



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**  
Διευθυντής: Καθηγητής Ιωάννης Α. Στεφανίδης

---

Διδακτορική Διατριβή

**"ΜΗΚΟΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ**  
**ΚΑΙ**  
**ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ**  
**ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ"**

υπό

**ΓΕΩΡΓΙΟΥ Α. ΒΟΛΙΩΤΗ**

**ΝΕΦΡΟΛΟΓΟΥ**

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος  
Λάρισα, 2014

©2014 ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΒΟΛΙΩΤΗΣ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:**

**1<sup>ος</sup> Εξεταστής (Επιβλέπων):** Ιωάννης Στεφανίδης  
Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**2<sup>ος</sup> Εξεταστής:** Ασπασία Τσέζου  
Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**3<sup>ος</sup> Εξεταστής:** Νικόλαος Σταθάκης  
Καθηγητής Παθολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**4<sup>ος</sup> Εξεταστής:** Γεώργιος Χατζηγεωργίου  
Καθηγητής Νευρολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**5<sup>ος</sup> Εξεταστής:** Λάζαρος Σακκάς  
Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**6<sup>ος</sup> Εξεταστής:** Σπυρίδων Ποταμιάνος  
Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**7<sup>ος</sup> Εξεταστής:** Ηλίας Ζιντζαράς  
Καθηγητής Βιομαθηματικών-Βιομετρίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Παθολογίας-Νεφρολογίας Ιωάννη Στεφανίδη, για την ιδιαίτερη τιμή που μου έκανε να μου αναθέσει αυτή τη διδακτορική διατριβή, τη συνεχή καθοδήγησή του, την πολύτιμη βοήθειά του σε όλα τα θέματα που αφορούσαν τη διεκπαιρέωσή της, καθώς και την ενθάρρυνση που μου πρόσφερε.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Ασπασία Τσέζου, που με καθοδήγησε στο περίπλοκο αλλά και ενδιαφέρον τμήμα της διατριβής μου, που σχετιζόταν με την επιστήμη της Μοριακής Βιολογίας.

Ευχαριστώ το συνεργάτη και φίλο Βασίλη Παπανικολάου, Μοριακό Βιολόγο, για την συνεχή και ουσιαστική βοήθειά του στο πρακτικό μέρος της διατριβής μου.

Ευχαριστώ τη σύζυγό μου Ιωάννα Χρονοπούλου, Νεφρολόγο, για τη διαρκή ενθάρρυνση, την υπομονή και τη βοήθειά της σε πρακτικά ζητήματα σχετικά με την παρούσα διατριβή.

Τέλος ευχαριστώ τους γονείς μου για την ανεξάντλητη υποστήριξή τους.

Γεώργιος Βολιώτης

*Στη μνήμη του πατέρα μου...*

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### ΒΟΛΙΩΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

**Όνομα πατρός:** Ανάργυρος

**Διεύθυνση κατοικίας :** Μετσόβου 6-8, Τ.Κ. 41223 Λάρισα

**Τηλέφωνα επικοινωνίας :** 2410.625.187 & 6977.438.033

**E-mail :** volgeo77@yahoo.gr

**Οικογενειακή κατάσταση:** έγγαμος με ένα παιδί

**Όνοματεπώνυμο συζύγου:** Ιωάννα Χρονοπούλου

### ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1995-2001: Πτυχίο Ιατρικής από το Ανώτατο Ιατρικό Ινστιτούτο του Πλόβντιβ Βουλγαρίας, με βαθμό <<ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ>> και αναγνώριση του πτυχίου από το ΔΙ.Κ.Α.Τ.Σ.Α. , με την υπ' αριθμ. πράξη 10-811/24-09-2002.

1991-1994: 1ο Λύκειο Λάρισας

### ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά - PROFICIENCY,

Βουλγαρικά

### ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

02/10/2002: Χορήγηση από τη Ν. Α. Λάρισας, άδεια ασκήσεως Ιατρικού επαγγέλματος με την υπ' αριθμ. Πράξη 7498.

03/02/2003-02/05/2003: Τρίμηνη άσκηση στο Π. Γ. Ν. Λάρισας, στα πλαίσια διορισμού για την εκπλήρωση της υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου.

04/05/2003-16/11/2003: Υπηρεσία υπαίθρου με θέση στο Π. Ι. Βελίκας, Κ. Υ. Αγιάς.

17/11/2003-04/05/2004: Απόσπαση στη Μονάδα Τεχνητού Νεφρού του Π.Π.Γ.Ν.Λάρισας.

05/05/2004-07/11/2005: Επιστημονικός συνεργάτης Μονάδας Τεχνητού Νεφρού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

30/06/2004: Χορήγηση διδακτορικής διατριβής με θέμα «Μήκος των τελομερών και δραστηριότητα τελομεράσης στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια» με απόφαση της συνεδρίασης 5η 30-06-2004 της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνθεσης του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

08/11/2005-08/11/2006: Εκπλήρωση στρατιωτικής θητείας στο Στρατό Ξηράς με ειδικότητα « Ιατρός άνευ ειδικότητας».

14/05/2006-14/09/2006: Εσωτερικός βοηθός της παθολογικής κλινικής του 404 Γ.Σ.Ν. Λάρισας στα πλαίσια της στρατιωτικής θητείας.

11/01/2007-10/03/2008: Ειδικευόμενος παθολογικής κλινικής Γενικού Νοσοκομείου Βέροιας, στα πλαίσια απόκτησης ειδικότητας στη νεφρολογία.

04/07/2008-04/07/2012: Ειδίκευση στη νεφρολογία – Νεφρολογικό Κέντρο Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ρίου Πατρών.

19/10/2012: Απόκτηση τίτλου ιατρικής ειδικότητας Νεφρολογίας.

08/01/2013: Πρόσληψη στην Μ.Τ.Ν.-Γενική Κλινική «Ευτύχιος Πατσίδης» στη Λάρισα με θέση Ειδικού Νεφρολόγου.

21/03/2013: Έναρξη Ιδιωτικού Νεφρολογικού Ιατρείου στη Λάρισα.

## **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ**

2005: Liakopoulos V., Wurth P., Mertens PR., Eleftheriadis T., Kourti P., Voliotis G., Heintz B., Koukoulis GN., Stefanidis I.  
Endothelin-1 plasma levels in hemodialysis treatment – the influence of type 2 diabetes.  
Ren. Fail. 2005; 27(5):515-22

2005: Liakopoulos V., Eleftheriadis T., Kyropoulos T., Voliotis G., Potamianos S., Zengos N., Stefanidis I., Heintz B.

Hemodialysis procedure does not affect the levels of sICAM-1 and sVCAM-1 in patients with end stage renal disease.

Ren. Fail. 2005; 27(3):315-21

2014: Savvidaki E, Kazakopoulos P, Papachristou E, Karavias D, Zavvos V, Voliotis G, Kalliakmani P, Marangos M, Goumenos DS.

Replacement of mycophenolate acid with everolimus in patients who became neutropenic after renal transplant.

Exp Clin Transplant. 2014 Feb;12(1):31-6.

## ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

2007: Georgios Voliotis, Aspasia Tsezou, Vasillios Liakopoulos, Mirto Giannopoulou, Spiridon Dovas, Giota Kourti, Elias Zintzaras, Ioannis Stefanidis.

Telomere length and telomerase activity in haemodialysis patients.

21-24/06/2007 XLIV Congress of the European Renal Association European Dialysis and Transplant (ERA-EDTA) Barcelona, Spain

2009: I. Χρονοπούλου, Π. Καλλιακμάνη, Γ. Βολιώτης, Ε. Παπακρήστου, Κ. Φουρτούνας, Δ. Γούμενος.

Εμπειρία από τη χρήση του Mycophenolate Mofetil στη θεραπεία της Ιδιοπαθούς Μεμβρανώδους Σπειραματονεφρίτιδας

78η Επιστημονική συνάντηση Ελληνικής Νεφρολογικής Εταιρίας, Θεσσαλονίκη

2010: Γ. Βολιώτης, Ε. Σαββιδάκη, Θ. Μπίτα, Μ. Βαρδουλάκη, I. Χρονοπούλου, Π. Χονδρογιάννης, I. Μαρούλης, Δ. Καραβίας, Δ. Γούμενος.

Εμπειρία από τη χορήγηση του tacrolimus βραδείας αποδέσμευσης (Advagraf) σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού.

Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας, Κως 2010



## ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

2007: Voliotis G, Tsezou A, Giannopoulou M, Dovas S, Chronopoulou I, Liakopoulos V, Zarogiannis S, Stefanidis I.

Telomeres and telomerase activity in end stage renal disease.

Renal Week 2007: The Annual Meeting of the American Society of Nephrology. J Am Soc Nephrol 18:372A-373A

2007: G.Voliotis, A. Tsezou, V. Liakopoulos, S. Zarogiannis, M. Giannopoulou, S. Dovas, E. Oikonomidou, E. Zintzaras, I. Stefanidis

Telomere length and telomerase activity in haemodialysis patients.

17th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Clin Chem Lab Med (CCML) 45 (Suppl):S277

2010: Ioanna Chronopoulou, Efthimios Dardiotis, Maria Dardioti, Georgios Voliotis, Vasilios Liakopoulos, Christos Syrganis, Pantelis Vakianis, Konstantinos Siamopoulos, Dorothea Papadopoulou, Dimitrios Goumenos, Georgios Hadjigeorgiou, Ioannis Stefanidis.

Association between the interleukin-1 $\beta$  gene (IL1B) C-511T polymorphism and the risk of progressive IgA nephropathy.

XLVII ERA-EDTA Congress 2010 Munich

2011: Marios Papatirou, Maria Vardoulaki, Georgios Voliotis, Eirini Savvidaki, Pantelitsa Kalliakmani, Evangelos Papachristou and Dimitrios S. Goumenos.

Cinacalcet in renal transplant recipients with hyperparathyroidism and/or hypercalcemia.

BANDAO Congress 2011

**"ΜΗΚΟΣ ΤΩΝ ΤΕΛΟΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ  
ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ"**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΒΟΛΙΩΤΗΣ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2014

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Ιωάννης Στεφανίδης**  
Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
(Επιβλέπων)
- 2. Ασπασία Τσέζου**  
Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3. Νικόλαος Σταθάκης**  
Καθηγητής Παθολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μήκος των τελομερών στα άκρα των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων, μειώνεται με κάθε κυτταρικό διαχωρισμό, με αποτέλεσμα την γήρανση των κυττάρων. Η τελομεράση συνθέτει τελομερικό DNA, αντικαθιστώντας το απολεσθέν τελομερικό υλικό. Το οξειδωτικό stress και η χρόνια φλεγμονή, έχει αποδειχθεί ότι επισπεύδουν τη μείωση του μήκους των τελομερών. Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου και η διαδικασία της αιμοκάθαρσης, χαρακτηρίζονται από αυξημένο οξειδωτικό stress και χρόνια φλεγμονή. Σκοπός της μελέτης ήταν να ερευνηθεί το μήκος των τελομερών και η δραστηριότητα της τελομεράσης, σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια υπό αιμοκάθαρση.

Στην μελέτη έλαβαν μέρος 43 κλινικά σταθεροί ασθενείς, με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου υπό αιμοκάθαρση. Το μήκος των τελομερών των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος, μελετήθηκε με τη μέθοδο TeloTAGGG Telomere Length Assay® και η ανίχνευση της δραστηριότητας της τελομεράσης έγινε με τη μέθοδο TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol). Η σύγκριση έγινε με ομάδα υγιών μαρτύρων (υγιείς επισκέπτες της κλινικής και προσωπικό).

Το μήκος των τελομερών των ασθενών, ήταν αντιστρόφως ανάλογο με τη διάρκεια της υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας με αιμοκάθαρση. Στους ασθενείς που ανιχνεύθηκε δραστηριότητα τελομεράσης, αυτή ήταν ανάλογη με το μήκος των τελομερών τους. Το μήκος των τελομερών και η δραστηριότητα της τελομεράσης, δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες,

μετά από προσαρμογή για την ηλικία. Τέλος το μήκος των τελομερών και η δραστικότητα της τελομεράσης δεν φάνηκε να επηρεάζουν την επιβίωση των ασθενών.

Τα αποτελέσματα της μελέτης, δείχνουν ότι το μήκος των τελομερών και η δραστικότητα της τελομεράσης, δεν διαφέρουν ανάμεσα στους ασθενείς υπό αιμοκάθαρση και τους υγιείς. Ακόμα η μακρά διάρκεια της υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας με αιμοκάθαρση, σχετίζεται με μειωμένο μήκος τελομερών, ανεξάρτητα από την ηλικία των ασθενών. Ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός και η κλινική σημασία αυτών των ευρημάτων, χρήζουν διερεύνησης με περαιτέρω μελέτες.

## SUMMARY

Telomere length at the ends of eukaryotic chromosomes, decreases with every mitotic division, leading cells to replicative senescence. Telomerase adds telomeric repeats, replacing the lost telomeric material. Oxidative stress and chronic inflammation have been shown to accelerate telomere shortening. Chronic end stage renal disease and the hemodialysis procedure are characterized by chronic inflammation and increased oxidative stress. The purpose of this study was to investigate the length of telomeres and telomerase activity, of patients with chronic renal failure under hemodialysis.

In the study enrolled 43 clinically stable hemodialysis patients. The mean telomere length was determined by the TeloTAGGG Telomere Length Assay® and telomerase activity was measured according to the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). Controls included in the study were a convenience group of apparently healthy individuals (relatives of patients visiting our clinic during the given time and staff members).

Telomere length, correlated inversely with hemodialysis vintage. In patients with detected telomerase activity, the latter correlated with telomere length. Telomere length and telomerase activity were not significantly different between chronic hemodialysis patients and healthy con-

trols. Finally, neither telomere length nor the activity of telomerase had a significant impact on patient survival.

Findings of this study suggest that telomere length and telomerase activity are not altered in hemodialysis patients when compared to healthy controls. In addition, long duration of hemodialysis is, independently from age, associated with increased telomere shortening. The exact underlying mechanism and possible clinical implications of our findings require further investigation.

## Περιεχόμενα

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	16
1.1 Τελομερή: δομή και ιδιότητες.....	16
1.2 Τελομεράση, δομή και λειτουργία.....	19
1.3 Γήρανση.....	22
1.4 Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια.....	26
1.4.1 Επιδημιολογία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.....	27
1.4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας..	28
1.4.3 Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου.....	29
1.4.4 Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου.....	30
1.4.5 Αίτια χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.....	31
1.4.6 Κλινική εικόνα και επιπλοκές της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.....	32
1.5 Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, χρόνια φλεγμονή και οξειδωτικό stress.....	39
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	43
3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	45
3.1 Ασθενείς.....	45
3.2. Μέθοδοι.....	48
3.2.1 Απομόνωση DNA από τα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος.....	48
3.2.2 Μέτρηση του μήκους των τελομερών (Telomere Restriction Fragment Length των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (Αποτύπωση κατά Southern).....	50
3.2.3 Μέτρηση της δραστηριότητας της τελομεράσης στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος.....	53
3.2.4 Στατιστική ανάλυση.....	57
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	59
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	69
5.1 Διάρκεια της υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας με αιμοκάθαρση και οξειδωτικό stress.....	69
5.2 Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου.....	70
5.3 Επίδραση της ηλικίας.....	71
5.4 Επίδραση του φύλου.....	72
5.5 Επίδραση του καπνίσματος.....	72
5.6 Παράγοντες σχετιζόμενοι με τη νεφρική νόσο.....	73
5.7 Χρόνια φλεγμονή.....	76
5.8 Σακχαρώδης διαβήτης και καρδιοαγγειακή νόσος.....	78
5.9 Επιβίωση.....	79
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	81
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82

# 1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1 Τελομερή: δομή και ιδιότητες

Μελέτες των Hermann Muller (1938) και Barbara McClintock (1941), έδειξαν πως τα άκρα των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων καταλήγουν σε ειδικές δομικές μονάδες που ονομάζονται τελομερή. Τα τελομερή αποτελούνται από εκατοντάδες έως χιλιάδες επαναλήψεις (n) απλών DNA αλληλουχιών, οι οποίες είναι ειδικές για κάθε είδος. Επιπλέον, αυτές οι αλληλουχίες είναι συνδεδεμένες με λειτουργικές και ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Στον άνθρωπο τα τελομερή έχουν την εξής δομή: (TTAGGG)<sub>n</sub>.

Τα τελομερή πιστεύεται πως παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στη γενετική σταθερότητα των κυττάρων, προστατεύοντας το χρωμόσωμα και διατηρώντας την ικανότητά του για αναπαραγωγή (Blackburn 1991, McEachern et al. 2000). Στον άνθρωπο το μήκος των τελομερών κυμαίνεται από 5-16 kb, με τα μεγαλύτερα μήκη να παρατηρούνται στα βλαστικά κύτταρα (Von Zglinicki 2002).

Με κάθε κυτταρικό διαχωρισμό, υπάρχει απώλεια νουκλεοτιδίων της τάξεως 33-120 bp από τα τελομερή (Harley et al. 1990). Αυτό συμβαίνει γιατί οι DNA πολυμεράσες αποτυγχάνουν να αναπαραγάγουν πλήρως το άκρο 3' των χρωμοσωμάτων. Έτσι με κάθε μίτωση τα



τελομερή μικραίνουν, φαινόμενο που είναι γνωστό και ως «πρόβλημα ολοκλήρωσης αντιγραφής» (« the end replication problem», Olovnikov 1973).

Όταν το μήκος των τελομερών φθάσει σε κάποιο οριακό σημείο, ο κυτταρικός διαχωρισμός σταματά και το κύτταρο μεταπίπτει στην κατάσταση της γήρανσης, δηλαδή του προοδευτικού περιορισμού των λειτουργιών του, ή της απόπτωσης. Σε περίπτωση που και οι δύο αυτές οδοί παρακαμφθούν και το κύτταρο συνεχίσει να αναπαράγεται, το χρωμόσωμα μένει απροστάτευτο. Τότε οι ενδογενείς επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του (Kim et al. 2002) το αναγνωρίζουν ως κατεστραμμένο DNA και γίνεται ευάλωτο για αναδόμηση, τήξη και εναπόθεση γεφυρών χρωματίνης.

Αν και το μήκος των τελομερών είναι υπεύθυνο για τη γήρανση των κυττάρων αφού λειτουργεί σαν «μιτωτικό ρολόι», η ρύθμιση της αναπαραγωγικής τους ικανότητας δεν είναι τόσο απλή. Στον άνθρωπο τα τελομερή καταλήγουν σε μια 3' μονή σειρά νουκλεοτιδίων, η οποία δεν είναι ευθεία, αλλά δημιουργεί μια αγκύλη (t-loop). Η αγκύλη αυτή λειτουργεί προστατευτικά για το τελομερές (Greider 1999), αφού το εμποδίζει να αναγνωριστεί ως καταστραμμένο DNA. Για τη δημιουργία της προστατευτικής αυτής αγκύλης απαραίτητη είναι η παρουσία δύο ρυθμιστικών παραγόντων, που ονομάζονται συνδετικοί παράγοντες επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών TTAGGG, TRF1 και TRF2 (TTAGGG repeat binding factors 1 και 2) (Griffith et al. 1999; Smogorzewska et al. 2000). Ειδικά ο TRF2, έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει το ευθύ άκρο του τελομερικού DNA σε αγκύλη τύπου t-loop (Griffith et al. 1999). Συνεπώς η ανεπάρκεια του TRF2 οδηγεί σε επισπευμένη κυτταρική απόπτωση (Karlseder et al. 1999).

Μείωση του μήκους των τελομερών παρατηρήθηκε μετά από επανειλημμένες κυτταρικές διαιρέσεις *in vitro* (Harley et al. 1990) και με

την πάροδο της ηλικίας *in vivo* ( DeLange et al. 1990; Hastie et al. 1990; Lindsey et al. 1991). Στον άνθρωπο έχει παρατηρηθεί πως κατά μέσο όρο, η ετήσια απώλεια νουκλεοτιδίων στα τελομερή είναι της τάξεως των 30-60 bp (Takubo et al. 2002). Όμως σύμφωνα με μελέτες, σε κάθε οργανισμό, υπάρχει μεγάλη πολυμορφία στο ρυθμό αναπαραγωγής κυττάρων και ανανέωσης για κάθε ιστό. Για παράδειγμα, η ανανέωση του επιθηλίου του γαστρεντερικού βλεννογόνου, είναι ταχύτερη σε σύγκριση με το ρυθμό ανανέωσης των κυττάρων του ήπατος και του νεφρού.

Στον άνθρωπο το μήκος των τελομερών των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (π.χ. των λεμφοκυττάρων), μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας (Von Zglinicki et al. 2000). Φαίνεται όμως πως η ηλικία δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που επηρεάζει το μήκος τους. Η απώλεια νουκλεοτιδίων από τα τελομερή των έμμορφων κυττάρων του αίματος, είναι επισπευμένη σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Koetz et al. 2000; Schonland et al. 2003), ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος (Honda et al. 2001), η ψωρίαση (Wu et al. 2000; Wu et al. 2001) και η ατοπική δερματίτιδα (Wu et al. 2000;), πολλές από τις οποίες συνδέονται και με αυξημένη χρωμοσωματική αστάθεια (Emerit et al. 1980; Tuschi et al. 1984; Enerback et al. 1999; Kinne et al. 2001).

## 1.2 Τελομεράση, δομή και λειτουργία

Με σκοπό να αντεπεξέλθουν στη συνεχή μείωση του μήκους των τελομερών που συμβαίνει με κάθε μίτωση, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει διάφορους «αμυντικούς» μηχανισμούς. Ο μηχανισμός αυτός στα ανθρώπινα κύτταρα, περιλαμβάνει το ένζυμο τελομεράση. Το ένζυμο αυτό είναι μια ειδική ριβονουκλεοπρωτεΐνη (Greider et al. 1985; Morin 1989) που συνθέτει TTAGGG τελομερικό DNA στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Για τη σύνθεσή του, η τελομεράση χρησιμοποιεί ως μήτρα το ενδογενές της RNA.

Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωρισθεί τέσσερις ξεχωριστές δομικές και λειτουργικές υπομονάδες της τελομεράσης: το RNA τμήμα (Greider et al. 1989; Shippen-Lentz et al. 1990; Feng et al. 1995; Blasco et al. 1996; Avilion et al. 1996; Tsao et al. 1998), η ανάστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης (TERT), η δυσκερίνη και η πρωτεΐνη 1 της τελομεράσης και του σωματιδίου Cajal (TCAB1) (Cohen et al. 2007, Venteicher et al. 2009). Το RNA τμήμα της, hTR (human telomerase RNA), επίσης γνωστό και ως hTERC (human telomerase RNA component), είναι απαραίτητο για την ενζυματική της λειτουργία. Αποτελείται

από 445 νουκλεοτίδια, επαναλήψεις μιας διάταξης 11 νουκλεοτιδίων (5'-CUAACCCUAAC-3'), η οποία χρησιμεύει ως μήτρα για την κωδικοποίηση των τελομερικών επαναλήψεων. Το πρωτεϊνικό τμήμα της, hTERT (human telomerase reverse transcriptase), έχει ιδιότητες ανάστροφης μεταγραφάσης και ομοιότητα με τις ανάστροφες μεταγραφάσες των ιών.

Η δυσκερίνη είναι πρωτεΐνη με κεντρικό ρόλο στη σύνθεση αλλά και τη διατήρηση της σταθερότητας διαφόρων ριβονουκλεοπρωτεϊνών, μεταξύ αυτών και της τελομεράσης (Mitchell et al. 1999, Mochizuki et al. 2004, Meier U.T. 2005). Όπως έχει φανεί σε πειράματα η έλλειψη της δυσκερίνης εξασθενεί τη δραστικότητα της τελομεράσης και του TERC (Mitchell et al. 1999, Venteicher et al. 2009).

Τα σωμάτια Cajal είναι σφαιρικά οργανίδια που απαντώνται στους πυρήνες των κυττάρων με αναπαραγωγική δραστηριότητα, όπως τα εμβρυονικά και τα καρκινικά κύτταρα ή κύτταρα με μεταβολική δραστηριότητα όπως οι νευρώνες. Τα σωμάτια αυτά, θεωρείται ότι λειτουργούν ως θέσεις συναρμολόγησης και επεξεργασίας των ριβονουκλεοπρωτεϊνών και ρυθμίζουν την κατανομή της τελομεράσης στα τελομερή, μια διεργασία για την οποία είναι απαραίτητη η πρωτεΐνη TCAB1 (Venteicher και Artandi, 2009). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη 1 της τελομεράσης και του σωματιδίου Cajal (TCAB1), σχετίζεται με την εναπόθεση του RNA τμήματος της τελομεράσης (TERC) στα σωμάτια Cajal και τη σύνθεση των τελομερών (Venteicher et al. 2009).

Στον ενήλικα άνθρωπο δεν ανιχνεύεται δραστικότητα της τελομεράσης, ιδίως στους ιστούς που τα κύτταρά τους δεν πολλαπλασιάζονται. Αντίθετα, στα κύτταρα όπως τα ανδρικά γεννητικά κύτταρα, τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, τα πρόδρομα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος και τα κύτταρα των εντερικών κρυπών, τα οποία συνεχίζουν τον πολλαπλασιασμό τους και μετά την ενηλικίωση

του ανθρώπου, υπάρχει σημαντική δραστικότητα τελομεράσης (Chiu et al. 1996; Yui et al. 1998; Holt et al. 1999; Meyerson 2000).

Όπως προκύπτει από μελέτες, υπάρχει δραστικότητα τελομεράσης και σε μεγάλο ποσοστό (>85%) των νεοπλασιών (Kim et al. 1994; Shay et al. 1997). Όμως η τελομεράση φαίνεται πως ενεργοποιείται αργά στην εξέλιξη του καρκίνου, γεγονός που εξηγεί τα μικρά μήκη των τελομερών που παρατηρούνται στα καρκινικά κύτταρα και τα οποία αλλοιώνουν τη χρωμοσωμική σταθερότητα των κυττάρων αυτών (Artandi 2006).

Το hTR εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, ασχέτως με τη δραστικότητα της τελομεράσης (Avilion et al. 1996), ενώ φαίνεται πως στα καρκινικά κύτταρα, η έκφρασή του είναι πενταπλάσια σε σχέση με τα κύτταρα των φυσιολογικών ιστών (Yi et al. 1999). Σε αντίθεση, η έκφραση του hTERT απαντάται σε λιγότερο από το ένα πέμπτο των κυττάρων (Yi et al. 1999). Επειδή ακριβώς η έκφραση του hTERT είναι γενικά μειωμένη στα φυσιολογικά και αυξημένη στα αθάνατα κύτταρα, εικάζεται πως το hTERT είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει τη δραστικότητα της τελομεράσης (Cong et al. 2002).

Η έλλειψη της δραστικότητας της τελομεράσης στα περισσότερα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα, είναι πιθανό να οφείλεται σε καταστολή του γονιδίου του hTERT. Έτσι, η άρση της καταστολής αυτής, έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του hTERT και τη διέγερση της δραστικότητας της τελομεράσης που παρατηρείται κατά την καρκινογένεση και σχετίζεται με την κυτταρική αθανασία (Cong et al. 2002).

Όμως, δεν αρκεί μόνο να υπάρχει δραστικότητα τελομεράσης, ώστε τα τελομερή να διατηρήσουν το μήκος τους. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η τελομεράση να έχει πρόσβαση στα τελομερή. Όπως φαίνεται από παλαιότερες μελέτες, οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες TRF1 και TRF2 είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία της t-αγκύλης (t-loop) (Griffith

et al. 1999) η οποία -όπως αναφέρθηκε παραπάνω- προστατεύει το τελομερές, αλλά ταυτόχρονα το κάνει και πιο δυσπρόσιτο για την τελομεράση (Van Steelsen et al. 1997; Smogorzewska et al. 2000). Έτσι, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών TRF1 και TRF2 εμποδίζει την περαιτέρω αύξηση του μήκους των τελομερών στα κύτταρα με δραστικότητα τελομεράσης (Smogorzewska et al. 2000).

### 1.3 Γήρανση

Η γήρανση είναι μια διαδικασία προοδευτικού περιορισμού των λειτουργιών των οργάνων, οι οποίες καταλήγουν με το χρόνο να γίνονται παθολογικές. Σε κυτταρικό επίπεδο, η συσσώρευση κυτταρικών καταστροφών προκαλεί τη γήρανση. Αν για κάποιο λόγο η δράση των παραγόντων που επιβαρύνουν τις λειτουργίες των κυττάρων αυξηθεί, τότε παρατηρείται πρόωρη κυτταρική γήρανση. Έτσι, τα κύτταρα γίνονται ανίκανα για αναπαραγωγή και οι λειτουργίες τους περιορίζονται σημαντικά. Αυτό οδηγεί στη μείωση των μιτώσεων και στο περιορισμό της ανάπτυξης (Jimenez et al. 2005).

Ένας δείκτης γήρανσης σε κυτταρικό επίπεδο είναι το μήκος των τελομερών. Συγκεκριμένα, μείωση του μήκους των τελομερών, έχει παρατηρηθεί μετά από επανειλημμένες κυτταρικές διαιρέσεις *in vitro* (Harley et al. 1990) και σε γήρανση *in vivo* (DeLange et al. 1990; Hastie et al. 1990; Lindsey et al. 1991). Ο ανώτερος αριθμός μιτώσεων που

συμβαίνει σε ένα φυσιολογικό σωματικό κύτταρο είναι γνωστός ως το «όριο του Hayflick» (Hayflick 1965).

Στο «όριο του Hayflick», ένα ή περισσότερα τελομερή με σημαντικά μειωμένο μήκος πυροδοτούν μια μόνιμη κατάσταση περιορισμού της ανάπτυξης, γνωστή ως αναπαραγωγική γήρανση ή επίπεδο θνητότητας 1 (mortality stage 1- M1) (Wright et al. 1989; Hara et al. 1991; Shay et al. 1991). Τα κύτταρα που ξεπερνούν το επίπεδο θνητότητας 1 και υπόκεινται σε περαιτέρω απώλεια τελομερικού υλικού, συναντούν ένα δεύτερο φραγμό αναπαραγωγής, το επίπεδο θνητότητας 2 (mortality stage 2- M2) (Shay et al. 1989; Counter et al. 1992; Shay et al. 1993). Το στάδιο αυτό, χαρακτηρίζεται από μαζικό κυτταρικό θάνατο και εξαιρετικά μικρά και μη λειτουργικά τελομερή. Τα ελάχιστα επιζώντα κύτταρα που διαφεύγουν του τελευταίου σταδίου, καταφέρνουν να διατηρήσουν το μήκος των τελομερών τους, χάρη στη δραστικότητα της τελομεράσης. Αυτό οδηγεί σε απεριόριστη αναπαραγωγική δυνατότητα, δηλαδή σε κυτταρική αθανασία (Yu-Sheng et al. 2002).

Παρά ταύτα όμως, τα περισσότερα ανθρώπινα σωματικά κύτταρα, δεν έχουν δραστικότητα τελομεράσης και έχουν περιορισμένο αριθμό μιτώσεων (Hayflick 1965; Shay et al. 2000; Wright et al. 2001). Όταν το κύτταρο φθάσει στον ανώτερο αριθμό μιτώσεων, ο οποίος εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου, σταματά για πάντα η αναπαραγωγή του. Αυτά τα κύτταρα υποβάλλονται σε μια σειρά μορφολογικών και βιοχημικών μεταβολών, αλλά παραμένουν ζωντανά για ορισμένο χρονικό διάστημα σε καλλιέργειες (Goldstein 1990).

Επίσης στη διαδικασία της γήρανσης, παίζουν σημαντικό ρόλο οι πρωτεΐνες αναστολής όγκων p53 και Rb. Θεωρείται πως ο μηχανισμός της γήρανσης πυροδοτείται κυρίως μέσω του p53, όταν μετά από αρκετές κυτταρικές διαιρέσεις το μήκος των τελομερών φθάσει σε κριτικό επίπεδο (Ben-Porath et al. 2005).

Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει ότι η κυτταρική γήρανση είναι δυνατόν να επέλθει και ταχέως, ανεξάρτητα από τον αριθμό των προηγούμενων κυτταρικών διαχωρισμών, ως αντίδραση σε διάφορους βλαπτικούς παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες είναι για παράδειγμα η ακτινοβολία, το οξειδωτικό stress, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών και η καταστροφή του DNA (Chen et al. 1994; Robles et al. 1998; Kaneko et al. 2001; Gire Roux et al. 2004). Αυτός ο τύπος γήρανσης καλείται «πρόωρη γήρανση οφειλόμενη στο stress» (stress induced replicative senescence) (Lloyd 2002).

Τα τελομερή εμπλέκονται και στην πρόωρη γήρανση οφειλόμενη στο stress, μόνο που εδώ φαίνεται πως ευθύνεται, όχι τόσο το μήκος τους, αλλά η αλλαγή στη δομή και στη λειτουργία τους και συγκεκριμένα η καταστροφή της t-αγκύλης (t-loop) (Karlseder et al. 2002; Li et al. 2003; Ben-Porath et al. 2004). Φραγμό στο μηχανισμό αυτό αποτελεί η τελομεράση, η οποία όχι μόνο συνθέτει τελομερικό DNA στα άκρα των χρωμοσωμάτων διατηρώντας έτσι το μήκος των τελομερών, αλλά φαίνεται πως προστατεύει και τη δομή τους διατηρώντας την t-αγκύλη (t-loop) (Bodnar et al. 1998; Zhu et al. 1999; Blackburn 2005).

Η γήρανση είναι ένας πολύ σημαντικός προδιαθεσικός παράγοντας για την αθηρωματική καρδιαγγειακή νόσο. Ο κίνδυνος για στεφανιαία νόσο, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και περιφερική αγγειοπάθεια αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας (Lakatta et al. 2003; Braunwald et al. 2005). Η γήρανση των αγγειακών κυττάρων, φαίνεται να είναι το *in vivo* φαινόμενο που σχετίζεται άμεσα με την αθηρωμάτωση. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών των αγγείων σε αθηρωματικές πλάκες, έχουν μορφολογικά χαρακτηριστικά γηρασμένων κυττάρων (Vasile et al. 2001; Minamino et al. 2002). Πιθανώς αυτό να είναι αποτέλεσμα της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου και της φλεγμονώδους αντίδρασης που συνοδεύει την αθηροσκλήρωση.



Σύμφωνα με διάφορες έρευνες, φαίνεται πως τα γηρασμένα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, παράγουν αυξημένες ποσότητες κυτταροκινών, όπως τον παράγοντα νέκρωσης όγκων  $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) (Effros et al. 2005; Effros 2007). Η περίσσεια των κυτοκινών αυτών και συγκεκριμένα του TNF $\alpha$ , επιτείνει τη φλεγμονώδη αντίδραση της αθηροσκλήρωσης και την προσκόλληση των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος στο ενδοθήλιο των αγγείων (Matsushita et al. 2001).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως το μονοξείδιο του αζώτου (NO), είναι πολύ σημαντικό για τη λειτουργία του αρτηριακού ενδοθηλίου (Haendeler 2006; Simionescu 2007). Φαίνεται πως ρυθμίζει τον αγγειακό τόνο και βελτιώνει την αντιθρομβωτική και αντιφλεγμονώδη δράση του. Έτσι παρατείνει τη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων, παρεμποδίζοντας τη διαδικασία της απόπτωσης (Dimmeler et al. 1999; Hoffman et al. 2001). Η γήρανση είναι ανασταλτικός παράγοντας για την ενδοθηλιακή σύνθεση του NO (eNOS), καθώς αναστέλλει τόσο την έκφραση όσο και τη δραστικότητα της eNOS (Matsushita et al. 2001). Ο ρόλος της τελομεράσης στο φαινόμενο αυτό, είναι υπό διερεύνηση. Πρόσφατα βρέθηκε, ότι η διατήρηση της έκφρασης του hTERT στο ενδοθήλιο, που έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση της δραστικότητας της τελομεράσης, αποκαθιστά τη σύνθεση του NO και τη δραστικότητα του eNOS. Επιπλέον προωθεί ένα νεότερο φαινότυπο για τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Με αυτό τον τρόπο η τελομεράση, φαίνεται ότι προστατεύει τις φυσιολογικές ιδιότητες του αγγειακού ενδοθηλίου (Matsushita et al. 2001).

## 1.4 Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι η επακόλουθη παθολογική κατάσταση μιας προοδευτικής και μη αναστρέψιμης καταστροφής νεφρώνων, που έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση όλων των απεκκριτικών (σπειραματικών, σωληναριακών) και ενδοκρινικών λειτουργιών των νεφρών, η οποία αναπτύσσεται βαθμιαία σε χρονικό διάστημα μηνών ή ετών. Η νεφρική βλάβη ή η ελάττωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης κάτω από  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  για διάστημα τριών μηνών ή και περισσότερο, ανεξάρτητα από το αίτιο, ορίζεται ως χρόνια νεφρική νόσος.

Σύμφωνα με τις τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες του Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI), διακρίνονται πέντε στάδια στην εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Στάδιο 1: φυσιολογικός ή αυξημένος ρυθμός σπειραματικής διήθησης με ταυτόχρονη παρουσία στοιχείων νεφρικής βλάβης, όπως μικρολευκωματινουρία/λευκωματουρία, αιματουρία, απεικονιστικές ή ιστολογικές αλλοιώσεις. Στάδιο 2: νεφρική βλάβη με ήπια μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης ( $60\text{-}89\text{ml/min/1,73m}^2$ ) και παρουσία

στοιχείων νεφρικής βλάβης, όπως μικρολευκωματινουρία/λευκωματουρία, αιματοουρία, απεικονιστικές ή ιστολογικές αλλοιώσεις.. Στάδιο 3: μέτρια μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (30-59 ml/min/1,73m<sup>2</sup>). Συγκεκριμένα το στάδιο 3 χωρίζεται στα στάδια 3A, με ρυθμό σπειραματικής διήθησης από 59 έως 45 ml/min/1,73m<sup>2</sup> και το στάδιο 3B, με ρυθμό σπειραματικής διήθησης από 44 έως 30 ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Στάδιο 4: σοβαρού βαθμού μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (15-29ml/min/1,73m<sup>2</sup>). Στάδιο 5: ρυθμός σπειραματικής διήθησης < 15ml/min/1,73m<sup>2</sup>. Στο στάδιο αυτό, για τη συνέχεια της ζωής, είναι απαραίτητη θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας, είτε ως εξωνεφρική κάθαρση, είτε ως μεταμόσχευση νεφρού.

#### **1.4.1 Επιδημιολογία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας**

Η τακτική κεντρικής καταγραφής των ασθενών με χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου που εφαρμόζεται τα τελευταία χρόνια σε Ευρώπη (αρχείο E.D.T.A.) και Η.Π.Α. (αρχείο U.S.R.D.S.), επιτρέπει με σχετική ακρίβεια την επιδημιολογική ανάλυση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Τα νέα περιστατικά με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, κυμαίνονται στο Ενωμένο Βασίλειο από 80-110 ασθενείς ανά εκατομμύριο πληθυσμού ετησίως (UK Renal Registry 2001). Αντίστοιχα η συχνότητα της νόσου ήταν αρκετά υψηλότερη στις Η.Π.Α. το 1999, φτάνοντας τους 315 ασθενείς ανά εκατομμύριο πληθυσμού (ANZDATA Registry 2001). Ο επιπολασμός ασθενών σε θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας στην Ευρώπη ήταν 462 ασθενείς ανά εκατομμύριο πληθυσμού το 1996 (The Annual Report on Management of Renal Failure in Europe XXVII; 1996) και

έφτασε τους 659 ασθενείς το 1999, ενώ την ίδια χρονιά στις Η.Π.Α. έφτανε τους 1217 ασθενείς ανά εκατομμύριο πληθυσμού (ANZDATA Registry 2001). Στοιχεία από την Αυστραλία (ANZDATA Registry 2001), δείχνουν παρόμοια επιδημιολογία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου με αυτήν του Ενωμένου Βασιλείου (The UK Renal Registry 2000) και της Ευρώπης (επίπτωση-90 νέοι ασθενείς ανά εκατομμύριο πληθυσμού ανά έτος, επιπολασμός-332 ασθενείς, σύμφωνα με στοιχεία του 2000). Στην Ιαπωνία τα στοιχεία του 2000 είναι παρόμοια με αυτά των Η.Π.Α. (252 νέοι ασθενείς ανά εκατομμύριο πληθυσμού και επιπολασμός 1624 ασθενείς) (Iseki et al. 2002) . Οι διαφορές ανάμεσα σε Ευρώπη/Αυστραλία και Αμερική/Ιαπωνία πιθανόν να οφείλονται στη υψηλότερη συχνότητα του σακχαρώδους διαβήτη (τύπου 2) και της αρτηριακής υπέρτασης στις Η.Π.Α. και την Ιαπωνία (USRDS 2001; Iseki et al. 2002). Οι δύο αυτές παθήσεις αποτελούν τις κυριότερες αιτίες χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου στις χώρες αυτές. Σε αντίθεση, η χρόνια σπειραματονεφρίτιδα μοιάζει να είναι η κυριαρχούσα αιτία σε Ευρώπη και Αυστραλία (The Annual Report on Management of Renal Failure in Europe XXVII 1996; ANZDATA Registry. Report. ANZDAT; 2001).

Παρόλο που ο επιπολασμός στην Ευρώπη και στην Ελλάδα είναι σε σύγκριση μικρότερη από ότι στις Η.Π.Α., φαίνεται ότι και εδώ ο συνολικός αριθμός των αρρώστων με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου αυξάνεται συνεχώς. Αυτή η αύξηση, οφείλεται αφενός στην καλύτερη ποιότητα των θεραπειών υποκατάστασης και τη μεταμόσχευση με συνέπεια την μακροχρόνια επιβίωση των ασθενών και αφετέρου στην συχνή πλέον εφαρμογή τους σε υπερήλικες.

## **1.4.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας**

Η εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας επηρεάζεται από δύο κατηγορίες παραγόντων. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει παράγοντες στους οποίους δεν είναι δυνατό να παρέμβουμε, όπως η ηλικία, το φύλο, τα γενετικά χαρακτηριστικά και η φυλή. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν παράγοντες που εν δυνάμει πυροδοτούν τη νόσο, όπως αιμοδυναμικοί, μεταβολικοί και αυτοάνοσοι. Παρεμβάσεις σε αυτούς τους παράγοντες (όπως ο έλεγχος της αρτηριακής υπέρτασης, του σακχαρώδη διαβήτη και οι ανοσοκατασταλτικές θεραπείες) είναι δυνατόν να αναστείλουν την εμφάνιση της χρόνιας νεφρικής νόσου ή να επιβραδύνουν την εξέλιξή της.

### **1.4.3 Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου**

#### **α. Ηλικία**

Η επίπτωση της νεφρικής νόσου αυξάνεται με την ηλικία. Στις Η.Π.Α. η ετήσια συχνότητα της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου, φθάνει τα 119 άτομα ανά εκατομμύριο πληθυσμού για την ηλικία μεταξύ 20 και 44 ετών, 603 άτομα ανά εκατομμύριο πληθυσμού μεταξύ 45 και 64 ετών, ενώ αγγίζουν τα 1300 περιστατικά στην ηλικία άνω των 65 ετών (USRDS 2001). Η αιτιολογία της νόσου είναι επίσης διαφορετική στους ηλικιωμένους ασθενείς. Η αρτηριακή υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης και η αποφρακτική ουροπάθεια αποτελούν το 40-60% των αιτιών.

#### **β. Φύλο**

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου είναι πιο συχνή στους άνδρες (USRDS 2001). Το 1999 στις Η.Π.Α. οι άνδρες ασθενείς ήταν σχεδόν διπλάσιοι σε σχέση με τις γυναίκες (USRDS 2001). Ακόμα, έχει παρατηρηθεί ταχύτερη έκπτωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και εξέλιξη της νεφρικής νόσου, ανάμεσα στους άνδρες (National Kidney Foundation 2002).

#### **γ. Φυλή**

Στους Αφρο-αμερικάνους και τους ισπανόφωνους των Η.Π.Α., η συχνότητα των νεφρικών παθήσεων που οφείλονται στο σακχαρώδη διαβήτη ή την αρτηριακή υπέρταση είναι υψηλότερη, από ότι στους λευκούς (Klag et al. 1997; USRDS 2001). Στους ασθενείς του Ηνωμένου Βασιλείου απαντάται συχνότερα η διαβητική, αλλά και η μη-διαβητική νεφροπάθεια στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου ινδικής καταγωγής (Buck et al. 1997). Αντίθετα η αρτηριακή υπέρταση φαίνεται να είναι η συχνότερη αιτία νεφροπάθειας στους ασθενείς με καταγωγή την Αφρική και την Καραϊβική.

#### **δ. Γενετικοί παράγοντες**

Οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 που έχουν οικογενειακό ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου και αρτηριακής υπέρτασης έχουν δύο και τέσσερις φορές αντίστοιχα, αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης διαβητικής νεφροπάθειας (El Nahas 2003). Επίσης, ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης στους γονείς του ασθενούς αποτελεί επιβαρυντικό παράγοντα για την εξέλιξη τόσο της διαβητικής, όσο και της IgA νεφροπάθειας (Locatelli et al. 2000). Ακόμα ασθενείς με πολυκυστική νόσο που φέρουν το γονότυπο PKD1 φαίνεται να έχουν χειρότερη πρόγνωση.

### **1.4.4 Τροποποιησιμοι παράγοντες κινδύνου**

### **α. Λευκωματουρία**

Η λευκωματουρία είναι σημαντικός προγνωστικός παράγοντας στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και σχετίζεται με την ταχύτερη εξέλιξή της (National Kidney Foundation 2002). Σε ένα μεγάλο φάσμα σπειραματοπαθειών, οι ασθενείς με σημαντική και εμμένουσα λευκωματουρία, έχουν χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με αυτούς στους οποίους υπάρχει καλύτερος έλεγχός της (Locatelli et al. 1996).

### **β. Αρτηριακή υπέρταση**

Επιπλέον ο ανεπαρκής έλεγχος της αρτηριακής υπέρτασης, σχετίζεται με ταχύτερη εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (National Kidney Foundation 2002). Πιστεύεται πως η μεταφορά της συστηματικής αρτηριακής υπέρτασης στο σπειραματικό τριχοειδικό δίκτυο και η υπέρταση που προκαλείται σε τοπικό επίπεδο, επιδεινώνει τη σπειραματική σκλήρυνση (El Nahas 2003).

### **γ. Μεταβολικοί και άλλοι παράγοντες**

Μεταβολικοί παράγοντες, όπως ο πτωχός έλεγχος της υπεργλυκαιμίας στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, η δυσλιπιδαιμία, η παχυσαρκία και η υπερουριχαιμία, αλλά και ποικίλοι άλλοι, όπως η καρδιαγγειακή νόσος, το κάπνισμα, η κατάχρηση αλκοόλ και καφέ, αλλά και η χρήση ναρκωτικών ουσιών, φαίνεται να επιταχύνουν την εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (El Nahas 2003).

## **1.4.5 Αίτια χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας**

Κάθε πάθηση που οδηγεί σε μη αναστρέψιμη καταστροφή νεφρικού παρεγχύματος, προκαλεί χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Τα αίτια της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας είναι επομένως ποικίλα και συμπεριλαμβάνουν ομάδες παθήσεων όπως σπειραματοπάθειες, διάμεσες

νεφροπάθειες, συστηματικές παθήσεις, παθήσεις των αγγείων, αποφρακτική ουροπάθεια και συγγενείς νεφροπάθειες. Στα συνηθέστερα αίτια χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας κατατάσσονται η διαβητική νεφροπάθεια, η υπερτασική νεφροπάθεια, η χρόνια σπειραματονεφρίτιδα, η αποφρακτική ουροπάθεια και η χρόνια πυελονεφρίτιδα, η νεφροπάθεια από αναλγητικά, οι πολυκυστικοί νεφροί αλλά και άλλα αίτια όπως η αμυλοείδωση, το πολλαπλούν μυέλωμα και ο συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος. Μια μεγάλη ομάδα ασθενών δεν μπορεί να καταταγεί αιτιολογικά, καθώς οι ασθενείς αυτοί έρχονται στο νοσοκομείο με προχωρημένη νεφρική ανεπάρκεια και ρικνούς νεφρούς, οπότε δεν είναι δυνατόν να αναγνωρισθεί η πρωτοπαθής νόσος.

#### **1.4.6 Κλινική εικόνα και επιπλοκές της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας**

Η κλινική συμπτωματολογία στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, είναι αποτέλεσμα της σταδιακώς επιδεινούμενης έκπτωσης όλων των φυσιολογικών λειτουργιών των νεφρών. Η μειωμένη απεκκριτική ικανότητα των νεφρών, οδηγεί σε διαταραχή της ομοιόστασης του ύδατος και των ηλεκτρολυτών, αλλά και της οξεοβασικής ισορροπίας. Η παραγωγή και η έκκριση ορμονών, όπως η ερυθροποιητίνη και ο ενεργός μεταβολίτης της βιταμίνης D (1,25 διυδροξυχοληκαλσιφερόλη), ελαττώνονται όσο η νόσος εξελίσσεται και οδηγούν σε νεφρογενή αναιμία, δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό και νεφρική οστεοδυστροφία. Τέλος, η τοξική επίδραση των συσσωρευμένων προϊόντων του καταβολισμού των λευκωμάτων, είναι υπεύθυνη για το



ουραιμικό σύνδρομο που αναπτύσσεται σε προχωρημένο στάδιο της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας.

Το καρδιαγγειακό σύστημα επιβαρύνεται σημαντικά, καθώς η αρτηριακή υπέρταση απαντάται συχνά στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Ο πτωχός έλεγχος της αρτηριακής υπέρτασης επιταχύνει την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας. Έτσι δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος με καταστροφικά αποτελέσματα για την καρδιά και τα αγγεία. Η συχνότητα της στεφανιαίας νόσου, των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων και της περιφερικής αγγειοπάθειας, είναι μεγαλύτερη στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό. Έτσι η καρδιαγγειακή νόσος, καθίσταται από τις συχνότερες αιτίες που απειλούν τη ζωή των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (Levey et al. 1998; Baigent et al. 2000).

Η ορθόχρωμη ορθοκυτταρική αναιμία που παρατηρείται στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, οφείλεται στη σχετικά ελαττωμένη παραγωγή και έκκριση ερυθροποιητίνης από τους νεφρούς. Συνήθως εμφανίζεται από το τρίτο στάδιο της εξέλιξης της νόσου και ευθύνεται για διάφορα συμπτώματα των ασθενών, όπως εύκολη κόπωση, αδυναμία και επιδείνωση της προϋπάρχουσας στηθάγχης. Η αναιμία μπορεί να συμβάλλει στην καρδιακή δυσλειτουργία με αύξηση της καρδιακής παροχής, επιδεινώνοντας έτσι την υπερτροφία της αριστεράς κοιλίας.

Η υπερφωσφαταιμία και η ανεπάρκεια της 1,25-διυδροξυβιταμίνης D<sub>3</sub>, οδηγούν σε δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό με αποτέλεσμα τη νεφρική οστεοδυστροφία. Συμπτώματα όπως διάχυτα οστικά άλγη, παραμόρφωση των τελικών φαλαγγών των δακτύλων και παθολογικά κατάγματα, χαρακτηρίζουν τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Τα υψηλά επίπεδα γινομένου ασβεστίου-φωσφόρου, κυρίως λόγω της υπερφωσφαταιμίας, οδηγούν σε επασβεστώσεις των αγγείων, σπλάχνων και μαλακών μορίων. Σήμερα πλέον θεωρείται

καίριας σημασίας, η έγκαιρη πρόληψη του δευτεροπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού με χορήγηση ανάλογων της βιταμίνης D, φωσφοροδεσμευτικά φάρμακα και διαιτητικό περιορισμό του φωσφόρου (Kanis 1995).

Η μεταβολική οξέωση της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, οφείλεται στη μειωμένη απέκκριση ιόντων υδρογόνου. Συγκεκριμένα στις διάμεσες νεφρίτιδες, ένας από τους μηχανισμούς που προκαλεί τη μεταβολική οξέωση, είναι η αυξημένη απώλεια διττανθρακικών. Η οξέωση με τη σειρά της επιδεινώνει την υπερκαλιαιμία, δυσχεραίνει τον αναβολισμό των λευκωμάτων και αυξάνει την απώλεια ασβεστίου από τα οστά (Alpern et al. 1997).

Η υποθρεψία είναι συχνό φαινόμενο και οφείλεται στην ανορεξία, την οξέωση και την ουραιμία που συνοδεύουν τη νεφρική νόσο. Τα κύρια κλινικά σημεία υποθρεψίας είναι η απώλεια βάρους και η μυική ατροφία, με συχνά εργαστηριακά ευρήματα τα χαμηλά επίπεδα αλβουμίνης, τρανσφερίνης και χοληστερόλης.

Οι ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, χωρίς όμως άλλες συνοδές παθήσεις, διατηρούν το ισοζύγιο άλατος και ύδατος σταθερό, μέχρι ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης να μειωθεί σημαντικά (συνήθως κάτω από 10 ml/min). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αύξησης της απέκκρισης άλατος και ύδατος, που ρυθμίζεται από τη σπειραματοσωληναριακή ισορροπία. Όταν όμως ο αντιρροπιστικός αυτός μηχανισμός αδυνατεί να αντεπεξέλθει στις μεταβολές του ισοζυγίου, οι κίνδυνοι για τον ασθενή είναι σημαντικοί. Για το λόγο αυτό, οι ασθενείς πρέπει να τηρούν αυστηρό διαιτητικό περιορισμό του άλατος, καθώς και καταμέτρηση των προσλαμβανόμενων υγρών. Αυτή η οδηγία δίνεται με σκοπό να διατηρηθεί το ισοζύγιο ύδατος και άλατος. Σε πολύ μειωμένη νεφρική λειτουργία, όπως στο στάδιο 4 και 5, λόγω των μειωμένων δυνατοτήτων των νεφρών, η υπερβολική λήψη υγρών θα οδηγήσει σε υπονατρίαμια

και υπερυδάτωση, ενώ αντίθετα ο υπερβολικός περιορισμός τους σε υπερνατριαιμία και αφυδάτωση.

Η υπερκαλιαιμία συνήθως παρατηρείται, όταν ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης μειωθεί κάτω από 10 ml/min. Ο διαιτητικός περιορισμός του καλίου στα 60 mmol ανά ημέρα, συνήθως επιτυγχάνει να διατηρήσει το ισοζύγιο του σταθερό. Πιο συχνά υπερκαλιαιμία παρατηρείται σε ασθενείς με υπορενιναιμικό υποαλδεστερονισμό (ειδικότερα ηλικιωμένους διαβητικούς ασθενείς), ασθενείς με υπερκαταβολισμό ή οξέωση. Σε αντίθεση με την οξεία νεφρική ανεπάρκεια, στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, οι ασθενείς αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στις αυξημένες συγκεντρώσεις καλίου. Έτσι είναι δυνατό, ασθενείς με συγκέντρωση καλίου μέχρι και 7,5 mmol/L στον ορό τους, να μην έχουν ηλεκτροκαρδιογραφικές μεταβολές. Για λόγους ασφάλειας όμως, γίνεται προγραμματισμός εξωνεφρικής κάθαρσης, όταν η συγκέντρωση καλίου στον ορό του ασθενούς είναι σταθερά πάνω από 6,5 mmol/L.

Η αιμορραγική διάθεση, είναι συχνό πρόβλημα για τους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Οφείλεται κυρίως στη δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων λόγω της ουραιμίας (ουραιμική θρομβοκυττοπάθεια). Ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει αρνητικά τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, είναι η νεφρογενής αναιμία (Stefanidis et al. 1995). Η αιμορραγική διάθεση μπορεί να οφείλεται εξίσου και στη δράση της αντιπηκτικής αγωγής (ηπαρίνη) κατά την αιμοκάθαρση. Κλινικές εκδηλώσεις του φαινομένου αυτού, μπορεί να είναι μια οξεία αιμορραγία από το γαστρεντερικό σύστημα ή η επίσταξη. Με σκοπό την αποφυγή επιπλοκών, πριν κάθε επέμβαση - συμπεριλαμβανομένου και των οδοντιατρικών- θα πρέπει να εξασφαλισθεί ικανοποιητική κάθαρση με στόχο τη βελτίωση της

ουραιμίας, επίπεδο αιμοσφαιρίνης 10-12 g/dL και ικανή χρονική απόσταση από την τελευταία χορήγηση ηπαρίνης.

Οι δερματολογικές εκδηλώσεις είναι ένα συχνό φαινόμενο στους ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο. Συνήθεις εκδηλώσεις είναι η γαιώδης (ουραιμική) χροιά δέρματος και η ξηροδερμία. Ένα άλλο συχνό σύμπτωμα είναι ο κνησμός, που πολλές φορές είναι δύσκολο να ελεγχθεί και ταλαιπωρεί σημαντικά τον ασθενή. Παρατηρείται συχνότερα σε τελικού σταδίου χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και ειδικότερα σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς. Οι παθογενετικοί μηχανισμοί που τον προκαλούν, δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι, αλλά φαίνεται πως ιδιαίτερο ρόλο έχει ο διαταραγμένος μεταβολισμός ασβεστίου-φωσφόρου.

Στα τελικά στάδια της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, όπου υφίσταται ουραιμία, εκδηλώσεις από το κεντρικό νευρικό σύστημα είναι η ουραιμική εγκεφαλοπάθεια, οι επιληπτικές κρίσεις και το κώμα. Αυτά τα συμπτώματα απαντώνται, σε περιπτώσεις παραμελημένης χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου, που δεν έχει γίνει θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας. Επίσης συχνά παρατηρείται γνωστική εξασθένιση, μυοκλονίες και το «σύνδρομο ανήσυχων ποδιών» (restless legs syndrome ). Το τελευταίο συνιστάται σε αυτόματες, ακούσιες κινήσεις των κάτω άκρων. Οφείλεται στην ουραιμία και αποτελεί ένδειξη για έναρξη εξωνεφρικής κάθαρσης.

Από το περιφερικό νευρικό σύστημα, εμφανίζονται κυρίως αισθητικού τύπου διαταραχές με κατανομή «γαντιού-κάλτσας», που βελτιώνονται σε ένα βαθμό με την εντατικοποίηση της εφαρμοζόμενης μεθόδου υποκατάστασης. Τέλος, διαταραχή στη λειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος, μπορεί να εμφανισθεί σε συνέπεια της ουραιμίας, ιδιαίτερα σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Η σημαντικότερη εκδήλωσή της είναι η ορθοστατική υπόταση και η

υπόταση κατά τη διάρκεια της αιμοκάθαρσης, λόγω ανακατανομής του όγκου των υγρών. Επίσης μπορεί να εμφανισθούν διαταραχές στην κινητικότητα του στομάχου (γαστροπάρεση) και του εντέρου (διάρροια, δυσκοιλιότητα).

Οι συχνότερες και σημαντικότερες ενδοκρινικές διαταραχές στην χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, είναι ο δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός λόγω των μεταβολών στον άξονα βιταμίνης D - παραθορμόνης, που οδηγεί σε νεφρική οστεοδυστροφία και η σχετική ανεπάρκεια της ερυθροποιητίνης που οδηγεί σε νεφρογενή αναιμία. Όμως δεν είναι μόνο αυτές οι ενδοκρινικές διαταραχές που παρατηρούνται στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Οι ουραιμικοί ασθενείς εμφανίζουν διαταραχή στην ανοχή της γλυκόζης και αύξηση της αντίστασης στην ινσουλίνη. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι καθώς ελαττώνεται η νεφρική λειτουργία, σε πολλούς διαβητικούς ασθενείς, μειώνονται οι ανάγκες σε ινσουλίνη. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αύξηση της ημιπεριόδου ζωής της χορηγούμενης ινσουλίνης, λόγω της νεφρικής ανεπάρκειας. Είναι γνωστό άλλωστε, ότι ο νεφρός συμμετέχει τόσο στο μεταβολισμό, όσο και στην απέκκριση της ινσουλίνης.

Η ολική θυροξίνη (T4) μπορεί να είναι ελαττωμένη, ενώ η τριώδοθυρονίνη (T3) αυξημένη. Η διαταραχή αυτή οφείλεται πιθανότατα σε ατελή μετατροπή της T3 σε T4. Ωστόσο η θυρεοειδοτρόπος διεγερτική ορμόνη (TSH), παραμένει φυσιολογική και η πλειοψηφία των ασθενών είναι ευθυρεοειδικοί (Μακροπούλος et al. 1997).

Τα επίπεδα αυξητικής ορμόνης του πλάσματος στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, είναι παθολογικά υψηλά. Αυτό συμβαίνει λόγω του παρατεταμένου χρόνου κάθαρσης της αυξητικής ορμόνης αλλά και σε μεταβολές στη ρύθμισή της, δηλαδή του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης. Στους ενήλικες οι επιπτώσεις αυτής της διαταραχής, δεν είναι εμφανείς.

Επίσης έχει φανεί σε παιδιά με ουραιμία, ότι κλινικά παρατηρείται καθυστέρηση στη σωματική τους ανάπτυξη. Αυτή η καθυστέρηση, οφείλεται πιθανόν στη διαταραχή της παραγωγής του παρόμοιου της ινσουλίνης αυξητικού παράγοντα-1 (IGF1, insulin-like growth factor 1).

Τα επίπεδα προλακτίνης είναι αυξημένα στους άνδρες με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. Αυτό είναι δυνατό να εκδηλωθεί κλινικά με γυναικομαστία και σεξουαλική ανικανότητα. Η τεστοστερόνη μπορεί να είναι ελαττωμένη ή και φυσιολογική ενώ οι γοναδοτροπίνες αυξημένες. Αποτέλεσμα αυτού είναι η πτωχή σπερματογένεση, που οδηγεί σε ολιγοσπερμία και στέρωση. Στις γυναίκες η ωχρινοτρόπος ορμόνη είναι αυξημένη αλλά η κανονική κατά ώσεις απελευθέρωση και η αύξηση πριν την ωορρηξία απουσιάζουν. Οι κύκλοι είναι ανωορρηκτικοί, ενώ σε προχωρημένη νεφρική ανεπάρκεια συχνή είναι και η αμηνόρροια. Αυξημένα επίπεδα προλακτίνης μπορεί επίσης να συμβάλλουν στην υπογονιμότητα. Αν και σε κάποιες περιπτώσεις, γυναίκες ασθενείς υπό αιμοκάθαρση είναι δυνατό να συλλάβουν, σπανίως καταφέρνουν να φέρουν εις πέρας την εγκυμοσύνη.

Στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, μετά τις παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος, οι λοιμώξεις αποτελούν τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου. Οι τακτικές παρακεντήσεις της αγγειακής προσπέλασης, οι κεντρικές γραμμές που χρησιμοποιούνται στην αιμοκάθαρση και η διαδικασία της περιτοναϊκής κάθαρσης, είναι δυνατό να πυροδοτήσουν φλεγμονές, ενίοτε ιδιαίτερα επικίνδυνες (Descamps-Latscha et al. 1994).

Φαίνεται επίσης, ότι και η ουραιμία αυτή καθ'αυτή είναι μια κατάσταση χρόνιας ανοσοκαταστολής (Descamps-Latscha et al. 1994). Η κυτταρική αλλά και η χυμική ανοσία του οργανισμού, πιστεύεται πως υπολείπονται στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Η απάντηση των T-λεμφοκυττάρων στα αντιγόνα είναι ελλιπής, αλλά και η

ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων φαίνεται να ανεπαρκεί. Αν και τα επίπεδα ανοσοσφαιρινών του ορού είναι φυσιολογικά, τα επίπεδα των αντισωμάτων που παράγονται με την ενεργητική ανοσοποίηση είναι πτωχά. Συχνά παρατηρείται αναζωπύρωση της φυματίωσης σε ασθενείς με θετική δοκιμασία Mantoux, αλλά και ελλιπής ανταπόκριση στον εμβολιασμό κατά της ηπατίτιδας Β. Τα αποτελέσματα αυτής της ανοσοκαταστολής στην πράξη παρατηρούνται, με μεγαλύτερη επίπτωση των βακτηριακών και ιδιαίτερα των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου.

Αυτή η χρόνια ανοσοκαταστολή που προκαλεί η ουραιμία, φαίνεται πως συμβάλλει στην ευαισθησία των ασθενών αυτών σε νεοπλασίες. Ένα μεγάλο φάσμα κακοηθειών, όπως το πρωτοπαθές ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, ο καρκίνος του νεφρού και του θυρεοειδή αδένου, το πολλαπλούν μυέλωμα και non-Hodgkin λεμφώματα, απαντώνται συχνότερα στους ασθενείς υπό αιμοκάθαρση σε σύγκριση με υγιείς ομήλικες (Buccianti et al. 1996).

## **1.5 Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, χρόνια φλεγμονή και οξειδωτικό stress**

Ένα ποσοστό 30-50% των ασθενών υπό αιμοκάθαρση, έχουν αυξημένους δείκτες φλεγμονής (Jofre et al. 2006). Οι αιτίες της φλεγμονής είναι ποικίλες και σχετίζονται με παράγοντες άμεσα συνδεδεμένους με τον ασθενή αλλά και παράγοντες της αιμοκάθαρσης. Παράγοντες σχετιζόμενοι με τον ασθενή είναι η πρωτοπαθής νόσος, τα συνοδά νοσήματα του ασθενούς, οι λοιμώξεις, η παχυσαρκία και

διάφοροι γενετικοί ή ανοσιακοί παράγοντες. Παράγοντες της αιμοκάθαρσης που συμβάλλουν στη χρόνια φλεγμονή, είναι η βιοσυμβατότητα των μεμβρανών αιμοκάθαρσης, καθώς και η ποιότητα των χρησιμοποιούμενων διαλυμάτων (Jofre et al. 2006). Η ακριβής γνώση των παραγόντων αυτών, καθώς και η πρόληψη ή η θεραπεία τους, μπορεί να συμβάλλει στον περιορισμό της χρόνιας φλεγμονής και πιθανόν στη μείωση της αυξημένης θνητότητάς τους.

Ένας από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενος και αξιόπιστος δείκτης φλεγμονής, είναι η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) (Bergstrom et al. 1995; Barany et al. 1997; Haverkate et al. 1997; Zimmermann et al. 1999; Yeun et al. 2000). Αυτή είναι εύκολο να μετρηθεί και έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται άμεσα με την πρόγνωση των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα σε φλεγμονώδεις καταστάσεις από τη CRP (Pecoits-Filho et al. 2002; Panichi et al. 2004). Για το λόγο αυτό είναι και πιο αξιόπιστος προγνωστικός δείκτης. Παρά ταύτα δεν χρησιμοποιείται ευρέως στην καθημερινή κλινική πράξη, διότι η μέτρησή της είναι μεθοδολογικά σχετικά πολύπλοκη.

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα οι παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος, αποτελούν τη συχνότερη αιτία θανάτου σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Οι παθήσεις αυτές είναι το αποτέλεσμα της αθηροσκλήρωσης των αγγείων, μια διαδικασία που ξεκινά σιωπηλά από την παιδική ηλικία, για να εκδηλωθεί συνήθως μετά την τρίτη δεκαετία της ζωής. Η αιτιοπαθογένεια της περιλαμβάνει μη ελεγχόμενους παράγοντες όπως την κληρονομικότητα, το φύλο και την αύξηση της ηλικίας αλλά και ελεγχόμενους όπως η υπερλιπιδαιμία, το κάπνισμα, η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία και η έλλειψη σωματικής άσκησης, που θεωρούνται ως κλασσικοί παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. Ανάμεσα στους μη κλασσικούς παράγοντες



καρδιαγγειακού κινδύνου, μεγάλο ενδιαφέρον έχει σημειωθεί για το οξειδωτικό stress. Τα προϊόντα γλυκοζυλίωσης και τα προϊόντα οξείδωσης των λευκωμάτων, έχει φανεί πως σχετίζονται με αυξημένους δείκτες φλεγμονής όπως η CRP και η IL-6 (Spittle et al. 2001; Danielski et al. 2003).

Οι ασθενείς υπό αιμοκάθαρση και ιστορικό καρδιακής ανεπάρκειας, έχουν υψηλότερα επίπεδα της CRP (Wang et al. 2003). Διάφορες μελέτες έδειξαν πως η υπερτροφία της αριστεράς κοιλίας της καρδιάς, σχετίζεται με τη χρόνια φλεγμονή και το οξειδωτικό stress (Nguyen-Khoa et al. 2001; Park et al. 2002; Losito et al. 2003; Kim et al. 2005). Ακόμα, μια πρόσφατη έρευνα απέδειξε πως τα υψηλά επίπεδα της CRP είναι ανάλογα με τη μάζα της αριστεράς κοιλίας της καρδιάς και αντιστρόφως ανάλογα με το κλάσμα εξώθησης αυτής (Losito et al. 2003). Από την έρευνα αυτή επίσης φάνηκε, πως η χρόνια φλεγμονή μπορεί να θεωρηθεί σαν ανεξάρτητος προδιαθεσικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρδιακής υπερτροφίας και δυσλειτουργίας των κοιλιών στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς.

Η πρωτοπαθής νόσος που ευθύνεται για την ανάπτυξη της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις, η ίδια να αποτελεί μια κατάσταση χρόνιας φλεγμονής. Παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων, είναι οι αυτοάνοσες παθήσεις και η αμυλοείδωση. Ακόμα οι συνοδοί νόσοι του ασθενούς, όπως για παράδειγμα η ισχαιμική καρδιοπάθεια, η περιφερική αγγειοπάθεια ή ο διαβήτης, είναι δυνατόν να αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες για τη φλεγμονή και το οξειδωτικό stress (Jaar et al. 2000; Vaziri 2004).

Επίσης η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου σαν μια κατάσταση χρόνιας φλεγμονής, αλλά και η διαδικασία της αιμοκάθαρσης, χαρακτηρίζονται από αυξημένη ενεργοποίηση των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος. Έχει βρεθεί πως η

αυξημένη ενεργοποίηση αυτών των κυττάρων, οδηγεί σε μείωση του μήκους των τελομερών τους (Ramirez et al. 2005) και σε μειωμένη δραστηριότητα τελομεράσης (Tsirpanlis et al. 2006).

Όπως φαίνεται από παλαιότερες μελέτες, η φλεγμονή επισπεύδει τη μείωση του μήκους των τελομερών (Effros 2004) και το παρατεταμένο οξειδωτικό stress, μειώνει τη δραστηριότητα της τελομεράσης (Serra et al. 2003). Είναι γνωστό πως και οι δύο αυτοί παράγοντες ( η χρόνια φλεγμονή και το οξειδωτικό stress), είναι παρόντες στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Σε μια πρόσφατη έρευνα, μελετήθηκε το μήκος των τελομερών και διάφοροι δείκτες φλεγμονής (όπως η CRP υψηλής ευαισθησίας, η IL-6, τα λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος και η φετουΐνη-A), σε ασθενείς υπό χρόνια αιμοκάθαρση. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, έδειξαν μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στους δείκτες της φλεγμονής και το μειωμένο μήκος των τελομερών, ανεξάρτητα από την ηλικία και το φύλο (Carrero et al. 2008). Από το εύρημα αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η χρόνια φλεγμονή, επηρεάζει ανεξάρτητα από την ημερολογιακή ηλικία το μήκος των τελομερών (Carrero et al. 2008). Παρά ταύτα, το αν η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια σα νοσολογική οντότητα, επηρεάζει το μήκος των τελομερών και τη δραστηριότητα της τελομεράσης και συνεπώς τη γήρανση των κυττάρων, παραμένει ακόμα αντικείμενο ερευνών.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Η επίπτωση της αθηρωματικής νόσου που ευθύνεται για καρδιαγγειακά συμβάματα, αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας. Έτσι οι παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος χαρακτηρίζουν το γήρας. Επίσης αυτές οι παθήσεις αποτελούν και τη συχνότερη αιτία θανάτου για τους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου.

Συνοψίζοντας τη βιβλιογραφία μπορούμε να καταλήξουμε σε κάποια συμπεράσματα. Τα τελομερή προστατεύουν τη γενετική

σταθερότητα των κυττάρων και διατηρούν την ικανότητα του χρωμοσώματος για αναπαραγωγή. Το μήκος τους όμως, με την πάροδο της ηλικίας μειώνεται. Όταν αυτό το μήκος φθάσει σε ένα κατώτατο όριο, τότε προκαλείται αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και της κυτταρικής δραστηριότητας εν γένει, οδηγώντας έτσι σε κυτταρική νέκρωση. Το ένζυμο τελομεράση λειτουργεί με σκοπό τη διατήρηση του μήκους των τελομερών. Συνεπώς το μήκος των τελομερών που εξαρτάται άμεσα από τη δραστικότητα της τελομεράσης, είναι ένας δείκτης γήρανσης σε κυτταρικό επίπεδο. Αντικατοπτρίζει τόσο τη φυσιολογική, όσο και τη πρόωρη γήρανση.

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή και αυξημένο οξειδωτικό stress, παράγοντες που οδηγούν σε πρόωρη κυτταρική γήρανση. Έτσι είναι πιθανό το μήκος των τελομερών και η δραστικότητα της τελομεράσης, να αποτελούν σημαντικούς προγνωστικούς δείκτες για τους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν να μελετηθεί το μήκος των τελομερών και η δραστικότητα της τελομεράσης, στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου υπό αιμοκάθαρση και να γίνει σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Επιπλέον στόχος ήταν να εξακριβωθεί, αν και κατά πόσο παράγοντες σχετιζόμενοι ή όχι με την αιμοκάθαρση, επηρεάζουν το μήκος των τελομερών και τη δραστικότητα της τελομεράσης στους ασθενείς αυτούς.

## **3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **3.1 Ασθενείς**

Στην παρούσα μελέτη, έλαβαν μέρος 43 κλινικά σταθεροί ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου υπό αιμοκάθαρση. Οι ασθενείς αυτοί είχαν ενταχθεί σε πρόγραμμα τακτικής αιμοκάθαρσης και

υποβάλλονταν σε τρεις συνεδρίες εβδομαδιαίως, σε δύο Μονάδες Τεχνητού Νεφρού της Λάρισας. Από τους 43 ασθενείς, οι 26 ήταν άντρες και οι 17 γυναίκες. Η ηλικία των ασθενών ήταν  $65 \pm 12,7$  χρόνια, ενώ το χρονικό διάστημα για το οποίο οι ασθενείς βρίσκονταν σε πρόγραμμα τακτικής αιμοκάθαρσης ήταν  $17,9 \pm 15,6$  μήνες.

Από τους ασθενείς αυτούς, οι 14 είχαν σακχαρώδη διαβήτη ενώ οι 29 όχι. Οι πρωτοπαθείς νόσοι που ενοχοποιούνταν για την ανάπτυξη της νεφρικής ανεπάρκειας στους ασθενείς αυτούς, είχαν μεγάλη ποικιλομορφία (Πίνακας 1.)

Για όλους τους ασθενείς καταγράφηκαν κλινικές πληροφορίες όπως χρονικό διάστημα για το οποίο βρίσκονται σε θεραπεία με αιμοκάθαρση, παρουσία ή όχι αρτηριακής υπέρτασης στο ιστορικό τους και από πότε αυτή χρονολογείται, παρουσία καρδιαγγειακών επεισοδίων, όπως οξύ ισχαιμικό έμφραγμα καρδιάς ή αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και επίσης ιστορικό καπνίσματος.

Από τους 43 ασθενείς αρτηριακή υπέρταση είχαν οι 38 (88,4%), της οποίας η χρονική διάρκεια κυμαινόταν από 1 έτος έως 35 έτη. Δεν υπήρχε αρτηριακή υπέρταση στο ιστορικό 5 ασθενών (11,6%). Διαγνωσμένο οξύ ισχαιμικό καρδιακό έμφραγμα, είχαν στο ιστορικό τους 9 ασθενείς (20,9%), ενώ αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο υπήρχε στο ιστορικό 7 ασθενών (16,3%). Καπνιστές, νυν και πρώην δήλωσαν 13 ασθενείς (30,2%) και 30 ασθενείς (69,8%) δήλωσαν πως δεν υπήρξαν ποτέ καπνιστές. Τέλος, η τριετής επιβίωση ήταν 76,7% (33 ασθενείς).

Διαβητική νεφροπάθεια	13	30,2%
Αγγειακή νεφροπάθεια	10	23,2%
Κακοήθης υπέρταση	2	4,6%
Πολυκυστική νόσος	3	6,9%
Διαμεσοσωληναριακή σκλήρυνση	2	4,6%

Σύνδρομο Alport	2	4,6%
Νόσος Wegener	2	4,6%
Αποφρακτική πυελονεφρίτιδα	2	4,6%
Χρόνια σπειραματονεφρίτιδα	1	2,3%
IgA νεφροπάθεια	1	2,3%
Μεμβρανώδη σπειραματονεφρίτιδα	1	2,3%
Φυματίωση ουροποιητικού	1	2,3%
Ινιδωειδής σπειραματονεφρίτιδα	1	2,3%
Άγνωστης αιτιολογίας	2	4,6%

Πίνακας 1.: Πρωτοπαθείς νόσοι των ασθενών που έλαβαν μέρος στη μελέτη

Η κρεατινίνη ορού των ασθενών, σε μετρήσεις ρουτίνας προ της συνεδρίας αιμοκάθαρσης, κυμαινόταν από 4,1-18,8 mg/dL ( $9,9 \pm 3$  mg/dL), ενώ η ουρία ορού από 80-246 mg/dL ( $159,6 \pm 35,3$  mg/dL). Ο αιματοκρίτης των ασθενών κυμαινόταν από 23,1-47% ( $35,1 \pm 5,3\%$ ), η CRP από 0,0-13,8 mg/dL ( $1,2 \pm 2,4$  mg/dL) και η PTH από 25,6-586 pg/ml ( $260 \pm 131,5$  pg/ml). Τέλος το URR (urea reduction ratio) που είναι ένας δείκτης επάρκειας της προσφερόμενης κάθαρσης, (υπολογιζόμενο ως  $(URp-URa)/URp$ , όπου URp η τιμή της ουρίας του ασθενούς πριν την έναρξη της συνεδρίας αιμοκάθαρσης και όπου URa η τιμή της ουρίας στο τέλος της συνεδρίας), κυμαινόταν από 0,5-0,8 ( $0,66 \pm 0,06$ ).

Στους 43 αυτούς ασθενείς, μελετήθηκε το μήκος των τελομερών και η δραστικότητα της τελομεράσης. Προκειμένου τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών να συγκριθούν με αποτελέσματα υγιών ατόμων, στη μελέτη έλαβαν μέρος και 57 υγιείς μάρτυρες, από την ίδια γεωγραφική περιοχή. Από τους μάρτυρες αυτούς, οι 45 ήταν άνδρες και οι 12 γυναίκες. Το μήκος των τελομερών μελετήθηκε σε 39 από αυτούς τους υγιείς μάρτυρες, ενώ η δραστικότητα της τελομεράσης σε 23.

## **3.2 Μέθοδοι**

### **3.2.1 Απομόνωση DNA από τα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος**



Το δείγμα αίματος κάθε ασθενούς, πάρθηκε πριν την έναρξη της συνεδρίας αιμοκάθαρσης. Από τα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος κάθε ασθενή, απομονώθηκε DNA μέσω του πρωτοκόλλου φαινόλης-χλωροφορμίου.

Διαδικασία:

Και για τις δύο ομάδες (υγιείς και μάρτυρες) συλλέχθηκαν 6 ml αίματος σε ηπαρινισμένο σωληνάριο και από εκεί μεταφέρθηκαν σε άλλο σωληνάριο με 6 ml PBS (Biochrom AG, Berlin, Germany). Αφού έγινε ανάμιξη, 9 ml δείγματος αναρροφήθηκαν και μεταφέρθηκαν σε νέο σωληνάριο που περιείχε 3 ml διαλύματος Φικόλλης (Biocoll Solution, Biochrom AG, Berlin, Germany). Ακολούθησε φυγοκέντρηση του δείγματος για 15΄στις 1900 rpm. Μετά τη φυγοκέντρηση στο μίγμα δημιουργήθηκαν τρεις φάσεις, όπου στη μεσαία περιέχονταν τα μονοπύρηνια κύτταρα του αίματος. Αφού αναρροφήθηκαν, αναμίχθηκαν με PBS σε ολικό όγκο 12 ml. Το σωληνάριο φυγοκεντρήθηκε εκ νέου για 15΄στις 1900 rpm και τα κύτταρα σχημάτισαν ίζημα.

Ακολούθησε προσθήκη 6 ml διαλύματος λύσης των λεμφοκυττάρων (Tris 10mM, NaCl 400 mM, EDTA 2mM, pH 8.2) και 100μl Proteinase K. Το μίγμα επώασθηκε για 1 ώρα στους 37°C. Έπειτα προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης και μετά από ανάδευση υψηλής ταχύτητας, έγινε φυγοκέντρηση του μίγματος στις 3000 rpm για 30min, αφού προηγουμένως ψυχράθηκε στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο και προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφορμίου-φαινόλης. Έγινε ανάδευση υψηλής ταχύτητας και φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 30min. Ακολούθησε μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάριο και προστέθηκε ίσος όγκος χλωροφορμίου. Μετά από ανάδευση υψηλής ταχύτητας, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 3000 rpm για 30min. Έπειτα το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο και προστέθηκε

διπλάσιος όγκος αιθανόλης 100% και το μίγμα αποθηκεύθηκε στους -20°C για 24 ώρες.

Μετά τις 24 ώρες, το μίγμα επαναθερμάνθηκε στους 4°C και φυγοκεντρήθηκε στις 3500 rpm για 30min. Ακολούθησε απόχυση υπερκείμενου και προσθήκη 500μl αιθανόλης 70%. Το ίζημα μεταφέρθηκε σε νέο δοκιμαστικό σωληνάριο και προστέθηκε 1 ml αιθανόλης 70%. Έγινε φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 30min και απόχυση του υπερκείμενου. Έπειτα, προστέθηκε άλλο 1 ml αιθανόλης 70% και το μίγμα αναδεύτηκε χειροκίνητα. Έγινε εκ νέου φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 30min, μετά την οποία ακολούθησε απόχυση του υπερκείμενου και αναποδογύρισμα του σωληναρίου σε διηθητικό χαρτί, προκειμένου να απομακρυνθεί η αιθανόλη. Η υπολειπόμενη ποσότητα αιθανόλης αφαιρέθηκε προσεκτικά με πιπέτα και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει έως την επόμενη ημέρα. Τότε έγινε προσθήκη 250 μl απεσταγμένου νερού και αποθήκευση του DNA στους 4°C μέχρι τη στιγμή της χρήσης του.

Φωτομέτρηση-Έλεγχος ποσότητας:

Για να ελεγχθεί η ποσότητα του DNA πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε κάθε δείγμα. Αραιώσεις κάθε δείγματος (1:100) φωτομετρήθηκαν στα 260 και 280 nm. Υπολογίστηκε ο λόγος 260/280 καθώς και η συγκέντρωση του DNA ως εξής:

συγκέντρωση DNA = αραιώση x OD<sub>260</sub> x 50 (mgr/ml)

Ηλεκτροφόρηση-Έλεγχος ποιότητας:

Για να ελεγχθεί η ποιότητα του DNA πραγματοποιήθηκε σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%.

### 3.2.2 Μέτρηση του μήκους των τελομερών (Telomere Restriction Fragment Length) των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (Αποτύπωση κατά Southern)

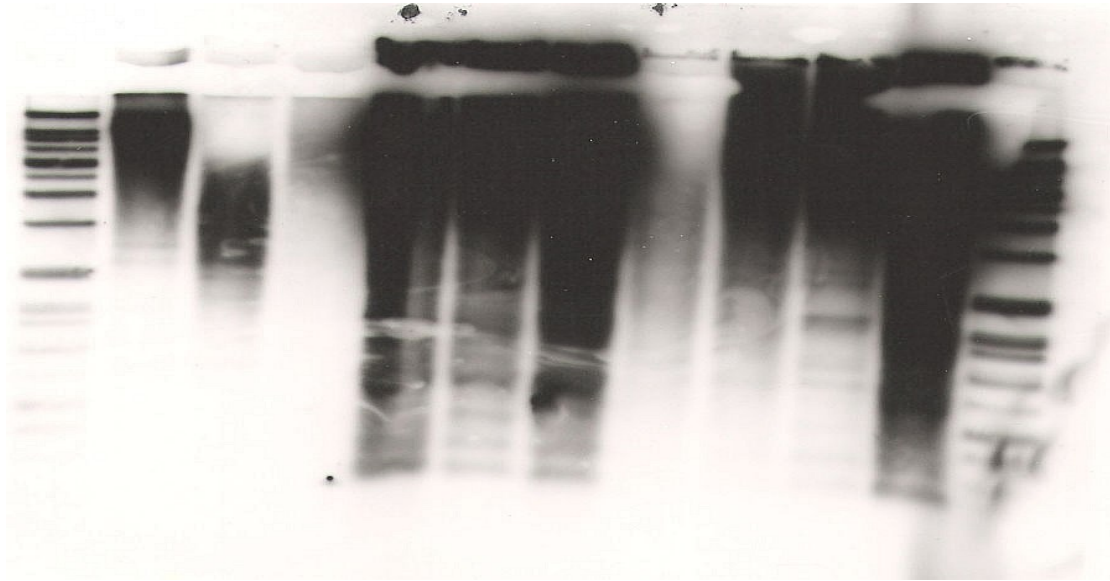
Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την ανίχνευση των τελομερών και τη μέτρηση του μήκους τους. Η πιο διαδεδομένη και χαρακτηρισμένη ως πρότυπο, πραγματοποιείται με ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Southern των τελομερικών αλληλουχιών («τελικά περιοριστικά θραύσματα», Terminal Restriction Fragments - TRF). Με τη μέθοδο αυτή προκαλείται πέψη του γονιδιακού DNA μέσω ενζύμων που προκαλούν την κατάτμησή του. Τα ένζυμα αυτά προκαλούν κατάτμηση με τέτοιο τρόπο, ώστε οι αλληλουχίες των τελομερών παραμένουν ακέραιες, ενώ τα τμήματα του DNA που δεν περιέχουν τελομερή διασπώνται σε θραύσματα χαμηλού μοριακού βάρους. Μετά την πέψη του DNA τα θραύσματα διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης και μετά τη διαδικασία ανοσοαποτύπωσης κατά Southern, οι τελομερικές αλληλουχίες γίνονται ορατές μέσω υβριδισμού, μετά από σήμανση με ολιγονουκλεοτίδια διγοξιγενίνης (DIG). Τέλος η αξιολόγηση του μήκους τους, γίνεται σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου γνωστού μήκους, που παρέχονται από τον κατασκευαστή του kit. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το TeloTAGGG Telomere Length Assay kit (Roche Applied Science, Germany).

Συγκεκριμένα, ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας:

1. 1 μg από κάθε δείγμα DNA αφέθηκε για πέψη από ένα μίγμα ενζύμων Hinf I/Rsa, ταυτόχρονα με δύο δείγματα control (μεγάλου και μικρού μήκους τελομερών, που περιεχόταν στο kit) για 2 ώρες στους 37°C.

2. Προσθήκη 4μl ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (gel electrophoresis loading buffer).
3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,8%, στα 5V/cm για 4 ώρες. (Τερματισμός της ηλεκτροφόρησης όταν η μπλε βαφή της βρωμοφαινόλης απομακρύνθηκε 10 cm από το σημείο της τοποθέτησης του κάθε δείγματος στην πηκτή).
4. Στη συνέχεια, η πηκτή αγαρόζης εμβαπτίσθηκε σε διάλυμα 0,25M HCl για 5', σε διάλυμα 0,5M NaOH/1,5M NaCl και τελικά σε διάλυμα ουδετεροποίησης (0,5M Tris-HCl/3M NaCl, pH 7,5), δύο φορές για 15' στο καθένα στους 25°C.
5. Ακολούθησε η διαδικασία ανοσοαποτύπωσης κατά Southern, μέσω τριχοειδικής μεταφοράς, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 20xSSC. Πιο συγκεκριμένα :
  - α. Το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 20xSSC τοποθετήθηκε σε δοχείο, επάνω από το οποίο τοποθετήθηκε γυάλινη πλάκα. Επάνω στη γυάλινη πλάκα τοποθετήθηκε εμβαπτισμένο στο 20xSSC χαρτί Wattman, με τις δύο άκρες του κομμένες, ώστε να περισσεύουν από τη γυάλινη πλάκα και να μένουν βυθισμένες στο 20xSSC.
  - β. Επάνω στο χαρτί Wattman, τοποθετήθηκαν διαδοχικά η πηκτή αγαρόζης, η μεμβράνη, η οποία ήταν κομμένη στο μέγεθος της πηκτής, δύο επιπλέον χαρτιά Wattman κομμένα στο μέγεθος της πηκτής, περίπου 20 εκατοστά απορροφητικού χαρτιού, μία δεύτερη γυάλινη πλάκα και ένα βαρίδιο του ενός κιλού.
  - γ. Η μεταφορά έγινε για 12 με 18 ώρες περίπου.
6. Μετά τη μεταφορά ακολούθησε σταθεροποίηση του DNA στη μεμβράνη με υπεριώδη ακτινοβολία (120mJ)

7. Η μεμβράνη εμβαπτίσθηκε σε 25 ml προθερμασμένου διαλύματος DIG Easy Hyb και επώασθηκε για 30' στους 42°C, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο προ-υβριδισμός.
8. Η μεμβράνη εμβαπτίσθηκε για 3 ώρες σε διάλυμα υβριδισμού (5ml DIG Easy Hyb, 1μl ανιχνευτής τελομερών (Telomere probe)) στους 42°C, με ήπια ανάδευση.
9. Αφαίρεση του διαλύματος υβριδισμού και διαδοχική έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα 2XSSC/0,1SDS, διάλυμα 0,2SSC/0,1SDS και ένα διάλυμα έκπλυσης που εμπεριέχεται στο kit.
10. Επώαση της μεμβράνης σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος φραγμού (blocking buffer/buffer μαλαϊκού οξέος 1:10) για 30'
11. Επώαση σε 50 ml διαλύματος Anti-DIG-AP με διάλυμα φραγμού σε αναλογία 1:10000 για 30'.
12. Έκπλυση της μεμβράνης εις διπλούν με το διάλυμα έκπλυσης του kit.
13. Επώαση σε διάλυμα ανίχνευσης (detection buffer) για 3'.
14. Ελαφρύ στέγνωμα της μεμβράνης.
15. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε σάκο υβριδισμού με διάλυμα υποστρώματος για 5'.
16. Έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ για 10' και εμφάνιση του φιλμ σε σκοτεινό θάλαμο με τη βοήθεια εμφανιστικών υγρών (εικόνα 5).
17. Αποθήκευση της εικόνας σε ηλεκτρονική μορφή με τη βοήθεια σαρωτή.
18. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού Image Master Elite. Το μήκος των τελομερών (Telomere Restriction Fragment Length-TRF), υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:  $TRF = \frac{\sum(OD_i)}{\sum(OD_i/L_i)}$ , όπου  $OD_i$  είναι το σήμα χημειοφωταύγειας και  $L_i$  το μήκος του τμήματος TRF στη θέση  $i$ .



**Εικόνα 1:** Ανοσοαποτύπωση κατά Southern των τελομερικών αλληλουχιών με τη μέθοδο TeloTAGGG Telomere Length Assay.

### **3.2.3 Μέτρηση της δραστηριότητας της τελομεράσης στα μονοπύρνα κύτταρα του περιφερικού αίματος**

#### ***Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης με τη μέθοδο TRAP***

Το πρωτόκολλο TRAP θεωρείται ευαίσθητη και ειδική PCR που βασίζεται στην ενζυμική δραστηριότητα. Το μεγάλο πλεονέκτημα του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου, είναι η ενίσχυση της αντίδρασης της τελομεράσης, μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, αποφεύγοντας έτσι την ανάγκη για μελέτη μεγάλου αριθμού κυττάρων με σημαντικές τεχνικές δυσκολίες και αμφίβολα αποτελέσματα (Kim et al., 1994). Έτσι το πρωτόκολλο TRAP, δείχνει πολύ μεγάλη ευαισθησία, ανιχνεύοντας ένα θετικό κύτταρο για την τελομεράση ανάμεσα σε 10000 αρνητικά κύτταρα. Στην παρούσα μελέτη, η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το kit TeloTAGGG telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche, Indianapolis, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες

του κατασκευαστή. Αναλυτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν περιγράφονται παρακάτω.

Και για τις δύο ομάδες (υγιείς και μάρτυρες), συλλέχθηκαν 6 ml αίματος σε ηπαρινισμένο σωληνάριο και από εκεί μεταφέρθηκαν σε άλλο σωληνάριο με 6 ml PBS (Biochrom AG, Berlin, Germany). Αφού έγινε ανάμιξη, 9 ml δείγματος αναρροφήθηκαν και μεταφέρθηκαν σε νέο σωληνάριο που περιείχε 3 ml διαλύματος Φικόλλης (Biocoll Solution, Biochrom AG, Berlin, Germany). Ακολούθησε φυγοκέντρηση του δείγματος για 15΄στις 1900 rpm. Μετά τη φυγοκέντρηση στο μίγμα δημιουργήθηκαν τρεις φάσεις, όπου στη μεσαία περιέχονταν τα μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος. Αφού αναρροφήθηκαν, αναμίχθηκαν με PBS σε ολικό όγκο 12 ml. Το σωληνάριο φυγοκεντρήθηκε εκ νέου για 15΄στις 1900 rpm και τα κύτταρα σχημάτισαν ίζημα. Αμέσως μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο στρώμα του μίγματος αφαιρέθηκε, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο και φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 rpm για 5΄. Τέλος αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο στρώμα, τα κύτταρα καταμετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο.

Για κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν  $2 \times 10^5$  κύτταρα σε ένα νέο σωληνάριο και φυγοκεντρήθηκαν για 5΄στις 4000 rpm. Το κάθε ίζημα ομογενοποιήθηκε σε 200μl διαλύματος λύσης κυττάρων. Μετά από επώαση 30 λεπτών στον πάγο, επακολούθησε φυγοκέντρηση στις 16000 rpm για 30 min στους 4°C, τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν σε καινούρια φιαλίδια και η πρωτεϊνική συγκέντρωσή τους προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Lowry. Στο σετ αντιδραστηρίων του πρωτοκόλλου, συμπεριλαμβάνονται δείγματα τα οποία περιέχουν DNA θετικό για την τελομεράση και διαθέτουν την ίδια αλληλουχία με αυτή ενός προϊόντος τελομεράσης με 8 τελομερικές επαναλήψεις. Αρνητικά δείγματα ελέγχου ετοιμάστηκαν από κάθε κυτταρικό εκχύλισμα, απενεργοποιώντας την ενεργότητα της τελομεράσης των δειγμάτων με υψηλή θερμοκρασία (10

λεπτά στους 85 °C). Για κάθε δείγμα που εξετάστηκε, αλλά και για το μάρτυρά του, μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο κατάλληλο για PCR 25 μl Reaction mixture και 5 μl Internal Standard. Σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 1-3 μl κυτταρικού εκχυλίσματος (που περιείχε 0,5-10 μg ολικής πρωτεΐνης) και αποσταγμένο νερό, μέχρι τελικό όγκο 50 μl. Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αντίδρασης (internal standard) πολλαπλασιάστηκε από ανιχνευτές TS, ώστε να αποφευχθούν τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τα θετικά αποτελέσματα για την δραστηριότητα της τελομεράσης, επιβεβαιώθηκαν με TRAP, μετά από έκθεση των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε υψηλή θερμοκρασία (85°C για 15 λεπτά), για να βρεθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα (αρνητικοί μάρτυρες). Τα δείγματα και οι αρνητικοί μάρτυρες μεταφέρθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η συνδυασμένη αντίδραση επιμήκυνσης των εκκινητών και πολλαπλασιασμού.

Οι συνθήκες της επιμήκυνσης των εκκινητών και της αντίδρασης πολλαπλασιασμού ήταν οι ακόλουθες :

- α. 25 °C για 20 λεπτά την επιμήκυνση για των εκκινητών.
- β. 95 °C για 10 λεπτά για την απενεργοποίηση της τελομεράσης.
- γ. 30 κύκλοι :
  - 94 °C για 30 δευτερόλεπτα, στάδιο αποδιάταξης
  - 50 °C για 30 δευτερόλεπτα, στάδιο υβριδισμού και
  - 72 °C για 90 δευτερόλεπτα, στάδιο πολυμερισμού.
- δ. 72 °C για 10 λεπτά και
- ε. Φύλαξη στους 4 °C.

Για την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης, 2,5 μl από το κάθε προϊόν επώασθησαν για 10' σε θερμοκρασία δωματίου με 10 μl αντιδραστήριου αποδιάταξης σε δύο ξεχωριστά φιαλίδια. Στο ένα φιαλίδιο προστέθηκαν 100 μl διαλύματος υβριδισμού T και στο άλλο 100 μl διαλύματος υβριδισμού για το IS και το καθένα αναμείχθηκε με ήπια



ανάδευση. 100 μl από το κάθε μείγμα μεταφέρθηκαν σε πηγαδάκια επικαλυμμένα με ειδικό αντίσωμα, πλάκας που περιεχόταν στο kit και καλύφθηκαν με προστατευτικό φύλλο. Ακολούθησε επώαση στους 37°C με ανάδευση (300rpm) για 2 h. Τα διαλύματα υβριδισμού απομακρύνθηκαν και ακολούθησαν τρεις πλύσεις με 250 μl διαλύματος πλύσης. Έπειτα προστέθηκαν 100 μl διαλύματος Anti-DIG-HRP σε κάθε πηγαδάκι και η πλάκα, αφού καλύφθηκε με προστατευτικό φύλλο επώασθη σε θερμοκρασία δωματίου για 30' με ανάδευση (300rpm). Μετά την επώαση, το διάλυμα απομακρύνθηκε εντελώς και ακολούθησε καθαρισμός με 250 μl διαλύματος πλύσης πέντε φορές.

Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 100 μl διαλύματος υποστρώματος TMB (TMB substrate solution) και ακολούθησε επώαση για 20' σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση στις 300 rpm, προκειμένου να γίνει ανάπτυξη χρώματος. Η αντίδραση τερματίστηκε προσθέτοντας 100 μl αντιδραστήριου παύσης σε κάθε δείγμα. Η απορρόφηση των δειγμάτων στα 450 nm, με μήκος κύματος αναφοράς τα 650 nm, μετρήθηκε χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο (Wallac) και θεωρήθηκε θετική όταν η διαφορά μεταξύ της απορρόφησης του δείγματος και της απορρόφησης του αρνητικού δείγματος ελέγχου, ήταν 2 φορές μεγαλύτερη από τη μη ειδική ενεργότητα (background). Για περαιτέρω έλεγχο, τα δείγματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, παράγοντας τη χαρακτηριστική τελομερική κλίμακα-δείκτη (ladder) 6 bp.

### 3.2.4 Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές των συνεχόμενων μεταβλητών εκφράστηκαν ως μέση τιμή και σταθερά απόκλιση ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ), ειδάλλως επισημαίνεται. Η κανονικότητα των συνεχόμενων μεταβλητών εξετάσθηκε με το test των Kolmogorov-Smirnov. Η σύγκριση κατά ζεύγη των συνεχόμενων μεταβλητών έγινε είτε με έλεγχο της προσημασμένης διάταξης του Wilcoxon (signed rank test) για τις τιμές κατά ζεύγη είτε με το U test των Mann-Whitney ή το κατάλληλο t-test όπου κρίθηκε απαραίτητο, για τις ανεξάρτητες τιμές. Η αλληλεξάρτηση των διαφορετικών μεταβλητών ελέγχθηκε με την ανάλυση συσχέτισης κατά Pearson ή κατά Spearman ανάλογα της περίπτωσης. Οι συχνότητες των κατηγορικών μεταβλητών παρουσιάσθηκαν ως ποσοστά (ή λόγοι, αναλόγως της περίπτωσης), με διαστήματα εμπιστοσύνης 95%. Οι συχνότητες των κατηγορικών μεταβλητών συγκρίθηκαν με τον ακριβή έλεγχο του Fisher. Προς εκτίμηση του πιθανού σφάλματος, υπολογίσθηκε το κλάσμα λόγου πιθανοτήτων με το αντίστοιχο διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Το μονομεταβλητό γενικό γραμμικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκε επίσης, για τη σύγκριση κατά ζεύγη των συνεχόμενων μεταβλητών και για τις υποθετικές αλληλοσυσχετίσεις των μεταβλητών. Οι ομάδες των ασθενών (δηλ. αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς και υγιείς μάρτυρες), εισήχθησαν ως σταθεροί παράγοντες του μοντέλου, ενώ οι συγχυτικοί παράγοντες (δηλ. ηλικία και φύλο), εισήχθησαν ως συμμεταβλητές, αναλόγως της περίπτωσης.

Οι καμπύλες επιβίωσης έγιναν με τη μέθοδο Kaplan Meier και αναλύθηκαν με το test των Mantel-Cox. Ο χρόνος επιβίωσης ορίσθηκε ως το χρονικό διάστημα από την έναρξη της μελέτης έως την ημερομηνία θανάτου για δεδομένο ασθενή ή το πέρας της τριετίας.

Η δραστικότητα της τελομεράσης χρησιμοποιήθηκε ως διακριτή μεταβλητή, χωρίζοντας τους ασθενείς σε δύο ομάδες – ασθενείς με δραστικότητα και ασθενείς χωρίς δραστικότητα τελομεράσης. Το μήκος των τελομερών χρησιμοποιήθηκε ως διακριτή μεταβλητή, χωρίζοντας τους ασθενείς σε δύο ομάδες- ασθενείς με μεγάλο και ασθενείς με μικρό μήκος τελομερών. Ως διχοτόμος χρησιμοποιήθηκε η διάμεση τιμή του μήκους των τελομερών. Η πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης έγινε με το μοντέλο του Cox. Τέλος, οι τιμές του  $P < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συγκεντρωτικά τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών που μελετήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.

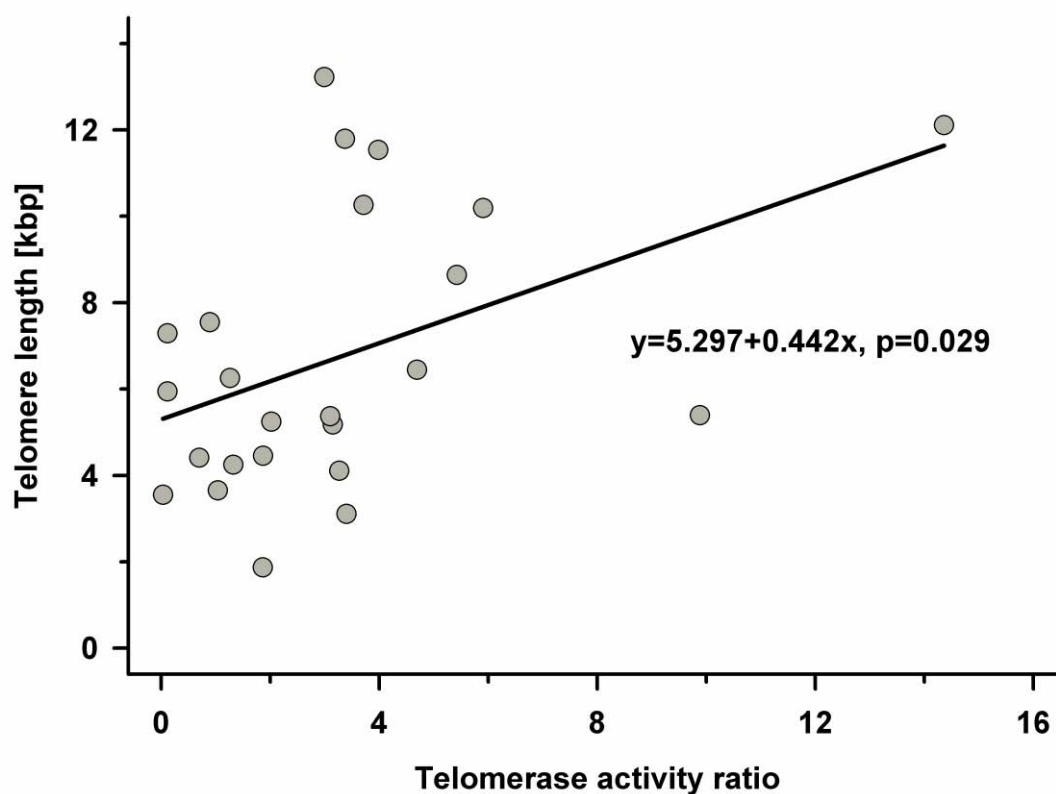
Χαρακτηριστικά ασθενών	Μέση τιμή	Σταθερά Απόκλιση
Ηλικία (έτη)	65	12,7
Διάρκεια θεραπείας με Α/Κ (μήνες)	17,9	15,6
Χρόνος από τη διάγνωση της Α.Υ. (έτη)	10,5	7,9
Κρεατινίνη ορού (mg/dl)	9,9	3
Ουρία ορού (mg/dl)	159	35
Αιματοκρίτης (%)	35,1	5,3
C- αντιδρώσα πρωτεΐνη (mg/dl)	1,2	2,4
Παραθορμόνη (pg/ml)	260	131
Λόγος ποσοστιαίας μείωσης ουρίας (%)	0,66	0,06

Πίνακας 2: Κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου υπό αιμοκάθαρση (n=43).

Στους ασθενείς αυτούς, μετρήθηκε το μήκος των τελομερών και η μέση τιμή που προέκυψε ήταν  $6,95 \pm 3,25$  kbp. Επίσης μετρήθηκε η δραστικότητα της τελομεράσης και βρέθηκε  $1,82 \pm 2,90$ . Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση ( $p=0,709$ ) ανάμεσα στο μήκος των τελομερών των ανδρών (n=26,  $6,76 \pm 3,06$  kbp) και αυτό των γυναικών (n=17,  $7,24 \pm 3,60$  kbp) στην ομάδα των ασθενών μας. Αντίθετα οι γυναίκες ασθενείς (n=17), είχαν μικρότερη δραστικότητα της

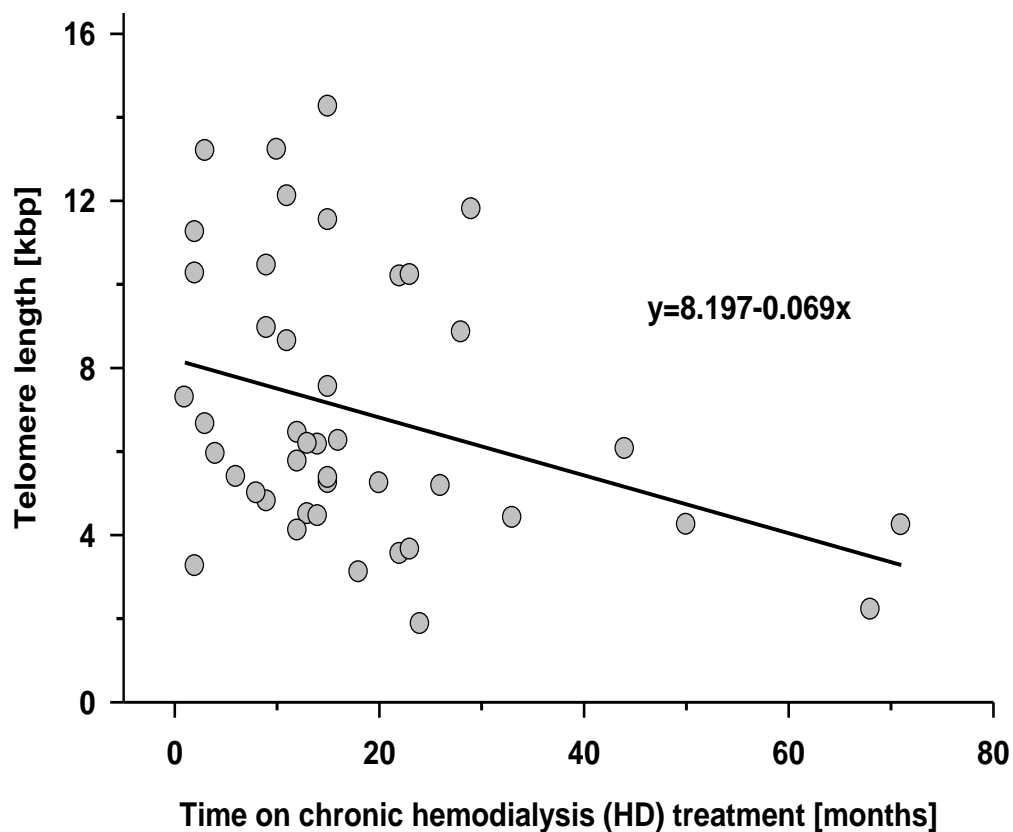
τελομεράσης ( $0,78 \pm 1,26$ ) σε σχέση με τους άνδρες ( $n=26$ ,  $2,50 \pm 3,46$ ). Όμως μετά από προσαρμογή για την ηλικία, η σχέση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p=0,083$ ).

Στην ανάλυση συσχέτισης του μήκους των τελομερών και της δραστηριότητας της τελομεράσης, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση ( $p=0,651$ ). Όταν όμως απομονώθηκαν οι ασθενείς στους οποίους διαπιστώθηκε ενεργής δραστηριότητα της τελομεράσης (24 ασθενείς, 55,8%), αυτή ήταν ανάλογη με το μήκος των τελομερών τους και η σχέση αυτή αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική ( $p=0,03$   $r=0,443$ ) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Το μήκος των τελομερών των ασθενών στους οποίους η τελομεράση ήταν ενεργής, ήταν ανάλογο με τη δραστηριότητά της.

Η σχέση του μήκους των τελομερών με την ηλικία των ασθενών, δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίθετα στατιστικά σημαντική σχέση, βρέθηκε να υπάρχει με το μήκος των τελομερών και το διάστημα κατά το οποίο οι ασθενείς βρισκόταν σε θεραπεία υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας με αιμοκάθαρση. Η σχέση των δύο αυτών παραμέτρων ήταν αντιστρόφως ανάλογη, υποδεικνύοντας πως το μήκος των τελομερών μειωνόταν σημαντικά όσο η διάρκεια της θεραπείας με αιμοκάθαρση παρατεινόταν (Εικόνα 6).



Εικόνα 3: Όσο η διάρκεια της αιμοκάθαρσης σε μήνες αυξανόταν τόσο το μήκος των τελομερών μειωνόταν με τρόπο αντιστρόφως ανάλογο.

Το χρονικό διάστημα για το οποίο υπήρχε κλινικά τεκμηριωμένη αρτηριακή υπέρταση, δε φάνηκε να επιδρά σημαντικά στο μήκος των τελομερών. Οι τιμές της ουρίας και της κρεατινίνης ορού όπως και η επάρκεια της κάθαρσης, όπως αυτή μετρήθηκε με το δείκτη URR δεν επηρέαζαν με τρόπο στατιστικά σημαντικό το μήκος των τελομερών των ασθενών. Επίσης ο αιματοκρίτης, η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και η παραθορμόνη που μετρήθηκαν, δεν είχαν στατιστικά σημαντική σχέση με το μήκος των τελομερών (Πίνακας 3).

Χαρακτηριστικά ασθενών (n=43)	Στατιστική συσχέτιση με το μήκος των τελομερών	
	r	p
Ηλικία	0,117	0,454
Διάρκεια υποστήριξης με A/K	-0,343	<b>0,024</b>
Χρόνος από τη διάγνωση της Α.Υ.	-0,047	0,779
Κρεατινίνη ορού	-0,075	0,639
Ουρία ορού	0,118	0,463
Αιματοκρίτης	-0,61	0,703
C- αντιδρώσα πρωτεΐνη	-0,101	0,559
Παραθορμόνη	-0,102	0,544
Λόγος ποσοστιαίας μείωσης ουρίας	-0,090	0,649

Πίνακας 3: Στατιστική συσχέτιση του μήκους των τελομερών με τα χαρακτηριστικά των ασθενών

Η δραστηριότητα της τελομεράσης δε φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά από την ηλικία. Η διάρκεια κατά την οποία οι ασθενείς βρισκόταν σε χρόνια πρόγραμμα αιμοκάθαρσης, ενώ επιτείνει το ρυθμό μείωσης του μήκους των τελομερών όσο αυτή παρατείνεται, δεν έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στην δραστηριότητα της τελομεράσης.

Συγκρίνοντας τη σχέση του χρόνου από τη διάγνωση της αρτηριακής υπέρτασης και της δραστικότητας της τελομεράσης, δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Επίσης η τιμή της κρεατινίνης και της ουρίας ορού, του αιματοκρίτη, της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, της παραθορμόνης και της επάρκειας της κάθαρσης όπως αυτή ορίστηκε με το δείκτη URR, φάνηκε πως δεν επηρεάζουν την ύπαρξη ή όχι δραστικότητας της τελομεράσης στους ασθενείς μας (Πίνακας 4).

Τέλος μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση, διαπιστώθηκε όταν συγκρίθηκε η επάρκεια κάθαρσης, μετρούμενη με το δείκτη URR, με τη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη ( $p=0,049$ ,  $r=-0,368$ ).

Χαρακτηριστικά ασθενών (n=43)	Στατιστική συσχέτιση με την δραστικότητα της τελομεράσης	
	r	p
Ηλικία	-0,247	0,110
Διάρκεια υποστήριξης με A/K	-0,060	0,703
Χρόνος από τη διάγνωση της A.Y.	-0,111	0,505
Κρεατινίνη ορού	-0,004	0,982
Ουρία ορού	0,113	0,482
Αιματοκρίτης	-0,140	0,384
C- αντιδρώσα πρωτεΐνη	0,231	0,175
Παραθορμόνη	0,233	0,159
Λόγος ποσοστιαίας μείωσης ουρίας	0,055	0,782

Πίνακας 4: Στατιστική συσχέτιση της δραστικότητας της τελομεράσης με τα χαρακτηριστικά των ασθενών

Οι ασθενείς επίσης κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την παρουσία ή όχι σοβαρών συνοδών παθήσεων, όπως σακχαρώδη διαβήτη, στεφανιαίας νόσου ή αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου. Μετά από προσαρμογή προς την ηλικία, οι διαφορές ανάμεσα σε αυτούς που



έπασχαν από τη συγκεκριμένη πάθηση με αυτούς που δεν έπασχαν, τόσο του μήκους των τελομερών όσο και της δραστικότητας της τελομεράσης, δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Πίνακες 5 και 6).

Πάθηση		N	TRF	p
Σακχαρώδης Διαβήτης	-	29	6,67 ± 3,10	0,517
	+	14	7,53 ± 3,59	
Στεφανιαία νόσος	-	21	6,63 ± 3,04	0,248
	+	9	5,58 ± 2,71	
Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο	-	22	6,62 ± 3,16	0,878
	+	7	6,68 ± 2,98	

Πίνακας 5: Σύγκριση του μήκους των τελομερών σε ασθενείς που έπασχαν (ομάδα 1) από σακχαρώδη διαβήτη, στεφανιαία νόσο ή με ιστορικό αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, με αυτό των ασθενών χωρίς τη δεδομένη πάθηση (ομάδα 0). Το μήκος των τελομερών για κάθε ομάδα εκφράζεται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση kbp.

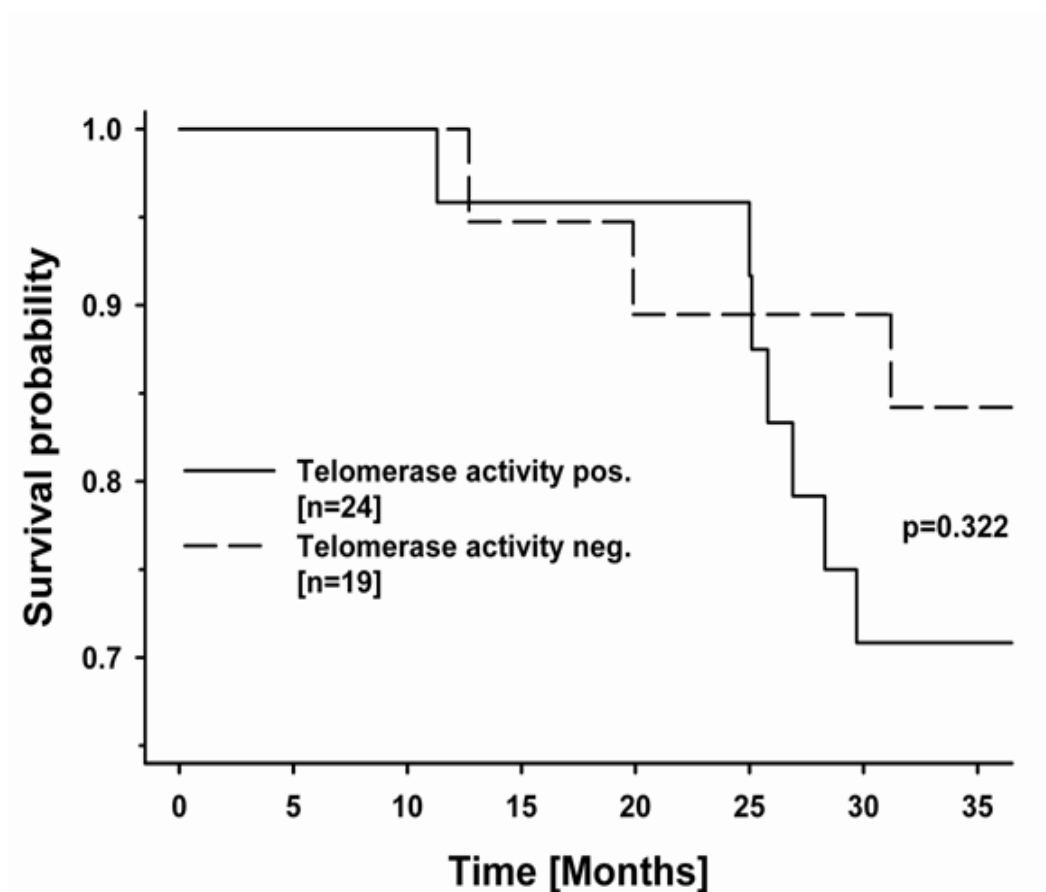
Πάθηση		N	RTA	p
Σακχαρώδης Διαβήτης	-	29	2,28 ± 3,30	0,167
	+	14	0,86 ± 1,55	
Στεφανιαία νόσος	-	21	2,37 ± 3,72	0,833
	+	9	1,39 ± 1,98	

Αγγειακό Εγκεφαλικό	-	22	2,44 ± 3,71	0,109
Επεισόδιο	+	7	0,58 ± 1,26	

Πίνακας 6: Σύγκριση της δραστηριότητας της τελομεράσης σε ασθενείς που έπασχαν (ομάδα 1) από σακχαρώδη διαβήτη, στεφανιαία νόσο ή με ιστορικό αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, με αυτή των ασθενών χωρίς τη δεδομένη πάθηση (ομάδα 0). Η δραστηριότητα της τελομεράσης για κάθε ομάδα εκφράζεται ως μέση τιμή ± σταθερά απόκλιση %.

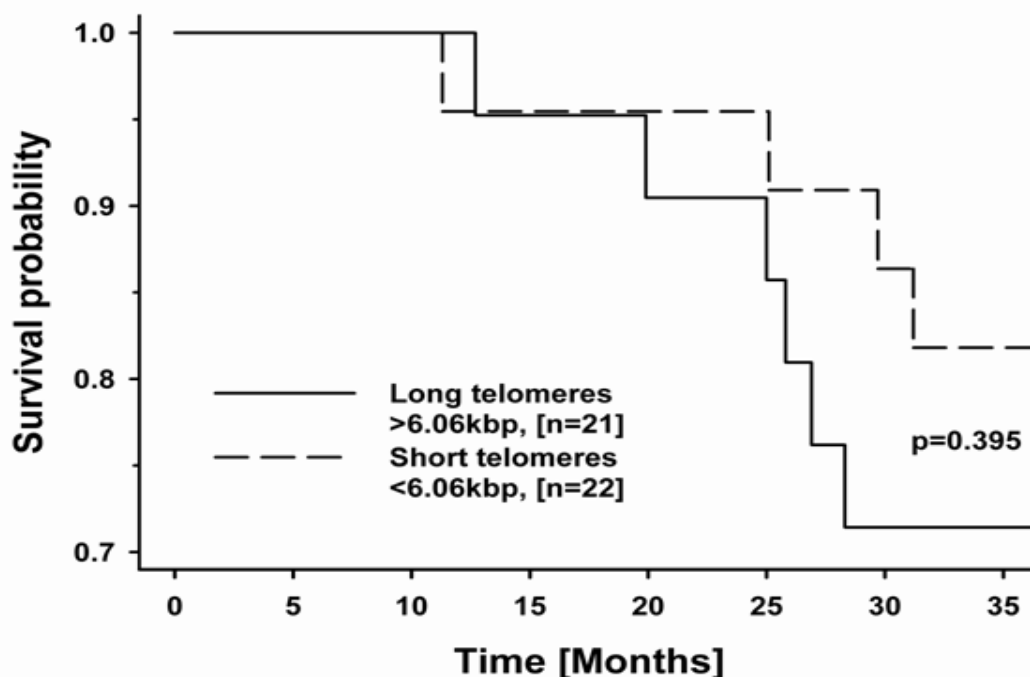
Το μήκος των τελομερών των καπνιστών ασθενών μας (n=13, 6,42±2,66), δε διέφερε σημαντικά (p=0,629) από αυτό των ασθενών που δήλωσαν μη καπνιστές (n=30, 7,18±3,49). Αλλά και η δραστηριότητα της τελομεράσης, δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες (1,54±1,93 στην ομάδα των καπνιστών έναντι 1,94±3,26 στην ομάδα των μη καπνιστών, p=0,825).

Οι ασθενείς με ενεργότητα της τελομεράσης (n=24), δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.322) ως προς την τριετή επιβίωση, σε σχέση με τους ασθενείς που δεν είχαν ενεργότητα της τελομεράσης (n=19).



Εικόνα 4: Οι ασθενείς με ενεργότητα της τελομεράσης (n=24) δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.322) ως προς την επιβίωση, σε σχέση με τους ασθενείς που δεν είχαν ενεργότητα της τελομεράσης (n=19).

Επίσης σημαντική στατιστική διαφορά δεν αναδείχθηκε (p=0.395) όταν συγκρίθηκαν ως προς την τριετή επιβίωση, οι ασθενείς με μεγαλύτερο μήκος τελομερών (>6.06kbp, n=21), με τους ασθενείς που είχαν μικρότερο μήκος τελομερών (<6.06kbp, n=22).



Εικόνα 5: Οι ασθενείς με μεγαλύτερο μήκος τελομερών (>6.06kbp, n=21), δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0.395$ ), ως προς την επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με μικρότερο μήκος τελομερών (<6.06kbp, n=22).

Τέλος σε μια ομάδα υγιών μαρτύρων (n=39), μετρήθηκε το μήκος των τελομερών ( $5,68 \pm 2,49$  kbp) και συγκρίθηκε με αυτό των ασθενών μας ( $6,95 \pm 3,25$  kbp). Μετά από προσαρμογή για την ηλικία, δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική ( $p=0,229$ ) διαφορά μεταξύ τους.

Σε ομάδα υγιών μαρτύρων (n=23), μετρήθηκε επίσης η δραστηριότητα της τελομεράσης ( $2,70 \pm 3,00$ ). Όταν συγκρίθηκε με αυτή των ασθενών ( $1,82 \pm 2,90$ ) και μετά από προσαρμογή για την ηλικία, δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσά τους ( $p=0,085$ )

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι:

- 1) Το μήκος των τελομερών μειωνόταν όσο η διάρκεια της θεραπείας με αιμοκάθαρση παρατεινόταν.
- 2) Το μήκος των τελομερών των ασθενών στους οποίους η τελομεράση ήταν ενεργής, ήταν ανάλογο με τη δραστικότητά της.
- 3) Το μήκος των τελομερών και η δραστικότητα της τελομεράσης των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών, δε διέφεραν σημαντικά με αυτά των υγιών μαρτύρων.

## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

### **5.1 Διάρκεια της υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας με αιμοκάθαρση και οξειδωτικό stress**

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, υποδεικνύουν ότι η διάρκεια της υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας με αιμοκάθαρση σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, σχετίζεται με το μήκος των τελομερών. Όπως προκύπτει από τα ευρήματά μας, οι ασθενείς που βρίσκονταν για μακρύτερο χρονικό διάστημα υπό αιμοκάθαρση είχαν μικρότερα μήκη τελομερών. Η σχέση αυτή αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική και τα δύο μεγέθη συνδέονταν με τρόπο αντιστρόφως ανάλογο.

Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει τα ευρήματα των Boxall et al. (2005) όπου μελετήθηκε το μήκος των τελομερών σε 38 ασθενείς σε χρόνια πρόγραμμα αιμοκάθαρσης και συγκρίθηκε με αυτό 20 υγιών μαρτύρων. Στην εν λόγω μελέτη διαπιστώθηκε πως η μείωση του μήκους των τελομερών των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών, ήταν ανάλογη με το χρόνο που οι ασθενείς βρίσκονταν υπό αιμοκάθαρση.

Πιθανή εξήγηση για αυτό, ίσως είναι η μεγαλύτερη αθροιστική επίπτωση του αυξημένου οξειδωτικού stress, που έχει βρεθεί ότι επισπεύδει την καταστροφή των τελομερών και τη γήρανση στα φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Kurz et al. 2004). Σε παλαιότερες μελέτες, έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία αυξημένου οξειδωτικού stress στους ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και ειδικότερα σε ασθενείς υπό αιμοκάθαρση (Loughrey et al. 1994 και Galle 2001). Το φαινόμενο αυτό εξηγείται από την αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Galli et al. 1999). Η αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, έχει φανεί πως

οφείλεται στην επίδραση των διαλυμάτων και των μεμβρανών αιμοκάθαρσης (Srinivasa et al. 2001) αλλά και στην ουραιμία (Roselaar et al. 1995).

Παρόλο που η διάρκεια της υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας με αιμοκάθαρση, διαπιστώθηκε να συνδέεται με τρόπο αντιστρόφως ανάλογο με το μήκος των τελομερών, δε φάνηκε να επηρεάζει τη δραστικότητα της τελομεράσης. Τα ευρήματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα πως σε αυτό τον πληθυσμό ασθενών, η δραστικότητα της τελομεράσης, αδυνατεί να αποκαταστήσει το μήκος των τελομερών, υπό την επίδραση του αυξημένου οξειδωτικού stress της αιμοκάθαρσης. Σε μια μελέτη του 2006 (Tsirpanlis et al.), φάνηκε πως στους ασθενείς που είχαν δραστικότητα της τελομεράσης, αυτή ήταν μικρότερη στους αιμοκαθαιρόμενους επί μακρό χρονικό διάστημα. Όμως η τελομεράση δεν είναι ο μοναδικός μηχανισμός διατήρησης του μήκους των τελομερών. Έχει αποδειχθεί πως υπάρχουν αθάνατες κυτταρικές σειρές, χωρίς δραστικότητα τελομεράσης και με διάφορα μήκη τελομερών (Reddel et al. 2001).

## **5.2 Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου**

Μετρήθηκε επίσης το μήκος των τελομερών σε μια ομάδα 39 υγιών μαρτύρων. Η ομάδα των υγιών μαρτύρων μας, δεν ήταν ταυτόσημων ηλικιών με την ομάδα των ασθενών μας. Αυτό έγινε σκόπιμα, καθώς ο σκοπός μας ήταν οι υγιείς μάρτυρες να είναι καθ'όλα υγιείς, έτσι ώστε το μήκος των τελομερών και η δραστικότητα της τελομεράσης να μην επηρεάζεται από άλλες παθολογικές καταστάσεις. Συνεπώς, ήταν δύσκολο να βρεθούν στην ηλικία των ασθενών ( $65 \pm 12,7$  έτη), καθ'όλα υγιείς μάρτυρες. Προκειμένου το στατιστικό αποτέλεσμα της μελέτης να



είναι αξιόπιστο, έγινε προσαρμογή ως προς την ηλικία κατά τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Όταν συγκρίθηκε το μήκος των τελομερών των ασθενών υπό αιμοκάθαρση με αυτό της ομάδας των υγιών μαρτύρων, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει τα ευρήματα των Boxall et al. (2005), όπου δεν βρέθηκε διαφορά στο μήκος των τελομερών, ανάμεσα στους υγιείς και τους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς. Αντίθετα σε άλλη μελέτη (Ramirez et al. 2005), όπου εξετάστηκε το μήκος των τελομερών 15 αιμοκαθαιρόμενων ασθενών, διαπιστώθηκε να είναι μειωμένο (40%), σε σύγκριση με αυτό ισάριθμων υγιών μαρτύρων (μειωμένο σε 5%). Στη μελέτη αυτή, για τη μέτρηση του μήκους των τελομερών, έγινε *in situ* υβριδισμός και κυτταρομετρία ροής.

Στη μελέτη των Tsiiranlis et al. (2006), διαπιστώθηκε δραστικότητα τελομεράσης να υπάρχει σε μικρότερο ποσοστό στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, σε σχέση με τους υγιείς. Πράγματι και στην παρούσα μελέτη, οι ασθενείς μας βρέθηκε να έχουν μικρότερη ( $1,82 \pm 2,90\%$ ) δραστικότητα τελομεράσης, σε σχέση με τους υγιείς μας μάρτυρες ( $2,70 \pm 3,00\%$ ). Όμως μετά από προσαρμογή για την ηλικία, η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

### 5.3 Επίδραση της ηλικίας

Στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, φάνηκε το μήκος των τελομερών να μην επηρεάζεται από την ηλικία. Πιθανή εξήγηση ίσως να αποτελεί, η συμμετοχή άλλων παραγόντων στη διατήρηση του μήκους των τελομερών στους ασθενείς αυτούς, που απορρέουν από την πολύπλοκη παθοφυσιολογία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας αλλά και παράγοντες που αφορούν τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης. Σε μια μελέτη των Carrero et al. (2008), το μήκος των τελομερών είχε αρνητική

συσχέτιση με την ηλικία στις γυναίκες ασθενείς, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στους άνδρες ασθενείς.

Η δραστικότητα της τελομεράσης δε φάνηκε να επηρεάζεται από την ηλικία στην ομάδα των ασθενών μας. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνει το εύρημα της μελέτης των Tsirpanlis et al. (2006) στην οποία μελετήθηκε η δραστικότητα της τελομεράσης και φάνηκε να μην συσχετίζεται με την ηλικία των ασθενών.

#### **5.4 Επίδραση του φύλου**

Όταν συγκρίθηκε το μήκος των τελομερών των ανδρών και αυτό των γυναικών στην ομάδα των ασθενών μας, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Αντίθετα σε άλλη μελέτη (Carrero et al. 2008), διαπιστώθηκε αυξημένο μήκος τελομερών στις γυναίκες ασθενείς υπό αιμοκάθαρση, σε σχέση με τους άνδρες. Επιπλέον στην παρούσα μελέτη, δε βρέθηκε διαφορά στη δραστικότητα της τελομεράσης ανάμεσα στα δύο φύλα, μετά από προσαρμογή για την ηλικία στην ομάδα των ασθενών μας.

#### **5.5 Επίδραση του καπνίσματος**

Το κάπνισμα δε φάνηκε να επηρεάζει το μήκος των τελομερών στην ομάδα των ασθενών μας. Ομοίως στη μελέτη των Carrero et al. (2008) αλλά και των Getliffe et al. (2005), δε φάνηκε συσχέτιση ανάμεσα στο κάπνισμα και το μήκος των τελομερών. Η τελευταία μελέτη βέβαια δεν είχε διεξαχθεί σε νεφροπαθείς, αλλά σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα, νόσο Crohn και μη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου. Στην εν λόγω μελέτη μάλιστα, παρότι διαπιστώθηκαν χαμηλότερα επίπεδα του hTERT στους καπνιστές, δε φάνηκε το κάπνισμα να επηρεάζει τη δραστικότητα της

τελομεράσης. Στη μελέτη των Tsirpanlis et al. (2006), που είχε διεξαχθεί σε νεφροπαθείς υπό αιμοκάθαρση, παρατηρήθηκε πως στην ομάδα των μαρτύρων χωρίς χρόνια νεφρική νόσο, υπήρχε σε μεγαλύτερο ποσοστό δραστικότητα της τελομεράσης, ανάμεσα στους μη καπνιστές από ότι στους καπνιστές. Στην παρούσα μελέτη δε φάνηκε η δραστικότητα της τελομεράσης να επηρεάζεται από το κάπνισμα στην ομάδα των ασθενών μας.

### **5.6 Παράγοντες σχετιζόμενοι με τη νεφρική νόσο**

Στους ασθενείς μας μελετήθηκαν και άλλοι παράγοντες που εμπλέκονται στην παθολογία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου. Τέτοιοι παράγοντες ήταν οι τιμές της ουρίας και της κρεατινίνης ορού και ο λόγος ποσοστιαίας μείωσης της ουρίας (URR) των ασθενών κατά τη συνεδρία αιμοκάθαρσης. Λήφθηκε υπόψη η ύπαρξη ή όχι αρτηριακής υπέρτασης και ο χρόνος από τη διάγνωσή της, ως ένδειξη αγγειακής βλάβης. Μελετήθηκε η βαρύτητα της νεφρογενούς αναιμίας με δείκτη τον αιματοκρίτη των ασθενών, που είναι δείκτης υποξίας των κυττάρων και η παραθορμόνη, προκειμένου να εκτιμηθεί η βαρύτητα του δευτεροπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού. Τέλος ως δείκτης χρόνιας φλεγμονής, έγινε ποσοτική μέτρηση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης.

Η κρεατινίνη αποτελεί τελικό παράγωγο του καταβολισμού των μυών και η ουρία του καταβολισμού των πρωτεϊνών από το ήπαρ. Οι δύο αυτές παράμετροι, είναι δείκτες συσσώρευσης του συνόλου των ουραιμικών τοξινών. Όμως εξαρτώνται από το φύλο, τη φυλή, την ηλικία, την μυϊκή μάζα σώματος και την πρωτεϊνική πρόσληψη μέσω της τροφής. Ο λόγος ποσοστιαίας μείωσης της ουρίας (URR) των ασθενών κατά τη συνεδρία αιμοκάθαρσης, αντικατοπτρίζει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Οι περισσότερες μελέτες σε

αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, όσον αφορά την κυτταρική γήρανση, δε σύγκριναν τις τιμές των παραπάνω παραμέτρων με το μήκος των τελομερών. Στην παρούσα μελέτη οι τιμές της ουρίας, της κρεατινίνης ορού και ο δείκτης URR, δεν είχαν στατιστικά σημαντική επίδραση στο μήκος των τελομερών.

Επίσης και η δραστικότητα της τελομεράσης, δεν είχε σημαντική σχέση με τις προαναφερθείσες μεταβλητές. Σε άλλες μελέτες που αφορούσαν νεφροπαθείς υπό αιμοκάθαρση δεν ερευνήθηκε η σχέση των παραμέτρων αυτών, με τη δραστικότητα της τελομεράσης. Συνεπώς από την παρούσα μελέτη, προκύπτει πως η βαρύτητα της ουραιμίας, η κατάσταση θρέψης και η διατήρηση της μυϊκής μάζας, καθώς και η επάρκεια της αποδιδόμενης κάθαρσης, όπως εκφράζονται με τους παραπάνω δείκτες, δεν ασκούν σημαντική επίδραση στο μήκος των τελομερών αλλά ούτε και στη δραστικότητα της τελομεράσης.

Είναι γνωστό πως η ιδιοπαθής υπέρταση, είναι η πιο συχνή διαταραχή του γήρατος και μια κύρια αιτία καρδιοαγγειακής νόσου. Οι ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα καρδιοαγγειακής νόσου, που είναι και η κύρια αιτία θανάτου σε αυτόν τον πληθυσμό. Η επίπτωση της ιδιοπαθούς αρτηριακής υπέρτασης αυξάνεται με την ηλικία και το μήκος των τελομερών μειώνεται φυσιολογικά με το γήρας. Έτσι θα περίμενε κανείς ότι ηλικιωμένοι υπερτασικοί ασθενείς θα είχαν μειωμένο μήκος τελομερών, χωρίς να μπορεί να ειπωθεί με βεβαιότητα, αν αυτό οφείλεται στο γήρας αυτό καθ' αυτό ή και σε επίδραση της αρτηριακής υπέρτασης. Πράγματι στη Framingham Heart Study, διαπιστώθηκε ότι η αρτηριακή υπέρταση σχετιζόταν με μικρότερα μήκη τελομερών. Η συγκεκριμένη όμως μελέτη δεν είχε διεξαχθεί σε νεφροπαθείς. Αντίθετα στην παρούσα μελέτη, η χρονική διάρκεια της διαγνωσμένης αρτηριακής υπέρτασης, δε φάνηκε

να επιδρά με στατιστικά σημαντικό τρόπο στο μήκος των τελομερών των ασθενών υπό αιμοκάθαρση.

Ανατρέχοντας στη βιβλιογραφία, δε βρέθηκαν μελέτες που να ερευνούν τη δραστικότητα της τελομεράσης σε σχέση με την υπέρταση σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς. Σε μια μελέτη (Perez-Rivero et al. 2006) που έγινε σε ποντίκια που δεν είχαν ενεργότητα της τελομεράσης, διαπιστώθηκαν υψηλότερα επίπεδα αρτηριακής πίεσης, οφειλόμενα σε αυξημένα επίπεδα ενδοθηλίνης-1. Επίσης σε μελέτη (EpeI et al. 2006) όπου έλαβαν μέρος 62 υγιείς γυναίκες, φάνηκε να συσχετίζεται η χαμηλή δραστικότητα της τελομεράσης με υψηλή συστολική πίεση αλλά και άλλους κλασσικούς παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου. Στην παρούσα μελέτη, η παρουσία αρτηριακής υπέρτασης στο ιστορικό των ασθενών μας, καθώς και ο χρόνος από τη διάγνωσή της δε φάνηκε να επηρεάζει τη δραστικότητα της τελομεράσης.

Η βαρύτητα της νεφρογενούς αναιμίας με δείκτη τον αιματοκρίτη των ασθενών, δε φάνηκε να επηρεάζει με στατιστικά σημαντικό τρόπο, το μήκος των τελομερών αλλά ούτε και τη δραστικότητα της τελομεράσης. Επίσης τα επίπεδα της παραθορμόνης που αντικατοπτρίζουν το δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό, που χαρακτηρίζει τους ασθενείς αυτούς, δεν αποδείχθηκε να παίζουν ρόλο στην ταχύτητα της μείωσης του μήκους των τελομερών του και στη δραστικότητα της τελομεράσης. Ανατρέχοντας στη βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν δημοσιευμένες μελέτες όσον αφορά τις δύο αυτές παραμέτρους σε σχέση με το μήκος των τελομερών και τη δραστικότητα της τελομεράσης σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς. Συνεπώς αυτή η απουσία συσχέτισης διαπιστώνεται για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη. Έτσι μπορούμε να συμπεράνουμε, πως το οξειδωτικό stress της ουραιμίας και η διαδικασία της αιμοκάθαρσης παίζουν σημαντικότερο ρόλο στη βιολογία των τελομερών σε σχέση με τις επιμέρους κλινικές εκδηλώσεις

της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου. Το αν και κατά πόσο η βαρύτητα της νεφρογενούς αναιμίας και του δευτεροπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού επιτείνει την πρόωρη γήρανση, γενικότερα με οποιοδήποτε τρόπο, θα πρέπει να διερευνηθεί με περαιτέρω μελέτες.

### 5.7 Χρόνια φλεγμονή

Οι ασθενείς που βρίσκονται σε χρόνια πρόγραμμα αιμοκάθαρσης, σε ένα ποσοστό 30 έως 50%, έχουν αυξημένους δείκτες φλεγμονής (Jofré et al., 2006). Οι παράγοντες που συμβάλλουν σε αυτό, μπορεί να σχετίζονται είτε με τον ασθενή (πρωτοπαθής νόσος, συνοδά νοσήματα, αυξημένη επίπτωση λοιμώξεων, αγγειακή προσπέλαση), είτε με τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης (βιοσυμβατότητα των μεμβρανών και των διαλυμάτων αιμοκάθαρσης, κύκλωμα εξωσωματικής κυκλοφορίας). Ενδείξεις χρόνιας φλεγμονής σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, είναι τα αυξημένα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και η παρουσία προφλεγμονωδών κυτοκινών (Zimmermann et al. 1999, Amore et al. 2002, Lindner et al. 1981).

Σε παλαιότερες μελέτες, έχει φανεί πως η φλεγμονή επισπεύδει τη μείωση του μήκους των τελομερών (Effros 2004). Ακόμα έχει βρεθεί πως η αυξημένη ενεργοποίηση των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος από τη διαδικασία της αιμοκάθαρσης, οδηγεί σε μείωση του μήκους των τελομερών τους (Ramirez et al. 2005). Τέλος, οι Spittle et al. (2002), διαπίστωσαν αυξημένη επίπτωση του οξειδωτικού stress σε ασθενείς υπό αιμοκάθαρση, μελετώντας δείκτες όπως οι F2-ισοπροστάνες. Στην εν λόγω μελέτη, φάνηκε οι δείκτες αυτοί να είναι αυξημένοι στους ασθενείς υπό αιμοκάθαρση, να σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και αυτή με τη σειρά της να είναι

σημαντικός προγνωστικός δείκτης θνητότητας. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν πως η χρόνια φλεγμονή και το οξειδωτικό stress χαρακτηρίζουν τους ασθενείς υπό αιμοκάθαρση, συνδέονται στενά μεταξύ τους και επηρεάζουν σημαντικά την επιβίωση των ασθενών αυτών.

Η συνήθης κλινική πρακτική, όσον αφορά την εργαστηριακή αξιολόγηση της φλεγμονής είναι η μέτρηση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, λόγω της εύκολης μέτρησής της και της αξιοπιστίας της. Στην παρούσα μελέτη δε φάνηκε η χρόνια φλεγμονή, όπως αυτή αξιολογήθηκε με τη μέτρηση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, να επηρεάζει το μήκος των τελομερών και τη δραστικότητα της τελομεράσης στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς. Τα ευρήματα αυτά, επιβεβαιώνουν τα ευρήματα παλαιότερων μελετών. Συγκεκριμένα στην μελέτη των Boxall et al. (2005), διαπιστώθηκε πως το μήκος των τελομερών δε σχετιζόταν με την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη. Επίσης στη μελέτη των Tsirpanlis et al. (2006), δε διαπιστώθηκε συσχέτιση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και άλλων δεικτών της φλεγμονής με τη δραστικότητα της τελομεράσης. Αντίθετα στη μελέτη των Carrero et al. (2008), φάνηκε πως υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο μειωμένο μήκος των τελομερών των νεφροπαθών και των μελετηθέντων δεικτών της φλεγμονής (Ιντερλευκίνη-6, υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, λευκών αιμοσφαιρίων και φετουίνη-A).

Πάρα ταύτα στην παρούσα μελέτη, φάνηκε η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη να έχει μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση με την επάρκεια της αποδιδόμενης κάθαρσης, όπως αυτή μετρήθηκε με το λόγο ποσοστιαίας μείωσης της ουρίας (URR). Δηλαδή οι ασθενείς με καλύτερη κάθαρση, είχαν μικρότερα επίπεδα C-αντιδρώσας πρωτεΐνης. Συμπερασματικά, η αποτελεσματικότητα της θεραπείας παίζει αποφασιστικό ρόλο στον περιορισμό της χρόνιας φλεγμονής.

## 5.8 Σακχαρώδης διαβήτης και καρδιοαγγειακή νόσος

Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια συχνά συνυπάρχει και αλληλεπιδρά και με άλλες μείζονες παθολογικές καταστάσεις, όπως το σακχαρώδη διαβήτη και την καρδιοαγγειακή νόσο. Με σκοπό να διερευνηθεί το αν και κατά πόσο αυτές οι καταστάσεις επηρεάζουν το μήκος των τελομερών ή τη δραστικότητα της τελομεράσης στους νεφροπαθείς, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με κριτήριο το αν έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη, στεφανιαία νόσο ή αν είχαν υποστεί αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Καμία όμως από τις παραπάνω καταστάσεις, δε φάνηκε να επηρεάζει με στατιστικά σημαντικό τρόπο το μήκος των τελομερών των ασθενών ή τη δραστικότητα της τελομεράσης.

Σε μια μελέτη στην οποία ερευνήθηκε το μήκος των τελομερών σε διαβητικούς ασθενείς (Adaikalakoteswari et al. 2007), βρέθηκε οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 να έχουν μικρότερα μήκη τελομερών σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Μάλιστα στην εν λόγω μελέτη, φάνηκε η μείωση των τελομερών να παρατηρείται ήδη από το στάδιο της διαταραγμένης ανοχής στη γλυκόζη. Οι Kuhlow et al. (2010), διαπίστωσαν μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη σε ποντίκια που στερούνταν το RNA τμήμα (TERC) της τελομεράσης, ως αποτέλεσμα μειωμένης έκκρισης ινσουλίνης υπό ερέθισμα γλυκόζης από τα παγκρεατικά νησίδα. Η μειωμένη απάντηση στη γλυκόζη αποδόθηκε στο ελαττωμένο μέγεθος των νησιδίων, ως αποτέλεσμα επηρεασμένης αναπαραγωγικής ικανότητας των κυττάρων αυτών, στους ποντικούς χωρίς δραστικότητα τελομεράσης.

Όσον αφορά τη στεφανιαία νόσο, σε μια πρόσφατη μελέτη (Weischer et al. 2012), διαπιστώθηκε πως το μειωμένο μήκος των



τελομερών σχετίζεται με μόλις αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου. Σε μια άλλη έρευνα που δημοσιεύθηκε την ίδια χρονιά (Kroenke et al., 2012), φάνηκε πως η αυξημένη δραστικότητα της τελομεράσης, σχετιζόταν με μεγαλύτερη επίπτωση των επασβεστωμένων αθηρωματικών πλακών στις στεφανιαίες αρτηρίες.

Οι Ding et al. (2012), διαπίστωσαν μικρότερα μήκη τελομερών σε ασθενείς που είχαν υποστεί ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Ακόμα σε μια μελέτη (Bei Zhang et al. 2010) σε ποντίκια που στερούνταν το RNA τμήμα (TERC) της τελομεράσης, φάνηκε αυτά να είναι πιο ευάλωτα σε ισχαιμικές εγκεφαλικές βλάβες. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή η απουσία δραστικότητας της τελομεράσης, ενίσχυε τη δυσλειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, τη φλεγμονώδη αντίδραση και το οξειδωτικό stress του πειραματικά προκαλούμενου ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου.

Όμως οι παραπάνω μελέτες δεν αφορούσαν νεφροπαθείς. Επιπρόσθετα στις περισσότερες από αυτές, το μήκος των τελομερών ή η δραστικότητα της τελομεράσης ασθενών, συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα υγιών μαρτύρων. Αντίθετα στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε ο βαθμός συμμετοχής των παραπάνω παθήσεων, στη διατήρηση του μήκους των τελομερών και στην έκφραση της δραστικότητας της τελομεράσης σε ασθενείς υπό αιμοκάθαρση. Πιθανότατα η επίδραση της διάρκειας της αιμοκάθαρσης στο μήκος των τελομερών των ασθενών, να αποτελεί πιο ισχυρό παράγοντα, από ότι οι επιμέρους παθολογικές καταστάσεις που μελετήθηκαν.

## 5.9 Επιβίωση

Κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής, έγινε καταγραφή της τριετούς επιβίωσης των ασθενών. Ανεξάρτητα από τα αίτια θανάτου, η τριετής

επιβίωση ήταν 76,7%. Όμως ούτε το μήκος των τελομερών, αλλά ούτε και η δραστηριότητα της τελομεράσης, φάνηκε να έχει σημαντική επίδραση στην επιβίωση των ασθενών. Αντίθετα στη μελέτη των Carrero et al. (2008), φάνηκε πως το μειωμένο μήκος τελομερών σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, σχετιζόταν με αυξημένη θνητότητα ανεξάρτητα από το φύλο, την ηλικία και τα επίπεδα της ιντερλευκίνης-6. Πάρα ταύτα στην ίδια μελέτη, όταν έγινε στατιστική προσαρμογή με τα επίπεδα της φετουίνης-A, η συσχέτιση του μήκους των τελομερών με την επιβίωση δεν ήταν πλέον σημαντική. Πιθανότατα αυτό σημαίνει πως η φλεγμονή, η αθηρωμάτωση και η κυτταρική γήρανση, επηρεάζουν αλληλένδετα και με πολύπλοκο τρόπο την επιβίωση. Στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, η χρόνια φλεγμονή και η διαλείπουσα επαφή του αίματος με το κύκλωμα εξωσωματικής κυκλοφορίας (Srinivasa et al. 2001, Stenvinkel P., 2003,), ενδεχομένως έχουν επίδραση περισσότερο στο μήκος των τελομερών των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος. Ως αποτέλεσμα, το μήκος των τελομερών στα κύτταρα αυτά, ίσως να μην είναι αντιπροσωπευτικό και για τους άλλους ιστούς και έτσι να μην συσχετίζεται με την επιβίωση.

Ο άνθρωπος φαίνεται να έχει τη μεγαλύτερη επιβίωση και το μικρότερο μήκος τελομερών από όλα τα πρωτεύοντα είδη που έχουν μελετηθεί (Kakuo et al., 1999; Steinert et al., 2002). Για παράδειγμα τα ποντίκια έχουν μεγαλύτερο μήκος τελομερών και αυξημένη δραστηριότητα τελομεράσης σε διάφορους ιστούς, σε αντίθεση με τον άνθρωπο (Prowse and Greider, 1995). Στη περίπτωση αυτή, το μήκος των τελομερών και η δραστηριότητα της τελομεράσης, δε μπορούν να εξηγήσουν γιατί ο άνθρωπος ζει παραπάνω από το ποντίκι. Αναμφισβήτητα τα τελομερή είναι το «μιτωτικό ρολόι» των κυττάρων, αλλά φαίνεται πως και άλλοι παράγοντες υπεισέρχονται στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης.

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, υποδεικνύουν ότι, η διάρκεια της υποκατάστασης της νεφρικής λειτουργίας με αιμοκάθαρση σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, σχετίζεται με το μήκος των τελομερών. Συγκεκριμένα οι ασθενείς που βρίσκονταν για μακρύτερο χρονικό διάστημα υπό αιμοκάθαρση, είχαν μικρότερα μήκη τελομερών. Ακόμα διαπιστώθηκε, πως το μήκος των τελομερών των ασθενών στους οποίους η τελομεράση ήταν ενεργή, ήταν ανάλογο με τη δραστικότητά της. Τέλος το μήκος των τελομερών και η δραστικότητα της τελομεράσης των αιμοκαθαιρόμενων ασθενών, δε διέφεραν σημαντικά με αυτά των υγιών μαρτύρων.

Όπως φάνηκε στην παρούσα μελέτη, η τάση για πρόωρη κυτταρική γήρανση στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, εξαρτάται από τη διάρκεια της έκθεσης του κυττάρου στο ουραιμικό περιβάλλον και τις εξ'ορισμού μη φυσιολογικές συνθήκες της αιμοκάθαρσης. Το φαινόμενο αυτό, πιθανόν να οφείλεται εν μέρει στην αθροιστική έκθεση του DNA των περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος, στο αυξημένο οξειδωτικό stress, επαγόμενο από την πληθώρα των ουραιμικών τοξινών αλλά και την επανειλημμένη επαφή του αίματος με τα υλικά του συστήματος της εξωσωματικής κυκλοφορίας. Πάρα ταύτα ο ακριβής

μηχανισμός του φαινομένου αυτού, παραμένει αδιευκρίνιστος και αντικείμενο μελλοντικών ερευνών.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adaikalakoteswari, A., Balasubramanyam, M., Ravikumar, R., Deepa, R., Mohan, V., 2007; Association of telomere shortening with impaired glucose tolerance and diabetic macroangiopathy. *Atherosclerosis* 195:83-89
- Alpern, R. J., Sakhaee, K., 1997; Clinical spectrum of chronic metabolic acidosis. Homeostatic mechanisms produce significant morbidity. *Am J Kidney Dis.* 29:291-302
- Amore, A., Coppo, R. 2002; Immunological basis of inflammation in dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 17:16-24
- ANZDATA Registry. Australia and New Zealand Dialysis and Transplant Registry Report. In: Russ, G. R., ed. 2001; ANZDATA Registry. Adelaide, South Australia: ANZDATA
- ANZDATA Registry. Report. ANZDATA; 2001
- Artandi, S. E., 2006; *N. Engl. J. Med.* 355 ; 12 :1195-97
- Avilion, A. A., Piatyszek, M. A., Gupta, J., Shay, J. W., Bacchetti, S., and Greider, C. W., 1996; Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res.* 56:645-50
- Baigent, C., Burbury, K., Wheeler, D., 2000; Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet* 356:147-152
- Barany, P., Divino, J. C., Bergstrom, J., 1997; High C-reactive protein is a strong predictor of resistance to erythropoietin in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 29:565-68

- Ben-Porath, I., Weinberg, R. A., 2004; When cells get stressed: An integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest* 113:8-13
- Ben-Porath, I., Weinberg, R. A., 2005; The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37:961-76
- Bergstrom, J., Heimbürger, O., Lindholm, B., Qureshi, A. R., 1995; C-reactive protein as predictor for serum albumin and mortality in hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 6:573-77
- Blackburn, E. H. 1991; Structure and function of telomeres. *Nature* 350:569-573
- Blackburn, E. H., 2005; Telomeres and telomerase: their mechanism of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett* 579:859-62
- Blasco, M. A., Rizen, M., Greider, C. W., and Hanahan, D., 1996; Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis. *Nature Genet.* 12:200-04
- Bodnar, A. G., Qujellete, M., Frolkis, M., et al. 1998; Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-52
- Boxall, M. C., Goodship, H. J., Brown, A. L., Ward, M. C., von Zglinicki, T., 2005; Telomere shortening and haemodialysis. *Blood Purif* 2006;24:185-89
- Braunwald, E., Zipes, D. P., 2005: Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine (ed 7). Philadelphia, PA, Saunders
- Buccianti, G., Perna, A., Gherardi, G., et al. 1996; Cancer in patients on renal replacement therapy in Lombardy, Italy. *Lancet* 347:59-60
- Buck, K., Feehally, J., 1997; Diabetes and renal failure in Indo-Asians in the UK- a paradigm for the study of disease susceptibility. *Nephrol Dial Transplant* 12:1555-7
- Carrero, J. J., Stenvinkel, P., Fellström, B., Qureshi, A. R., Lamb, K., Heimbürger, O., Bárány, P., Radhakrishnan, K., Lindholm, B., Soveri, I., Nordfors, L., Shiels, P. G., 2008; Telomere attrition is associated with inflammation, low-fetuin-A levels and high mortality in prevalent haemodialysis patients. *J Int Med* (vol. 263) 3:302-312
- Chen, Q., Ames, B. N., 1994; Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4130-46

- Chiu, C. P., et al. 1996; Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem. Cells.* 14:239-48
- Cohen, S.B., Graham, M.E., Lovrecz, G.O., Bache, N., Robinson, P.J., Reddel, R.R. 2007; Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* 315(5820): 1850-1853
- Cong, Y. S., Wright, W. E., Shay, J. W. 2002; Human telomerase and its regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:407-425
- Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., Bacchetti, S., 1992; Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 11:1921-929
- Danielski, M., Ikizler, T. A., McMonagle, E., Kane, J. C., Pupim, L., Morrow, J., Himmelfarb, J., 2003; Linkage of hypoalbuminemia, inflammation and oxidative stress in patients receiving maintenance hemodialysis therapy. *Am J Kidney Dis.* 42:286-294
- DeLange, T., Shiue, L., Myers, R. M., Cox, D. R., Naylor, S. L., Killery, A. M., and Varmus, H. E., 1990; Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell. Biol.* 10:518-527
- Demissie, S., Levy, D., Benjamin, E. J., Cupples, L. A., Gardner, J. P., Herbert, A., Kimura, M., Larson, M. G., Meigs, J. B., Keaney, J. F., Aviv, A., 2006; Insulin resistance, oxidative stress, hypertension and leucocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging Cell* 5:325-30
- Descamps-Latscha, B., Herbelin, A., Nguyen, A., et al. 1994; The immune system in end-stage renal disease. *Semin Nephrol* 14:253-60
- Dimmeler, S., Zeiher, A. M., 1999; Nitric oxide-An endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ* 6:964-68
- Ding, H., Chen, C., Shaffer, J. R., Liu, L., Xu, Y., Wang, X., Hui, R., Wang, D. W., 2012; Telomere length and risk of stroke in Chinese. *Stroke* 43(3) 658-63
- Effros, R. B., 2004; T cell replicative senescence: pleiotropic effects on human aging. *Ann N Y Acad Sci* 1019:123-6
- Effros, R. B., 2007; Telomerase induction in T cells: A cure for aging and disease? *Exp Gerontol* 42:416-20

- Effros, R. T., Dagarag, M., Spaulding, C., Man, J., 2005; The role of CD8 T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev* 205:147-57
- El Nahas, M., 2003; Progression of Chronic Renal Failure. In: Johnson, R. J., Feehaly, J. *Comprehensive Clinical Nephrology*, 2<sup>nd</sup> Ed. 66:843
- Emerit, I., Michelson, A. M., 1980; Chromosome instability in human and murine autoimmune disease: anticlastogenic effect of super-oxide dismutase. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* 492:59-65
- Enerback, C., Holmqvist, D., Inerot, A., et al. 1999; Cytogenic analysis of 477 psoriatics revealed an increased frequency of aberrations involving chromosome region 11q. *Eur. J. Hum. Genet.* 7:339-44
- Epel, E. S., Lin, J., Wilhelm, F. H., Wolkowitz, O. M., Cawthon, R., Adler, N. E., Dolbier, C., Mendes, W. B., Blackburn, E. H. 2006; Cell aging in relation to stress arousal and cardiovascular disease risk factors. *Psychoneuroendocrinology* 31:277-87
- Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J., Le, S., West, M. D., Harley, C. B., Andrews, W. H., Greider, C.W., and Villeponteau, B. 1995; The RNA component of human telomerase. *Science* 269:1236-41
- Galle, J., 2001: Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 16:2135-37
- Galli, F., Canestrari F., Bellomo, G., 1999; Pathophysiology of the oxidative stress and its implication in uremia and dialysis. *Contrib Nephrol. Basel, Karger* vol 127, pp1-31
- Getliffe, K. M., Al Dulaimi, D., Martin-Ruiz, C., Holders, R. L., Von Zglinicki, T., Morris, A., Nwokolo, C.U. 2005; Lymphocyte telomere dynamics and telomerase activity in inflammatory bowel disease: effect of drugs and smoking. *Aliment Pharmacol Ther* 21:121-31
- Gire Roux, P., Wynford-Thomas, D., Brondello, J. M., Dulic, V., 2004; DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J* 23:2554-63
- Goldstein, S., 1990; Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 249: 1129-133
- Greider, C. W. 1999; Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell* 97:419-422

- Greider, C. W., and Blackburn, E. H., 1985; Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*. 43:405-13
- Greider, C. W., and Blackburn, E. H., 1989; A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature (London)* 337:331-37
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and DeLange, T. 1999; Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97: 503-514
- Haendeler, J., 2006; Nitric oxide and endothelial cell aging. *Eur J Clin Pharmacol* 62:137-40
- Hara, E. T., Shinozaki, A., Nakada, S., Oda, K., 1991; Cooperative effect of antisense-RB and antisense-p53 in the regulation of cellular senescence. *Exp. Cell. Res.* 179:528-534
- Harley, C. B., Futcher, A. B., Greider, C. W., 1990; Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458-460.
- Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K., and Allshire, R. C. 1990; Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346:866-868
- Haverkate, F., Thompson, S.G., Pype, S. D. M., Gallimore, J. R., Pepys, M. B., 1997; Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *Lancet* 349:462-66
- Hayflick, L., 1965; The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.* 37:614-636
- Hoffman, J., Haendeler, J., Aicher, A., et al. 2001; Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: Important role of nitric oxide. *Circ Res* 89:709-15
- Holt, S. E., and Shay, J. W., 1999; Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J. Cell. Physiol.* 180:10-18
- Honda, M., Mengesha, E., Albano, S., et al. 2001; Telomere shortening and decreased replicative potential, contrasted by continued proliferation of telomerase-positive CD8+CD28(lo) T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* 99:211-21



- Iseki, K., Tozawa, M., Iseki, C., et al. 2002; Demographic trends in the Okinawa Dialysis Study (OKIDS) registry (1971-2000). *Kidney Int.* 61:668-75
- Jaar, B. G., Hermann, J. A., Furth, S. L., Briggs, W., Powe, N. R., 2000; Septicemia in diabetic hemodialysis patients: Comparison of incidence, risk factors, and mortality with nondiabetic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 35:282-92
- Jimenez, R., Carracedo, J., Santamaria, R., Soriano, S., Madueno, J. A., Ramirez, R., Rodriguez, M., Martin-Malo, A., Aljama, P. 2005; Replicative senescence in patients with chronic kidney failure. *Kidney Int.* 99:S11-S15
- Jofre, R., Rodriguez-Benitez, P., Lopez-Gomez, J. M., Perez-Garcia, R., 2006 ; Inflammatory Syndrome in Patients on Hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 17 :274-80
- Kakuo, S., Asaoka, K., Ide, T., 1999; Human is a unique species among primates in terms of telomere length. *Biochem Biophys Res Commun* 263(2):308-14
- Kaneko, T., Tahara, S., Taguchi, T., Kondo, H., 2001; Accumulation of oxidative DNA damage, 8-oxo-2'-deoxyguanoside, and change of repair systems during in vitro cellular aging of cultured human skin fibroblasts. *Mutat Res* 487:19-30
- Kanis, J. A., 1995; The use of alfacalcidol in the prevention of bone disease in early renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 10(Suppl 4):23-8
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and DeLange, T. 1999; p-53 and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science.* 283:1321-325
- Karlseder, J., Smogorzewska, A., de Lange, T., 2002; Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 295:2446-9
- Kim, B. S., Jeon, D. S., Shin, M. J., Kim, Y. O., Song, H. C., Lee, S. H., Kim, S. Y., Choi, E. J., Chang, Y. S., Bang, B. K., 2005; Persistent elevation of C-reactive protein may predict cardiac hypertrophy and dysfunction in patients maintained on hemodialysis. *Am J Nephrol* 25:189-95
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., and Shay, J. W., 1994;

Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 266:2011-15

- Kim, S. H., Kaminker, P., Campisi, J. 2002; Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending. *Oncogene* 21:503-511
- Kinne, R.W., Liehr, T., Beensen, V., et al. 2001; Mosaic chromosomal aberrations in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and other inflammatory joint diseases. *Arthritis Res.* 3:319-30
- Klag, M., J., Whelton, P., K., Randall, B., L., et al.1997; End stage renal disease in African-American and white men. *JAMA* 227:1293-8
- Koetz, K., Bryl, E., Spickschen, K., et al. 2000; T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:9203-8 *Aging (Albany, NY)*. 2(10):650-58
- Kroenke, C. H., Pletcher, M. J., Lin, J., Blackburn, E., Adler, N., Matthews, K., Epel, E. 2012; Telomerase, telomere length, and coronary artery calcium in black and white men in the CARDIA study. *Atherosclerosis* 220(2):506-12
- Kuhlow, D., Florian, S., von Figura, G., Weimer, S., Schulz, N., Petzke, K. J., Zarse, K., Pfeiffer, A. F., Rudolph, K. L., Ristow, M. 2010; Telomerase deficiency impairs glucose metabolism and insulin secretion.
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., Trivier, E., Akhmedov, A., Erusalimsky, J. D., 2004; Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 117:2417-26
- Lakatta, E. G., Levy, D., 2003; Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises. Part I: Aging arteries: A “set up” for vascular disease. *Circulation* 107:139-46
- Levey, A. S., Beto, J. A., Coronado, B. E., et al.1998; Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: what do we know? What do we need to learn? Where do we go from here? National Kidney Foundation Task Force on Cardiovascular Disease. *Am J Kidney Dis.* 32:853-906
- Li, C-Z., Eller, M. S., Firoozabadi, R., Gilchrist, B. A., 2003; Evidence that exposure of the telomere 3' overhang sequence induces senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:527-31

- Lindner, A., Farewell, V. T., Sherrard, D. J., 1981: High incidence of neoplasia in uremic patients receiving long-term dialysis. *Cancer and long-term dialysis. Nephron* 27:292-96
- Lindsey, J., McGill, N. I., Lindsey, L. A., Green, D. K., and Cooke, H. J. 1991; In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat. Res.* 256:45-48
- Lloyd, A. C., 2002; Limits to life span. *Nat Cell Biol* 4:E25-E27
- Locatelli, F., Del Vecchio, L., 2000; Natural history and factors affecting the progression of chronic renal failure. In: El Nahas, A., M., Anderson, S., Harris, K., P., G., eds. *Mechanisms and management of progressive renal failure.* London: Oxford University Press; 20-79
- Locatelli, F., Marcelli, D., Comelli, M., and the Northern Italian Cooperative Study Group. 1996; Proteinuria and blood pressure as causal components of progression to end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 11:461-7
- Losito, A., Kalidas, K., Santoni, S., Jeffery, S., 2003; Association of interleukin-6-174G/C promoter polymorphism with hypertension and left ventricular hypertrophy in dialysis patients. *Kidney Int* 64:616-22
- Loughrey, C. M., Young, I. S., Lightbody, J. H., McMaster, D., McNamee, P. T., Trimble E. R., 1994; Oxidative stress in haemodialysis. *Q J Med* 87:679-83
- Makropoulos, W., Heintz, B., Stefanidis, I. 1997; Selenium deficiency and thyroid function in acute renal failure. *Ren Fail* 19(1):129-136
- Matsushita, H., Chang, E., Glassford, A. J., Cooke, J. P., Chiu, C-P., Tsao, R. S., 2001; eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells. Preservation by hTERT immortalization. *Circ Res* 89:793-98
- McEachern, M. J., A. Krauskopf, and E. H. Blackburn. 2000; Telomeres and their control. *Annu. Rev. Genet.* 34:331-358
- Meier, U.T. 2005; The many facets of H/ACA ribonucleoproteins. *Chromosoma* 114:1-14
- Meyerson, M., 2000; Role of telomerase in normal and cancer cells. *J. Clin. Onkol.* 18:2626-34
- Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Ischida, Y., Yoshida, H., Komuro, I., 2002; Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: Role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 105: 1541-4

- Mitchell, J.R., Cheng, J., Collins, K. 1999; A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol. Cell Biol.* 19:567-576
- Mochizuki, Y., He, J., Kulkarni, S., Bessler, M., Mason, P.J. 2004; Mouse dyskerin mutations affect accumulation of telomerase RNA and small nucleolar RNA, telomerase activity, and ribosomal RNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:10756-10761.
- Morin, G. B., 1989; The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell.* 59:521-29
- National Kidney Foundation. DOQI kidney disease outcome quality initiative. *Am J Kidney Dis.* 2002;39:(Suppl.1):S1-S266
- Nguyen-Khoa, T., Massy, Z. A., De Bandt, J. P., Kebede, M., Salama, L., Lambrey, G., Witko-Sarsat, V., Druke, T. B., Lacour, B., Thevenin, M., 2001; Oxidative stress and hemodialysis: Role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 16:335-40
- Olovnikov, A. M. 1973; A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* 41:181-190
- Panichi, V., Maggiore, U., Taccola, D., Migliori, M., Rizza, G. M., Consani, C., Bertini, A., Sposini, S., Perez-Garcia, R., Rindi, P., Palla, R., Tetta, C., 2004 ; Interleukin-6 is a stronger predictor of total and cardiovascular mortality than C-reactive protein in dialytic patients. *Nephrol Dial Transplant* 19:1154-60
- Park, C. W., Shin, Y. S., Kim, C. M., Lee, S. Y., Yu, S. E., Kim, S. Y., Choi, E. J., Chang, Y. S., Bang, B. K., 2002; Increased C-reactive protein following hemodialysis predicts cardiac hypertrophy in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 40:1230-39
- Pecoits-Filho, R., Barany, P., Lindholm, B., Heimbürger, O., Stenvinkel, P., 2002; Interleukin-6 is an independent predictor of mortality in patients starting dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 17:1684-88
- Perez-Rivero, G., Ruiz-Torres, M. P., Rivas-Elena, J. V., Jerkic, M., Diez-Marques, M. L., Lopez-Novoa, J. M., Blasco, M. A., Rodriguez-Puyol, D.

- 2006; Mice deficient in telomerase activity develop hypertension because of an excess of endothelin production. *Circulation* 114:309-17
- Prowse, K. R., Greider, C. W., 1995; Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(11): 4818-22
  - Ramirez, R., Carracedo, J., Soriano, S., Jimenez, R., Martin-Malo, A., Rodriguez, M., Blasco, M., Aljama, P., 2005; Stress-induced premature cellular senescence in mononuclear cells from patients on long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 45:353-9
  - Reddel, R. R., Bryan, T. M., Colgin, L. M., Perrem, K. T., Yeager, T. R., 2001;. Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat Res* 155(1 Pt 2):194-200.
  - Robles, S. J., Adami, G. R., 1998; Agents that cause double strand DNA breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16:1113-23
  - Roselaar, S. E., Nazhat, N. B., Winyard, P. G., Jones, P., Cunningham, J., Blake, D. R., 1995; Detection of oxidants in uremic plasma by electron spin resonance spectroscopy. *Kidney Int* 48:199-206
  - Schonland, S. O., Lopez, C., Widmann, T., et al. 2003; Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:13471-6
  - Serra, V., von Zglinicki, T., Lorenz, M., Saretzki, G., 2003; Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem* 278:6824-30
  - Shay, J. W., and Bacchetti, S., 1997; A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer.* 33:787-91
  - Shay, J. W., Pereira-Smith, O., Wright, W. E., 1991; A role for both RB and p53 in the regulation of the cellular senescence. *Exp. Cell. Res.* 196:33-39
  - Shay, J. W., Wright, W. E., 1989; Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 larger T-antigen. *Exp. Cell. Res.*184: 109-118
  - Shay, J. W., Wright, W. E., 2000; Hayflick, his limit and cellular aging. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1: 72-76

- Shay, J. W., Wright, W. E., Brasiskyte, D., Van der Haegen, B. A., 1993; E6 of human papillomavirus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. *Oncogene* 8:1407-413
- Shippen-Lentz, D., and Blackburn, E. H., 1990; Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 247:546-52
- Simionescu, M. 2007; Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 266-74
- Smogorzewska, A., Van Steelsen, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M., R., Schnapp, G., and DeLange, T. 2000; Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell. Biol.* 20:1659-668
- Spittle, M. A., Hoenich, N. A., Handelman, G. J., Adhikarla, R., Homel, P., Levin, N. W., 2001; Oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 38:1408-1413
- Srinivasa, Rao, P. V., Dakshinamurthy, K. V., Saibaba, K. S., Raghavan, M. S., Vijayabhaskar, M., Sreekrishna, V., Ambekar, J. G., Jayaseelan, L., 2001; Oxidative stress in haemodialysis: intradialytic changes. *Redox Rep* 6: 303-9
- Stefanidis, I., Hägel, J., Kiedorf, H., Maurin, N. 1995; Influencing hemostasis during continuous venovenous hemofiltration after acute renal failure: comparison with intermittent hemodialysis. *Contrib Nephrol* 116:140-144
- Steinert, S., White, D. M., Zou, Y., Shay, J. W., Wright, W. E., 2002; Telomere biology and cellular aging in nonhuman primate cells. *Exp Cell Res* 272(2):146-52
- Stenvinkel, P., 2003; Interactions between inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in end-stage renal disease. *J Ren Nutr* 13(2):144-148
- Takubo, K., Izumiyama-Shimomura, N., Honma, N., Sawabe, M., Arai, T., Kato, M., Nakamura, K. I. 2002; Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp. Gero.* 37:523-531
- The Annual Report on Management of Renal Failure in Europe XXVII; 1996
- The UK Renal Registry. The Third Annual Report; December 2000
- Tsao, D. A., Wu, C. W., and Lin, Y. S., 1998; Molecular cloning of bovine telomerase RNA. *Gene.* 221:51-58

- Tsirpanlis, G., Chatzipanagiotou, S., Boufidou, F., Kordinas, V., Alevyzaki, F., Zoga, M., Kyritsis, I., Stamatelou, K., Triantafyllis, G., Nikolaou, C. 2006; Telomerase activity is decreased in peripheral blood mononuclear cells of hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 26:91-6
- Tuschi, H., Kovac, R., Wolf, A., et al. 1984; SCE frequencies in lymphocytes of systemic lupus erythematosus patients. *Mutat. Res.* 128:167-71
- UK Renal Registry. UK Renal Registry Report. In: Ansell, D., Feest, T. G., eds. 2001; UK Renal Registry. Bristol, UK: UK Renal Registry
- US Renal Data System: USRDS 2001 Annual Data Report. The National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD. 2001; Incidence and prevalence of ESRD. *Am J Kidney Dis* 38 (Suppl. 3):S17-36
- Van Steelsen, B., and DeLange, T. 1997; Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385:740-743
- Vasile, E., Tomita, Y., Brown, L. F., Kocher, O., Dvorak, H. F., 2001; Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: Evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB J* 15: 458-66
- Vaziri, N. D., 2004; Oxidative stress in uremia: Nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol* 24:469-73
- Venteicher, A.S., Artandi, S.E. 2009; TCAB1: driving telomerase to Cajal bodies. *Cell Cycle*. 2009 May 1;8(9):1329-31
- Venteicher, A.S., Abreu, E.B., Meng, Z., McCann, K.E., Terns, R.M., Veenstra, T.D., Terns, M.P., Artandi, S.E., 2009; A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* 323:644-648
- Von Zglinicki, T. 2002; Oxidative stress shortens telomeres. *Trends. Biochem. Sci.* 27:339-344
- Von Zglinicki, T., Serra, V., Lorenz, M., Saretzki, G., Lenzen-Grossimlighaus, R., Gessner, R., Risch, A., Steinhagen-Thiessen, E. 2000; Short telomeres in patients with vascular dementia: an indicator of low antioxidative capacity and a possible risk factor? *Lab. Invest.* 80:1739-1747

- Wang, A. Y., Woo, J., Lam, C. W., Wang, M., Sea, M. M., Lui, S. F., Li, P. K., Sanderson, J., 2003; Is a single time point C-reactive protein predictive of outcome in peritoneal dialysis patients? *J Am Soc Nephrol* 14:1871-79
- Weischer, M., Bojesen, S. E., Cawthon, R. M., Freiberg, J. J., Tybjaerg-Hansen, A., Nordestgaard, B. G., 2012; Short telomere length, myocardial infarction, ischemic heart disease and early death. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 32(3):822-9
- Wright, W. E., Pereira-Smith, O., Shay, J. W., 1989; Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 9:3088-092
- Wright, W. E., Shay, J. W., 2001; Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:98-103
- Wu, K. D., Hansen, E. R., 2001; Shortened telomere length is demonstrated in T-cells subsets together with a pronounced increased telomerase activity in CD4 positive T cells from blood of patients with mycosis fungoides and parapsoriasis. *Exp. Dermatol.* 10:329-36
- Wu, K., Higashi, N., Hansen, E. R., et al. 2000; Telomerase is increased and telomere length shortened in T cells from blood of patients with atopic dermatitis and psoriasis. *J. Immunol.* 165:4742-7
- Yeun, J. Y., Levine, R. A., Mantadilok, V., Kaysen, G. A., 2000 ; C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 35:469-76
- Yi, X., Tesmer, V. M., Savre-Train, I., Shay, J. W., and Wright, W. E. 1999; Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. *Mol. Cell. Biol.* 19:3989-997
- Yui, J., Chiu, C. P., and Lansdorp, P. M., 1998; Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow. *Blood.* 91:3255-62
- Yu-Sheng, C., Wright, W. E., Shay, J. W., 2002; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3): 407-425
- Zhang, B., Chen, L., Swartz, K. R., Bruemmer, D., Eum, S. Y., Huang, W., Seelbach, M., Choi, Y. J., Hennig, B., Toborek, M. 2010; Deficiency of telomerase activity aggravates the blood-brain barrier disruption and neuroin-



flammatory response in a model of experimental stroke. *J Neurosci Res* 88(13):2859-68

- Zhu, J., Wang, H. , Bishop, J. M. , Blackburn, E. H. ,1999; Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3723-28
- Zimmermann, J., Herrlinger, S., Pruy, A., Metzger, T., Wanner, C., 1999; Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis. *Kidney Int* 55:648-5