

ARTICOLI ORIGINALI

Alterazioni eritrocitarie e loro possibile ruolo nelle complicanze cardiovascolari dell'uremia



Mario Bonomini¹, Arduino Arduini⁴, Vittorio Sirolli¹, Natalia Di Pietro^{1,3}, Assunta Pandolfi^{2,3}

(1) Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti – Pescara

(2) Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti – Pescara

(3) Centro Scienze dell'Invecchiamento e Medicina Traslazionale - CeSI-MeT, Fondazione-Università "G. d'Annunzio", Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti – Pescara

(4) Dipartimento Ricerca e Sviluppo, CoreQuest, Manno, Svizzera

Corrispondenza a: Prof. Mario Bonomini; Istituto di Clinica Nefrologica, Ospedale Clinicizzato "SS. Annunziata", Via dei Vestini, 66013 Chieti; Tel: +39 0871 540120; Fax: +39 0871 574736; E-mail: m.bonomini@nephro.unich.it

Abstract

La patologia cardiovascolare (CV) rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità nei pazienti affetti da malattia renale cronica (MRC). L'elevata incidenza di eventi CV è legata alla presenza, oltre ai fattori di rischio CV tradizionali, a fattori di rischio non tradizionali associati alla insufficienza renale, come l'anemia. Il ruolo dei globuli rossi (GR) nel paziente uremico è stato in genere considerato solo in relazione al loro deficit quantitativo. L'eritrocita tuttavia nell'ambiente uremico acquisisce numerose alterazioni che possono comprometterne le proprietà. Nella presente review vengono riportate le principali alterazioni eritrocitarie qualitative ed il loro potenziale ruolo fisiopatologico nel rischio CV del paziente uremico.

Parole chiave: anemia, fosfatidilserina, globulo rosso, malattia cardiovascolare, ossido nitrico, uremia

Erythrocyte abnormalities and their possible role in cardiovascular complications of uremia

Cardiovascular (CV) disease is the leading cause of morbidity and mortality in patients with chronic kidney disease (CKD). Increased incidence of CV events in CKD is related to the presence, besides traditional CV risk factors, of non-traditional CV risk factors associated to renal insufficiency, like anemia. The role of red blood cells (RBC) in uremia has been taken into account almost exclusively in relation to their reduced number. However, RBC in the uremic milieu can acquire several abnormalities which may jeopardize their properties.

In this review, we report the main qualitative abnormalities of RBC and their potential pathophysiological role in the increased CV risk of uremic patient.

Key words: anemia, cardiovascular disease, nitric oxide, phosphatidylserine, red blood cell, uremia

Introduzione

La patologia cardiovascolare (CV) rappresenta a tutt'oggi la principale causa di morbilità e mortalità nei pazienti affetti da malattia renale cronica [1]. Il rischio di eventi cardiovascolari aumenta allorché il filtrato glomerulare scende al di sotto di 60 ml/min/1.73 m² e si accentua progressivamente con il ridursi della funzione renale [2] (full text), risultando particolarmente elevato nei pazienti in terapia sostitutiva dialitica [3] [4].

I fattori di rischio CV tradizionali come età avanzata, diabete, ipertensione e dislipidemia, sono altamente prevalenti nei pazienti con malattia renale cronica (MRC) e contribuiscono in maniera significativa alla patologia CV, in particolare nelle fasi di disfunzione renale lieve-moderata [5] (full text) [6] (full text) [7]. Accanto a questi, l'elevata incidenza di eventi CV nei pazienti con MRC rispetto alla popolazione generale viene attribuita alla simultanea presenza di fattori di rischio CV non tradizionali, associati all'insufficienza renale [8] (full text). Questi fattori, la cui prevalenza aumenta con il declino della funzione renale, comprendono disturbi del metabolismo calcio-fosforo, malnutrizione, espansione del volume extracellulare, infiammazione, aumentato stress ossidativo, iperomocisteinemia, stato trombotico e rigidità vascolare [9].

Relativamente alla patologia CV del paziente uremico, il ruolo dei globuli rossi (GR) è in genere stato considerato quasi unicamente in relazione alle alterazioni numeriche degli stessi. L'anemia, segno clinico tipico e frequente, è difatti considerata un fattore di rischio CV non tradizionale nella MRC [9] [10]. Tuttavia, il ruolo del GR uremico nel sistema CV può essere più ampio, in quanto nel milieu uremico l'eritrocita acquisisce numerose alterazioni che possono avere effetti sfavorevoli a livello cardiovascolare.

Nella presente review, verranno di seguito commentate le principali alterazioni eritrocitarie qualitative ed il loro potenziale ruolo fisiopatologico nel rischio CV del paziente uremico.

Ridotta attività eritrocitaria del sistema antiossidante intracellulare

Il termine "stress ossidativo" indica l'insieme delle alterazioni che si generano in tessuti, cellule e macromolecole allorché si verifica uno squilibrio tra eccessiva produzione di agenti ossidanti e inefficace meccanismo di difesa antiossidante [11] (full text). Un corretto bilanciamento tra questi sistemi (il cosiddetto equilibrio ossido-riduttivo o equilibrio redox) risulta essenziale per tutta una serie di funzioni fisiologiche del nostro organismo.

Le sostanze ossidanti sono composti altamente reattivi caratterizzati da un'emivita di pochi secondi. Quando questi radicali ossidrilici interagiscono nell'ambiente cellulare con le principali macromolecole biologiche (lipidi, proteine, carboidrati e acidi nucleici) ne modificano permanentemente la struttura e la funzione e rappresentano, quindi, dei potenziali agenti di danno CV [12] (full text). La Tabella 1 riporta i principali marcatori di stress ossidativo e i sistemi antiossidanti.

In presenza di una ridotta funzionalità renale si assiste ad un incremento in circolo dei radicali liberi dell'ossigeno (reactive oxygen species, ROS), in modo inversamente proporzionale ai livelli di filtrato glomerulare [13]. L'aumento dei ROS, ossida l'ossiemoglobina con formazione di perossido di idrogeno (H₂O₂) e metaemoglobina [14] (full text), responsabili di ipossia tissutale [15] (full text). L'eccessiva presenza di ROS determina inoltre perossidazione lipidica, con alterazioni ossidative permanenti delle lipoproteine [16] (full text). Tra queste, alcune fortemente aterogene come la malonildialdeide, i prodotti finali di glicazione avanzata o i prodotti proteici di ossidazione avanzata, innescano il processo aterosclerotico e danneggiano la parete intimale delle arterie, stimolando la risposta infiammatoria a livello

vascolare con espressione di molecole di adesione leucocitaria e susseguente migrazione di cellule infiammatorie nello spazio sub-endoteliale. Le LDL ossidate, a loro volta, stimolano la formazione di cellule schiumose con liberazione in circolo di numerose citochine pro-infiammatorie, in grado di destabilizzare le placche aumentando il rischio di cardiopatia ischemica [17] (full text) [18].

Il danno lipidico indotto dai ROS mediante perossidazione può causare alterazioni dell'integrità della membrana degli eritrociti, riducendo l'emivita cellulare [19] (full text). Il globulo rosso peraltro può contribuire di *per se* allo stress ossidativo uremico, attraverso alterazioni degli enzimi cellulari che agiscono sull'equilibrio ossido-riduttivo. Infatti, in corso di MRC è possibile osservare un importante aumento dell'attività della glutazione perossidasi e della glutazione reduttasi (enzimi pro-ossidanti), così come una significativa riduzione della superossido dismutasi e della catalasi (enzimi con attività anti-ossidante) [20] (full text).

Inoltre, l'attività enzimatica eritrocitaria nell'uremia può essere influenzata dal trattamento emodialitico e le membrane in cellulosa o polisulfone, frequentemente utilizzate nella pratica clinica, sono risultate associarsi ad una modulazione dei biomarcatori di stress ossidativo [21] (full text). In maniera interessante, è stato osservato che l'utilizzo di membrane arricchite con vitamina E comportava un significativo miglioramento dell'attività eritrocitaria della superossido dismutasi [22] e della deformabilità dei GR [23] (full text), con riduzione della richiesta di eritropoietina umana ricombinante (EPO). Per di più, anche i livelli di glucosio contenuti nel liquido dializzante possono svolgere un ruolo importante nella regolazione della capacità antiossidante eritrocitaria. Bober e coll. hanno infatti riportato come concentrazioni di glucosio di 5.6 mmol/l generano un aumento del ciclo dell'esoso monofosfato negli eritrociti, con benefici sul sistema antiossidante e ridotto rischio di emolisi [24].

Circa l'utilizzo di agenti antiossidanti, Usberti e coll. hanno evidenziato come la somministrazione endovena di glutazione ridotto (GSH) al dosaggio di 1200 mg al termine di ogni seduta emodialitica per un periodo non inferiore a 9 mesi, fosse in grado in 28 pazienti emodializzati (14 dei quali in trattamento con EPO) di aumentare significativamente la sopravvivenza eritrocitaria e migliorare il quadro anemico [25]. L'importanza del ruolo del GSH nel rimuovere i ROS dalla membrana eritrocitaria è stata confermata anche in sinergia con filtri arricchiti con vitamina E [26]. L'impiego di tali filtri in associazione con vitamina C (250 mg endovena) per 2 mesi, è inoltre risultato in grado di ridurre l'emolisi intradialitica e il danno ossidativo ai GR [27] (full text).

Tabella 1. Marcatori di stress ossidativo e agenti anti-ossidanti

MARCATORI	ANTIOSSIDANTI
Perossidazione lipidica	Meccanismi enzimatici
Acroleina, Malonidialdeide, F2-isoprostani, Sostanze reattive all'acido tiobarbiturico, Prodotti di ossidazione lipidica avanzata, Anticorpi LDL ossidati	Superossido dismutasi, Catalasi, Glutazione perossidasi, Glutazione reduttasi
Ossidazione di proteine	Meccanismi non enzimatici
Prodotti proteici di ossidazione avanzata	Glutazione, Vitamina E, Vitamina C, Ferritina, Transferrina, Albumina ecc.
Ossidazione di carboidrati	
Prodotti finali di glicosilazione avanzata	
Ossidazione di acidi nucleici	
8-idrossi-2-desossiguanosina	

Il possibile ruolo della supplementazione di vitamina E è più controverso. Il trattamento orale con 600 mg al giorno per un periodo di 14 settimane in 36 pazienti in emodialisi, è risultato in grado di aumentare l'attività eritrocitaria di superossido dismutasi e glutatione perossidasi rispetto a soggetti sani di controllo suggerendo un ruolo protettivo [28]. Cristol e coll. hanno mostrato in pazienti in trattamento emodialitico, come l'impiego *per os* di vitamina E (500 mg/die) per 6 mesi sia in grado di correggere la ridotta concentrazione intra-eritrocitaria della stessa, con progressiva riduzione dei livelli di malonildialdeide e azione antiossidante [29] (full text). In pazienti uremici in terapia sostitutiva (34 in emodialisi, 13 in dialisi peritoneale) l'assunzione di 300 mg/die di vitamina E per 20 settimane è risultata associarsi ad un miglioramento della fragilità osmotica eritrocitaria [30]. Altri lavori, tuttavia, non hanno confermato l'efficacia della vitamina E nel modulare l'attività antiossidante negli eritrociti di pazienti in dialisi [31] [32].

Alterata composizione della membrana cellulare eritrocitaria

Il GR è una cellula piuttosto semplice e priva di nucleo, i cui principali componenti sono rappresentati dalla membrana cellulare e dal citoplasma ricco di emoglobina. La composizione della membrana cellulare modula le proprietà visco-elastiche dell'eritrocita, a loro volta fondamentali per la sopravvivenza della cellula nel torrente circolatorio. La deformabilità è una caratteristica intrinseca del GR normale, che ne permette il passaggio attraverso capillari di calibro più piccolo per il rilascio di ossigeno [33]. Una ridotta deformabilità favorisce il processo di emolisi nei capillari e di sequestro prematuro dei GR da parte del sistema reticolo-endoteliale [34], alterando l'ossigenazione tissutale [35].

Una delle componenti patogenetiche non trascurabili dell'anemia nel nefropatico cronico è rappresentata dalla significativa riduzione del tempo di emivita dei GR circolanti [36] [37] ed è ipotizzabile che essa sia essenzialmente attribuibile all'azione tossica esercitata sui GR dall'ambiente plasmatico uremico. Difatti, è ben noto che la sopravvivenza di GR di donatori sani una volta reinfusi in pazienti uremici si riduce significativamente [38] [39]. La diminuzione dell'emivita non comporta solo un calo della quantità di emoglobina circolante, parametro normalmente utilizzato per valutare la severità della condizione anemica, ma testimonia anche la difficoltà che i GR di pazienti uremici hanno nel perfondere adeguatamente il microcircolo, proprio a causa delle alterate proprietà reologiche dei GR stessi [40].

In maniera interessante, studi recenti hanno evidenziato una alterata composizione proteica della membrana dell'eritrocita uremico, che in particolare interessa componenti proteiche del *network* citoscheletrico. In particolare, in GR di pazienti emodializzati in trattamento con EPO, l'analisi dell'espressione di alcune principali proteine della membrana eritrocitaria ha evidenziato ridotti livelli di spettina [41]. Un più recente studio *unbiased* volto a valutare mediante proteomica la composizione della membrana eritrocitaria in soggetti affetti da MRC, ha mostrato significative variazioni di numerose proteine come beta-adducina, tropomodulina-1, ezrina e radixina [42]. Il *network* citoscheletrico rappresenta un principale determinante delle proprietà visco-elastiche dei GR come la deformabilità [43] (full text). Le suddette alterazioni della componente proteica di membrana [41] [42] potrebbero pertanto contribuire alla patogenesi della alterata deformabilità eritrocitaria osservata nella MRC [44] [45] [46] (full text).

Un composto in grado di influenzare positivamente le proprietà reologiche dei GR è la carnitina. In particolare, quando questo importante cofattore della beta-ossidazione degli acidi grassi è presente a concentrazioni al di sopra di quelle fisiologiche è in grado di influenzare le proprietà biofisiche e viscoelastiche della membrana cellulare. Per esempio, è noto che la carnitina allevia significativamente le alterazioni indotte da molecole anfipatiche sulla dinamica molecolare dei fosfolipidi di membrana di eritrociti umani, riducendo nel contempo

l'emolisi [47]. Inoltre, attraverso l'uso di tecniche di ectacitometria, abbiamo osservato che la carnitina è capace di incrementare l'elasticità della membrana cellulare, e che tale effetto è in qualche misura connesso ad un'interazione della carnitina con alcune proteine componenti del membrano-scheletro [48]. Sembrerebbe quindi che la carnitina sia in grado di rafforzare i legami esistenti tra le proteine costituenti il citoscheletro, e che quest'azione sia responsabile dell'incrementata elasticità della membrana, che a sua volta migliora le proprietà reologiche dei GR. A sostegno di queste evidenze sperimentali, si è anche osservato che la carnitina incrementa significativamente nella membrana cellulare l'interazione tra le proteine del membrano-scheletro [49].

Il riscontro di una significativa correlazione inversa tra fluidità di membrana (indice di deformabilità) e dose richiesta di EPO in pazienti emodializzati, potrebbe suggerire che gradi differenti di alterazione delle proprietà meccaniche dei GR uremici possono avere un importante ruolo sulla dose necessaria di EPO [46] (full text).

Ad oggi, non esistono evidenze cliniche dirette a supporto di un possibile ruolo delle alterate proprietà reologiche dei GR nell'incrementare il rischio CV dei pazienti uremici. Una recente esperienza preclinica, comunque, suggerisce che GR di ratto conservati per 2 settimane a 4 °C sono meno efficaci nel garantire una normale ossigenazione a livello del microcircolo rispetto a GR non conservati [50]. Difatti, sono ben note le alterazioni a cui vanno incontro i GR quando conservati in emoteche a fini trasfusionali [51], tra cui troviamo quelle che coinvolgono il membrano-scheletro e le proprietà reologiche dei GR in qualche modo sovrapponibili ai difetti presenti nei GR di pazienti uremici [52]. Queste alterazioni potrebbero rendere conto non solo dell'osservazione sperimentale riportata sopra sull'ossigenazione del microcircolo, ma anche dei potenziali effetti ipossici a carico del microcircolo coronarico e relativo rischio cardiovascolare.

Oltre che nella componente proteica, la membrana dell'eritrocita uremico risulta alterata anche nella componente fosfolipidica. I fosfolipidi del GR umano sono normalmente distribuiti in maniera asimmetrica nel doppio strato della membrana cellulare, e il mantenimento di tale asimmetria è un processo di rilevante importanza fisiologica per la cellula [53]. La perdita della normale asimmetria, difatti, in particolare l'esposizione sulla superficie cellulare dell'aminofosfolipide fosfatidilserina (phosphatidylserine, PS), normalmente localizzato sul versante interno della membrana, può avere numerose implicazioni fisiopatologiche [54] (full text) [55]. Tra queste, la generazione di un segnale riconosciuto dai macrofagi con successiva fagocitosi e rimozione della cellula dal circolo [56] (full text) [57] (full text). Tale meccanismo di accelerata morte suicida dell'eritrocita, denominato eriptosi [58], è considerato di rilevanza *in vivo* nella ridotta sopravvivenza del GR falciforme [59] (full text).

I GR di pazienti nefropatici cronici (sia in dialisi che in terapia conservativa) presentano un'aumentata esposizione di PS sul versante cellulare esterno [60] (full text). Tale alterazione si accentua progressivamente con il ridursi della funzionalità renale residua ed è sostenuta da composti patologicamente presenti nel plasma uremico [60] (full text), tra cui beta2-microglobulina [61], acroleina [62] (full text) e indossil solfato [63] (full text). Il trattamento dialitico extracorporeo può ridurre la capacità del plasma uremico di induzione di PS sugli eritrociti, con risultati più significativi allorché vengono impiegate tecniche con un più ampio *range* di rimozione rispetto all'emodialisi convenzionale quali emodiafiltrazione [64] (full text) ed emodiafiltrazione con reinfusione endogena [65]. Anche la L-carnitina si è dimostrata in grado *in vitro* di ridurre l'esposizione di PS sui GR di pazienti uremici attraverso un'azione anti-ossidante [66], il che potrebbe almeno in parte spiegare l'aumentata sopravvivenza eritrocitaria osservata in pazienti emodializzati trattati per 24 settimane con tale composto [67] (full text).

Inoltre, l'aumentata esposizione sugli eritrociti di PS può contribuire all'anemia presente nella MRC [68] [69]. È stato infatti dimostrato che la presenza di PS promuove la suscettibilità dei GR uremici alla fagocitosi da parte di macrofagi umani [70], potendo così avere un ruolo nella ridotta sopravvivenza eritrocitaria dell'uremia [36] [37].

L'emivita eritrocitaria determina il tempo necessario per raggiungere uno stato di equilibrio (steady state) tra una somministrazione e l'altra di EPO [71]. Non essendo completamente integrata negli algoritmi di dosaggio, la diminuita emivita del GR nell'uremia potrebbe avere un ruolo nella risposta eritropoietica all'EPO [71], favorendo il fenomeno della variabilità dell'emoglobina [72] (full text), che nel paziente uremico è stato associato ad un aumentato rischio di mortalità [73] (full text).

Aumentata attività eritrocitaria pro-coagulante

La sindrome uremica è caratterizzata da complesse modificazioni del sistema emostatico. Accanto ad una diatesi emorragica dovuta principalmente ad alterazioni funzionali delle piastrine, può difatti coesistere una aumentata tendenza trombotica [74]. I pazienti uremici presentano un aumentato rischio di trombosi venose e arteriose, che possono rappresentare la causa predominante di mortalità soprattutto nei pazienti sottoposti ad emodialisi [75] [76] (full text). La presenza di uno stato di ipercoagulabilità nell'uremia è suggerita da numerose alterazioni a carico delle piastrine e della cascata coagulativa [77] [78] [79] [80]. Questo stato trombofilico è ritenuto essere di origine multifattoriale [81], anche se meccanismi specifici dello stato uremico non sono ancora stati identificati [82] (full text).

I GR possono acquisire un'attività pro-coagulante a seguito dell'esposizione di PS sulla superficie esterna della loro membrana cellulare. L'aminofosfolipide promuove l'assemblaggio di due complessi del sistema della coagulazione, tenasi e protrombinasi, con susseguente generazione di trombina [83], che causa ipercoagulabilità. Questo meccanismo è ritenuto un fattore contribuente allo stato protrombotico di condizioni patologiche quali l'anemia a cellule falciformi e la beta talassemia [84] [85] (full text).

Recenti evidenze indicano che l'aumentata esposizione eritrocitaria di PS può indurre un fenotipo patologico pro-coagulante, che potrebbe contribuire allo stato di ipercoagulabilità dell'uremia.

L'attività pro-coagulante dei GR uremici è dimostrata dalla aumentata generazione di trombina in vari saggi enzimatici [82] (full text) [86] (full text). Il ruolo della PS esposta sulla superficie eritrocitaria è suggerito da diverse osservazioni [86] (full text): l'aumentata generazione di trombina determinata con il saggio della protrombinasi, che misura la conversione di protrombina in trombina indotta dall'esposizione di PS su GR interi [54] (full text); la significativa correlazione tra livelli eritrocitari di PS e grado di attivazione protrombinasica; la significativa inibizione dell'attività pro-coagulante a seguito della preincubazione dei GR con annessina V, che lega la PS rendendola non disponibile per altri processi. Similmente, la preincubazione di GR uremici con lattoaderina, che si lega alla PS esposta sulla superficie cellulare e ne blocca l'attività pro-coagulante, è risultata associarsi ad una riduzione dell'80% dell'attività pro-coagulante eritrocitaria, suggerendo un possibile uso del composto quale strategia terapeutica contro l'ipercoagulabilità uremica [82] (full text). Sono anche state osservate in pazienti emodializzati significative correlazioni tra eritrociti PS-positivi e aumentati livelli plasmatici di *markers* di generazione di trombina (frammento protrombinico F1.2 e complesso trombina-antitrombina) e di fibrinolisi (D-dimero e complesso plasmina-antiplasmina) [86] (full text). Inoltre, in un'analisi retrospettiva di 3 anni, abbiamo osservato che i pazienti che avevano sofferto di eventi trombotici presentavano livelli di GR PS-positivi significativamente più elevati rispetto ai pazienti senza tali eventi [86] (full text).

I GR possono indurre ipercoagulabilità anche attraverso il rilascio di microparticelle, che espongono PS ed esprimono antigeni di membrana sulla loro superficie [87]. Recentemente è stato dimostrato che i livelli circolanti di microparticelle dotate di attività pro-coagulante e derivate da cellule ematiche come i GR, sono aumentati nei pazienti uremici rispetto ai controlli sani [82] ([full text](#)).

Nell'insieme, si può ragionevolmente ipotizzare un effetto di promozione della coagulazione indotto dall'esposizione di PS sui GR, che può contribuire all'elevata incidenza di complicanze trombotiche nell'uremia. Alternativamente, l'aumentata esposizione di PS potrebbe rappresentare un nuovo *marker* o un predittore di trombosi cliniche [82] ([full text](#)).

Alterata produzione e biodisponibilità eritrocitaria dell'Ossido Nitrico

L'ossido nitrico (Nitric Oxide, NO; monossido di azoto) è un radicale libero gassoso prodotto per azione dell'enzima ossido nitrico sintasi (NOS), costitutivamente espresso a livello endoteliale (eNOS) e neuronale (nNOS) mentre risulta inducibile (iNOS) in numerosi tessuti e cellule in situazioni fisiopatologiche peculiari. L'NO è implicato nella regolazione del *signaling* intracellulare in numerosi distretti ed esercita un'ampia azione pleiotropica [88]. A livello vascolare, l'NO rappresenta la molecola chiave nella regolazione della vasodilatazione endotelio-mediata [89]; regola inoltre una serie di meccanismi vascolari quali aggregazione piastrinica, adesione dei leucociti all'endotelio e proliferazione/migrazione delle cellule muscolari lisce [90], le cui alterazioni rappresentano eventi cruciali nel processo di aterosclerosi [91].

La disfunzione endoteliale è considerata un meccanismo patogenetico in grado di contribuire all'aumentato rischio CV nella MRC [92]. Ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente e aumentati livelli plasmatici di mediatori derivati dall'endotelio rappresentano alterazioni consistentemente riportate nei pazienti uremici [93] ([full text](#)) [94] ([full text](#)) [95] [96] ([full text](#)). L'alterata vasodilatazione endotelio-dipendente di questi pazienti suggerisce una riduzione della biodisponibilità di NO [93] ([full text](#)) [94] ([full text](#)). I meccanismi della ridotta bioattività dell'NO nell'insufficienza renale rimangono tuttavia ancora non ben precisati.

È noto da tempo che i livelli di NO presente in circolo sono determinati principalmente dall'attività enzimatica dell'endotelio vascolare e ad oggi i GR erano stati considerati responsabili del trasporto di tale gas e non della sintesi. È stato dimostrato, infatti, che gli eritrociti legano e inattivano l'NO prodotto nell'endotelio mediante una rapida reazione con l'ossiemoglobina per formare metaemoglobina, S-nitrosoemoglobina e nitrati [97] ([full text](#)) [98] ([full text](#)).

In condizioni di ipossiemia, i GR giocano un ruolo fondamentale nel rilascio di NO e conseguente vasodilatazione NO-dipendente [99] ([full text](#)) [100] [101] ([full text](#)), mentre in condizioni di normo-ossigenazione o in condizioni patologiche diverse dalla ipossiemia il ruolo dei GR nel rilascio e/o eventuale produzione di NO è ancora da caratterizzare. A tal riguardo, la localizzazione e la funzione della NOS nei GR e nelle piastrine è stata descritta per la prima volta nel 2006 [102] ([full text](#)), anche se studi precedenti suggerivano la presenza di tale enzima nei GR [100] [103] [104].

In particolare, nel 2006, Kleinbongard e coll. hanno dimostrato la presenza della isoforma eNOS eritrocitaria, estendendo così il ruolo dei GR da semplici trasportatori di NO a produttori di tale gas [102] ([full text](#)). Successivamente, gli stessi autori hanno ipotizzato un meccanismo di regolazione della NOS eritrocitaria paragonabile a quella della NOS endoteliale, sebbene nei GR maturi manchino gli organelli cellulari che svolgono un ruolo chiave nella regolazione della NOS endoteliale [105]. Più di recente, è stato dimostrato che i GR pro-

ducono NO anche in condizioni di normo-ossigenazione attraverso l'attivazione della isoforma endoteliale della NOS e che i livelli di espressione ed attività della eNOS nei GR di pazienti affetti da coronaropatia sono significativamente ridotti rispetto a GR di soggetti sani [106] (full text).

Oltre a quanto citato, studi focalizzati sulla caratterizzazione della NOS eritrocitaria, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, sono piuttosto esigui e talvolta controversi [107] (full text) [108] [109] [110] [111] (full text).

Il nostro gruppo ha recentemente pubblicato uno studio che descrive per la prima volta i possibili meccanismi implicati nella sintesi e nella biodisponibilità di NO nei GR di pazienti uremici [112]. In particolare, è stata messa a confronto la produzione enzimatica di NO negli eritrociti di pazienti affetti da MRC in stadio terminale in trattamento emodialitico con quella di individui sani di pari età.

Il nostro studio ha dimostrato che, in condizioni basali, sebbene l'espressione della eNOS nei GR uremici risultasse inferiore rispetto a quella riscontrata nei GR di controllo, i livelli di fosforilazione di eNOS in Serina-1177, di produzione di NO e la sua biodisponibilità (livelli di guanosina monofosfato ciclico, cGMP) risultavano significativamente più elevati. Al contrario, in seguito a stimolazione dei GR con insulina o ionomicina (note per attivare eNOS rispettivamente tramite un meccanismo di fosforilazione o in maniera calcio dipendente), i livelli di NO e la sua biodisponibilità risultavano significativamente più elevati nei GR dei soggetti sani rispetto ai GR dei pazienti emodializzati, suggerendo che la condizione uremica possa ridurre la risposta della eNOS eritrocitaria ad ulteriori stimoli.

Le nostre osservazioni hanno permesso *in primis* di confermare la presenza della isoforma eNOS eritrocitaria (evidenza sulla quale in letteratura ad oggi non è stato raggiunto univoco consenso) ed identificare, per la prima volta, un meccanismo alterato di attivazione di tale enzima nei GR di soggetti uremici [112].

In maniera interessante, tali risultati sono supportati da studi precedenti in cui è stato mostrato un marcato aumento della produzione di NO sia negli eritrociti che nelle piastrine di pazienti uremici in emodialisi [113] [114]. Inoltre, uno studio pubblicato nel 1982 [115] dimostrava un aumentato livello di cGMP negli eritrociti di pazienti uremici rispetto ai soggetti sani. Tale dato è stato confermato nel nostro recente studio [112], in cui è stato dimostrato che l'accumulo di cGMP nel GR dei soggetti affetti da uremia era associato ad un difetto di trasporto di tale nucleotide verso il circolo ematico [112] [116]. Ciò era associato ad una compromessa attività del trasportatore eritrocitario del cGMP (MRP4), i cui livelli di nitrificazione e nitrosilazione risultavano significativamente aumentati nei GR prelevati da soggetti uremici (Figura 1).

Questi dati ci permettono pertanto di ipotizzare che il livello di cGMP eritrocitario potrebbe rappresentare un biomarcatore utile a monitorare nel paziente uremico lo stato pro-ossidante e/o pro-infiammatorio associato alla riduzione della biodisponibilità vascolare di NO nella MRC.

Aumentata adesione eritrocitaria all'endotelio

Recentemente, nostri studi hanno dimostrato che i GR di pazienti emodializzati presentano un'aumentata capacità di adesione all'endotelio, attraverso l'interazione tra la PS esposta sulla membrana esterna del GR e la trombospondina, presente nella matrice extracellulare endoteliale [117] (full text). In maniera interessante, è stato osservato che l'adesione degli eritrociti uremici all'endotelio può modulare il rilascio di NO da parte di tali colture cellulari [118] (full text), così come riportato anche per il GR falciforme [119] [120]. In particolare, il nostro studio ha evidenziato ridotti livelli di espressione della eNOS (mRNA e proteina),

nonché una significativa riduzione dell'attività NOS, in colture primarie di cellule endoteliali umane incubate con GR di pazienti uremici [118] (full text).

La riduzione dell'attività dell'enzima eNOS è ritenuta un parametro fondamentale nel caratterizzare la disfunzione della cellula endoteliale [121] (full text), pertanto, la potenziale diminuzione dell'attività eNOS vascolare nell'uremia potrebbe avere correlazione con lo stato disfunzionale dell'endotelio [118] (full text). La ridotta produzione di NO, infatti, rappresenta un evento importante per le alterazioni vascolari funzionali e strutturali, e può risultare implicata nella patogenesi della vasculopatia uremica. Inoltre, l'inibizione cronica di NOS potrebbe favorire lo stress ossidativo e l'espressione delle molecole di adesione, con danno endoteliale e accelerata aterosclerosi [122] (full text).

Oltre agli effetti pro-infiammatori conseguenti alla ridotta biodisponibilità di NO, l'interazione PS-mediata tra il GR uremico e l'endotelio può causare direttamente un fenotipo endoteliale pro-infiammatorio [123]. Come mostrato in Figura 1, l'aumentata adesione dei GR uremici all'endotelio ha infatti indotto nelle cellule endoteliali un aumento di espressione (mRNA e proteina) e di esposizione di membrana delle molecole di adesione in-

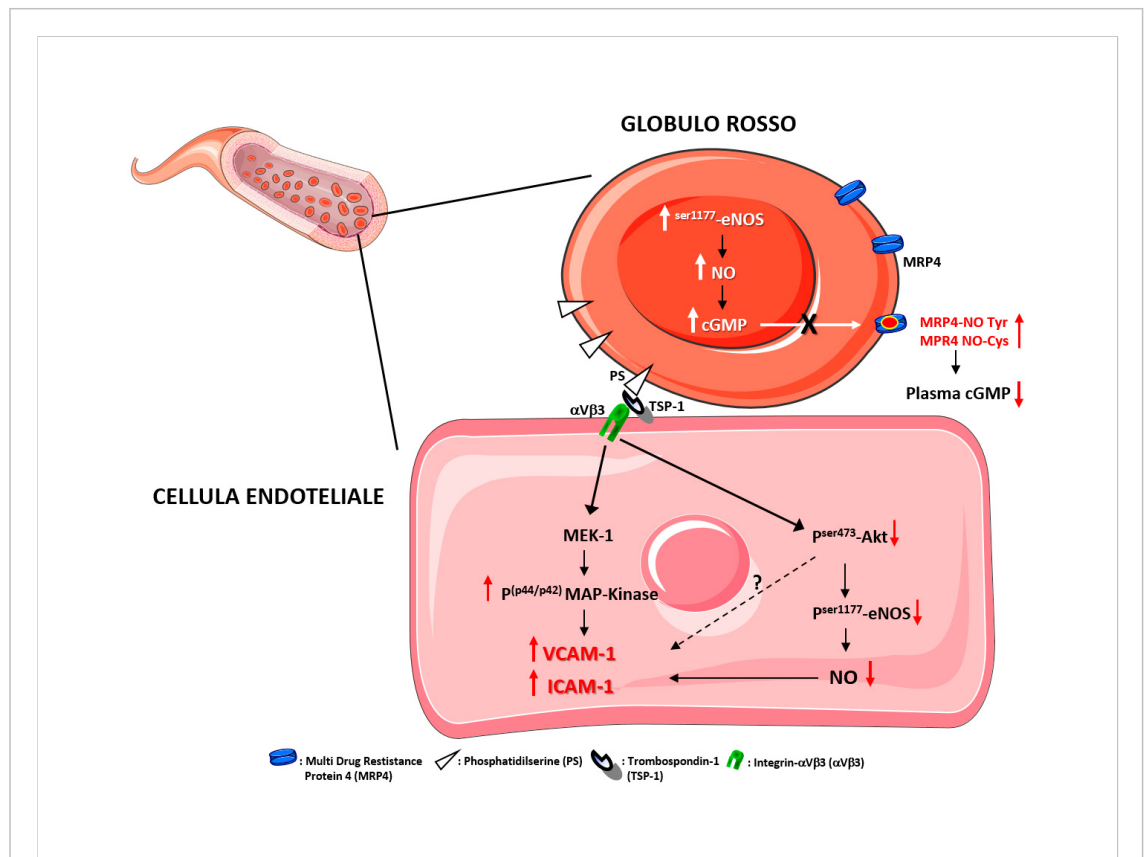
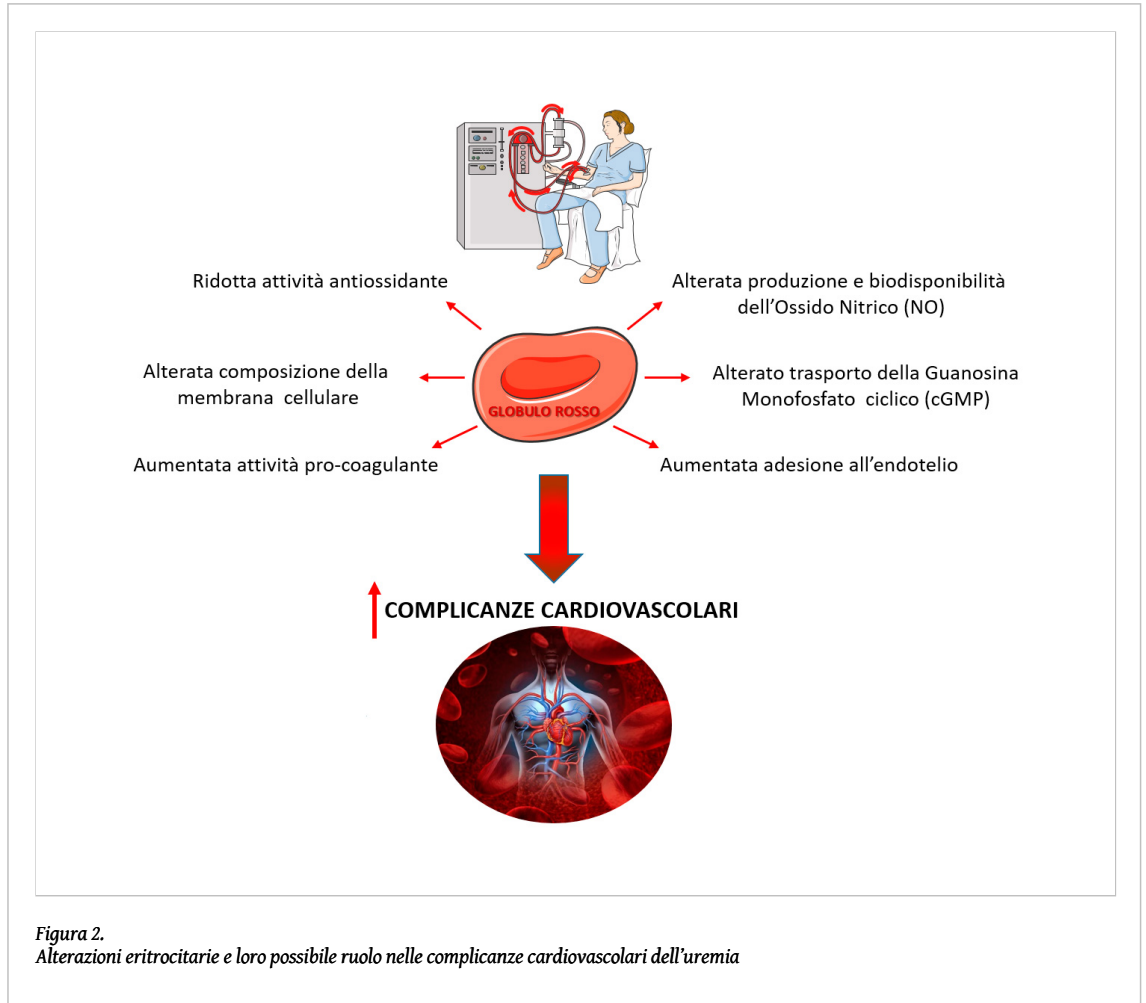


Figura 1.

Meccanismi potenzialmente implicati nell'alterata produzione e biodisponibilità endoteliale ed eritrocitaria dell'Ossido Nitrico nell'uremia. L'aumentata esposizione della fosfatidilserina (PS) promuove l'adesione del globulo rosso uremico all'endotelio tramite l'interazione con il complesso trombospondina-1 (TSP-1, matrice extracellulare) – integrina-αVβ3 (αVβ3, membrana cellulare). Tale interazione a livello endoteliale promuove: (i) l'attivazione della via pro-aterogena delle MAP-Kinase (mitogen activated protein kinase) con aumento di espressione delle molecole di adesione VCAM-1 (Vascular cellular adhesion molecule-1) e ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1); (ii) l'inibizione della via anti-aterogena con conseguente diminuzione dei livelli di fosforilazione di Akt-eNOS (Protein kinase B- endothelial Nitric Oxide synthase) e riduzione della produzione e biodisponibilità dell'Ossido Nitrico (NO, Nitric Oxide). Nel globulo rosso l'ambiente uremico può causare un aumento compensatorio dei livelli di fosforilazione di eNOS e di produzione di NO associato ad un accumulo intracitocitario di cGMP. Quest'ultimo potrebbe essere dovuto ad una diminuita attività del trasportatore di membrana di cGMP (MRP4, multidrug-resistance-associated protein-4), che presenta un aumento significativo dei livelli di nitrazione in tirosina e nitrosilazione in cisteina (MRP4-NOTyr e MRP4-NOCys). Tali alterazioni possono contribuire alla riduzione della biodisponibilità ematica di NO contribuendo così ad un aumento del rischio CV nella MRC.



tercellulare ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) e VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) [123]. L'aumento di queste ultime è modulato da vie di trasduzione del segnale con effetto proinfiammatorio [124] [125], NO-indipendenti, quali attivazione della protein chinasi mitogeno-attivata (MAPK; mitogen activated protein kinase) e ridotta attività Akt (anche conosciuta come proteina chinasi B) [123]. Tali molecole svolgono un ruolo chiave nel regolare l'infiltrazione leucocitaria che rappresenta un evento fondamentale nell'infiammazione vascolare e nel processo aterosclerotico precoce [126] [127], ed è da notare che nelle suddette condizioni sperimentali l'adesione all'endotelio di cellule monocitoidi umane è risultata marcatamente aumentata [123].

Può essere rilevante notare che questi meccanismi sono analoghi a quelli dimostrati in alcune emoglobinopatie caratterizzate da accelerata aterosclerosi [119] [128] (full text).

Infine, l'inibizione della eNOS potrebbe anche avere un ruolo causale nell'aumento delle resistenze periferiche e della pressione arteriosa dell'uremia [129].

Nel complesso, diverse evidenze sottolineano la potenziale rilevanza delle interazioni tra eritrociti ed endotelio nell'induzione nell'uremia cronica di un fenotipo vascolare infiammatorio. Pertanto, interventi terapeutici volti ad antagonizzare l'aumentata adesione eritrocitaria all'endotelio e/o i sistemi MAPK e Akt, potrebbero rappresentare un nuovo approccio per la prevenzione/trattamento della patologia vascolare uremica.

Conclusioni

La presente revisione della letteratura è stata incentrata sul potenziale ruolo delle alterazioni qualitative eritrocitarie nelle complicanze cardiovascolari nell'uremia. Sulla base delle evidenze descritte è possibile proporre che l'eritrocita nel milieu uremico subisca compromissioni strutturali e funzionali (Figura 2), come la riduzione dell'attività antiossidante e l'alterazione dei meccanismi di produzione/biodisponibilità di NO, la modifica della composizione della membrana plasmatica, l'aumento della potenzialità pro-coagulante e di adesione all'endotelio, che possono comprometterne le principali proprietà.

Tali trasformazioni molecolari, oltre a rappresentare un interessante nesso fisiopatologico con lo sviluppo delle complicanze cardiovascolari dell'uremia, potrebbero assumere un potenziale ruolo traslazionale se, mediante ulteriori studi, si riuscisse ad individuare possibili bio-marcatore eritrocitari utili sia per la prevenzione che per il monitoraggio rischio cardiovascolare nell'uremia.

Bibliografia

- [1] Go AS Cardiovascular Disease Consequences of CKD. *Seminars in nephrology* 2016 Jul;36(4):293-304
- [2] Go AS, Chertow GM, Fan D et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *The New England journal of medicine* 2004 Sep 23;351(13):1296-305 (full text)
- [3] Levey AS, Beto JA, Coronado BE et al. 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. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 1998 Nov;32(5):853-906
- [4] Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ et al. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 1998 Nov;32(5 Suppl 3):S112-9
- [5] Cullerton BF, Larson MG, Wilson PW et al. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney international* 1999 Dec;56(6):2214-9 (full text)
- [6] Fried LF, Shlipak MG, Crump C et al. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and mortality in elderly individuals. *Journal of the American College of Cardiology* 2003 Apr 16;41(8):1364-72 (full text)
- [7] Parikh NI, Hwang SJ, Larson MG et al. Cardiovascular disease risk factors in chronic kidney disease: overall burden and rates of treatment and control. *Archives of internal medicine* 2006 Sep 25;166(17):1884-91
- [8] Zoccali C Cardiovascular risk in uraemic patients-is it fully explained by classical risk factors? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2000 Apr;15(4):454-7 (full text)
- [9] van der Zee S, Baber U, Elmariah S et al. Cardiovascular risk factors in patients with chronic kidney disease. *Nature reviews. Cardiology* 2009 Sep;6(9):580-9
- [10] Levin A, Thompson CR, Ethier J et al. Left ventricular mass index increase in early renal disease: impact of decline in hemoglobin. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 1999 Jul;34(1):125-34
- [11] Terawaki H, Yoshimura K, Hasegawa T et al. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney international* 2004 Nov;66(5):1988-93 (full text)
- [12] Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU et al. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2003 Jul;18(7):1272-80 (full text)
- [13] Kao MP, Ang DS, Pall A et al. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. *Journal of human hypertension* 2010 Jan;24(1):1-8
- [14] McLeod LL, Alayash AI Detection of a ferrylhemoglobin intermediate in an endothelial cell model after hypoxia-reoxygenation. *The American journal of physiology* 1999 Jul;277(1 Pt 2):H92-9 (full text)
- [15] D'Agnillo F, Alayash AI Redox cycling of diaspirin cross-linked hemoglobin induces G2/M arrest and apoptosis in cultured endothelial cells. *Blood* 2001 Dec 1;98(12):3315-23 (full text)
- [16] Kaysen GA The microinflammatory state in uremia: causes and potential consequences. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2001 Jul;12(7):1549-57 (full text)
- [17] Hansson GK Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2009 Jul;7 Suppl 1:328-31 (full text)
- [18] Di Pietro N, Formoso G, Pandolfi A et al. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis. *Vascular pharmacology* 2016 Sep;84:1-7
- [19] Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S et al. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of

malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014;2014:360438 (full text)

[20] Sindhu RK, Ehdai A, Farmand F et al. Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochimica et biophysica acta* 2005 Mar 22;1743(1-2):86-92 (full text)

[21] Ogunro PS, Olujombo FA, Ajala MO et al. The effect of a membrane dialyzer during hemodialysis on the antioxidant status and lipid peroxidation of patients with end-stage renal disease. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia* 2014 Nov;25(6):1186-93 (full text)

[22] Bargnoux AS, Cristol JP, Jausset I et al. Vitamin E-coated polysulfone membrane improved red blood cell antioxidant status in hemodialysis patients. *Journal of nephrology* 2013 May-Jun;26(3):556-63

[23] Kobayashi S, Moriya H, Aso K et al. Vitamin E-bonded hemodialyzer improves atherosclerosis associated with a rheological improvement of circulating red blood cells. *Kidney international* 2003 May;63(5):1881-7 (full text)

[24] Bober J, Kedzierska K, Kwiatkowska E et al. Does oxidative stress affect the activity of the sodium-proton exchanger? *Annales Academiae Medicae Stetinensis* 2010;56(3):5-12

[25] Usberti M, Lima G, Arisi M et al. Effect of exogenous reduced glutathione on the survival of red blood cells in hemodialyzed patients. *Journal of nephrology* 1997 Sep-Oct;10(5):261-5

[26] Usberti M, Gerardi G, Micheli A et al. Effects of a vitamin E-bonded membrane and of glutathione on anemia and erythropoietin requirements in hemodialysis patients. *Journal of nephrology* 2002 Sep-Oct;15(5):558-64

[27] Yang CC, Hsu SP, Wu MS et al. Effects of vitamin C infusion and vitamin E-coated membrane on hemodialysis-induced oxidative stress. *Kidney international* 2006 Feb;69(4):706-14 (full text)

[28] Giray B, Kan E, Bali M et al. The effect of vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in hemodialysis patients. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2003 Dec;338(1-2):91-8

[29] Cristol JP, Bosc JY, Badiou S et al. Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 1997 Nov;12(11):2312-7 (full text)

[30] Uzum A, Toprak O, Gumustas MK et al. Effect of vitamin E therapy on oxidative stress and erythrocyte osmotic fragility in patients on peritoneal dialysis and hemodialysis. *Journal of nephrology* 2006 Nov-Dec;19(6):739-45

[31] Durak I, Akyol O, Başıme E et al. Reduced erythrocyte defense mechanisms against free radical toxicity in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1994;66(1):76-80

[32] Chen CK, Liaw JM, Juang JG et al. Antioxidant enzymes and trace elements in hemodialyzed patients. *Biological trace element research* 1997 Jul-Aug;58(1-2):149-57

[33] Lowe GD Blood rheology in vitro and in vivo. *Bailliere's clinical haematology* 1987 Sep;1(3):597-636

[34] Kikuchi Y, Koyama T, Koyama Y et al. Red blood cell deformability in renal failure. *Nephron* 1982;30(1):8-14

[35] Fischer DJ, Torrence NJ, Sprung RJ et al. Determination of erythrocyte deformability and its correlation to cellular ATP release

using microbore tubing with diameters that approximate resistance vessels in vivo. *The Analyst* 2003 Sep;128(9):1163-8

[36] Ly J, Marticorena R, Donnelly S et al. Red blood cell survival in chronic renal failure. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2004 Oct;44(4):715-9

[37] Vos FE, Schollum JB, Coulter CV et al. Red blood cell survival in long-term dialysis patients. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2011 Oct;58(4):591-8

[38] JOSKE RA, MCALISTER JM, PRANKERD TA et al. Isotope investigations of red cell production and destruction in chronic renal disease. *Clinical science* 1956 Nov;15(4):511-22

[39] KURTIDES ES, RAMBACH WA, ALT HL et al. EFFECT OF HEMODIALYSIS ON ERYTHROKINETICS IN ANEMIA OF UREMIA. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1964 Mar;63:469-79

[40] Bonomini M, Zammit V, Pusey CD et al. Pharmacological use of L-carnitine in uremic anemia: has its full potential been exploited? *Pharmacological research* 2011 Mar;63(3):157-64

[41] Costa E, Rocha S, Rocha-Pereira P et al. Altered erythrocyte membrane protein composition in chronic kidney disease stage 5 patients under haemodialysis and recombinant human erythropoietin therapy. *Blood purification* 2008;26(3):267-73

[42] Alvarez-Llamas G, Zubiri I, Maroto AS et al. A role for the membrane proteome in human chronic kidney disease erythrocytes. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2012 Nov;160(5):374-83

[43] Evans EA, Hochmuth RM Membrane viscoelasticity. *Biophysical journal* 1976 Jan;16(1):1-11 (full text)

[44] Viljoen M, de Oliveira AA, Milne FJ et al. Physical properties of the red blood cells in chronic renal failure. *Nephron* 1991;59(2):271-8

[45] Zachée P, Ferrant A, Daelemans R et al. Oxidative injury to erythrocytes, cell rigidity and splenic hemolysis in hemodialyzed patients before and during erythropoietin treatment. *Nephron* 1993;65(2):288-93

[46] Linde T, Sandhagen B, Wikström B et al. The required dose of erythropoietin during renal anaemia treatment is related to the degree of impairment in erythrocyte deformability. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 1997 Nov;12(11):2375-9 (full text)

[47] Watanabe H, Kobayashi A, Hayashi H et al. Effects of long-chain acyl carnitine on membrane fluidity of human erythrocytes. *Biochimica et biophysica acta* 1989 Apr 28;980(3):315-8

[48] Arduini A, Rossi M, Mancinelli G et al. Effect of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on the human erythrocyte membrane stability and deformability. *Life sciences* 1990;47(26):2395-400

[49] Butterfield DA, Rangachari A Acetylcarnitine increases membrane cytoskeletal protein-protein interactions. *Life sciences* 1993;52(3):297-303

[50] Gonzalez AM, Yazici I, Kusza K et al. Effects of fresh versus banked blood transfusions on microcirculatory hemodynamics and tissue oxygenation in the rat cremaster model. *Surgery* 2007 May;141(5):630-9

- [51] Hoehn RS, Jernigan PL, Chang AL et al. Molecular mechanisms of erythrocyte aging. *Biological chemistry* 2015 Jun;396(6-7):621-31
- [52] Georgatzakou HT, Antonelou MH, Papassideri IS et al. Red blood cell abnormalities and the pathogenesis of anemia in end-stage renal disease. *Proteomics. Clinical applications* 2016 Aug;10(8):778-90
- [53] Devaux PF, Zachowski A. Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry. *Chem Phys Lipids* 1994; 73: 107-20
- [54] Zwaal RF, Schroit AJ Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997 Feb 15;89(4):1121-32 (full text)
- [55] Kuypers FA Phospholipid asymmetry in health and disease. *Current opinion in hematology* 1998 Mar;5(2):122-31
- [56] Schroit AJ, Madsen JW, Tanaka Y et al. In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *The Journal of biological chemistry* 1985 Apr 25;260(8):5131-8 (full text)
- [57] Connor J, Pak CC, Schroit AJ et al. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *The Journal of biological chemistry* 1994 Jan 28;269(4):2399-404 (full text)
- [58] Lang E, Qadri SM, Lang F et al. Killing me softly - suicidal erythrocyte death. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2012 Aug;44(8):1236-43
- [59] Wood BL, Gibson DF, Tait JF et al. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. *Blood* 1996 Sep 1;88(5):1873-80 (full text)
- [60] Bonomini M, Sirolli V, Settefrati N et al. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1999 Sep;10(9):1982-90 (full text)
- [61] Pavone B, Bucci S, Sirolli V et al. Beta2-microglobulin causes abnormal phosphatidylserine exposure in human red blood cells. *Molecular bioSystems* 2011 Mar;7(3):651-8
- [62] Ahmed MS, Langer H, Abed M et al. The uremic toxin acrolein promotes suicidal erythrocyte death. *Kidney & blood pressure research* 2013;37(2-3):158-67 (full text)
- [63] Ahmed MS, Abed M, Voelkl J et al. Triggering of suicidal erythrocyte death by uremic toxin indoxyl sulfate. *BMC nephrology* 2013 Nov 4;14:244 (full text)
- [64] Bonomini M, Ballone E, Di Stante S et al. Removal of uremic plasma factor(s) using different dialysis modalities reduces phosphatidylserine exposure in red blood cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2004 Jan;19(1):68-74 (full text)
- [65] Sirolli V, Cappelli P, Amoroso L et al. [On-line HFR and removal of uremic toxins inducing the loss of phospholipidic asymmetry of the erythrocyte membrane]. *Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Società italiana di nefrologia* 2004 Nov-Dec;21 Suppl 30:S208-11
- [66] Sun Y, Liu G, Li X et al. L-Carnitine inhibits eryptosis induced by uremic serum and the related mechanisms. *Renal failure* 2015 Jul;37(6):1050-6
- [67] Arduini A, Bonomini M, Clutterbuck EJ et al. Effect of L-carnitine administration on erythrocyte survival in haemodialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2006 Sep;21(9):2671-2 (full text)
- [68] Bi SH, Cheng LT, Wang T et al. The role of erythrocytes phosphatidylserine exposure in anemia in peritoneal dialysis patients. *Renal failure* 2006;28(7):573-6
- [69] Kong QY, Wu X, Li J et al. Loss of phospholipids asymmetry in red blood cells contributes to anemia in uremic patients. *Advances in peritoneal dialysis. Conference on Peritoneal Dialysis* 2001;17:58-60
- [70] Bonomini M, Sirolli V, Reale M et al. Involvement of phosphatidylserine exposure in the recognition and phagocytosis of uremic erythrocytes. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2001 Apr;37(4):807-14
- [71] Kalicki RM, Uehlinger DE Red cell survival in relation to changes in the hematocrit: more important than you think. *Blood purification* 2008;26(4):355-60
- [72] Kalantar-Zadeh K, Aronoff GR Hemoglobin variability in anemia of chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2009 Mar;20(3):479-87 (full text)
- [73] Yang W, Israni RK, Brunelli SM et al. Hemoglobin variability and mortality in ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2007 Dec;18(12):3164-70 (full text)
- [74] Eberst ME, Berkowitz LR Hemostasis in renal disease: pathophysiology and management. *The American journal of medicine* 1994 Feb;96(2):168-79
- [75] Pavord S, Myers B Bleeding and thrombotic complications of kidney disease. *Blood reviews* 2011 Nov;25(6):271-8
- [76] Olesen JB, Lip GY, Kamper AL et al. Stroke and bleeding in atrial fibrillation with chronic kidney disease. *The New England journal of medicine* 2012 Aug 16;367(7):625-35 (full text)
- [77] Nakamura Y, Chida Y, Tomura S et al. Enhanced coagulation-fibrinolysis in patients on regular hemodialysis treatment. *Nephron* 1991;58(2):201-4
- [78] Ito T, Niwa T, Matsui E et al. Fibrinolytic activity in renal disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1972 Jan;36(1):145-51
- [79] Sagripanti A, Cozza V, Baicchi U et al. Increased thrombin generation in patients with chronic renal failure. *International journal of clinical & laboratory research* 1997;27(1):72-5
- [80] Tomura S, Nakamura Y, Deguchi F et al. Coagulation and fibrinolysis in patients with chronic renal failure undergoing conservative treatment. *Thrombosis research* 1991 Oct 1;64(1):81-90
- [81] Shashar M, Francis J, Chitalia V et al. Thrombosis in the uremic milieu--emerging role of "thrombolome". *Seminars in dialysis* 2015 Mar-Apr;28(2):198-205
- [82] Gao C, Xie R, Yu C et al. Thrombotic Role of Blood and Endothelial Cells in Uremia through Phosphatidylserine Exposure and Microparticle Release. *PLoS one* 2015 Nov 16;10(11):e0142835 (full text)
- [83] Vance JE, Steenbergen R Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Progress in lipid research* 2005 Jul;44(4):207-34

- [84] Helley D, Eldor A, Girot R et al. Increased procoagulant activity of red blood cells from patients with homozygous sickle cell disease and beta-thalassemia. *Thrombosis and haemostasis* 1996 Sep;76(3):322-7
- [85] Setty BN, Rao AK, Stuart MJ et al. Thrombophilia in sickle cell disease: the red cell connection. *Blood* 2001 Dec 1;98(12):3228-33 (full text)
- [86] Bonomini M, Sirolli V, Merciaro G et al. Red blood cells may contribute to hypercoagulability in uraemia via enhanced surface exposure of phosphatidylserine. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2005 Feb;20(2):361-6 (full text)
- [87] Shantsila E, Montoro-García S, Gallego P et al. Circulating microparticles: challenges and perspectives of flow cytometric assessment. *Thrombosis and haemostasis* 2014 Jun;111(6):1009-14
- [88] Michel T, Feron O Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *The Journal of clinical investigation* 1997 Nov 1;100(9):2146-52
- [89] Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S et al. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6
- [90] Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ et al. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *The American journal of physiology* 1994 Nov;267(5 Pt 1):C1405-13
- [91] Behrendt D, Ganz P Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *The American journal of cardiology* 2002 Nov 21;90(10C):40L-48L
- [92] Morris ST, Jardine AG The vascular endothelium in chronic renal failure. *Journal of nephrology* 2000 Mar-Apr;13(2):96-105
- [93] Morris ST, McMurray JJ, Rodger RS et al. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in uraemia. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2000 Aug;15(8):1194-200 (full text)
- [94] Passauer J, Busesmaker E, Range U et al. Evidence in vivo showing increase of baseline nitric oxide generation and impairment of endothelium-dependent vasodilation in normotensive patients on chronic hemodialysis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2000 Sep;11(9):1726-34 (full text)
- [95] Bonomini M, Reale M, Santarelli P et al. Serum levels of soluble adhesion molecules in chronic renal failure and dialysis patients. *Nephron* 1998 Aug;79(4):399-407
- [96] Stam F, van Guldener C, Schalkwijk CG et al. Impaired renal function is associated with markers of endothelial dysfunction and increased inflammatory activity. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2003 May;18(5):892-8 (full text)
- [97] Lancaster JR Jr Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994 Aug 16;91(17):8137-41 (full text)
- [98] Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Gladwin MT et al. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006 Apr;26(4):697-705 (full text)
- [99] Webb AJ, Milsom AB, Rathod KS et al. Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to nitric oxide in hypoxia: role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation research* 2008 Oct 24;103(9):957-64 (full text)
- [100] Chen LY, Mehta JL Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1998 Jul;32(1):57-61
- [101] Schechter AN Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 2008 Nov 15;112(10):3927-38 (full text)
- [102] Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 2006 Apr 1;107(7):2943-51 (full text)
- [103] Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC et al. Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients. *Anticancer research* 1995 Jul-Aug;15(4):1435-46
- [104] Jubelin BC, Gierman JL Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *American journal of hypertension* 1996 Dec;9(12 Pt 1):1214-9
- [105] Ozüyan B, Grau M, Kelm M et al. RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. *Trends in molecular medicine* 2008 Jul;14(7):314-22
- [106] Cortese-Krott MM, Rodriguez-Mateos A, Sansone R et al. Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. *Blood* 2012 Nov 15;120(20):4229-37 (full text)
- [107] Eligini S, Porro B, Lualdi A et al. Nitric oxide synthetic pathway in red blood cells is impaired in coronary artery disease. *PLoS one* 2013;8(8):e66945 (full text)
- [108] Keymel S, Heiss C, Kleinbongard P et al. Impaired red blood cell deformability in patients with coronary artery disease and diabetes mellitus. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 2011 Oct;43(11):760-5
- [109] Grau M, Mozar A, Charlot K et al. High red blood cell nitric oxide synthase activation is not associated with improved vascular function and red blood cell deformability in sickle cell anaemia. *British journal of haematology* 2015 Mar;168(5):728-36
- [110] Savu O, Iosif L, Bradescu OM et al. L-arginine catabolism is driven mainly towards nitric oxide synthesis in the erythrocytes of patients with type 2 diabetes at first clinical onset. *Annals of clinical biochemistry* 2015 Jan;52(Pt 1):135-43
- [111] Bizjak DA, Brinkmann C, Bloch W et al. Increase in Red Blood Cell-Nitric Oxide Synthase Dependent Nitric Oxide Production during Red Blood Cell Aging in Health and Disease: A Study on Age Dependent Changes of Rheologic and Enzymatic Properties in Red Blood Cells. *PLoS one* 2015 Apr 22;10(4):e0125206 (full text)
- [112] Di Pietro N, Giardinelli A, Sirolli V et al. Nitric oxide synthetic pathway and cGMP levels are altered in red blood cells from end-stage renal disease patients. *Molecular and cellular biochemistry* 2016 Jun;417(1-2):155-67
- [113] Reis PF, da Silva CD, Brunini TM et al. Plasma amino acid profile and L-arginine uptake in red blood cells from malnourished uremic patients. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation* 2006 Oct;16(4):325-31

- [114] Siqueira MA, Brunini TM, Pereira NR et al. Increased nitric oxide production in platelets from severe chronic renal failure patients. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 2011 Feb;89(2):97-102
- [115] DeBari VA, Bennun A Cyclic GMP in the human erythrocyte. Intracellular levels and transport in normal subjects and chronic hemodialysis patients. *Clinical biochemistry* 1982 Aug;15(4):219-21
- [116] Wu CP, Woodcock H, Hladky SB et al. cGMP (guanosine 3',5'-cyclic monophosphate) transport across human erythrocyte membranes. *Biochemical pharmacology* 2005 Apr 15;69(8):1257-62
- [117] Bonomini M, Sirolli V, Gizzi F et al. Enhanced adherence of human uremic erythrocytes to vascular endothelium: role of phosphatidylserine exposure. *Kidney international* 2002 Oct;62(4):1358-63 (full text)
- [118] Bonomini M, Pandolfi A, Di Pietro N et al. Adherence of uremic erythrocytes to vascular endothelium decreases endothelial nitric oxide synthase expression. *Kidney international* 2005 May;67(5):1899-906 (full text)
- [119] Hebbel RP, Mohandas N: Sick cell adherence, in *Sickle Cell Disease: Basic Principles and Clinical Practice*, edited by Embyry SH, Hebbel RP, Mohandas N, Steinberg MH, New York, Raven Press, Ltd., 1994, pp 217-230.
- [120] Mosseri M, Bartlett-Pandite AN, Wenc K et al. Inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by sickle erythrocytes. *American heart journal* 1993 Aug;126(2):338-46
- [121] Goligorsky MS Endothelial cell dysfunction and nitric oxide synthase. *Kidney international* 2000 Sep;58(3):1360-76 (full text)
- [122] Naruse K, Shimizu K, Muramatsu M et al. Long-term inhibition of NO synthesis promotes atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. PGH2 does not contribute to impaired endothelium-dependent relaxation. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology* 1994 May;14(5):746-52 (full text)
- [123] Pandolfi A, Di Pietro N, Sirolli V et al. Mechanisms of uremic erythrocyte-induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *Journal of cellular physiology* 2007 Dec;213(3):699-709
- [124] Madonna R, Pandolfi A, Massaro M et al. Insulin enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human cultured endothelial cells through a pro-atherogenic pathway mediated by p38 mitogen-activated protein-kinase. *Diabetologia* 2004 Mar;47(3):532-6
- [125] Mukai Y, Rikitake Y, Shiojima I et al. Decreased vascular lesion formation in mice with inducible endothelial-specific expression of protein kinase Akt. *The Journal of clinical investigation* 2006 Feb;116(2):334-43
- [126] De Caterina R, Libby P, Peng HB et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *The Journal of clinical investigation* 1995 Jul;96(1):60-8
- [127] Ross R Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* 1999 Jan 14;340(2):115-26
- [128] Manodori AB, Barabino GA, Lubin BH et al. Adherence of phosphatidylserine-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin. *Blood* 2000 Feb 15;95(4):1293-300 (full text)
- [129] Xiao S, Schmidt RJ, Baylis C et al. Plasma from ESRD patients inhibits nitric oxide synthase activity in cultured human and bovine endothelial cells. *Acta physiologica Scandinavica* 2000 Jan;168(1):175-9