επιπλέον, τα επίπεδα της IL-6 σχετίζονταν θετικά με το ινωδογόνο και τη CRP, γεγονός το οποίο είναι θεωρητικά απόλυτα δικαιολογημένο, αφού η IL-6 αποτελεί την κύρια κυττοκίνη που διεγείρει την παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών οξείας φάσης. Τέλος, το ινωδογόνο πλάσματος και η CRP ορού βρέθηκε να έχουν σημαντική, θετική συσχέτιση μεταξύ τους, παρά το γεγονός ότι η CRP δεν μεταβλήθηκε με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας, αλλά τα επίπεδά της ήταν συνολικά υψηλότερα από τα φυσιολογικά. Πρόσφατα, οι Τρίπερι και συν. αφενός περιγράψανε ανάλογες με τις δικές μας αλληλοσυσχετίσεις μεταξύ των δεικτών φλεγμονής και ενδοθηλιακής βλάβης και αφετέρου διαπίστωσαν ότι κάποιοι από αυτούς και συγκεκριμένα η CRP και IL-6 έχουν σημαντική προγνωστική ικανότητα στο να προβλέψουν θάνατο από κάθε αίτιο και θάνατο από καρδιαγγειακό αίτιο σε 217 ασθενείς με τελικού σταδίου ΧΝΝ (379).

Στις ημέρες μας, συνεχώς αθροίζεται η τεκμηριωμένη γνώση που αναδεικνύει αλληλοεπιδράσεις και αμφίδρομες σχέσεις μεταξύ των δεικτών απόπτωσης, ΟΣ, φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας τόσο στους ασθενείς με τελικού



σταδίου ΧΝΝ όσο και στα πιο πρώιμα στάδια της νόσου. Οι συσχετίσεις μεταξύ των εξειδικευμένων δεικτών που προέκυψαν στην παρούσα μελέτη ίσως έρχονται να ενισχύσουν τη θεωρία της αλληλεπίδρασης των παθολογικά αυξημένων καταστάσεων του ΟΣ, της φλεγμονής και της απόπτωσης, ήδη από τα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ, χωρίς βέβαια σε καμία περίπτωση να αξιώνουν αιτιολογική σχέση μεταξύ αυτών και χωρίς επίσης να είναι γνωστή η κλινική σημασία αυτών των αλληλοεπιδράσεων. Επίσης, ένας περιορισμός που αφορά συγκεκριμένα τη συσχέτιση της έκφρασης του Bcl-2 με τους υπόλοιπους δείκτες της απόπτωσης, του ΟΣ και της φλεγμονής ήταν ότι αυτή έγινε με όλες τις επιφυλάξεις που μπορεί να έχει μία συσχέτιση ανάμεσα σε στοιχεία που προέρχονται από μελέτη κυτταροδομής και σε στοιχεία που αφορούν στην ποσοτική έκφραση κάποιων δεικτών στο αίμα.

Η ενδελεχής ανάλυση και συζήτηση των συσχετίσεων που προέκυψαν, ξεφεύγει από τον σκοπό της κλινικής αυτής μελέτης που σχεδιάσθηκε βασικά για να ελέγξει πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών του ΟΣ, της απόπτωσης και της φλεγμονής με τη νεφρική λειτουργία και τὰ ευρήματα από το υπερηχοκαρδιογράφημα. Παρόλα αυτά, τα ευρήματα που περιγράφονται σε αυτήν την ενότητα καταδεικνύουν την αλληλοεπίδραση των δεικτών αυτών ως κοινών παραγόντων κινδύνου για την καρδιά και τους νεφρούς και μπορεί να αποτελέσουν έναυσμα για την περαιτέρω διερεύνηση της σημασίας μιας τέτοιας πολυπλοκότητας, αφού γίνεται ολοένα και πιο φανερό ότι οι μη-παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου και ο μεταξύ τους «διάλογος» διαδραματίζουν ρόλο κλειδί στην παράλληλη εξέλιξη νεφρικής και καρδιαγγειακής βλάβης.



I. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας και οι διαταραχές της καρδιακής γεωμετρίας εμφανίσθηκαν σε πολύ πρώιμα στάδια της ΧΝΝ σε πολύ υψηλά ποσοστά και εξελίχθηκαν παράλληλα με την εξέλιξη νεφρικής βλάβης. Με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας μειώθηκε σημαντικά η αντι-αποπτωτική και αντίθετα, αυξήθηκαν η προ-αποπτωτική και προ-οξειδωτική δραστηριότητα. Παράλληλα, με την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας αυξήθηκαν σημαντικά οι δείκτες της φλεγμονής IL-6 και ινωδογόνο, καθώς και ο δείκτης ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, VCAM-1. Ο LVMI βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά με τους δείκτες που εκφράζουν την προ-αποπτωτική (Fas και TNF- α), την προ-οξειδωτική (8-epiPGF2a), καθώς και την προ-φλεγμονώδη (VCAM-1, IL-6 και ινωδογόνο) δραστηριότητα. Οι παράμετροι της απόπτωσης, του ΟΣ και της φλεγμονής έδειξαν σημαντικές αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των και με άλλους συμβατικούς κλινικούς και εργαστηριακούς παράγοντες κινδύνου, γεγονός που συνηγορεί υπέρ του ρόλου των ως κοινών παραγόντων κινδύνου για την παράλληλη εξέλιξη της νεφρικής και καρδιακής βλάβης. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν υπέρ της έγκαιρης εκτίμησης των ασθενών με ΧΝΝ στα πρώιμα στάδια και της ολιστικής παρέμβασης στους παράγοντες κινδύνου που ευθύνονται για την εξέλιξη της καρδιονεφρικής βλάβης.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η χρόνια νεφρική νόσος (ΧΝΝ) αποτελεί τεράστιο επιδημιολογικό πρόβλημα σε όλο τον κόσμο και η συχνότητα όσο και ο επιπολασμός της βαίνει αυξανόμενος παγκοσμίως κάθε χρόνο κατά 5-8 %. Υπολογίζεται ότι οι ασθενείς σε αιμοκάθαρση (ΑΜΚ) σε όλο το κόσμο από 1.1 εκ. το 2001 προβλέπεται να αυξηθούν σε 2 εκ. το 2010 και η δαπάνη για τη θεραπεία αυτών των ασθενών υπολογίζεται ότι θα ξεπεράσει το 1 τρισεκατομμύριο δολάρια το 2010. Το ποσοστό των ασθενών στο γενικό πληθυσμό των ΗΠΑ με ΧΝΝ σταδίων 1-5 φθάνει περίπου το 11% που είναι σχεδόν 60 φορές μεγαλύτερο από το ποσοστό των ασθενών που καταλήγει σε ΑΜΚ, γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ατόμων στο γενικό πληθυσμό με πρώιμα στάδια ΧΝΝ που είναι ασυμπτωματικοί αλλά και πεθαίνουν κατά την εξέλιξη της νόσου κυρίως από καρδιαγγειακά συμβάματα. Από τη στιγμή που εγκαθίσταται η ΧΝΝ πιστεύεται ότι αργά ή γρήγορα εξελίσσεται σε τελικό στάδιο ΧΝΝ. Ωστόσο, είναι εξαιρετικά σπάνιες οι διαχρονικές μελέτες που παρακολούθησαν τη φυσική εξέλιξη της ΧΝΝ. Έτσι, είναι άγνωστο σήμερα τι ποσοστό ασθενών με πρώιμα στάδια ΧΝΝ θα καταλήξουν σε τελικό στάδιο ΧΝΝ. Συνεπώς απαιτούνται μεγάλες, καλά σχεδιασμένες, προοπτικές μελέτες προκειμένου να διευκρινισθεί η φυσική εξέλιξη της ΧΝΝ και οι παθοφυσιολογικές μεταβολές, κυρίως του καρδιαγγειακού συστήματος που σχετίζονται με την εξέλιξη αυτή.

Στην Ελλάδα υπάρχει παντελής έλλειψη στοιχείων για τον αριθμό των ασθενών με τα διάφορα στάδια ΧΝΝ στο γενικό πληθυσμό. Επίσης, είναι παντελώς άγνωστη η επίπτωση παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με την εξέλιξη της καρδιονεφρικής βλάβης. Εκτός από τους συμβατικούς παράγοντες κινδύνου που περιγράφηκαν από τη μελέτη Framingham είναι γνωστό ότι και παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με αυτό καθαυτό το ουραιμικό περιβάλλον διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της καρδιονεφρικής βλάβης. Από τους τελευταίους αυτούς παράγοντες, φαίνεται ότι κεντρικό ρόλο καταλαμβάνει το οξειδωτικό στρες (ΟΣ), η απόπτωση και η φλεγμονή.

Σκοπός της διατριβής αυτής ήταν να μελετηθεί η επίπτωση των σταδίων 1-4 ΧΝΝ σε επιλεγμένο πληθυσμό των Εξωτερικών Ιατρείων δύο Νεφρολογικών Κέντρων και να οριστεί η συνοδός καρδιαγγειακή βλάβη και οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την εξέλιξη των καταστάσεων αυτών.



Ασθενείς-Μέθοδοι: Μελετήθηκαν 229 ενήλικοι ασθενείς από τα εξωτερικά ιατρεία ΧΝΝ δύο Νοσοκομείων (Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων και Γενικό Νοσοκομείο Βέροιας). Από το σύνολο των ασθενών 119 ήταν άνδρες (52%) και 110 ήταν γυναίκες (48%), με μέση ηλικία 64.8 έτη. Οι κυριότερες πρωτοπαθείς νόσοι ήταν η υπερτασική νεφροσκλήρυνση (15%), η διαβητική νεφροπάθεια (14%) και η διάμεση νεφροπάθεια (11%) ενώ σε ποσοστό 35% το πρωτοπαθές αίτιο ήταν άγνωστο. Σε όλους τους ασθενείς καταγράφηκαν τα δημογραφικά, σωματομετρικά και κλινικά χαρακτηριστικά και έγινε πλήρης αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος. Για την ταξινόμηση των ασθενών στα στάδια της ΧΝΝ χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση MDRD και η κατανομή τους ήταν: 24 (10.5%), 58 (25.3%), 85 (37.1%) και 62 (27.1%) στα αντίστοιχα στα στάδια 1-4 της ΧΝΝ.

Στους ασθενείς κατά την ένταξή τους στη μελέτη προσδιορίστηκαν εξειδικευμένες παράμετροι εκτίμησης της απόπτωσης, του ΟΣ της χρόνιας φλεγμονής και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Ως παράμετροι εκτίμησης του φαινομένου της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκαν η έκφραση των επιπέδων του Bcl-2 καθώς και η έκφραση των Αννεξίνη V - PI στα μονόπύρρηνα του περιφερικού αίματος, τα επίπεδα ορού των Fas και FasL και ο TNF- α . Ως παράμετροι εκτίμησης της οξειδωτικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα των 8-epiPGF2a του ορού, της οξειδωμένης LDL του ορού, των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών και της ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης (TAS). Ως παράμετροι εκτίμησης της χρόνιας φλεγμονής και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα των CRP, ICAM-1, VCAM-1 και της IL-6 στον ορό των ασθενών καθώς και τα επίπεδα του ινωδογόνου στο πλάσμα.

Στα πλαίσια εκτίμησης της καρδιαγγειακής κατάστασης όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε υπερηχοκαρδιογράφημα μέσα σε ένα μήνα από την ημέρα της ένταξης των στη μελέτη. Οι μετρήσεις περιλάμβαναν τη διάσταση του αριστερού κόλπου, το πάχος του μεσοκοιλιακού διαφράγματος (IVSTd), το πάχος του οπισθίου τοιχώματος (PWTd), τη διάμετρο της αριστερής κοιλίας (LV) στο τέλος της διαστολικής φάσης (LVDd), τη διάμετρο της LV στο τέλος της συστολικής φάσης (LVDs), τη μάζα της LV (LVmass) προσαρμοσμένη στην επιφάνεια σώματος (LVMI). Επίσης μετρήθηκαν το FS και το EF της LV, ενώ για την εκτίμηση της διαστολικής λειτουργίας της LV, μετρήθηκε η διαστολική πλήρωση της LV και καταγράφηκαν η



μέγιστη ταχύτητα της πρώιμης διαστολικής πλήρωσης (E) και η μέγιστη ταχύτητα της ακόλουθης κολπικής πλήρωσης (A), για τον υπολογισμό του κλάσματος E/A.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα SPSS 11. Η σύγκριση των τιμών των διαφόρων παραμέτρων στα στάδια 1-4 της ΧΝΝ έγινε με την μέθοδο της απλής μη συσχετισμένης ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA). Η συσχέτιση μεταξύ δύο συνεχών μεταβλητών υπολογίστηκε με τη μη παραμετρική μέθοδο του Spearman. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η στατιστική διαδικασία της βηματικής πολλαπλής παλινδρόμησης (stepwise multiple regression) για να προσδιοριστούν ιεραρχικά κατά σημαντικότητα οι συσχετίσεις μεταξύ εξέλιξης της νεφρικής βλάβης και των αποτελεσμάτων από τα υπερηχοκαρδιογραφήματα και τις ειδικές εξετάσεις της απόπτωσης, του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής.

Αποτελέσματα: Από τις υπερηχοκαρδιογραφικές παραμέτρους οι IVSTd, PWTd, RWT, LVmass και LVMI αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά από το στάδιο 1 στο στάδιο 4 της ΧΝΝ (IVSTd: 0.95 ± 0.2 σε 1.2 ± 0.3 $p < 0.001$, PWTd: 0.8 ± 0.1 σε 1 ± 0.25 $p < 0.001$, RWTd: 0.33 ± 0.06 σε 0.43 ± 0.1 $p < 0.001$, LVmass: 216 ± 95 σε 305 ± 102 $p < 0.001$, LVMI: 111 ± 39 σε 167 ± 52 $p < 0.001$). Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την άποψη της παράλληλης εξέλιξης καρδιακής και νεφρικής βλάβης από τα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της διπαραγοντικής συσχέτισης βρέθηκε σημαντική, αρνητική συσχέτιση μεταξύ των τιμών των IVSTd, PWTd, RWT, LVmass, LVMI και του eGFR (Spearman's $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ αντίστοιχα). Από την ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης φάνηκε ότι από τους κλινικούς παράγοντες πρόβλεψης μόνο η ηλικία επηρέασε σημαντικά την ισχυρή συσχέτιση των δύο μεταβλητών, του eGFR και του LVMI ($p < 0.001$). Από τους εργαστηριακούς παράγοντες τα επίπεδα ινωδογόνου του πλάσματος, τα επίπεδα VCAM-1 του ορού καθώς και τα επίπεδα του αποπτωτικού παράγοντα Fas βρέθηκε ότι επηρέασαν σημαντικά τη συσχέτιση των δύο μεταβλητών ($p < 0.001$). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να στηρίξουν την πιθανή αλληλεπίδραση αποπτωτικών και φλεγμονωδών παραγόντων και τις επιδράσεις αυτών στην παράλληλη εξέλιξη νεφρικής και καρδιαγγειακής βλάβης.

Όσον αφορά στη γεωμετρία της καρδιάς μόνο 37 από 206 ασθενείς (18%) είχαν φυσιολογικά ευρήματα, 9 ασθενείς (4.5%) είχαν ευρήματα συγκεντρικής αναδιαμόρφωσης και 57 (28%) ασθενείς είχαν ευρήματα συγκεντρικής υπερτροφίας, ενώ η έκκεντρη υπερτροφία διαπιστώθηκε σε ποσοστό 50% των



ασθενών. Η διαστολική λειτουργία βρέθηκε φυσιολογική σε ποσοστό 85% των ασθενών, ενώ 15% (31 ασθενείς) είχαν παθολογικό κλάσμα Ε/Α. Τέλος, 5 ασθενείς από το σύνολο των 217 ασθενών, ποσοστό 2.3%, είχαν ΕF μικρότερο του 50%, το οποίο είναι ενδεικτικό διαταραχής της συστολικής λειτουργίας της LV και όλοι αυτοί οι ασθενείς έπασχαν από στεφανιαία νόσο. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι οι διαταραχές της καρδιακής γεωμετρίας εμφανίζονται σε πολύ πρώιμα στάδια της ΧΝΝ και μάλιστα σε πολύ υψηλά ποσοστά.

Η έκφραση του Bcl-2 βρέθηκε να μειώνεται σημαντικά τόσο στα λεμφοκύτταρα όσο και στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος με την πρόοδο των σταδίων της ΧΝΝ ($p < 0.002$ και 0.001 αντίστοιχα), υποδηλώνοντας έτσι ότι η αντι-αποπτωτική δραστηριότητα μειώνεται με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας. Αντίθετα, η δραστηριότητα του αποπτωτικού μορίου Fas αυξήθηκε σημαντικά και το ίδιο παρατηρήθηκε και με τα επίπεδα στο ορό του TNF- α από το στάδιο 1 προς το στάδιο 4 της ΧΝΝ. Τα ποσοστά των λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων που συνέδεαν την Annexin V- PI καθώς και τα επίπεδα του Fas ligand στον ορό δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων σταδίων της ΧΝΝ. Από την ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης φάνηκε ότι η ισχυρή συσχέτιση του eGFR με το δείκτη απόπτωσης Fas δεν επηρεάστηκε σημαντικά από κανένα από τους κλινικούς παράγοντες πρόβλεψης που επιλέχθηκαν για το προσαρμοσμένο μοντέλο, ενώ από τους εργαστηριακούς παράγοντες τα επίπεδα ορού των VCAM-1 βρέθηκε ότι επηρέασαν σημαντικά τη συσχέτιση των δύο μεταβλητών ($p = 0.001$). Τα επίπεδα VCAM-1 του ορού βρέθηκε επίσης ότι επηρέασαν σημαντικά τη συσχέτιση του eGFR με τον TNF- α ($p = 0.003$) πιθανολογώντας την αλληλεπίδραση αποπτωτικών και φλεγμονωδών μηχανισμών στην εξέλιξη της ΧΝΝ. Τέλος από τους κλινικούς παράγοντες πρόβλεψης διαπιστώθηκε ότι οι τιμές του BMI επηρέασαν σημαντικά τη συσχέτιση των δύο μεταβλητών, eGFR και TNF- α ($p = 0.001$).

Από τους δείκτες του ΟΣ που μετρήθηκαν μόνο τα επίπεδα των 8-epiPGF2a αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά με την επιδείνωση του σταδίου της ΧΝΝ ($p < 0.001$). Από την ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης φάνηκε ότι η συσχέτιση του eGFR με τα επίπεδα των 8-epiPGF2a επηρεάστηκε σημαντικά από την ηλικία ($p < 0.001$) και το BMI ($p = 0.001$). Από τους εργαστηριακούς παράγοντες η Hb, η sAlb, τα επίπεδα ορού των VCAM-1 και του αποπτωτικού μορίου Fas βρέθηκαν ότι επηρέασαν σημαντικά τη συσχέτιση των δύο μεταβλητών. Με τα αποτελέσματα

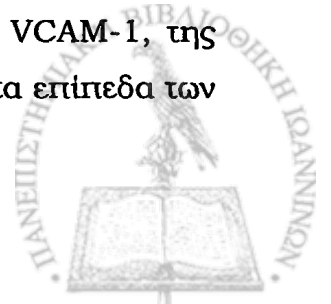


αυτά ενισχύεται η σημασία του ρόλου τόσο των παραδοσιακών παραγόντων όπως η ηλικία και το αυξημένο σωματικό βάρος, όσο και των μη παραδοσιακών παραγόντων, όπως η αναιμία, η ανεπαρκής θρέψη και η φλεγμονή στα αρχικά στάδια της ΧΝΝ και πιθανολογείται κάποιου είδους αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

Από τους δείκτες της φλεγμονής σημαντική, αρνητική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ των επιπέδων των VCAM-1 ($p < 0.001$), της IL-6 ($p = 0.013$) και του ινωδογόνου ($p < 0.001$) με τον eGFR. Αντίθετα δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των CRP, ICAM-1 και της νεφρική λειτουργίας. Από την ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης φάνηκε ότι η σημαντική, αρνητική συσχέτιση του eGFR με το δείκτη φλεγμονής VCAM-1 δεν επηρεάστηκε σημαντικά από κανένα από τους κλινικούς παράγοντες πρόβλεψης που επιλέχθηκαν για το προσαρμοσμένο μοντέλο ενώ από τους εργαστηριακούς παράγοντες ο παράγοντας πρόβλεψης που επηρέασε σημαντικότερα τη συσχέτιση ήταν το αποπτωτικό μόριο Fas ($p = 0.003$), γεγονός που ενισχύει την πιθανολογούμενη αλληλοεπίδραση απόπτωσης και φλεγμονής ήδη από τα πρώιμα στάδια της ΧΝΝ. Όσον αφορά στη συσχέτιση του eGFR με το ινωδογόνο αυτή επηρεάστηκε οριακά σημαντικά από τη συστολική ΑΠ ($p < 0.05$), ενώ από τους εργαστηριακούς παράγοντες πρόβλεψης η sAlb ($p < 0.001$), ο παράγοντας Fas ($p = 0.002$) και ο LVMI επηρέασαν σημαντικά τη συσχέτιση των δύο μεταβλητών ($p = 0.005$).

Από τη συσχέτιση του δείκτη LVMI με τις εξειδικευμένες παραμέτρους της απόπτωσης, του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής διαπιστώθηκαν οι παρακάτω σημαντικές συσχετίσεις: ο LVMI βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά με το αποπτωτικό μόριο Fas ($p < 0.001$), με τον TNF- α ($p = 0.01$), τα επίπεδα των 8-epiPGF2a ($p = 0.03$), τα επίπεδα των VCAM-1 ($p < 0.001$), της IL-6 ($p = 0.005$) και του ινωδογόνου ($p < 0.001$).

Όσον αφορά στις συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών απόπτωσης, ΟΣ, φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας διαπιστώθηκαν αρκετές ενδιαφέρουσες συσχετίσεις. Η έκφραση του Bcl-2 στα λεμφοκύτταρα βρέθηκε να σχετίζεται αρνητικά με το αποπτωτικό μόριο Fas και τα επίπεδα των καρβονυλίων. Σημαντική αρνητική συσχέτιση βρέθηκε να έχει η έκφραση του Bcl-2 στα μονοκύτταρα με τα επίπεδα του Fas, των καρβονυλίων, της IL-6 και του ινωδογόνου. Τα επίπεδα του Fas βρέθηκε να σχετίζονταν θετικά με τα επίπεδα του TNF- α , των VCAM-1, της IL-6 και του ινωδογόνου, ο δε FasL βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα των



VCAM-1 και αρνητικά με τα επίπεδα του ινωδογόνου. Τέλος από τους δείκτες της απόπτωσης ο TNF-α σχετιζόνταν σημαντικά, θετικά και με τα επίπεδα των VCAM-1, των ICAM-1, της IL-6 και του ινωδογόνου.

Για τους δείκτες του OS εκτός από τις προαναφερθείσες συσχετίσεις τους με τους δείκτες της απόπτωσης διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα των 8-epiPGF2a σχετιζόνταν θετικά με τα επίπεδα των VCAM-1, των ICAM-1, του ινωδογόνου και της CRP. Όσον αφορά στους δείκτες φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, τα επίπεδα των VCAM-1 σχετιζόνταν θετικά με τα επίπεδα όλων των άλλων δεικτών φλεγμονής εκτός από τη CRP, ενώ τα επίπεδα των ICAM-1 σχετιζόνταν θετικά με τη CRP. Επιπλέον, τα επίπεδα της IL-6 σχετιζόνταν θετικά με το ινωδογόνο και τη CRP γεγονός το οποίο είναι θεωρητικά απόλυτα δικαιολογημένο αφού η IL-6 αποτελεί την κύρια κυττοκίνη που διεγείρει την παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών οξείας αντίδρασης. Τέλος το ινωδογόνο πλάσματος και η CRP ορού βρέθηκε να έχουν σημαντική, θετική συσχέτιση μεταξύ τους.

Συμπεράσματα: Η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας και οι διαταραχές της καρδιακής γεωμετρίας εμφανίσθηκαν σε πολύ πρώιμα στάδια της ΧΝΝ σε πολύ υψηλά ποσοστά και εξελίχθηκαν παράλληλα με την εξέλιξη νεφρικής βλάβης. Με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας μειώθηκε σημαντικά η αντι-αποπτωτική και αντίθετα αυξήθηκαν η προ-αποπτωτική και προ-οξειδωτική δραστηριότητα. Παράλληλα, με την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας αυξήθηκαν σημαντικά οι δείκτες της φλεγμονής IL-6 και ινωδογόνο καθώς και ο δείκτης ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, VCAM-1. Ο LVMI βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά με τους δείκτες που εκφράζουν την προ-αποπτωτική (Fas και TNF-α), την προ-οξειδωτική (8-epiPGF2a) και την προ-φλεγμονώδη (VCAM-1, IL-6 και ινωδογόνο) δραστηριότητα. Οι παράμετροι της απόπτωσης, του OS και της φλεγμονής έδειξαν σημαντικές αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των και με άλλους συμβατικούς κλινικούς και εργαστηριακούς παράγοντες κινδύνου, γεγονός που συνηγορεί υπέρ του ρόλου των ως κοινών παραγόντων κινδύνου για την παράλληλη εξέλιξη της νεφρικής και καρδιακής βλάβης. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν υπέρ της έγκαιρης εκτίμησης των ασθενών με ΧΝΝ στα πρώιμα στάδια και ολιστικής παρέμβασης στους παράγοντες κινδύνου που ευθύνονται για την εξέλιξη της καρδιονεφρικής βλάβης.



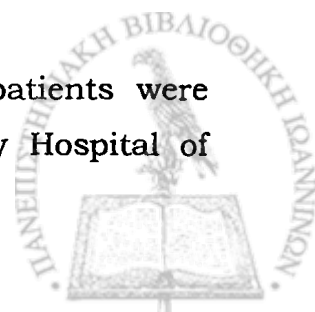
SUMMARY

Introduction: Chronic kidney disease (CKD) constitutes a huge epidemiological problem in the world and the annual incidence of patients ending to dialysis has been increasing by 5-8 %. It is estimated that the number of haemodialysis (HD) patients in the world from 1.1 million in 2001 will increase to 2 million in 2010 and the global cost will exceed 1 trillion USD in 2010. The proportion of patients in the general population of USA with CKD stages 1-5 accounts to nearly 11%, which is 60-times more compared to the number of patients starting HD, indicating that a large number of patients with CKD in the general population is asymptomatic, while a large number of these patients will die from cardiovascular disease before receiving renal replacement therapy. Once CKD is established sooner or later it is expected to progress to end-stage renal failure and dialysis. However, despite the significance of the above arguments there is lack of large longitudinal studies on the natural history of CKD progression and effectively it is unknown how many and when patients with CKD will end up to dialysis. It is apparent, therefore, that there is urgent need for well-designed prospective studies in order to define the rate of CKD progression and pathophysiological disturbances, mainly related to cardiovascular function, that are associated with this progression.

In Greece there is complete lack of information about the number of patients with variable stages of CKD in the general population. Furthermore, there is not any information at all on the incidence of risk factors that are related to the progression of cardiovascular injury. Besides the conventional risk factors that were described by the Framingham Study, it is known that other factors related to uraemia may contribute to the pathophysiological alterations of the cardiorenal damage. Among the latter factors oxidative stress (OS), apoptosis and inflammation play a pivotal role in this process.

The aim of this thesis was to study the incidence of CKD stages 1-4 and define associated echocardiographic findings in a selected population of outpatients in two departments of nephrology and relate risk factors with the progression of both renal and cardiac injury.

Patients-Methods: Two hundred and ninety nine adult patients were studied from the outpatient clinics of two hospitals (University Hospital of



Ioannina and General Hospital of Veria). There were 119 men (52%) and 110 women (48%) and their mean age was 64.8 years. The main primary renal diseases were hypertensive nephrosclerosis (15%), diabetic nephropathy (14%) and interstitial nephropathy (11%), while in 35% of the patients the primary cause was unknown. At recruitment all patients were screened for demographic, anthropometric and clinical parameters and full haematological and biochemistry tests were carried out. For the classification into CKD stages 1-4 the MDRD equation was used and the distribution of the patients was: 24 (10.5%), 58 (25.3%), 85 (37.1%), 62 (27.1%) in the respective CKD stages 1-4. Also at recruitment specific parameters of apoptosis, OS, inflammation and endothelial dysfunction were carried out. Namely, apoptotic activity was measured by the expression of Bcl-2 and Annexin V-PI in peripheral mononuclear cells and the serum levels of Fas, FasL, and TNF- α , while oxidative stress activity was reflected by measuring serum levels of 8-epiPGF2a, oxidized-LDL (ox-LDL), carbonyls and total antioxidant status (TAS). Chronic inflammation and endothelial dysfunction were assessed by estimation of serum CRP, ICAM-1, VCAM-1, IL-6 and plasma fibrinogen.

Echocardiographic examination was carried out in all patients within one month from recruitment including measurement of RWT, IVSTd, PWTd, LVDD, LVDs, LVmass and LVMI. Also estimations of fraction shortening (FS) and ejection fraction (EF) were available, while diastolic dysfunction was estimated by measuring diastolic fill of the LV and recording the maximal velocity of the first diastolic fill (E) and the following maximal velocity of the atrial fill (A) in order to calculate the ratio E/A.

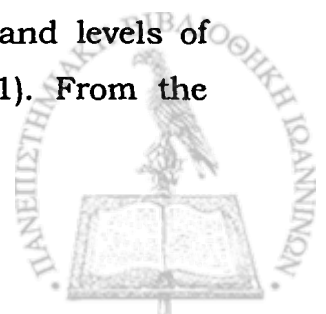
Statistical analysis was carried out by the SPSS 11. Comparison of mean values of different parameters in the CKD stages 1-4 were carried out using analysis of variance (ANOVA), while correlation between two continuous variables was done using the non-parametric Spearman correlation. Stepwise multiple regression analysis was also applied in order to discriminate the most significant cofounders interfering between the association of eGFR and echocardiographic findings, and the specific markers of apoptosis, OS and inflammation.



Results: IVSTd, PWTd, RWT, LVmass and LVMI increased significantly for CKD stage 1 to 4, (IVSTd: 0.95 ± 0.2 to 1.2 ± 0.3 $p < 0.001$, PWTd: 0.8 ± 0.1 to 1 ± 0.25 $p < 0.001$, RWT: 0.33 ± 0.06 to 0.43 ± 0.1 $p < 0.001$, LVmass: 216 ± 95 to 305 ± 102 $p < 0.001$, LVMI: 111 ± 39 to 167 ± 52 $p < 0.001$), and all these parameters correlated significantly with eGFR ($p < 0.001$). Stepwise multiple regression showed that age, plasma fibrinogen and serum levels of VCAM-1 and Fas affected the correlation between eGFR and echo findings but did not reverse the significance. With regards to cardiac geometry only 37 of 206 patients (18%) had normal echo findings, 9 patients (4.5%) had concentric remodelling and 57 patients (28%) had concentric hypertrophy, while eccentric hypertrophy was observed in 50% of the patients. Diastolic function was normal in 85% of patients, while 15% (31 patients) had abnormal E/A fraction. Finally, 5 of the 217 patients (2.3%) had $EF < 50\%$, indicating LV systolic dysfunction and all these patients were suffering from ischemic heart disease. These findings suggest that cardiac remodelling takes place early during the progression of CKD and abnormalities of cardiac geometry may be found in a large proportion of patients with early stages of CKD.

Expression of Bcl-2 was found to reduce significantly in peripheral blood monocytes as CKD was progressing ($p < 0.002$ and 0.001 respectively), indicating that anti-apoptotic activity was declining. In contrast, the activity of the pro-apoptotic molecule Fas increased significantly from stage CKD1 to 4 and the same was observed with serum levels of TNF- α . The percentages of lymphocytes and monocytes binding to Annexin V- PI and serum levels of Fas ligand did not differ between CKD stages 1-4. Stepwise multiple regression showed that the strong correlation between eGFR and serum Fas was not affected by any of the clinical variables, while BMI had some effect in the association between eGFR and TNF- α ($p = 0.001$). Serum VCAM-1 also had some effect both in the association between eGFR and serum Fas, and eGFR and serum TNF- α implicating the interrelation between apoptotic and pro-inflammatory markers.

With regards to oxidative stress markers only serum levels of 8-epiPGF2a increased significantly with the progression of CKD stages ($p < 0.001$). Stepwise multiple regression showed that the association between eGFR and levels of 8-epiPGF2a was influenced by age ($p < 0.001$) and BMI ($p = 0.001$). From the



laboratory variables Hb, serum albumin, serum VCAM-1 and Fas were also found to affect the association of the two variables, suggesting the interplay between traditional risk factors (age, BMI) and non-traditional factors (anaemia, malnutrition, inflammation) in the pathophysiologic alterations during the early stages of CKD.

The pro-inflammatory markers VCAM-1, IL-6 and fibrinogen showed a significant negative correlation with eGFR ($p < 0.001$, $p = 0.013$ and $p < 0.001$ respectively). In contrast no correlation was found between levels of CRP, ICAM-1 and eGFR. Stepwise multiple regression showed that the association between eGFR and VCAM-1 was independent of the effect of any clinical variable, while Fas had some effect ($p = 0.003$). Finally, the association between eGFR and fibrinogen was affected by serum albumin, serum Fas, LVMI and blood pressure ($p < 0.001$, $p = 0.002$, $p = 0.005$ and $p < 0.05$ respectively).

With regards to the relation between LVMI, as most representative of the echocardiographic parameters, and the markers of apoptosis, OS and inflammation it was found that LVMI correlated significantly with the pro-apoptotic molecule Fas, serum TNF- α , serum 8-epiPGF2a, serum VCAM-1, IL-6 and plasma fibrinogen ($p < 0.001$, $p = 0.01$, $p = 0.03$, $p < 0.001$, $p = 0.005$ and $p < 0.001$ respectively).

Interrelations between markers of apoptosis, OS and inflammation showed that there was a number of variable significant correlations between Bcl-2 vs. Fas, carbonyls, TNF- α , fibrinogen (negative). Serum soluble Fas levels correlated positively with VCAM-1, IL-6 and fibrinogen and FasL correlated positively with VCAM-1 and negatively with fibrinogen, while TNF- α had a significant positive correlation with serum VCAM-1, ICAM-1, IL-6 and plasma fibrinogen. Furthermore, serum 8-epiPGF2a were found to correlate significantly with serum VCAM-1, ICAM-1 and fibrinogen. Regarding markers of inflammation and endothelial dysfunction serum VCAM-1 levels correlated positively with levels of all other inflammation markers except from CRP, while ICAM-1 levels correlated positively with CRP. Serum IL-6 levels had an absolutely justified positive correlation with CRP and plasma fibrinogen, as IL-6 is mainly responsible for the increased production of these two acute phase proteins. Finally plasma fibrinogen and serum CRP had a significant positive correlation.



Conclusions: LVH and abnormalities in cardiac geometry appeared in high percentages in the early stages of CKD and progressed in parallel with the progression of CKD. As renal function declined there was a significant reduction in anti-apoptotic activity and an increased pro-apoptotic and pro-oxidative activity. Furthermore, there was a significant increase of the pro-inflammatory markers, namely VCAM-1, IL-6 and fibrinogen. LVMI was found to correlate significantly with pro-apoptotic (Fas and TNF- α), pro-oxidative (8-epiPGF2a) and pro-inflammatory markers (VCAM-1, IL-6 and plasma fibrinogen). The parameters of apoptosis, OS inflammation and endothelial dysfunction showed a number of variable correlations between each other and between other clinical and laboratory variables suggesting their interplay as common risk factors - traditional and non-traditional- of the parallel progression of the cardiorenal injury. These findings suggest that prompt assessment of patients with CKD is mandatory during the early stages and holistic intervention against risk factors contributing to damage of both organs may prevent the progression of kidney and cardiac disease.



H. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

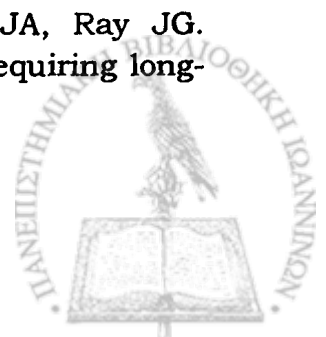
1. Nahas ME. The global challenge of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005;68:2918-2929
2. Nawnkwo E, Bello AK, Nahas ME. Chronic kidney disease: Stemming the global tide. *Am J Kidney Dis* 2005;45:201-208
3. Lysaght MJ. Maintenance dialysis population dynamics: Current trends and long-term implications. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(Suppl 1):S37-S40
4. Kidney Disease Outcome Quality Initiative. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39(Suppl 2):S1-S246.
5. Coresh J, Astor BC, Greene T, et al. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 2003;41:1-12
6. US Renal Data System. *USRDS 1998 Annual Data Report*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Bethesda, MD, 1998
7. Coresh J, Byrd-Holt D, Astor BC, et al. Chronic kidney disease awareness, prevalence, and trends among US adults, 1999 to 2000. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:180-188
8. Keith DS, Nichols GA, Gullion CM, et al. Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med* 2004;164:659-663
9. Chadban SJ, Briganti EM, Kerr PG, et al. Prevalence of kidney damage in Australian adults: The AusDiab Kidney Study. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(7 Suppl 2):S131-S138
10. Iseki K. The Okinawa screening program. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(7 Suppl 2):S127-S130
11. Ramirez SP, Hsu SI, McClellan W. Taking a public health approach to the prevention of end-stage renal disease: The NKF Singapore Program. *Kidney Int* 2003;63(Suppl 83s):S61-S65
12. Mani MK. Prevention of chronic renal failure at the community level. *Kidney Int* 2003;63(Suppl 83s):S86-S89
13. McDonald SP, Maguire GP, Hoy WE. Renal function and cardiovascular risk markers in a remote Australian Aboriginal community. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1555-1561



14. Stidley CA, Shah VO, Narva AS, et al. A population-based, cross-sectional survey of the Zuni Pueblo: A collaborative approach of to an epidemic of kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2002;39:358-368
15. Brown WW, Peters RM, Ohmit SE et al. Early detection of kidney disease in community settings. The Kidney Early Evaluation Program (KEEP). *Am J Kidney Dis* 2003;42:22-35
16. ERA-EDTA REGISTRY. ERA-EDTA Registry 2002, Annual Report, Amsterdam, The Netherlands, 2004. Academic Medical Centre, 2004
17. Magnason RL, Indridason OS, Sigvaldason H, et al. Prevalence and progression of CRF in Iceland: A population-based study. *Am J Kidney Dis* 2002;39:358-368
18. Drey N, Roderick P, Mullee M, Rogerson M. A population-based study of the incidence and outcome of diagnosed chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003;42:677-684
19. John R, Webb M, Young A, Stevens PE. Unreferred chronic kidney disease. A longitudinal study. *Am J Kidney Dis* 2004;43:825-835
20. Ejerblad E, Fored CM, Lindblad P, et al. Association between smoking and chronic failure in a nationwide population-based case-control study. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2178-2185
21. Cirillo M, Laurenzi M, Panarelli P, et al. Relation of urinary albumin excretion to coronary heart disease and low renal function. *Kidney Int* 2004;65:2290-2297
22. Feest TG, Mistry CD, Grimes DS, Mallick NP. Incidence of advanced chronic renal failure and the need for end stage renal replacement treatment. *BMJ* 1990;301:897-900
23. Khan IH, Catto GR, Edward N, Macleod AM. Chronic renal failure: Factors influencing nephrology referral. *QJM* 1994;87:559-564
24. Bruno G, Biggeri A, Merletti F, et al. Low incidence of end-stage renal disease and chronic renal failure in type 2 diabetes: A 10-year prospective study. *Diabetes Care* 2003;26:2353-2358
25. Kissmeyer L, Kong C, Cohen J, et al. Community nephrology: Audit of screening of renal insufficiency in a high risk population. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:2150-2155
26. Verhave JC, Gansevoort RT, Hillege HL, et al. An elevated urinary albumin excretion predicts de novo and development of renal function impairment in the general population. *Kidney Int* 2004;66(Suppl 92s):S18-S21



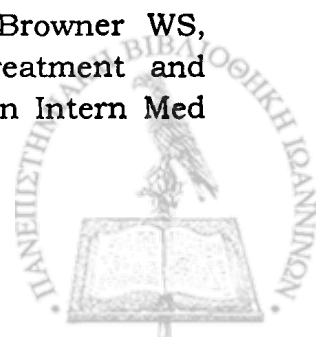
27. Chen ML, Hsu C-Y. Should the K/DOQI definition of chronic kidney disease be changed? *Am J Kidney Dis* 2003;42:623-625
28. Levy AS, Eckart K-U, Tsukamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney failure: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005;67:2089-2100
29. Coresh J, Astor BC, McQuilan G, et al. Calibration and random variation of the serum creatinine assay as criteria elements of using equations to estimate glomerular filtration rate. *Am J Kidney Dis* 2002;39:920-929
30. Hallan S, Asberg A, Lindeberg M, et al. Validation of the Modification of Diet in Renal Disease for estimating GFR with special emphasis on calibration of the serum creatinine assay. *Am J Kidney Dis* 2004;44:84-93
31. Lin J, Knight ER, Hogan Ml, Singh AK. A comparison of prediction equations for estimating GFR in adults without kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2573-2580
32. Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing kidney function- Measured and estimated glomerular filtration rate. *New Engl J Med* 2006;354 :2473-83.
33. Agarwal R. Estimating GFR from serum creatinine concentration: Pitfalls of GFR-estimating equations. *Am J Kidney Dis* 2005;45:610-613
34. Froissart M, Rossert J, Jaqout C, Paillard M, Houillier P. Predictive performance of the MDRD and Cockcroft -Gault estimations for estimating renal function. *J Am S Nephrol* 2005;16:763-773
35. Vervoort G, Willems HL, Wetzels JFM. Assessment of glomerular filtration rate in healthy subjects and normoalbuminuric diabetic patients: validity of a new (MDRD) prediction formula. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:1909-1913
36. Rule AD, Larson TS, Bergstralh EJ, Slezak JM, Jacobsen SJ, Cosio FG. Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease. *Ann Intern Med* 2004;141:929-937
37. Victorsdottir O, Palsson R, Andresdottir MB, Aspelund T, Gudnason V, Indridason OS. Prevalance of chronic kidney disease based on estimated glomerular filtration rate and proteinuria in Icelandic adults. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1799-1807
38. Garg AX, Papaioannou A, Ferko N, Campbell G, Clark JA, Ray JG. Estimating the prevalence of renal insufficiency in seniors requiring long-term care. *Kidney Int* 2004;65:649-653



39. Ibrahim H, Mondress M, Tello A, Ying F, Koopmeiners, Thomas W. An alternative formula to the Cockcroft-Gault and MDRD formulas in predicting GFR in individuals with type 1 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1051-1060
40. Rigalleau V, Lasseur C, Perlemoine C et al. Estimation of glomerular filtration rate in diabetic subjects: Cockcroft formula or modification of Diet in Renal Disease study equation?. *Diabetes Care* 2005;28:838-843
41. Manjunath G, Sarnak MJ, Levey AS. Estimating glomerular filtration rate. Dos and don'ts for assessing kidney function. *Postgrad Med* 2001;110:55-62
42. Pierrat A, Gravier E, Saunders C, Caira MV, Ait-Djafer Z, Legras B, Mallie JP. Predicting GFR in children and adults: a comparison of the Cockcroft-Gault and MDRD formulas. *Kidney Int* 2003;64:1425-36
43. Poggio ED, Nef PC, Wang X, Greene T, Nan de lente F, Dennis VW, Hall PM. Performance of the Cockcroft-Gault and MDRD equations in estimating GFR in ill hospitalizes patients. *Am J Kidney Dis* 2005;46:242-52
44. Hoste EAJ, Damen J, Vanholder RC, et al. Assessment of renal function in recently admitted critically ill patients with normal serum creatinine. *Neprhol Dial Trasnplant* 2005;20:747-753
45. Levin A. Clinical epidemiology and cardiovascular disease in chronic kidney disease prior to dialysis. *Seminars Dial* 2003;6:101-105
46. Parfrey P. Is renal insufficiency an atherogenic state? Reflections on prevalence; incidence and risk. *Am J Kidney Dis* 2001;37:154-157
47. Stenvinkel P, Pecoits-Filtho R, Lindholm B. Coronary artery disease in end-stage renal disease: no longer a simple plumping problem. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1427-1439
48. US Renal Data System 1998. USRD annual report. *Am J Kidney Dis* 1998;32 (Suppl 1): S69-S80
49. Menon V, Sarnak MJ. The epidemiology of chronic kidney disease stages 1 to 4 and cardiovascular disease: A high risk combination. *Am J Kidney Dis* 2005;45:223-232
50. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32 (Suppl 3): S112-S119
51. Foley RN. Clinical epidemiology of cardiac disease in dialysis patients: Left ventricular hypertrophy, ischaemic heart disease and cardiac failure. *Sem Dial* 2003;6:111-117



52. Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD et al. Outcome and risk factors for left ventricular disorders in chronic uraemia. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11:1277-1285
53. Zoccali C. Traditional and emerging cardiovascular and renal risk factors: An epidemiologic prospective. *Kidney Int* 2006;70:26-33
54. Weiner DE, Tighiouart H, Amin MG, et al. Chronic kidney disease as a risk factor for cardiovascular disease and all-cause mortality: a pooled analysis of community based studies. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1307-1315
55. Schillaci G, Reboldi G, Verdecchia P. High normal serum creatinine concentration is a predictor of cardiovascular risk in essential hypertension. *Arch Int Med* 2001;161:886-891
56. De Leeuw PW, Thijs L, Birkenhager WH, et al. Prognostic significance of renal function in elderly patients with isolated systolic hypertension. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2213-2222
57. Anavekar NS, McMurray JJ, Velasquez EJ, et al. Relation between renal dysfunction and cardiovascular outcomes after myocardial infarction. *New Engl J Med* 2004;351:1285-1295
58. Culeton BF, Larson MG, Wilson PW, et al. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int* 1999;56:2214-2219
59. Shlipak MG, Smith GL, Rathore SS, et al. Renal function, digoxin therapy and heart failure outcomes: evidence from the digoxin intervention group study. *J AM SOC NEPHROL* 2004; 15:2195-2203
60. Go AS, Chertow GM, Fan D, et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events and hospitalization. *New Engl J Med* 2004; 23:1296-1305
61. Matts JP, Karnegis JN, Campos CT, et al. Serum creatinine as an independent predictor of coronary heart disease mortality in normotensive survivors of myocardial infarction. POSCH Group. *J Fam Pract* 1993;36:497-503
62. Wright RS, Reeder GS, Herzog CA, et al. Acute myocardial infarction and renal dysfunction: a high-risk combination. *Ann Intern Med* 2002 ;137 :563-570
63. Shlipak MG, Heidenreich PA, Noguchi H, Chertow GM, Browner WS, McClellan MB. Association of renal insufficiency with treatment and outcomes after myocardial infarction in elderly patients. *Ann Intern Med* 2002 ;137 :555-562



64. Reis SE, Olson MB, Fried L, et al. Mild renal insufficiency is associated with angiographic coronary artery disease in women. *Circulation*. 2002;105:2826-2829
65. Best PJ, Lennon R, Ting HH, et al. The impact of renal insufficiency on clinical outcomes in patients undergoing percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1113-1119
66. Anderson B, Higgins L, Rozmus C. Critical pathways: application to selected patient outcomes following coronary artery bypass graft. *Appl Nurs Res* 1999;12:168-74
67. Czczech LA, Reddan DN, Owen WF, Califf R, Racz M, Jones RH, Hannan EL. Differential survival after coronary revascularization procedures among patients with renal insufficiency. *Kidney Int* 2001;60:292-299
68. Mann JF, Gerstein HC, Pogue J, Bosch J, Yusuf S. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: the HOPE randomized trial. *Ann Intern Med* 2001;134:629-636
69. Tonelli M, Moye L, Sacks FM, Cole T, Curhan GC. Cholesterol and recurrent events trial investigators. *J Am Soc Nephrol* 2003 ;14 :1605-13
70. Shlipak MG, Fried LF, Crump C, et al. Cardiovascular disease risk status in elderly persons with renal insufficiency. *Kidney Int* 2002;62:997-1004
71. Muntner P, He J, Hamm L, et al. Renal insufficiency and subsequent death resulting from cardiovascular disease in the United States. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:745-53
72. Manjunath G, Tighiouart H, Ibrahim H, et al. Level of kidney function as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular outcomes in the community. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:47-55
73. McClellan WM, Flanders WD, Langston RD, Jurkovitz C, Presley R. Anaemia and renal insufficiency are independent risk factors for death among patients with congestive heart failure admitted to community hospitals: A population-based study. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1928-1936
74. Hillege HL, Girbes ARJ, Kam PJ, et al. Renal function, neurohormonal activation, and survival in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000;102:203-210
75. Gottlieb SS, Abraham W, Butler J, et al. The prognostic importance of different definitions of worsening renal function in congestive heart failure. *J Card Fail* 2002;8:136-141



76. de Santo NG, Cirillo M, Perna A, et al. The kidney in heart failure. *Semin Nephrol* 2005;25:404-407
77. Shlipak MG, Massie BM. The clinical challenge of cardiorenal syndrome. *Circulation* 2004;110:1514-7
78. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, ND Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003, 108: 2154-2169
79. Magnus P, Beaglehole R. The real contribution of the major risk factors to the coronary epidemics: time to end the 'only-50%' myth. *Arch Intern Med* 2001;161: 2657-2660
80. Sarnak MJ, Coronado BE, Greene T, et al. Cardiovascular disease risk factors in chronic renal insufficiency. *Clin Nephrol* 2002, 57: 327-335
81. Weiner DE, Tighiouart H, Elsayed EF, et al. The Framingham predictive instrument in chronic kidney disease. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:217-24
82. Kalantar-Zadeh K, Block G, Humphreys MH, et al. Reverse epidemiology of cardiovascular risk factors in maintenance dialysis patients. *Kidney Int* 2003, 63: 793-808
83. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, et al. The elephant in uremia: Oxidative stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002; 62:1524-38
84. Galle J, Quaschnig T, Seibold S, Wanner C. Endothelial dysfunction and inflammation: what is the link? *Kidney Int* 2003;84(Suppl 63):45-49
85. Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol*. 2000;53:55-63. (Review)
86. Xu G, Shi Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Research* 2007;17:759-771
87. Θεοφιλόπουλος Α, Παπαγαλάνης Ν. Απόπτωση και νεφρικές παθήσεις. *Ελληνική Νεφρολογία* 1998;10(4):425-440
88. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 2005;84:627-639
89. Mahoney JA, Rosen A. Apoptosis and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2005;17: 583-588
90. Ekshyyan O, Aw TY. Apoptosis: a key in neurodegenerative disorders. *Curr Neurovasc Res* 2004;1:355-371



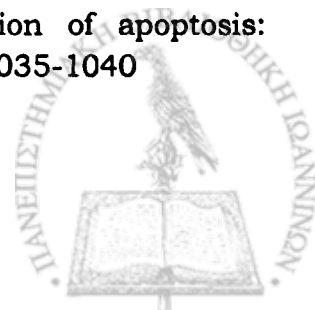
91. Kerr JF. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257
92. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. Mechanisms and function of cell death. *Ann Rev Cell Biol* 1991;7:663-698
93. Hengartner MO, Horvitz HR. Hengartner MO et al. *C.elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 1994;76:665-676
94. Majno G. Apoptosis, oncosis, necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15
95. Dong Z. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* 1997;151:1205-1213
96. Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* 1997;53:491-508
97. Savill J. Apoptosis. Phagocytic docking without shocking. *Nature* 1998;392:442-443
98. Martin SJ. Phosphatidylserine extranalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem* 1996;271:28753-28756
99. Dinenko VV. Biotin-labeled hairpin oligonucleotids. Probes to detect double-strand breaks in DNA in apoptotic cells. *Am J Pathol* 1998;152:897-902
100. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998;281:1317-22
101. Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999;35:531-539
102. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Möller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989;245:301-305
103. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991;66:233-243
104. Suda T, Takahashi T, Golstein P, et al. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75:1169-1178



105. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673-682
106. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996;271:12687-12690
107. Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 1993;268:10932-10937
108. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, et al. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993;74(5):845-853
109. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, et al. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998;254:439-459
110. Bajorath J, Aruffo A. Prediction of the three-dimensional structure of the human Fas receptor by comparative molecular modeling. *J Comput Aided Mol Des* 1997;11:3-8
111. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, et al. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81:505-512
112. Irmeler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190-195
113. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17:1675-1687
114. Sato M, Konuma T, Yanagisawa N, et al. Fas-Fas Ligand system in the peripheral blood of patients with renal disease. *Nephron* 2000;85:107-113
115. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that release tumour-necrosis factor alpha from cells. *Nature* 1997;385:729-733
116. Adams JM, Suzanne Cory. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* 1998;281:1322
117. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, et al. Involvement of the Bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985;228:1440-1443
118. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619
119. Cheng EH, Levine B, Boise LH, et al. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-xL. *Nature* 1996;379:554-556



120. Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, et al. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 1995;270:96-99
121. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, et al. Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* 1996;13:21-29
122. Yasuhara N, Sahara S, Kamada S, et al. Evidence against a functional site for Bcl-2 downstream of caspase cascade in preventing apoptosis. *Oncogene* 1997;15:1921-1928
123. Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, et al. Multiple subcellular localization of Bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1994;54:2468-2471
124. Chinnaiyan AM, Orth K, O'Rourke K, et al. Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases. *J Biol Chem* 1996;271:4573-4576
125. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-489
126. Narita M, Shimizu S, Ito T, et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14681-14686
127. Matsuyama S, Xu Q, Velours J, et al. The Mitochondrial FOF1-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell* 1998;1:327-336
128. Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 1998;94:739-750
129. Juin P, Hueber AO, Littlewood T, et al. c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev* 1999;13:1367-81
130. Silke J, Verhagen AM, Ekert PG, et al. Sequence as well as functional similarity for DIABLO/Smac and Grim, Reaper and Hid? *Cell Death Differ* 2000;7:1275
131. Green D. Apoptotic Pathways, Paper Wraps Stone, Blunts Scissors. *Cell* 2000;102:1-4
132. Nicotera P, Leist M, Single B, Volbracht C. Execution of apoptosis: converging or diverging pathways? *Biol Chem* 1999;380:1035-1040



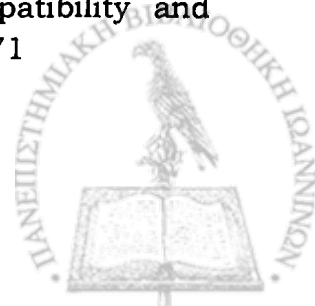
133. Lazebnik YA, Takahashi A, Poirier GG, et al. Characterization of the execution phase of apoptosis in vitro using extracts from condemned-phase cells. *J Cell Sci* 1995;19:41-49
134. <http://en.wikipedia.org/wiki/Caspase>
135. Phil Dash. Basic Medical Sciences, St. George's, University of London. www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash
136. Woo D. Apoptosis and loss of renal tissue in PKD. *N Engl J Med* 1995;333(1):18-25
137. Lanoix J. Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates autosomal dominant PKD. *Oncogene* 1996;13:1153-1160
138. Trudel M, Barisoni L, Lanoix J, et al. PKD in SBM transgenic mice. *Am J Pathol* 1998;152:219-229
139. Trudel M, Lanoix J, Barisoni L, et al. C-myc-induced apoptosis in PKD is Bcl-2 and p53 independent. *J Exp Med* 1997;186:1873-1884
140. Sheridan AM. Pathophysiology of ARF. *Contrib Nephrol* 2001;132:7-21
141. Kelly KJ. Guanosine supplementation reduces apoptosis and protects renal function in the setting of ischemic injury. *J Clin Invest* 2001;108:1291-1298
142. Shimizu A, Yamanaka N. Apoptosis and cell desquamation in repair process of ischemic tubular necrosis. *Virchows Arc* 1993;64:171-180
143. Gobé G. Relationship between expression of Bcl-2 genes and growth factors in ischemic acute renal failure in the rat. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:454-467
144. Kelly K.J. P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:128-138
145. Spandou E, Tsouchnikas I, Karkavelas G, Dounousi E, et al. EPO attenuates renal injury in experimental acute renal failure ischaemic/reperfusion model. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:330-336
146. Yang B. Inflammation and caspase activation in long term renal ischemia/reperfusion injury and immunosuppression in rats. *Kidney Int* 2005;68:2050-2067
147. Hughes J, Savill S. Apoptosis in glomerulonephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14:389-395



148. Savill J. Apoptosis in post-streptococcal glomerulonephritis. *Kidney Int* 2001;60:1203-1214
149. Tashiro K, Kodera S, Takahashi Y, et al. Detection of apoptotic cells in glomeruli of patients with IgA nephropathy. *Nephron* 1998;79:21-27
150. Makino H, Sugiyama H, Yamasaki Y, et al. Glomerular cell apoptosis in human lupus nephritis. *Virchows Arch* 2003;443:67-77
151. Baker AJ, Mooney A, Hughes J, et al. Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest* 1994;94:2105-2116
152. Messmer UK, Winkel G, Briner VA, et al. Suppression of apoptosis by glucocorticoids in glomerular endothelial cells: effects on proapoptotic pathways. *Br J Pharmacol* 2000;129:1673-1683
153. Mené P, Amore A. Apoptosis: potential role in renal diseases. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:1936-1943
154. Meehan SM, McCluskey RT, Pascual M, et al. Cytotoxicity and apoptosis in human renal allografts: identification, distribution, and quantitation of cells with a cytotoxic granule protein GMP-17 (TIA-1) and cells with fragmented nuclear DNA. *Lab Invest* 1997;76:639-649
155. USRDS: the United States Renal Data System. *Am J Kidney Dis* 2003;43:1-230
156. Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF-beta as the major mediator. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(Suppl 1):S55-S57
157. WeNephrol Dial Transplant TM, Tanji N, Guo J, et al. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol* 2003;162:1123-1137
158. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006;69:2131-2147
159. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, et al. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006;55:225-233
160. Chuang PY, Yu Q, Fang W, et al. Advanced glycation endproducts induce podocyte apoptosis by activation of the FOXO4 transcription factor. *Kidney Int* 2007;72:965-976
161. Savill J, Mooney A, Hughes J. What role does apoptosis play in progression of renal disease? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996;5:369-374



162. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 1981;241:F85-F93
163. Eddy AA. Experimental insights into the tubulointerstitial disease accompanying primary glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol* 1994;5:1273-1287
164. Abboud HE. Nephrology forum: growth factors in glomerulonephritis. *Kidney Int* 1993;43:252-267
165. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286-1292
166. Gobé GC, Axelsen RA. Genesis of renal tubular atrophy in experimental hydronephrosis in the rat: role of apoptosis. *Lab Invest* 1987;56:273-282
167. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1988;1:335-347
168. Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and kidney disease, the role of fetal programming. *Hypertension* 2006;46(part2):502-508
169. Schelling JR, Cleveland RP. Involvement of Fas-dependent apoptosis in renal tubular epithelial cell deletion in chronic renal disease. *Kidney Int* 1999;55:1313-1316
170. Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H. Apoptosis in crescentic glomerulonephritis. *Lab Invest* 1996;74:941-951
171. Thomas GL, Yang B, Wagner BE, et al. Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2216-2226
172. Yang B, Johnson TS, Thomas GL, et al. Expression of apoptosis-related genes and proteins in experimental chronic renal scarring. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:275-288
173. Erkan E, Garcia CD, Patterson LT, et al. Induction of renal tubular cell apoptosis in focal segmental glomerulosclerosis: roles of proteinuria and Fas dependent pathways. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:398-407
174. Teteris SA, Menahem SA, Perry G, et al. Dysregulated growth factor gene expression is associated with tubulointerstitial apoptosis and renal dysfunction. *Kidney Int* 2007;71:1044-1053
175. Horl WH. Hemodialysis membranes: interleukins, biocompatibility and middle molecules. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(Suppl 1):S62-S71



176. Jaber B, Cendoroglo M, Balakrishnan VS, et al. Apoptosis of leukocytes: Basic concepts and implications. *Kidney Int* 2001;59(Suppl 78):S197-S205
177. Cendoroglo M, Jaber BL, Balakrishnan VS, et al. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:93-100
178. Jaber B, Balakrishnan VS, Cendoroglo MN, et al. Apoptosis inducing activity of uremic plasma during hemodialysis. *Blood Purif* 1998;16:325-335
179. Rosenkranz AR, Peherstorfer E, Kőrmőczi GF, et al. Complement-dependent acceleration of apoptosis in neutrophils by dialyzer membranes. *Kidney Int* 2001;59(Suppl 78):S216-S220
180. Koller H, Hochegger K, Zlabinger GJ, et al. Apoptosis of human polymorphonuclear neutrophils accelerated by dialysis membranes via activation of the complement system. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:3104-3111
181. Matsumoto Y, Shinzato T, Amano I, et al. Relationship between susceptibility to apoptosis and Fas expression in peripheral blood T cells from uremic patients: A possible mechanism for lymphopenia in chronic renal failure. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;215:98-105
182. Heidenreich S, Schmidt M, Bachmann J, et al. Apoptosis of monocytes cultured from long-term hemodialysis patients. *Kidney Int* 1996;49:792-799
183. Galli F, Ghibelli L, Buoncristiani U, et al. Mononuclear leukocyte apoptosis in haemodialysis patients: the role of cell thiols and vitamin E. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1592-1600
184. Kolioussi E, Vartholomatos G, Katopodis KP, et al. Effect of the hemodialysis session on Bcl-2 expression in peripheral blood mononuclear cells in vivo. *Blood Purif* 2006;24:542-547
185. Jaber B, Perianayagam MC, Balakrishnan VS, et al. Mechanisms of neutrophil apoptosis in uremia and relevance of the Fas (APO-1, CD95)/Fas ligand system. *J Leukoc Biol* 2001;69:1006-1012
186. Majewska E, Baj Z, Sulowska Z, et al. Effects of uraemia and haemodialysis on neutrophil apoptosis and expression of apoptosis-related proteins. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2582-2588
187. Sela S, Shurtz-Swirski R, Cohen-Mazor M, et al. Primed peripheral polymorphonuclear leukocyte: a culprit underlying chronic low-grade inflammation and systemic oxidative stress in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2431-2438



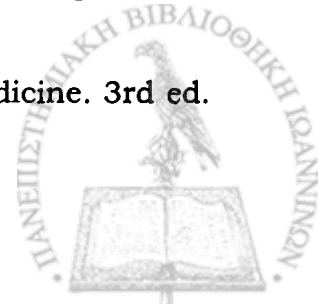
188. Sardenberg C, Suassuna P, Andreoli MC, et al. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:160-165
189. Martin-Malo A, Carracedo J, Ramírez R, et al. Effect of uremia and dialysis on mononuclear cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:936-942
190. Fernández-Fresnedo G, Ramos MA, González-Pardo MC, et al. B lymphopenia in uraemia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysfunction of Bcl-2. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:502-510
191. Meier P, Dayer E, Edouard Blanc E, Wauters J-P. Early T cell activation correlates with expression of apoptosis markers in patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:204-212
192. D'Intini V, Bordoni V, Fortunato A, et al. Longitudinal study of apoptosis in chronic uremic patients. *Semin Dial* 2003;16(6):467-473
193. Sandres R. Williams, Apoptosis and heart failure. *N Engl J Med* 1999;341(10):759-760
194. Colluci WS. Apoptosis in the heart. *N Engl J Med* 1996;335(16):1224-1226
195. Khoynezhad A, Jalali Z, Tortolani AJ. A synopsis of research in cardiac apoptosis and its application to congestive heart failure. *Tex Heart Inst J*. 2007;34(3):352-359
196. González A, Fortuño MA, Querejeta R, et al. Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2003;59:549-562
197. Patten RD, Karas RH. Cardiomyocyte apoptosis in the ischemic and failing heart. *Drug discovery today: Disease mechanisms* 2005;2(1):47-53
198. Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, et al. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest* 1997;100:1363-1372
199. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, et al. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res* 2000;45:651-660
200. Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, et al. Cardiomyocytes apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H2726-H2731
201. Holly TA, Drincic A, Byun Y, et al. Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1709-1715
202. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, et al. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998;97:276-281



203. Mani K, Kitsis RN. Myocyte apoptosis: programming ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:761-764
204. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997;336:1131-1141
205. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, et al. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;95:320-323
206. Baldi A, Abbate A, Bussani R, et al. Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:165-174
207. Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Bussani R, et al. Increased myocardial apoptosis in patients with unfavorable left ventricular remodeling and early symptomatic post-infarction heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:753-760
208. Condorelli G, Morisco C, Stassi G, et al. Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and Bcl-2 during left ventricular adaptation to chronic pressure overload in the rat. *Circulation* 1996;99:3071-3078
209. Sam F, Sawyer DB, Chang DL, et al. Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H422-H428
210. Engel D, Peshock R, Armstrong RC, et al. Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1303-H1311
211. Kitsis RN, Mann DL. Apoptosis and the heart: a decade of progress. *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:1-2
212. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, et al. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest* 1999;29:380-386
213. Narula J, Pandey P, Arbustini E, et al. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8144-8149
214. Diez J, Panizo A, Hernández M, et al. Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997;30:1029-1034
215. Hamet P, Richard L, Dam TV, et al. Apoptosis in target organs in hypertension. *Hypertension* 1995;26:642-648



216. Li Z, Bing OH, Long X, et al. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 1997;272:H2313-H2319
217. Li P, Zhang X, Capasso JM, et al. Myocyte loss and left ventricular failure characterize the long term effects of coronary artery narrowing or renal hypertension in rats. *Cardiovasc Res* 1993;27:1066-1075
218. Diep QN, Mabrouk ME, Yue P, et al. Effect of AT1 receptor blockade on cardiac apoptosis in angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol* 2002;282:H1635-H1641
219. Ikeda S, Hamada M, Qu P, et al. Relationship between cardiomyocyte cell death and cardiac function during hypertensive cardiac remodeling in Dahl rats. *Clin Sci* 2002;102:329-335
220. González A, López B, Ravassa S, et al. Stimulation of cardiac apoptosis in essential hypertension: potential role of angiotensin II. *Hypertension* 2002;39:75-80
221. Olivetti G, Melissari M, Balbi T, et al. Myocyte cellular hypertrophy is responsible for ventricular remodeling in the hypertrophied heart of middle aged individuals in the absence of cardiac failure. *Cardiovasc Res* 1994;28:1199-1208
222. Port FK. Morbidity and mortality in dialysis patients. *Kidney Int* 1994;46:1728-1737
223. Clinical Practice Guidelines for Cardiovascular Disease in Dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005;45:S86-S89
224. Baigent C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet* 2000;356:147-152
225. Goicoechea M, De Vinuesa SG, Gomez-Campdera F, et al. Predictive cardiovascular risk factors in patients with chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int* 2005;67(Suppl 93):S35-S38
226. Kowald A, Kirkwood TBL. A network theory of ageing: the interactions of defective mitochondria, aberrant proteins, free radicals and scavengers in the ageing process. *Mutat Res* 1996;316:209-236
227. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95
228. Fridovitch I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exper Biol* 1998;201:1203-1209
229. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford University Press, Oxford, 1999



230. Γαλάρης Δ, Μητρογιάννη Ζ, Σιαμόπουλος ΚΧ. Οξειδωτικό stress στην αιμοκάθαρση. Ανίχνευση δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου. Θεραπευτικές στρατηγικές. Ελληνική Νεφρολογία 2002;14(Suppl 1):27-31
231. Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Current issues concerning the role of oxidative stress in aging: a perspective. In: Hemiki S, ed. The molecular genetics of aging. Springer-Verlag, Heidelberg 2000:45-66
232. Hand SC, Hardewig I. Downregulation of celllural metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. Annu Rev Physiol 1996;58:539-563
233. Βαλαβανίδης Α. Ελεύθερες ρίζες στην οργανική χημεία. Χημικές ιδιότητες, φασματοσκοπία, εφαρμογές και μηχανισμοί στη σύνθεση οργανικών ενώσεων. Εκδ. Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2004 p.48
234. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In: Parker L, Glazer AN, eds. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc., 1990;186:1-85
235. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. In: Cheeseman KH, Slater TF eds. Free Radicals in Medicine, British Medical Bulletin, Vol. 49, Longman Singapore Publishers, 1993:481-93
236. Gilbert DL, ed. Oxygen in living processes: an inter-disciplinary approach. Springer-Verlag, New York, 1981
237. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived relaxing factor. Nature 1987, 327:524-526
238. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, et al. Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med 1987;107:526-545
239. Bates GW, Schlabach MR. The reaction of ferric salts with transferrin. J Biol Chem 1973;248:3228-3234
240. Baeuerle PA. Enter a polypeptide messenger. Nature 1995;373:661-667
241. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage, function and cellular regulation. Biochim Biophys Acta 1996;1275:161-168
242. Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: state of the art. Am J Med 1991;91(Suppl 3C):2S-13S
243. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. Ann Rev Nutr 1996;16:33-50
244. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys 1990;280:1-8



245. Sies H, ed. Oxidative stress, oxidants and antioxidants. Academic Press, San Diego, CA, 1997
246. Fairfield KM, Fletcher RH. Vitamins for chronic disease prevention in adults. *JAMA* 2002;287:3116-3129
247. Holveet P, Collen D. Oxidation of low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998;137(Suppl): S33-S38
248. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994;344:793-795
249. Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res* 1983;24: 1070-1076
250. Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:6499-6503
251. Hazen SL. Oxidation and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1683-84
252. Gerrity RG. The role of monocyte in atherogenesis I. Transmission of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 1981;103:181-190
253. Goldstein JL, Brown MS. The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann Rev Biochem* 1977;46:897-930
254. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (part I). *N Engl J Med* 1976;95:369-377
255. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Rev Biochem* 1983;52:223-261
256. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modification of low density lipoprotein that increases atherogenesis. *N Engl J Med* 1989;320:915-924
257. Jurgens G, Hoff HF, Chisolm GM, Esterbauer H. Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation-characterization and pathological implications. *Chem Phys Lipids* 1987;45:315-336
258. Steinbrecher UP, Zhang H, Longheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 1990;9:155-168



259. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonist in atherothrombosis. *FASEB J* 2001;15:2073-2084
260. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28:1685-1696
261. Knight JA. Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Ann Clin Lab Sci* 1995;25:111-121
262. Gutteridge JMC. Free radicals in disease processes: A compilation of causes and consequences. *Free Radic Res Comms* 1993;19:141-158
263. Kanungo MS. Genes and aging. Cambridge University Press, Cambridge, 1994
264. Honda Y, Honda S. The daf-2 gene network for longevity regulate oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J* 1999;13:1385-1993
265. Lin YJ, Seroude L, Benzer S. Extended life span and stress resistance in the *Drosophila* mutant Methuselah. *Science* 1998;282:943-946
266. Barnett YA, King CM. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutations as a function of age in humans. *Mutat Res* 1995;338:115-128
267. Zweier JL, Villamena FA. Chemistry of free radicals in biological systems. In: Kukin ML, Fuster V, eds. *Oxidative stress and Cardiac Failure*. Futura Publishing Company, New York, 2003:67-95
268. Blech JJ, Bridges AB, Scott N, et al. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J* 1991;65:245-248
269. Mallat Z, Philip I, Lebre M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-isoprostaglandin F2a in pericardial fluid of patients with heart failure: A potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation* 1998;97:1536-1539
270. Cracowski JL, Tremel F, Marpeau C, et al. Increased formation of F2-isoprostanes in patients with severe heart failure. *Heart* 2000;84:439-440
271. Goldhaber JI, Ji S, Lamp ST. Effects of exogenous free radicals on electromechanical function and metabolism in isolated rabbit and guinea pig ventricle: implications for ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest* 1989;83:1800-1809
272. Scherer NM, Deamer DW. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca²⁺-ATPase. *Arch Biochem Biophys* 1986;246:589-601



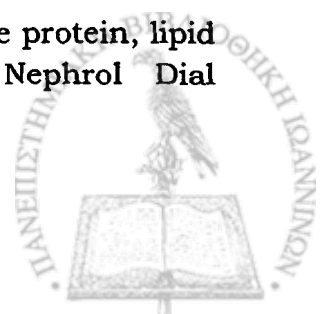
273. Pallandi Rt, Perry MA, Campbell TJ. Proarrhythmic effects of an oxygen-derived free radical generating system on action potentials recorded from guinea pig ventricular myocardium: a possible cause of reperfusion-induced arrhythmias. *Circ Res* 1987;61:50-54
274. Stewart DJ, Pohl U, Bassenge E. Free radicals inhibit endothelium-dependent dilation in the coronary resistance bed. *Am J Physiol* 1988;255:H765-H769
275. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74:1141-48
276. Cipollone F, Ciabattoni G, Patrignani P, et al. Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation* 2000;102:1007-1013
277. Vassalle C, Petrozzi L, Botto N, Andreassi MG, Zucchelli GC. Oxidative stress and its association with coronary artery disease and different atherogenic risk factors. *J Int Med* 2004;256:308-315
278. Kromer BM, Tippins JR. Coronary artery constriction by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *Br J Pharmacol* 1996;119:1276-1280
279. Sakamoto H, Corcoran TB, Lafey JG, et al. Isoprostanes-markers of ishaemia reperfusion injury. *Eur J Anaesthesiol* 2002;19:550-559
280. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999;138(5 Suppl 2): S419-S420
281. Fenster BE, Tsao PS, Rockson SG. Endothelial dysfunction: clinical strategies for treating oxidant stress. *Am Heart J* 2003;146:218-226
282. Annuk M, Zilmer M, Lind L, et al. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2747-2752
283. Nath KA. Reactive oxygen species in renal injury. In: Andreucci VE, Fine LG, eds. *International Year Book of Nephrology*. Kluwer, Academic Press 1991;(chapter 3):47-69
284. Rondini P, Cudkowicz G. Hydrogen peroxide in tumors. *Experimentia* 1953;9:348-349
285. Guited BR, Shah SV. In vivo generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am J Physiol* 1989;256: F158-F164
286. Alfrey AC, Hammond WS. Renal iron handling in the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1990;37:1409-1413



287. Nath KA, Croatt AJ, Hostetter TH. Oxygen consumption and oxidant stress in surviving nephrons. *Am J Physiol* 1990;258:F1354-F1362
288. Ha H, Kim KH. Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1995;51(Suppl):S18-S21
289. Nath KA, Salahudeen AK. Induction of renal growth and injury in the intact rat kidney by dietary deficiency of antioxidants. *J Clin Invest* 1990;86:1179-1192
290. Nath KA, Fischereder M, Hostetter TH. The role of antioxidants in progressive renal injury. *Kidney Int* 1994;45(Suppl):S111-S115
291. Katusic ZS. Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Rad Biol Med* 1996;20:443-448
292. Remuzzi G, Zoja C, Bertani T. Glomerulonephritis. *Curr Opin Nephrol Hyperten* 1993;2:465-474
293. Shah SV. The role of reactive oxygen metabolites in glomerular disease. *Annu Rev Physiol* 1995;57:245-262
294. Yoshioka T, Ichikawa I, Fogo A. Reactive oxygen metabolites cause massive, reversible proteinuria and glomerular sieving defect without apparent ultrastructural abnormality. *J Am Soc Nephrol* 1991;2:902-912
295. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of free transcription. *FASEB J* 1996;10:709-720
296. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 1997;22:269-285
297. Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, et al. Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1996;49:103-111
298. Lieberthal W, Levine JS. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 1996;271:F477-F488
299. Brandy HR. Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney Int* 1994;45:1285-1300
300. London GM, Drueke TB. Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 1997;51:1678-1695
301. Kidney Disease Outcome Quality Initiative Clinical Practice Guidelines for Cardiovascular Disease in Dialysis Patients. *Am J Kidney Dis* 2005;45(Suppl 3):S86-S90



302. Pupim L.B, Himmelfarb J, McMonagle E, et al. Influence of initiation of maintenance hemodialysis on biomarkers of inflammation and oxidative stress. *Kidney Int* 2004;65:2371-2379
303. Paik-Seong Lim, Yei-Mei Chang, Lee-Moi Thien, et al. 8-Iso-ProstaglandinF2a as a useful clinical biomarker of oxidative stress in ESRD patients. *Blood Purif* 2002;20:537-542
304. Canaud B, Cristol JP, Morena M, et al. Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. *Blood Purif* 1999;17:99-106
305. Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000;58:2571-2578
306. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 2004;65:1009-1016
307. Terawaki H, Yoshimura K, Hasegawa T, et al. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: Examination with the redox state of albumin. *Kidney Int* 2004;66:1988-1993
308. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, et al. Advanced products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998;161:2524-2532
309. Yilmaz MI, Saglam M, Calgar K, et al. The determinants of endothelial dysfunction in CKD: Oxidative stress and assymetric dimethylarginine. *Am J Kidney Dis* 2006;47:42-50
310. Stenvinkel P, Heimurger O, Paultre F, et al. Strong association between malnutrition, inflammation and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999;55:1899-1911
311. Mitrogianni Z, Barbouti A, Galaris D, Siamopoulos KC. Tyrosine nitration in plasma proteins from patients undergoing hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2004;44:286-292
312. Handelman GJ, Walter MF, Adhikarla R, et al. Elevated plasma F2-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. *Kidney Int* 2001;51:1960-1966
313. Ikizler TA, Morrow JD, Roberts LJ, et al. Plasma F2-isoprostane levels are elevated in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 2002;88:190-197
314. Bayers B, Pastor MC, Bonal J, et al. Homocysteine, C-reactive protein, lipid peroxidation and mortality in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:106-112



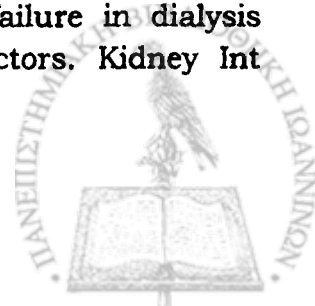
315. Scott B, Deman A, Peeters P, et al. Cardiac troponin T and malondialdehyde modified plasma lipids in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:737-742
316. Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J et al. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:505-521
317. Frick M, Weidinger F. Endothelial function: a surrogate endpoint in cardiovascular studies? *Curr Pharm Des* 2007, 13: 1741-1750
318. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126
319. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999; 55: 648-658
320. Wanner C, Zimmermann J, Schwedler S, Metzger T. Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients. *Kidney Int* 2002; 61 (Suppl 80): S99-S102
321. Stam F, van Guldener C, Schalkwijk CG, ter Wee PM, Donker AJM, Stehouwer CDA. Impaired renal function is associated with markers of endothelial dysfunction and increased inflammatory activity. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 892-898
322. Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Barany P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, Stenvinkel P. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 1212-1218
323. Dogra G, Irish A, Chan D, Watts G. Insulin resistance, inflammation and blood pressure determine vascular dysfunction in CKD. *Am J Kidney Dis* 2006; 48: 926-934
324. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-2101
325. Blankenberg S, Barboux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003; 170: 191-203
326. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 1996; 93: 672-682



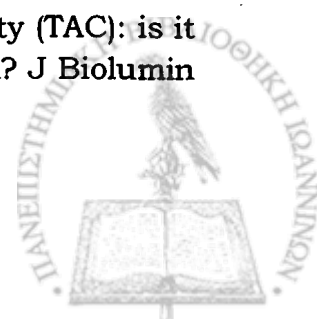
327. Rabb H, Calderon E, Bittle PA, Ramirez G. Alterations in soluble intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1996; 27: 239-243
328. Bonomini M, Heale M, Santarelli P, Stuard S, Settefrati N, Abertazzi A. Serum levels of soluble adhesion molecules in chronic renal failure and dialysis patients. *Nephron* 1998; 79: 399-407
329. Vaccaro F, Mule G, Cottone S, Soresi M, Giannitrapani L, Vadala A, Sparacino V, Calabrese S, Picone FP, Montalto G, Cerasola G. Circulating levels of adhesion molecules in chronic kidney disease correlate with the stage of renal disease and with C-reactive protein. *Arch Med res* 2007; 38: 534-538
330. Papagianni A, Kalovoulos M, Kirmizis D et al. Carotid atherosclerosis is associated with inflammation and endothelial cell adhesion molecules in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 113-119
331. Vanholder R, Ringoir S. Infectious morbidity and defects of phagocytic function in end-stage renal disease: a review. *J Am Soc Nephrol* 1993; 3: 1541-1554
332. Pesanti EL. Immunologic defects and vaccination in patients with chronic renal failure. *Infect Dis Clin N Am* 2001; 15: 813-832
333. Descamps-Latscha B, Herbelin A. Long term dialysis and cellular immunity: a critical survey. *Kidney Int* 1993; 41: S135-S142
334. Moser B, Roth G, Brunner M et al. Aberrant T cell activation and heightened apoptotic turnover in end-stage renal failure patients: a comparative evaluation between non-dialysis, hemodialysis and peritoneal dialysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 581-585
335. Brunner T, Mogil R, LaFace D et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 1995; 373: 441-444
336. Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu rev Immunol* 1998; 16: 395-419
337. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors, signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305
338. Raff MC, Barres BA, Burne JF et al. Programmed cell death and the control of cell survival. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994; 345: 265-268
339. Iyer SB, Bishop JE, Abrams B et al: Qantibrite™: A new standard for fluorescence quantitation. White paper. Scan Jose, Becton Dickinson Immunocytometry Systems 1997;23-3496-3500:1-6



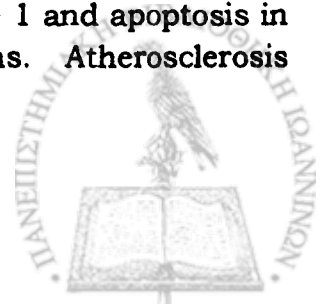
340. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, et al. A series of PGF₂-like compounds are produced in vivo in humans by a noncyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9383-9387
341. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I & Reichek N. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: Comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 1986;57:450-458
342. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a Branch of the European Society of Cardiology, *J of the American Society of Echocardiography*, 2005;18:1440-1463
343. Wachtell K, Gunnar S, Gerds E, et al. LV filling patterns in patients with systemic hypertension and LVH (the LIFE study). *Am J Cardiol* 2000; 85:466-472
344. Giovanni de Simone, Kitzman DW, Chinali M, et al. Left ventricular concentric geometry is associated with impaired relaxation in hypertension: the HyperGEN study. *European Heart Journal* 2005;26:1039-1045
345. Paoletti E, Bellino D, Cassottana P et al. Left ventricular hypertrophy in nondiabetic predialysis CKD. *Am J Kidney Dis* 2005;46:320-327
346. Nardi E, Cottone NE, Mulé G et al. Influence of chronic renal insufficiency on left ventricular diastolic function in hypertensives without left ventricular hypertrophy. *J Nephrol* 2007;20: 320-328
347. Covic A, Mardare NGI, Ardeleanu S et al. Serial echocardiographic changes in patients on hemodialysis: an evaluation of guideline implementation. *J Nephrol* 2006;19:783-793
348. Levin A, Singer J, Thompson CR t al. Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: Identifying opportunities for intervention. *Am J Kidney Dis* 1996;27:347-354
349. Silverberg J, Barre P, Prichard S, Sniderman A. Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end-stage renal disease *Kidney Int* 1989;36:286-290
350. Foley R, Parfrey PS, Harnett JD, et al. The prognostic importance of left ventricular geometry in uremic cardiomyopathy. *J Am Soc Nephrol* 1995;5:2024-2031
351. Harnett J, Foley R, Kent G, et al. Congestive heart failure in dialysis patients: Prevalence, incidence, prognosis and risk factors. *Kidney Int* 1995;47:884-890



352. Perianayagam MC, Murray SL, Balakrishnan VS et al Serum soluble Fas (CD95) and Fas ligand profiles in chronic kidney disease. *J Lab Clin Med* 2000;136:320-327
353. Cheng J, Zhou T, Liu C et al, Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994;263:1759-1762
354. Hotamisligil GS, Shargill NS and Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor - α : a direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91
355. Varizi ND. Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms and potential consequences. *Semin Nephrol* 25: 469-473, 2004.
356. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, et al. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in end stage renal disease (SPACE): randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2000;356:1213-1218,
357. Tepel M, van der Giet M, Statz M, et al. The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure. *Circulation* 2003;107:992-995
358. Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, et al. Oxidative stress is progressively enhanced with the advancing stages of CKD. *Am J Kidney Dis* 2006;48:752-760
359. Kaysen GA, Eiserich JP. The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:538-548
360. Bolton CH, Downs LG, Victory JG, et al. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1189-1197
361. Meier P, Spertini F, Blanc E, Burnier M. Oxidized LDL activate CD4+ T cell apoptosis in patients with end-stage renal disease through Fas engagement. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:331-342
362. Shoji T, Fukumoto M, Kimoto E, et al. Antibody to oxidized LDL and cardiovascular mortality in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2002;62:2230-2237
363. Tsouli SG, Kiortsis DN, Lourida ES, et al. Autoantibody titers against OxLDL are correlated with Achilles tendon thickness in patients with familiar hypercholesterolemia. *J Lip Res* 2006;47:2208-2214
364. Bergesio F, Monzani G, Ciuti R, et al. Total antioxidant capacity (TAC): is it an effective method to evaluate the oxidative stress in uraemia? *J Biolumin Chemilumin* 1998;13:315-319



365. Rao M, Wong C, Kanetsky P et al. Cytokine gene polymorphism and progression of renal and cardiovascular diseases. *Kidney Int* 2007;72:549-556
366. Landray MJ, Wheeler DC, Lip GYH et al. Inflammation, endothelial dysfunction, and platelet activation in patients with chronic kidney disease: The chronic Renal Impairment in Birmingham (CRIB) Study. *Am J Kidney Dis* 2004;43:244-253
367. Fried L, Solomon C, Shlipak M et al. Inflammatory and prothrombotic markers and the progression of renal disease in elderly individuals. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:3184-91
368. Zoccali C, Benedetto FA, Mallamaci F et al. Fibrinogen, inflammation and concentric left ventricular hypertrophy in chronic renal failure. *Eur J Clin Invest* 2003;33:561-566
369. Koenig W. Update on C-reactive protein as a risk marker in cardiovascular disease. *Kidney Int* 2003;63(Suppl 84):S58-S61
370. Tsirpanlis G. The pattern of inflammation and a potential new clinical meaning and usefulness of C-reactive protein in end-stage renal failure patients. *Kidney Blood Press Res* 2005;28:55-61.
371. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, et al. Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005;45:39-47
372. Zoccali C. Endothelial dysfunction in CKD: a new player in town? *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:783-785
373. Kuroda YT, Komamura K, Tatsumi R et al. Vascular cell adhesion molecule-1 as a biochemical marker of left ventricular mass in the patients with hypertension. *Am J Hypertens* 2001;14:868-72
374. Valiki BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J* 2001;141:334-341
375. Salvetti M, Muiesan ML, Painsi A et al. Myocardial ultrasound tissue characterization in patients with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1953-1958
376. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD et al. Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy. *Kidney Int* 1995;47:186-192
377. Cai W, Devaux B, Schaper W et al. The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1997;131:177-186



378. Hebert MJ, Masse M, Vigneault N et al. Soluble Fas is a marker of coronary artery disease in patients with endstage renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001;38:1271-1276
379. Tripepi G, Mallamaci F, Zoccali C. Inflammation markers, adhesion molecules, and all cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: Searching for the best risk marker by multivariate modeling. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:S83-S88
380. Cottone S, Nardi E, Mulé G et al. Association between biomarkers of inflammation and left ventricular hypertrophy in moderate chronic kidney disease. *Clin Nephrol* 2007;67(4):209-216
381. Siems W, Quast S, Carluccio F et al. Oxidative stress in chronic renal failure as cardiovascular risk factor. *Clin Nephrol* 2002;58(Suppl 1):S12-S19
382. Hirokazu H, Qureshi AR, Heimbürger O et al. Serum albumin, C-reactive protein and fetuin A as predictor of malnutrition, cardiovascular disease and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis* 2006;47:139-148
383. Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1993;118:956-63
384. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G et al. Fibrinogen, mortality and incident cardiovascular complications in end-stage renal failure. *J Intern Med* 2003;254:132-9
385. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X-M et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-251

