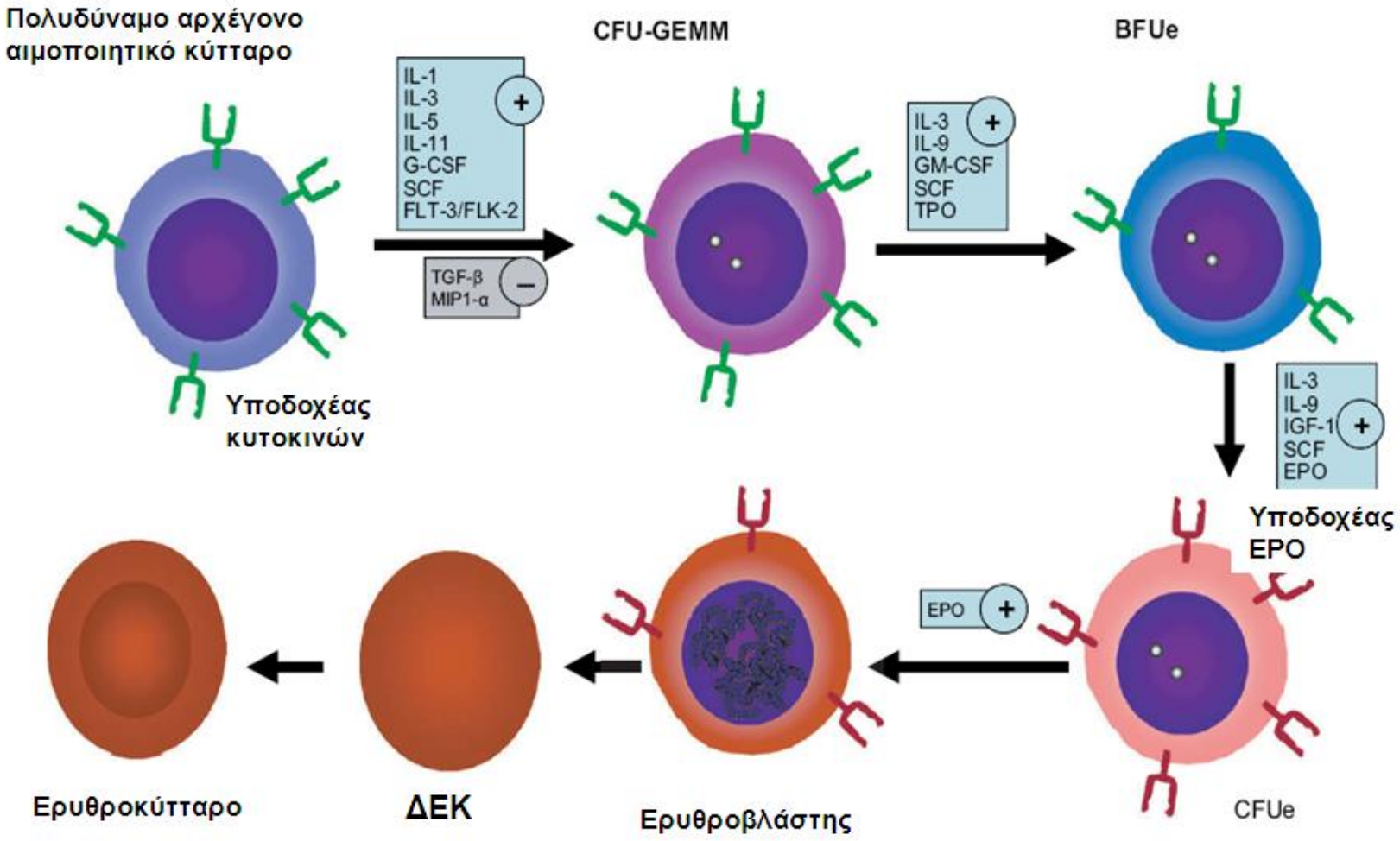
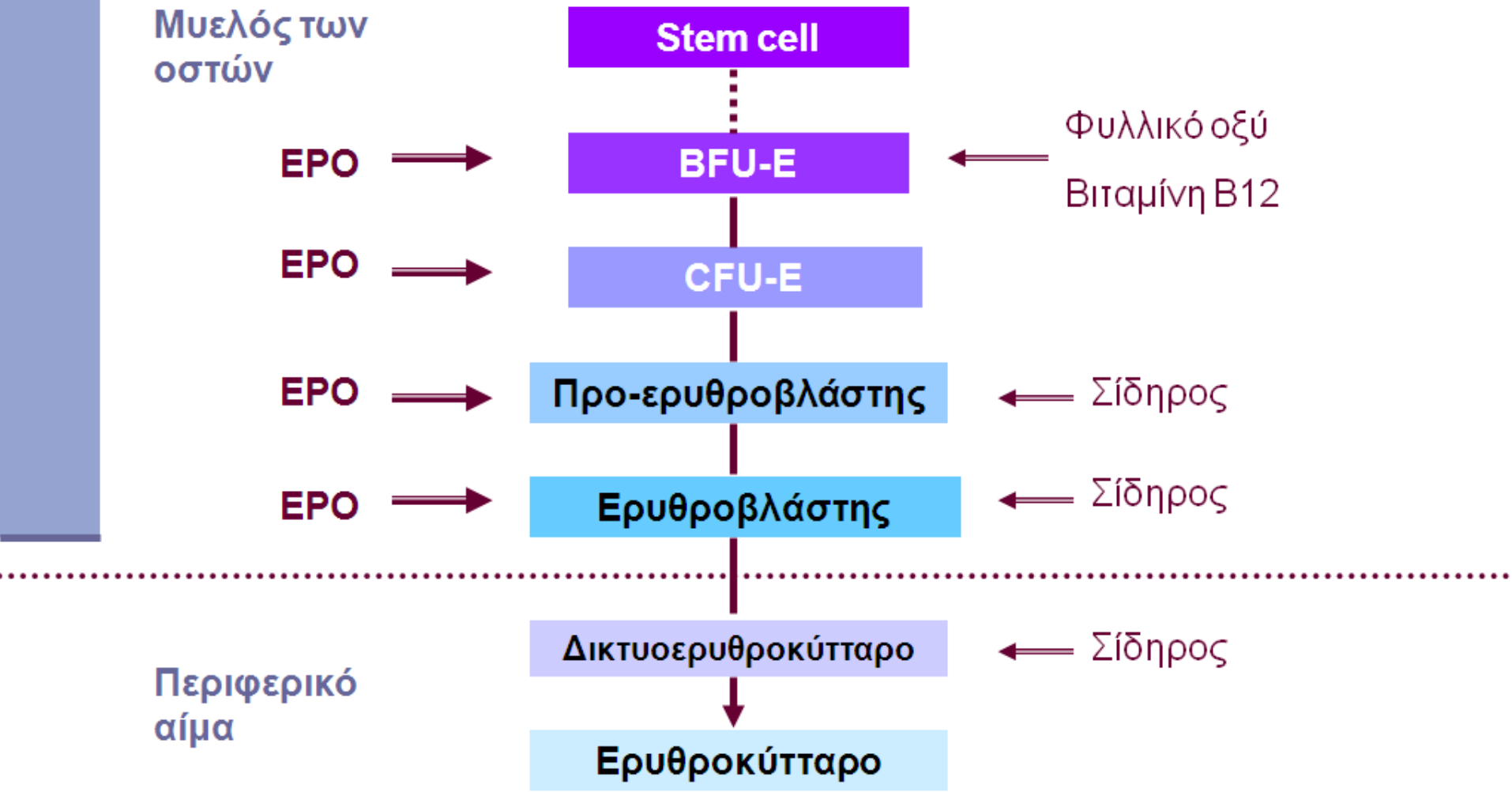
Ερυθροποίηση



Η ερυθροποιητίνη στην ερυθροποίηση

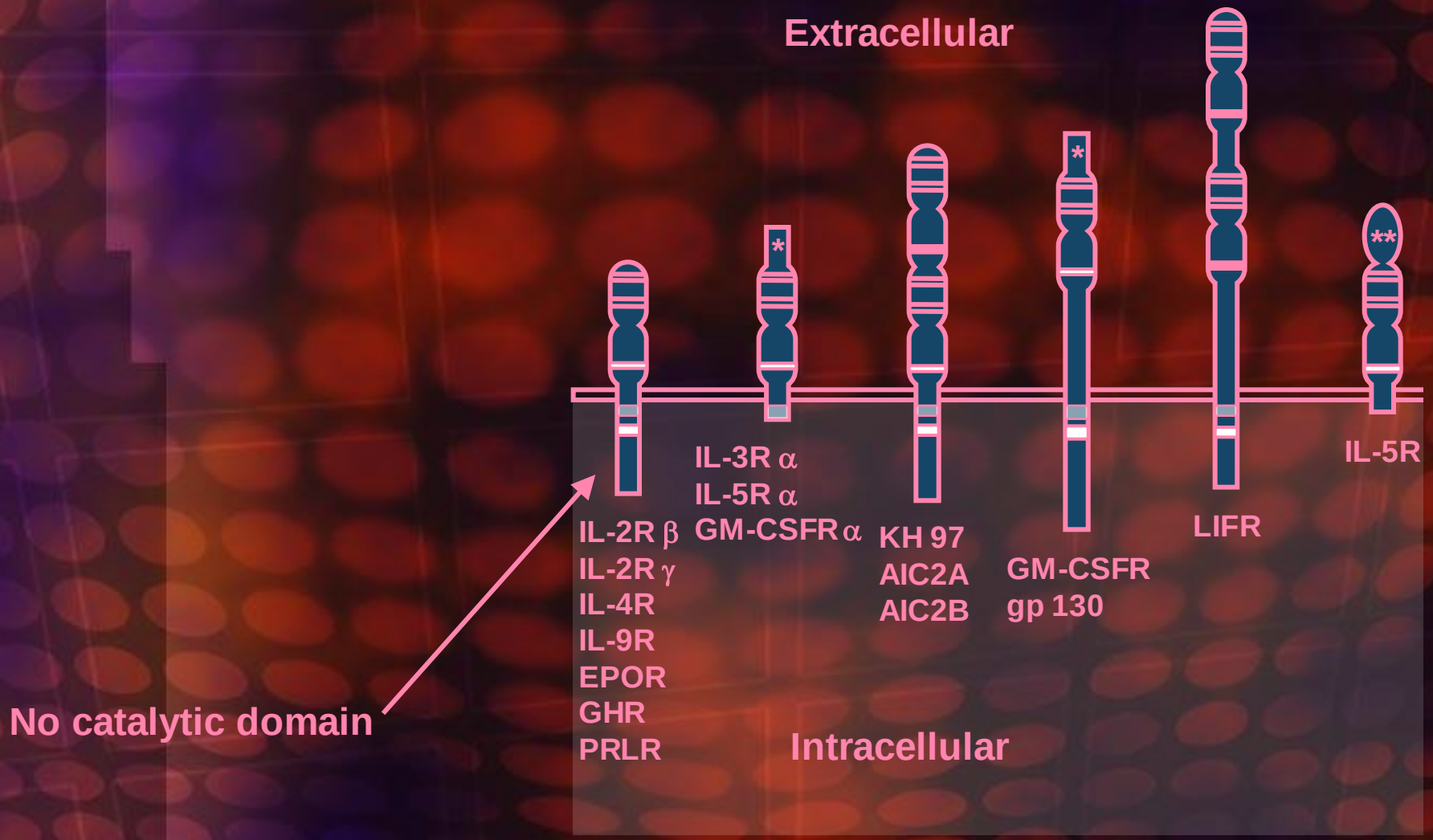


Σε ποια κύτταρα δρά η ΕΠΟ;

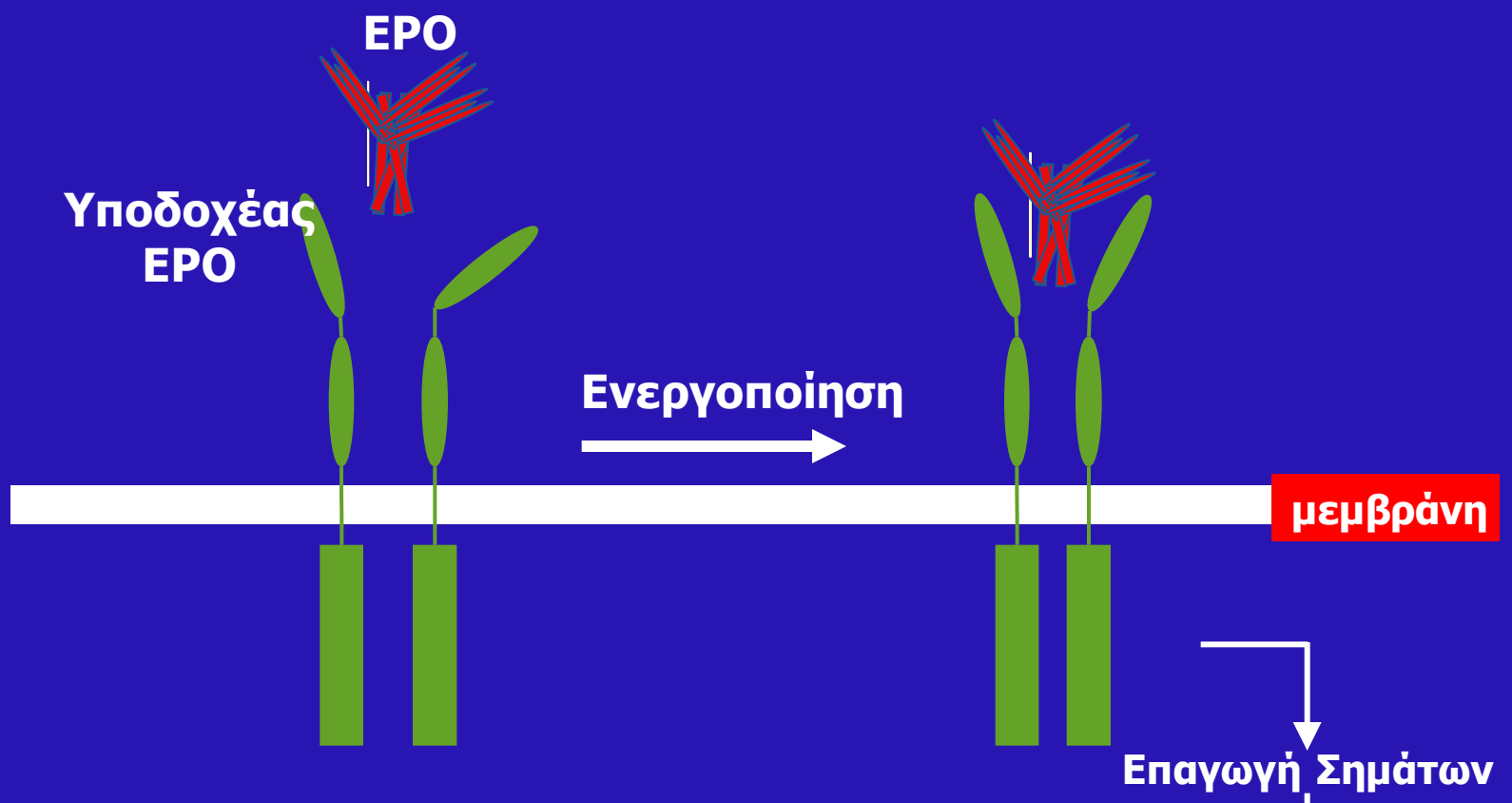
- Δρά στα κύτταρα που διαθέτουν τον ειδικό για αυτή υποδοχέα, EPO-R.
  - Δύο τάξεις EPOR με διαφορετική χημική συγγένεια σύνδεσης με την EPO, μια τάξη με μεγάλη και μια τάξη με μικρή χημική συγγένεια σύνδεσης.
  - Οι υποδοχείς της πρώτης τάξης μεσολαβούν στις ήδη γνωστές αιμοποιητικές δράσεις ενώ της δεύτερης τάξης φαίνεται να εμπλέκονται στη γενικότερη κυτταροπροστατευτική δράση της ερυθροποιητίνης.
- Η σύνδεση με τον υποδοχέα είναι απαραίτητη ώστε να ασκήσει η ΕΠΟ τις φυσιολογικές ενδοκυττάριες δράσεις.

Υποδοχέας EPO-R

Γλυκοπρωτείνη, 484 αμονιξέα,1 N-γλυκάνη



Υποδοχέας ΕΠΟ



Πολλ/σμός, αύξηση διαφοροποίηση

Η ΕΠΟ δρά στα κύτταρα που φέρουν τον EPOR.

Ερυθρά Σειρά

ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η ΕΠΟ δρά στα κύτταρα που φέρουν τον EPOR.

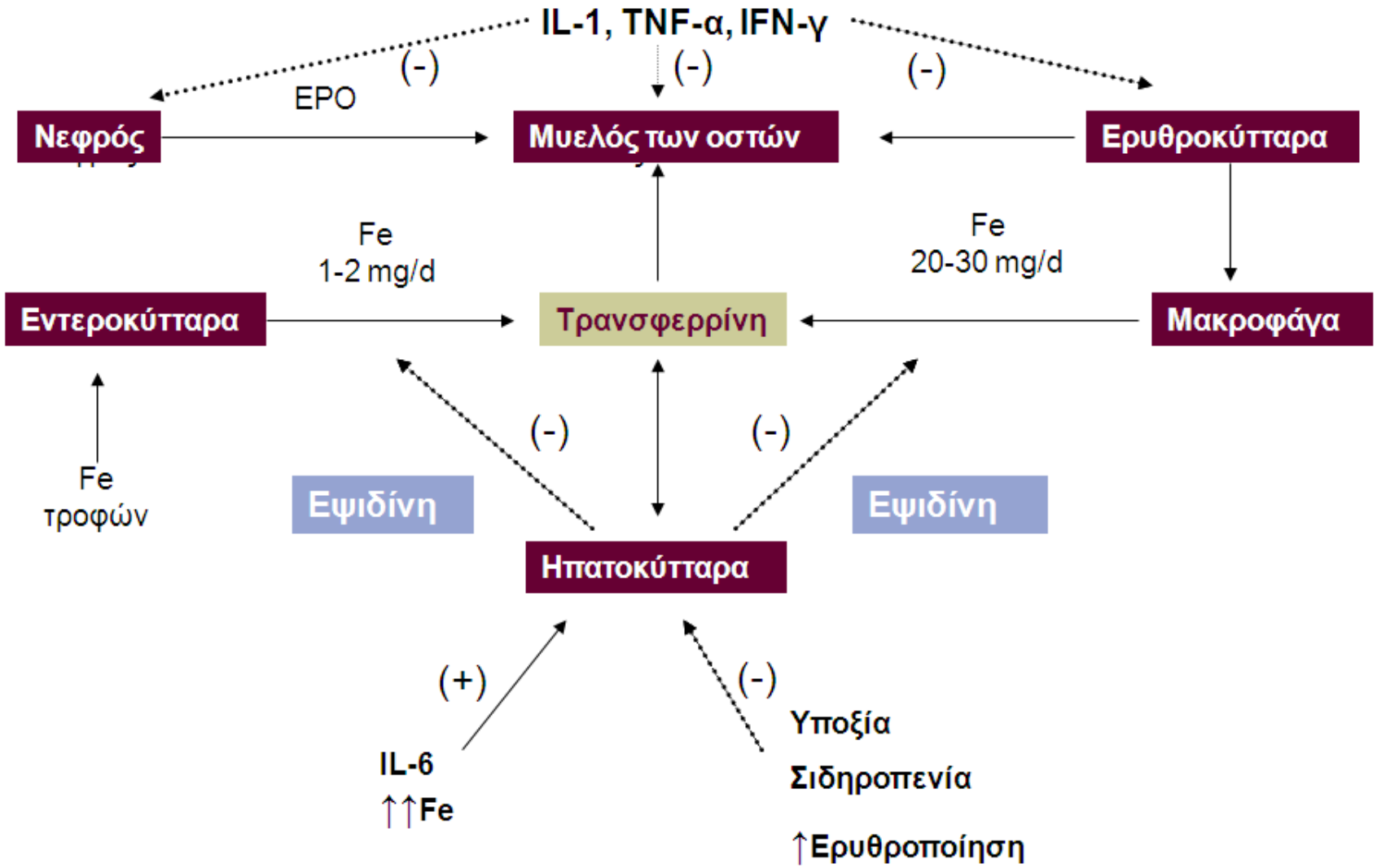
Ερυθρά Σειρά

Σωληναριακά,μεσαγγειακά, νευρώνες, μικρογλοία, αστροκυτ. SMC, καρδιομυοκυ. Μυοβλαστες παγκρεατικών νησιδίων, των μυελοειδών λεμφοκυττάρων,μεγακαρυοκυτ.προστατικών, Ca μαστού, AδενοCa μήτρας Ca ωοθηκών

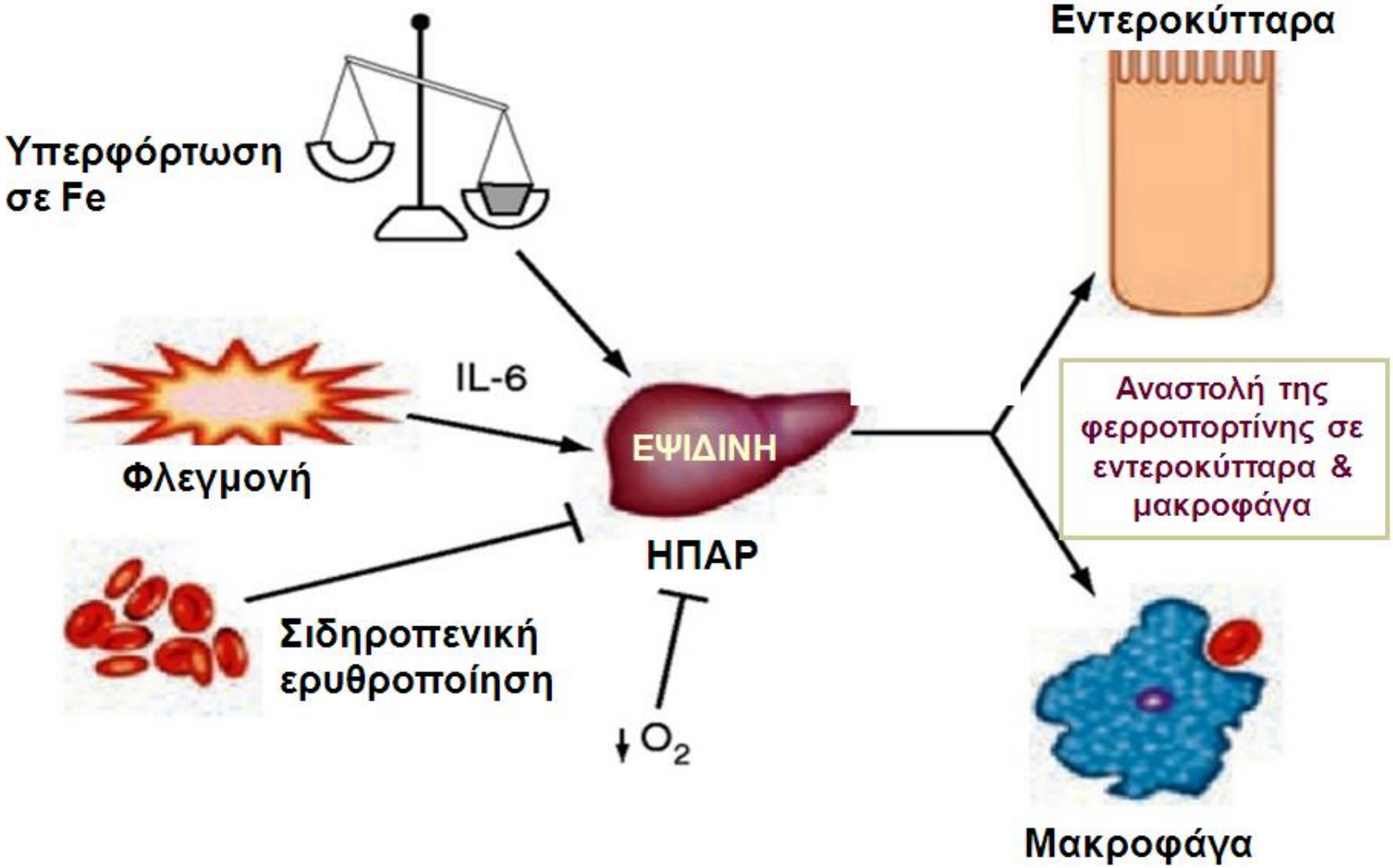
ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ

ΚΥΤΤΑΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ

Η παθοφυσιολογία της αναιμίας χρονίας νόσου



Η εψιδίνη


Εντεροκύτταρα
Υπερφόρτωση σε Fe
IL-6
Φλεγμονή
ΕΨΙΔΙΝΗ
Αναστολή της φερροπορτίνης σε εντεροκύτταρα & μακροφάγα
ΗΠΑΡ
Σιδηροπενική ερυθροποίηση
↓O2
Μακροφάγα

Αξιολόγηση του μεταβολισμού του σιδήρου Ι

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ Fe

- Κλινική εικόνα
- Ιστορικό
- Hb / HCT
- MCV / MCH

ΑΠΟΘΗΚΕΣ Fe

- Φερριτίνη ορού
- Κατανομή Fe στο μυελό

ΜΕΤΑΦΟΡΑ Fe

- Fe ορού
- TIBC
- Κορεσμός Tf
- sTfR
- Πρωτοπορφυρίνη
- Φερριτίνη RBCs
- Υπόχρωμα RBCs

Αξιολόγηση του μεταβολισμού του σιδήρου ΙΙ

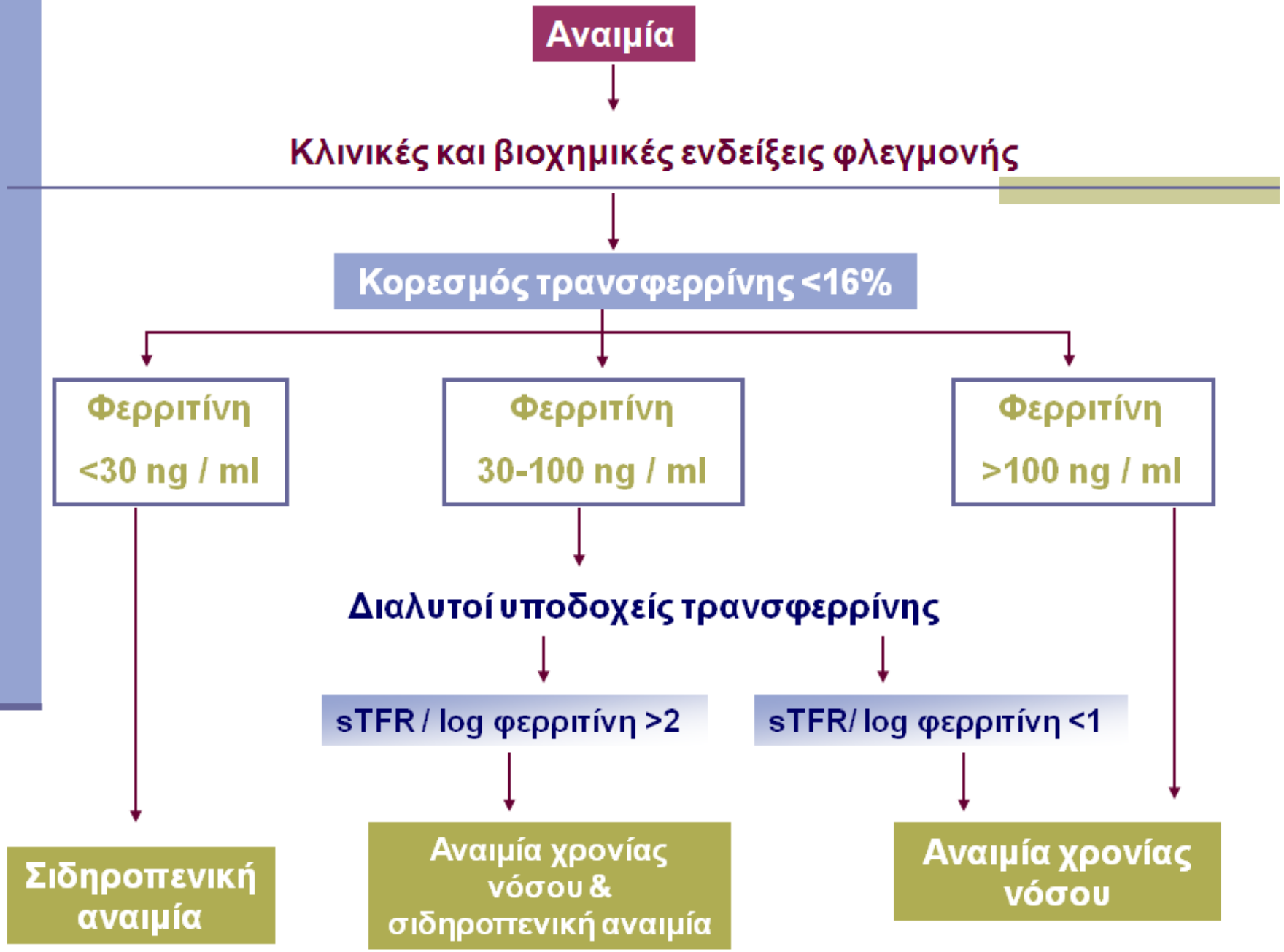
Σίδηρος ορού: Η μέτρηση του σιδήρου του ορού αφορά στον **τρισθενή σίδηρο**, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με την τρανσφερρίνη.

Ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα του ορού: Η τιμή της TIBC αποτελεί έμμεσο δείκτη των **επιπέδων τρανσφερρίνης του ορού.** Η σύνθεση της τρανσφερρίνης είναι αντιστρόφως ανάλογη των αποθηκών του σιδήρου.

Ποσοστό κορεσμού της τρανσφερρίνης: **[σίδηρος ορού / TIBC] x 100**, αποτελεί δείκτη της ποσότητας του **διαθέσιμου σιδήρου** στον οργανισμό για τη σύνθεση της Hb.

Διαφορική διάγνωση

Παράμετρος	Σιδηροπενία	Αναιμία χρονίας νόσου	Αναιμία χρονίας νόσου & Σιδηροπενία
Fe ορού	↓	Κ.φ. - ↓	↓
TIBC	↑	Κ.φ. - ↓	Κ.φ. - ↓
Κορεσμός Tf	↓	Κ.φ. - ↓	Κ.φ. - ↓
Φερριτίνη ορού	↓	Κ.φ. - ↑	Κ.φ. - ↓
sTfR	↑	Κ.φ.	↑
Σιδηραποθήκες μυελού	↓	Κ.φ.	↓
Σίδηρος νορμοβλαστών	↓	↓	↓


Αναιμία
Κλινικές και βιοχημικές ενδείξεις φλεγμονής
Κορεσμός τρανσφερρίνης <16%
Φερριτίνη <30 ng / ml
Φερριτίνη 30-100 ng / ml
Φερριτίνη >100 ng / ml
Διαλυτοί υποδοχείς τρανσφερρίνης
sTFR / log φερριτίνη >2
sTFR/ log φερριτίνη <1
Σιδηροπενική αναιμία
Αναιμία χρονίας νόσου & σιδηροπενική αναιμία
Αναιμία χρονίας νόσου

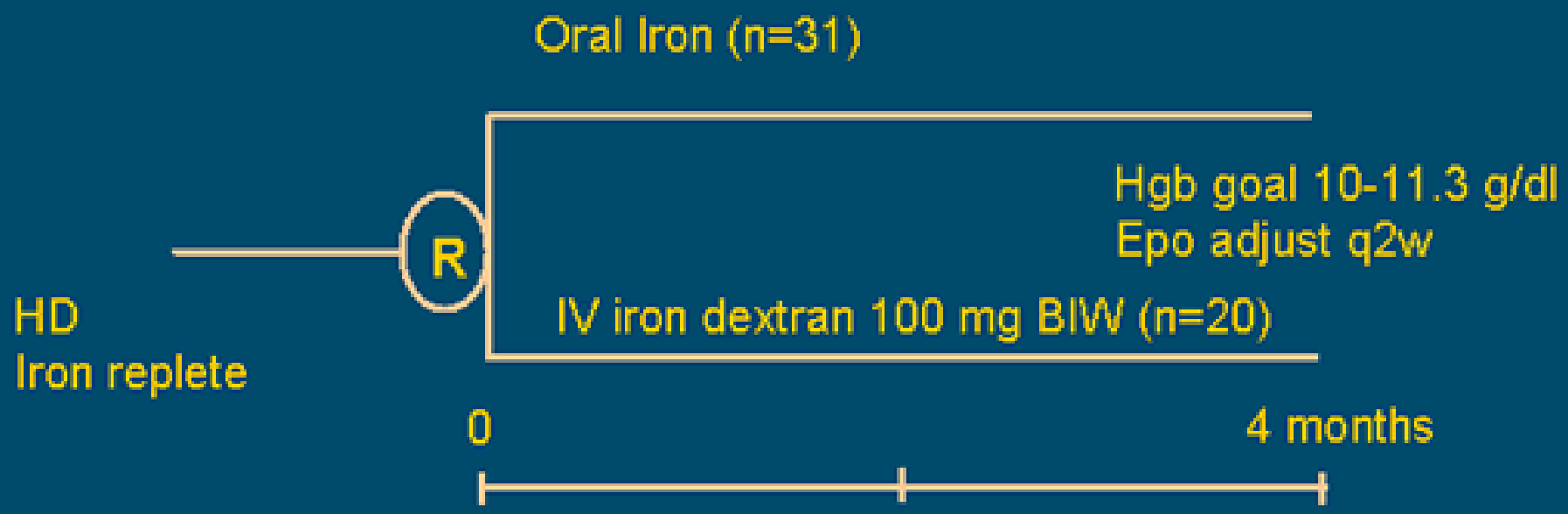
A Comparison of Two Maintenance Iron Protocols in Hemodialysis Patients

Initial Demographics :	P1 (N=225)	P2 (N=171)
Age, mean±SD (yrs)	64.4 ± 15.0	64.0 ± 15..8
M/F ratio	47.7/52.3	47.8/52.2
vintage (yrs)	7.19 ± 4.71 (max =24.0)	7.90 ± 5.63 (max 24.1)

- Reduction of iron to maintain Ferritin < 600 ng/mL resulted 6 months later in
  - Lower TSAT
  - Lower Hb by 0.5 g/dL
  - Increase in epoetin usage

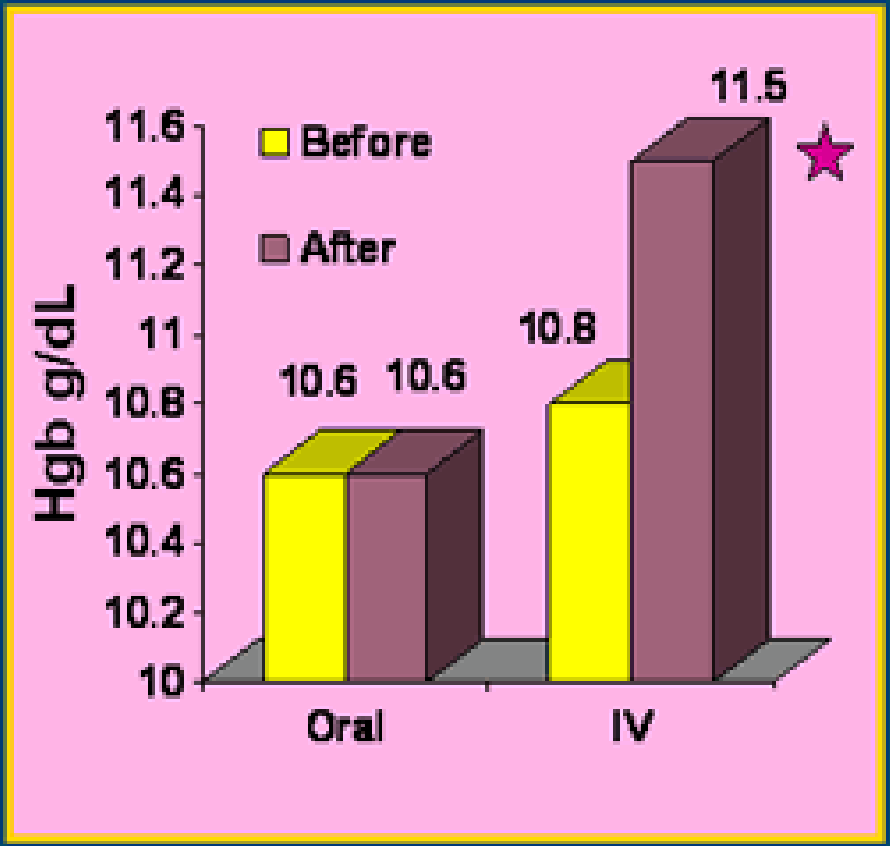
Besarab A, Soi V,Frinak S, Bhat S. Division of Nephrology, Henry Ford Hospital and Greenfield Health Services , HFHS, Detroit, MI, United States ASN 2007

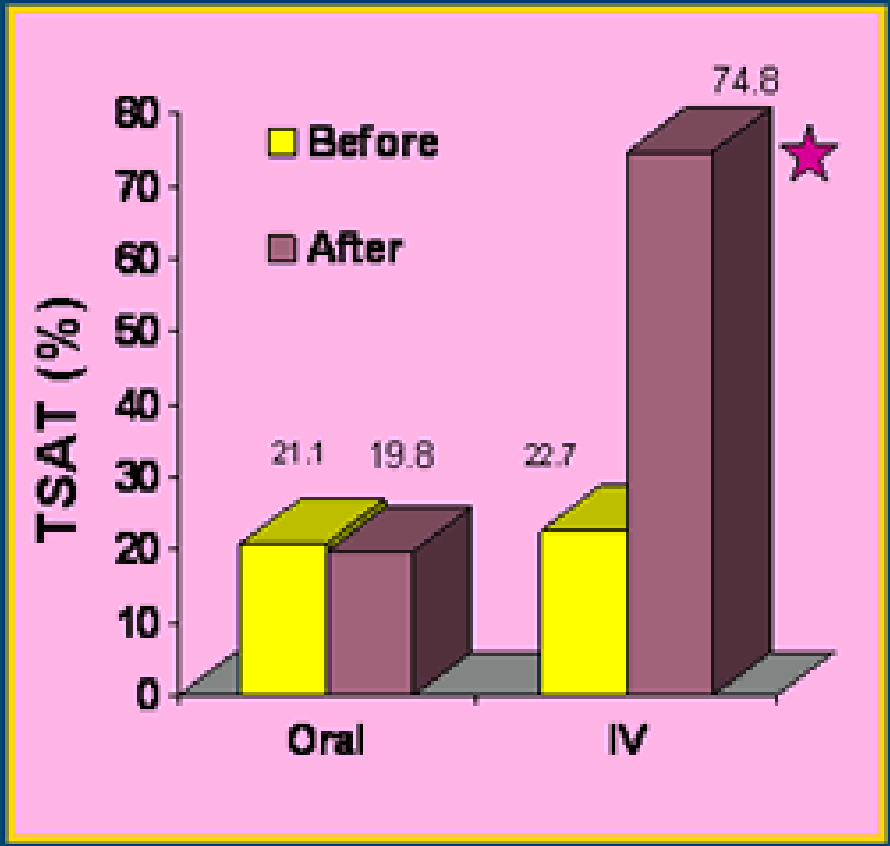
Open-label, Single Center, Parallel Group, Controlled Randomized Trial



Fishbane S et al AJKD 26: 41-46, 1995

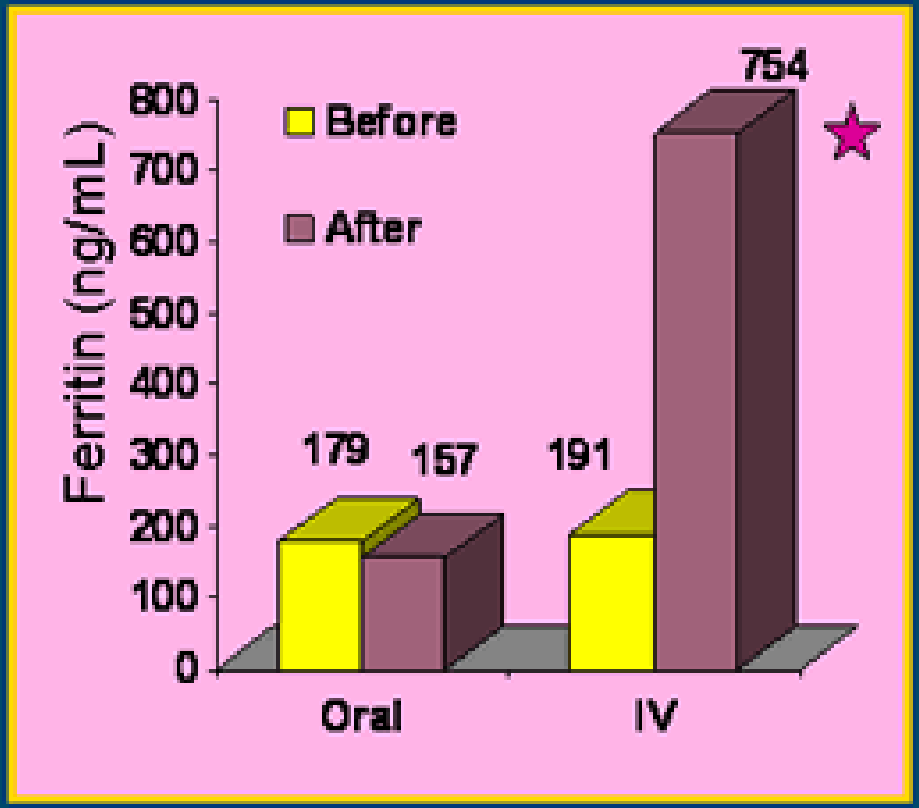
IV iron was more effective than oral iron in raising Hgb, increasing TSAT...

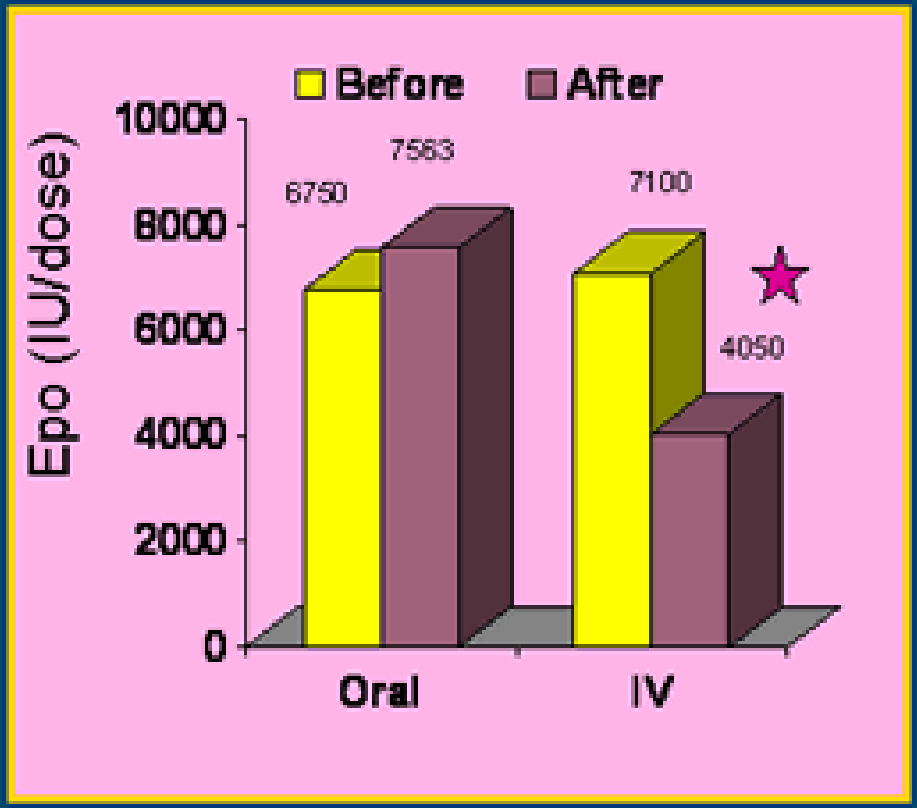




Fishbane S et al AJKD 26: 41-46, 1995

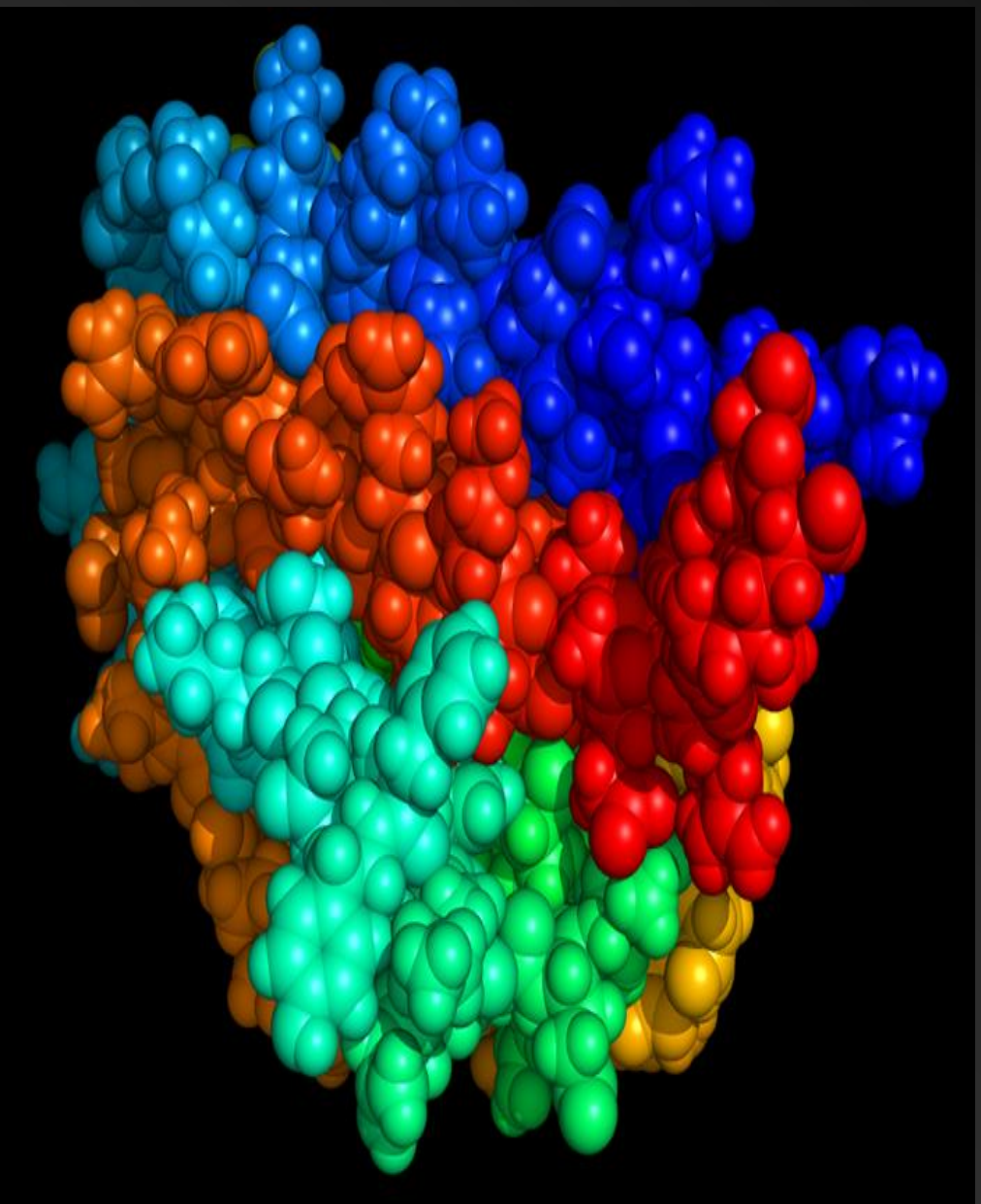
IV iron was more effective than oral iron in also raising ferritin and reducing Epoeitin





Fishbane S et al AJKD 26: 41-46, 1995

Πού παράγεται η Ερυθροποιητίνη;



Γλυκοπρωτεΐνη, κυτταροκινη Τάξης I

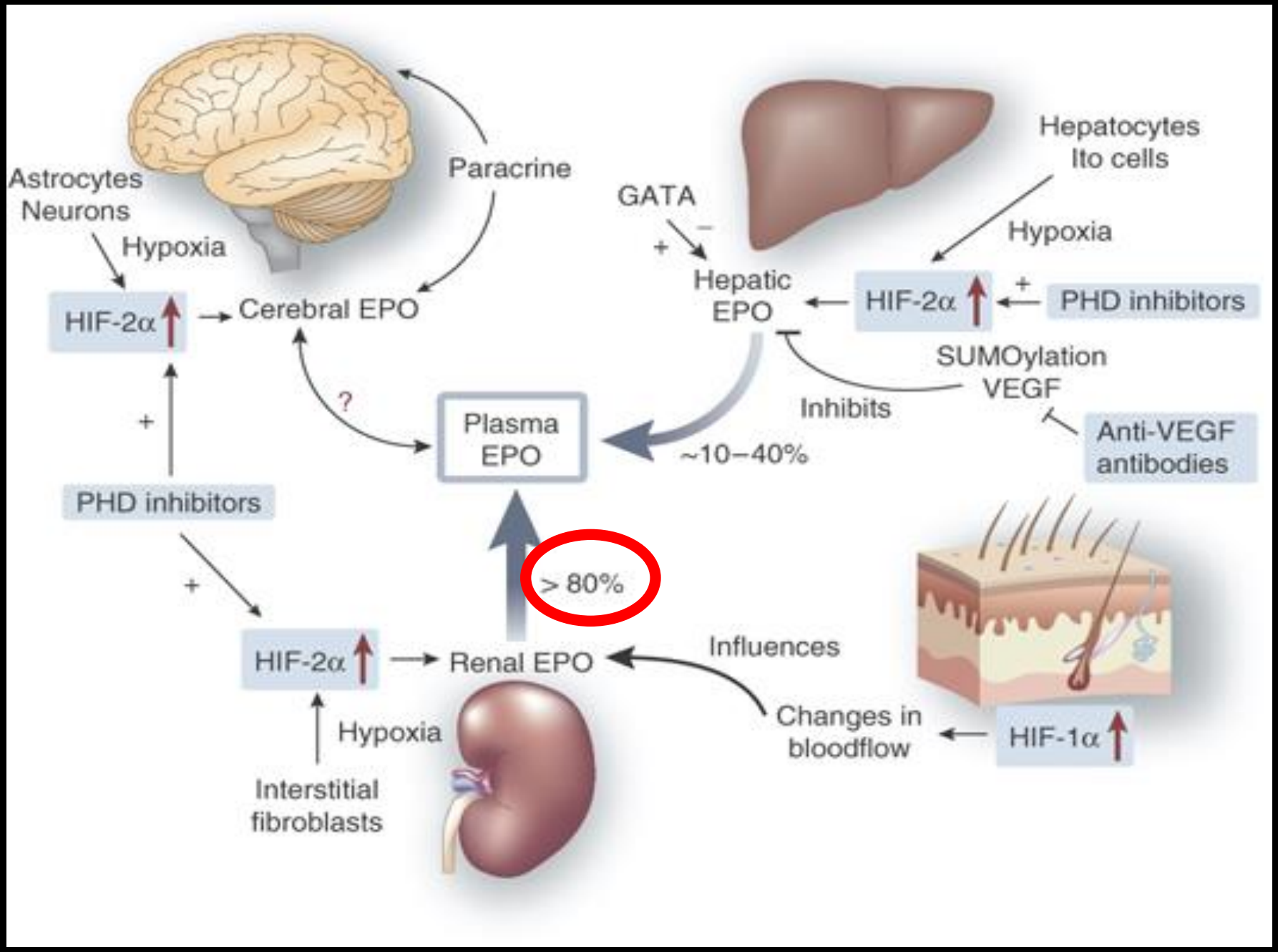
4 αντιπαράλληλες α-έλικες.

ΜΒ 30,4 kDa.

Εμβρυική ζωή: στα ηπατοκύτταρα.

Ενήλικη ζωή: στα ενδοθηλιακά περισωληναριακά νεφρικού φλοιού.

(fibroblast-like type-1 interstitial cells)



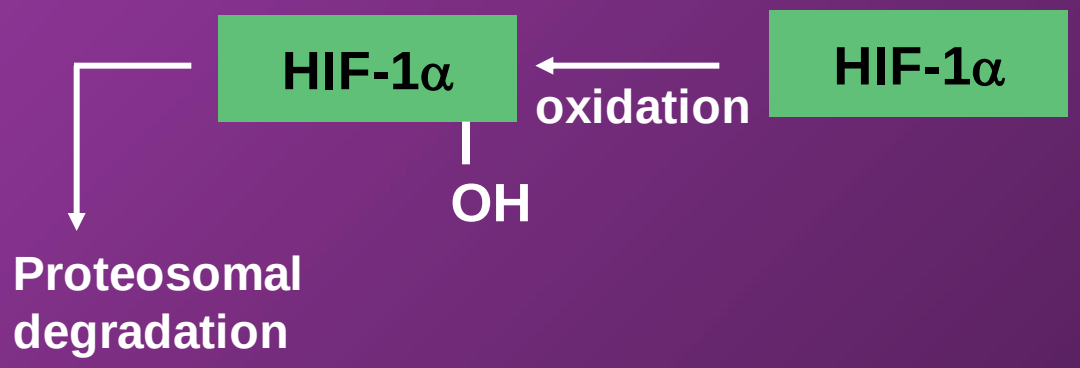
A Weidemann, R Johnson, Kidney International (2009) **75,** 682–688.

Ποιός είναι ο κύριος μηχανισμός διέγερσης της παραγωγής EPO;

Η έκφραση του γονιδίου της EPO διεγείρεται σε συνθήκες ιστικής υποξίας:

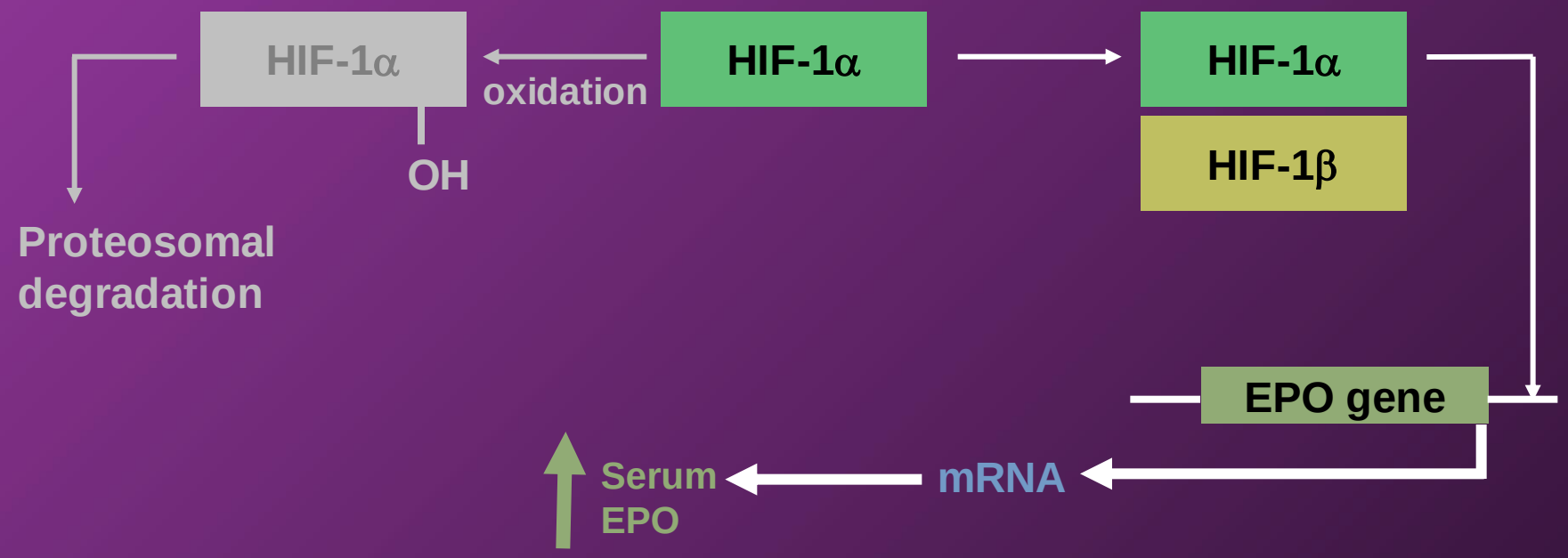
- ελαττώνεται η συγκέντρωση του O_2 που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση της Hb,
- ελαττώνεται η αρτηριακή πίεση του O_2 (μεγάλα υψόμετρα ή όταν αυξάνεται η χημική συγγένεια του αίματος προς το O_2).

Ρύθμιση της Παραγωγής ΕΠΟ
Normoxia

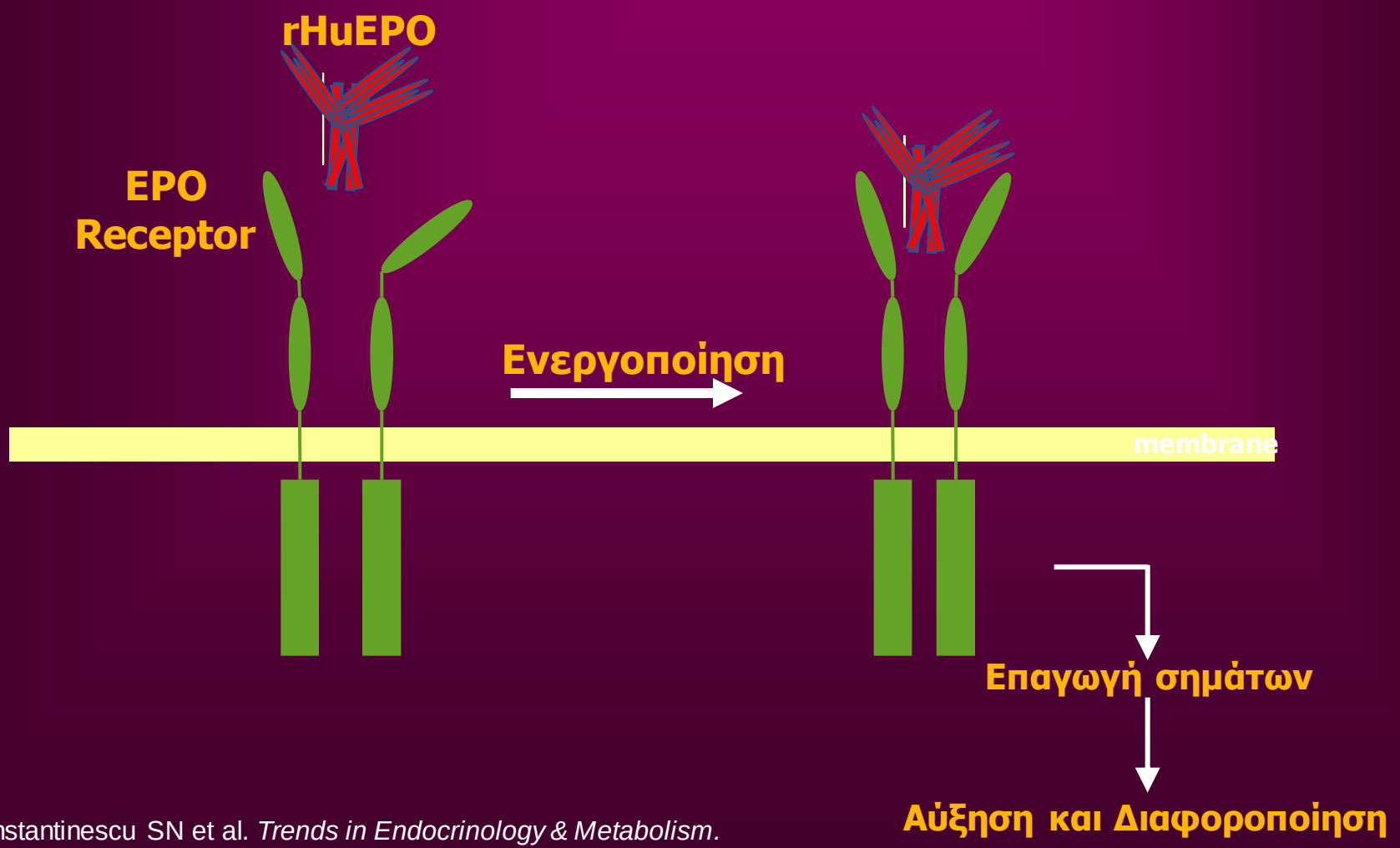


HIF=hypoxia-inducible factor

Ρύθμιση της Παραγωγής της ΕΠΟ
Υποξία

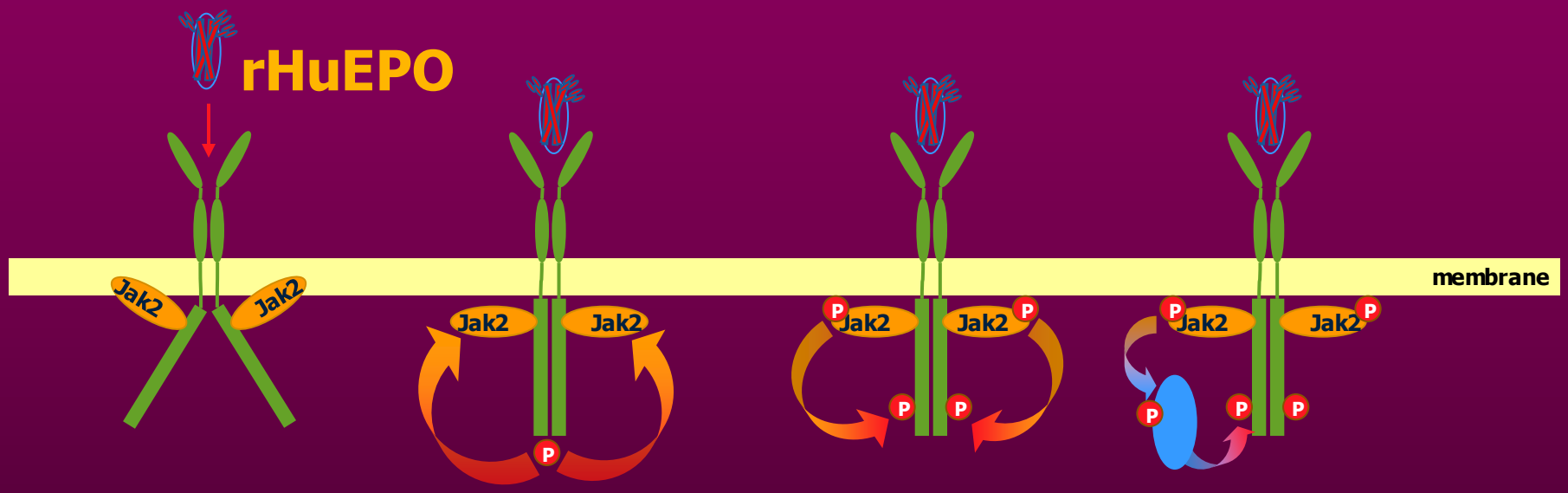


Η EPO διεγείρει την ερυθροποίηση ενργοποιώντας τους υποδοχείς της ΕΠΟ



Constantinescu SN et al. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 1999;10:18-23.

Η ενεργοποίηση των υποδοχέων έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη ενδοκυττάριων οδών σημάτων.



Conformational change

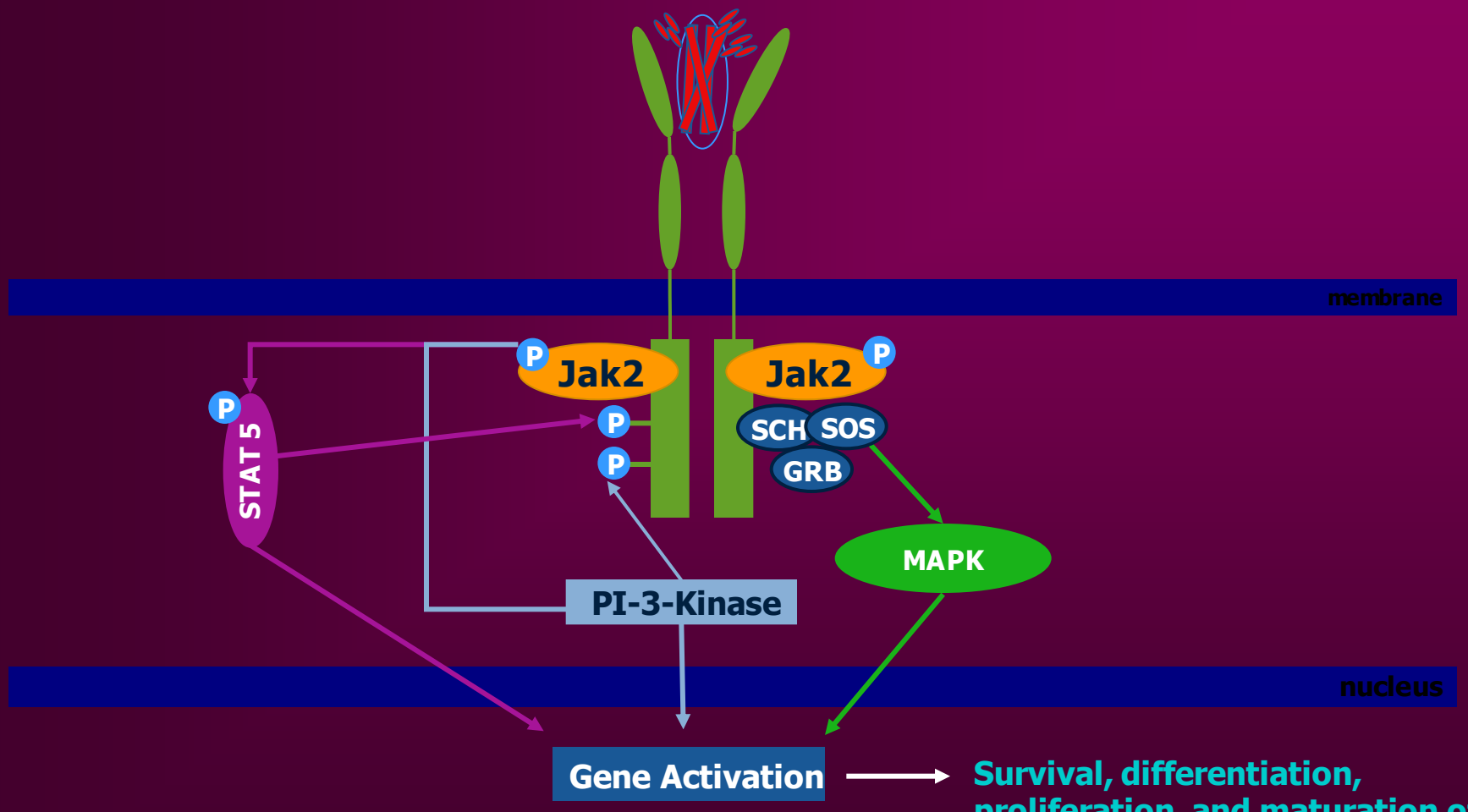
Phosphorylation of JAK2, tyrosine kinase

Phosphorylation of EPO receptor

Initiation of intracellular signalling pathways

Fisher JW. Proc Soc Exp Biol Med **216:**358–369, 1997.

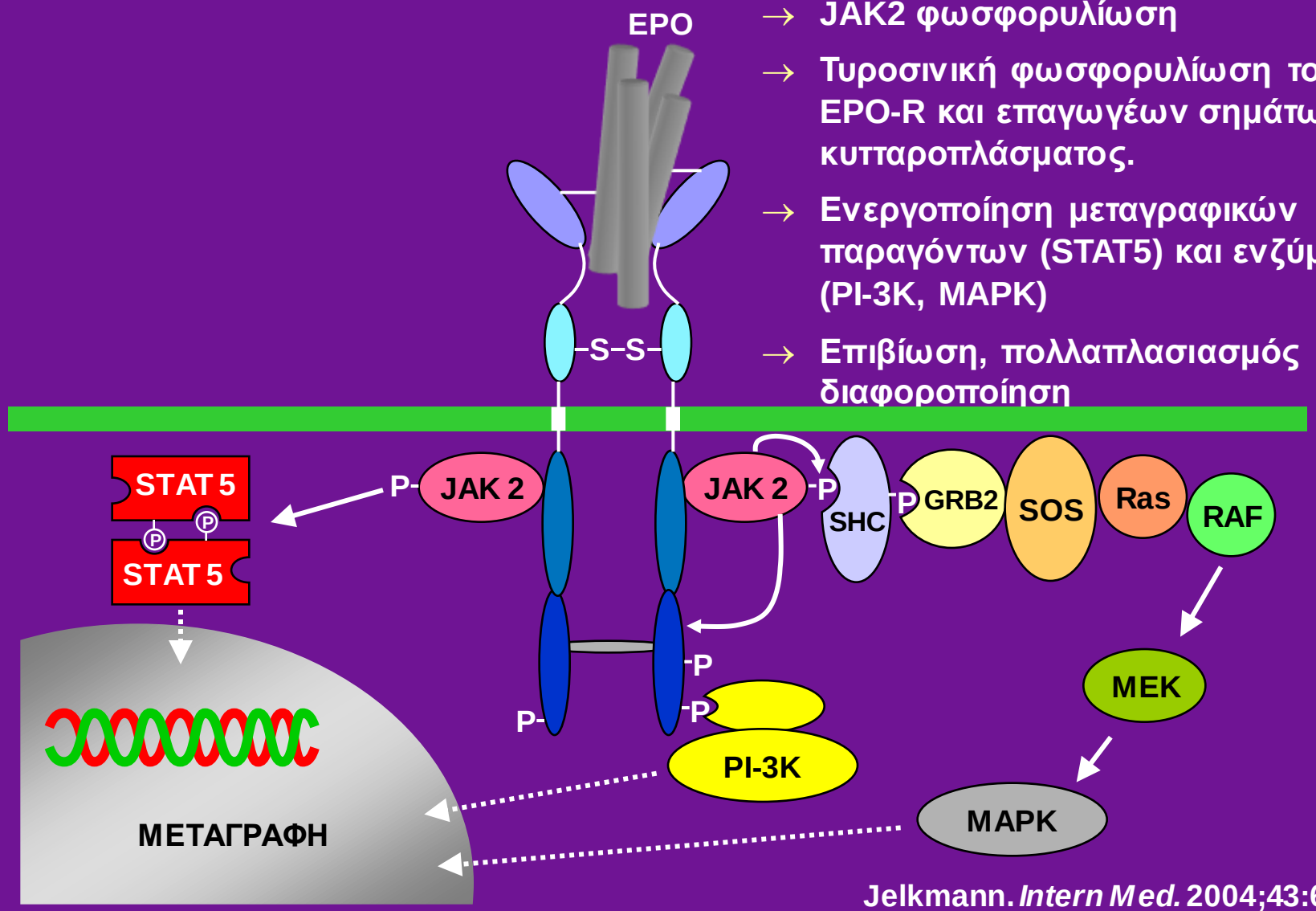
Η σύνδεση της ΕΠΟ με τον υποδοχέα της ενεργοποιεί τον υποδοχέα που ενεργοποιεί μια αλληλουχία σημάτων που επάγει την ερυθροποίηση



Survival, differentiation, proliferation, and maturation of RBC progenitors and precursors

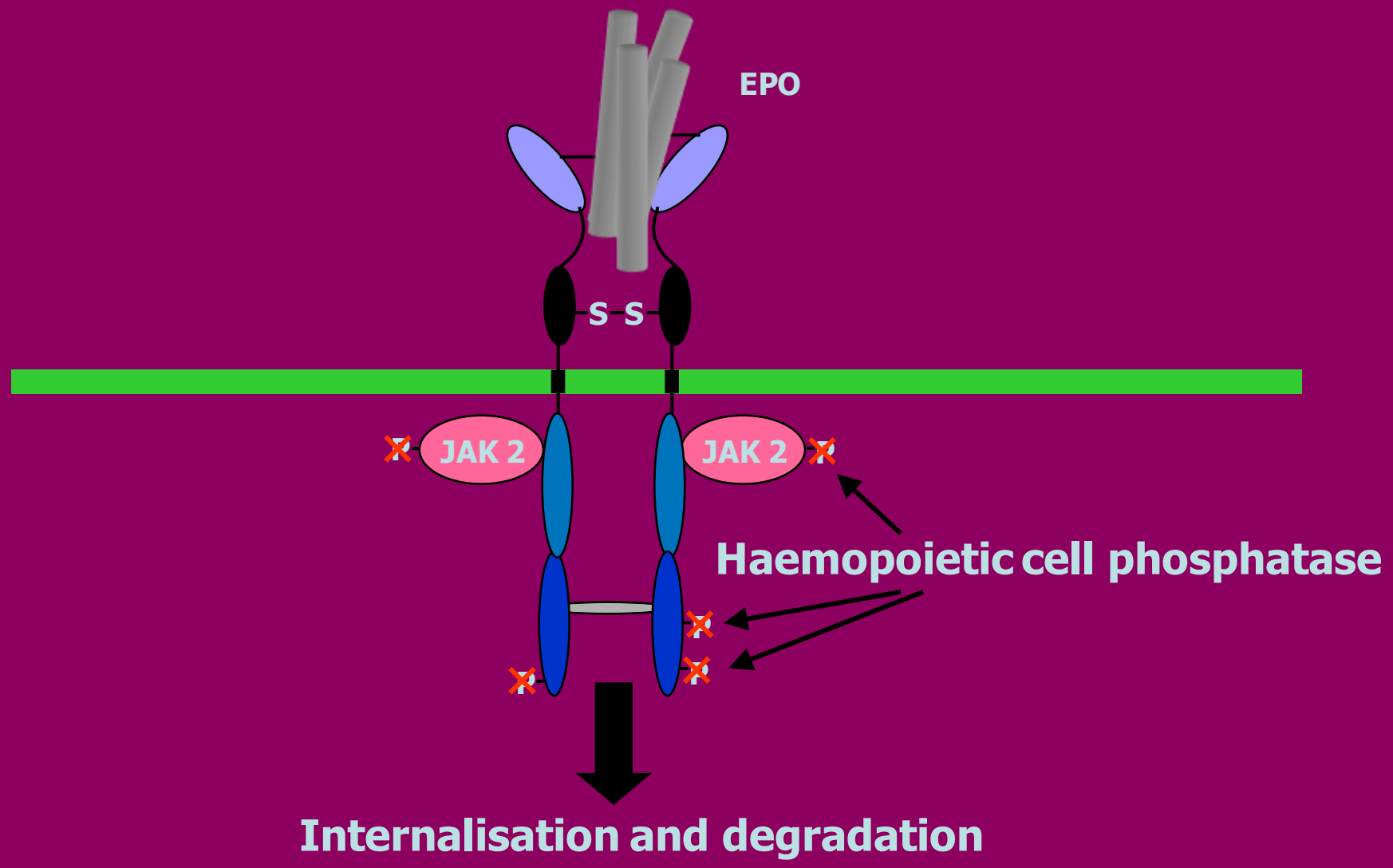
Διέγερση της Ερυθροποίησης

- → Ομοδιμερισμός
- → JAK2 φωσφορυλίωση
- → Τυροσινική φωσφορυλίωση του EPO-R και επαγωγέων σημάτων του κυτταροπλάσματος.
- → Ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων (STAT5) και ενζύμων (PI-3K, MAPK)
- → Επιβίωση, πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση

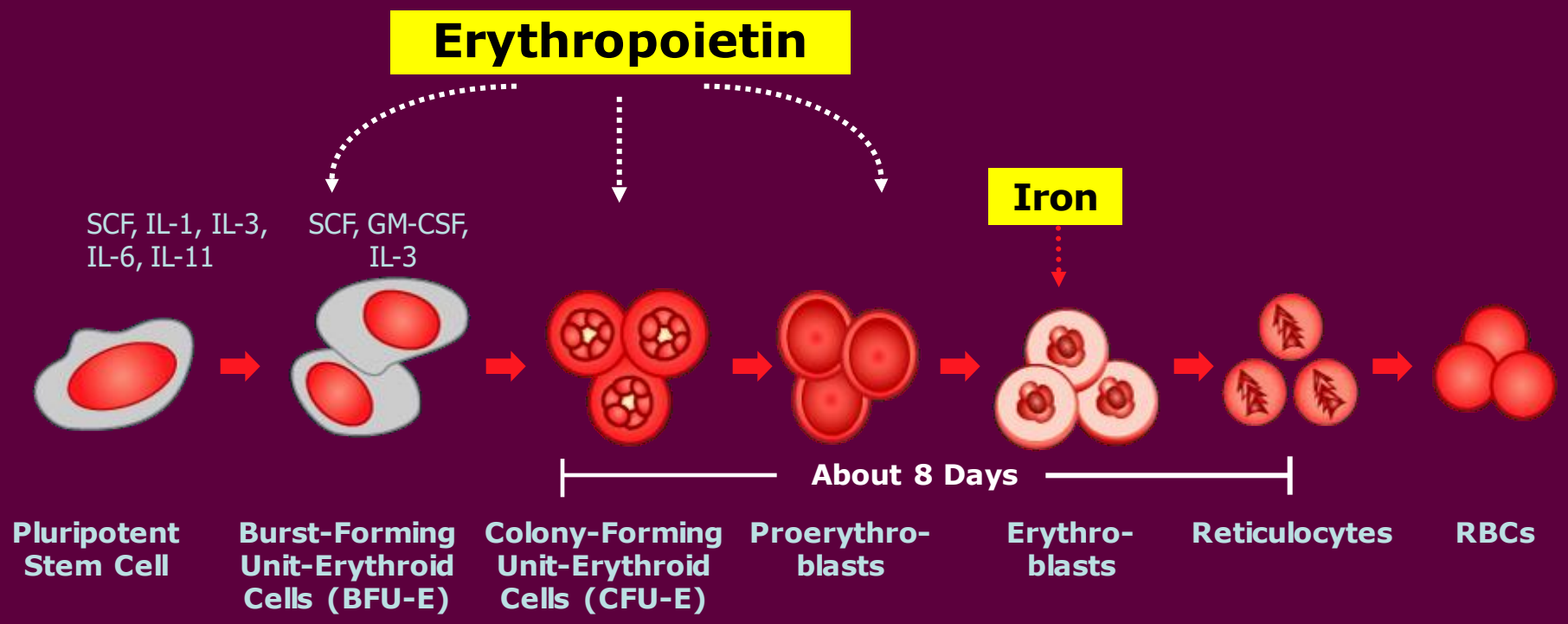


Jelkmann. *Intern Med.* 2004;43:649-659

Διακοπή της ενεργοποίησης του υποδοχέα της ΕΠΟ (φωσφατάση)



Πως δρά η ΕΠΟ σε κυτταρικό επίπεδο;



Papayannopoulou T, et al. In: Hoffman R, et al., ed. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 4th ed. 2005;267-288.

Η ΕΠΟ στην ερυθροποίηση.

- Η ΕΡΟ επάγει τον ***πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και ωρίμανση*** των ερυθροειδών προγονικών κυττάρων, BFU-E και CFU-E σε προ-ερυθροβλάστες και αυτά σε ερυθροβλάστες.
- Η ΕΡΟ ***αναστέλλει την απόπτωση*** ελαττώνοντας τον κυτταρικό θάνατο στα προγονικά ερυθροειδή κύτταρα του μυελού.

Η σταθερότητα σύνδεσης με τον EPO-R εξαρτάται από το βαθμό γλυκοζυλίωσης

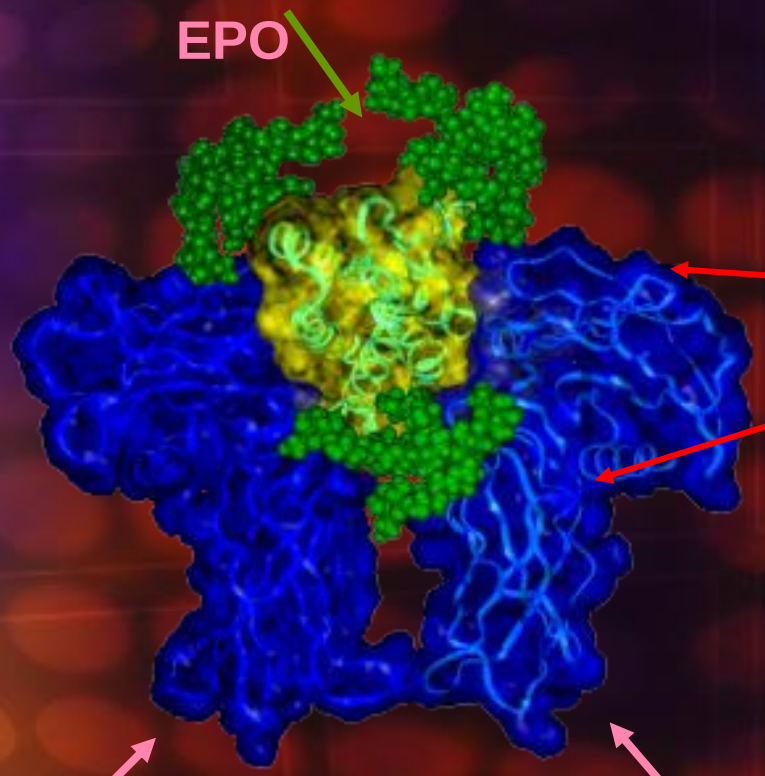
Association constants (k_{on}) and sialic acid content of EPO isoforms

Isoform	sialylation (%)	k_{on} (10^7) ($M^{-1}s^{1}$)
Nonglycosylated EPO	0	40.0 ± 4.0
Asialo-EPO	10	5.9 ± 0.1
Int. EPO Ref. Prep.	99.5	2.1 ± 0.3

Mean ± SD of 3-4 experiments
Surface plasmon resonance (BIAcore)

Darling et al. *Biochemistry.* 2002;41:14524-14531

Η γλυκοζυλίωση αναστέλλει τη σύνδεση της ΕΠΟ με τον υποδοχέα της.



Glycosylation reduces electrostatic affinity

Darling RJ, et al. *Biochemistry* 2002;41:14524-31
Elliott S, et al. *Nature Biotechnol* 2003;21:414-21

Δαρβεποετίνη άλφα
Μοριακή σχεδίαση

rHuEPO

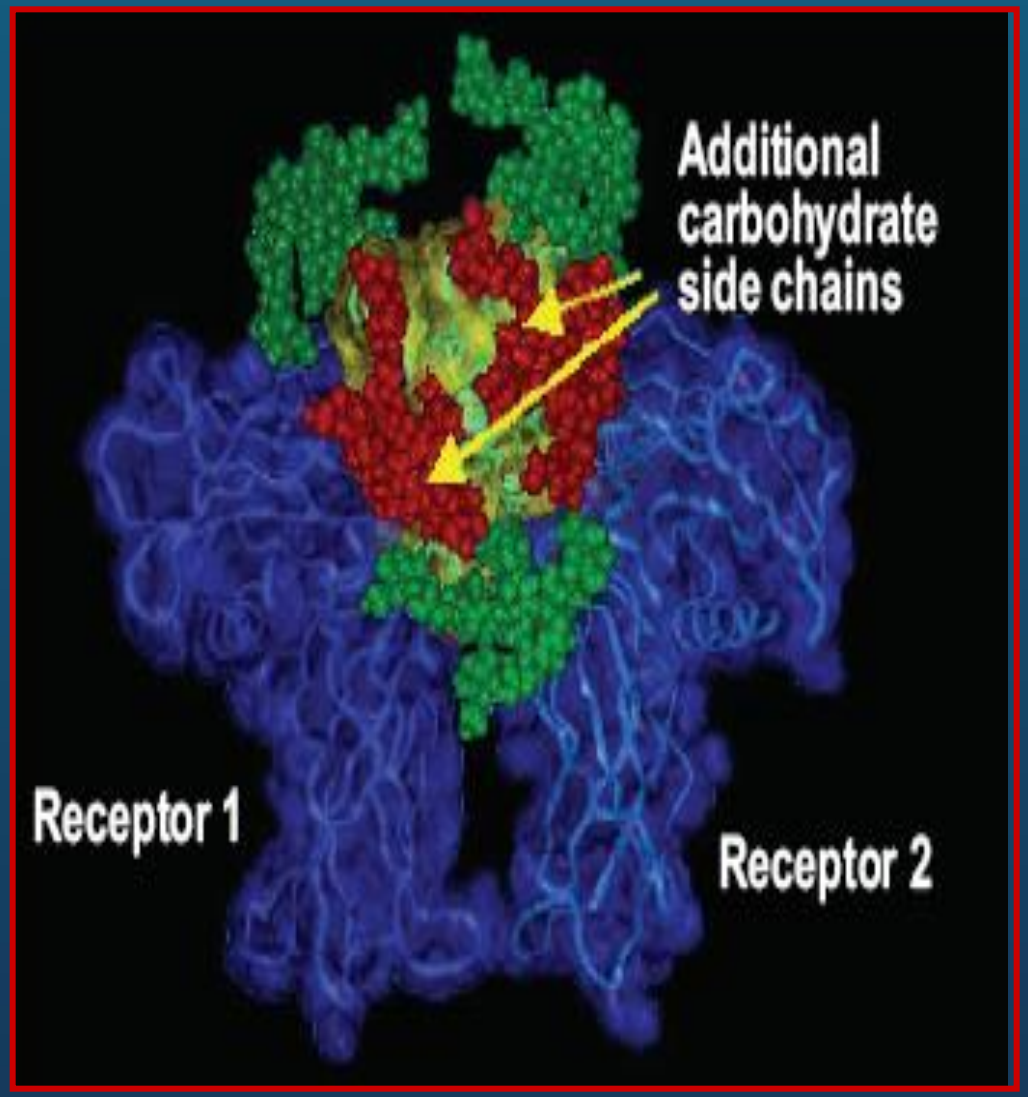
- Τρεις N-αλυσίδες υδατανθράκων
- Έως και 14 σιαλικά οξέα
- 30,400 daltons
- 40% υδατάνθρακες

Aranesp®

- Πέντε N- αλυσίδες υδατανθράκων
- Έως και 22 σιαλικά οξέα (οκτώ επιπλέον)
- 37,100 daltons
- 51% υδατάνθρακες

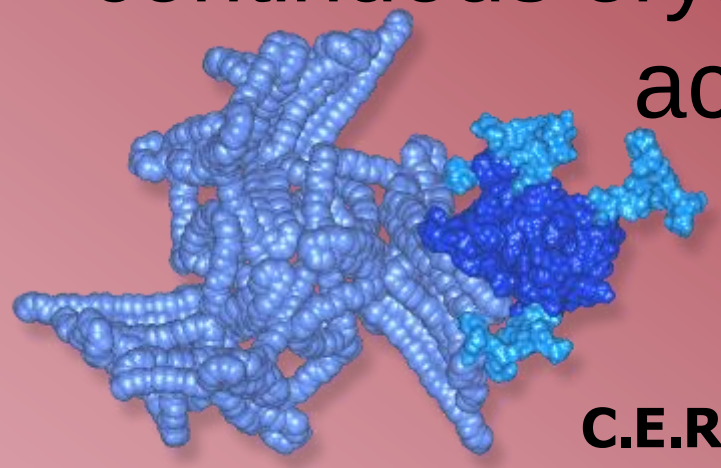
Macdougall I. *Semin Nephrol*. 2000;20:375-381

Ο σχεδιασμός της Darbepoetin



- 2 επιπλέον N-υδατανθρακικές αλυσίδες συγκριτικά με την rHuEPO
- Αυξημένος αριθμός σιαλικών οξέων
- Τριπλάσιος χρόνος ημιζωής από την rHuEPO

CERA
continuous erythropoietin receptor activator



C.E.R.A.

MB: ~60 000 Da

EPO

- CERA, συνεχής ενεργοποιητής του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης
  - Εχει συντεθεί χημικά
  - Ενσωμάτωση methoxy-polyethylene glycol πολυμερικής αλυσίδας στο μόριο της ΕΠΟ.
  - Ημ Χρόνος απομάκρυνσης 130 ώρες

Macdougall et al. ASN 2003

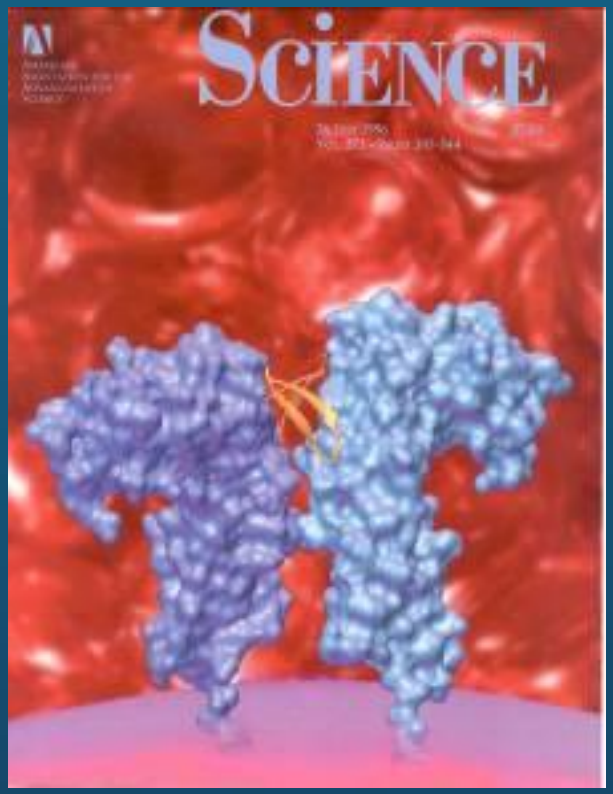
CERA Μακρύτερος Χρόνος Ημ. Ζωής

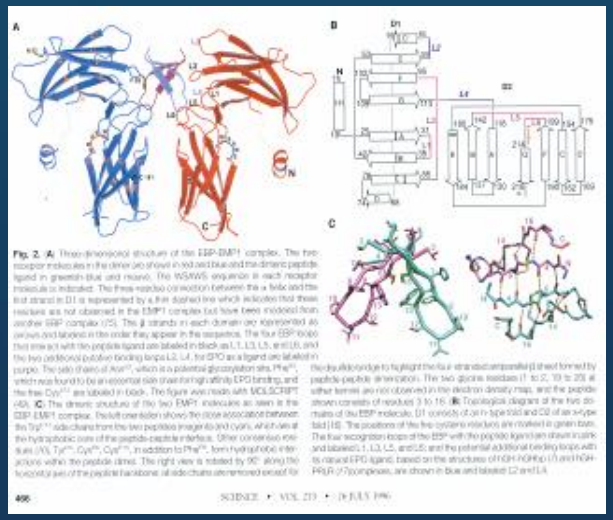
Περίπου 130 ώρες μετά IV και SC χορήγηση

Agent	Population	Mean (± SE) half-life (h)	
		IV	SC
Epoetin alfa	Healthy volunteers[1]	6.8 ± 0.6	19.4 ± 2.5
Epoetin beta	Healthy volunteers[1]	8.8 ± 0.5	24.2 ± 2.6
Darbepoetin alfa	Peritoneal dialysis patients[2]	25.3 ± 2.2	48.8 ± 5.2
CERA	Peritoneal dialysis patients[4,5]	134 ± 19	139 ± 20

†Mean (SD)

1. Halstenson et al. *Clin Pharmacol Ther*. 1991:50:702-712
2. Macdougall et al. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:2392-2395
3. Padhi et al. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45:503-510
4. Macdougall et al. *Am J Kidney Dis*. 2006;47:A41
5. Macdougall et al. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16:759A





ΕΠΟ ΜΙΜΗΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ

Μικρά κυκλικά δισουλφιδικά πεπτίδια (20 αμινοξέα), όμοια δράση, σύνδεση και ενεργοποίηση EPOR

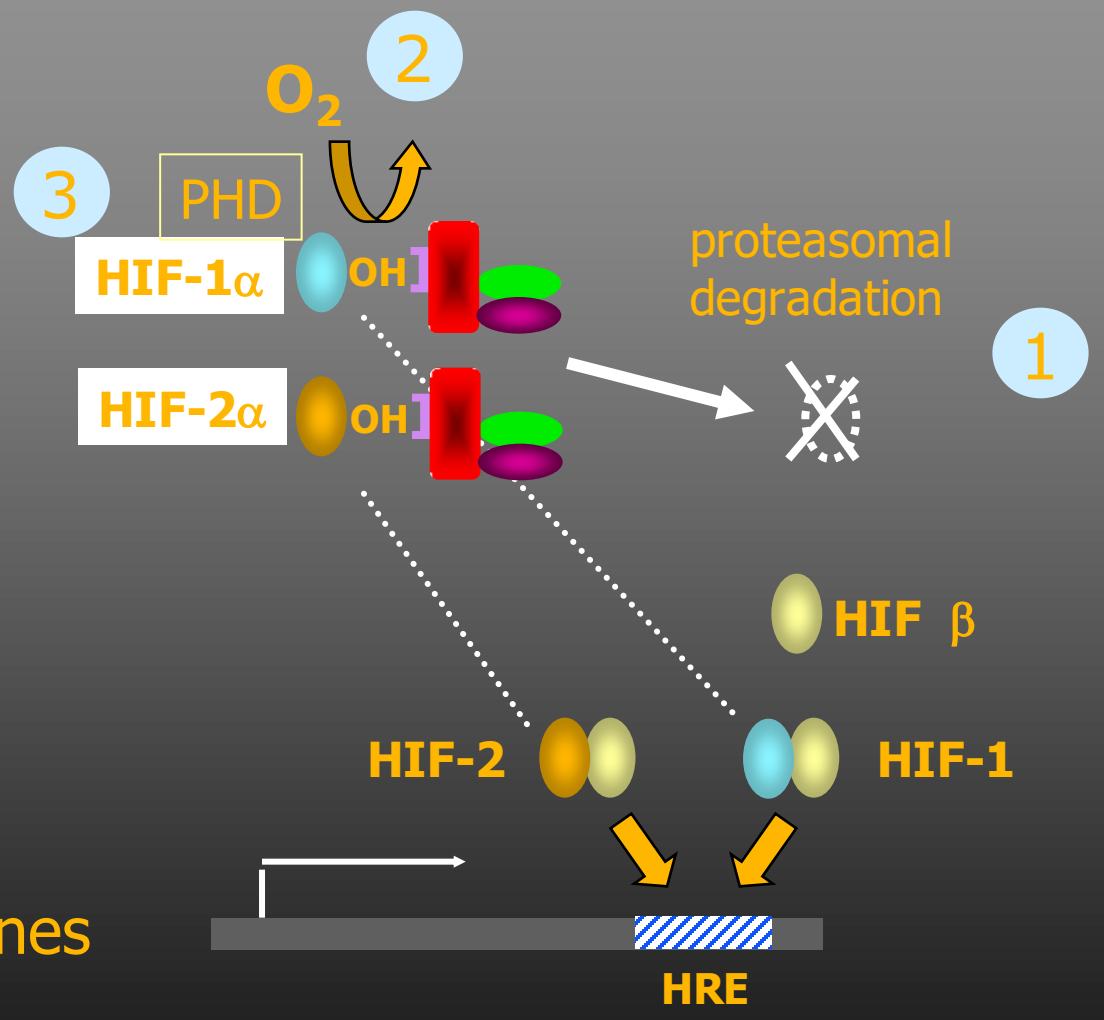
Hematide™ μελέτες Phase III, συνθετικός αγωνιστής της ΕΠΟ.

Πλεονεκτήματα

1. **μεγαλύτερη μοριακή σταθερότητα σε θερμοκρασία δωματίου**
2. **μικρότερη ανοσογονικότητα**
3. **απλούστερη και οικονομικότερη παραγωγική διαδικασία.**

Σταθεροποιητές του HIF

(Αναστολείς της Prolyl hydroxylase, ή της Φωσφατάσης HCP)



HIF target genes
- EPO, etc.

Macdougall & Eckardt, Lancet, 2006

❖ Ποιός είναι ο θεωρούμενος ως επαρκής στόχος Hb, ο οποίος εξασφαλίζει σταθερή ποιότητα ζωής στους ασθενείς που λαμβάνουν EPO;

Ποιότητα ζωής στις μελέτες διόρθωσης της αναιμίας

- Έχει υποεκτιμηθεί ως τελικό σημείο έκβασης

Επίπεδα Hb ≥ 13 g/dL:

- Βελτίωση ορισμένων παραμέτρων, ιδιαίτερα ως προς τη φυσική κατάσταση/ κόπωση και την κοινωνική απόδοση
- Χωρίς στατιστική σημαντικότητα

Επίπεδα Hb ≥ 11 g/dL:

- Σημαντική βελτίωση σε πλήθος παραμέτρων

❖ Ποιός είναι ο θεωρούμενος ως επαρκής στόχος Hb, ο οποίος εξασφαλίζει σταθερή ποιότητα ζωής στους ασθενείς που λαμβάνουν EPO;

Περιορισμοί

- Έλλειψη μεγαλύτερων τυχαιοποιημένων μελετών
- Ζητήματα ασφαλείας από τη μεγάλη αύξηση της Hb

Προτιμάται το πιο ασφαλές όριο ***Hb 11-12 g/dL***,

- Επαρκής βελτίωση της ποιότητας ζωής
- Μικρότερος κίνδυνος συνοδής θνητότητας και δυσμενών εκβάσεων

❖ Ποιο από τα παρακάτω ισχύει, σύμφωνα με τις πρόσφατες μεγάλες τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες;

- Σημαντική αύξηση των πρωτοπαθών τελικών εκβάσεων στην ομάδα υψηλής Hb

Μελέτη	Πρωτοπαθές τελικό σημείο	Στατιστική σημαντικότητα	Δόση EPO (U/εβδ.)
NHS, 1998	Θάνατος + Μη θανατηφόρο ΟΕΜ	p = 0,01	3πλάσια αύξηση στην ομάδα υψηλής Hb
CHOIR, 2006	Θάνατος + Νοσηλεία για ΣΚΑ + μη θανατηφόρο ΟΕΜ + ΑΕΕ	p = 0,03	6.057 (11.098) 10.694 (12.884)
CREATE, 2006	Αιφνίδιος θάνατος + ΟΕΜ + ΣΚΑ + ΑΕΕ + ΠΙΕ + Νοσηλεία για στηθάγχη ή αρρυθμία + Περιφερική αγγειακή νόσος με ακρωτηριασμό ή νέκρωση	p = 0,20	1.000-3.000 3.000-8.000

❖ Ποιο από τα παρακάτω ισχύει, σύμφωνα με τις πρόσφατες μεγάλες τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες;

Αναθεώρηση οδηγιών KDOQI (2007):

- Hb στόχος: 11-12 g/dL
- Αποφυγή αύξησης Hb > 13,0 g/dL

Οδηγίες ασφαλείας FDA (2007):

- Κίνδυνος αυξημένης θνητότητας, σοβαρών καρδιαγγειακών και θρομβοεμβολικών επιπλοκών και εξέλιξης νεοπλασμάτων
- Σε ασθενείς με ΧΝΝ: Εξατομίκευση δόσης με στόχο τη διατήρηση ***Hb 10-12 g/dL***

❖ Ποιες είναι οι δράσεις της EPO στο νευρικό σύστημα;

- Εμβρυική ανάπτυξη εγκεφάλου- νευρικού σωλήνα
- Μείωση μεγέθους του εγκεφαλικού εμφράκτου και ατροφίας
- Βελτίωση λειτουργικότητας, διατήρηση- αύξηση μυελίνης σε τραυματικές βλάβες εγκεφάλου και ΝΜ
- Πρόληψη εκφύλισης σε περιφερικές αισθητικές- κινητικές νευροπάθειες
- Μείωση νευροπαθητικού πόνου σε διαβητική νευροπάθεια
- Σχιζοφρένεια: Βελτίωση γνωσιακών λειτουργιών, μνήμης, ψυχισμού, λεκτικής έκφρασης, διάθεσης

❖ Ποιες είναι οι επιδράσεις της EPO στο καρδιαγγειακό σύστημα;

Δράσεις EPO στο αγγειακό ενδοθήλιο

- Διέγερση παραγωγής NOS και VEGF
- Κινητοποίηση ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων

- Αναστολή ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και απόπτωσης
- Αύξηση αγγειογένεσης και νεοαγγείωσης
  - εμβρυική ανάπτυξη, κυκλική αγγειογένεση της μήτρας, επούλωση τραυμάτων
  - αγγειακή ισχαιμία, νεοπλάσματα, αμφιβληστροειδοπάθεια

❖ Ποιες είναι οι επιδράσεις της EPO στο καρδιαγγειακό σύστημα;

Καρδιακές δράσεις EPO

- Αναστολή απόπτωσης μυοκαρδιακών κυττάρων
- Μείωση μυοκαρδιακής ίνωσης και μεγέθους του εμφράκτου
- Αύξηση νεοαγγείωσης στο ισχαιμικό μυοκάρδιο

Στην Καρδιακή ανεπάρκεια:

- Αύξηση LVMI και LVEF
- Βελτίωση τάξης λειτουργικότητας κατά NYHA
- Μείωση ανάγκης χορήγησης διουρητικών

❖ Η νεφροπροστατευτική δράση της EPO ασκείται:

Νεφρικά σωληνάρια

Χορήγηση EPO σε πειραματικά πρότυπα ισχαιμικής/ τοξικής οξείας σωληναριακής βλάβης και ουρητηρικής απόφραξης

- Έκφραση αντιαποπτωτικών και αναστολή προαποπτωτικών γονιδίων
- Αναστολή δραστικότητας κασπασών
- Κινητοποίηση και διαφοροποίηση στρωματικών κυττάρων μυελού
- Διέγερση πολλαπλασιασμού σωληναριακών κυττάρων
- Μείωση σωληναροδιάμεσης ίνωσης και ατροφίας

❖ Η νεφροπροστατευτική δράση της EPO ασκείται:

Νεφροπροστασία στη ΧΝΝ

- ✓ *Πειραματικά πρότυπα υφολικής (5/6) νεφρεκτομής*
  - Περιορισμός βλάβης στο σπειραματικό ενδοθήλιο
  - Μείωση σπειραματοσκλήρυνσης
  - Διατήρηση αρχιτεκτονικής διάμεσου ιστού
- ✓ *Πειραματικά πρότυπα σπειραματονεφρίτιδας*
  - Μείωση εξοίδησης και απόπτωσης ποδοκυττάρων
  - Διατήρηση ποδοειδών προσεκβολών
  - Μείωση λευκωματουρίας

❖ Υπάρχει διαφορά στην επιβίωση μεταξύ ασθενών των ομάδων υψηλού Ht και υψηλής δόσης EPO έναντι υψηλού Ht - χαμηλής δόσης EPO;

Αυξημένη θνητότητα:

- Στους ασθενείς που λαμβάνουν τις υψηλότερες δόσεις EPO, για κάθε επίπεδο Ht
- Στους ασθενείς που δεν επιτυγχάνουν το στόχο Ht, παρά τη λήψη μεγάλων δόσεων EPO

- Συννοσηρότητες
- «Τοξικές» δράσεις EPO
- Μειωμένη ανταπόκριση στην EPO

❖ Ποιοι από τους παρακάτω παράγοντες ευθύνονται για τη δημιουργία θρόμβωσης σε ασθενείς σε ΧΑ που λαμβάνουν EPO;

Οι υψηλές δόσεις EPO συσχετίζονται με αυξημένα ποσοστά θρομβώσεων

- ✓ Προπηκτικές δράσεις
  - Αύξηση αριθμού και συγκολλητικότητας αιμοπεταλίων
  - Διέγερση παραγόντων πήξης (vWF, σελεκτίνη E/P, PAI-1)
  - Αύξηση θρομβομοντουλίνης, θρομβοποιητίνης
- ✓ Αύξηση Ht (αύξηση γλοιότητας, αιμοσυμπύκνωση, shear stress)
- ✓ Αγγειακές δράσεις (αύξηση ADMA, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, υπέρταση)
- ✓ Έλλειψη σιδήρου (αντιδραστική θρομβοκυττάρωση)

❖ Ποιά από τα ακόλουθες καταστάσεις δεν έχει συσχετιστεί με τα αυξημένα επίπεδα EPO;

Αυξημένα επίπεδα EPO

↑ Ca^{2+} αγγειακών ΛΜΙ
↑ Ενεργοποίηση ΣΡΑ
↑ Ενδοθηλίνη-1
↑ Θρομβοξάνη
↓ Προστακυκλίνη
↑ ADMA
↓ NO

ΥΠΕΡΤΑΣΗ

- Πολλ/σμός αγγειακών ΛΜΙ
- Πολλ/σμός ενδοθηλιακών κυττάρων
- Αγγειογένεση

- Στένωση αγγ. προσπέλασης
- Παραγωγική αμφιβλ/πάθεια
- Αγγειακή αναδιαμόρφωση
- Αύξηση όγκων

↑ Παραγωγή αιμοπεταλίων
↑ Δραστικότητα αιμοπεταλίων
↑ Ε- σελεκτίνη
↑ Ρ- σελεκτίνη
↑ vWF
↑ PAI-1

ΘΡΟΜΒΩΣΗ